

Beiträge zur Kenntnis des Cholesterins

(V. Abhandlung)

von

J. Mauthner und W. Suida.

(Vorgelegt in der Sitzung am 5. Februar 1903.)

Über die Oxydation des Cholesterins.

In unserer IV. Abhandlung¹ haben wir einige Oxydationsprodukte beschrieben, die bei der Einwirkung von Chromsäure in Eisessig aus dem Cholesterin erhalten wurden. Diese Substanzen stehen dem Ausgangsmaterial noch recht nahe; sie enthalten noch den ganzen Kohlenstoffkomplex des Cholesterinmoleküles und sind von nichtsaurer Beschaffenheit. Neben ihnen bilden sich, wie wir bereits mitgeteilt haben, amorphe Säuren, auf die wir seinerzeit nicht näher eingegangen sind.²

Wir haben uns nun seither eingehender mit den sauren Oxydationsprodukten des Cholesterins befaßt und wollen einen Teil der dabei gewonnenen Ergebnisse im folgenden mitteilen. Neben dem Umstande, daß seit unserer letzten Veröffentlichung eine längere Zeit verstrichen ist, was mit den ungewöhnlichen Schwierigkeiten zusammenhängt, die der Gegenstand bietet, sehen wir uns zu der gegenwärtigen Mitteilung auch dadurch bewogen, daß inzwischen von anderer Seite in der gleichen Richtung gearbeitet worden ist. Van Oordt³ hat

¹ Monatshefte für Chemie, XVII, 579 (1896).

² Über die Literatur des Gegenstandes haben wir in der zitierten Arbeit bereits kurz berichtet.

³ Über Cholesterin. Inaug. Diss. von Gabriel van Oordt. Heidelberg, 1901. (Aus dem chem. Laboratorium der medizinischen Fakultät zu Freiburg i. B.) Auf diese Arbeit sind wir durch Zufall in allerletzter Zeit aufmerksam geworden.

zunächst mit Chromsäure, dann mit Permanganat und mit Salpetersäure oxydiert, wobei neben den von uns beschriebenen indifferenten Oxydationsprodukten amorphe Säuren erhalten wurden, auf die der Verfasser jedoch nicht näher eingeht.

Wenn auch die Ergebnisse unserer Versuche, bei denen ebenfalls Salpetersäure, Kaliumpermanganat bei gewöhnlicher Temperatur und in der Hitze verwendet wurden, noch keinen näheren Einblick in die Konstitution des Cholesterins gestatten, so sind sie doch zu einer allgemeineren Schlußfolgerung geeignet. Es wurden nämlich in Wasser lösliche Säuren gewonnen, die das Gemeinsame zeigen, daß sie als Carboxylderivate von Kohlenwasserstoffen der Formel C_nH_{2n} aufzufassen sind, was mit der in unserer ersten Abhandlung¹ ausgesprochenen Vermutung in Einklang steht, daß wir es in den Cholesterinkörpern mit Abkömmlingen von Kohlenwasserstoffen zu tun haben, die komplizierte, gesättigte, cyclische Kerne enthalten. Bei den unter verschiedenen Bedingungen vorgenommenen Oxydationen sind wir durch die Analysen, gleichgiltig, ob einheitliche Verbindungen oder Gemische vorlagen, stets zu Zahlen gelangt, deren Deutung nur unter der Annahme von Kernen C_nH_{2n} möglich ist.

Bei den zahlreichen Versuchen, die uns eine Reihe von Jahren hindurch beschäftigten, gelang es bisher nicht, kristallisierte Säuren² zu gewinnen; bei ausreichender Oxydation entstanden stets in geringerer Menge wasserunlösliche neben größeren Mengen leicht löslicher Säuren, deren Trennung und Identifizierung lediglich durch verschiedenes Verhalten ihrer Salze möglich war, während sich die sonst gebräuchlichen Trennungs- und Reinigungsverfahren, wie verschiedene Löslichkeit der freien Säuren, fraktionierte Krystallisation, Destillation etc. nicht anwenden ließen. Mehrere hundert Darstellungen und Elementaranalysen von Salzen mußten allein zur Orientierung ausgeführt werden und dennoch steht das Ergebnis bis auf die angegebene Schlußfolgerung mit dem Aufwand an Zeit und Arbeit in keinem Einklange.

¹ Monatshefte für Chemie, XV, 85 (1894).

² Außer Oxalsäure.

Bei den angewendeten Oxydationsverfahren mit Salpetersäure, mit Kaliumpermanganat bei Zimmertemperatur und auf dem Wasserbade wurden unter anderem in Wasser leicht lösliche, amorphe Säuren erhalten, deren Kalksalze, in ihrer Zusammensetzung einander nahestehend, die gemeinsame Eigenschaft zeigen, in der Hitze aus ihrer wässrigen Lösung auszufallen, beim Erkalten sich wieder zu lösen, ein Verhalten, welches ihre Isolierung aus dem Gemenge ermöglichte und das an die Eigenschaft mehrerer, schon bekannter Säuren erinnert, von denen wir hier insbesondere die Hydromellithsäure und die von Francesconi¹ aus Santonsäure durch Oxydation mit Kaliumpermanganat erhaltenen beiden Säuren $C_{13}H_{18}O_8$ erwähnen wollen. Unsere Säuren sind so wie die letztgenannten vierbasisch und eine von ihnen besitzt auch die gleiche empirische Formel.

Eine weitere gemeinsame Eigenschaft der Kalksalze dieser Säuren ist ihr gleicher Gehalt an Krystallwasser und zwar entspricht dessen Menge 8 Molekülen, von denen ein Teil schon bei 100°, ein anderer aber erst bei 200° C. entweicht.

Die folgenden Mitteilungen beschäftigen sich vorwiegend mit diesen Säuren.

1. Oxydation mit Salpetersäure.

Die Oxydation von Cholesterin mit Salpetersäure wurde in verschiedener Weise vorgenommen; einerseits wurden die Mengenverhältnisse, andererseits die Temperatur und die Dauer der Behandlung variiert. Es wurde dabei angestrebt, die in Wasser unlöslichen Oxydationsprodukte auf ein möglichst geringes Ausmaß einzuschränken, weshalb meist längere Einwirkung der Salpetersäure stattfand.

Für den Beginn der Oxydation war die verwendete Säure immer mit dem halben Volum Wasser verdünnt, später wurde zum Ersatz der verbrauchten und der verdampften Säure reine Salpetersäure hinzugefügt. Nach Beendigung der Einwirkung wurde die Salpetersäure abdestilliert, der Rest auf dem Wasser-

¹ S. Beilstein, 3. Aufl., II, 2067, 2068.

bade in offener Schale verdampft. Dabei trat zum Schlusse gewöhnlich noch eine durch Auftreten roter Dämpfe erkennbare Reaktion ein und es hinterblieb eine schaumige, gelblich gefärbte Masse, die wiederholt mit Wasser abgedampft wurde. Der Rückstand enthielt meist eine geringere Menge in Wasser unlöslicher, gelbgefärbter, saurer Substanz und eine größere Menge in Wasser löslicher Säuren.

Die Aufarbeitung geschah anfangs ähnlich der von Redtenbacher¹ angegebenen Art durch Überführung der in Wasser löslichen Säuren in die Ammonsalze, Fällung mit Silbernitrat und Umkrystallisieren des Niederschlages aus ammoniumnitrathaltigem Wasser, später jedoch stets in der Weise, daß die von dem Unlöslichen abfiltrirte wässerige Lösung zur Abscheidung der stets reichlich vorhandenen Oxalsäure (teils direkt, teils nach vorangegangenem Ausschütteln mit Äther) mit kohlensaurem Kalk in der Kälte neutralisiert und aus der filtrirten Lösung durch Aufkochen die in der Hitze unlöslichen Kalksalze abgeschieden wurden. Durch Wiederauflösen in kaltem Wasser und abermaliges Ausfällen in der Hitze konnten die Kalksalze gereinigt werden.

In den Filtraten von den durch Hitze abgeschiedenen Kalksalzen sind reichliche Mengen von Kalksalzen in Wasser löslicher, amorpher Säuren enthalten, welche mit Alkohol gefällt werden können. Eine nähere Untersuchung dieser Säuren wurde vorläufig nicht vorgenommen.

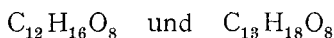
Die in der Hitze abgeschiedenen Kalksalze bilden rein weiße Pulver, welche in feuchtem Zustande sich in kaltem Wasser rasch, getrocknet nur langsam auflösen und in Alkohol unlöslich sind. Die durch Einwirkung berechneter Mengen von Schwefelsäure und Alkohol abgeschiedenen freien Säuren bilden nach dem Verdunsten des Lösungsmittels amorphe, firnisartige, zerreibliche, fast farblose Massen, welche in Wasser leicht löslich sind und deren Lösungen mit den Acetaten von Kupfer, Zink, Baryum und Calcium in der Hitze Niederschläge geben. Für die Untersuchung dürften sich vor allen die Kalksalze am besten eignen.

¹ Liebig's Annalen, 57, 162 (1846).

In den heiß abgeschiedenen Kalksalzen scheinen zwei einander in der Zusammensetzung nahestehende, homologe Verbindungen vorzuliegen, wofür die folgende Beobachtung spricht. Erhitzt man die frei abgeschiedene Säure für sich, so tritt bei 125 bis 126° C. Verflüssigung unter Gasentwicklung ein, die bei 160° lebhafter wird und nach längerem Erhitzen auf diese Temperatur aufhört. Der Rückstand ist in Wasser löslich und liefert neben einem in der Hitze wieder fällbaren Kalksalz in dem Filtrat davon ein zweites Kalksalz, das durch Alkohol gefällt wird und das eine Säure enthält, die durch Wasserabspaltung aus einer der ursprünglichen Säuren entstanden ist.

Das direkt aus den Oxydationsprodukten abgeschiedene, wiederholt umgefällte Kalksalz hat eine Zusammensetzung, die am besten mit der Formel $C_{12}H_{12}Ca_2O_8 + 8H_2O$ übereinstimmt, während das nach dem Erhitzen der freien Säure wiedergewonnene, in der Hitze fällbare Kalksalz bei der Analyse Zahlen lieferte, die gut zu der Formel $C_{13}H_{14}Ca_2O_8 + 8H_2O$ stimmen. Das aus dem Filtrat von diesem letzteren durch Alkohol gefällte Kalksalz zeigte eine Zusammensetzung, die erkennen ließ, daß wir es hier mit einer Säure zu tun haben, die durch Austritt von Wasser aus einer Verbindung $C_{12}H_{16}O_8$ entstanden ist.

Auf Grund dieser Beobachtungen müssen wir die erwähnte Annahme machen, daß die aus den Oxydationsprodukten des Cholesterins mit Salpetersäure erhaltenen, in der Hitze fällbaren Kalksalze ein Gemenge darstellen, das die Salze der beiden Säuren:



enthält, die homolog sind und von denen die erstgenannte in überwiegender Menge gebildet wird.

Charakteristisch ist das Verhalten des Krystallwassers bei den Kalksalzen: Das Salz der Säure $C_{12}H_{16}O_8$ hat die Zusammensetzung: $C_{12}H_{12}Ca_2O_8 + 8H_2O$; davon entweichen 6 Moleküle bei 100° C., die anderen 2 Moleküle erst bei 200° C. Ähnlichem Verhalten begegnen wir bei den Produkten der später zu besprechenden Oxydation mit Kaliumpermanganat.

Bei der trockenen Destillation der heiß abgeschiedenen Kalksalze mit Natronkalk wurde ein Öl gewonnen, dessen Hauptmenge zwischen 200° und 246° übergang, sich bei der Analyse als sauerstoffhaltig erwies, reichlich Brom addierte und eine Permanganat-Sodalösung in der Kälte sofort reduzierte.

Die Überführung der Kalksalze in andere Metallverbindungen durch doppelte Umsetzung liefert meist keine brauchbaren Resultate, weil leicht Kalk in die neuen Salze mit übergeht.

Im folgenden soll nun eine kurze Darstellung der Versuche und ihrer Ergebnisse gegeben werden.

- I. Je 20 g Cholesterin mit 300 cm^3 reiner Salpetersäure und 150 cm^3 Wasser durch 21 $\frac{1}{2}$ Stunden am Wasserbade erhitzt. Der in Wasser lösliche Teil des Produktes ergab nach dem Vorgange Redtenbacher's ein Silbersalz $C_{13}H_{15}Ag_3O_8$.

In 100 Teilen:

	Gefunden	Berechnet
C	25·53	25·04
H	2·56	2·43
Ag	51·27	51·98

Aus dem Filtrat dieses Salzes wurde durch Einengen, Versetzen mit Ammoniak und Silbernitrat ein gleich zusammengesetztes Salz gewonnen.

In 100 Teilen:

	Gefunden
C	25·01
H	2·38
Ag	51·06

- II. Je 20 g Cholesterin mit 300 cm^3 Salpetersäure und 150 cm^3 Wasser durch 13 Stunden am Wasserbade erhitzt, dann 100 cm^3 Salpetersäure zugefügt und 10 Stunden weiter erhitzt. Der in Wasser lösliche Teil des Produktes wurde

mit Ammoniak übersättigt, mit Chlorcalcium die Oxalsäure ausgefällt; das Filtrat gab, mit Kupferacetat und Essigsäure (Barfoed's Reagens) gefällt, ein Kupfersalz, das bei 100° getrocknet die Zusammensetzung $C_{13}H_{14}Cu_2O_8 + 2H_2O$ zeigte.

In 100 Teilen:

	Gefunden	Berechnet
C	34·27	33·81
H	3·80	3·94
Cu	27·75	27·57

III. Je 20 g Cholesterin wurden, wie beschrieben, oxydiert, die wässrige Lösung mit Äther ausgeschüttelt, dann mit kohlensaurem Kalk neutralisiert, kalt filtriert, das Filtrat aufgekocht, wobei eine reichliche Menge Kalksalz als weißes Pulver gewonnen wurde, das mit kochendem Wasser und schließlich mit Alkohol gewaschen annähernd die Zusammensetzung $C_{12}H_{12}Ca_2O_8 + 8H_2O$ zeigte.

Wasserverlust bei 200° in 100 Teilen:

	Gefunden	Berechnet
H ₂ O	27·63	28·35

Die wasserfreie Substanz gab in 100 Teilen:

	Gefunden	Berechnet für $C_{12}H_{12}Ca_2O_8$
C	38·78	39·53
H	3·41	3·33
Ca	21·07	22·01

Aus diesem Kalksalze wurde auf die schon angegebene Weise die freie Säure als amorphe, lackartige, leicht zerreibliche Masse gewonnen und analysiert. Sie gab, bei 100° getrocknet, folgende Zahlen:

In 100 Teilen:

	Gefunden	Berechnet für $C_{12}H_{16}O_8$
C.....	49·40	49·97
H.....	5·34	5·61

Die wässrige Lösung der freien Säure gibt mit Eisenchlorid keine Fällung, was sie von den Säuren unterscheiden läßt, die keine in der Hitze unlöslichen Kalksalze liefern.

Aus der freien Säure wurde mit essigsaurer Kupferacetatlösung ein Kupfersalz als Niederschlag gewonnen, der, bei 100° getrocknet, gab:

In 100 Teilen:

	Gefunden	Berechnet für $C_{12}H_{12}Cu_2O_8 + H_2O$
Cu.....	29·55	29·63

IV. Oxydation wie beschrieben. Das Ausäthern des in Wasser gelösten Oxydationsproduktes wurde solange fortgesetzt, bis die wässrige Lösung mit Eisenchlorid keine Fällung mehr gab; die saure wässrige Lösung wurde auf das heiß fällbare Kalksalz verarbeitet und dieses zur Reinigung umgefällt.

Analysen des Kalksalzes:

1. Das lufttrockene Salz gab in 100 Teilen:

	Gefunden	Berechnet für $C_{12}H_{12}Ca_2O_8 + 8H_2O$
Ca.....	15·90	15·77

Wasserverlust bei 100°:

	Gefunden	Berechnet für $6H_2O$
H_2O	20·91	21·26

Wasserverlust bei 200°:

	Gefunden	Berechnet für 2H ₂ O
H ₂ O	7·06	7·09

2. Das wasserfreie Salz gab in 100 Teilen:

	Gefunden	Berechnet für C ₁₂ H ₁₂ Ca ₂ O ₈
C	39·21	39·53
H	3·45	3·33
Ca	21·42	22·01

Um das Verhalten der Säure C₁₂H₁₆O₈ bei der Weiteroxydation kennen zu lernen, wurde der folgende Versuch angestellt:

5 g des Kalksalzes wurden in wässriger Lösung mit kohlensaurem Natron umgesetzt und mit Kaliumpermanganat entsprechend 4 Atomen Sauerstoff auf 1 Molekül der Säure unter Erwärmen oxydiert. Die filtrierte Lösung wurde mit Calciumacetat von der Oxalsäure befreit, dann mit Bleiessig gefällt, der gewaschene Niederschlag durch Schwefelwasserstoff zerlegt, das Filtrat mit kohlensaurem Kalk behandelt, filtriert und aufgekocht. Das jetzt erhaltene Kalksalz zeigte die folgende Zusammensetzung:

Wasserverlust bei 100° 19·91 Prozent,
 » » 200° 7·35 »

Die wasserfreie Substanz gab für 100 Teile:

C 39·03
 H 3·54
 Ca 21·41

Es ist also das Ausgangsmaterial teilweise zerstört, teilweise unverändert zurückgewonnen worden.

Um nun auch einen Versuch in der Richtung auszuführen, ob die Säure C₁₂H₁₆O₈ ein Endprodukt der Oxydation mit

Salpetersäure darstellt, wurde ein aus der Ätherausschüttelung gewonnenes Oxydationsprodukt des Cholesterins, das kein in der Hitze fällbares Kalksalz lieferte, der Weiteroxydation mit Permanganat unterworfen.

Dieses Produkt war aus dem Ätherrückstande als Kupfersalz gewonnen worden durch Auflösen in Wasser, Fällern mit Eisenchlorid, Zerlegen des Niederschlages mit Ammoniak in der Wärme, Ansäuern und Ausäthern des Filtrates, Auflösen des Ätherrückstandes in Wasser, Versetzen mit Kupferacetat und Essigsäure, Abfiltrieren des Niederschlages, Aufkochen des Filtrates, Abfiltrieren des neuerlich dabei gebildeten Niederschlages und Fällern des Filtrates mit Alkohol. Dieses Kupfersalz gab bei der Analyse folgende Werte nach dem Trocknen bei 130°:

In 100 Teilen:

	Gefunden	Berechnet für $C_{13}H_{16}Cu_2O_9$
C.....	34·78	35·19
H.....	3·43	3·65
Cu.....	28·82	28·69

Dieses Salz¹ wurde, wie vorhin angegeben, in das Natriumsalz übergeführt und mit Permanganat entsprechend 6 Molekülen Sauerstoff pro Molekül behandelt. Die Aufarbeitung geschah auf die angegebene Weise, die gewonnene Säure wurde gelöst und mit Kupferacetat und Essigsäure aufgeköcht, wobei ein gelbgrünes, körniges Kupfersalz ausfiel. Die Analyse derselben zeigte, daß wieder unverändertes Ausgangsmaterial vorlag; es lieferte nach dem Trocknen bei 120° folgende Zahlen:

In 100 Teilen:

C.....	34·88
H.....	3·56
Cu.....	29·20

¹ Die Säure dieses Salzes ist nicht identisch mit der Säure $C_{13}H_{18}O_8$, die ein in der Hitze fällbares Kalksalz liefert.

Das Filtrat dieses Kupfersalzes enthielt eine Säure, welche ein durch Aufkochen fällbares Kalksalz lieferte.

Der eben angeführte Versuch wurde wiederholt mit der alleinigen Ausnahme, daß diesmal die doppelte Menge Kaliumpermanganat verwendet wurde. Die gewonnene Säure wurde in das Kalksalz übergeführt und dieses durch Aufkochen abgeschieden; das lufttrockene Salz gab für 100 Teile:

	Gefunden	Berechnet für $C_{12}H_{12}Ca_2O_8 + 8H_2O$
C.....	28·21	28·32
H	5·35	5·56
Ca.....	16·00	15·77

Aus diesen Versuchen erhellt, daß in der Tat die Säure $C_{12}H_{16}O_8$ ein Endoxydationsprodukt darstellt. Die oxydierte Säure aus dem Kupfersalz $C_{13}H_{16}Cu_2O_9$ wurde bei der Anwendung von 6 Atomen Sauerstoff zum Teile unverändert zurückgewonnen, bei 12 Atomen Sauerstoff in $C_{12}H_{16}O_8$ umgewandelt.¹

Wir haben oben erwähnt, daß die Säure $C_{12}H_{16}O_8$ wahrscheinlich mit einer homologen Säure $C_{13}H_{18}O_8$ gemengt auftritt und auch kurz angeführt, was uns zu dieser Annahme führte. Der folgende Versuch dient als Beleg hiefür.

Aus dem heiß abgeschiedenen Kalksalz dargestellte freie Säure wurde längere Zeit auf 160 bis 166° erhitzt, bis die Gasentwicklung aufhörte und die Masse in ruhigem Flusse war. Der glasartig erstarrte Rückstand wurde in Wasser gelöst von Verunreinigungen abfiltriert, das Filtrat mit kohlen-saurem Kalk abgesättigt und nach 24 Stunden filtriert. Die Lösung wurde aufgeköcht und der dabei ausgeschiedene Niederschlag wie üblich mit heißem Wasser und Alkohol gewaschen. Dieses Salz zeigte, bei 100° getrocknet, folgende Zusammensetzung:

¹ Auch bei dem Versuche mit 6 Atomen Sauerstoff scheint eine geringere Menge dieser Säure gebildet worden zu sein.

In 100 Teilen:

	Gefunden	Berechnet für $C_{13}H_{14}Ca_2O_8 + 2H_2O$
C	37·31	37·65
H	4·13	4·39
Ca	19·10	19·35

Das Filtrat, mit Alkohol gefällt, gab als Niederschlag ein Kalksalz, das, bei 100° getrocknet, folgende Zusammensetzung aufwies:

In 100 Teilen:

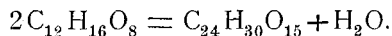
	Gefunden	Berechnet für $C_{24}H_{24}Ca_3O_{15} + 2H_2O$
C	40·37	40·65
H	4·37	3·99
Ca	16·88	16·98

Ein Silbersalz derselben Säure lieferte eine Bestätigung für diese Formel; es gab vakuumtrocken:

In 100 Teilen:

	Gefunden	Berechnet für $C_{24}H_{24}Ag_6O_{15}$
C	24·04	24·00
H	2·19	2·02
Ag	54·57	53·97

Diese Säure ist also entstanden zu denken nach der Gleichung:



Dies bietet gleichzeitig eine Bestätigung unserer (auch auf Grund der Ähnlichkeit mit der öfter beobachteten Säure $C_{13}H_{18}O_8$ gemachten) Annahme, daß wir es mit $C_{12}H_{16}O_8$ und nicht mit einem kleineren Molekül (etwa $C_6H_8O_4$) zu tun haben.

Dieses Anhydrid scheint übrigens unter den direkten Oxydationsprodukten, die kein in der Hitze fällbares Kalksalz liefern, enthalten zu sein, denn wir sind unter den zahlreichen

dargestellten und analysierten Kupfersalzen dieser Oxydationsprodukte wiederholt auf die Formel $C_8H_8CuO_5$ gestoßen, deren Multiplum $C_{24}H_{24}Cu_3O_{15}$ in völliger Übereinstimmung steht mit der Zusammensetzung der eben besprochenen Salze.

2. Oxydation mit kalter Permanganatlösung.

Fein zerriebenes Cholesterin wurde in Portionen zu je 3·3 g mit je 330 cm^3 fünfprozentiger Kaliumpermanganatlösung (entsprechend 18 Atomen Sauerstoff pro Molekül) in Flaschen gebracht und unter öfterem Umschütteln in Berührung gelassen. Nach etwa zwei Wochen war die Permanganatlösung entfärbt. Die Flüssigkeit wurde von dem ausgeschiedenen Schlamm, der viel unangegriffenes Cholesterin, aber (nach dem negativen Ausfall der Reaktion mit Phenylhydrazin) kein Oxycholestenon enthielt, abfiltriert, mit Schwefelsäure angesäuert und mit Äther ausgeschüttelt. In den Äther gingen saure Substanzen über, die in Wasser zum Teile löslich, zum Teile unlöslich waren.

Die ausgeätherte wässrige Lösung wurde mit Kalilauge neutralisiert, das ausgeschiedene Kaliumsulfat entfernt, die Flüssigkeit mit Baryumacetat gefällt, filtriert und mit Bleiacetat ausgefällt. Der gewaschene Bleiniederschlag wurde mit Schwefelwasserstoff zerlegt und das Filtrat eingengt. Nun wurde mit kohlenurem Kalk abgesättigt, filtriert und aufgekocht, wobei ein Kalksalz ausfiel, das durch Lösen in der Kälte und Aufkochen umgefällt und mit kochendem Wasser und Alkohol gewaschen wurde. Die Analysen solcher bei verschiedenen Darstellungen gewonnener Kalksalze gaben folgende Zahlen:

1. Bei 100° getrocknetes Salz gab in 100 Teilen:

	Gefunden	Berechnet für $C_{13}H_{14}Ca_2O_8 + 2H_2O$
C	37·63	37·65
H	4·47	4·39
Ca	19·53	19·35

2. Wasserverlust bei 200° C.:

In 100 Teilen:

	Gefunden		Berechnet für $C_{13}H_{14}Ca_2O_8 + 8H_2O$
H_2O	27·69	$8H_2O$	27·59

Die wasserfreie Substanz gab in 100 Teilen:

	Gefunden	Berechnet für $C_{13}H_{14}Ca_2O_8$
C	41·02	41·23
H	3·96	3·74
Ca	21·24	21·20

Die aus dem Kalksalz dargestellte freie Säure ist amorph und gibt, in wässriger Lösung mit den Acetaten von Zink und Kupfer gekocht, Niederschläge, die sich in kaltem Wasser wieder auflösen.

Mit heiß gefälltem Kalksalz wurde ein Versuch der Weiteroxydation mit Salpetersäure ausgeführt: 5 g des Salzes wurden mit 150 cm^3 reiner Salpetersäure und 75 cm^3 Wasser auf dem Wasserbade erhitzt, wobei eine ziemlich lebhaftere Reaktion stattfand. Nach etwa $\frac{3}{4}$ Stunden ließ die Reaktion nach und trat auch bei längerem Erhitzen nicht weiter auf. Der durch Abdampfen der Salpetersäure erhaltene sirupöse Rückstand wurde in Wasser gelöst, mit kohlenurem Kalk neutralisiert und die Lösung aufgeköcht. Das ausgefallene Kalksalz gab nach dem Reinigen und Trocknen bei 200° C. bei der Analyse folgende Zahlen für 100 Teile:

C	41·06
H	3·87
Ca	21·31

Die Säure $C_{13}H_{18}O_8$, welche der Formel nach der im vorigen Abschnitte besprochenen Säure homolog ist, wurde also durch Salpetersäure wahrscheinlich zum Teile zerstört, zum Teile unverändert gelassen.

3. Oxydation mit heißer Permanganatlösung.

Der Vorgang bei dieser Oxydation, bei welcher einheitlichere Produkte zu entstehen scheinen, war im allgemeinen folgender: Je 10 g fein gepulvertes Cholesterin wurden mit 1 l fünfprozentiger Permanganatlösung auf dem Wasserbade erwärmt, nach dem Entfärben wurden noch weitere 50 g Kaliumpermanganat in fester Form oder in Lösung eingetragen. Dieses Verhältnis entspricht ungefähr 36 Atomen Sauerstoff für 1 Molekül Cholesterin; es wurde nach verschiedenen Versuchen mit größeren oder geringeren Mengen des Oxydationsmittels festgehalten, da diese keinen Vorteil geboten hatten. Nach etwa eintägigem Erwärmen war die Flüssigkeit entfärbt, sie wurde von dem Manganschlamm abfiltriert, mit Essigsäure schwach angesäuert und mit Bleizucker und Bleiessig ausgefällt. Der gewaschene Niederschlag wurde in Wasser suspendiert, mit Schwefelwasserstoff zerlegt und das Filtrat stark eingeeengt. Beim Erkalten krystallisierte Oxalsäure in beträchtlicher Menge aus; sie wurde abgesaugt, das Filtrat mit Wasser etwas verdünnt, mit kohlen-saurem Kalk neutralisiert, abermals kalt filtriert und durch Erhitzen gefällt. Die ausgeschiedenen Kalksalze wurden dann mit siedendem Wasser und mit Alkohol gewaschen und durch Umfällen gereinigt.

Das erste Filtrat von den heiß gefällten Kalksalzen wurde nach dem Einengen abermals aufgekocht und so noch gewisse Mengen heiß fällbarer Salze gewonnen. Nach eventueller zweiter Wiederholung dieser Operation wurden die Filtrate mit Alkohol gefällt.

Die Analysen der heiß gefällten Kalksalze führten hier zu Zahlen, die zu den in den vorigen Abschnitten angeführten Säuren $C_{12}H_{16}O_8$ und $C_{13}H_{18}O_8$ nicht stimmen, die dagegen mit der Formel $C_{14}H_{20}O_9$ in Übereinstimmung stehen. Diese wäre also als eine Oxysäure zu betrachten, die sich von einer den vorgenannten Säuren homologen Verbindung ableitet. Das Verhalten ihrer Salze ist ganz ähnlich demjenigen, das die Salze jener Säuren zeigen.

- I. (Vorversuch.) Oxydation mit 45 Atomen Sauerstoff; 10 g Cholesterin mit 2500 cm^3 fünfprozentiger Kaliumperman-

ganatlösung behandelt wie angegeben. Analyse des heiß gefällten, bei 100° getrockneten Kalksalzes:

In 100 Teilen:

	Gefunden	Berechnet für $C_{14}H_{16}Ca_2O_9 + 2H_2O$
C	37·51	37·80
H	4·40	4·55
Ca	18·15	18·05

2. In dem bei 200° getrockneten Salz:

	Gefunden	Berechnet für $C_{14}H_{16}Ca_2O_9$
Ca.....	19·45	19·64

Das aus dem Filtrat mit Alkohol gefällte Kalksalz zeigte folgende Zusammensetzung nach dem Trocknen bei 100°:

In 100 Teilen:

	Gefunden	Berechnet für $C_{24}H_{24}Ca_3O_{15} + 3H_2O$
C	39·19	39·64
H	4·61	4·17
Ca	16·58	16·56

II. (Vorversuch.) Oxydation mit 41 Atomen Sauerstoff. Das heiß gefällte Kalksalz gab, bei 200° getrocknet:

In 100 Teilen:

	Gefunden	Berechnet für $C_{14}H_{16}Ca_2O_9$
C.....	41·67	41·14
Ca.....	19·95	19·64

III. 300 g Cholesterin wurden in Portionen zu je 10 g mit 2 l fünfprozentiger Lösung von Kaliumpermanganat oxydiert (36 Atome Sauerstoff). Dabei wurden erhalten:

Oxalsäure (teils auskrystallisiert, teils als Kalksalz) 45·2 g;
 heiß ausgeschiedene Roh-Kalksalze, lufttrocken:
 134 g;

mit Alkohol gefällte Kalksalze: 94 g.

Das heiß gefällte Kalksalz, durch Umfällen gereinigt, gab bei der Analyse folgende Zahlen:

Wasserverlust bei 100° C.

In 100 Teilen:

Gefunden				Berechnet für
				$C_{14}H_{16}Ca_2O_9 + 8H_2O$
19·58	19·59	19·87	für 6H ₂ O.....	19·57

Das bei 100° getrocknete Salz gab:

In 100 Teilen:

	Gefunden	Berechnet für
		$C_{14}H_{16}Ca_2O_9 + 2H_2O$
C	37·36	37·80
H	4·71	4·55
Ca	17·81	18·05

Um sicher zu sein, daß wir es in diesem Salz mit einer einheitlichen Substanz zu tun haben, wurde es durch Digerieren mit Wasser in Lösung gebracht, von etwas Ungelöstem abfiltriert und mit Alkohol gefällt. Die Zusammensetzung des Salzes erlitt dadurch keine Änderung. Dasselbe gab, bei 100° getrocknet, in 100 Teilen:

	Gefunden	Berechnet für
		$C_{14}H_{16}Ca_2O_9 + 2H_2O$
C	37·55	37·80
H	4·42	4·55
Ca	18·06	18·05

Dasselbe Salz gab, bei 200° C. getrocknet, in 100 Teilen:

	Gefunden	Berechnet für
		$C_{14}H_{16}Ca_2O_9$
C.....	41·28	41·14
H.....	3·88	3·96
Ca.....	20·16	19·64

Betreffs der im Filtrat von dem heiß gefällten Kalksalz durch Alkoholfällung abgeschiedenen Verbindungen wollen wir hier nur kurz erwähnen, daß genügende Anhaltspunkte vorliegen, um anzunehmen, es liege hier ein Gemenge der Kalksalze von den Säuren $C_{13}H_{18}O_8$, $C_{14}H_{20}O_9$ und der Anhydrosäure $C_{24}H_{30}O_{15}$ vor.

IV. Bei diesem Versuche wurde zunächst mit Kaliumpermanganat oxydiert und nach Entfernung der Oxalsäure mit reiner Salpetersäure durch $1\frac{1}{2}$ Tage weiter behandelt, die Salpetersäure abgeraucht, der in Wasser gelöste Rückstand mit kohlensaurem Kalk neutralisiert, im Filtrat das Kalksalz durch Aufkochen abgeschieden (Filtrat davon: *A*) und durch Umfällen gereinigt (Filtrat *B*). Das heiß gefällte Kalksalz ergab bei der Analyse folgende Zahlen:

Wasserverlust bei $200^\circ C$. in 100 Teilen:

Gefunden		Berechnet für $C_{13}H_{14}Ca_2O_8 + 8H_2O$
27·66	für $8H_2O$	27·59

Die wasserfreie Substanz gab:

	Gefunden	Berechnet für $C_{13}H_{14}Ca_2O_8$
C	40·77	41·23
H	3·85	3·74
Ca	21·30	21·20

Aus dem Filtrat *A* wurde mit Bleizucker ein Bleisalz gefällt, welches, bei 100° getrocknet, folgende Zahlen gab:

In 100 Teilen:

	Gefunden	Berechnet für $C_{14}H_{16}Pb_2O_9 + H_2O$
C	22·11	22·11
H	2·18	2·39
Pb	55·06, 54·81	54·45

Aus dem Filtrat *B* wurde ebenfalls ein Bleisalz hergestellt, das, bei 100° getrocknet, folgende Zusammensetzung zeigte:

In 100 Teilen:

	Gefunden	Berechnet für $C_{12}H_{16}O_8Pb_2O_8$
C.....	20·21	20·63
H.....	1·95	1·74
Pb.....	58·99	59·29

In dem Produkte der Weiteroxydation mit Salpetersäure haben wir es demnach mit einem Gemenge aller drei Säuren: $C_{12}H_{16}O_8$, $C_{13}H_{18}O_8$ und $C_{14}H_{20}O_9$ zu tun.

Aus den Oxydationsprodukten des Cholesterins haben wir, wie im vorstehenden mitgeteilt wurde, drei einander nahestehende Säuren durch die Fällbarkeit ihrer Kalksalze in der Hitze abscheiden können. Wenn nun bei der Oxydation mit Salpetersäure vorwiegend die Säure $C_{12}H_{16}O_8$, mit Kaliumpermanganat in der Kälte die Säure $C_{13}H_{18}O_8$ und in der Hitze $C_{14}H_{20}O_9$ erhalten wurde, so möchten wir hier, da die Abscheidung der Kalksalze in der Hitze nicht quantitativ verläuft, besonders betonen, daß wir die Bildung aller drei Säuren bei jeder Art der angewendeten Oxydationsverfahren nicht für ausgeschlossen halten. Daß bei der Einwirkung von Salpetersäure neben $C_{12}H_{16}O_8$ auch $C_{13}H_{18}O_8$ gebildet wird, haben wir schon mitgeteilt. Es liegen Anhaltspunkte dafür vor, daß auch bei der Oxydation mit Kaliumpermanganat in der Kälte die Säure $C_{14}H_{20}O_9$, in der Hitze $C_{12}H_{16}O_8$ und $C_{13}H_{18}O_8$ entstehen.

Ergibt sich schon daraus eine gewisse Komplikation, so wird diese wesentlich erhöht dadurch, daß neben diesen Säuren in großer Menge noch andere saure Oxydationsprodukte gebildet werden. Wahrscheinlich handelt es sich dabei zum Teile um weniger hoch oxydierte Substanzen. Daneben spielen aber gewiß auch Umwandlungsprodukte der genannten drei Säuren eine Rolle. Wie schon erwähnt, geht die Säure

$C_{12}H_{16}O_8$ durch Wasserverlust in $C_{24}H_{30}O_{15}$ über, eine Säure, die wir auch bei der Oxydation mit heißer Permanganatlösung (Versuch I und III) unter den Produkten gefunden haben. Eine ähnliche Wasserabspaltung dürfte auch bei $C_{13}H_{18}O_8$ erfolgen. Es scheint aber noch eine weitere Veränderung der primär gebildeten Säuren einzutreten. Es liegen nämlich genügende Beobachtungen vor, welche für eine Abspaltung von Kohlensäure aus den genannten Säuren sprechen; so sind wir wiederholt einer Säure $C_{11}H_{16}O_6$ begegnet, die aus $C_{12}H_{16}O_8$ auf diese Weise hervorgegangen sein kann. Dies steht in Analogie zu der Angabe von Tappeiner,¹ daß die (von ihm aus Cholsäure mit Chromsäure erhaltene) »Cholesterinsäure« Redtenbacher's ein Gemenge von $C_{12}H_{16}O_7$ und ihrer Brenzsäure $C_{11}H_{16}O_5$ darstelle.

Da nun jede der drei von uns besprochenen Säuren durch Abspaltung von Wasser oder von Kohlensäure leicht in mehrere andere Verbindungen übergehen kann, so erklären sich die Schwierigkeiten, die das Arbeiten mit den Oxydationsprodukten des Cholesterins bereitet, zur Genüge.

Wir sind mit weiteren Untersuchungen über diese Verhältnisse und mit dem eingehenderen Studium der drei besprochenen Säuren beschäftigt.

¹ Annalen, 194, 226.