

Erfahrungen über die Isolierung der spezifischen Gallensäuren.

Von

Fritz Pregl und Dr. **Hans Buchtala**, Assistenten am Institute.

(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Universität Graz.
Vorstand: Hofrat K. B. Hofmann.)

(Der Redaktion zugegangen am 28. Juli 1911.)

I. Über die Säuren der Grazer Sommer-Rindergalle.

A. Trennungsversuche.

Ältere Beobachtungen des einen von uns¹⁾ darüber, daß die Krystallisationsfähigkeit der rohen Cholalsäure bei Verwendung von Alkohol als Lösungsmittel nicht mehr vorhanden ist, wenn die Carboxylzahl unter den Wert von 10% sinkt (was in Versuchen mit Sommergallen zugetroffen ist), sowie Anschauungen, die aus der Arbeit Langhelds hervorgehen, waren die Veranlassung, die Zusammensetzung der sogenannten rohen Cholalsäure der Grazer Rindergalle einmal im Winter und das andere Mal im Sommer einer genauen Untersuchung in bezug auf die quantitativen Verhältnisse zu unterziehen. Besonders aussichtsreich erschien uns diese Untersuchung, nachdem Langheld²⁾ ein völlig neues Verfahren für die Aufarbeitung der wasserunlöslichen Säuren der Rindergalle angegeben hat, die nach dem Kochen der Galle mit Natronlauge daraus zu erhalten sind. Von der Brauchbarkeit dieser Methode konnte sich der eine von uns schon im verflommenen Jahre dadurch überzeugen, daß er aus jenen Mutterlaugen, die bei der Gewinnung der Cholal- und Desoxycholsäure (aus den Jahren 1900 und 1901) in einer Menge von beinahe 1 kg Trockensubstanz übrig geblieben waren und welche bisher jedem Krystallisations-

¹⁾ Pregl. Monatshefte für Chemie 1903, S. 41 u. 42.

²⁾ Langheld. Ber. d. d. chem. Ges., Bd. 51, S. 378.

versuche getrotzt hatten, noch ganz erhebliche Mengen von Cholal-, Desoxychol- und sogar Choleinsäure gewinnen konnte.

Zu diesem Ende wurden in der zweiten Augsthälfte des Jahres 1909 im Grazer Schlachthause 25 kg, das sind ungefähr 22 l Rindergalle gesammelt, in zwei Portionen mit je 150 g Natriumhydroxyd durch 24 Stunden gekocht und nach dem Abkühlen mit verdünnter Salzsäure solange versetzt, als noch eine Fällung zu erhalten war. Diese stellte einen grünlich gefärbten, harzigen, an Vogelleim erinnernden Kuchen dar. Er wurde wiederholt mit Wasser durchgeknetet; das Gewicht dieses Kuchens betrug nach Abscheidung des bloß mechanisch beigemengten Wassers 1720 g. Nach längerem Stehen und öfterem Abgießen der sich ausscheidenden Wassermengen sank schließlich das Gewicht des plastischen Kuchens auf 983 g. Davon wurden zum Zwecke der Wassergehaltsbestimmung 8,43 g in einem Exsikkator über Schwefelsäure und Kalk vier Wochen lang bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Der Gewichtsverlust betrug 2,6 g. Das Trockengewicht der in Arbeit genommenen Substanzmenge beträgt sonach 674 g.

Entsprechend unserer ursprünglichen Absicht, genau nach dem Langheldschen Verfahren die Durcharbeitung vorzunehmen, lösten wir den noch etwas feuchten plastischen Rohsäurekuchen mit dem Gehalt von 674 g Trockensubstanz in 2 l Alkohol und unterwarfen diese Lösung einer energischen Vakuumdestillation, um die letzten Reste von anhaftendem Wasser zu entfernen. Der gewonnene Trockenrückstand wurde neuerlich in 2 l Alkohol gelöst und mit konzentrierter sirupöser Natronlauge bis zur bleibenden alkalischen Reaktion versetzt und hierauf am Rückflußkühler durch zwei Stunden gekocht.

Ganz entgegen den Angaben Langhelds und entgegen den mehrfachen Erfahrungen, die der eine von uns über die sonst so vorzügliche Methode der Abscheidung des Natronsalzes der Cholalsäure aus siedender alkoholischer Lösung gemacht hatte, schied sich in diesem Falle nichts aus; die Lösung blieb klar. Nach dem völligen Eindampfen dieser Lösung bis zur Trockene, wobei die letzten etwa störenden Beimengungen von Wasser entfernt worden sein mußten, und nach Auflösen dieses

Rückstandes in einer neuerlichen Menge von 2 l absoluten Alkohols zeigte sich abermals selbst nach zweistündigem Kochen nur eine klare Lösung.

Da Krystallisationsversuche mit den verschiedenen bisher üblichen Lösungsmitteln versagt hatten, wurde endlich folgender ans Ziel führende Weg für die Zerlegung dieser Rohsäuren in krystallisierte einheitliche Substanzen aufgefunden. Der nach neuerlicher Destillation im Vakuum erhaltene Trockenrückstand der alkalisch-alkoholischen Lösung wurde in seiner Gesamtheit in etwa 4 l Brunnenwasser gelöst und in einer 10 l fassenden Flasche mit 2 l Äther überschichtet und öfter durchgeschüttelt. Erst nach erfolgter Sättigung der wässerigen Schicht mit Äther wurde verdünnte Salzsäure zugesetzt, bis eine weitere Ausscheidung unlöslichen Materials nicht mehr zu beobachten war. Die nach häufigem Schütteln sich klar abscheidende ätherische Lösung wurde abgehebert, mit Natriumsulfat getrocknet und nach dem Abfiltrieren der Äther abdestilliert. Mit dem Destillat, sowie mit frischen Äthermengen wurde der Vorgang der Ausschüttelung etwa 10 mal wiederholt, bis nur mehr ein kaum nennenswerter Destillationsrückstand zu gewinnen war. Die gesamten vereinigten Destillationsrückstände der Ätherextrakte, im Gewichte von 374 g, bildeten nach längerem Stehen in der Kälte eine durchaus krystallisierte starre Masse.

Um eine annähernde Abtrennung der Fettsäuren von den spezifischen Gallensäuren zu erreichen, wurde die gesamte Krystallmasse in einem Kolben mit ungefähr 1 l Äther übergossen, eine Stunde lang am Rückflußkühler ausgekocht und nach mehrtägigem Stehen in der Kälte die ätherische Lösung abgesaugt. Letztere ergab nach dem Trocknen und Abdestillieren des Äthers einen Rückstand im Gewichte von 70 g. Er bestand zum größten Teil aus Fettsäuren.

Zur Trennung der Gallensäuren in dem vom Äther ungelöst gebliebenen Materiale wurde es in heißem Alkohol gelöst. Aus dieser Lösung konnte man nach dem Abkühlen drei Fraktionen einer rein weißen, schön krystallisierenden Substanz erhalten, welche, nach ihrer Krystallform zu urteilen, ein Gemenge aller drei Gallensäuren vorstellte. Ihrem Gewichte nach betrug:

Fraktion I 150 g

» II 30 »

» III 21 »

Da die übriggebliebene Mutterlauge wenig Tendenz zur Krystallisation zeigte, wurde sie mit einer gleichen Menge von Eisessig versetzt. Nach mehrtägigem Stehen in der Kälte schieden sich in der sirupös gewordenen Masse Krystalle aus, welche durch scharfes Absaugen von der Mutterlauge getrennt wurden. Sie wogen 50 g in völlig trockenem Zustande. Durch Anrühren der dickflüssigen Mutterlauge mit einem Gemisch von Aceton und Äther im Verhältnis 1 : 3 konnte daraus noch eine weitere krystallisierte Fraktion im Gewichte von 30 g erhalten werden. Nachdem die letzten Reste der Mutterlauge trotz sehr langen Stehens nicht krystallisieren wollten, wurden die ausgeschiedenen Säuren in ammoniakalischem Wasser gelöst und mit Essigsäure ausgefällt. Sie schieden sich mit roter Farbe als eine ölige, auf der Lösung schwimmende Masse ab. Da dieselbe in Alkohol und Äther schwer, in Essigäther dagegen sehr leicht löslich war, wurde sie damit im Scheidetrichter ausgeschüttelt. — Um zu sehen, ob ein Gemenge von Fettsäuren mit Gallensäuren oder gar die von Langheld beschriebene »glasige Säure« vorliege, wurde mit dieser Masse eine fraktionierte Destillation im Vakuum bei 12 mm Druck vorgenommen. Dabei erhielten wir drei Fraktionen; (I) 110—190°, (II) 190—250° und (III) 250—340°. Alle drei stellten eine hellgelbe, ölige Flüssigkeit dar, welche in der Kälte erstarrte und der durch Alkohol eine geringe Menge von Fettsäuren entzogen werden konnte, von denen vornehmlich Stearinsäure nachgewiesen werden konnte. Der Fraktionierungsrückstand bildete eine glasartige, spröde, grün fluorescierende Masse, die weder in Alkalien, noch in Alkohol oder Äther, sondern nur in heißem Benzol sich löste und vermutlich aus Zersetzungsprodukten von Gallensäuren bestand.

B. Die Fettsäuren des Ätherextraktes.

Das Gemenge der Fettsäuren, deren Gewicht, wie oben erwähnt, 70 g betrug, wurde zum Zwecke ihrer Trennung und

Reinigung der fraktionierten Destillation unter vermindertem Druck unterworfen, wobei drei Fraktionen erhalten wurden:

Fraktion:	Temperatur:	Schmelzpunkt:
I 31 g	200—230°	52°
II 19 g	230—240°	50°
III 13 g	240—265°	45°
Rest 7 g		

Die drei Fraktionen erstarrten gleich beim Erkalten auf Zimmertemperatur zu einer wachsartigen Masse, während der übriggebliebene Rest erst bei einer Temperatur von $+5^{\circ}$ zu einer gelben durchsichtigen Substanz erstarrte. Da die Schmelzpunkte der erhaltenen Fraktionen von Fettsäuren weder denen der Palmitin-, noch Stearin-, ja nicht einmal der von Lassar-Cohn gefundenen Myristinsäure entsprachen, wurden die drei Fraktionen in heißem Alkohol und zwar jede für sich gelöst. Daraus krystallisierten die Fettsäuren in schönen weißen, perlmutterartig glänzenden Schüppchen. Diese Gemenge von Fettsäuren wurden abermals fraktioniert destilliert und dabei erhielten wir Fraktionen mit den Schmelzpunkten von 59, 60 und 68°. Die Gemenge bestanden sonach aus Palmitin- und Stearinsäure. Eine Probe der ersten Fraktion wurde der Elementaranalyse unterworfen, wobei wir folgende Worte erhielten:

0,2237 g Substanz geben: 0,2523 g H_2O
0,6138 g CO_2

entsprechend 12,61 % H und 74,83 % C.

Zum Vergleiche sei hier die Zusammensetzung der drei in Betracht kommenden Fettsäuren angeführt:

Myristinsäure	12,28 % H—73,69 % C
Palmitinsäure	12,50 % H—75,00 % C
Stearinsäure	12,70 % H—76,00 % C
Fraktion (F = 59°)	12,61 % H—74,83 % C

Myristinsäure konnten wir in Übereinstimmung mit Langheld weder in den Mutterlaugen noch in dem Rest vorfinden.

C. Die spezifischen Gallensäuren des Ätherextraktes.

Zur Trennung der spezifischen Gallensäuren in dem mit Äther extrahierten Teil wurden die krystallisierten Fraktionen mit kaltem Alkohol angerührt und nach zwölfstündigem Stehen abgesaugt. Die erhaltene weiße Krystallmasse zeigte einen Schmelzpunkt von 148° und ein Gewicht von 85 g. Sie wurde in der fünffachen Menge Eisessig heiß gelöst. Die daraus krystallisierende Substanz zeigte einen Schmelzpunkt von 145° und konnte danach sowie nach ihrer Krystallform als Desoxycholsäure angesehen werden. Aus der Mutterlauge konnten noch einige kleinere Fraktionen mit Schmelzpunkten von 140 bis 145° gewonnen werden. In der nicht weiter krystallisierenden Mutterlauge wurden die gelösten Säuren durch Zusatz von Wasser gefällt und in der alkoholischen Mutterlauge des ersten Auszuges gelöst. Um die Cholalsäure, die sich in dieser Lösung befand, zur Ausscheidung zu bringen, wurde das Natronsalz der Säuren dargestellt, im Vakuum zur Trockene eingedampft und hierauf durch zwei Stunden am Rückflußkühler mit einer neuerlichen Menge von 96%igem Alkohol gekocht. Dabei schied sich das Natronsalz der Cholalsäure krystallinisch ab. Es wurde siedendheiß abgesaugt. Das fluoreszierende Filtrat erstarrte beim Abkühlen zu einer dicken, gallertartigen Masse, (choleinsaures Natrium), aus der die Choleinsäure in Freiheit gesetzt wurde. Ihr Gewicht betrug im trockenen Zustande fast 80 g und sie zeigte schon nach dem ersten Umkrystallisieren aus Alkohol Schmelzpunkte von 180 — 186° .

Zur vollständigen Entfernung der letzten Spuren von Cholalsäure wurde das Gemenge nochmals in das Natriumsalz übergeführt, der zur Trockene im Vakuum eingedampfte Rückstand in heißem Alkohol gelöst, filtriert und die Choleinsäure nach Abdestillieren des Alkohols mit Essigsäure in Freiheit gesetzt. Nach einem nochmaligen Umkrystallisieren aus Alkohol zeigte die Choleinsäure den Schmelzpunkt von 186° . Aus der letzten Mutterlauge dieser alkoholischen Lösung konnte eine unbedeutende Krystallisation erhalten werden, die sich bei genauerer Untersuchung als Stearinsäure herausstellte. Dieser

Befund zeigt, wie innig die Fettsäuren den Gallensäuren anhaften und so ihre Reinheit beeinflussen, was sich in den so häufig gefundenen zu niedrigen Schmelzpunkten äußert.

D. Die spezifischen Gallensäuren, die nicht in den Äther übergegangen sind.

In der mit Äther völlig erschöpften wässerigen Flüssigkeit befand sich ein dunkelbrauner, aus äußerst klebrigen Flocken bestehender Niederschlag, welcher zum Zwecke der Weiterverarbeitung mit Ammoniak in Lösung gebracht wurde. Daraus wurde der Äther durch mehrstündiges Einpressen von Luft bis auf die letzten Spuren vertrieben und hernach alles Fällbare durch vorsichtigen Zusatz von verdünnter Salzsäure abgeschieden. Nach längerem Stehen wurde die Flüssigkeit abgegossen, der Niederschlag mit Wasser gewaschen und durch Erwärmen auf dem Wasserbade in einer Abdampfschale vom mechanisch anhaftenden Wasser vollständig befreit. Der wasserfreie Kuchen wurde in 700 ccm 96%igen Alkohols gelöst und das Langheldsche Verfahren der Darstellung der Cholsäure über das Natriumsalz wieder angewendet. Trotz der ausgiebigsten Entwässerung schied sich nicht eine Spur eines krystallinischen Natronsalzes ab. Jetzt erst griffen wir zur Veresterung und brachten zu diesem Behufe durch Salzsäure die freien Gallensäuren aus wässriger Lösung zur Abscheidung. Nach entsprechendem Trocknen ihrer alkoholischen Lösung mittels Vakuumdestillation wurden die Säuren mit 700 ccm absoluten Alkohols unter Zusatz von 4 ccm einer alkoholischen Salzsäure, die 25 g HCl in 100 ccm enthält, durch fünfständiges Kochen am Rückflußkühler verestert. Aus dieser Lösung wurde durch Vakuumdestillation der Alkohol entfernt und auf Grund der von einem von uns im Vorjahre gemachten Erfahrung folgender Weg eingeschlagen. Der Destillationsrückstand, welcher die Rohester enthielt, wurde durch Kochen mit Benzol am Rückflußkühler in Lösung zu bringen versucht. Die klare Lösung wurde von dem Ungelösten abgegossen und das Auskochen solange wiederholt, als das Benzol noch etwas aufzunehmen vermochte. Die vereinigten Benzollösungen wurden

nun mit Sodalösung ausgeschüttelt, um der Benzollösung der erhaltenen Ester die letzten Spuren freier Säuren zu entziehen. Die abgeschiedene Sodalösung wurde entsprechend mit Salzsäure angesäuert und der geringfügige, dabei erhaltene schmierige Niederschlag dem in Benzol unlöslichen Anteile hinzugefügt und neuerlich unter ähnlichen Bedingungen mit 1%iger alkoholischer Salzsäure verestert. Dieser Vorgang wurde fünfmal wiederholt.

Schließlich blieb eine Estermasse von ungefähr 45 g übrig, die in Alkohol und Essigäther löslich, in Äther, Aceton, Benzol sowie auch in Soda unlöslich war.

Die vereinigten Benzolextrakte der Ester der spezifischen Gallensäuren wurden mit Natriumsulfat getrocknet und mit 20 ccm Petroläther (Fraktion 50—70°) versetzt, wobei sich eine schwarze Masse abschied, die an der Glaswand haften blieb und aus keinem der angewandten Lösungsmittel auskrystallisierte.

Um eine etwaige Trennung der in der Benzollösung vorhandenen Gallensäureester zu erzielen, wurde die von dem schmierigen Belage abgegossene Lösung mit einer weiteren, jedoch beträchtlicheren Menge von Petroläther versetzt. Wir erhielten einen Niederschlag, der aus einem Gemenge von Aceton und Äther vollständig zur Krystallisation gebracht werden konnte und der Hauptmenge nach Cholalsäureäthylester vorstellte. Das Benzol-Petrolätherfiltrat wurde abdestilliert, der Rückstand verseift und aus Alkohol umkrystallisiert. Er bestand ausschließlich aus Cholalsäure. Die mit Petroläther erhaltene Fällung von Estern der spezifischen Gallensäuren wurde gleichfalls verseift und es konnten daraus neben Cholalsäure ungefähr 10 g Desoxycholsäure gewonnen werden.

Diese Zusammenstellung zeigt, daß es nach dem von uns eingeschlagenen Verfahren gelungen ist, 87,4% des Rohsäurekuchens in krystallisierte, gut definierte, einheitliche Körper zu zerlegen, während die älteren Verfahren dabei gänzlich versagt hatten. Vielleicht war die verminderte Krystallisationsfähigkeit der Rohsäure, sowie die Unmöglichkeit, das Natriumsalz der Cholalsäure aus alkoholischer Lösung unmittelbar zu gewinnen, durch die Anwesenheit größerer Mengen von Fettsäuren oder noch nicht näher bekannter Substanzen bedingt.

Übersichtstabelle.

Gewicht der trockenen, nicht krystallisierten Rohsäuren: 674 g.

	Ätherextrakt g	Benzolextrakt g	Summe in % der Rohsäuren
Fettsäuren	73	—	10,8
Cholalsäure	140	205	51,2
Desoxycholsäure	81	10	13,5
Choleinsäure	80	—	11,9
Nicht krystallisiert	—	85	12,6
			100,0

Auch hier zeigte es sich, in welcher zäher Weise die freien Fettsäuren den schon krystallisiert gewonnenen spezifischen Gallensäuren anzuhaften und deren Reinigung zu erschweren vermögen.

Die unerwarteten Schwierigkeiten auf der einen Seite, sowie auf der andern Seite der Umstand, daß es uns dennoch gelungen ist, 87,4% — das ist der bisher höchste zur Beobachtung gekommene Betrag — des Rohsäurekuchens aus Sommergalle in einheitliche Körper zu zerlegen, veranlaßte uns, den eingeschlagenen Weg etwas ausführlicher anzugeben, weil wir meinen, daß dieses Verfahren bei der methodischen Untersuchung der Gallen verschiedener Tiere vielleicht gute Dienste leisten dürfte.

II. Über ein neues Verfahren zur Isolierung der drei spezifischen Gallensäuren aus Rindergalle.

Die Vermutung, die sich aus den voranstehend mitgeteilten Beobachtungen ergab, daß möglicherweise die Fettsäuren die Gewinnung der spezifischen Gallensäuren in krystallisiertem Zustande auf kurzem Wege verhindern, waren für den einen von uns (Pregl) der Anlaß, einige Versuche in dieser Richtung anzustellen, die dieser Vermutung nicht nur nicht widersprechen, sondern schließlich zu einem Verfahren geführt haben, mit welchem es gelingt, 50—70% der spezifischen Gallensäuren aus der mit Natronlauge zerkochten Galle unmittelbar aus

wässriger Lösung in krystallisiertem Zustande abzuscheiden. Es besteht in folgendem:

11 l Rindergalle werden nach Zusatz von 150 g Natriumhydroxyd (= 3,75 Mol.) in einem mit Deckel versehenen eisernen Topf durch 24 Stunden gekocht und hierauf die Flüssigkeit nach Abnahme des Deckels bis auf $\frac{1}{4}$ ihres ursprünglichen Volumens (ca. 2 $\frac{1}{2}$ l) eingedampft. Nach dem Erkalten wird die Flüssigkeit in eine 10 l fassende Flasche übergespült und der Topf mit wenig warmen Brunnenwasser nachgewaschen.

Nun versetzt man die alkalische Flüssigkeit mit Äther, bis sie damit gesättigt ist, und falls man auf die Entfernung des Cholesterins Wert legen sollte, schüttelt man sie mit 1 l Äther aus. Nach dem Abhebern der ätherischen Schicht werden 180 ccm Eisessig (ca. 3 Mol.) in kleinen Portionen und unter jedesmaligem Umschütteln zugesetzt, wobei die übermäßige Schaumbildung durch Hinzufügen kleiner Äthermengen aus einer Spritzflasche leicht in Schranken zu halten ist. Zu der so vorbereiteten Flüssigkeit wird nun Salzsäure nach folgendem Plane zugesetzt: Zum Neutralisieren von 150 g NaOH wären 3,75 Moleküle HCl erforderlich, also 620 ccm einer Salzsäure von der Konzentration 22 g HCl in 100 ccm. Von diesen berechneten 620 ccm werden vorerst nur 500 ccm (3,28 Mol. HCl) in kleinen Portionen und unter jedesmaligem Umschütteln zugesetzt, und der aufsteigende Schaum durch kleine Ätherzusätze zerstört.

Sind endlich diese 500 ccm eingetragen und die Flüssigkeit vollkommen schaumfrei geworden, dann wird die Flasche mit einem Kautschukstöpsel verschlossen und heftig umgeschüttelt. Dieses Schütteln wiederholt man während der ersten 3 Stunden öfter, bis man an den Wänden des oberen Teiles der Flasche Krystalle haften sieht. Besitzt man von einer früheren Darstellung nach diesem Verfahren verarbeitete Galle, so ist es am besten, der Flüssigkeit etwa 20—50 ccm davon als Impfmateriale sofort zuzusetzen. Nach 12 Stunden ist das Aussehen des Flascheninhaltes gänzlich geändert: Die braune Flüssigkeit ist von einem Filzwerk weißer Nadeln durchsetzt. Nun fügt man die restlichen 120 ccm Salzsäure unter heftigem

Umschütteln zu und läßt mindestens weitere 48 Stunden in der Kälte stehen. Die weitere Verarbeitung kann man aber mit vielleicht noch besserem Erfolge sogar mehrere Wochen später vornehmen. Sie erfolgt nach folgendem Arbeitsplane:

Die durch Absaugen auf großen Nutschen von der wässrigen Flüssigkeit (C) gesonderten Krystalle bestehen im wesentlichsten aus Cholalsäure, Choleinsäure, Desoxycholsäure und geringen Mengen höherer Fettsäuren und werden in einem starkwandigen Glasgefäß mit Alkohol zu einem flüssigen Brei angerührt. Nach mindestens einer Stunde wird abgesaugt und zuerst mit Ätheralkohol, und dann mit reinem Äther gewaschen. Auf der Nutsche bleiben als schwer lösliche Bestandteile die Cholalsäure und die Choleinsäure (A), während die Mutterlauge die Hauptmenge der Desoxycholsäure und der Fettsäuren enthält (B).

A. Die abgesaugte Krystallmasse, im wesentlichsten aus Cholalsäure und Choleinsäure bestehend, wird nach dem von Langheld zuerst geübten Verfahren in der dreifachen Menge starken Alkohols fein verteilt und durch Zusatz sirupöser Natronlauge bis zur alkalischen Reaktion in die Na-Salze übergeführt. Oft scheidet sich dabei schon in der Kälte, jedenfalls aber beim Erhitzen am Rückflußkühler das Na-Salz der Cholalsäure krystallisiert ab, welches siedend heiß abgesaugt und mit siedendem Alkohol gewaschen wird. Das alkoholische Filtrat wird im Vakuum bis zur Trockene eingedampft und hierauf nach Zusatz von etwas absolutem Alkohol am Rückflußkühler erhitzt. Es erfolgt dann meist noch eine zweite, geringfügige Abscheidung von Na-Cholat, welches jedenfalls siedend heiß abgesaugt und mit siedendem Alkohol gewaschen wird. Die jetzt erhaltene Mutterlauge enthält ihrer Hauptsache nach das Na-Salz der Choleinsäure, zu deren Gewinnung folgender Weg eingeschlagen wird. Nach Entfernung des Alkohols im Vakuum wird der Rückstand im Wasser gelöst, auf etwa 50° erwärmt und mit etwas überschüssiger Essigsäure versetzt. Unter der Voraussetzung, daß alle bisherigen Operationen gewissenhaft durchgeführt worden sind, d. h. wenn diese Fraktion außer Choleinsäure nur Spuren anderer Säuren enthält, erstarrt die

mit Essigsäure gefällte harzige Masse beim Umschütteln während des Abkühlens durchaus krystallinisch. Durch Umkrystallisieren aus Alkohol erhält man dann die Choleinsäure rein von dem Schmelzpunkte 187° .

Es sei hier bemerkt, daß auch die Gewinnung der reinen Cholalsäure aus ihrem Na-Salze am besten aus verdünnter, erwärmter wässriger Lösung mit Essigsäure zu erfolgen hat, wobei man diese Säure unmittelbar mit einem Molekül Krystallwasser krystallisiert erhält. Erwärmt man die so erhaltenen Krystalle, nachdem sie von der wässrigen Mutterlauge durch Absaugen befreit worden sind, mit so viel Alkohol, daß sie dabei einen dicken Brei bilden, so resultiert das Alkoholat der Cholalsäure ($F. = 197^{\circ}$).

B. Die alkoholische Mutterlauge, im wesentlichen Desoxycholsäure und etwas höhere Fettsäuren enthaltend, wird im Vakuum eingedampft und der Rückstand mit etwas kaltem Äther gut durchgeschüttelt. Die Hauptmenge der Fettsäuren wird dabei gelöst, während Desoxycholsäure ungelöst bleibt. Sie wird am besten aus Eisessig bis zum konstanten Schmelzpunkt von 145° umkrystallisiert und, wenn dieser so nicht zu erhalten wäre, so führt man sie in das schwer lösliche Ba-Salz über, das aus etwa 70%igem Alkohol umkrystallisiert wird, worauf die daraus nach Umsetzung mit Na-Carbonat in der Hitze und Fällern mit Essigsäure erhaltene freie Säure nach dem ersten Umkrystallisieren aus Eisessig den richtigen Schmelzpunkt zeigen wird.

Sind hingegen in die alkoholische Mutterlauge (B) beträchtlichere Mengen von Cholalsäure übergegangen, dann empfiehlt sich auch hier, diese Säure zuerst als Na-Salz völlig abzuschcheiden und aus der eingeengten alkalischen Mutterlauge die Na-Salze der höheren Fettsäuren in der Kälte auskrystallisieren zu lassen. Nachdem auch diese entfernt sind, kann die letzte alkalische Mutterlauge neben dem Na-Salz der Desoxycholsäure höchstens noch Na-Salz der Choleinsäure enthalten. Die in wässrigen Lösungen aus ihren Salzen durch Essigsäure freigemachten Säuren werden dann durch fraktionierte Krystallisation aus Eisessig getrennt, wobei sich die mit einem Molekül

Eisessig krystallisierende Desoxycholsäure als schwerer löslich zuerst ausscheidet, während die Choleinsäure aus den im Vakuum eingeeengten Mutterlaugen von der ersteren gewonnen und durch nachträgliches Umkrystallisieren aus Alkohol bis zum Schmelzpunkte 187° endgültig rein erhalten wird.

C. Die von den ursprünglichen Krystallen abgeseugte wässrige Flüssigkeit setzt ein schweres braunes Öl ab, das die Hauptmenge der Desoxycholsäure und der Fettsäuren enthält. Geht man auf möglichst vollständige Aufarbeitung desselben aus, dann empfiehlt es sich, sofort die Veresterung vorzunehmen und hernach nach dem im I. Teil angegebenen Verfahren vorzugehen. Dabei hat man selbstverständlich noch immer den Vorteil, mit kleineren Flüssigkeitsmengen und daher rascher arbeiten zu können.

Verzichtet man jedoch auf quantitative Ausbeuten, so kann folgender Weg empfohlen werden: Nach sorgfältiger Trennung der wässrigen Flüssigkeit vom braunen Öl versetzt man letzteres mit 100—200 ccm Aceton und schüttelt diese Masse 3—5 mal mit je einem Liter Äther aus. Der Destillationsrückstand der vereinigten und filtrierten ätherischen Ausschüttelungen krystallisiert über Nacht, und aus der Mutterlauge können durch Einengen noch einige Krystallisationen erhalten werden. Die letzte, nicht krystallisierende Mutterlauge führt man in das Barytsalz über und kocht es mit 80%igem Alkohol aus, wodurch die letzten Anteile von spezifischen Gallensäuren (hier hauptsächlich Desoxycholsäure) gewonnen werden, die dann am besten durch Anreiben mit Aceton-Äther zur Krystallisation gebracht werden können. Letzteres Gemisch hat sich dabei sogar besser bewährt als Eisessig und Langhelds Gemisch von Essigäther und Aceton.

Zum Schlusse sei noch bemerkt, daß das angegebene Verfahren jedesmal und zu jeder Jahreszeit bei Grazer Rindergalle von Erfolg begleitet war: es wäre daher auch wünschenswert zu wissen, ob dies bei Gallen anderer Gegenden auch der Fall ist, oder ob dabei ähnliche Verschiedenheiten vorkommen, wie sie sich bei der Abscheidung der krystallisierten Glykocholsäure nach dem Verfahren von Hüfner ergeben haben.

Ein einziges Mal konnte ich dieses Verfahren auf menschliche Leichengalle in Anwendung bringen, jedoch ohne jeden Erfolg. Hierauf wurde der im I. Teil geschilderte Weg eingeschlagen, wobei die nach dem Kochen mit Natronlauge durch Säuren aus wässriger Lösung fällbaren Bestandteile der menschlichen Leichengalle bis auf einen geringfügigen schmierig gebliebenen Rest als durchwegs krystallisierte, einheitliche Körper abgeschieden werden konnten. Diese Beobachtung scheint darauf hinzudeuten, daß der im I. Teile angeführte Weg der allgemeiner anwendbare und sicherere ist, während das im II. Teil angeführte Verfahren dort eine wertvolle Schnellmethode darstellt, wo es sich darum handelt, sich rasch in den Besitz größerer Mengen von spezifischen Gallensäuren zu setzen.