

Die Abbauprodukte des Cholesterins in den tierischen Organen (Gallensäuren).

VII. Mitteilung.¹⁾

Von

J. Lifschütz, in Hamburg.

(Der Redaktion zugegangen am 29. August 1914.)

Die Ermittlung des genetischen Zusammenhanges zwischen dem Cholesterin und den Gallensäuren durch die charakteristische Farb- und Spektralreaktion, welche die beiden Stoffe in Eisessiglösungen (nach der Behandlung dieser Lösungen mit Peroxyden) auf Zusatz von etwas Schwefelsäure geben, geschah bis jetzt, wie ersichtlich, auf qualitativem Wege.²⁾ Es ist jedoch für die Kenntnis der Ökonomie des Cholesterins in den tierischen Organen und nicht minder für die Erkenntnis des Wesens und des molekularen Baues der Gallensäuren von erheblicher Bedeutung auch quantitativ zu erfahren: ob die N-freien Komponenten der Gallensäuren ihr Entstehen ausschließlich dem Cholesterin (oder dem gleichen Ursprung mit dem letzteren) zu verdanken haben, resp. ob hier auch eine andere Quelle mit im Spiele ist, der manche dieser Säuren entstammen könnte. Da mir bis jetzt — außer dem Oxycholesterin und seinen Derivaten — kein tierischer Stoff, der hier in Betracht kommen könnte, bekannt geworden ist, welcher die Essigschwefelsäure-Reaktion mit ihren bekannten Farben und Spektren gibt, so müßte derjenige Teil der Gallensäuren, der mit dem Cholesterin nichts gemein hat, sich dieser Reaktion (auch nach dessen Oxydation) entziehen. Daß diese Ermittlungen — bei der charakteristisch-prägnanten Schärfe des Spektrums dieser Farbreaktion — in entsprechender Weise sich bewerkstelligen lassen müßten, war erfahrungsgemäß vorauszusehen.

¹⁾ Vorgehende Mitteilungen: Diese Zeitschr. Bd. 50, S. 437; Bd. 53, S. 140 (1907); Bd. 58, S. 175 (1908); Bd. 63, S. 223 (1909); Bd. 91, S. 309 (1914); Biochem. Zs. Bd. 52, S. 206 (1913).

²⁾ «Berichte», Bd. 47, S. 1459 (1914).

So kompliziert die Zusammensetzung der Galle auch ist, so sind doch, namentlich die Gallensäuren, die ja die Hauptbestandteile der Galle ausmachen, soweit studiert, daß das bereits vorliegende Material ausreichen dürfte, um die in Rede stehende Frage, wenigstens in ihren Hauptzügen und dem Prinzip nach, befriedigend zu beantworten.

Mit der Feststellung der Tatsache, daß die Farben- und Spektralerscheinungen der bei den Gallensäuren nach ihrer Oxydation in Eisessiglösung mit H_2SO_4 hervorgerufenen Farb-reaktion identisch sind mit denen der in gleicher Weise beim Cholesterin herbeigeführten Oxycholesterin-Reaktion, ist auch gleichzeitig die Möglichkeit geschaffen, auch die Gallensäuren (wie ihre mutmaßliche Muttersubstanz, das Oxycholesterin),¹⁾ spektralanalytisch zu ermitteln. Die quantitative Bewertung dieser Ermittlungen der Gallensäuren als Cholesterinderivate müßte sich dann aus vergleichenden Untersuchungen der auf diesem Wege erhaltenen Daten mit den bereits bekannten anderweitigen Ergebnissen der Gallenforschung ergeben.

Die seit Jahren aus zahlreichen Untersuchungen der Cholesterinstoffe, unter Verwertung ihrer Spektralreaktionen zu quantitativ analytischen Zwecken, gesammelten positiven Erfahrungen kamen tatsächlich auch hier gut zustatten. Es hat sich gezeigt, daß die bei der reinen Cholsäure bzw. bei der rohen Galle hervorgerufenen Oxycholesterin-Reaktionen nach den Intensitäten ihrer Farben- und Spektralabsorptionen recht gut meßbar sind und auch — bei Vergleichung dieser Messungen der Cholsäurespektren mit denen der Galle — recht brauchbare Rückschlüsse auf den Gallensäuregehalt der letzteren gewähren.

Zu den nachstehenden diesbetreffenden Versuchen sind als Objekte einerseits die reine krystallisierte Cholsäure und andererseits die rohe eingedickte Ochsen-galle²⁾ verwendet worden.

¹⁾ Siehe Dies: Biochem. Zeitschr., Bd. 48, S. 381 u. 345; ferner Bd. 54, S. 230 ff. (1913); und Bd. 62, S. 223 ff. (1914).

²⁾ Das sogenannte Fel tauri der Apotheken.

Im Nachfolgenden sollen zunächst zwei Ermittlungsarten der Gallensäuren in der Rohgalle erörtert werden:

1. Ermittlung des spektralen Reaktionsumfanges der Galle durch Messungen der minimalen Spektralabsorption ihrer durch Oxydation hervorgerufenen Oxycholesterin-Reaktion, unter Vergleichung der dabei ermittelten Werte mit den in gleicher Weise erhaltenen Daten der reinen Cholsäure; und

2. gewichtsmäßige Ermittlung des Cholsäuregehalts der Galle unter Ausschaltung derjenigen Bestandteile der Rohgalle, die nicht zu den eigentlichen Gallensäuren gehören und die auf Essigschwefelsäure (auch nach ihrer Oxydation) nicht reagieren.

I.

A. Bestimmungen der minimalen Spektralabsorption der rohen Galle.

Analysenreihe 1. 0,5 g der eingedickten Ochsen-galle mit 67,0% Trockensubstanz wurden im geräumigen Bechergläschen in 10 ccm Eisessig kochend gelöst und in die grüne heiße, aber nicht kochende Lösung 0,5 g reinen Benzoylsuperoxyds eingetragen. Nach vorsichtigem gelindem Erwärmen trat Gasentwicklung ein. Die Flamme wurde weggezogen und die Reaktion sich selbst überlassen. Nach kurzer Zeit war die Reaktion vorüber. Die Lösung wurde dann rasch bis zum Aufschäumen aufgeköcht und die Flamme hinweggezogen. Nachdem die hellgelb gewordene Lösung sich völlig beruhigt hat, wurde sie schnell abgekühlt, von den ungelöst gebliebenen Schleimstoffen durch ein kleines Filter filtriert und das Filter mit kleinen Mengen Eisessig ausgewaschen. Das klare Filtrat nebst Waschflüssigkeit wurden in einem Kölbchen von 20 ccm Inhalt aufgefangen und bis zur Marke aufgefüllt, sodaß die Lösung nunmehr 2,5% der wasserhaltigen Ochsen-galle enthielt.

1 ccm dieser Eisessiglösung wurde mit 5 ccm Chloroform verdünnt¹⁾ und die nunmehr 0,4166%ige Gallenlösung für die Spektralanalyse verwendet.

¹⁾ Die Verdünnung mit Chloroform ist notwendig, weil sonst die Oxycholesterinreaktion viel träger und unvollständiger vor sich geht.

1 ccm davon wurde mit 2 ccm Essigschwefelsäure¹⁾ vermischt. Nach 7—8 Minuten wurde die Lösung blau bis blaugrün. Sie zeigte dann im Spektrum — der charakteristischen Hauptsache nach — ein starkes Absorptionsband im Gelb und einen schwachen Streifen im Rot (zwischen C und d). Das Gemisch wurde dann mit 1 Tropfen 2,5%iger Eisenchlorid-Eisessiglösung versetzt. Das Absorptionsband im Gelb des Spektrums verschwand und die volle Entwicklung des Streifens «C—d» trat momentan ein. Das 3 ccm betragende, echt grün gewordene Gemisch enthielt also nunmehr 0,1388% Gallensubstanz. 1 ccm dieses Gemisches wurde in ein Zylinderchen von 18 mm Durchmesser und ca. 10 ccm Inhalt gebracht und vor dem Spektroskop an einer Lichtquelle von ca. 100 HK nach und nach mit Eisessig so lange verdünnt, bis der vorerwähnte Absorptionsstreifen «C—d» im Rot bei engster Spaltöffnung des Spektroskops zu einem eben noch sichtbaren Wölkchen zusammenschrumpfte, das bei weiterer geringfügiger Verdünnung der Lösung aus dem roten Spektralfelde verschwand. Bei dieser minimalen Spektralabsorption betrug die immer noch schwach grüne Lösung 4,0 ccm und hatte somit einen Gallensubstanzgehalt von 0,0347%. Mithin zeigte die oxydierte Gallenlösung — nach dem Hervorrufen ihrer Oxycholesterin-Reaktion mit Essigschwefelsäure und Eisenchlorid — eine **spektrale Grenzempfindlichkeit** von

1 : 2882.

Bezieht man diese Werte auf die Trockensubstanz der verwendeten Ochsen-galle (67,0%), so liegt die äußerste Grenze der genannten Spektralreaktion der Lösung bei 0,0232% Trockengalle. Ihre Spektralreaktion besitzt somit eine Grenzempfindlichkeit von

1 : 4310.

Die Entscheidung der Frage: inwiefern der so erhaltene Wert als etwaige Konstante für den Gallensäuregehalt der Galle gelten darf, ist im Wesentlichen von der Frage abhängig: ob resp. in welchem Grade die Oxydation der Galle mit Benzoyl-

¹⁾ 10 Vol. Eisessig und 1 Vol. H₂SO₄.

galle besitzt eine mittlere **spektrale Grenzempfindlichkeit** von **1 : 4349**.

Da zu befürchten stand: der Wassergehalt der obigen Versuchsgalle könnte auf die Oxydation derselben von irgend welchem Einfluß sein, so wurde ein Versuch mit der im Vakuum getrockneten Galle ausgeführt. Und zwar wurde die Trockengalle in 6%iger Eisessiglösung mit dem 1,33-fachen Gewicht an Peroxyd in der oben beschriebenen Weise oxydiert, filtriert und auf 3% Gallengehalt gebracht.

1 ccm dieser Lösung wurde mit 5 ccm Chloroform verdünnt und in 1 ccm dieser nunmehr 0,5%igen Gallenlösung, wie oben beschrieben, mit 2 ccm Essigschwefelsäure und 1 Tropfen Eisenchloridlösung die grüne Oxycholesterin-Reaktion hervorgerufen und bis zur spektralen Minimalabsorption unter den angegebenen Bedingungen mit Eisessig verdünnt. Die so ermittelte spektrale Absorptionsgrenze lag bei 0,0238% Gallengehalt des grünen Reaktionsgemisches. Ein Befund, der von dem obigen mittleren und auf die Trockengalle berechneten Grenzwert (0,02299) nicht wesentlich abweicht.

Diese aus fünf unter den verschiedensten Reaktionsbedingungen ausgeführten Operationen erhaltenen, und dennoch untereinander gut stimmenden Daten dürften dartun, daß man an der Oxycholesterin-Reaktion der oxydierten Galle tatsächlich eine optische Erscheinung besitzt, die sehr wohl als Konstante zur Ermittlung derjenigen Bestandteile der Galle benutzt werden kann, welche mit dem Cholesterin in genetischem Zusammenhang stehen. Die quantitative Bewertung dieser Substanzen muß sich, wie oben bereits angedeutet, ergeben: aus dem Verhältnis der oben ermittelten Zahlenwerte der rohen Galle zu den in gleicher Weise zu ermittelnden Werten der reinen N-freien Komponenten der Gallensäurepaarlinge, die ja, wie nachgewiesen,¹⁾ gleichfalls die Oxycholesterin-Reaktion mit Essigschwefelsäure geben, wie die rohe Galle.²⁾

¹⁾ Diese Zeitschr. Bd. 91, S. 323 und 324 (1914); «Berichte» Bd. 47, S. 1459 (1914).

²⁾ Siehe weiter unten S. 389.

B. Bestimmung der minimalen Spektralabsorption der reinen Cholsäure.

Analysenreihe 2. 0,20 g der reinen krystallisierten Cholsäure wurden in 10 ccm Eisessig gelöst und mit 0,20 g Benzoylsuperoxyd genau so behandelt, wie oben in der Analysenreihe 1 die rohe Ochsen-galle. Das Reaktionsgemisch blieb nach wie vor der Operation völlig klar und farblos.¹⁾ Die Lösung wurde in einem Maßkölbchen auf 20 ccm aufgefüllt und entsprach dann 1,0% Cholsäuregehalt. 1 ccm davon wurde mit 5 ccm Chloroform verdünnt und so die Lösung auf 0,1666% Cholsäuregehalt gebracht.

In 1 ccm dieser Eisessig-Chloroformlösung wurde die grüne Essigschwefelsäure-Eisenchlorid-Reaktion ebenso hervorgerufen, wie oben bei der gleichartigen Gallenlösung. Das 3 ccm betragende grüne Reaktionsgemisch hatte also 0,05555% Cholsäure. Wurde nun 1 ccm der grünen Lösung in der oben angegebenen Weise mit Eisessig bis zur minimalen Spektralabsorption verdünnt, so betrug die verdünnte Lösung 5,2 ccm mit 0,01068% Cholsäure.

Weitere drei Operationen mit 2,4%igen Cholsäurelösungen in Eisessig unter Steigerung des Peroxydzusatzes bis zum 1,4-fachen der angewendeten Cholsäure ergaben ähnliche Werte. Die Ergebnisse dieser 4 Operationen seien hier, wie folgt, zusammengestellt:

Bei Operat. 1 lag das spektrale Absorptionsminimum bei 0,01068% Cholsäuregehalt

»	»	2	»	»	»	»	»	0,01111%	»
»	»	3	»	»	»	»	»	0,01157%	»
»	»	4	»	»	»	»	»	0,01096% ²⁾	»

also im Mittel bei: **0,01108%** Cholsäuregehalt

¹⁾ Bei einer zu weitgehenden Reaktion färbt sich die Lösung gelb bis braungelb, was zu vermeiden ist.

²⁾ Von jeder Operation sind je zwei Chloroform-Mischungen und von diesen je zwei bis drei farbige Reaktionsgemische hergestellt worden. Die obigen vier Werte sind somit Durchschnittszahlen von je zwei bis drei spektroskopischen Messungen. Dasselbe geschah auch bei den obigen Analysen der rohen Galle. (Siehe oben S. 387).

Demnach besitzt die reine Cholsäure, $C_{24}H_{46}O_5 + H_2O$, eine mittlere spektrale Grenzempfindlichkeit von

1 : 9025.

Unter der Voraussetzung, daß unter den Bestandteilen der Galle — außer den N-freien Gallensäurekomponenten — keine anderen Substanzen vorhanden sind, die nach ihrer Oxydation die Oxycholesterinreaktion mit Essigschwefelsäure geben, muß — aus dem Verhältnis des oben bei der Galle ermittelten spektralen Grenzempfindlichkeitswertes (1:4349) zu dem hier bei der reinen Cholsäure gefundenen gleichartigen Werte — sich der Gehalt der Galle an jenen Gallensäurekomponenten ergeben: Setzt man nämlich den letzteren Zahlenbefund der reinen Cholsäure gleich hundert und bezeichnet den gesuchten prozentualen Cholsäuregehalt der Galle mit x , so ergibt sich die Proportionalgleichung:

$$9025 : 4349 = 100 : x,$$

woraus sich für die wasserfreie Ochsen-galle ein Cholsäuregehalt von **48,2%** berechnet.

Da die obigen Spektralanalysen mit reiner krystallisierter Cholsäure, die 1 Molekül H_2O (= 4,2%) enthält, ausgeführt, die Analysenwerte der Galle aber auf die Trockensubstanz bezogen wurden, so müssen hier 2,0% abgezogen werden. Der gefundene Cholsäuregehalt reduziert sich somit auf **46,20%** wasserfreier Cholsäure der Trockengalle.

Wie weiter unten dargetan wird, enthält die Galle, außer den Gallensäuren, tatsächlich keine andere Substanz, die nach ihrer Oxydation mit Benzoylsuperoxyd die in Rede stehende Oxycholesterin-Reaktion gibt.¹⁾ Es kann somit kaum einem Zweifel unterliegen, daß die obige auf spektralanalytischem Wege ermittelte Zahl mit befriedigender Annäherung den tatsächlichen Gehalt der Ochsen-galle an N-freien Gallensäuren ausdrückt.

¹⁾ Bezüglich des Cholesterins, das im Fel tauri in nur geringen Mengen vorkommt, sei bemerkt, daß es sich, wie weiter unten nachgewiesen wird, an der Oxycholesterin-Reaktion der Galle in nachweislichem Grade nicht beteiligt. Es liegt daher keine Berechtigung vor, das Cholesterin vom obigen Befund abzuziehen. (Vgl. auch: Diese Zeitschr. Bd. 91, S. 322 (1914) und weiter unten S. 398).

Eine hinlänglich bestätigende Stütze erhält diese Anschauung in einer Arbeit von K. Langheld,¹⁾ der aus 522 g Festsubstanz der Rindergalle 299 g = 57,3% Rohsäuren erhalten hat. Eingangs seiner Arbeit²⁾ schreibt dieser Autor: «Es (das neue Verfahren) gestattet bereits jetzt, mindestens 80% des Rohprodukts in chemisch definierte Körper überzuführen.» Daß der Verfasser unter letzteren die Cholsäure und die Desoxycholsäuren verstanden haben will, scheint aus seiner Zusammenstellung der Ausbeuten an den von ihm aus der Rohgalle gewonnenen Körpern am Schlusse seiner Arbeit hervorzugehen.³⁾ In diesem Falle reduzieren sich jene 57,3% Rohsäuren auf 45,8% eigentlicher Reinsäuren: eine Zahl, die mit der obigen Spektralanalyse übereinstimmt.

Auch die nachstehende Gewichtsanalyse der Galle dürfte diese Anschauung bestätigen.

II.

Gewichtsmäßige Ermittlung des Gallensäuregehaltes der Galle.

Spricht nun nach dem Obengesagten alle Wahrscheinlichkeit für die Annahme, daß der oben auf optischem Wege ermittelte Wert dem wirklichen Gallensäuregehalt der Ochsen-galle entsprechen dürfte, so wurde doch der Versuch unternommen, diesen Wert auch gewichtsanalytisch zu kontrollieren. Hierfür wurde das Verfahren von Hoppe-Seýler zur Bestimmung der gallensäuren Salze in der Galle — wenigstens seinem Prinzip nach — zu Grunde gelegt. Bildet auch dieses Verfahren, das auf der Unlöslichkeit der genannten Salze in Äther beruht, einen recht beschwerlichen Umweg gegenüber den in neuerer Zeit vorgeschlagenen Methoden, die Cholsäuren als solche zur Wägung zu bringen, so scheint doch das erstere Verfahren wesentlich geringere Fehlerquellen und Bedenklichkeiten in sich zu schließen, als die letzteren Methoden.

¹⁾ «Über die Bestandteile der Rindergalle I.» Ber. d. deutsch. chem. Gesell., Bd. 41, S. 378 (1908).

²⁾ Dasselbst, S. 379.

³⁾ Dasselbst, S. 384.

Zu diesem Ende wurde die eingedickte Ochsen-galle mit Alkohol behandelt, um die Schleimstoffe und einen Teil der Farbstoffe zu beseitigen. Sie betragen 8,2% der Trockengalle und reagierten weder auf Gallensäuren, noch nach ihrer Oxydation auf Oxysterin. Um die relativ kleinen Mengen von Fett, Cholesterin, dem überwiegenden Teil des Lecithins und ähnlichen Beimengungen zu entfernen, wurde die wässerige Lösung der bereits durch die Alkoholreinigung gegangenen Galle mit alkoholhaltigem Äther und darauf mit alkoholhaltigem Benzin ausgeschüttelt.

Die **Alkalien** (Kalium und Natrium) wurden zunächst in bekannter Weise als Alkalisulfate und das Kalium für sich als Kalium-Platinchlorid bestimmt. Nach der entsprechenden Berechnung ergab die Differenz auch den Natriumgehalt der trockenen Galle.

Der **Schwefelgehalt**, als BaSO_4 bestimmt und 2,0% von der Trockengalle betragend, ergab den Gehalt der Galle an Taurocholsäure.

Nach Abzug des Alkalimetallgehaltes der isolierten Salze ergaben sich die freien Säurepaarlinge und nach Abzug des Schwefel- resp. des stickstoffhaltigen Restes von den Säurepaarlingen wurde schließlich der Gehalt der Galle an Cholsäuren ermittelt.¹⁾

Behufs Ermittlung der Summe der gallensauren Salze wurde die, wie soeben angedeutet, vorgereinigte Galle in absolutem Alkohol gelöst, die klar filtrierte Lösung auf ein möglichst geringes Volumen eingedampft und mit überschüssigem Äther gefällt. Der grünliche Niederschlag wurde auf einem Filter gesammelt. Da die Substanz auf dem Filter zusammenbackte und Risse bildete, so daß sie sich nicht gut auswaschen ließ, so wurde sie mitsamt dem Filter zunächst an der Luft und dann im Vakuum getrocknet. Sie sah noch grün aus und war noch sehr hygroskopisch. Das ätherische Filtrat wurde eingedampft und der fettige, klebrige und hygroskopische Rückstand qualitativ untersucht. Es enthielt kleine Mengen Seife,

¹⁾ Siehe weiter unten S. 394 u. Anmerk. 1, daselbst.

reagierte spurenweise auf Cholesterin; aber nicht auf Gallensäure. Der Niederschlag nebst Filter wurden dann mit absolutem Alkohol erschöpfend extrahiert, der Extrakt eingeeengt, wiederum mit Äther gefällt und nach 2 bis 3-stündigem Stehen die nunmehr wesentlich hellere Substanz abfiltriert. In obiger Weise getrocknet, wurde sie — da sie noch etwas hygroskopisch war — wiederum wie vorher mit Alkohol und Äther behandelt. Diese Prozedur wurde viermal wiederholt. Nach der vierten Fällung wurden die weißen sehr voluminösen Flocken auf einem bei 110° C. getrockneten und gewogenen Filter gesammelt, mit Äther gut ausgewaschen und auf dem Filter erst an der Luft und dann bei 105° C. bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

0,3066 g der wasserfreien Ochsen-galle lieferten dabei **0,1890 g = 61,64%** gallensaurer Salze.

Sämtliche ätherische Filtrate wurden, wie das erste, jedes für sich eingedampft, die (zuletzt sehr geringen) Rückstände auf Gallensäuren geprüft und ergaben stets negative Resultate. Diese Rückstände wurden auch teilweise in Eisessiglösung mit Benzoylsuperoxyd oxydiert; gaben aber auf Zusatz von Schwefelsäure keine Oxycholesterinreaktionen. Auf Zusatz von Eisenchlorid färbten sich diese Reaktionsgemische mitunter schwach braunrötlich und zeigten im Spektrum Spuren der Lifschützschens Oleinreaktion;¹⁾ namentlich in der unteren Schicht nach dem Durchschütteln des Reaktionsgemisches mit Chloroform.

Bei allen diesen Manipulationen waren also nachweisbare Spuren von Gallensäuren nicht verloren gegangen; wohl aber dürften die wiederholten Umfällungen mit überschüssigem Äther aus den alkoholischen Lösungen: die in der vorgereinigten Galle noch verbliebenen Verunreinigungen — bis auf geringe Spuren — beseitigt haben.

Die Zusammenfassung der oben angedeuteten gewichtsanalytischen Daten ergibt — hinsichtlich des Cholsäuregehaltes der wasserfreien Ochsen-galle — folgendes Resultat:

¹⁾ Vgl. Diese Zeitschr., Bd. 56, S. 446 ff. (1908), sowie Hammarstens Lehrb. d. physiol. Chem. 7. Aufl. (1910), S. 226.

100 Teile der Trockengalle gaben:

Gallensaure Salze 61,64 Teile.
Zieht man hiervon die ermittelten 1,26 Tle. K + 4,96 Tle. Na = 6,22 >

ab, so verbleiben für die freien Säurepaarlinge: . . . 55,42 Teile.

Hiervon müssen abgezogen werden:

Differenz zwischen Taurocholsäure¹⁾
und Cholsäure mit: 6,71 Teilen;

Differenz zwischen Glykocholsäure
und Cholsäure mit: 2,83 > zusammen: 9,54 >

Es bleiben dann für reine und wasserfreie Cholsäure: **45,88** Teile.

Die auffallende Übereinstimmung dieser gewichtsmäßig gewonnenen Zahl mit der unter IA im proportionalen Verhältnis zu der unter IB spektralanalytisch vermittels der Oxycholesterin-Reaktion erhaltenen Zahl (**46,20%**) dürfte wohl kaum einen Zweifel darüber hinterlassen, daß der gesamte N-frei Gallensäuregehalt der Galle tatsächlich in genetischem Zusammenhang mit dem Cholesterin stehen muß.

Eine weitere nicht minder interessante Folge dieser vergleichenden Untersuchung dürfte auch sein, daß sie einen bequemen Weg erschließt:

zur quantitativen Ermittlung des Cholsäuregehaltes der Galle.

Angesichts der Schwierigkeiten und der langwierigen und zeitraubenden Arbeit, welche die bisherigen Verfahren zur Bestimmung der Gallensäuren, — selbst bei größerer analytischer Geschicklichkeit, — beanspruchen, dürfte es der Mühe Wert erscheinen, diesen Gedanken einer Verwertung der Oxycholesterinreaktion der Cholsäure für die quantitative Ermittlung der letzteren, auch in weiteren Fachkreisen zu prüfen und weiter zu verfolgen. Hierzu kommt noch der beachtenswerte Umstand, daß — für nicht geübte Spektroskopiker — hier nichts im Wege steht, die in Rede stehende, intensiv

¹⁾ Aus der oben erwähnten Schwefelbestimmung berechnet sich der Taurocholsäuregehalt zu 32,26%. Dieser Betrag von den 55,42% der Gesamtsäuren abgezogen, ergibt für die Glykocholsäure: 23,16%. (Vgl. oben S. 392).

und echt grüne Farbreaktion der Gallensäuren mit Essigschwefelsäure und Eisenchlorid mit gutem Erfolg auch kolorimetrisch zu messen, um den Cholsäuregehalt in Gallenflüssigkeiten zu ermitteln, etwa in der Art, wie jetzt vielfach die gleichfarbige Liebermannsche Cholastolreaktion benutzt wird, um Cholesterin quantitativ zu bestimmen. Es gibt nämlich, wie gesagt, in der Galle keine anderen Substanzen, die, nach ihrer sie völlig entfärbenden Oxydation mit dem Peroxyd, durch H_2SO_4 und Fe_2Cl_6 das Reaktionsgemisch grün färben.

Übrigens ist in diesem Falle selbst die spektroskopische Arbeit so gering, und die Beobachtungen und deren Ausführungen so einfach, daß sie fast gar keinerlei Übung bedürfen. Die Methodik wie die Technik bei der quantitativen Fixierung einer «minimalen Spektralabsorption», wie sie oben geschildert wurde, sind keine wesentlich anderen als diejenigen, welche z. B. bei der qualitativen spektroskopischen Prüfung des Blutes zur Anwendung gelangen.

Aber gleichviel, ob man diese für Gallensäuren neue Farbreaktion für Gallenuntersuchungen spektroskopisch oder kolorimetrisch verwendet: in beiden Fällen beansprucht eine solche Gallenanalyse, wenn es sich z. B. um direkte Gallenuntersuchungen handelt, mit allen Vorarbeiten noch keine ganze Stunde, von der die Ausführung der eigentlichen Farbreaktion bei gewöhnlicher Zimmertemperatur und deren Messungen nur wenige Minuten einnehmen.

III.

Zur Kenntnis der Oxycholesterinreaktion der Gallensäuren.

Unterliegt auch die Identität der durch Oxydation bei den Gallensäuren hervorgerufenen Essigschwefelsäure-Reaktion in ihren Farben und Spektralerscheinungen mit der gleichen Reaktion des Oxycholesterins keinem Zweifel, so ist es doch andererseits einleuchtend, daß zwei ihrer chemischen Natur nach so heterogene Stoffe, wie die Gallensäuren und das Oxycholesterin es sind, auch in ihren unter gewissen Be-

dingungen identischen Formerscheinungen, irgendwelche unterscheidende, der Verschiedenartigkeit ihrer Natur entsprechende Merkmale mit sich führen müssen. Sicherlich entstehen durch die Einwirkung der Essigschwefelsäure in beiden Fällen: bei den oxydierten Gallensäuren wie beim Oxycholesterin, analoge Verbindungen, welche dieselben optischen Erscheinungen an den Tag legen. Nun sind aber beide genannten Muttersubstanzen dieser farbigen Verbindungen in ihrem Verhalten zu Lösungsmitteln bekanntlich so außerordentlich verschieden, daß man von vornherein veranlaßt sein muß, diese Verschiedenheit auch bei ihren in Rede stehenden farbigen Derivaten anzunehmen.

In der Tat trat diese vorausgesehene Verschiedenheit schon bei den ersten vergleichenden Studien der beiderseitigen gleichfarbigen Reaktionsgemische in Erscheinung:

1. Bekanntlich läßt sich das Cholesterin in Eisessiglösung schon durch einmaliges Aufkochen mit dem gleichen Gewicht Benzoylsuperoxyd in Oxycholesterin überführen,¹⁾ so daß diese oxydierte Lösung auf Zusatz von einigen Tropfen H_2SO_4 bzw. eines darauf folgenden Tropfens Eisenchloridlösung dieselben Farb- und Spektralreaktionen gibt, wie die Eisessiglösung des reinen Oxycholesterins. Schüttelt man diese farbigen Reaktionslösungen mit etwa dem gleichen Volumen Chloroform, so geht der intensiv blau-violette resp. grüne Farbstoff nach der Klärung des Gemisches quantitativ in die obere Schicht über. Die untere Schicht ist dann nur mehr oder minder schwach gelb oder braungelb mit grünlicher Fluoreszenz gefärbt und zeigt auch keines der Oxycholesterinspektren.

2. Führt man diese Reaktion unter genau denselben Bedingungen mit reiner Cholsäure oder auch mit der gut eingedickten Rohgalle aus²⁾ und schüttelt das mit der obigen

¹⁾ Siehe Hammarstens Lehrb. d. Physiol. Chem., 7. Aufl., 1910, S. 418 und 419.

²⁾ Einige Milligramme Cholesterin oder Cholsäure oder Galle werden in 2 ccm Eisessig gelöst und bei gelinder Wärme einige Körnchen Benzoylsuperoxyd in die Lösung eingetragen. Ist auch dies gelöst, so wird die Lösung 1 bis 2mal aufgeköcht und schnell abgekühlt. Die Lö-

Reaktion gleichfarbige Reaktionsgemisch mit Chloroform durch, so geht der gleiche Farbstoff hier in die untere Schicht, während die obere Schicht vollständig farblos bleibt.

3. Ruft man diese Reaktion in der Eisessiglösung eines Gemisches von Cholsäure und Cholesterin hervor und schüttelt die stark gefärbte Lösung mit Chloroform durch, so erscheinen — nach der Trennung — beide Schichten gleich gefärbt: die obere — vom Oxycholesterin, und die untere — von der Cholsäure. Naturgemäß sind die Intensitäten der Farben abhängig von dem jeweiligen Substanzgehalt der entsprechenden Schichten.

Gerade dieses Gemisch, wo das farbige Reaktionsprodukt des Oxycholesterins (obere Schicht) vom gleichfarbigen Produkt der Gallensäuren (untere Schicht) scharf getrennt ist, läßt sich dazu benutzen, um sich von der spektroskopischen Identität der Produkte zu überzeugen. Spannt man nämlich das Reagenzglas, in dem die Reaktion vorgenommen wurde, nach dem Zusatz eines Tropfens Eisenchloridlösung, wo beide Schichten echt grün geworden sind, vor das Spektroskop und stellt es vor der Lampenlichtquelle so ein, daß die Trennungsfläche der beiden grünen Schichten als feine horizontale Linie etwa die Mitte des Spektrums trifft und so alle Farbfelder des letzteren durchschneidet, so merkt man — bei passender Verdünnung der beiden Schichten —, daß der Absorptionsstreifen zwischen den Fraunhofferschen Linien C und d der einen Schicht nichts anderes ist, als die genaue und gerade Fortsetzung des gleichen Streifens der anderen Schicht. Sind die beiden Schichten gleich stark gefärbt, so fallen im Spektrum beide Absorptionen in einen homogenen Streifen zusammen.

Dieser sehr charakteristische Unterschied zwischen der Essigschwefelsäure-Reaktion des Oxycholesterins und der gleichen Reaktion der Gallensäuren, dem, wie gesagt, die Löslichkeitsunterschiede der beiden farbigen Reaktionsprodukte in den

sung wird dann mit 1 ccm Chloroform vermischt und 8 bis 10 Tropfen H_2SO_4 hinzugesetzt, worauf die Farbreaktion ihre Entwicklung beginnt. Bei diesen vergleichenden Versuchen müssen alle diese Mischungsverhältnisse innegehalten werden.

betreffenden Lösungsmitteln zu Grunde liegen, läßt sich mit Vorteil dazu benutzen, um die Gallensäuren in tierischen Stoffen auch neben den eigentlichen Cholesterinstoffen, die für sich oder nach ihrer Oxydation gleichfalls die Essigschwefelsäure-Reaktion geben, mit Sicherheit zu erkennen. Schüttelt man nämlich das nach obigen Angaben hergestellte farbige Reaktionsgemisch mit Chloroform durch, so ist nach der Trennung der Schichten in Abwesenheit von Cholesterinstoffen die obere Schicht völlig farblos, ist sie aber gefärbt und zeigt das Absorptionsspektrum des Oxycholesterins, so kann mit Sicherheit auf die Anwesenheit von Cholesterinstoffen in der zu untersuchenden Substanz geschlossen werden.

Um Irrtümer auszuschließen, empfiehlt es sich, ein Probchen der obern Schicht, die mitunter Tröpfchen der unteren Schicht suspendiert enthält und so gleichfalls etwas farbig erscheint, durch ein kleines Filter zu filtrieren. In Abwesenheit von Cholesterinstoffen ist die klare Lösung völlig farblos; im Gegenfalle — auch wenn das Filtrat mißfarbig erscheint — läßt sich die Gegenwart von Cholesterinstoffen durch das Spektrum des Oxycholesterins außer Zweifel setzen.

Auf diese Weise konnte auch festgestellt werden, daß — bei den oben unter I A wiedergegebenen Spektralanalysen der Ochsgalle — der geringe Cholesteringehalt der letzteren in merklichem Grade an den dortigen Oxycholesterin-Reaktionen nicht beteiligt war¹⁾ und infolgedessen auf das Resultat jener Analysen von keinem Einfluß sein konnte.

Schlußsätze:

1. Wie aus dieser und der vorhergehenden Mitteilung²⁾ hervorgeht, ist die Farbreaktion, die bei der Cholsäure oder der eingedickten Galle nach der Oxydation ihrer Eisessiglösungen durch konzentrierte Schwefelsäure (Essigschwefelsäure-Reaktion) hervorgerufen werden kann, in ihren Farben und Absorptionsspekteren identisch mit der gleichen Reaktion des Oxycholesterins.

¹⁾ Vergl. oben, S. 390, Anmerkung 1.

²⁾ Diese Zeitschr., Bd. 91, S. 322 (1914).

2. Diese Farbreaktion ist außer beim Oxycholesterin und seinen Derivaten — unmittelbar — bei keinem anderen tierischen Stoff einschließlich des Cholesterins anzutreffen. Beim letzteren (wie bei den Gallensäuren), kann sie nur nach der Oxydation, also nach Überführung in Oxycholesterin (respektive in ein Derivat desselben), hervorgerufen werden.¹⁾ Hieraus folgt der genetische Zusammenhang der Gallensäuren mit dem Cholesterin.

3. Wie beim Oxycholesterin, so ist auch bei den Gallensäuren die Intensität der Farben und der Spektren der nach ihrer Oxydation hervorgerufenen Essigschwefelsäure-Reaktion direkt proportional dem jeweiligen Gehalt des Reaktionsgemisches an den genannten Substanzen.²⁾ Diese Reaktion kann daher, durch entsprechende Messungen ihrer Farbenintensität (kolorimetrisch) oder ihrer Spektralintensität (spektrometrisch) wie oben nachgewiesen; auch hier zu Ermittlungen des quantitativen Gehalts der Gallenflüssigkeiten an Gallensäuren dienen.

4. Am einfachsten lassen sich — hinsichtlich der Spektralanalyse — diese Messungen verwerten: durch Ermittlung der «minimalen Spektralabsorptionen» einerseits der zu untersuchenden Gallensubstanz und andererseits der reinen Cholsäure. Aus dem proportionalen Verhältnis dieser beiden Ermittlungen ergibt sich der Gehalt der Gallensubstanz an den N- resp. S-freien Komponenten (Cholsäuren) der Gallensäurepaarlinge (s. oben S. 390).

5. Zahlenmäßig kommt die «minimale Spektralabsorption» durch denjenigen Prozentgehalt des farbigen Reaktionsgemisches an der betreffenden Substanz zum Ausdruck, bei welchem das Spektralbild des Gemisches — nach dessen entsprechender Verdünnung mit einem genau gemessenen farblosen Mittel — eben noch deutlich wahrnehmbar ist, so daß es bei weiterer geringfügiger Verdünnung aus

¹⁾ «Berichte», Bd. 41, S. 252 (1908) und Bd. 47, S. 1459 (1914).

²⁾ S. Bioch. Zeitschr. Bd. 62, S. 219 (1914) und die dort zitierten Stellen. Auch hier bestätigt sich dies, wenn man verschiedene Analysen mit Lösungen von verschiedenem Substanzgehalt vornimmt: Man erhält dann stets die gleichen Zahlenwerte. (S. obige Spektralanalysen S. 387 u. 389).

dem betreffenden Spektralfeld verschwindet. Wie oben gezeigt, läßt sich dieser Punkt mit befriedigender Genauigkeit sehr wohl fixieren.

6. Auf diese Weise konnte oben der Beweis geführt werden, daß die Cholsäuren nicht nur teilweise, sondern auch in ihrer Gesamtheit quantitativ als Abbauprodukte des Cholesterins angesprochen werden dürfen. Und zwar: weil das proportionale Verhältnis der Oxycholesterinreaktion der rohen Galle zu der gleichen Reaktion der reinen Cholsäure für eine etwaige anderweitige Herkunft der N- und S-freien Komponenten der Gallensäuren keinen Raum übrig läßt.

7. Das Instrument, mit dem die obigen Spektralanalysen ausgeführt wurden, ist das bekannte Spektroskop mit gerader Durchsicht (Dreiprismenkörper). Als Lichtquelle diente ein Glühkörper von ca. 100-H.-K. Das Verdünnungsgefäß, durch welches das Absorptionsspektrum beobachtet wurde, war 18 mm weit.

8. Die für die Hervorrufung der farbigen Oxycholesterin-Reaktion dienende Essigschwefelsäure läßt sich vorrätig halten. Sie besteht aus 1 Volumen konzentrierter Schwefelsäure und 10 Volumen Eisessig, ist — wenn Gefäße und Reagenzien rein sind — völlig farblos und unbegrenzt haltbar.

Die Eisenchlorid-Eisessiglösung ist zweiprozentig und ebenfalls unbegrenzt haltbar, so daß auch sie vorrätig gehalten werden kann. Zur Hervorrufung der grünen Farbe der Reaktion darf — namentlich für Gallenlösungen — nicht mehr als 1 Tropfen der Eisenlösung verwendet werden.

9. Die in angegebener Weise hergestellten oxydierten Cholsäure- resp. Gallenlösungen in Eisessig, halten sich recht lange, so daß sie selbst nach wochenlanger Aufbewahrung ihre Reaktionsintensität in merklichem Grade nicht einzubüßen pflegen.

10. Es empfiehlt sich die Eisessiglösungen der Galle wie der Cholsäure für die obigen Spektralanalyse in nicht sehr konzentriertem Zustande zu verwenden, damit sie für die quantitativ zu messende Verdünnung bis zur minimalen Spektralabsorption nicht zu große Mengen Eisessig beanspruchen.

Die geeignete Konzentration für Gallenlösungen ist die 2%ige und für Lösungen der reinen Cholsäure, die 1%ige.¹⁾ Die für die Oxydation geeigneten Verhältnisse zwischen diesen Substanzen und dem Benzoylsuperoxyd sind: Auf 1 Teil Galle 1,4 Teile und auf 1 Teil Cholsäure 1 Teil des Peroxyds. — Im übrigen gelten für beide Operationen die oben unter IA und IB empfohlenen Handhabungen. (siehe oben S. 335 u. S. 389.)

11. Die in Rede stehenden messenden Verdünnungen der farbigen Lösungen behufs Feststellung der minimalen Spektralabsorptionen oder die etwaigen kolorimetrischen Messungen müssen sofort nach dem Zusatz des Eisenchlorids vorgenommen werden. Es ist daher zweckmäßig — da man stets einige Kubikzentimeter der Gallenlösung zur Verfügung hat und nur 1 ccm für je eine Analyse braucht — daß man zunächst eine Messung zur Orientierung ausführt, um zu erfahren, wieviel man z. B. zur Verdünnung vom Lösungsmittel verbrauchen muß, um zum Ziele zu gelangen. Die weiteren Analysen können daher umso rascher und genauer von statten gehen.

Hamburg, im Juli 1914.

¹⁾ Gemeint sind: die nach dem obigem Verfahren für die Spektralanalyse fertiggestellten Eisessiglösungen vor ihrer Verdünnung mit Chloroform.