

# Untersuchungen über die Gallensäuren.

## VIII. Mitteilung.

### Zur Kenntnis der Lithocholsäure.

Von

Heinrich Wieland und Paul Weyland.

(Aus dem organ.-chem. Laboratorium der Technischen Hochschule zu München.)  
(Der Redaktion zugegangen am 18. April 1920.)

Im Jahre 1911 hat Hans Fischer<sup>1)</sup> in einer Partie von Rindergallensteinen bestimmter Herkunft eine neuartige Säure gefunden, die ihren Reaktionen und ihrer Zusammensetzung nach in die Gruppe der Gallensäuren gehört. Sie hat die Zusammensetzung  $C_{24}H_{40}O_3$ , und es liegt nahe, in ihr die einwertige Alkoholsäure der Gruppe zu sehen, eine Mono-oxycholansäure, deren biologisches Auftreten neben dem der beiden typischen Gallensäuren, der Dioxycholansäure (Desoxycholsäure  $C_{24}H_{40}O_4$ ) und der Trioxycholansäure (Cholsäure  $C_{24}H_{40}O_5$ ) durchaus möglich erschien. Hans Fischer hat die neue Säure als Lithocholsäure (Gallensteinsäure) bezeichnet. Der Entdecker hat nach privater Mitteilung bei der Verarbeitung von Rindergallensteinen außer dem einzigen Mal bei der Auffindung die Säure nie mehr in die Hände bekommen. So erlaubte Materialmangel nicht, in der zitierten Arbeit über Analysen und präzise Feststellung der physikalischen Konstanten hinauszugehen. Ein Jahr später beschäftigt sich

<sup>1)</sup> Diese Zeitschr. Bd. 73, S. 234 (1911).  
Hoppe-Seyler's Zeitschrift f. physiol. Chemie. CX.

der englische Chemiker Schryver<sup>1)</sup> in einer Abhandlung über die Zusammensetzung der Rindergalle mit der Frage nach dem Vorkommen der Lithocholsäure. Da es ihm trotz gründlicher Bemühung nicht gelingt, die Säure in der Galle zu finden, glaubt er sich zu dem Schluß berechtigt, daß sie keinen natürlichen Bestandteil der Galle bilde und daß es sich bei dem Befund Fischers um das Produkt eines pathologischen Prozesses handle.

Die Bearbeitung der Nebensäuren der Galle, die der eine von uns schon seit mehreren Jahren betreibt, hat uns zu anderen Ergebnissen geführt als Schryver. Wir haben aus Rindergallen verschiedener Herkunft Lithocholsäure isolieren können, auf schwierigem und umständlichem Wege zwar und in geringen Mengen, aber doch so bestimmt, daß wir die Lithocholsäure als einen normalen Bestandteil der Galle betrachten müssen. Die von uns gewonnene Säure stimmt in ihren Eigenschaften in jeder Hinsicht — abgesehen von einer nicht unerheblichen Differenz in der optischen Drehung — vollkommen mit der Fischerschen Lithocholsäure überein, von der uns ein Originalpräparat zum Vergleich zur Verfügung stand.

Wir besitzen noch keine quantitative Methode zur Abtrennung der Lithocholsäure. Daher geben unsere Ausbeuten keinen ganz scharfen Maßstab für den Gehalt der Galle an Lithocholsäure (die gleich den beiden andern Gallensäuren zweifellos in gepaartem Zustand in der Galle enthalten sein wird). Aus 100 kg Rindergalle gewannen wir rund 1 g Lithocholsäure; sehr viel mehr dürfte nicht darin enthalten sein, sicherlich nicht mehr als 2 g. Demnach tritt die Lithocholsäure der Menge nach ganz gewaltig zurück gegenüber Cholsäure und Desoxycholsäure, von deren einer 5—6 kg, von deren anderer 600—800 g in 100 kg Galle enthalten sind. Die Methode, nach der wir bei der Isolierung der Lithocholsäure gearbeitet haben, behandeln wir ausführlich im Versuchsteil.

---

<sup>1)</sup> Journ. of Physiol. Bd. 44, S. 265 (1912).

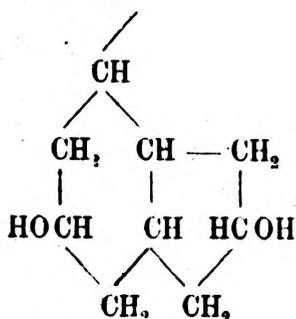
Für die nähere Untersuchung der interessanten Säure standen uns 3,4 g reiner Substanz zur Verfügung. Dank des für uns hierbei ganz unentbehrlichen Hilfsmittels der Pregl'schen Mikroanalyse haben wir nicht nur die chemische Anreicherung der Lithocholsäure an die beiden hydroxylreicheren Gallensäuren einwandfrei vornehmen können, sondern die oxydative Aufspaltung hat uns außerdem noch einen willkommenen Beitrag zur Konstitution des Gallensäuremoleküls geliefert.

Durch vorsichtige Oxydation mit Chromsäure geht Lithocholsäure in eine Ketocholansäure  $C_{24}H_{38}O_3$ , in Dehydro-lithocholsäure über. Damit ist bewiesen, daß im Molekül eine sekundäre Alkoholgruppe enthalten ist; die Natur der 3 Sauerstoffatome — 2 gehören der Carboxylgruppe an — ist bestimmt. Bei der Destillation im Vakuum verliert die Lithocholsäure 1 Molekül Wasser; es entsteht eine einfach ungesättigte Säure, die Cholensäure  $C_{24}H_{38}O_2$ . Bei der gleichen Reaktion ist in vollkommen analoger Weise Desoxycholsäure in Choladiensäure  $C_{24}H_{36}O_2$ , Cholsäure in Cholatriensäure  $C_{24}H_{34}O_2$  umgewandelt worden. Die Hydrierung mit Palladiumschwarz und Wasserstoff hebt die Doppelbindung auf. Das Produkt ist Cholansäure, die Grundsäure der ganzen Gruppe, die auch bei der Hydrierung der doppelt und der dreifach ungesättigten Säure erhalten worden ist. Damit ist der scharfe Nachweis für die Konstitution der Lithocholsäure als Monooxycholansäure geführt.

Für die Desoxycholsäure (Dioxycholansäure) steht fest, daß ihre beiden Hydroxylgruppen auch in der Cholsäure (Trioxycholansäure) in gleicher Stellung enthalten sind<sup>1)</sup>. In der VII. Mitteilung<sup>2)</sup> ist ferner bewiesen, daß die beiden sekundären Alkoholgruppen in je einem von zwei kondensierten hydroaromatischen Ringen stehen, und zwar die eine in einem Sechsring, die andere höchst wahrscheinlich in einem Fünfring. Für den mit Hydroxyl besetzten Teil des Moleküls der Desoxycholsäure ergab sich der nachstehende Ausdruck

<sup>1)</sup> Borsche Bd. 52, S. 342 (1919).

<sup>2)</sup> Diese Zeitschr. B. 108, S. 311—314 (1919).



Die Beziehungen der Lithocholsäure zur Desoxycholsäure bezüglich der Stellung der Hydroxylgruppe ließen sich nun weiter mit voller Schärfe ableiten. Durch Salpetersäure wird nämlich Lithocholsäure (über die Ketosäure) ganz analog den beiden andern Gallensäuren mit Leichtigkeit aufgespalten. Aus dem sauerstoffhaltigen Ring entstehen unter Aufspaltung zwei Carboxylgruppen, genau so wie es bei der oxydativen Aufspaltung der Cholsäure zu Biliansäure und der Desoxycholsäure zu Desoxybiliansäure der Fall ist. Das Oxydationsprodukt der Lithocholsäure, die Säure  $\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{O}_6$ , ist die dreibasische Grundsäure der Biliansäuregruppe; wir bezeichnen sie als Lithobiliansäure.

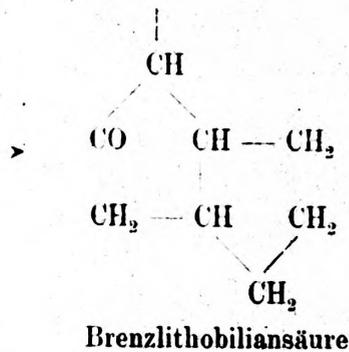
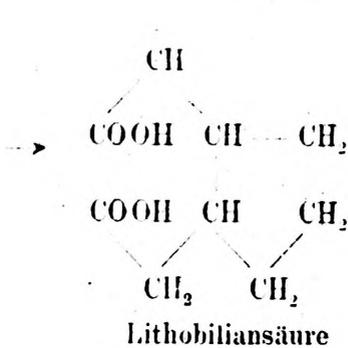
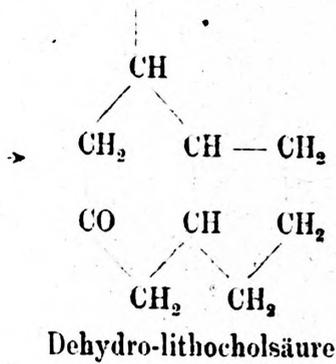
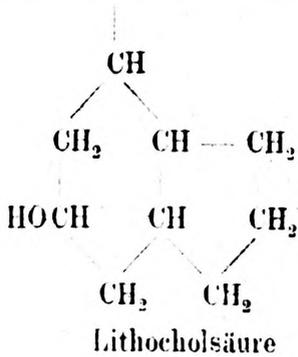
Daß in der Gruppe der Biliansäure der Sechsring der oben gegebenen Formel geöffnet ist, wurde in der VI. Mitteilung bewiesen<sup>1)</sup>. Aus der VII. Mitteilung geht hervor, daß die Sprengung des Fünfrings weit schwieriger erfolgt<sup>2)</sup>. Auf diese Tatsachen läßt sich schon mit ziemlicher Wahrscheinlichkeit die Annahme stellen, daß der Sechsring die Hydroxylgruppe der Lithocholsäure trägt. Das Ergebnis der Hitzezersetzung der Lithobiliansäure erhöht diese Annahme zum scharfen Beweis. Dabei entsteht nämlich unter Verlust von je 1 Molekül  $\text{CO}_2$  und Wasser eine Ketosäure  $\text{C}_{23}\text{H}_{36}\text{O}_3$ , die Brenzlithobiliansäure, die in ihrer Bildung und in ihrer Konstitution vollkommen der Brenzdesoxybiliansäure<sup>3)</sup> entspricht. Da nur 1—6, nicht aber 1—5 Dicarbonsäuren cyclische Ketone geben können, so muß die sekundäre Alkohol-

<sup>1)</sup> Diese Zeitschr. Bd. 108, S. 297 (1919).

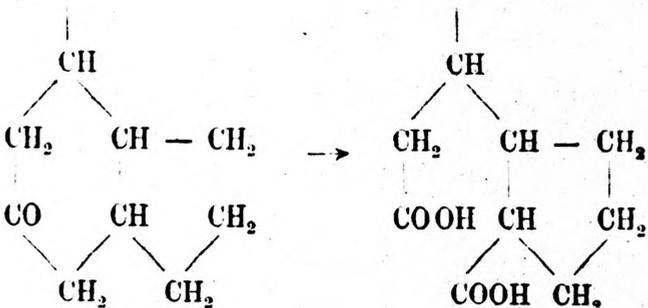
<sup>2)</sup> Vgl. die Darstellungsmethoden für Desoxybiliansäure und Cholidansäure.

<sup>3)</sup> VI. Mitteilung, Diese Zeitschr. Bd. 108, S. 298 (1919).

gruppe der Lithocholsäure im Sechsring stehen, entsprechend nachstehendem Fragment der Gesamtstruktur:



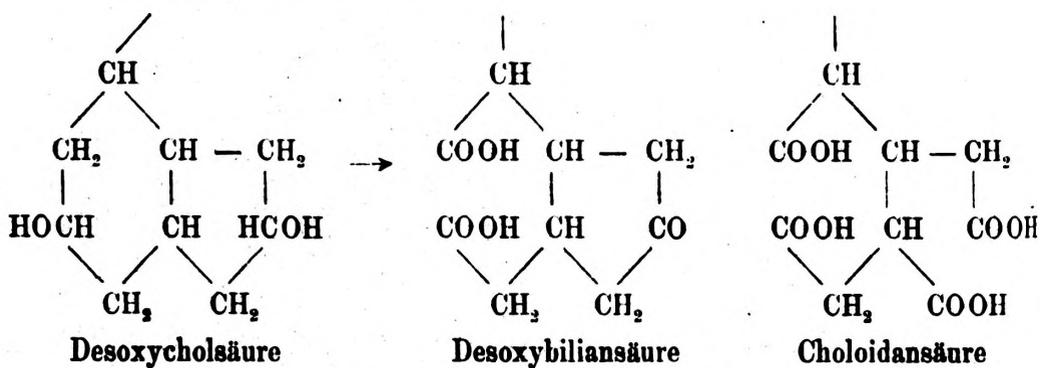
Unsere Untersuchung weist hier eine Lücke auf. Die zu erwartende Iso-lithobiliansäure, die gemäß der Analogie mit der Aufspaltung der Cholsäure und Desoxycholsäure durch Verschiebung der Öffnungsstelle neben der Lithobiliansäure auftreten wird,



haben wir nicht feststellen können. Dies ist nicht erstaunlich angesichts des Umstandes, daß für die Operation nur wenige Dezigramme eingesetzt werden konnten und daß voraussichtlich auf höchstens 10% Ausbeute an Isosäure zu rechnen ist.

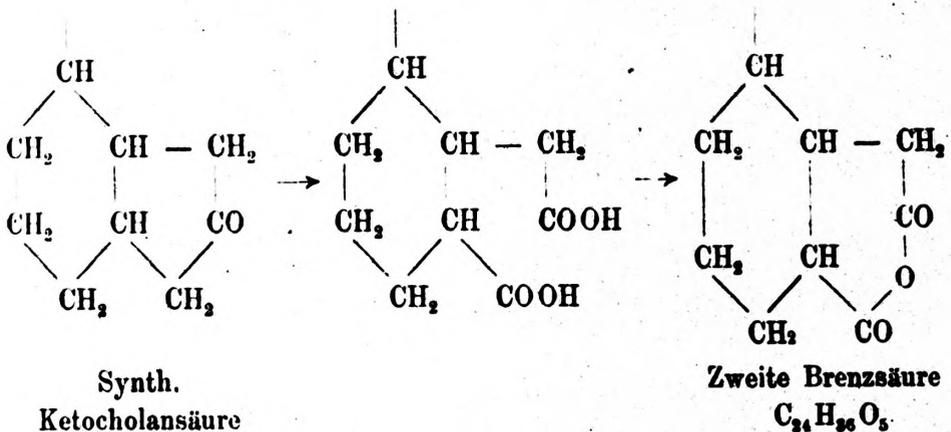
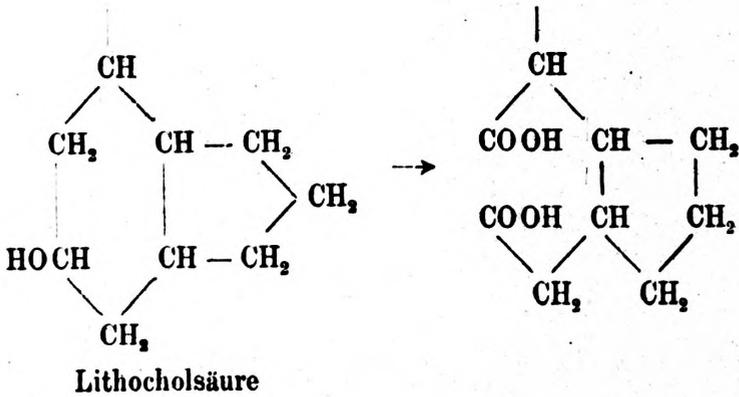
In der V. Mitteilung über die Gallensäuren haben Wieland und Boersch<sup>1)</sup> bei der Reduktion von Dehydrodesoxycholsäure mit amalgamiertem Zink und Salzsäure ein Carboxylsauerstoffatom durch Wasserstoff ersetzt und so eine Keto-cholansäure  $C_{24}H_{38}O_3$  erhalten, die mit der Dehydro-lithocholsäure nicht identisch ist. Diese isomere Säure leistet der oxydativen Aufspaltung durch Salpetersäure heftigen Widerstand. Doch konnte sie durch längere Einwirkung ebenfalls zu einer mit Lithobiliansäure isomeren Tricarbon-säure  $C_{24}H_{38}O_6$  oxydiert werden. Diese Tricarbonsäure gibt nun bei der Hitzezersetzung kein Kohlendioxyd, sondern bloß 1 Molekül Wasser ab. Es entsteht ein Anhydrid, das durch Alkalien wieder zur dreibasischen Säure aufgespalten wird. Daraus ergibt sich, daß eine 1,5-Dicarbonsäure vorliegen muß und daß die Ketongruppe in der Keto-cholansäure von Wieland und Boersch in einem Fünfring steht.

Die Annahme des Fünfrings wurde zuerst aus den Resultaten der Hitzezersetzung der Choloidansäure gezogen. Die Choloidansäure ist das Produkt der doppelten Ringöffnung am Desoxycholsäuremolekül, und zwar führt die Reaktion leicht und rasch zur Aufspaltung des Sechsrings (Desoxybiliansäure), während der zweite Ring einer nachdrücklicheren Einwirkung der Salpetersäure bedarf.



Diese beiden Ringspaltungen haben wir jetzt mit den Ergebnissen der Oxydation der Lithocholsäure und der synthetischen Keto-cholansäure, jede für sich, an getrennten Molekülen vorgenommen.

<sup>1)</sup> Diese Zeitschr. Bd. 106, S. 190 (1919).



Wir glauben, daß die Existenz des Fünfrings im Gallensäuremolekül damit einwandfrei festgelegt ist, wenn nicht — ein Vorbehalt, den auch Windaus in der gleichen Frage macht<sup>1)</sup> — die Regeln über die thermische Veränderung von Dicarbonsäuren an cyclischen Systemen eine ganz unerwartete und unwahrscheinliche Ausnahme erfahren.

### Die Isolierung der Lithocholsäure.

Bei der Trennung der Gallensäuren über die Baryumsalze geht die Lithocholsäure mit der Desoxycholsäure. Sie findet sich in der Baryumsalzfällung, die zur Abscheidung von Cholsäure und Desoxycholsäure vorgenommen wird. Es ist erforderlich, die Fettsäuren in einem möglichst frühen Stadium der Verarbeitung fortzunehmen. Das wird am leichtesten dadurch erreicht, daß man die aus den Barytsalzen durch Umkochen mit Natriumcarbonat erhaltene Natriumsalzlösung unter Ligroin langsam unter Schütteln oder Turbinieren ansäuert. Die so

<sup>1)</sup> B. 52, 163 (1919).

gereinigten Rohsäuren werden dann aus der dreifachen Menge Eisessig umkristallisiert, mit der Vorsicht, daß die Substanz in das zum Sieden erhitzte Lösungsmittel fein gepulvert eingetragen wird. Längeres Kochen führt zur Acetylierung. Acetyldesoxycholsäure ist in Eisessig beträchtlich leichter löslich als Desoxycholsäure. Ihre Trennung von den andern Begleitsäuren gelingt auf diesem Weg nicht.

Über Acetyldesoxycholsäure vgl. die folgende Abhandlung S. 143.

Die Eisessig-Mutterlauge von der auskristallisierten Desoxycholsäure wird im Vakuum auf  $\frac{1}{3}$  des Volumens eingeeengt und liefert nach einigem Stehen noch eine zweite Kristallisation. In den Restlaugen ist dann die Lithocholsäure neben viel Desoxycholsäure und neben andern, größtenteils amorphen Säuren von unbekannter Konstitution enthalten. Die Hauptschwierigkeit ihrer Isolierung beruht auf der großen Übereinstimmung der Eigenschaften von Litho- und Desoxycholsäure. Beider Säuren Baryumsalze sind in Wasser schwer löslich, beider Natriumsalze kristallisieren aus heißem Alkohol. Eine Erleichterung liegt in der größeren Löslichkeit der Lithocholsäure in Äther, wobei aber zu bemerken ist, daß auch die nicht reine Desoxycholsäure von diesem Lösungsmittel in anscheinlicher Menge gelöst wird. Der Umstand, daß die Alkalisalze der Lithocholsäure in Wasser schwer löslich sind, kommt deshalb nicht zur Wirkung, weil sie bei Gegenwart von Desoxycholat diese Eigenschaft verlieren. Schließlich hat sich als wichtiges Hilfsmittel die fraktionierte Trennung auf Grund der verschieden starken Acidität bewährt. Eine ätherische Lösung, die beide Säuren im Gemisch enthält, gibt an Lauge zuerst überwiegend Desoxycholsäure ab.

Nach den hier kurz berührten Prinzipien ist bei der Isolierung der Lithocholsäure verfahren worden. Wir geben im folgenden den Verlauf der Operation wieder, wie er sich bei der Verarbeitung der Laugen aus 348 kg Rohgalle als erfolgreich erwiesen hat. Über die Methoden, die bei anderem Material ebenfalls Lithocholsäure ergeben haben, wird später zu berichten sein.

Die Eisessig-endlaugen, von denen oben die Rede war, wurden im Vakuum bis zur Syrupkonsistenz eingedampft, und der Rückstand dann mit viel Äther ausgeschüttelt. Diese Ätherlösung ließ beim Herausschütteln des mit in Äther gegangenen Eisessigs durch Natronlauge Schmierer fallen, von denen abgessen wurde; sie bestanden zum Teil aus Desoxycholsäure, zum größten Teil aus braungrün gefärbten amorphen Säuren. Der in Äther unlösliche Rückstand von oben wurde in Ammoniak gelöst und unter Äther unter starkem Durchschütteln mit Salzsäure gefällt. Die so erhaltene Ätherlösung wurde etwas eingengt und dann mit der zuerst erhaltenen Ätherlösung vereinigt. Hierbei fielen wiederum Schmierer aus, von denen abgessen wurde. Die Schmierer bestehen der Hauptsache nach aus Desoxycholsäure. Die in Äther gelösten Säuren wurden dann fraktioniert mit Normalnatronlauge herausgeschüttelt.

1. Fraktion mit 250 ccm

2. „ „ 300 „

3. „ „ 400 „

4. „ „ 800 „

Fraktion 1, 2 und 3 wurden unter Äther angesäuert. Die Säure von 3 ging ganz in Äther. 1 und 2 hinterließen braune, in Äther unlösliche Schmierer. Aus den vereinigten Ätherlösungen wurde dann die Säure wieder mit Natronlauge herausgeschüttelt und diese alkalische Lösung mit der vierten Salzlösungsfraction von oben vereinigt. Mit Salzsäure wurden hieraus die Gallensäuren als klumpige Masse ausgefällt, die nach tüchtigem Durchkneten unter öfters erneuertem Wasser 3 Tage auf dem Wasserbad und dann im Exsikkator getrocknet wurde. Die so erhaltenen scharf getrockneten 600 g Säure wurden in der dreifachen Menge absoluten Alkohols gelöst und mit Natriumäthylat (40 g Natrium in 800 ccm Alkohol) verkocht. Das in der Hitze schon zur Abscheidung kommende Natriumsalz wurde heiß abgesaugt, nochmals mit absolutem Alkohol aufgeköcht, wieder heiß abgesaugt und gut mit heißem Alkohol gewaschen. Das trockene Natriumsalz wog 190 g. Die heiß abfiltrirte Mutterlauge vom Verkochen mit Äthylat erstarrte in der Kälte. Diese zweite Fraktion hat trotz gründ-

licher Durcharbeitung keine Lithocholsäure ergeben. Für die Weiterverarbeitung blieben also nur obige 190 g Natriumsalz, die in Wasser gelöst unter wenig Äther mit Salzsäure gefällt wurden. Hierbei ging bis auf einen kleinen Rest von Desoxycholsäure alles in Äther. Nach dem Trocknen mit Chlorcalcium hinterließ der Äther beim Abdestillieren 160 g eines schmierigen Rückstandes. Dieser wurde nochmals in der vierfachen Menge absoluten Alkohols gelöst und mit Natriumäthylat wie oben verkocht. In der Hitze bereits Kristallisation, von der abgesaugt wurde und die nach öfterem Waschen mit heißem Alkohol 87 g trockenes Natriumsalz ergab. Beim Abdestillieren der Hälfte des Alkohols wurde in der Hitze noch eine zweite Kristallisation erhalten, die aber bis jetzt ebensowenig wie die Restsäuren der Mutterlauge auf ein brauchbares Produkt verarbeitet werden konnte. Die erste Kristallisation von 87 g Natriumsalz wurde in Wasser gelöst und gab angesäuert 73 g Säure. Nach scharfem Trocknen wurden 68 g dieser Säure in 210 ccm absoluten Alkohols gelöst und mit der Lösung von 4 g Natrium in absolutem Alkohol (90 ccm) versetzt. Die Lösung muß jetzt schwach alkalisch sein.

Nach kurzem Kochen am Rückflußkühler Abscheidung von langen verfilzten Nadeln, die heiß abgesaugt und dreimal mit heißem Alkohol gewaschen 20 g wogen. Diese 20 g wurden in 80 ccm Wasser gelöst, worin sie ziemlich schwer löslich waren. Eine bleibende geringe Trübung wurde mit Äther weggenommen. Beim Ansäuern der nunmehr klaren Lösung unter Äther ging alles in den Äther. Die getrocknete Ätherlösung ließ beim Stehen über Nacht 1 g Desoxycholsäure ausfallen, die sich nach dem Umkristallisieren aus Eisessig einwandfrei durch Schmelzpunkt, Farbreaktion mit Essigsäureanhydrid-Schwefelsäure und charakteristische Bariumchloridfällung (anfängliche Verschmierung) identifizieren ließ. Der Ätherlösung wurden durch Ausschütteln mit je 10 ccm 2 n-Natronlauge zwei Fraktionen Säure entzogen.

I. Fraktion. Die alkalische Lösung vom Äther befreit gab beim Ansäuern 10,5 g Säure, die zwar aus Essigester um-

kristallisiert werden konnte, aus der aber erst auf einem nachher zu beschreibenden Umweg sich reine Lithocholsäure gewinnen ließ.

II. Fraktion. Die vom Äther befreite alkalische Lösung ließ in der Kälte ein schwerlösliches Natriumsalz gallertig ausfallen, das aber nicht abzusaugen war. Deshalb wurde die Säure gefällt. Die so erhaltenen 5,5 g trockene, amorphe Säure wurden schon beim Übergießen mit Essigester kristallin und ergaben aus 60 ccm Essigester umkristallisiert 2,5 g Säure. Nach zweimaligem Umkristallisieren aus Essigester war Kristallisierfähigkeit aus Alkohol erreicht, und nach zweimaligem Umkristallisieren aus möglichst wenig dieses Lösungsmittels blieb der Schmelzpunkt konstant bei  $186^{\circ}$ . Ausbeute 1 g reine Lithocholsäure.

Die heiß filtrierte Mutterlauge von der letzten Verkokung mit Äthylat erstarrte beim Erkalten zu einer kristallinen Masse, die abgesaugt und dreimal mit Alkohol gewaschen 19 g trockenes Natriumsalz ergab.

Das Salz wurde weiterhin genau behandelt, wie es oben für das in der Hitze erhaltene Natriumsalz beschrieben worden ist. Das Verhalten der Fraktionen war das gleiche, so daß aus der zweiten Fraktion nochmals 0,9 g Lithocholsäure vom Schmelzpunkt  $186^{\circ}$  erhalten werden konnten.

Aufarbeitung der Mutterlauge vom Umkristallisieren der lithocholsäurehaltigen Gallensäure-Fraktionen.

Die Aufarbeitung stützt sich auf die Tatsachen, daß von den drei bis jetzt bekannten Gallensäuren die Lithocholsäure die schwächste Säure ist, daß sie in Äther leichter löslich ist wie die beiden anderen Gallensäuren, und daß sie das in Wasser am schwersten lösliche Baryumsalz bildet. Demgemäß vollzog sich die Aufarbeitung der Mutterlauge wie folgt. Ihr Inhalt wurde in Ammoniak gelöst und fraktioniert mit Chlorbaryum gefällt. Die ersten Fraktionen, die also vor allem das lithocholsäure Baryum enthielten, wurden zur Entfernung des Baryumdesoxycholats mit viel Wasser ausgekocht und aus viel 80—90%igem Alkohol umkristallisiert.

Das Baryumsalz, das so in Nadeln, die zu warzigen Büscheln angeordnet waren, erhalten wurde, wurde mit Soda verkocht. Vom Baryumcarbonat abfiltriert, wurde die Sodalösung unter Äther angesäuert, wobei die Säure leicht und gewöhnlich ganz in Äther ging. Der getrocknete Äther ließ beim Stehen über Nacht gewöhnlich eine Säure auskristallisieren, die schon aus Alkohol umkristallisierbar war. Kristallisierte nichts aus, dann wurde die Ätherlösung mit Natronlauge fraktioniert ausgezogen, und die zweite Fraktion der Säure gab dann aus Essigester und hernach aus Alkohol umkristallisiert Lithocholsäure vom richtigen Schmelzpunkt. So wurden noch insgesamt 1,5 g Lithocholsäure als Nachausbeute gewonnen. Der Ertrag der gleichermaßen aufgearbeiteten Fraktion I von oben ist darin eingeschlossen.

#### Lithocholsäure $C_{24}H_{40}O_3$ .

Aus Alkohol kristallisiert die Säure in hexagonalen Blättchen, sie schmilzt bei  $186^\circ$  (Sintern ab  $185^\circ$ ), ohne Gasentwicklung zu einer wasserklaren Schmelze. Hans Fischer<sup>1)</sup> gibt als Schmelzpunkt der Lithocholsäure  $184\text{--}186^\circ$  an. Der Mischschmelzpunkt mit einem Präparat von Hans Fischer aus Rindergallensteinen gewonnener Lithocholsäure liegt bei  $186^\circ$ . Sie ist in Alkohol besonders in der Hitze sehr leicht löslich. In Äther ist sie leichter löslich als die beiden andern bekannten Gallensäuren. Zur Lösung in Essigester braucht man etwa die 10fache Menge des heißen Lösungsmittels. Aus Eisessig, in dem Lithocholsäure schwer löslich ist (0,2 g lösen sich in 3 ccm Eisessig erst in der Wärme), kristallisiert sie in sechseckigen Blättchen wieder aus, die zum Teil kreuzförmig übereinander gelagert sind. Der Schmelzpunkt dieses aus Eisessig erhaltenen Produkts ist auch  $186^\circ$ . Es liegt also keine Eisessigverbindung vor. In Benzol ist Lithocholsäure vor allen Dingen in der Wärme ziemlich löslich, ein Umstand, der gut zu ihrer Trennung von Desoxycholsäure verwendet werden kann, vorausgesetzt, daß die Säuren bereits kristallisiert vorliegen, denn amorphe Produkte verschmieren mit Benzol. In Gasolin, Ligroin und Wasser ist die Litho-

<sup>1)</sup> H. 73, S. 234 (1911).

cholsäure unlöslich. Reine Lithocholsäure ist vollständig geschmacklos. Die Farbreaktion mit Essigsäureanhydrid-Schwefelsäure ist sehr schwach und geht von schwach rosa über hellbraun (rosa in durchfallendem Licht) nach mehreren Stunden in ein grünliches Hellgelb über. Diese schwache Farbreaktion scheint von Spuren einer Säure von sehr starker Farbreaktion herzurühren, die als schwer abtrennbare Begleiterin der Lithocholsäure auftritt<sup>1)</sup>. In Ammoniak ist die Lithocholsäure in der Kälte schwer löslich. Ist die Lösung in der Hitze bewirkt, so kristallisiert das Ammoniumsalz in der Kälte in haarförmigen verfilzten Nadeln wieder aus. In Soda ist sie in der Kälte ebenfalls unlöslich. Beim Kochen erfolgt Lösung, in der Kälte Erstarrung zu einer Gallerte, die nach langem Stehen in feine verfilzte Nadeln übergeht. Mit Natriumäthylat kristallisiert aus der alkoholischen Lösung in der Hitze das Natriumsalz aus, eine allen drei Gallensäuren gemeinsame Reaktion. Die schwer löslichen Alkalisalze der Lithocholsäure sind mit Natriumdesoxychololat spielend in Lösung zu bringen, ein Umstand, der die Trennung außerordentlich erschwert.

Mikroanalysen nach Pregl der im Hochvakuum bei 110° konstant getrockneten Säure. Die Abnahme betrug 0,7%.

5,303 mg: 14,871 mg CO<sub>2</sub> und 5,044 mg H<sub>2</sub>O

5,237 mg: 14,654 mg CO<sub>2</sub> und 5,001 mg H<sub>2</sub>O

C<sub>24</sub>H<sub>40</sub>O<sub>3</sub> berechnet: C 76,53% H 10,71%

gefunden: 76,48% 76,32% 11,65% 10,69%

Spezifische Drehung: Konzentration 1,543% (absoluter Alkohol), abgelesener Winkel + 0,36°  $[\alpha]_D^{19} = + 23,33^\circ$ .

Fischer gibt eine spezifische Drehung von  $[\alpha]_D^{20} = + 32,14^\circ$  an.

#### Dehydrolithocholsäure C<sub>24</sub>H<sub>38</sub>O<sub>3</sub>.

0,3 g Lithocholsäure in 10 ccm Eisessig gelöst wurden mit 65 mg Chromsäure in einigen Tropfen Wasser versetzt. Hierbei

<sup>1)</sup> Die von H. Fischer angegebene „leichte Grünblaufärbung“ tritt bei der ganz reinen Lithocholsäure nicht ein, wovon sich Herr Kollege Fischer persönlich überzeugt hat. W.

stieg die Temperatur von  $22^{\circ}$  auf  $26^{\circ}$ . Nach 2 Stunden war wieder Zimmertemperatur erreicht. Die Reaktionsflüssigkeit wurde mit einigen Tropfen schwefliger Säure hellgrün gefärbt und im Exsikkator eingedunstet. Nach kurzem Einengen zeigte sich kristalline Ausscheidung sehr feiner filziger Nadeln. Nach völligem Eintrocknen wurde das erhaltene Pulver im Extraktionsapparat mit Äther I ausgezogen. Die entstandene Ketosäure ging leicht in Äther. Schon beim Abdunsten des Äthers zeigten sich am Rand der Flüssigkeit flechtenartig vereinigte Nadeln. Der Ätherrückstand wurde in Soda aufgenommen. Lösung erfolgte erst in der Wärme. Beim Erkalten schied sich das Natriumsalz der Ketosäure in Form feiner Nadeln als Kristallbrei wieder ab. Das Natriumsalz wurde mit Salzsäure zerlegt und die freie Säure aus 70%igem Alkohol umkristallisiert, aus dem sie in kleinen rhomboederartigen Blättchen herauskam. Nach dreimaligem Umkristallisieren aus verdünntem Alkohol wurde der konstante Schmelzpunkt von  $140\text{--}141^{\circ}$  erreicht. Mit Essigsäureanhydrid-Schwefelsäure gibt die Säure nur langsam schwache Rosafärbung im Gegensatz zur isomeren Ketocholansäure von Wieland und Boersch<sup>1)</sup>, die starke Farbreaktion: gelb orange, rot mit grüner Fluoreszenz, liefert.

Im Hochvakuum bei  $110^{\circ}$  keine nennenswerte Abnahme der Analysensubstanz.

5,085 mg: 14,349 mg  $\text{CO}_2$  und 4,775 mg  $\text{H}_2\text{O}$

5,352 mg: 15,082 mg  $\text{CO}_2$  und 5,026 mg  $\text{H}_2\text{O}$

$\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{O}_2$  berechnet: C 76,94%                      H 10,23%

gefunden:    76,96%    76,86%    10,51%    10,51%.

### Cholensäure $\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{O}_2$ .

Die Wasserabspaltung aus der Lithocholsäure wurde durch Destillation im gewöhnlichen Wasserstrahlpumpenvakuum erreicht nach der gleichen Methode, nach der Wieland und Weil<sup>2)</sup> aus Cholsäure Cholatriensäure, Wieland und Sorge<sup>3)</sup> aus Desoxycholsäure Choladiensäure dargestellt haben.

<sup>1)</sup> H. 106, S. 198 (1919).

<sup>2)</sup> H. 80, S. 296 (1912).

<sup>3)</sup> H. 98, S. 59 (1916).

0,3097 g Lithocholsäure wurde in einem tief angesetzten kleinen Schwertkolben im Metallbad erwärmt. Kurz nach dem Schmelzen trat bei ca.  $190^{\circ}$  Außentemperatur lebhaftes Schäumen ein. Deshalb mußte bei dieser Temperatur einige Zeit gehalten werden, bis sich die Schmelze wieder beruhigt hatte. Nach Steigern der Außentemperatur setzte langsam Destillation eines wasserklaren Öles ein, die bei einer Außentemperatur von  $325^{\circ}$  nach etwa  $1\frac{1}{2}$  Stunden beendet war. Als Rückstand blieb nur ganz wenig eines dunkelbraunen spröden Harzes im Kolben zurück. Das Destillat war schon während der Destillation kristallin geworden. Nach dem Erkalten war es sehr spröde und konnte nach dem Pulvern, wobei die Substanz stark elektrisch wurde, aus verdünntem Alkohol (etwa 80% ig) leicht umkristallisiert werden, aus dem die Säure in warzenförmig angeordneten dünnen Nadelchen herauskam. Nach mehrmaligem Umkristallisieren wurde der Schmelzpunkt bei  $153\text{--}154^{\circ}$  konstant gefunden. Während der Destillation erlitten die 0,3097 g Lithocholsäure einen Gewichtsverlust von  $16,3\text{ mg} = 5,26\%$ . Für die Abspaltung von 1 Mol Wasser aus Lithocholsäure berechnet sich eine Gewichtsabnahme von  $4,79\%$ . Die Cholsäure ist in den meisten organischen Lösungsmitteln, auch in Benzol und Ligroin, leicht löslich. Die Säure ist gegen Kaliumpermanganat unbeständig. Ihr Natriumsalz ist so schwer löslich, daß die Säure auch in der Wärme weder in Soda, noch in verdünnte Natronlauge geht, genau wie dies bei Choladien- und Cholatriensäure der Fall ist. In Ammoniak ist sie erst in der Hitze löslich. Aus der warmen Lösung fällt Bariumchlorid sofort kristallinisches Bariumcholenat. Auffällig ist die Farbreaktion der Cholsäure mit Essigsäureanhydrid beim Hinzusetzen eines Tropfens konzentrierter Schwefelsäure. Die starke Farbreaktion erinnert lebhaft an die des Cholesterins. Die Farbe geht von gelb über rosa, rotviolett sehr bald in ein sehr dunkles, rotstichiges Violett über, das nach etwa  $\frac{1}{2}$  Stunde zu einem dunklen Olivgrün wird. Es ist bemerkenswert, daß die einfach ungesättigte Säure noch diese intensive Farbreaktion gibt, zu deren Erzeugung also eine Doppelbindung im Ringsystem genügt.

Wir haben keine Angabe darüber gefunden, ob auch das Cholesten, das der Cholensäure in der Sättigung (nicht in der Stellung der Doppelbindung) entspricht, eine Färbung mit Essigsäureanhydrid-Schwefelsäure liefert.

Die Analysensubstanz erlitt im Hochvakuum bei 110° getrocknet keine Abnahme.

	5,923 mg:	17,396 mg CO <sub>2</sub>	und	5,703 mg H <sub>2</sub> O
	5,657 mg:	16,633 mg CO <sub>2</sub>	und	5,281 mg H <sub>2</sub> O
C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	berechnet:	C 80,38%		H 10,69%
	gefunden:	80,10%	80,19%	10,77% 10,45%

### Cholansäure C<sub>24</sub>H<sub>40</sub>O<sub>2</sub>.

161,3 mg reine Cholensäure wurden in 10 ccm Eisessig aufgeschlemmt und mit 0,2 g Palladiumschwarz unter Wasserstoff in der Schüttelbirne geschüttelt. Die Wasserstoffaufnahme war sehr lebhaft und bereits nach 1/4 Stunde beendet. Die festen Kristalle der Cholensäure waren verschwunden und an ihre Stelle war eine milchige Suspension feiner Nadeln getreten. Es wurde 2 Stunden geschüttelt. Die Wasserstoffaufnahme betrug 35 ccm. Durch Erwärmen wurde die Suspension in Lösung gebracht und vom Palladium abfiltriert. Beim Stehen ließ die Essiglösung voluminöse Nadeln von Cholansäure auskristallisieren, die keine Farbreaktion mehr zeigten. Nach zweimaligem Umkristallisieren aus Alkohol wurde der Schmelzpunkt 162—163° erreicht. Der Mischschmelzpunkt mit einem durch Reduktion nach Clemmensen aus Dehydrocholsäure von Wieland und Boersch<sup>1)</sup> hergestellten Präparat lag bei 161—162°.

Die Analysensubstanz wurde im Hochvakuum bei 110° konstant getrocknet. Abnahme 0,4%.

	7,254 mg:	21,199 mg CO <sub>2</sub>	und	7,279 mg H <sub>2</sub> O
	5,478 mg:	16,007 mg CO <sub>2</sub>	und	5,596 mg H <sub>2</sub> O
C <sub>24</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>	berechnet:	C 79,94%		H 11,19%
	gefunden:	79,70%	79,69%	11,23% 11,43%

<sup>1)</sup> H. 106, S. 195 (1919).

Lithobiliansäure  $C_{24}H_{38}O_6$ .

0,3 g Lithocholsäure wurden mit 1 ccm Salpetersäure vom spezifischen Gewicht 1,4 übergossen. Die in der Kälte nur langsam einsetzende Reaktion wurde auf dem Wasserbade eingeleitet und führte alsbald zu einer klaren Lösung. Nach etwa 10 Minuten trübte sich die Reaktionsflüssigkeit durch Ausscheidung feiner Nadeln von Lithobiliansäure. Nach 15 bis 20 Minuten war die Reaktion praktisch beendet, was sich durch das fast gänzliche Aufhören der Entwicklung von  $NO_2$ -Dämpfen zu erkennen gab. Deshalb wurde die Oxydation durch Hinzufügen von 1—2 ccm Wasser unterbrochen, der Niederschlag gut durchgerieben, wobei die anfangs auf Wasserzusatz flockige Ausscheidung fest wurde, und abgesaugt. Das trockene Produkt wurde mit wenig Äther angerieben und zeigte nach dem Absaugen schon gleich den Schmelzpunkt von  $278^\circ$ , der sich auch durch zweimaliges Umkristallisieren aus Eisessig nicht über  $279^\circ$  hinauftreiben ließ; bei dieser Temperatur fließt die Lithobiliansäure unter kurzem Aufschäumen zu einer hellbraunen Schmelze zusammen. Kristallform aus Eisessig: an beiden Enden durch steile Domen abgegrenzte Prismen, die zum Teil kreuzförmig übereinandergelagert sind, zum Teil Rosetten bilden. Aus dem Rückstand der Äthermutterlauge konnte noch durch Umkristallisieren aus Eisessig eine Nachausbeute an reiner Lithobiliansäure erhalten werden.

Die Analysensubstanz erfuhr im Hochvakuum bei  $110^\circ$  zur Konstanz getrocknet keine nennenswerte Abnahme.

5,265 mg: 13,214 mg  $CO_2$  und 4,319 mg  $H_2O$

6,325 mg: 15,889 mg  $CO_2$  und 5,297 mg  $H_2O$

$C_{24}H_{38}O_6$  berechnet: C 68,20%                      H 9,07%

gefunden:    68,45%    68,51%    9,18%    9,37%

Brenz-Lithobiliansäure  $C_{23}H_{36}O_3$ .

78,8 mg Lithobiliansäure wurden im wasser- und kohlenstofffreien Stickstoffstrom bei  $280-300^\circ$  im Metallbad der Hitzeersetzung im Verlauf von  $\frac{1}{2}-\frac{3}{4}$  Stunden unterworfen. Die Reaktion wurde quantitativ dadurch verfolgt, daß erstens

die Gewichtsabnahme der Substanz beim Erhitzen bestimmt wurde, und zweitens im angeschalteten Chlorcalciumrohr und Kaliapparat das gebildete Wasser und die Kohlensäure aufgefangen wurden. Der Gewichtsverlust der Substanz betrug 14,5 mg oder 18%, während sich für ein Mol. Kohlensäure und ein Mol. Wasser ein Gewichtsverlust von 11,57 mg oder 15,69% berechnet. Dabei hatte das Chlorcalciumrohr um 6,5 mg oder 8,26% zugenommen, statt der für ein Mol. Wasser berechneten Zunahme von 3,3 mg oder 4,19%. Der Kaliapparat war statt der für 1 ccm Kohlensäure berechneten Gewichtszunahme von 8,2 mg oder 10,42% um 7,8 mg oder 9,9% schwerer geworden. Die starke Differenz in der Abnahme der Substanz und in der Zunahme des Chlorcalciumrohres erklärt sich durch die deutlich wahrzunehmende Nebenreaktion, die geringe Mengen eines angenehm aromatisch riechenden Öles ins Ansatzrohr des Chlorcalciumapparats destillieren ließ. Nach Beendigung der Brenzreaktion war die Brenzsäure zum größten Teil als hellbraune Schmelze am Boden des Zersetzungsrohres geblieben. Ein kleiner Teil war heraufdestilliert und kristallisierte beim Erkalten in langen feinen Nadeln, die zu flechtenartigen Gebilden angeordnet waren. Bei der Titration verbrauchten die entstandenen rohen 64,3 mg Brenz-Lithobiliansäure statt der berechneten Menge von 2,15 ccm  $\frac{1}{10}$ -Normalkalilauge 2,3 ccm. Das Kaliumsalz der Brenzsäure ist im kalten Wasser schwer löslich. Die mit Salzsäure aus dem Salz frei gemachte Säure zeigte nach zweimaligem Umkristallisieren aus schwach verdünntem Eisessig einen Schmelzpunkt von 200—201°. Sintern ab 197°. Sie bildete nadelartige Kristalle, die zum Teil zu baumflechtenartigen Gebilden verwachsen waren.

Die Analysensubstanz wurde im Hochvakuum bei 110° konstant getrocknet. Abnahme 0,62%.

4,670 mg:	13,068 mg CO <sub>2</sub> und	4,247 mg H <sub>2</sub> O
C <sub>23</sub> H <sub>34</sub> O <sub>3</sub> berechnet:	C 76,60%	H 10,07%
gefunden:	76,33%	10,18%

### Isomere Tricarbonsäure $C_{24}H_{38}O_6$ aus Ketochole- säure.

Als Ausgangsmaterial diente die nach der Vorschrift von Wieland und Boersch<sup>1)</sup> dargestellte  $\alpha$ -Ketocholeensäure vom Schmelzpunkt  $183^\circ$ . 1 g dieser Säure wurde im Reagenzglas mit 5 ccm Salpetersäure vom spezifischen Gewicht 1,4 übergossen und ins Wasserbad gestellt. Die Reaktion kam erst langsam in Gang. Die Säure wurde zu einem wasserhellen Öl, das nach und nach braun wurde und erst im Laufe von 2 bis 3 Stunden ganz in Lösung ging. Dann trat allmählich kristallinische Abscheidung auf. Die Oxydation war nach 10 Stunden stehen bei Wasserbadtemperatur so gut wie beendet und wurde durch Hinzufügen von 5 ccm Wasser unterbrochen. Das schwach gelb gefärbte Reaktionsprodukt wurde abgesaugt, getrocknet und mit wenig Äther angerieben. Nach dem Absaugen blieb ein rein weißes Pulver vom Schmelzpunkt  $258^\circ$ , der durch Umkristallisieren der Säure aus Eisessig nicht über  $261^\circ$  gesteigert werden konnte. Auch das reinste Präparat bräunt sich von ca.  $200^\circ$  ab und schmilzt unter gelindem Schäumen zu einer braunen Schmelze. Kristallform: spitze Nadeln, die warzenförmig angeordnet sind, ohne aber die schönen Endflächen der Lithobilansäure zu haben. Aus den Rückständen der Äthermutterlaugen konnte auch hier durch Umkristallisieren aus Eisessig eine Nachausbeute an reiner Tricarbonsäure erhalten werden.

Die Analysensubstanz wurde im Hochvakuum wie oben getrocknet. Abnahme 0,8%.

7,525 mg: 18,828 mg  $CO_2$  und 6,075 mg  $H_2O$

5,298 mg: 13,295 mg  $CO_2$  und 4,430 mg  $H_2O$

$C_{24}H_{38}O_6$  berechnet: C 68,20% H 9,07%

gefunden: 68,24% 68,44% 9,03% 9,36%

### Brenzensäure $C_{24}H_{36}O_5$ .

129,3 mg von obiger Tricarbonsäure wurden im Hochvakuum bei  $280-300^\circ$  zersetzt und daran anschließend de-

<sup>1)</sup> H. 106, S. 198 (1919).

stilliert unter Steigerung der Badtemperatur bis  $320^{\circ}$ . Ein wasserklarer Tropfen ging über, der in Benzol und Ligroin unlöslich, in Äther und Eisessig leicht löslich war. Aus verdünntem Eisessig kristallisierte die Säure in prachtvoll lanzettförmigen Blättchen, die in Rosetten angeordnet waren und den Schmelzpunkt  $173\text{--}174^{\circ}$  zeigten. Der Gewichtsverlust bei der Zersetzung betrug 10,2 mg oder 7,89% statt der für 1 Mol. Wasser berechneten Abnahme von 4,3%.

Ein zweites Mal wurden 145 mg der isomeren Lithobiliansäure im wasser- und kohlensäurefreien Stickstoffstrom zersetzt; durch Auffangen der flüchtigen Produkte im Chlorcalciumrohr und Kaliapparat wurde die Reaktion wägend verfolgt. Der Kaliapparat erfuhr keine nennenswerte Gewichtszunahme. Das Chlorcalciumrohr zeigte die der Gewichtsabnahme der Substanz entsprechende Zunahme von 15,3 mg oder 10,8%. Für 1 Mol. Wasser berechnet sich ein Gewichtsverlust von 4,3%. Auch hier war etwas eines aromatisch riechenden, zähen Öles ins Ansatzrohr des Chlorcalciumrohrs destilliert, das den Unterschied im Gewichtsverlust der Substanz erklärt. Nach  $1\frac{1}{2}$  stündigem Erhitzen war die Reaktion beendet. Die tiefbraun gefärbte Schmelze wurde mit  $\frac{1}{10}$ -Normalkalilauge titriert und verbrauchte 10,3 ccm, woraus sich ein Äquivalentgewicht von 126 berechnet an Stelle des theoretischen Wertes von 134 für das Anhydrid der Tricarbonsäure. Die alkalische Lösung wurde mit Salzsäure fraktioniert gefällt und so eine Trennung von den grössten Verunreinigungen erreicht. Die zweite ziemlich helle Fällung mit Salzsäure lieferte, aus Eisessig umkristallisiert, die der Lithobiliansäure isomere Säure  $C_{24}H_{39}O_6$  mit dem Schmelzpunkt von  $255\text{--}256^{\circ}$  zurück. Der Mischschmelzpunkt mit reiner Säure lag bei  $255^{\circ}$ .