

# Über die Ursache der Schwefelsäure-Fluoreszenzreaktion der Gallensäuren.

Von  
**Fritz Pregl.**

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Graz)  
Der Redaktion zugegangen am 11. Mai 1905.)

Eine alte, empirische Reaktion der Gallensäuren ist die Schwefelsäurereaktion: in konzentrierter Schwefelsäure lösen sich die Gallensäuren schon in der Kälte, leichter bei gelindem Erwärmen; die Lösung zeigt eine gelbrote Farbe im durchfallenden Lichte und prachtvolle, grünliche Fluoreszenz im auffallenden Lichte.

Die Beziehungen, die anderweitig vielfach schon zwischen Farbe und Fluoreszenz einerseits und chemischer Konstitution andererseits ermittelt worden sind, luden um so mehr zu einer Untersuchung der genannten Reaktion ein, als bisher weder der diese Fluoreszenzerscheinung bedingende Körper isoliert, noch die Konstitution der Gallensäuren bis heute aufgeklärt ist.

Schon beim Anstellen dieser Reaktion im kleinen kann man die Beobachtung machen, daß dabei der Geruch nach schwefeliger Säure auftritt, und kann sich somit überzeugen, daß die Schwefelsäure hier die Rolle eines Oxydationsmittels spielt.

Für die Isolierung des die Fluoreszenzerscheinung bedingenden Reaktionsproduktes hat sich nach mehrfachen Abänderungen folgendes Verfahren als geeignet erwiesen:

In einem Kölbchen übergießt man 20 g getrockneter Cholalsäure mit 50 cem Eisessig, fügt unter Umschütteln 10 cem konzentrierte Schwefelsäure zu, setzt ein Steigrohr auf und erhitzt über kleiner Flamme zum Sieden. Dabei färbt sich das Gemisch zuerst intensiv rot und es beginnen Ströme von

schwefeliger Säure zu entweichen; bei weiterem Erhitzen treten allmählich gelblich-grünliche und noch dunklere Farbentöne und reichliche Schwefelabscheidungen im Steigrohr auf, bis das weitere Erhitzen nach  $5\frac{1}{4}$  Stunden infolge Stoßens unterbrochen werden muß. Die noch warme Lösung gießt man in ca. ein Liter kalten Wassers und saugt die olivgrüne Fällung nach Zusatz von  $\frac{1}{4}$  Volumen gesättigter Steinsalzlösung ab. Der erhaltene Niederschlag löst sich, noch feucht, sehr leicht in Ather: seine Lösung wird sofort einigemal mit Wasser ausgeschüttelt, um den Rest von Essigsäure zu entfernen, und hierauf so lange mit sehr verdünnter Natronlauge behandelt, bis diese nichts durch Säuren Fällbares mehr aufnimmt.

Diese alkalischen Ausschüttelungen zeigen im durchfallenden Licht gelbrote Färbung, im auffallenden eine grünliche Fluoreszenz. Zusatz von  $\frac{1}{3}$  Volumen konzentrierter Steinsalzlösung oder konzentrierter Natronlauge fällt daraus das alkohollösliche Na-Salz einer organischen Säure, weshalb bei den Ausschüttelungen nur sehr verdünnte Na-Lauge zu verwenden ist, wenn Fällungen vermieden werden sollen. Mit verdünnter Schwefel- oder Salzsäure fällt aus den alkalischen Ausschüttelungen die freie, in Wasser unlösliche organische Säure aus, die, in konzentrierter Schwefelsäure gelöst, keine Fluoreszenz zeigt.

Hingegen zeigt der Rückstand der abdestillierten ätherischen Lösung diese Eigenschaft in hohem Maße: eine Spur davon, in kalter konzentrierter Schwefelsäure gelöst, verleiht dieser orangerote Färbung im durchfallenden und prachtvolle grünliche Fluoreszenz im auffallenden Lichte. Der gesuchte Körper ist demnach in der ausgeschüttelten ätherischen Lösung enthalten. Da er in keiner Weise zum Kristallisieren zu bringen war, mußte in anderer Weise eine Reinigung versucht werden. Durch Abkühlen seiner heißen, verdünnt-alkoholischen Lösung schied sich ein Teil aus, und durch Zusatz von Wasser zur abgossenen Lösung, Erwärmen bis zum Eintritt der Lösung des Ausgeschiedenen, Abkühlen und öftere Wiederholung dieses Vorganges konnten mehrere Fraktionen erhalten werden, von denen die erste bei  $150\text{--}160^\circ$  schmolz, die übrigen hingegen zwischen  $80$  und  $100^\circ$ .

Um die in Alkohol leicht löslichen Fraktionen in eine Form zu bringen, in der sie leicht getrocknet und analysiert werden können, wurde jede in Alkohol gelöst und durch Eingießen in viel Wasser wieder ausgeschieden. Diese Ausscheidungen sind immer kolloid und gehen milchig durch das Filter; erst nach Zusatz von etwas Steinsalzlösung gelingt es, eine flockige Fällung zu erhalten, welche abgesaugt, vollends mit Wasser gewaschen und im Vacuum getrocknet werden kann. Die drei letzten, in Alkohol am leichtesten löslichen Fraktionen zeigten danach folgende Zusammensetzung:

82,51°	83,63°	84,11°
8,26°	8,55°	8,74°
		C
		H

Die in Alkohol am schwersten lösliche 1. Fraktion erwies sich als in Petroläther völlig unlöslich und zeigte, in konzentrierter Schwefelsäure gelöst, einen auffallenden bräunlichen, nicht roten, Farbenton, während die übrigen Fraktionen die typische Schwefelsäurereaktion zeigten und sich als zum bei weitem größten Teile in Petroläther löslich erwiesen. Eine weitere Reinigung konnte daher so durchgeführt werden, daß sowohl die besprochenen Fraktionen, als auch bei späteren Darstellungen der Rückstand der ätherischen Lösung in wenig Alkohol gelöst, im Scheidetrichter mit Petroläther (Siedepunkt 30—50°) versetzt und wiederholt mit viel Wasser ausgeschüttelt wurde. Dabei schieden sich die in Alkohol schwer und in Petroläther unlöslichen Beimengungen ab, und der die typische Schwefelsäurefluoreszenzreaktion bedingende Körper blieb allein im Petroläther in Lösung. Der Rückstand nach dem Abdestillieren des Petroläthers wurde wieder in Alkohol gelöst, in Wasser gegossen, durch Zusatz von Steinsalzlösung ausgeflockt, abgesaugt, gewaschen und über Schwefelsäure und Paraffin getrocknet und im automatischen Verbrennungsofen verbrannt.

1.	0,1630 g	Substanz	lieferten	0,1260 g	H <sub>2</sub> O	und	0,5170 g	CO <sub>2</sub>
2.	0,1467	»	»	0,1132	»	»	0,4646	»
3.	0,1578	»	»	0,1227	»	»	0,4992	»
4.	0,1832	»	»	0,1407	»	»	0,5792	»
5.	0,1597	»	»	0,1264	»	»	0,5050	»
6.	0,1653	»	»	0,1282	»	»	0,5204	»

		In 100 Teilen:					
		1.	2.	3.	4.	5.	6.
C	86.50	86.37	86.27	86.23	86.43	85.88	
H	8.65	8.63	8.69	8.59	8.86	8.68	

Berechnet für

$C_{24}H_{28}O$ :	$C_{23}H_{27}O$ :
C 86.69%	86.46%
H 8.49%	8.52%

Die gefundenen Zahlen lassen den Schluß ziehen, daß diese Präparate ihrer Hauptmenge nach als einheitlich anzusehen sind, und daß ihnen die wahrscheinliche Formel  $C_{24}H_{28}O$  zukommt. Neben dieser käme auch die Formel  $C_{23}H_{27}O$  in Betracht.

Zugunsten der einfachen Formel entscheiden zwei Molekulargewichtsbestimmungen; von denen die eine nach dem kryoskopischen Verfahren mit Benzol als Lösungsmittel, die andere nach dem ebullioskopischen Verfahren mit Äther als Lösungsmittel ausgeführt wurden.

Benzol. G. = 9,95 g		
Substanzmenge g	$\Delta$	$M = \frac{100 \cdot g \cdot K}{(G + g) \Delta}$
0,207	0,283	367
0,354	0,488	359

Äther. G. = 8,70 g		
Substanzmenge g	$\Delta$	$M = \frac{100 \cdot g \cdot K}{(G + g) \Delta}$
0,120	0,080	359
0,306	0,192	373

Für die Formel  $C_{24}H_{28}O$  ergibt die Rechnung ein Molekulargewicht von 332.

Dieser Körper, den ich aus Gründen, die später angeführt werden sollen, Dehydrocholon nennen will, zeigt folgende Eigenschaften: Er ist leicht löslich in Alkohol, Äther, Benzol, Chloroform, Petroläther, Eisessig; unlöslich hingegen in Wasser, Alkalien und verdünnten Mineralsäuren. Im Kapillarrohr erhitzt, schmilzt er zwischen 90 und 100° zu einem braunen, durchsichtigen Tropfen zusammen. Seine alkoholische Lösung ist bei niedrigen Konzentrationsgraden strohgelb, und spektroskopisch zeigen solche Lösungen eine allmähliche Verdunkelung des vio-

letten Endes des Spektrums schon von der Linie B angefangen, besonders deutlich ist die Verdunkelung von der Linie G an.

Ganz verdünnte Lösungen dieses Körpers in konzentrierter Schwefelsäure erscheinen im durchfallenden Lichte gelblich-rötlich, und im auffallenden Lichte zeigen sie die schon mehrfach erwähnte prachtvolle grünliche Fluoreszenz. Vor dem Spalte des Spektroskopes untersucht, zeigen solche Lösungen einen schmalen Absorptionsstreifen über der Linie D und eine deutliche Verdunkelung des violetten Endes des Spektrums von der Linie F angefangen; etwas konzentriertere Lösungen erscheinen im durchfallenden Lichte deutlich rot und lassen, wie die spektroskopische Untersuchung zeigt, zu beiden Seiten des tiefdunklen Absorptionsstreifens bei D nur einerseits rotes, andererseits etwas grünes Licht durch. Noch konzentriertere Lösungen lassen überhaupt nur noch sichtbares rotes Licht durch.

Konzentrierte Salpetersäure wirkt schon in der Kälte, noch besser in der Wärme oxydierend auf den Körper ein. Dabei geht das Reaktionsprodukt in Lösung und läßt sich durch Zusatz von Wasser als hellgelbe, stickstoffhaltige Säure ausfällen. Die bisherigen Bestimmungen von Kohlenstoff, Wasserstoff, Stickstoff und Karboxyl, sowie die Ausbeute, weisen auf eine Dinitrodikarbonsäure hin. Durch Einwirkung von Ketonreagentien auf Dehydrocholon ist es mir bisher nicht gelungen, zu fassbaren Reaktionsprodukten zu kommen.

Vergleicht man die wahrscheinliche Formel dieses fluoreszierenden Körpers  $C_{21}H_{28}O$  mit der Formel des Grundkohlenwasserstoffs<sup>1)</sup> der Cholsäure  $C_{21}H_{42}$ , aus welcher er unter Einwirkung von Schwefelsäure entstanden ist, so ergibt sich unter der Annahme, daß das einzige Sauerstoffatom des Dehydrocholons einer Ketongruppe angehört, ein Mindergehalt von 12 Wasserstoffatomen, und man gelangt unter Berücksichtigung des Umstandes, daß bei der in Rede stehenden Reaktion die Schwefelsäure als Oxydationsmittel gewirkt hat, und daß dabei ein nitrierbarer Körper entstanden ist, zu der Vermutung, daß hierbei eine hydrierte cyclische Verbindung, die Cholsäure, in eine

<sup>1)</sup> Landsteiner, Über Cholsäure, Diese Zeitschrift, Bd. XIX, S. 285 (1894).

dehydrierte cyclische Verbindung, Dehydrocholon, übergegangen ist, ähnlich wie hydroaromatische Verbindungen unter Verlust von Wasserstoffatomen in aromatische übergehen.

Wenn aber diese Anschauung zutrifft, so müssen bei dieser Reaktion einfache, wenn auch ringförmige Kohlenstoffbindungen in benzolartige Kohlenstoffbindungen übergegangen sein, die sich in optischer Beziehung ebenso wie doppelte oder Äthylenbindungen zu erkennen geben, und die Molekularrefraktion und die Molekulardispersion müßten dann größere Werte im dehydrierten Körper aufweisen, als sie die Berechnung der Summe der Atomdispersionen unter der Voraussetzung nur einfacher Kohlenstoffbindungen ergibt.

Solche Bestimmungen wurden von mir im Institut für physikalische Chemie zu Leipzig an alkoholischen Lösungen mit dem neuen Pulfrichschen Refraktometer bei Natrium- und Wasserstofflicht ausgeführt. Um ein vergleichbares Versuchsmaterial zu erhalten, bestimmte ich in zwei Versuchen die Molekularrefraktion und -dispersion der Cholalsäure, und in drei weiteren Versuchen die Molekularrefraktion des Dehydrocholons: die Dispersion dieses Körpers konnte wegen der Lichtabsorption seiner Lösung im violetten Ende des Spektrums nicht mit Sicherheit bestimmt werden.

Jeder Versuch wurde in folgender Weise ausgeführt: Gewogene Mengen der getrockneten Substanz wurden in gewogenen Mengen starken Alkohols gelöst, und die Dichte der Lösung sowohl, als auch die des verwendeten Alkohols bei 20° im Ostwaldschen Pyknometer bestimmt. Sofort darauf erfolgte die Bestimmung des Brechungsexponenten dieser Lösung und dieses Alkohols für die drei Lichtarten H $\alpha$ , D und H $\gamma$ , und zwar entweder in zwei Versuchen bei einer Temperatur von 20°, oder nach der optischen Differenzialmethode im geteilten Trog gleichzeitig.

Aus diesen Bestimmungen wurde dann nach der Mischungsregel

$$R = R_1 \frac{p}{100} + R_2 \frac{100 - p}{100},$$

worin R, R<sub>1</sub> und R<sub>2</sub> den entsprechenden Ausdruck für  $\frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \cdot \frac{1}{d}$

und  $p$  den Prozentgehalt der Lösung bedeutet, der Wert von  $R_1$  für den gelösten Stoff berechnet. Der größeren Genauigkeit wegen erfolgte die Berechnung der Ausdrücke  $\frac{n^2 - 1}{n^2 + 2}$  mit Benützung von Vegas 7stelligen Logarithmentafeln.<sup>1)</sup>

### Cholalsäure, kristallalkoholfrei.

#### 1. Versuch.

Alkohol $d_{20} = 0,795843$	Lösung $d_{20} = 0,79998$ , $p^{\circ} = 1,51207$
Ha $60^{\circ} 56'$ $n = 1,36013$	$60^{\circ} 35'$ $n = 1,36206$
D $61^{\circ} 40'$ $1,36198$	$61^{\circ} 18'$ $1,36395$
Hf $65^{\circ} 31'$ $1,36953$	$65^{\circ} 6'$ $1,37152$

#### 2. Versuch.

Alkohol $d_{20} = 0,796229$	Lösung $d_{20} = 0,80146$ , $p^{\circ} = 1,84198$
Ha $60^{\circ} 50'$ $n = 1,36068$	$60^{\circ} 23'$ $n = 1,36315$
D $61^{\circ} 34'$ $1,36252$	$61^{\circ} 06'$ $1,36503$
Hf $65^{\circ} 23'$ $1,37015$	$64^{\circ} 52'$ $1,37267$

### Molekularrefraktion der Cholalsäure.

$$M \cdot \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \cdot \frac{1}{d}$$

berechnet aus dem

1. Versuch	2. Versuch
Ha 110,36	110,83
D 111,44	111,67
Hf 113,14	112,98

Berechnet für die Formel  $C_{24}H_{40}O_6$  unter der Voraussetzung nur einfacher Kohlenstoffbindungen aus der Summe der Atomrefraktionen

109,23
110,43
111,76

### Molekulardispersion der Cholalsäure

Ha: 2,78                      D: 2,15                      Hf: 2,53

### Dehydrocholon.

#### 1. Versuch.

Alkohol $d_{20} = 0,795843$	Lösung $d_{20} = 0,807239$ , $p^{\circ} = 4,76578$
Ha $60^{\circ} 56'$ $n = 1,36013$	$59^{\circ} 25'$ $n = 1,36851$
D $61^{\circ} 40'$ $1,36198$	$60^{\circ} 4'$ $1,37067$

#### 2. Versuch.

Alkohol $d_{20} = 0,795843$	Lösung $d_{20} = 0,799655$ , $p^{\circ} = 1,61653$
Ha $60^{\circ} 56'$ $n = 1,36013$	$60^{\circ} 27'$ $n = 1,36278$
D $61^{\circ} 40'$ $1,36198$	$61^{\circ} 10'$ $1,36467$

<sup>1)</sup> Über die Einzelheiten des Verfahrens und der Berechnung siehe: Nernst, Theoretische Chemie, 3. Aufl. 1900, S. 107 und 309; ferner Brühl, Zeitschrift f. physikal. Chem., Bd. VII, S. 140 (1891).

### 3. Versuch.

Alkohol $d_{20} = 0.796026$	Lösung $d_{20} = 0.810562$ , $p^0_{20} = 5.93167$
Ha $60^\circ 52'$ $n = 1.36050$	$58^\circ 59'$ $n = 1.37094$
D $61^\circ 36'$ $1.36234$	$59^\circ 38'$ $1.37307$

#### Molekularrefraktion des Dehydrocholons.

$$M \cdot \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \cdot \frac{1}{d}$$

berechnet aus dem

	1. Versuch	2. Versuch	3. Versuch
Ha	104.59	102.44	103.89
D	106.40	103.23	105.23

$$M \cdot \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \cdot \frac{1}{d}$$

berechnet aus dem

	1. Versuch	2. Versuch	3. Versuch
Ha	100.05	98.44	99.82
D	102.24	99.19	101.12

a) Berechnet für die Formel  $C_{24}H_{25}O$  aus der Summe der Atomrefraktionen unter der Voraussetzung nur einfacher Kohlenstoffbindungen:

89.97  
91.74

b) Berechnet für die Formel  $C_{23}H_{27}O$  aus der Summe der Atomrefraktionen unter der Voraussetzung nur einfacher Kohlenstoffbindungen:

86.50  
88.19

Der Vergleich der theoretisch unter der Voraussetzung nur einfacher Kohlenstoffbindungen aus der Summe der Atomrefraktionen für die Cholalsäure berechneten Werte mit den aus den direkten Bestimmungen abgeleiteten ergibt eine große Übereinstimmung: die geringen Abweichungen der gefundenen Werte von den berechneten erreichen in keinem Falle den Wert der Refraktion einer Äthylenbindung. Diese Übereinstimmung ist um so befriedigender, als wegen der geringen Löslichkeit ganz reiner Cholalsäure nur sehr verdünnte Lösungen verwendet werden konnten, und demgemäß auch schon kleine Beobachtungsfehler infolge der Anwendung der Mischungsregel das Resultat bedeutend beeinflusst hätten.

In demselben Sinne stimmen auch die Werte für die Molekulardispersion überein, so daß man sagen kann: Die Bestimmungen der Molekularrefraktion und -dispersion geben keinen Anhaltspunkt für die Annahme doppelter oder benzolartiger Kohlenstoffbindungen in der Cholalsäure.

Dem gegenüber verhält sich das Dehydrocholon wesentlich anders: In allen drei Versuchen sind die für die Molekularrefraktion gefundenen Werte viel größer, als die aus der Summe

der Atomrefraktionen unter der Voraussetzung nur einfacher Kohlenstoffbindungen berechnet, und trotz der Schwankungen, die diese Refraktionsüberschüsse in den einzelnen Versuchen aufweisen, sind sie durchwegs so beträchtlich, daß sie nur durch die Annahme von doppelten oder diesen optisch ganz gleichwertigen benzolartigen Bindungen erklärt werden können. Diese Refraktionsüberschüsse erreichen den Wert von mindestens sechs derartigen Doppelbindungen.

Zu ganz gleichsinnigen Ergebnissen, d. h. zu Überschüssen der beobachteten über die berechneten Werte gelangt man ebenfalls, wenn man von der Aufstellung einer Formel vollends absieht und die Berechnungen lediglich auf Grund des aus den Analysen sich ergebenden Verhältnisses von C : H : O und auf Grund des direkt bestimmten Molekulargewichtes durchführt. Ferner muß noch bemerkt werden, daß auch in dem Falle, als das Dehydrocholon trotz der übereinstimmenden Analysenzahlen nicht der Hauptmenge nach einheitlich, sondern ein Gemenge von Körpern gleicher Löslichkeit sein sollte, das Vorhandensein von Refraktionsüberschüssen für die Bestandteile des Gemenges angenommen werden muß, weil die Refraktion eine additive Eigenschaft der Atome ist.

Gegen eine Erklärung dieser Refraktionsüberschüsse durch Kohlenstoffringe, die lediglich erst sekundär unter dem Einflusse der Schwefelsäure zustande gekommen sein sollten, sprechen einige andere Beobachtungen, die ich vorläufig nur kurz anführen will. Es gelingt auch auf dem Wege anderer Reaktionen, die ebenfalls zur Dehydrierung hydroaromatischer Verbindungen in Verwendung stehen, von der Cholalsäure zu Körpern zu kommen, die sich ebenso durch einen bedeutenden Mindergehalt an Wasserstoffatomen und durch die Eigenschaft auszeichnen, unter der Einwirkung kochender konzentrierter Salpetersäure gelb gefärbte, nitrierte Säuren zu liefern.

So erhält man durch Kochen von Cholalsäure in Eisessig mit wechselnden Mengen von Jod und nachträgliche Reduktion mit Zinkstaub je nach der Menge des angewandten Jods verschiedene halogenfreie Dehydrierungsprodukte, die teils noch den Charakter von Säuren an sich tragen, teils indifferente

Körper sind. Durch Einwirkung von trockenem Brom auf trockene Cholalsäure konnte ich vor einiger Zeit im Vereine mit Herrn Prof. Hugo Schrötter ein bromhaltiges Dehydrierungsprodukt erhalten, dessen Zusammensetzung annähernd durch die Formel  $C_{24}H_{20}Br_8$  gekennzeichnet ist, und aus dem unter der Einwirkung von Reduktionsmitteln wohl bromärmere, aber keine halogenfreien Produkte erhalten werden konnten.

Ferner gelangt man nach dem Verfahren von Vesterberg,<sup>1)</sup> welches zur Gewinnung von Reten aus Abietinsäure geführt hat, durch Zusammenschmelzen von Schwefel mit Cholalsäure, wobei Schwefelwasserstoff entweicht, ebenfalls zu einer dehydrierten, nitrierbaren Säure.

Berücksichtigt man alle die angeführten Tatsachen, sowie auch den Umstand, daß die Cholalsäure selbst weder direkt nitrierbar ist, noch bisher bei der Oxydation faßbare aromatische Produkte geliefert hat, und das gesamte, bis heute bekannte Verhalten der Chlorsäure, so ergibt sich als wahrscheinliche Erklärung dafür die Anschauung, daß die Cholalsäure den hydrierten carbocyclischen Verbindungen angehört.

Bei dieser Gelegenheit teile ich auch noch die Ergebnisse zweier Versuche mit, die die Ermittlung der in physiologischer Beziehung kennenswerten Verbrennungswärme der Cholalsäure zum Zwecke hatten.

Die Bestimmungen wurden in der kalorimetrischen Bombe durch Verbrennung in reinem Sauerstoff bei konstantem Volumen und einem Druck von 25 Atmosphären ausgeführt, nachdem der Wasserwert des gesamten Apparates, durch Verbrennung von Naphtalin und Phthalsäureanhydrid aufs sorgfältigste bestimmt, zu nahezu völlig übereinstimmenden Werten geführt hatte.

Danach ergab sich für die Verbrennungswärme von 1 g reiner, kristallalkoholfreier Cholalsäure in

$$\text{Versuch 1: } 8105 \text{ cal.} = 33.903 \text{ J} = 33.903 \times 10^{10} \text{ Erg} = 34.574 \text{ mkg}$$

$$\text{» 2: } 8101 \text{ »} = 33.887 \text{ J} = 33.887 \times 10^{10} \text{ »} = 34.561 \text{ »}$$

---


$$\text{Mittel: } 8103 \text{ cal.} = 33.900 \text{ J} = 33.900 \times 10^{10} \text{ Erg} = 34.567 \text{ mkg}$$

<sup>1)</sup> Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXVI, S. 420 (1903).