



# Bijdrage tot de kennis van het cholzuur

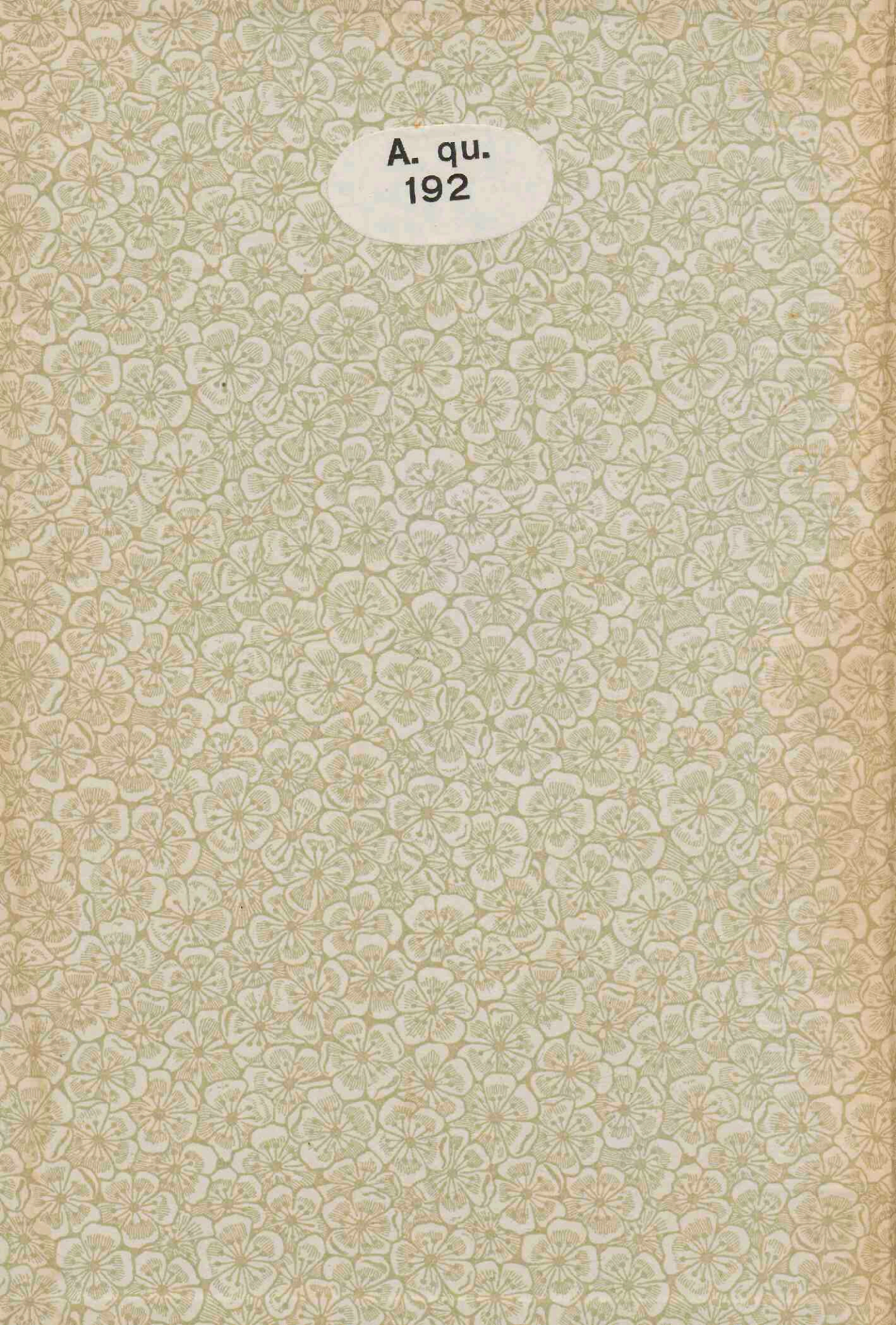
<https://hdl.handle.net/1874/261194>

ACADEMISCH PROEFSCHRIFT.

B. C. P. JANSEN.

qu.  
2





A. qu.  
192











BIJDRAGE TOT DE KENNIS VAN HET  
:- :- CHOLZUUR :- :-













*Aan mijn Vader,*

*Aan de nagedachtenis mijner Moeder en*

*Aan mijn aanstaande Vrouw.*





*Bij 't indienen van dit proefschrift is 't mij een aangename plicht, mijn dank te brengen aan alle hoogleeraren zoowel te Utrecht als te Amsterdam, die tot mijne wetenschappelijke vorming hebben meegewerkt.*

*Waar ik vóór mijn candidaatsexamen meer werd bekend gemaakt met de bestaande wetenschap, daar zijt Gij het geweest, hooggeleerde COHEN, die mij voor 't eerst zelf hebt leeren experimenteeren en mij hebt ingeleid, v.n.l. ook in de physisch-chemische methoden van onderzoek.*

*Hooggeleerde VAN ROMBURGH, hooggeschatte promotor, zeer veel dank ben ik in het bijzonder aan U verschuldigd, vooral ook voor den steun en belangstelling bij de bewerking van dit proefschrift ondervonden. Uw opwekkende omgang heeft mijn lust tot experimenteel werk aangewakkerd, en Uw critische blik heeft mij leeren inzien, dat strenge zelfcritiek een eerste vereischte is bij wetenschappelijken arbeid.*

*Een groot voorrecht acht ik het, hooggeleerde VAN RIJNBEEK, gedurende eenige jaren Uw assistent geweest te zijn. Ik ben er van overtuigd dat Uw opmerkingen en gesprekken een zeer grooten invloed op mijn vorming hebben gehad.*





## INLEIDING.

---

De keuze van het onderwerp voor deze dissertatie werd v.n.l. bepaald door de volgende overwegingen. Omdat ik als chemicus wenschte te promoveeren, moesten de bij het onderzoek voorkomende methodes hoofdzakelijk van zuiver chemischen aard zijn. Als assistent aan 't Physiologisch Laboratorium van de Gem. Universiteit te Amsterdam echter, trok een onderzoek, dat een physiologisch belang kon hebben, mij uiteraard aan. Voor de hand lag het dus, een onderwerp te kiezen op het gebied van de door FRÄNKEL, ter onderscheiding van de dynamische, descriptieve Biochemie genoemde wetenschap.

Nu was ik door proeven over de lipase van het darmsap<sup>1)</sup> opmerkzaam geworden op de eigenaardige physiologische werking van het cholzuur. Interessant leek het mij, iets meer van den chemischen bouw ervan te weten te komen. Bij de studie van de massa litteratuur over het chemisch onderzoek van dit zuur, bleek wel, dat 't geen gemakkelijk onderwerp was, waar de gewone, voor de hand liggende, methodes vrijwel reeds allen beproefd waren en er, met zoo'n groote hoeveelheid arbeid, nog maar zoo weinig positiefs gevonden was. Toch besloot ik te trachten iets te vinden, dat zou kunnen bijdragen, om de structuur van deze eigenaardige stof wat nader te leeren kennen.

Waar ik om praktische redenen gaarne op een bepaalden tijd mijn proefschrift voltooid wilde hebben, heb ik tot mijn spijt alle onderdeelen niet zoodanig kunnen uitwerken, als ik anders wel gewenscht zou hebben.

---

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. Physiol. Chem. 68, 400, [1910].

## Historisch Overzicht. 1)

---

Geen wonder is het, dat het eigenaardige, door de lever gevormde, in de galblaas verzamelde en vandaar aan de darmen toegevoerde, vloeibare, viskeuze product, de gal, reeds van ouds de aandacht der chemici en der physiologen heeft getrokken en dat er heel wat tijd en ingespannen arbeid gegeven is aan het onderzoek zoowel van de chemische samenstelling ervan, als van de physiologische functie. En al zijn er talrijke interessante gegevens gevonden in den loop der tijden, nòch de physiologische werking, nòch de chemische structuur (en deze nog veel minder) is geheel opgeklaard. Over de chemische samenstelling werden reeds in 1806 onderzoekingen gedaan door THÉNARD. Op grond hiervan kwam hij ertoe, om in de (osse-) gal twee bestanddeelen aan te nemen: een galhars, die door loodacetaat wordt neergeslagen en een ander lichaam, het „picromel”, dat bij die behandeling in oplossing blijft. In de natieve gal zou dan dit picromel de oplossing van de op zichzelf onoplosbare galhars bewerkstelligen.

In 1807 werd door BERZELIUS gevonden, dat het neerslag, door zwavelzuur in gal teweeggebracht, oplost bij digereeren met bariumcarbonaat. Hij trok hieruit de conclusie, dat het hoofdbestanddeel der gal, de galstof, oplosbaar is in water, maar met zuren onoplosbare verbindingen geeft, die dan na het neutraliseeren van het zuur weer oplossen.

---

1) Voor samenvattende overzichten, van wat op 't oogenblik bekend is over de galzuren, zie: OPPENHEIMER's Handbuch der Biochemie p. 820—838 (SAMUELY); ABDERHALDEN's Biochemisches Handlexikon 3, 310—330 (KNOOP); en von FÜRTH: Probleme der Physiologischen und Pathologischen Chemie I p. 306—323.



In 1826 verscheen er een verhandeling van TIEDEMANN en GMELIN <sup>1)</sup>: „Die Verdauung nach Versuchen”, als antwoord op een prijsvraag van de Fransche Academie. Van deze aan experimenteele gegevens zeer rijke publicatie, was een deel gewijd aan het onderzoek van de gal. De schrijvers gingen hierbij zóó te werk, dat de gal, na verdunning met water, werd neergeslagen met loodsuiker. Het neerslag werd dan ontleed met zwavelwaterstof en daarna uitgetrokken met alcohol. Bij verdunnen met water slaat dan neer wat de schrijvers noemen „Gallenharz”, een stof, waar ze verder niets mee wisten aan te vangen (dit zal wel een mengsel van glycocholzuur en taurocholzuur met galkleurstoffen geweest zijn).

Door nu, na verdunnen met water en affiltreeren van het „Gallenharz”, het filtraat in te dampen, scheiden zich hieruit kleurlooze, naaldvormige kristallen af, die „Cholsäure” genoemd werden. Deze „Cholsäure” bevatte stikstof; de smaak is zoet en iets of wat scherp; de stof lost zeer moeilijk op in water; de oplossing kleurt lakmoes rood. De beide eerste eigenschappen wijzen erop, dat we hier niet te doen hebben met het tegenwoordige cholzuur, waarschijnlijk met het tegenwoordige glycocholzuur.

Hier wordt dus voor het eerst de naam cholzuur gebruikt (om het van galluszuur te onderscheiden), zij het dan ook in eenigszins andere beteekenis dan tegenwoordig. Door allerlei andere inwerkingen werd verder, door TIEDEMANN en GMELIN, de gal in een groot aantal bestanddeelen gescheiden.

Twaalf jaar later verscheen er een publicatie van DEMARÇAY <sup>2)</sup>, die door den schrijver van het Jahresbericht niet zóó gunstig beoordeeld werd als de verhandeling van GMELIN, die dan ook grootendeels in Giessen, onder leiding van LIEBIG vervaardigd was.

Inderdaad echter bracht dit onderzoek ons een heel eind verder. Over zijn voorgangers schrijft hij: „Malgré les nombreux travaux dont la bile a été l'objet, sa nature nous est encore

1) Vgl. BERZELIUS' Jahresbericht 7, 302 [1828].

2) LIEBIG'S Annalen 27, 270—291 [1838]; Annales de Chim. et de Phys. 67, 177—203 [1838].



peu connue. Considérée par les anciens chimistes comme un savon à base de soude, elle devint entre les mains de leurs successeurs un mélange de substances plus ou moins indifférentes, mais dont chacun augmenta le nombre. Les derniers travaux de M. GMELIN nous représentent la bile comme composée de 22 corps différens, presque tous neutres et peu connus". Zijn bedoeling met z'n verhandeling is dan: „de soutenir l'opinion des premiers chimistes et de montrer comment des produits de décomposition ont été souvent considérés comme parties intégrantes de la bile, dont les neuf dixièmes au moins sont un véritable savon à base de soude — — — et qui tient en dissolution des quantités variables, mais toujours minimales, d'autres substances en petit nombre".

Ik geloof wel, dat hij zijn doel bereikt heeft, al is de bewijsvoering dan ook niet geheel en al streng. DEMARÇAY vermengde één deel, door alcohol van slijm bevrijde, gal met 10 deelen water en 1 deel zoutzuur. Dampst men nu langzaam in, dan hebben zich, als de helft der vloeistof verdampt is, een groene, samenhangende massa en verder wat witte vlokken van vetzuren afgescheiden. De groene massa is oplosbaar in water en geeft, bij koken met loog, ammoniak. Wordt de moederloog nu verder ingedampst (waarbij dus 't zoutzuur steeds meer geconcentreerd wordt), dan scheiden zich donker gekleurde druppels af, die tegen den wand van 't vat zich afzetten en bij bekoelen vast worden. Dit lichaam is onoplosbaar in water en geeft bij koken met loog geen ammoniak meer. Uit de moederloog kan door verder indampen het reeds door GMELIN ontdekte en benoemde taurine gewonnen worden.

DEMARÇAY bewees nu, dat er in de oorspronkelijke gal niet 3 lichamen aanwezig waren: 1e 't in water oplosbare, met loog ammoniak afsplitsende zuur, 2e 't in water onoplosbare, geen stikstof bevattende zuur en 3e 't taurine; maar dat 't eerst ontstane, in water oplosbare, stikstof bevattende zuur, het natieve is, dat dan door het steeds sterker wordende zoutzuur gesplitst wordt in 't onoplosbare zuur en taurine.



Deze beide zuren noemde DEMARÇAY choleïnezuur ('t in water oplosbare zuur, 't tegenwoordige taurocholzuur) en choloïdinezuur (het in water onoplosbare stikstofvrije zuur, 't (onzuivere) tegenwoordige cholzuur).

Door inwerking van loog verkreeg hij, na aanzuren, een, naar hij meende, ander zuur, dat door hem cholzuur genoemd werd (ten onrechte meenende, dat dit 't zelfde zou zijn als 't cholzuur van GMELIN). Door omkristalliseeren uit alcohol, kon deze stof in tetraëders verkregen worden. Hieruit blijkt dus wel (in verband met de bereiding), dat het hetzelfde lichaam was, dat wij tegenwoordig cholzuur noemen.

Intusschen was ook BERZELIUS<sup>1)</sup> zelf opnieuw begonnen met 't onderzoek van de galbestanddeelen, o.a. om de door DEMARÇAY beschreven proeven en conclusies op hun juiste waarde te onderzoeken. Jammer echter, dat hij, die zooveel ertoe bijgedragen heeft, om één universeele, internationale nomenclatuur in de chemie in te voeren, hier 't werk van vorige onderzoekers misschien wel wat al te gering schatte, en zelf aan de verschillende bestanddeelen der gal geheel nieuwe namen gaf. Volgens BERZELIUS dan bestaat de gal v.n.l. uit een lichaam dat hij biline (een mengsel van tauro- en glycocholzuur-natrium) noemt en dat een bitteren smaak, met iets of wat zoeten nasmaak bezit. Het is oplosbaar in water en in alcohol, onoplosbaar in aether en in geconcentreerde oplossingen van koolzure of bijtende alcaliën.

Verder vindt hij dan de bestanddeelen, die ook vorige onderzoekers gevonden hebben: vetten, cholesterine, kleurstoffen enz.

Na de vermelding van deze bestanddeelen gaat BERZELIUS dan aldus voort:

„Es will scheinen alsob die Galle im ersten Augenblick ihrer Absonderung die Bestandtheile enthalte, welche ich so eben angeführt habe; aber das Bilin hat eine solche Neigung metamorphosirt zu werden, dasz es bald, selbst noch in der Gallen-

1) K. Vet, Acad. Handl. 1841, I, 64, geciteerd uit Jahresber. 22, 556, [1843].



blase, anfängt, die Metamorphose zu erleiden, welke ich im Jahresbericht 1840 S. 669, nach ihrem Entdecker DEMARÇAY, in Rücksicht auf ihre Beschaffenheit beschrieben habe. Das Bilin wird dabei in zwei Säuren verwandelt, welche ich Fellinsäure und Cholinsäure nenne, sowie in Ammoniak und in Taurin. Diese beiden Säuren verbinden sich in dem Augenblicke ihrer Bildung mit Bilin, welches sich in dieser Verbindung besser erhält; ich nenne sie Bilifellinsäure und Bilicholinsäure (DEMARÇAY's Acide Choleïque). Sie zeichnen sich durch die Eigenschaft aus, aus ihrer Auflösung in Wasser, durch Mineralsäuren ausgefällt zu werden, wenn man diese in einer gewissen Quantität zumischt, während dem das damit nicht verbundene Bilin in der Auflösung zurückbleibt. . . ."

Door gal in den zomer eenige weken te laten staan, gaat ze in bederf over, en door aanzuren kunnen er dan 2 andere, met biline verbonden zuren uit verkregen worden: 't cholzuur van GMELIN en 't fellaanzuur.

Deze onderzoekingen van BERZELIUS zijn dus, vergeleken bij die van DEMARÇAY, niet als een vooruitgang aan te merken, maar maken veel eer de zaak ingewikkelder en minder helder.

Intusschen had men in het laboratorium te Giessen ook niet stil gezeten, en zetten verschillende anderen 't door DEMARÇAY begonnen onderzoek voort. In 1844 verscheen er een verhandeling van THEYER en SCHLOSSER <sup>1)</sup>. Door ingedroogde gal op te lossen in alcohol en deze oplossing neer te slaan met aether, verkregen zij een product, dat bij de verschillende bereidingen nagenoeg constant bleef. De inwerking van verschillende zuren (oxaalzuur, zoutzuur, salpeterzuur) op gal werd nagegaan, en hierbij niets anders geconstateerd, dan dat bij lang behandelen van gal met sterk zoutzuur het reeds bekende dyslysine ontstond.

Uit gal werd bij koken met een uiterst geconcentreerde oplossing van kaliumhydroxyde geen kristallijne stof verkregen.

<sup>1)</sup> LIEB. Ann. 50, 235—259 [1844].



Wèl op de reeds door DEMARÇAY aangegeven manier: koken van gal gedurende eenige dagen met gewone loog. Dit product werd omgekristalliseerd uit alcohol en water. Zoo werden ten slotte naaldjes en octaëdertjes verkregen van smp.  $130^{\circ}$  C. Van dit zuur werden verschillende zouten en de elementairanalyse gemaakt. Als empirische formule werd gevonden  $C_{42} H_{33} O_9$  (volgens onze tegenwoordige schrijfwijze dus  $C_{21} H_{33} O_{4.5}$ ). REDTENBACHER <sup>1)</sup> bestudeerde voor 't eerst de inwerking van sterk salpeterzuur op 't door DEMARÇAY verkregen choloïdinezuur (door inwerking van sterk zoutzuur op gal; onzuiver cholzuur dus). Hij vond hierbij heel wat stoffen o.a. de vluchtige producten: azijnzuur, caprinezuur, caprylzuur en nitrocholzuur. (Deze zijn afkomstig uit de bijgemengde vetzuren; door latere onderzoekers zijn ze bij 't zuivere cholzuur nooit gevonden). Verder als niet vluchtige stoffen: 't kristallijne choloïdaanzuur en cholestherinezuur. Dit laatste werd zoo genoemd, omdat uit cholesterine door behandelen met salpeterzuur een analoog product verkregen zou zijn.

Reeds eenige maanden later vond SCHLIEPER <sup>2)</sup>, dat, na genoegzame zuivering van het cholzuur, er geen vluchtige producten ontstonden bij inwerking van salpeterzuur. Wel vond ook hij 't choloïdaanzuur en 't cholestherinezuur.

Omstreeks dienzelfden tijd beschreef PLATNER <sup>3)</sup> een methode om uit een alcoholische oplossing van ingedroogde gal, door behandelen met aether, een kristallijn product te krijgen. VERDELL <sup>4)</sup> vond een iets andere, eenvoudiger methode, om 't zelfde product te bereiden.

Deze gekristalliseerde gal werd nu door STRECKER <sup>5)</sup> nader onderzocht. Hij loste ze op in water, voegde dan zooveel zwavelzuur toe, dat er juist een neerslag begon te ontstaan,

1) LIEB. Ann. 57, 145—170 [1846].

2) LIEB. Ann. 58, 375 [1846].

3) LIEB. Ann. 51, 105 [1844].

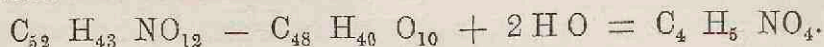
4) LIEB. Ann. 59, 311 [1847].

5) LIEB. Ann. 65, 1—39 [1848]; 65, 130 [1848]; 67, 1—61 [1848].



en verkreeg zoo een in stervormige naaldjes kristalliseerend zuur, volgens hem het cholzuur van GMELIN ('t tegenwoordige glycocholzuur). Hij meende, dat hierin nog een isomeer gemengd was, hetwelk bij uittrekken met kokend water in blaadjes zou achterblijven, 't paracholzuur. Later <sup>1)</sup> bleek, dat dit paraglycocholzuur ontstond uit 't glycocholzuur door koken met water, waarschijnlijk een physisch isomeer; de derivaten zijn, zooals STRECKER reeds vond, identiek met die van 't glycocholzuur.

STRECKER bepaalde nu van dit cholzuur van GMELIN en van 't cholzuur van DEMARÇAY (waarvoor hij den naam cholalzuur voorslaat) de samenstelling; hij vond zoo resp.  $C_{52} H_{43} NO_{12}$  en  $C_{48} H_{40} O_{10}$ . Door deze beide formules met elkaar te vergelijken, zag hij, dat ze juist (op 1 mol. water na) 1 mol. glycocoll van elkaar verschilden:



Hij kookte nu gedurende 8 uur 't gekristalliseerde cholzuur van GMELIN met geconcentreerd barytwater, sloeg daarna met zwavelzuur het genoemde cholalzuur en het baryt neer, nam de overmaat zwavelzuur weg met loodhydroxyde, verwijderde het lood met zwavelwaterstof, en zag nu, dat inderdaad de moederloog bij indampen kristallen gaf van glycocoll.

Hiermee was dan nu (1848) aangetoond, dat het voornaamste bestanddeel der gal bestaat uit een stikstof-vrij zuur, het cholalzuur of cholzuur van DEMARÇAY, dat gepaard voorkomt, voor een deel met taurine, voor een deel met glycocoll.

Nu men eenmaal 't cholzuur, naar men meende, geheel zuiver had leeren bereiden, liet men hierop verschillende agendiën inwerken, om te trachten een inzicht in de structuur te verkrijgen.

Zoo behandelde GORUP-BEZANES <sup>2)</sup> het cholzuur met phosphor-pentachloride; hij verkreeg daarbij een phosphor-houdend product, dat echter niet kristallijn was te krijgen. Ook werd door hem 't cholzuur samengesmolten met kaliumhydroxyde, waarbij

<sup>1)</sup> LETSCHE, Zeitschr. f. Physiol. Ch. 60, 473 [1909].

<sup>2)</sup> LIEB. Ann. 157, 282 [1871].



azijnzuur en propionzuur werden verkregen en een harsachtig lichaam van het karakter van dyslysine.

Ook werd de inwerking van oxydeerende, stoffen, zooals salpeterzuur, chroomzuur enz., op 't cholzuur ijverig bestudeerd <sup>1)</sup>, zonder echter tot goed gedefinieerde lichamen te leiden. Wel vond men vaak stearinezuur en palmitinezuur, maar deze moeten volgens latere onderzoekingen toegeschreven worden aan de onzuiverheden van het uitgangsmateriaal. LATSCHINOFF meende, dat 't reeds door REDTENBACHER bij inwerking van salpeterzuur op choloïdinezuur gevonden choloïdaanzuur isomeer zou zijn met kamferzuur, en noemde 't daarom cholekamferzuur, dat volgens hem de formule  $C_{10} H_{16} O_4$  zou hebben. Voor de structuur van het cholzuur was dit lichaam in zoover op 't oogenblik van geen belang, omdat niet de weg kon ingezien worden waarlangs men van het zuur  $C_{24} H_{40} O_5$  tot een zuur  $C_{10} H_{16} O_4$  zou komen.

TAPPEINER vond, dat het door REDTENBACHER verkregen, amorf cholesterolinezuur, te splitsen was in een amorf stof en het kristallijne cholesterolinezuur  $C_{12} H_{16} O_7$ , oplosbaar in water, in alcohol en aether. Door verhitten gedurende 1 uur op  $198^\circ$  of door verwarmen met zuren, heeft kooldioxyde-afplitsing plaats en ontstaat het pyrocholesterinezuur  $C_{11} H_{16} O_5$ , dat een driebasisch zuur zou zijn.

Verder vond TAPPEINER bij oxydatie met kaliumbichromaat en zwavelzuur, behalve het cholesterolinezuur, het cholaanzuur:  $C_{20} H_{28} O_6$ , waarschijnlijk een driebasisch zuur; door salpeterzuur zou dit overgaan in choloïdaanzuur.

Van meer belang was, voorloopig in alle geval, 't door HAMMARSTEN ontdekte dehydrocholzuur <sup>2)</sup> van smp.  $225^\circ$ , waarvoor hij als formule vond  $C_{25} H_{36} O_5$ ; hij verkreeg het door matige oxydatie van cholzuur, n.l. door een oplossing daarvan

1) TAPPEINER, Ber. 6, 1285 [1873]; TAPPEINER, Lieb. Ann. 194, 211—242 [1878]; LATSCHINOFF, Ber. 12, 1518 [1879]; LATSCHINOFF, Ber. 13, 1052 [1880]; EGGER, Ber. 12, 1068 [1879].

2) Ber. 14, 71 [1881].



in ijsazijn te behandelen met een oplossing van chroomzuur in hetzelfde oplosmiddel bij een temperatuur beneden  $50^{\circ}$ . (Over de formule zie beneden).

Bij reductie met natrium-amalgaam kon wel een in alcohol goed oplosbare, in blaadjes kristalliseerende stof, maar niet het cholzuur terug verkregen worden. Zoowel 't dehydrocholzuur als zijn reductieproduct gaven niet de reactie van PETTENKOFER. (Deze bestaat hierin, dat men een verdunde oplossing van cholzuur vermengt met een weinig suikeroplossing en daarna met sterk zwavelzuur, zorgende dat de temperatuur niet boven  $60^{\circ}$ — $70^{\circ}$  komt; de oplossing wordt dan intensief rood gekleurd; het absorptiespectrum vertoont 2 strepen even vóór E en even vóór F.).

Ongeveer tegelijkertijd werd door CLÈVE<sup>1)</sup> bij oxydeeren van cholzuur met chroomzuurmengsel het biliaanzuur ontdekt:  $C_{24} H_{34} O_8$ , een driebasisch zuur, dat niet meer bitter smaakt.

In 1885 kwam nu LATSCHINOFF met een belangwekkende verhandeling<sup>2)</sup>, waarin hij voor een deel de oorzaak der tegenstrijdige gegevens, door de verschillende onderzoekers gevonden, ophelderde. Hij geeft 3 oorzaken aan voor deze tegenstrijdigheden: 1<sup>o</sup>. de „ondankbare” eigenschappen van die producten, 2<sup>o</sup>. 't verschil in voorwaarden waaronder de verschillende oxydaties hadden plaats gegrepen, en dan vooral 3<sup>o</sup>. 't verschil in zuiverheid van het uitgangsmateriaal. Tot nu toe had men, op gezag van STRECKER, aangenomen, dat er in de gal niet anders (behalve dan de kleurstoffen enz.) aanwezig was dan glycocholzuur en taurocholzuur. Zeer vreemd was 't echter, dat (bij verschillend materiaal, maar bij geheel gelijke proef-voorwaarden) er bij oxydatie van cholzuur verschillende opbrengsten aan cholaanzuur gevonden werden: 50 0/0, 40 0/0, 20 0/0, 7 0/0, 0 0/0. LATSCHINOFF werkte bij zijn oxydaties gewoonlijk met 't bariumzout van 't cholzuur en merkte nu op, dat er hiervan 2 vormen bestonden, die een verschillend gedrag vertoonden t. o. van hun oplosbaar-

<sup>1)</sup> Bullet. de la Soc. chim. **35**, 373, 429 [1881].

<sup>2)</sup> Ber. **18**, 3039 [1885].



heid in water. Vooral ook door een opmerking van THUDICHUM<sup>1)</sup> kwam hij er nu toe om die bariumzouten eens wat nader te onderzoeken. Door herhaaldelijk uitwasschen met water werd ten slotte een zeer moeilijk oplosbaar bariumzout verkregen. Hieruit werd het zuur in vrijheid gesteld en van dit zuur den aethylester gemaakt. Het smeltpunt hiervan bleek te liggen bij 71°. Daar nu TAPPEINER voor 't smeltpunt van den aethylester van cholzuur gevonden had 147°—157°, bleek hieruit wel ten duidelijkste, dat we hier met een ander zuur te doen hebben. Dit nieuwe zuur lijkt veel op 't cholzuur, maar is minder oplosbaar in water, in alcohol en in ijsazijn. Smp. 185°—190°; bij 225° kleurt zich de smelt nog niet bruin. Het kristalliseert watervrij en in kristallen met 1½ mol. kristalwater. Bij de elementairanalyse werd als formule gevonden: C<sub>25</sub> H<sub>42</sub> O<sub>4</sub>.

Als naam voor 't nieuwe zuur werd voorgesteld: Choleïnezuur (die vroeger voor 't taurocholzuur gebruikt was, maar door 't onderzoek van STRECKER overbodig was geworden). Naar schatting bedroeg in de gal het gehalte aan choleïnezuur 1/10 van dat aan cholzuur. LATCHINOFF vond nu verder, dat bij oxydatie van cholzuur met chroomzuurmengsel in een opbrengst van ± 50 % biliaanzuur ontstond en onder volkomen dezelfde condities uit choleïnezuur, ook in een opbrengst van ± 50 %, cholaanzuur. Hiermee was dus de bovenvermelde tegenstrijdigheid in de opbrengst van cholaanzuur opgelost. Met HAMMARSTEN'S chroomzuur + azijnzuur verkreeg LATCHINOFF uit choleïnezuur het met dehydrocholzuur overeenkomende dehydrocholeïnezuur (smp. 180°—183°).

Tot nu toe had men voor 't onderzoek naar de constitutie van het cholzuur-molecuul er gewoonlijk heftig werkende middelen op toegepast, zooals salpeterzuur, chroomzuurmengsel, phosphor-pentoxyde en smelten met kaliumhydroxyde, om te trachten uit de afbrekingsproducten iets nader over 't groote oorspronkelijke molecule te weten te komen. Tot heel veel resultaat had dit

<sup>1)</sup> Journ. f. prakt. Chem. 25, 25 [1882].



niet geleid. In 1886 en '87 pakte echter MYLIUS <sup>1)</sup> in 't laboratorium van BAUMANN de zaak wat anders aan. Hij trachtte n.l. te weten te komen welke functie aan de 5 zuurstof-atomen in het mol. toekomen. Reeds BAUMSTARK <sup>2)</sup> had met behulp van benzoylchloride in den aethylester van cholzuur een benzoylgroep kunnen invoceren, en daarmee, naar hij meende, aangetoond, dat er één carboxyl- en tenminste één alcoholgroep in 't cholzuur aanwezig was. Daar echter z'n uitgangproduct (de aethylester) en het reactieproduct beiden harsen waren, kon aan deze waarneming niet al te veel gewicht worden gehecht.

MYLIUS trachtte langs verschillende wegen tot acetylverbindingen te komen. Bij verhitten met azijnzuur in een toegesmolten glazen buis werden niet anders verkregen dan anhydrozuren, die niet kristallijn te krijgen waren. Bij inleiden van chloorwaterstof in een oplossing van cholzuur in ijsazijn werd wel een neerslag van naaldjes gekregen, maar na eenigen tijd loste dit weer op. Uit de oplossing kon nu een zuur verkregen worden, dat na verdunnen met water en toevoegen van overmaat ammoniak, met bariumchloride een neerslag gaf. Dit zuur bleek het monoacetylcholzuur te zijn. Hiermee was dus de aanwezigheid van minstens één alcoholgroep althans zeer waarschijnlijk gemaakt.

Door nu cholzuur te overgieten met 't dubbele gewicht azijnzuuranhydride en dit mengsel geruimen tijd te laten staan, waarbij 't cholzuur oplost, werd in korrelig kristallijnen toestand, via het bariumzout, een diacetylcholzuur verkregen. Hiermee was dus nog een 2<sup>e</sup> alcoholgroep aangetoond.

Van de 5 O-atomen waren er dus nu al 4 in hun functie bekend. Langs indirecten weg gelukte het MYLIUS aan te toonen, dat ook het 5<sup>e</sup> zuurstofatoom een alcoholgroep toebehoort. Indien dit n.l. zoo is, dan zal 't cholzuur, dat dan dus 3 alcoholgroepen bevat, bij oxydatie een zuur geven met 3

<sup>1)</sup> Ber. 19, 2000—2009 [1886]; Ber. 20, 1968 [1887]; Zeitschr. f. Physiol. Chem. 12, 292 [1888].

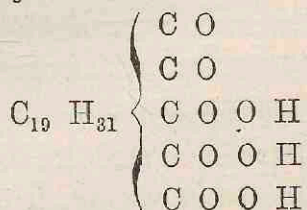
<sup>2)</sup> Ber. 6, 1185 [1873].



carbonylgroepen ('t zij aldehyde-, 't zij ketongroepen, naar gelang de alcohol primair of secundair is). En inderdaad bleek hem, dat 't oxydatieproduct van cholzuur, 't dehydrocholzuur, 3 aldehyde- of ketongroepen bevat: want bij behandelen van dehydrocholzuur met hydroxylamine verkreeg hij een in kleurlooze, microscopische tafeltjes kristalliseerende stof van een ontledingspunt boven 270 °, dat bij analyse het trioxim van dehydrocholzuur bleek te zijn.

Blijft nu nog de vraag of het aldehyde- of ketongroepen zijn in 't dehydrocholzuur (en dus daarmee overeenkomend, of er primaire of secundaire alcoholgroepen voorkomen in 't cholzuur). Ook deze vraag gelukte 't MYLIUS grootendeels te beantwoorden.

Bij verdere oxydatie toch van het dehydrocholzuur ontstaat biliaanzuur  $C_{24} H_{34} O_8$  of wel:



Waar er nu in het dehydrocholzuur reeds een carboxylgroep aanwezig is, blijkt dus, dat er door oxydatie 2 nieuwe carboxylgroepen ontstaan zijn, wat wel waarschijnlijk maakt, dat het dehydrocholzuur 2 aldehydegroepen bevat. Geheel streng is deze bewijsvoering niet, want bijv. uit kamfer ontstaat bij oxydatie een 2-basisch zuur, het kamferzuur, terwijl er geen aldehydegroep en maar één C O-groep in aanwezig is.

Voor de andere carbonylgroep neemt MYLIUS dan een ketonfunctie aan.

Hiermee is dus nu bewezen, dat van de 5 zuurstofatomen van het cholzuur er 2 toebehooren aan de carboxylgroep, 2 aan primaire alcoholgroepen en 't vijfde waarschijnlijk aan een secundaire alcoholgroep.

Verder maakte MYLIUS zich verdienstelijk door 'taangeven van een methode ter bereiding van zuiver cholzuur, die, met eenige kleine wijzigingen, door de meeste latere onderzoekers



tot op LANGHELD toe, gevolgd is. MYLIUS slaat met behulp van chloorbarium uit de alkalische, verdunde oplossing van het ruwe cholzuur het choleïnezuur neer; tevens worden hierdoor de vetzuren verwijderd; door het filtraat aan te zuren, wordt dan het cholzuur verkregen, dat nu nog uit alcohol omgekristalliseerd moet worden, om 't geheel zuiver te krijgen (door dit omkristalliseeren uit alcohol kunnen de vetzuren en het choleïnezuur niet verwijderd worden).

Ten slotte polemiseerde MYLIUS nog tegen LATSCHINOFF, die de formule  $C_{25} H_{42} O_5$  voor 't cholzuur verdedigde <sup>1)</sup>, terwijl MYLIUS vasthield aan de door STRECKER gevonden formule  $C_{24} H_{40} O_5$ .

Dat LATSCHINOFF hierbij zwak stond, blijkt wel daaruit, dat hij, om zijn formule staande te houden, allerlei eigenaardige hoeveelheden kristalwater en kristalalcohol moest aannemen. Zoo gaf hij als formule van de uit alcohol, volgens MYLIUS met 1 mol. kristalalcohol kristalliseerende tetraëdertjes:  $C_{25} H_{42} O_5$ ,  $\frac{1}{8} H_2 O$ ,  $\frac{7}{8} C_2 H_5 OH$ ; bij verhitten op  $140^\circ$  zou dit dan  $\frac{7}{8} C_2 H_5 OH$  verliezen en dus overgaan in  $C_{25} H_{42} O_5$ ,  $\frac{1}{8} H_2 O$ . Een moeilijkheid bleef echter altijd nog de formule van het dehydrocholzuur, waarvoor door HAMMARSTEN in nauwkeurig met de berekening overeenstemmende analyses gevonden was  $C_{25} H_{36} O_5$ , wat dan zou overeenkomen met LATSCHINOFF's formule  $C_{25} H_{42} O_5$  voor 't cholzuur.

Latere onderzoekers vonden wel niet precies de uitkomsten van HAMMARSTEN, maar toch wel een koolstof-gehalte, dat hooger was dan 't voor  $C_{24} H_{34} O_5$  berekende. De oplossing van deze moeilijkheid vond LASSAR-COHN <sup>2)</sup>, die opmerkte dat het, volgens voorschrift van HAMMARSTEN uit alcohol omgekristalliseerde dehydrocholzuur niet meer geheel oplosbaar was in verdunde alkaliën. Hij kristalliseerde nu herhaaldelijk om uit alcohol, trok de massa daarna uit met sodaoplossing, en analyseerde het residu. Dit bleek de aethylester van dehydro-

1) Ber. 20, 3274—3283 [1887].

2) Ber. 25, 805 [1892].



cholzuur te zijn. Door het ruwe dehydrocholzuur nu om te kristalliseeren uit aceton + benzol, verkreeg hij 't zuivere dehydrocholzuur van smp.  $239^{\circ}$ , dat nu bij analyse precies de formule  $C_{24} H_{34} O_5$  bleek te bezitten. Hiermee was dus ook voor 't cholzuur de formule  $C_{24} H_{40} O_5$  vastgesteld.

In de gal waren dus al aangetoond 2 zuren: 't cholzuur en 't choleïnezuur. MYLIUS meende nu, dat er nog een derde zuur, het desoxycholzuur, een isomeer van het choleïnezuur, in zou voorkomen. Dit werd door LATSCHINOFF ontkend. Langen tijd is dit al of niet identiek zijn van de beide zuren een geschilpunt geweest, tot 't aan LANGHELD <sup>1)</sup> en aan PREGL <sup>2)</sup> gelukte met zekerheid aan te toonen, dat 't 2 isomeren zijn. LANGHELD gebruikte een geheel nieuwe methode, om 't cholzuur te scheiden van de overige in de met loog gekookte gal voorkomende zuren. Hij vond n.l. dat indien men een alcoholische oplossing van dit zuurmengsel kookte met zeer geconcentreerde natronloog, het cholzuur in den vorm van zijn natrium-zout (bijna quantitatief volgens hem) werd afgescheiden. Uit de zoo verkregen moederloog gelukte het hem in zuiveren toestand 2 zuren te verkrijgen, in grootte hoeveelheid een desoxycholzuur van smp.  $172^{\circ}$ — $173^{\circ}$  en in geringe quantiteit 't isomeere choleïnezuur, smp.  $187^{\circ}$ — $188^{\circ}$ ; formule van beiden:  $C_{24} H_{40} O_4$ .

Ook PREGL vond dezelfde uitkomsten voor de smeltpunten en door voorzichtige oxydatie volgens HAMMARSTEN met chroomzuur in ijsazijn slaagde hij erin om 2 verschillende dehydrozuren te krijgen: die van desoxycholzuur smp.  $186^{\circ}$  en die van 't choleïnezuur smp.  $178^{\circ}$ .

Een groot deel van wat we in den laatsten tijd omtrent de constitutie van 't cholzuur zijn te weten gekomen, hebben we te danken aan de, zich over een tijdvak van meer dan tien jaren uitstrekkende, onderzoekingen van PREGL. Deze heeft eerst getracht <sup>3)</sup> (wat vóór hem o.a. reeds door LASSAR-COHN

<sup>1)</sup> Ber. 41, 378 [1908].

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. Physiol. Chem. 65, 157—180 [1910].

<sup>3)</sup> PFLÜGER'S Archiv 71, 302 [1898]; PFLÜGER'S Archiv. 72, 266 [1898].



en door SENKOWSKI beproefd was), om de stam-koolwaterstof van 't cholzuur te isoleeren. Hij heeft daartoe het cholzuur gedestilleerd met zinkstof, of ook in een toegesmolten glazen buis verhit met joodwaterstof en phosphor, dan wel gekookt met joodwaterstof en phosphor, echter zonder veel gevolg. De laatste methode gaf nog 't beste resultaat, indien dan het reactieproduct werd opgelost in ijsazijn en nog eens gekookt met zinkstof. Hij verkreeg zoo ten slotte een zandig neerslag, dat bij analyse uitkomsten gaf, die overeenkwamen met een formule  $C_{48} H_{78} O_3$ .

Later hield PREGL<sup>1)</sup> zich bezig met het onderzoek naar de fluorescentie-reactie van het cholzuur. Indien n.l. cholzuur-bevattende oplossingen vermengd worden met sterk zwavelzuur, dan treedt er een prachtige geelgroene fluorescentie op. Na verschillende vergeefsche pogingen ter isolering van het inwerkingsproduct, vond PREGL nu, dat bij verhitten van 20 gr. droog, zuiver, cholzuur met 50 cM<sup>3</sup>. azijnzuur en 10 cM<sup>3</sup>. sterk zwavelzuur, een groote hoeveelheid zwaveldioxyde ontwijkt; er heeft dus oxydatie plaats. Door de oplossing uit te gieten in water verkreeg hij een neerslag, dat opgelost werd in aether. Deze aetherische oplossing werd uitgeschud met zeer verdunde loog, en daarna ingedampt. Aan de loog is een lichaam afgegeven, dat bij oplossen in zwavelzuur geen fluorescentie geeft. Het residu, na verdampen van de aetherische oplossing, wordt opgelost in alcohol en gefractionneerd neergeslagen met water.

De laatste fracties geven met zwavelzuur de sterkste fluorescentie; ze zijn oplosbaar in petroleumaether. Door uittrekken met petroleumaether, wordt een stof verkregen, dehydrocholon genaamd, die wel niet kristallijn te krijgen is, maar waarvan de formule bij analyse blijkt te zijn  $C_{24} H_{28} O$  of  $C_{23} H_{27} O$ . Met geconcentreerd salpeterzuur geeft 't een stikstofhoudend lichaam, waarschijnlijk een dinitro-dicarboonzuur. Bij vergelijking van de formules  $C_{24} H_{40} O_5$  en  $C_{24} H_{28} O$  en in aan-

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. Physiol. Chem. 45, 163 [1905].



merking nemende, dat het zwavelzuur oxydeerend heeft gewerkt en er een nitreerbaar lichaam is ontstaan, komt men tot 't vermoeden, dat cholzuur een hydroaromatisch lichaam is, dat bij oxydatie met zwavelzuur overgaat in 't aromatische dehydrocholon. Als dit zoo is, dan moet in 't gehydreerde lichaam de moleculairrefractie en dispersie grooter zijn dan de som van de atoomrefracties (resp. dispersies), omdat er een benzolverbinding in aanwezig is. Hierover zijn nu door PREGEL uitvoerige proeven verricht. Hij vond daarbij dat de moleculairrefractie en dispersie voor 't cholzuur juist overeenkwam met de berekende, indien men bij die berekening aannam, dat er alleen enkelvoudige bindingen in 't molecuul voorkwamen. Voor 't dehydrocholon werden echter veel grootere getallen, dan de op die manier berekende, gevonden; de berekening klopte met 't experiment, indien men de aanwezigheid van 6 dubbele bindingen, dus van een benzolachtig lichaam veronderstelde.

Een verder bewijs voor 't bestaan van gehydreerde ringvormige bindingen trachtte PANZER<sup>1)</sup> te geven, die door oxydatie met salpeterzuur beproeven wilde 't cholekamferzuur van LATSCHINOFF weer in handen te krijgen. Hij verkreeg, door 1 deel cholzuur met 5 gewichtsdeelen salpeterzuur (S. G. 1.41) eenige uren op 't waterbad te verhitten, een stof in naaldvormige kristallen van smp.  $270^{\circ}$ – $286^{\circ}$ , waaraan hij de formule  $C_{14} H_{22} O_6$  toekende, en dat, volgens hem, wel identiek zou zijn met 't door LATSCHINOFF verkregen cholekamferzuur  $C_{10} H_{16} O_4$ .

Door dit kristallijne product te verhitten met het 5-voudige gewicht natronkalk, verkreeg hij een vloeistof van kookpunt  $227^{\circ}$ , die de samenstelling  $C_{11} H_{18}$  zou hebben. Daar deze koolwaterstof geen broom addeert, is 't wel zeer waarschijnlijk een homoloog van benzol.

Dit zou dan weer een bewijs zijn voor 't voorkomen van

1) Zeitschr. f. Physiol. Chem. 48, 192 [1906]; Zeitschr. f. Physiol. Chem. 60, 376 [1909].



ringvormige bindingen in 't cholzuur-molecuul. Wat echter misschien wel wat afdoet aan de waarde van dit gegeven, is het feit, dat uit 250 gram cholzuur slechts 11.8 gram cholekamferzuur en uit 5 gr. van dit cholekamferzuur slechts 0.7 gram van deze (zuivere) vloeistof werd verkregen.

Dit cholekamferzuur is op zichzelf wel bestendig tegen kokend salpeterzuur, maar niet in tegenwoordigheid van de reactieproducten. Door dan ook bij een volgende proef 100 gram cholzuur gedurende 3 dagen te koken met 500 cm<sup>3</sup>. salpeterzuur van S. G. 1.4, werden heel andere reactieproducten gevonden.

Als goed gedefinieerde stoffen werden nu verkregen: het barnsteen- en het glutaarzuur en het  $\alpha$ -methylglutaarzuur. PANZER wijst er op, dat deze laatste stof ook door oxydatie van kamferphoron, dus door oxydatie van een gehydreerden 5-ring, is verkregen.

Hierdoor is dus de aanwezigheid van gehydreerde ringen in 't cholzuur-molecuul wel zeer waarschijnlijk geworden.

Op grond hiervan, en van andere oxydatieproducten, (zoo bijv. een gele hars, die de formule  $C_8 H_{12} O_5$  zou hebben en waarschijnlijk een oxyhexahydrophthaalzuur  $C_6 H_9 OH(COOH)_2$  zou zijn) komt PANZER er dan zelfs toe, om een voorloopige structuurformule op te stellen, met 3 gehydreerde benzolringen, en geen dubbele bindingen. Deze formule werd echter direct bestreden door LETSCHE<sup>1)</sup>, die verschillende gronden aanvoerde, die 't bestaan van één dubbele binding waarschijnlijk maken. (Aange-toond is deze door LANGHELD<sup>2)</sup> die in 't Laboratorium van HARRIES, door behandelen van een suspensie van cholzuur in chloroform met ozoon, een ozonide verkreeg  $C_{24} H_{40} O_9$ ; bij splitsing met water vertoonde 't dezelfde eigenaardigheden, die HARRIES voor ozoniden van hydroaromatische lichamen had gevonden). Verder vond LETSCHE bij oxydatie van cholzuur met salpeterzuur + zwavelzuur een lichaam, dat niet met de formule van PANZER in overeenstemming is te brengen. Hij verkreeg

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. Physiol. Chem. 61, 215—240 [1909].

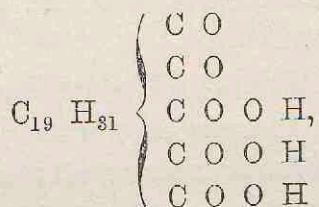
<sup>2)</sup> Ber. 41, 1023 [1908].



n.l. kristalletjes van smp. 226 °, die een 5-basisch zuur van formule  $C_{19} H_{28} O_{10}$  bleken te zijn.

In 1910 verscheen er een publicatie van PREGL <sup>1)</sup>, over „de gemeenschappelijke constitutie der 3 specifieke galzuren.” Hieronder verstond hij 't cholzuur, 't desoxycholzuur en 't choleïnezuur; indien deze geoxydcerd werden met een groote overmaat (15-voudige hoeveelheid) salpeterzuur van S. G. 1.4 (gedurende 3 uur op 't waterbad), dan ontstond uit elk dier drie stoffen hetzelfde choloïdaanzuur  $C_{18} H_{28} O_8$ , een 4-basisch zuur van smp. 324 °. (Uit 135 gr. cholz. werd 4 gr. zuiver praeparaat verkregen). Door verhitten van telkens één gram eenigen tijd boven het smp., werd een 2-basisch zuur verkregen van smp. 217 °, het pyrocholoïdaanzuur  $C_{18} H_{20} O_4$  (opbrengst hoogstens 20 %). Dit pyrocholoïdaanzuur zou volgens PREGL dan  $\alpha$ -methyl- $\zeta$ -parabenzoëzuur, norm. caprinezuur zijn.

PREGL redeneert nu verder aldus: de formule van het biliaanzuur staat vrijwel vast en we mogen daarvoor wel aannemen:



waaruit dus blijkt, dat het kan worden afgeleid uit de grondkoolwaterstof  $C_{19} H_{31} (C H_2)_2 (C H_3)_3 = C_{24} H_{44}$ , dus met 6 waterstofatomen minder dan een verzadigde koolwaterstof uit de aliphatische reeks; dit tekort zou dan niet aan dubbele bindingen te wijten zijn, omdat het biliaanzuur ontstaan is uit cholzuur door oxydatie met permanganaat. 't Meest voor de hand liggend is dus, om 3 gehydreerde ringen aan te nemen.

Door nu het biliaanzuur te koken met een geconcentreerde, alkalische oplossing van kaliumpermanganaat, kunnen we een hooger oxydatieproduct krijgen, n.l. het reeds door LASSAR-COHN gevonden ciliaanzuur, waaraan PREGL de formule  $C_{20} H_{28} O_8$  en

<sup>1</sup> Zeitschr. f. Physiol. Chem. 65, 157—180 [1910].





uit de bij inwerking van het sterke zwavelzuur ontstane koolstof.

Ten slotte moge in dit overzicht nog vermeld worden, dat men in de gal van andere dieren (dan het rund) en van den mensch nog een heele reeks andere galzuren heeft gevonden, altijd gepaard met glycocoll of taurine.

Zoo meende H. BAYER<sup>1)</sup> in de menschengal een zuur  $C_{18} H_{23} O_4$ , door hem anthropocholalzuur genoemd, aangetoond hebben.

Bij nader onderzoek door SCHOTTEN<sup>2)</sup> bleek echter, dat dit zuur nog bariumcarbonaat bevatte. Het geheel zuivere zuur bleek ten slotte de formule  $C_{23} H_{40} O_4$  te bezitten; SCHOTTEN noemde het fellinczuur.

Door STRECKER is in zwijnegal het hyocholalzuur gevonden  $C_{25} H_{40} O_4$ . Later onderscheidde men dit in een  $\alpha$ - en  $\beta$ -hyocholzuur, welk laatste dan de formule  $C_{24} H_{40} O_4$  zou hebben.

Door HEINTZ en WISLICENUS<sup>3)</sup> is in de ganzegal een met taurine gepaard voorkomend zuur, het chenocholzuur gevonden: formule  $C_{27} H_{44} O_4$  of  $C_{27} H_{42} O_4$ .

Voorals HAMMARSTEN heeft uitgebreide onderzoekingen verricht over de gal van allerlei dieren en daarbij in de gal van den ijsbeer, naast cholzuur en choleïnezuur het urso-choleïnezuur  $C_{19} H_{30} O_4$  of  $C_{18} H_{28} O_4$  gevonden<sup>4)</sup>.

Ook in de gal van walrus en zeehond werden door hem bijzondere cholzuren gevonden. In de gal van *Scymnus borealis*, vond hij 2 galzuren:  $\alpha$ - en  $\beta$ -scymnol  $C_{27} H_{46} O_5$  en  $C_{29} H_{50} O_5$ , die zoowel de cholzuur-reacties, als ook enkele cholesterine-reacties gaven.

1) Zeitschr. f. Physiol. Ch. 2, 358 [1878] en 3, 292 [1897].

2) Zeitschr. f. Physiol. Ch. 10, 175 [1885] en 11, 268 [1887].

3) POGGENDORF's Ann. 103, 559 [1859].

4) Zeitschr. f. Physiol. Chem. 36, 525 [1902].

## Bereiding van het Uitgangsmateriaal.

---

Hiervoor worden in de litteratuur zeer vele methodes aangegeven, waarvan de meeste in principe overeenkomen met de oude bereidingswijze van MYLIUS en LATSCHINOFF, terwijl één, de methode van LANGHELD, geheel daarvan verschillend is.

Gemeenschappelijk aan alle methodes, is de bereiding van het ruw-product; deze geschiedt, door versche rundergal ongeveer 30 uur te koken met  $\pm \frac{1}{5}$  van haar volume aan 30 % natronloog. Het in de rundergal aanwezig glyco- en taurocholzuur wordt daardoor gesplitst in cholzuur en glycocoll resp. taurine.

Door de vloeistof nu aan te zuren, slaat het cholzuur als een taaie, samenhangende massa neer. Tevens worden dan neergeslagen choleïnezuur, desoxycholzuur, vetzuren, galkleurstoffen enz.

Om het cholzuur te scheiden van de overige zuren, wordt bij de oude methodes gebruik gemaakt van de eigenschap van het bariumzout van cholzuur om oplosbaar te zijn in  $\pm$  30 dln. water. De bariumzouten van de andere zuren zijn daarentegen onoplosbaar in water.

Het neergeslagen ruwe zuur wordt nu uit de vloeistof genomen (wat gewoonlijk zeer gemakkelijk gaat, daar het één samenhangende, deegachtige massa vormt), gedroogd, (waarbij het brokkelig wordt, doordat de zuren kristalliseeren), gepoederd, opgelost in ammonia en daarna verdund met zooveel water, dat de concentratie van de oplossing ongeveer 2 % ruw zuur bedraagt. Nu wordt zoolang geconcentreerde bariumchloride-oplossing toegevoegd, als er nog een neerslag ontstaat (van de bariumzouten van vetzuren, choleïnezuur en desoxycholzuur). Na filtreeren wordt het filtraat weer aangezuurd met zoutzuur; het cholzuur slaat dan neer. Om dit cholzuur al dadclijk wat



zuiverder te hebben, wordt wel aangegeven <sup>1)</sup>, de vloeistof vóór 't aanzuren te koken met beenderkool. Bij proefneming is 't mij echter niet mogen gelukken zodoende een noemenswaard zuiverder product te verkrijgen.

Het neergeslagen cholzuur wordt nu met water doorgekneed, om 't zoutzuur zooveel mogelijk te verwijderen, en daarna op 't waterbad gedroogd; zodoende wordt een brokkelige, vuilwitte massa verkregen, die echter, bij oplossen in een of ander oplosmiddel, een donkerbruin gekleurde vloeistof geeft.

De verdere reiniging heeft plaats door omkristalliseeren uit alcohol; men gaat daartoe gewoonlijk zóó te werk: de droge massa wordt in een mortier fijngemaakt en daarna goed door-eengewreven met 1 à 2 maal het gewicht aan alcohol. Het cholzuur neemt daarbij 1 molccuul kristalalcohol op; brengt men nu de massa op een zuigfilter, dan is het filtraat een zeer donkergekleurde stroop, terwijl op 't filter, na uitwasschen met weinig alcohol, een slechts licht gekleurde kristal massa achterblijft; deze wordt dan verder gezuiverd door omkristalliseeren uit kokenden alcohol.

Dit behandelen met alcohol is altijd een onaangenaam stemmend werk, omdat men daarbij zulke groote verliezen heeft, doordat een belangrijk percentage van het cholzuur in de moederloog achterblijft. Volgens LASSAR-COHN <sup>2)</sup> zou dit gedeeltelijk daaraan te wijten zijn, dat het cholzuur reeds bij omkristalliseeren uit alcohol zich begint te veresteren.

Zooals reeds boven vermeld werd, heeft LANGHELD <sup>3)</sup> een principiëel van de vroegere methodes verschillende wijze aangegeven, om in het ruw-product, dat verkregen wordt door de gal 30 uur met loog te koken en daarna aan te zuren, het cholzuur te scheiden van de overige zuren. Hij maakt daarbij gebruik van de eigenschap van het natriumzout van cholzuur,

1) BONDI en MÜLLER, Zeitschr. f. Physiol. Chem. 47, 500 [1906].

2) Zeitschr. f. Physiol. Chem. 16, 488 [1892].

3) Ber. 41, 378 [1908].



om onoplosbaar te zijn in kokende alcoholische loog. Hij geeft dan 't volgend recept:

„Nach der neuen Methode werden die auf dem Wasserbade getrockneten Rohsäuren ohne vorhergehende Fällung mit Bariumchlorid mit dem Doppelten ihres Gewichts an Alkohol angerührt. Der hierbei ungelöst gebliebene Teil der Cholsäure wird zweimal aus Alkohol umkrystallisiert. Zu den vereinigten Mutterlaugen, bezüglich bei völliger Lösung der Rohsäuren, zu der ursprünglichen Lösung, wird überschüssiges Natriumhydroxyd, das in wenig Wasser gelöst ist, gegeben, und die Reaktionsmasse 1—2 Stunden auf dem Wasserbade erwärmt. Während dieser Zeit scheidet sich das cholsaure Natrium nahezu quantitativ in Gestalt kleiner, weisser Nadeln ab. Es wird möglichst heisz abgesaugt und mit viel siedendem Alkohol gewaschen. Die daraus in Freiheit gesetzte und getrocknete Cholsäure wird mit dem doppelten Gewicht Alkohol vermengt, wobei sie ein Molekül Krystallalkohol aufnimmt, und filtriert. Das so erhaltene Produkt zeigt sofort den richtigen Schmp. 196°—197°”.

Bij 't volgen van dit voorschrift hebben we zeer uiteenloopende resultaten verkregen, wat waarschijnlijk zal samenhangen met het verschil in samenstelling van zomer- en wintergal.

Nu zijn we bij een groot deel van ons onderzoek niet uitgegaan van het cholzuur zelf, maar van zijn oxydatieproduct, het dehydrocholzuur. Dit ontstaat uit cholzuur volgens de fraaie bereidingswijze van HAMMARSTEN <sup>1)</sup>:

Het cholzuur wordt opgelost in ijsazijn (een 10 % oplossing), hierbij voegt men voorzichtig een 10 % oplossing van chroomzuur in ijsazijn, zóó langzaam, dat de temperatuur niet boven 45° komt. Heeft men ongeveer 9 deelen chroomzuur op 10 deelen cholzuur toegevoegd, dan stijgt de temperatuur niet meer bij verdere toevoeging van chroomzuur; de reactie is afgelopen. Door nu uit te gieten in veel water, slaat het dehydrocholzuur

<sup>1)</sup> Ber. 14, 71 [1881].



neer, dat dan afgefiltreerd en, ter verwijdering van ingesloten chroomzouten, opgelost wordt in soda-oplossing. Het chroom blijft dan als chromoxyde achter, en na filtreren slaat vrij zuiver dehydrocholzuur neer. Na drogen op het waterbad en omkristalliseeren uit aceton, is het gewoonlijk zuiver (smeltpunt  $236^{\circ}$ ).

Het cholzuur, waaruit dit dehydrocholzuur bereid wordt, heeft niet geheel zuiver te zijn. Om dus zoo snel mogelijk het uitgangproduct, zuiver dehydrocholzuur, te verkrijgen, werd ten slotte (bij zomergal!) deze weg ingeslagen:

10 Liter gal wordt in een groot cilindervormig ijzeren vat, dat van boven door een kurk kan gesloten worden, vermengd met 2 Liter 30 % natronloog, dan  $\pm$  40 uur gekookt aan een opstijgenden koeler en daarna uitgegoten in een grooten ijzeren bak; na verdunnen met ongeveer een gelijk volume water, waardoor de temperatuur van het mengsel daalt tot  $\pm$   $50^{\circ}$ , wordt de vloeistof aangezuurd met zoutzuur; de neergeslagen, deegachtige massa wordt uit de vloeistof genomen, met water dooreengekneed, gewasschen en vervolgens op het waterbad gedroogd. De brokkelige massa wordt nu gepoederd en met het dubbele gewicht aan 96 % alcohol gebracht in een groote kolf; de massa brengt men op het waterbad onder goed schudden aan de kook en voegt daarna een groote overmaat ( $\pm$  tweemaal de berekende hoeveelheid) sterke alcoholische natronloog toe (verkregen door metallisch natrium op te lossen in 96 % alcohol). Na eenigen tijd verwarmen stolt de geheele massa tot een kristalbrij van naaldjes; deze worden op een zuigfilter afgezogen en uitgewasschen met kokenden alcohol. Zóó wordt verkregen een stroperig, bruinzwart filtraat en een lichtgroen gekleurd residu; dit residu wordt opgelost in water, en aangezuurd met zoutzuur; er slaat dan vrij zuiver cholzuur neer. Dit wordt nu, na drogen en poederen, opgelost in  $\pm$  7 maal zijn gewicht aan ijsazijn. De oplossing wordt gebracht in een groote, wijdmondse stopflesch, die in een bak met stroomend koud water staat. Onder sterk roeren met behulp van een electromotor, wordt nu uit een scheidrecter een oplossing van



200 gr. chroomzuur in 500 cM<sup>3</sup> water + 500 cM<sup>3</sup> azijnzuur in een zóódanig (vrij snel) tempo toegevoegd, dat de temperatuur van het mengsel niet boven 40° komt. Nadat we zeker zijn, dat er een voldoende hoeveelheid chroomzuur is toegevoegd, wordt het geheele mengsel uitgegoten in veel water (of in 25 % keukenzout-oplossing).

Na 24 uur staan, wordt het neergeslagen dehydrocholzuur afgefiltreerd en op het filter uitgewasschen met veel water; de vochtige massa wordt in soda-oplossing gebracht en daarmee even opgekookt. Dan filtreert men door een vouwfilter. Het bruingeel gekleurde filtraat wordt nog wat verdund met water en daarna aangezuurd met zoutzuur; het dehydrocholzuur slaat dan neer, wordt na eenigen tijd afgezogen en op het waterbad gedroogd. Er blijft dan een zeer lichtgeel gekleurde massa achter, die, waar zij met den schaalwand in aanraking is, groengeel is gekleurd.

Van deze droge massa wordt nu een deel opgelost in zoo weinig mogelijk kokend aceton; bij bekoelen scheidt zich dan zuiver dehydrocholzuur af met het smeltpunt 236°; dit wordt afgezogen en eenige malen uitgewasschen met kleine hoeveelheden aceton. In de bruine, tamelijk stroperige moederloog lost men bij kookhitte weer een deel van het ruw-product op, laat uitkristalliseeren en gaat hiermee door, tot alles omgekristalliseerd is. De donkerbruin gekleurde moederloog kan, door voorzichtig neerslaan met petroleumæther, nog een minder zuivere fractie geven (smeltpunt ± 225°).

Het omkristalliseeren mag niet gebeuren uit alcohol (vgl. blz. 14). Wèl kan het ruwe zuur omgekristalliseerd worden uit azijnzuur; dit heeft het voordeel, dat we met een hooger kokend oplosmiddel werken, zoodat we bij het filtrereen en afzuigen niet zoo'n last hebben van het verdampen ervan. Het verkregen product is echter niet zoo fraai als dat uit aceton (het is niet geheel wit; smeltpunt ± 230°).



## Experimenteel gedeelte.

---

Zooals uit het historisch overzicht gebleken is, mogen we wel als zeer waarschijnlijk aannemen, dat het cholzuur behoort tot de hydroaromatische lichamen.

Waar nu in 't algemeen het onderzoek van een aromatisch lichaam (door 't reeds bekend zijn van een reusachtig aantal van die stoffen, en door hun gemakkelijke kristalliseerbaarheid) groter kans van slagen heeft dan dat van een hydroaromatisch, lag 't voor de hand, om te trachten het cholzuur in een aromatische verbinding over te voeren.

Op allerlei wijzen heeft men reeds getracht, gehydreerde ringvormige verbindingen van hun overmaat waterstof te bevrijden; gewoonlijk echter met niet veel resultaat, behalve dan in enkele speciale gevallen. Zoo heeft KÖNIGS<sup>1)</sup> 't geprobeerd met geconcentreerd zwavelzuur en ook met rood bloedloogzout; LELLMANN en GELLER<sup>2)</sup> met nitrobenzol, KÖNIGS (l.c.) en FRITZ BLAU<sup>3)</sup> met zilveroxyde. Aan TAFEL<sup>4)</sup> is 't gelukt piperidine in pyridine over te voeren door oxydatie met een azijnzure oplossing van zilveracetaat; bij tetrahydrochinoline bloek hem, dat niet zilveracetaat maar een waterige oplossing van mercuriacetaat of van koperacetaat gebruikt moest worden, om 't gewenschte doel (oxydatie tot chinoline) te bereiken. Dan heeft HERZIG<sup>5)</sup> aangetoond, dat in haematoxyline 4 H-atomen kunnen worden weggeoxydeerd door chromzuur, zonder dat de functie der zuurstofatomen veranderd wordt, behalve van één, dat phenol-

---

1) Ber. **12**, 2341 [1879].

2) Ber. **21**, 1921 [1888].

3) Ber. **27**, 2537 [1894].

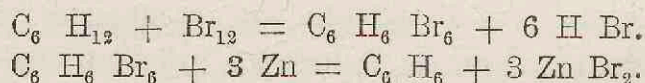
4) Ber. **25**, 1619 [1892].

5) Monatshefte für Chemie **16**, 906 [1895].

karakter krijgt. Hieruit besluit HERZIG dan, dat haematoxyline een gehydreerde benzolring bezit, waarvan de geaddeerde waterstofatomen door het chroomzuur worden weggeoxydeerd, zoodat een in de kern zich bevindende oorspronkelijke alcoholische hydroxylgroep, tot phenolgroep wordt.

Van deze methodes is op 't cholzuur reeds toegepast de oxydatie met chroomzuur. Hierdoor ontstaan echter uit de alcoholgroepen carbonylgroepen, terwijl de ring onaangetast blijft; verder heeft PREGL reeds de oxydatie met sterk zwavelzuur toegepast en zoo de hydroaromatische ringen kunnen dehydreeren (zie blz. 16) hoewel 't hem niet gelukt is, daarbij een kristallijn product te krijgen.

Nu bestaat er nog een methode ter oxydatie van hydroaromatische verbindingen (waar PREGL ook reeds mee gewerkt heeft), die in zeer vele gevallen goede uitkomsten geeft, n.l. die van v. BAYER en VILLIGER <sup>1)</sup>. v. BAYER redeneerde aldus: Uit benzolhexabromide ontstaat door zink en zoutzuur gemakkelijk benzol. Als we dus een gehydreerden 6-ring eerst, door volkomen symmetrische vervanging van 6 waterstofatomen door broom, kunnen overvoeren in een derivaat van benzolhexabromide, dan kunnen we dit laatste zeer gemakkelijk tot een benzolderivaat verwerken.



Bij proefneming bleek dat broom reeds in de kou substitueerend werkt, indien men jood als katalysator gebruikt. Bij verwarmen of bij gebruik van ijzer als katalysator, heeft men last van verharsing. Zoo gelukte het hun, uit carvestreen en uit silvestreen, metacymol te verkrijgen, paracymol uit limoneen enz.

Ook bij een zuurstof bevattend lichaam uit de terpeengroep, het menthon, gaf deze methode een bevredigend resultaat.

Om nu na te gaan, of de methode, die v. BAYER volgde, ook toe te passen zou zijn bij 't cholzuur, werden de volgende proeven genomen:

<sup>1)</sup> Ber. **31**, 1401 [1898].



18 gr. cholzuur (smp.  $194^{\circ}$ ; door verhitten op  $130^{\circ}$  van kristalalcohol bevrijd) werd gebracht in een fractioneerkolfje van  $300\text{ cm}^3$  inhoud; het kolfje werd gesloten door een met vaseline overdekte kurk, waardoor een scheidtrechter ging; de zijbuis was verbonden met een waschflesch met geconcentreerd zwavelzuur, om de vochtigheid van de lucht uit te sluiten. Het kolfje werd nu geplaatst in een koudmakend mengsel van ijs en keukenzout en door de scheidtrechter langzaam toegevoegd ongeveer 75 gr. broom, gemengd met een weinig jodium. Hoewel het broom van te voren gekoeld was en druppelsgewijs toegevoegd werd, was de inwerking zeer heftig; een deel van 't broom verdampt dan ook, verder ontwijken stroomen broomwaterstof. Den volgenden dag werd nog een weinig broom toegevoegd. De eerste dagen blijft geregeld een langzame stroom broomwaterstof ontwijken, na ruim 2 weken heeft de gasontwikkeling opgehouden; de kolf wordt nu geopend, en er blijkt een taaie, samenhangende, door 't jood zwart gekleurde massa achtergebleven te zijn; deze wordt met water en natriumbisulfiet-oplossing behandeld en gaat daarbij over in een geelbruin poeder. Na affiltreeren en drogen, weegt dit 48 gr. De gewichtsvermeerdering bedraagt dus 30 gr.; daar nu het mol. gewicht van cholzuur 408 is, zou dit er op wijzen, dat er ruim 8 atomen broom in 't molecuul getreden zijn.

Bij een broombepaling werd genomen:

0.1884 gr. stof.

Gevonden: AgBr 0.2570 gr.

Dus: 57.9% Br.

Berekend voor  $\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{O}_5\text{Br}_7$ : 58.2% Br.

Het reactieproduct is een oranjegeel amorf poeder; 't heeft nog zure eigenschappen, want na oplossen in alcohol en toevoegen van ammonia of loog, kan men de oplossing in water uitgieten, zonder dat er een neerslag ontstaat. Dat ontstaat dan bij aanzuren van de oplossing.

Pogingen om 't reactieproduct gekristalliseerd te krijgen, leidden tot geen resultaat. De stof (of waarschijnlijker: het



mengsel der stoffen) lost zeer goed op in aceton; ook is zij oplosbaar in aether, iets minder in alcohol. Op zichzelf behoeft 't feit, dat 't reactieproduct van de bromering niet kristallijn te krijgen was, nog niet verontrustend te zijn: de broomverbinding was immers slechts een tusschenproduct. Daarom werd nu getracht dit ruw-product van het broom te berooven door middel van zink en zoutzuur.

Daartoe werd dus een deel van het gebromeerde cholzuur opgelost in aether en alcohol; deze oplossing eerst in een koudmakend mengsel, daarna 24 uur bij kamertemperatuur, onder sterk roeren met behulp van een motor, behandeld met zinkstof + alcoholische chloorwaterstof + eenige druppels platinachloride-oplossing. Op deze manier bleek echter, tot mijn teleurstelling, geen broomvrij, noch ook een kristalliseerbaar product te krijgen te zijn. Daarom werd nu een deel der oplossing langen tijd aan een opstijgenden koeler gekookt met zinkstof. Ook zoo is echter het broom niet te verwijderen.

Voor de hand lag 't nu, de broomonttrekking te beproeven met een sterker werkend reductiemiddel. Daartoe werd een ander deel van 't broom-product behandeld met natrium + alcohol. De oplossing werd nu geheel zwart gekleurd. Na aanzuren ontstaat er een bruinzwart neerslag, dat zeer gemakkelijk oplost in aceton, evenwel niet, ook maar eenigermate, zuiver te krijgen was. Ook werd beproefd 't een of ander reactieproduct te isoleeren, door de zwarte vloeistof over te stoomen; er gaat echter niets over (ook na aanzuren); ook sublimatieproeven in 't absolute vacuum van een Gaede-pomp gaven geen resultaat.

Wel bleek, dat bij inwerking van loog alleen op 't broom-product al een ontleding plaats grijpt; reeds de zwartkleuring van de oplossing wijst erop, en verder 't feit, dat een groot deel van het broom aan het natrium gebonden wordt. Zoo werd 0.2034 gr. van het gebromeerde cholzuur eenigen tijd gekookt met loog; de verkregen oplossing verdund met water en aangezuurd; na affiltreeren van het daarbij ontstane neer-



slag werd aan het filtraat zilvernitraat toegevoegd. Hierbij ontstaat een dik neerslag van broomzilver, dat 0.1700 gr. blijkt te wegen. Ruim de helft van het broom wordt dus door de loog uit 't molecuul verwijderd.

Om de misschien verharsende werking van de tamelijk geconcentreerde natrium-alcoholaat-oplossing te ontgaan, werd getracht een mogelijkerwijze gekristalliseerd reactieproduct (zij 't dan ook niet 't gewenschte geheel broomvrije) te krijgen op de volgende manier:

Een deel van het ruwe broom-product werd opgelost in aether, en deze oplossing langen tijd geschud met natrium-amalgaam. De oplossing wordt nu echter ook donkerbruin (na toevoegen van weinig alcohol, bruinzwart). Bij schudden van de aetherische oplossing met water, wordt dit laatste donkerbruin gekleurd en bij aanzuren slaat weer de bruinzwarte, harsachtige stof neer, die niet gezuiverd kon worden.

Waar dus op deze manier, waarschijnlijk ook door inwerking van het aanwezige alkali, het reactieproduct verharst, werd nog eens geprobeerd met een sterkwerkend *neutraal* reductiemiddel het gewenschte resultaat te verkrijgen.

Zoo'n reductie-middel is sinds lang bekend in het door kwik geactiveerde aluminium, dat verkregen wordt door aluminium, in den vorm van spanen of van poeder, eenigen tijd in aanraking te laten met sublimaat-oplossing.

Bij toepassing op het gebromeerde cholzuur werd dit dus in waterig-alcoholische oplossing langen tijd gekookt met geactiveerd aluminium-poeder. Hierbij werd het bezwaar ondervonden, dat het reactieproduct in hooge mate de poriën van het filtreerpapier verstopt, zoodat de oplossing niet door filtreren, maar door centrifugeeren van de overmaat van aluminium-poeder bevrijd moest worden. Ook zoo echter werd geen broomvrij product verkregen, of ook maar een product, dat door omkristalliseeren kristallijn was te krijgen.

Dat de boven beschreven wijze van bromering zoo'n onhandel-



baar product opleverde, zou misschien daaraan te wijten kunnen zijn, dat, hoewel het kolfje zich in een koudmakend mengsel bevond, toch plaatselijk de inwerking van het vloeibare broom op het vaste cholzuur een hooge temperatuur teweeg bracht, zoodat de reactie te heftig werd. Een kalmer inwerking zou waarschijnlijk te krijgen zijn, door broomdamp langzaam op 't cholzuur te laten inwerken.

Daartoe werd de proef als volgt ingericht:

In een grooten vacuumexsiccator werd een uitdampschaaltje gebracht met een fijngepoederd mengsel van 28 gr. cholzuur met 10 gr. jood; daarnaast werd een schaalte geplaatst met  $\pm$  120 gr. broom en nu de deksel op den exsiccator gezet; de geopende kraan werd verbonden met een waschflesch met geconcentreerd zwavelzuur, om 't binnendringen van vochtigheid uit de lucht te beletten. De inwerking van broom en cholzuur op elkaar heeft nu zeer langzaam plaats, en bel voor bel ontwijkt het broomwaterstof door de waschflesch. Na ruim een week, als nagenoeg al 't broom verdampt is, wordt de exsiccator geopend, en het reactieproduct van de overmaat broom en jood bevrijd. Dit product heeft dezelfde eigenschappen als 't op de eerste manier verkregene: 't is niet kristallijn te krijgen, verliest bij behandeling met zinkstof + zoutzuur of met aluminium-amalgaam of met magnesium-poeder z'n broom niet geheel, noch geeft 't na behandeling daarmee een kristalliseerbaar lichaam; het verharst door de inwerking van alkaliën.

Deze brutale poging om de structuur van het cholzuur nader te leeren kennen, leidde dus tot geen resultaat. De voor de hand liggende methodes: oxydatie met sterkere of zwakkere oxydatiemiddelen, inwerking van salpeterzuur enz., waren al beproefd geworden, en hadden geleid tot de in 't historisch overzicht besproken uitkomsten. De inwerking van halogenen was echter nog maar weinig bestudeerd geworden. Ik besloot derhalve, de inwerking van broom op cholzuur niet op te geven, maar te trachten die reactie minder energisch te doen plaats hebben.



Nu had reeds LANDSTEINER<sup>1)</sup> broom op cholzuur laten inwerken, door beide op te lossen in ijsazijn; maar hij is daarbij niet tot eenig gedefinieerd lichaam gekomen. Misschien nu, dat de inwerking van een verdunde broomloogoplossing op fijnverdeeld cholzuur een beter resultaat zou geven. Daartoe ben ik als volgt te werk gegaan:

10 gr. cholzuur werd opgelost in een overmaat verdunde loog en de oplossing verder met water verdund tot 1 à 1.5 L. vloeistof.

Deze vloeistof werd met behulp van een turbine sterk geroerd en nu langzaam broom toegevoegd; plotseling scheidt zich een deegachtig, vast lichaam af, dat aan den roerder blijft kleven. Het neerslag is wit gekleurd, aan de oppervlakte bruinrood. Met roeren wordt nu opgehouden, en het mengsel eenigen tijd aan zichzelf overgelaten. Daarna wordt 't reactieproduct behandeld met natriumbisulfit-oplossing, waardoor 't geheel wit wordt, en afgezogen op een zuigfilter. Het ruw-product weegt na drogen ruim 10 gr. Het wordt opgelost in aceton, dan voegt men een overmaat aether toe en laat 24 uur staan. Er is dan een neerslag ontstaan van oktaëdrische kristalletjes, die bij 120°—130° beginnen te ontleden en halogeenhoudend blijken te zijn.

Om na te gaan, welk bromeringsproduct er was ontstaan, werd het broom quantitatief bepaald. Deze bepaling werd, evenals de groote meerderheid van de bij dit onderzoek verrichte broombepalingen, uitgevoerd volgens de zeer handige, elegante methode van PRINGSHEIM. Er werd gebruik gemaakt van een gewoon nikkelen kroesje van 5 à 10 cM<sup>3</sup>. inhoud, zooals dit voor geringen prijs in den handel verkrijgbaar is; de deksel werd in 't midden doorboord met een zoo wijde opening, dat hierdoor juist een ijzeren staafje (een spijkertje) kon gebracht worden.

In het kroesje (waarvan het gewicht na een 50-tal bepa-

1) Zeitschr. f. Physiol. Chemie, 19, 285 [1894].



lingen nagenoeg niet veranderd was en dat zeer spoedig de temperatuur en vochtigheidstoestand van de balans aanneemt) wordt de stof afgewogen. Dan wordt ongeveer het 20-voudige gewicht natriumperoxyde toegevoegd, goed gemengd met het spijkertje en daarna het kroesje, met het dekseltje erop, geplaatst in een Griffith-beker van 400 cM<sup>3</sup>. Nu wordt het bekersglas zoover met gedestilleerd water gevuld, totdat  $\pm \frac{3}{4}$  van het kroesje in 't water staat, en dan de reactie, door inbrengen van den gloeiend gemaakten spijker, in gang gebracht.

Na eenige oogenblikken is de gesmolten inhoud van het kroesje weer vast geworden; de massa wordt nu in het water gebracht, het kroesje, dekseltje en staafje goed afgespoeld met water. Bij de oplossing voegde ik zooveel zwavelzuur tot de reactie zuur was en daarna natriumbisulfitoplossing (om eventueel gevormde halogeenzuren te reduceeren tot halogeenvanwaterstofzuren) totdat de oplossing duidelijk naar zwaveligzuur rook. De overmaat zwaveligzuur wordt dan weggekookt, de warme oplossing van de afgescheiden kooldeeltjes gefiltreerd, na bekoelen 3 cM.<sup>3</sup> salpeterzuur toegevoegd en met zilvernitraat het halogeenzilver neergeslagen; dit wordt dan in een Gooch-kroes gefiltreerd en gewogen.

Zóó werd nu gevonden voor het broomgehalte van het reactieproduct:

0.1690 gr. stof gaf:

AgBr 0.0520 gr.

Dus gevonden Br: 13.1 %

Bij een tweede analyse:

0.1340 gr. stof gaf: AgBr 0.0410 gr.

Dus gevonden Br: 13.0 %

Voor C<sub>24</sub> H<sub>39</sub> O<sub>5</sub> Br, een stof, die ontstaan zou zijn, als in cholzuur één atoom H door Br was vervangen, wordt 't broomgehalte berekend op 16.4 %.

Om na te gaan of dit verschil tusschen gevonden en berekend gehalte misschien te wijten zou zijn aan de methode van



broombepaling, werd het broomgehalte ook bepaald volgens LIEBIG:

0.1374 gr. stof gaf:

AgBr 0.0413 gr.

Dus gevonden Br: 12.8 %.

Dit komt dus binnen de grenzen van de analysefouten overeen met het volgens de methode van PRINGSHEIM bepaalde gehalte.

't Gevonden broomgehalte stemt dus in 't geheel niet overeen met het berekende, is veel te klein. Een te klein gehalte aan broom zou het gevolg zijn van een grooter molecuul dan van 't oorspronkelijke cholzuur. Dat dit niet het geval kan zijn door aanwezige kristalvloeistof (kristal-aceton of -aether dus) wordt daardoor zeer waarschijnlijk gemaakt, dat bij langen tijd verhitten op 100°, de stof nagenoeg geen gewichtsverlies ondergaat.

De meest voor de hand liggende veronderstelling is nu, dat de stof bestaat uit een mengsel van een gebromeerd en niet-gebromeerd zuur. Dat dit vermoeden juist is, bleek door de proef iets anders in te richten:

't Natriumcholaat werd opgelost in water en deze oplossing, onder sterk roeren, langzaam uitgegoten in broomwater. 't Neerslag wordt weer ontkleurd met natriumbisulfit-oplossing, en afgefiltreerd; dan opgelost in aceton en omgekristalliseerd uit aceton + water. Zoo worden fijne naaldjes verkregen van smp. 230°, die geen broom meer bevatten. Er is dus dehydrocholzuur gevormd; 't broom heeft niet substitueerend, maar oxydeerend gewerkt. Een dergelijke werking was vroeger al gevonden door LASSAR-COHN <sup>1)</sup>, die 't cholzuur oplostte in azijnzuur, uitgoot in water en daarna broom toevoegde.

Bij de eerste proef was 't cholzuur nog eenigen tijd in aanraking geweest met vrij broom; hieraan was waarschijnlijk de gedeeltelijke bromering te danken. Later werd in een afzonderlijke proef nagegaan de inwerking van waterige broomoplossing op dehydrocholzuur:

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. Physiol. Chem. 16, 488 (1892).



Dehydrocholzuur werd opgelost in loog en deze oplossing uitgegoten in broomwaterstof-solutie. Er ontstaat een kaasachtig neerslag van dehydrocholzuur. Nu wordt een groote overmaat broom toegevoegd, zoodanig echter, dat alles in 't broomwaterstofzuur in oplossing gaat. Gedurende 2 dagen wordt nu de suspensie telkensflink doorgeschud, en daarna afgefiltreerd; er blijft dan op 't filter een stof achter, die, na omkristalliseeren, als fijne naaldjes van smp.  $238^{\circ}$  verkregen wordt en geen broom bevat, dus onveranderd dehydrocholzuur is. Het filtraat (de waterige oplossing dus) wordt met zwaveligzuur ontkleurd en uitgeschud met aether. Bij indampen van de aetherische oplossing blijft een gele, harsachtige massa achter, waarin eenige oktaëdrische kristalletjes (van monobroom-dehydrocholzuur?). De uitgeschudde waterige vloeistof gaat nu bij alkalisch maken prachtig groen-rood fluoresceeren. Een gekristalliseerde stof kan echter niet verkregen worden (fluoresceerende stof, misschien dezelfde als bij oxydatie met zwavelzuur?).

Het broomhoudende product, dat dus door toevoegen van broomwater aan natriumcholaat-oplossing verkregen was, zal hoogstwaarschijnlijk niet afkomstig zijn van 't cholzuur zelf, maar van het intermediair ontstane dehydrocholzuur. Nu heeft reeds LASSAR-COHN (l. c.) er op gewezen, dat van het dehydrocholzuur gemakkelijker gekristalliseerde derivaten verkregen worden, dan van het cholzuur. Daarom werd nu, in plaats van 't cholzuur, zijn oxydatieproduct, het dehydrocholzuur, in bewerking genomen.

Eerst werd nog eens geprobeerd of hierbij door inwerking van broomdamp in een exsiccator op 't vaste, met jood saamgewreven kristalpoeder, een gekristalliseerd derivaat te krijgen was, of tenminste een stof, die na behandelen met zink + zoutzuur of met natrium + alcohol een kristallijn product zou geven. Deze pogingen leidden evenwel tot hetzelfde resultaat als bij 't cholzuur.

Nu had LANDSTEINER (l. c.) een monobroomproduct van dehy-



drocholzuur verkregen, door bij een oplossing in ijsazijn, per 1 mol. dehydrocholzuur, 1 mol. broom te voegen; de oplossing blijft dan eenige uren onveranderd en daarna is de kleur van het broom spoedig verdwenen. Door nu ligroïne toe te voegen, verkreeg hij, volgens zijn opgave, microscopische naaldjes; deze zijn oplosbaar in aceton, ijsazijn en alcohol. Uit alcohol slaan bij bekoelen van de warm verzadigde oplossing, mooie, oktaëdrische kristallen neer. Van deze kristallen wordt geen analyse vermeld. Bij omkristalliseeren uit benzol ontstaan gedeeltelijk korte prisma's, gedeeltelijk een netwerk van fijne naalden. Mechanisch werden ze zoo goed mogelijk gescheiden; zoo ontstonden uit de oplossing (A) van de naaldvormige kristallen, bij omkristalliseeren uit aceton, weer naaldjes; uit de oplossing van de prisma's daarentegen in aceton (B), een mengsel van naaldjes en oktaëdertjes. Smp. A  $171^{\circ}$ - $173^{\circ}$  en smp. B  $160^{\circ}$ - $163^{\circ}$ .

De analyse van A zoowel als van B (van B wordt geen Broomgehalte opgegeven) stemt wel overeen met de formule  $C_{24}H_{33}O_5Br$ . De verbinding is onbestendig tegenover alkaliën.

Tot zoover de opgave van LANDSTEINER.

Om nu het monobroomdehydrocholzuur te bereiden, werd het voorschrift van LANDSTEINER gevolgd:

Een glazen buisje werd aan een zijde uitgetrokken tot een capillair en aan de andere zijde toegesmolten; het werd getareerd, daarna met broom gevuld, de capillair toegesmolten, en weer gewogen. Aldus afgewogen 1.605 gr. broom. Daar het mol. gewicht van

dehydrocholzuur 402 is, werden afgewogen  $\frac{402}{160} \times 1.605 = 4.03$  gr.

dehydrocholzuur (dus 1 mol. dehydrocholzuur op 1 mol. broom), dit opgelost in ijsazijn, deze oplossing in een wijdmondsche stopflesch gebracht, en na inbrengen van het buisje met broom, de flesch gesloten. Door schudden wordt de capillair verbrijzeld en zoo het broom met de oplossing vermengd. Na eenige uren heeft nog geen merkbare ontkleuring plaats gegrepen. De oplossing wordt nu 24 uur aan zichzelf overgelaten; ze is dan nog wel lichtbruin gekleurd, maar geeft met een waterige



joodkalium-oplossing behandeld, geen jood-afscheiding, bevat dus geen vrij broom meer.

Nu wordt aan de oplossing aether en petroleumaether toegevoegd, tot er juist een neerslag begint te ontstaan. Dit wordt snel afgefiltreerd en het filtraat gedurende 24 uur aan zichzelf overgelaten. Er hebben zich aan den wand en op den bodem van het kolfje, mooie, oktaëdrische kristalletjes afgezet (1.5 gr.). Deze worden voor een deel omgekristalliseerd uit alcohol; daarbij worden weer evenzoo gevormde kristalletjes verkregen van smeltpunt (of liever ontledingspunt)  $\pm 130^\circ$ . Bij analyse blijkt deze stof een veel grooter broomgehalte te bezitten dan voor een monobrooms substitutieproduct van dehydrocholzuur wordt berekend:

Afgewogen hoeveelheid stof: 0.1588 gr., na drogen bij  $100^\circ$ :  
0.1365 gr.

gevonden AgBr: 0.0650 gr.

Dus: 20.2 % Br.

Berekend voor  $C_{24} H_{33} O_5$  Br: 16.6% Br.

De andere helft van de oktaëdrische kristallen werd omgekristalliseerd uit aceton en aether. Ook op deze wijze werden oktaëdertjes van ontledingspunt  $\pm 130^\circ$  verkregen.

Het broomgehalte hiervan is nagenoeg gelijk aan dat van de vorige fractie.

Afgewogen hoeveelheid stof: 0.1390 gr., na drogen bij  $100^\circ$ :  
0.1302 gr.

gevonden AgBr: 0.0595 gr.

Dus: 19.5% Br.

Dit komt dus niet overeen met de resultaten van LANDSTEINER. Om de zaak wat nauwkeuriger te kunnen bestudeeren, werd een grootere portie dehydrocholzuur in bewerking genomen.

Er werd nu 8.7 gr. dehydrocholzuur opgelost in ijsazijn ( $\pm 250 \text{ cm}^3$ ), hieraan toegevoegd 3.48 gr. broom en ruim  $1 \text{ cm}^3$  48% broomwaterstofzuur.

De oplossing is nu in ongeveer 10 min. (in het daglicht) lichtgeel geworden; al het broom is verdwenen. Aan de oplossing



wordt dan aether en petroleumaether toegevoegd, tot er juist een neerslag begint te ontstaan; dit wordt afgefiltreerd en het filtraat 24 uur aan zichzelf overgelaten. Er hebben zich dan 5.8 gr. van het bromeringsproduct in oktaëderachtige kristallen afgezet.

Van deze kristallen werden 4 gr. opgelost in kokend toluol. Na bekoelen scheidt zich, na 24 uur, een deel (2.6 gr.) af, in den vorm van korte, vergroeide staafjes van ontledingspunt  $\pm 120^\circ$ . Deze kristallen werden op nieuw omgekristalliseerd uit kokend toluol; zoo werd verkregen 1.9 gr. van ontledingspunt  $\pm 140^\circ$ . Dit werd nog eens omgekristalliseerd uit aceton + petroleumaether, waarbij 't ontledingspunt nagenoeg niet veranderde.

Ten slotte werd 1.1 gr. verkregen, waarvan verschillende analyses gemaakt werden:

0.1336 gr. gaf:

AgBr 0.0640 gr.

Gevonden dus: 20.4 % Br.

0.1570 gr. gaf:

0.3242 gr. C O<sub>2</sub> en 0.0973 gr. H<sub>2</sub>O.

Dus: 56.3 % C. en 6.9 % H.

0.1600 gr. gaf:

0.3290 gr. C O<sub>2</sub> en 0.0956 gr. H<sub>2</sub>O.

Dus: 56.1 % C. en 6.6 % H.

Deze analyses kloppen in 't geheel niet op de formule: C<sub>24</sub> H<sub>33</sub> O<sub>5</sub> Br, maar zeer goed op de formule: C<sub>18</sub> H<sub>26</sub> O<sub>4</sub> Br, waarvoor berekend wordt:

56.0 % C, 6.7 % H en 20.7 % Br.

Met deze formule is ook goed in overeenstemming te brengen, 't geen bij een ander deel gevonden werd. Dit werd n.l. omgekristalliseerd uit alcohol en op deze wijze verkreeg ik mooi-

gevormde oktaëdrische kristallen van ontledingspunt  $\pm 140^\circ$ .

Hiervan werd het broom-gehalte bepaald:

0.1484 gr. stof gaf:

AgBr 0.0630 gr.

Dus: 18.1 % Br.

0.1930 gr. stof gaf:

AgBr 0.0833 gr.

Waaruit volgt: 18.3 % Br.

Dit uit alcohol omgekristalliseerde product zou dan hetzelfde zijn als het uit toluol verkregen, maar met 1 mol. kristalalcohol.

Dat het werkelijk één zuiver product moest zijn, scheen wel daaruit te volgen, dat toen een groote hoeveelheid ervan gefractionneerd uit alcohol werd omgekristalliseerd en van die fracties het broomgehalte werd bepaald, dit binnen de grenzen van de analysefouten voor allen gelijk bleek te zijn.

Indien er nu werkelijk uit het dehydrocholzuur  $C_{24}H_{34}O_5$  bij bromeren ontstaan was een stof  $C_{18}H_{26}O_4Br$ , dan zou er dus in de moederloog moeten zijn achtergebleven een stof van de formule  $C_6H_{14}O$ , dan wel een derivaat daarvan. Deze moederloog bestond voor 't overige deel uit ijsazijn, een weinig broomwaterstof, wat aether en veel petroleumaether. Bij een temperatuur van  $40^\circ$  werd nu bij gewonen druk de aether en een groot deel van den petroleumaether afgedestilleerd. Daarna werd de rest in vacuo gedestilleerd, tot er nog eenige  $cm^3$  waren overgebleven. Daarbij werd gezorgd, dat de temperatuur van het waterbad, waarin zich de kolf bevond, niet boven  $50^\circ$  kwam.

Bij bekoelen scheidt zich dan uit de zeer donkergekleurde oplossing nog een weinig van het in de typische oktaëderachtige kristalletjes kristalliseerende product af, dat na omkristalliseeren uit alcohol bijna geheel wit wordt; maar verder is er geen lichaam uit te isoleeren.



Van het uit alcohol omgekristalliseerde broomproduct, dat dus misschien de formule  $C_{18} H_{26} Br O_4 \cdot C_2 H_5 OH$  kon hebben, werd nu een deel opgelost in aceton en gekookt met door koper (volgens GLADSTONE en TRIBE) geactiveerd zinkstof. Na ongeveer een uur koken werd de oplossing verdund met veel warm water; er ontstaat dan een geleachtig neerslag, dat bij toevoegen van zoutzuur in oplossing gaat. Bij bekoeien van deze oplossing scheidt zich een brij van naaldjes af, van een smeltpunt  $230^\circ$ ; na omkristalliseeren uit aceton + petroleumaether is 't smeltpunt  $235^\circ$  geworden. Dit komt dus goed overeen met dat van dehydrocholzuur. Om na te gaan, of we werkelijk daarmee te doen hadden, werden ongeveer gelijke hoeveelheden zuiver dehydrocholzuur en gereduceerd broomproduct op een voorwerpglasje met een druppel aceton tot een brij aangerood, waarna ik onder wrijven het aceton liet verdampen. Dan werd van het zóó verkregen innige mengsel het smeltpunt bepaald. Dit bleek weer  $235^\circ$  te zijn. Hiermede is dus wel zeer waarschijnlijk gemaakt, dat het gereduceerde product dehydrocholzuur is.

Nader werd dit nog als volgt aangetoond: 1 gr. broomproduct werd opgelost in aceton en gereduceerd met geactiveerd zinkstof. Na affiltreeren, toevoegen van broomwaterstofzuur en veel kokend water, werd bij bekoelen een neerslag verkregen van 0.7 gr. Dit werd éénmaal omgekristalliseerd uit aceton + petroleumaether. Van het gezuiverde product werden afgewogen 0.410 gr. en deze getitreerd met 0.08585 Norm. loog en phenolphthaleïne als indicator. Ter neutralisatie werden vereischt 11.60 cM<sup>3</sup>. Hieruit volgt dus voor 't mol. gewicht:  $\frac{4100}{116 \times 0.08585} = 412$ . Het

blijkt dus wel, dat er na reductie niet een lichaam  $C_{18} H_{27} O_4$  verkregen is, maar 't uitgangproduct  $C_{24} H_{34} O_5$  (hiervoor berekend mol. gew.: 402). Om nog uit te maken of het geoorloofd is, deze methode van titratie aan te wenden, ter berekening van het moleculair gewicht van dehydrocholzuur, werd een proefje van 0.546 gr. zuiver dehydrocholzuur getitreerd met die



zelfde loog. Er bleken ter neutralisatie noodig te zijn: 15.6 cM<sup>3</sup>; waaruit 't moleculair gewicht 407 volgt.

Daar het toch ongerijmd is aan te nemen, dat een lichaam C<sub>24</sub> H<sub>34</sub> O<sub>5</sub> bij bromeren over zou gaan in een lichaam C<sub>18</sub> H<sub>27</sub> O<sub>4</sub> Br, en dit bij reductie weer in 't oorspronkelijke C<sub>24</sub> H<sub>34</sub> O<sub>5</sub>, werd, om de zaak nader te onderzoeken, een grootere hoeveelheid dehydrocholzuur gezuiverd en in bewerking genomen.

Afgewogen werden 7.1 gr. broom en hierbij gevoegd een oplossing van 17.7 gr. dehydrocholzuur in ruim 200 cM<sup>3</sup> ijsazijn, alsmede nog 1 cM<sup>3</sup> 38 % broomwaterstof-solutie. In 10 minuten is het vrije broom geheel verdwenen. Nu voegde ik 700 à 800 cM<sup>3</sup> aether toe, en liet 't mengsel 24 uur staan. Dan hadden zich op den bodem en aan den wand van het vat kleinere en grootere oktaëderachtige kristallen afgezet (aan den wand tot een grootte van ruim 1 mM. toe), in het geheel ongeveer 15 gr., van ontledingspunt 120°—130°. Van dit product werden 14.7 gr. opgelost in aceton en gefractionneerd neergeslagen met petroleum-aether. Zoo werd verkregen:

11.3 gr. van ontledingspunt	± 160°
1.8 " " "	130°—140°
0.6 " " "	± 130°.

Van die eerste fractie werden 4.4 gr. opgelost in kokend azijnzuur; bij bekoelen kristalliseert 1.5 gr. uit in naaldjes van ontledingspunt ± 180°. Dit product blijkt nu (echter, zooals later zal blijken, toevallig) het berekende broomgehalte te bezitten:

0.2046 gr. stof gaf:

AgBr: 0.0796 gr.

Dus Br-gehalte: 16.55 %.

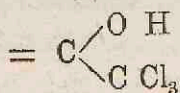
Berekend voor C<sub>24</sub> H<sub>33</sub> O<sub>5</sub> Br: 16.6 % Br.

Behalve azijnzuur werden nog andere oplosmiddelen geprobeerd; zoo bleek het broomdehydrocholzuur uit benzol, toluol of xylol te kristalliseeren in staafvormige kristallen (tot een grootte van eenige mM. toe), die echter aan de lucht direct verweeren, en dan ondoorschijnend, wit worden.



Verder werd een groote hoeveelheid broomdehydrocholzuur opgelost in kokend chloroform en zooveel tetrachloorkoolstof toegevoegd, tot er juist een troebeling begon te ontstaan; ik nam deze weg met een weinig chloroform, en liet nu de oplossing bekoelen. Zoo werden (door herhaling van deze bewerking) een groot aantal fracties verkregen, waarvan de ontledingspunten afwisselden tusschen  $120^{\circ}$  en ruim  $180^{\circ}$ . Bij broombepaling van eenige van deze (allen bij  $100^{\circ}$  op 't waterbad gedroogde) fracties, bleken ze een abnormaal hoog halogeen-gehalte te bezitten (één zelfs schijnbaar  $47.6\%$  broom). Dit is te verklaren, door aan te nemen, dat de stof kristal-chloroform bevat. Om dit te onderzoeken, werd een proefje opgelost in alcohol, en aan deze oplossing een weinig aniline + loog toegevoegd. De duidelijk optredende carbylamine-reuk bewees, dat er in de vloeistof chloroform aanwezig was. Deze kristal-chloroform bleek zeer vast gebonden te zijn. Werden de kristalletjes (glinsterende blaadjes) eenigen tijd op  $90^{\circ}$ – $100^{\circ}$  verhit in 't absolute vacuum van een Gaede-pomp, dan vond er geen noemenwaardige gewichtsvermindering plaats.

Men zou hier kunnen denken aan de vorming van een additieproduct analoog met het acetonchloroform, dus een waarbij de carbonylgroep was overgegaan in de groep:



Men zou dan verwachten, dat er evenzoo met blauwzuur een cyaanhydrine zou ontstaan. Nu lost het broomdehydrocholzuur vrij gemakkelijk op in vloeibaar blauwzuur, zelfs bij  $0^{\circ}$ . Laten we de oplossing echter aan de lucht verdampen, dan ontstaan er oktaëdervormige kristallen, die, na koken met loog en toevoegen van een weinig ferrosulfaat en ferrichloride, bij aanzuren met zoutzuur geen blauw neerslag (of ook maar een blauwe verkleuring) geven, dus geen cyaangroep bevatten.

Een zeer onaangename eigenschap van het broomdehydrocholzuur is, dat 't zoo langzaam uitkristalliseert. Om zeker te



zijn, dat alle overmaat uit een bepaalde oplossing uitgekristalliseerd is, moet men tenminste over nacht laten staan. Hierdoor wordt 't omkristalliseeren natuurlijk zeer tijdroovend. Vooral uit de chloroform-oplossingen gaat het uitkristalliseeren zeer langzaam.

Van het broomdehydrocholzuur kunnen dus verschillende fracties verkregen worden, met een smeltpunt afwisselend tusschen  $110^{\circ}$  à  $120^{\circ}$  en  $\pm 180^{\circ}$ . Het bleek nu, dat de hooger smeltende (of liever ontledende) fracties bestonden uit naaldjes of mengsels van naaldjes en oktaëdertjes, terwijl de lager smeltende meer oktaëdertjes bevatten. Verder bleek, dat alle fracties uit alcohol of uit alcohol-bevattende mengsels, oktaëdertjes met laag ontledingspunt waren, terwijl v.n.l. uit azijnzuur en uit aceton fracties met hoog ontledingspunt en in naaldvormige kristallen verkregen werden.

Om dit eigenaardige gedrag nader te onderzoeken, werden de op 't oog meest zuivere fracties vereenigd, en gezamenlijk nog eens omgekristalliseerd uit ijsazijn. Nu lost het broomdehydrocholzuur bij koken zeer goed op in azijnzuur; bij bekoelen stolt dan de geheele massa tot een dikke brij van microscopische naaldjes. Hieruit is echter de moederloog moeilijk geheel te verwijderen. Daarom werd bij dit omkristalliseeren als volgt te werk gegaan: het broomproduct werd in een ERLIENMEIJER-kolfje opgelost in weinig kokend ijsazijn; bij deze oplossing werd zoolang kokend water gevoegd, tot er juist een geringe troebeling begon te ontstaan. Dan werd het kolfje geplaatst op een flink kokend waterbad; langzamerhand ontstaat er een brij van zijdeachtige naaldjes; nu laat men afkoelen, en filtreert af op een zuigfilter. We kunnen de moederloog nu wegwasschen met koud water (soms was toevoeging van weinig azijnzuur noodig). Na drogen blijken deze kristallen een ontledingspunt van  $\pm 180^{\circ}$  te hebben. Door omkristalliseeren uit azijnzuur of uit aceton of uit aceton + petroleumaether, verandert dit ontledingspunt niet meer.



Kristalliseeren we nu echter deze naaldjes van ontledingspunt  $180^{\circ}$ , uit alcohol om, dan gaan ze over in oktaëdertjes, die, na gedurende 24 uur aan de lucht gedroogd te zijn, zich ontleden bij  $110^{\circ}$ – $120^{\circ}$ . Bij verhitten op een kokend waterbad blijken ze nog een gewichtsvermindering te ondergaan, die nagenoeg overeenkomt met het verlies van 1 mol. kristalalcohol. (Aan de kristalletjes was onder het microscoop geen verweering te bemerken, wel bij andere macroscopische). Het ontledingspunt blijkt nu te liggen bij  $130^{\circ}$ – $140^{\circ}$ .

Bij omkristalliseeren uit azijnzuur gaan deze oktaëdertjes weer over in naaldjes van ontledingspunt  $180^{\circ}$ .

Ook uit aceton of uit aceton + petroleumaether verkrijgen we, 't zij uitgaande van naaldjes, 't zij van oktaëdertjes, altijd naaldjes van ontledingspunt  $180^{\circ}$ . Kristalliseeren we echter om uit aceton + aether (deze aether was door 4 maal wasschen met ongeveer een gelijk volume water van alcohol, daarna, door staan boven chloorcalcium, van water bevrijd), dan ontstaan, zoowel uit naaldjes als uit oktaëdertjes, altijd oktaëdervormig kristallen.

Prof. SCHOORL was zoo vriendelijk deze naaldjes en oktaëdertjes kristallografisch te onderzoeken, waarvoor ik Z. H. G. veel dank verschuldigd ben.

Bij dit onderzoek werd gevonden, dat de kristallen uit azijnzuur en uit aceton weinig verschillend zijn; de eerste zijn beter gevormd dan de laatste. Beide zijn naalden, recht uitdoovend, zwak anisotroop en van gelijk optisch teeken. Dit sluit echter niet uit, dat er nog wel kristallografische verschillen zijn.

De kristallen uit alcohol zijn geheel anders; sterk dubbelsbrekende tetragonale (rhombische?) dubbelpyramiden.

Van deze verschillende soorten van kristallen werden nu elementair-analyses gemaakt, met 't volgend resultaat: <sup>1)</sup>

---

1) De stof werd vooraf gedroogd op het waterbad bij  $100^{\circ}$ . De verbranding geschiedde in een open buis, met loodchromaat; het broom werd bepaald volgens PRINGSHEIM of door ontleden met loog (zie onder).

1<sup>e</sup>. van de naaldjes uit aceton (ontledingspunt  $\pm 180^\circ$ ):

0.2262 gram stof gaf:

0.4984 gr.  $\text{CO}_2$  en 0.1420 gr.  $\text{H}_2\text{O}$ .

Dus: 60.1 % C en 7.0 % H.

0.1555 gr. stof gaf:

0.3410 gr.  $\text{CO}_2$  en 0.0896 gr.  $\text{H}_2\text{O}$ .

Dus: 59.8 % C en 6.4 % H.

0.2001 gr. stof gaf:

AgBr 0.0748 gr.

Dus: 15.9 % Br.

0.2421 gr. stof gaf:

AgBr 0.0890 gr.

Dus: 15.7 % Br.

Berekend voor  $\text{C}_{24} \text{H}_{33} \text{O}_5 \text{Br}$ .

59.8 % C, 6.9 % H en 16.6 % Br.

Voor de koolstof en waterstof klopt het gevonden gehalte dus goed met het berekende; voor het broom daarentegen wordt een te laag gehalte gevonden. Dit zou het gevolg kunnen zijn van de aanwezigheid van kristalaceton; hierdoor verandert het koolstof- en waterstofgehalte bijna niet, maar wordt het broomgehalte natuurlijk lager. Zoo wordt berekend voor:

$\text{C}_{24} \text{H}_{33} \text{O}_5 \text{Br}, \frac{1}{3} \text{C}_3 \text{H}_6 \text{O}$ :

60.0 % C., 7.1 % H en 16.0 % Br;

dit klopt dus heel goed met het gevondene.

Om te zien of deze veronderstelling juist is, werd een grootere hoeveelheid (bijna 1 gram) van de uit aceton verkregen naaldjes in een ERLÉNMEYER-kolfje overgoten met azijnzuur en het kolfje verbonden met een koeler, die uitmondde in een reageerbuisje met  $\pm 1 \text{ cm}^3$  water. Nu werden de naaldjes door verwarmen opgelost in het azijnzuur, en door even te koken,



eventueel aanwezig aceton overgedestilleerd in het water; aan dit destillaat werd nu toegevoegd ammoniak en een oplossing van jodium in joodammonium; er treedt nu zeer duidelijk jodoform-reuk op en na eenigen tijd zijn onder het microscoop de typische stervormige kristalletjes van het jodoform waar te nemen.

Hiermee is dus wel aangetoond, dat er kristal-aceton in de uit aceton omgekristalliseerde naaldjes aanwezig is.

Om dit aceton quantitatief te bepalen, werd 0.3711 gr. naaldjes, omgekristalliseerd uit aceton, afgewogen en in een destilleerkolfje gebracht. Het kolfje is verbonden met een koeler, die (onder water) uitmondt in een stopflesch waarin zich water bevindt. Nu werd uit een scheidrechter zooveel azijnzuur toegevoegd, tot bij verwarmen alles oplost.

Door koken wordt het aceton overgedestilleerd, terwijl uit den scheidrechter azijnzuur toegevoegd wordt, om het volume vloeistof constant te houden. Het destillaat wordt vermengd met een overmaat kaliloog en nu toegevoegd 24.3 cM<sup>3</sup> 0.0906 Norm. joodoplossing. Na tien minuten staan wordt aangezuurd en terug getitreerd met 3.0 cM<sup>3</sup> 0.0906 Norm. natriumthiosulfaat-oplossing. Door een even groote hoeveelheid azijnzuur, als noodig is geweest om het aceton over te stoomen, blijkt 5.0 cM<sup>3</sup> van de 0.0906 norm. joodoplossing gebonden te worden. Er is dus  $24.3 - 3.0 - 5.0 = 16.3$  cM<sup>3</sup> 0.0906 N. joodoplossing noodig geweest om het aceton over te voeren in jodoform. Er is dus 14.3 mgr. aceton overgedestilleerd. Berekend voor  $\frac{1}{3}$  mol. kristal-aceton: 14.3 mgr. Hieruit volgt dus, dat er  $\frac{1}{3}$  mol. kristal-aceton in die naaldjes aanwezig is.

2° van de naaldjes uit azijnzuur (ontledingspunt 180°):

0.2270 gr. stof gaf:

0.4900 gr. CO<sub>2</sub>

Dus: 58.9 % C.

0.1660 gr. stof gaf:

0.3575 gr. CO<sub>2</sub> en 0.1100 gr. H<sub>2</sub> O.

Dus: 58.7 % C en 7.4 % H.

0.1662 gr. stof gaf:

0.0637 gr. Ag Br.

Dus: 16.1 % Br.

0.1577 gr. stof gaf:

0.0584 gr. Ag Br.

Dus: 15.8 % Br.

Deze waarden kloppen in 't geheel niet met de formule  $C_{24} H_{33} O_5 Br$ , maar heel goed met de formule  $C_{24} H_{33} O_5 Br \frac{1}{2} C_2 H_4 O_2$ , dus met  $\frac{1}{2}$  mol. azijnzuur; hiervoor berekend:

58.7 % C, 6.9 % H en 15.7 % Br.

Om te trachten dit azijnzuur te bepalen, werden 0.4728 gr. uit azijnzuur omgekristalliseerde naaldjes in een destilleerkolfje opgelost in xylol en het azijnzuur op de bij het bepalen van het aceton beschreven wijze overgestoomd met xylol. Het destillaat wordt getitreerd met 0.107 Norm. loog en blijkt aequivalent te zijn met 3.8 cM<sup>3</sup>. hiervan. Dit komt overeen met 24.4 mgr. azijnzuur; berekend voor  $\frac{1}{2}$  molecule: 27.8 mgr.

Dit pleit er dus ook voor, om in de naaldjes  $\frac{1}{2}$  mol. azijnzuur aan te nemen.

3° van de oktaëdertjes uit alcohol (ontledingspunt  $\pm 140^\circ$ ):

0.1741 gr. stof gaf:

0.3837 gr. CO<sub>2</sub> en 0.1110 gr. H<sub>2</sub> O.

Dus: 60.1 % C en 7.1 % H.

0.2007 gr. stof gaf:

0.4413 gr. CO<sub>2</sub> en 0.1273 gr. H<sub>2</sub> O.

Dus: 60.0 % C en 7.0 % H.

0.2140 gr. stof gaf:

0.0829 gr. Ag Br.

Dus: 16.5 % Br.

0.2288 gr. stof gaf:

0.0900 gr. Ag Br.

Dus: 16.7 % Br.



Berekend voor  $C_{24} H_{38} O_5 Br$  :

59.8 % C, 6.9 % H en 16.6 % Br.

Hier stemt de analyse dus heel goed overeen met het voor broomdehydrocholzuur, zonder kristalvloeistof, berekende gehalte.

Hiermee is dus de moeilijkheid, die zich in het begin voordeed, het te hooge broomgehalte, opgelost. Het is n.l. gebleken, dat de stof door omkristalliseeren uit alcohol niet zuiver is te krijgen (verontreinigd door dibroomproduct?); door omkristallisatie uit azijnzuur (of uit aceton) hebben we nu het zuivere mono-broomdehydrocholzuur verkregen. Wel is 't zeer eigenaardig, dat de kristalvloeistof (aceton of azijnzuur) bevattende naaldjes een hooger smeltpunt hebben dan de kristalvloeistofvrije oktaëdertjes; maar dit feit staat niet alleen; ook van het narceïne en van het nornarceïne is iets dergelijks bekend, waar het kristalwaterhoudende lichaam veel hooger smelt dan het kristalwaterervrije.

Als nu de naaldjes kristalaceton of -azijnzuur bevatten, en de oktaëdertjes niet, dan moet er bij overgang van naaldjes in oktaëdertjes een gewichtsvermindering plaats vinden en, omgekeerd, bij overgang van oktaëdertjes in naaldjes, een gewichtsvermeerdering; om dit aan te toonen, werd als volgt te werk gegaan:

In een ERLLENMEYER-kolfje werden afgewogen 18.8741 – 18.3816 = 0.4925 gram uit aceton omgekristalliseerde naaldjes; deze werden opgelost in ruim 10 cM<sup>3</sup> warmen alcohol; het kolfje werd nu gesloten met een ingeslepen stop, waardoor 2 buisjes gingen: één, eenige cM. onder de stop eindigend, dat met een koolzuurtoestel in verbinding stond, en één voor den afvoer van het koolzuur + den alcohol damp. Het kolfje plaatste ik in een groot bekeerglas met water van ongeveer 70° en leidde er een koolzuurstroom door; na eenigen tijd (ruim een uur) is alle alcohol verdampt en het broomdehydrocholzuur overgegaan in oktaëdertjes; nu wordt nog eenigen tijd op een kokend



waterbad verwarmd, onder doorvoeren van koolzuur, om alle vochtigheid weg te nemen, en daarna (na verdringen van het koolzuur door lucht), het kolfje weer gewogen. Het weegt nu 18.8545 gr.; is dus  $18.8741 - 18.8545 = 0.0196$  gr. in gewicht afgenomen. Voor  $\frac{1}{2}$  mol. aceton wordt berekend: 0.0285 gr.; voor  $\frac{1}{3}$  mol. aceton: 0.0190 gr.

De contra-proef werd nu genomen door  $18.8400 - 18.8810 = 0.4590$  gr. oktaëdertjes op te lossen in aceton, en deze oplossing op de boven omschreven wijze in een koolzuurstroom in te dampen. Het gewicht blijkt dan geworden te zijn: 18.8602 gr. Er heeft dus een gewichtsvermeerdering plaats gehad van  $18.8602 - 18.8400 = 0.0202$  gr. Voor een  $\frac{1}{3}$  mol. aceton wordt berekend 0.0185 gr.

Dit pleit er dus wel voor, om in de uit aceton verkregen naaldjes  $\frac{1}{3}$  mol. kristal-vloeistof aan te nemen (met behulp van de elementairanalyse is niet uit te maken, of we met  $\frac{1}{2}$  mol. of  $\frac{1}{3}$  mol. aceton te doen hebben; het verschil ertusschen ligt binnen de grenzen van de analysefouten).

Van het uit azijnzuur omgekristalliseerde product werden 0.5609 gr. in het boven beschreven kolfje opgelost in alcohol, en deze oplossing in koolzuurstroom bij  $70^\circ$  ingedampt en daarna op het waterbad gedroogd. Het gewicht is dan afgenomen met 0.0252 gr. Berekend voor  $\frac{1}{2}$  mol. azijnzuur: 0.033 gr.

Van de bij  $180^\circ$  zich ontleden de naaldjes, uit aceton, werd het moleculair gewicht bepaald volgens de methode van BARGER<sup>1)</sup>. Hierbij wordt een oplossing van bekende sterkte van de te onderzoeken stof vergeleken, wat zijn dampdruk betreft, met oplossingen van bekend gehalte van een stof met bekend moleculair gewicht. Daartoe brengt men in een capillair-buisje (een aan beide zijden open smeltpuntsbuisje) beurtelings een zuiltje van de oplossing der te onderzoeken stof en van de oplossing der stof met bekend mol. gewicht: dan wordt het buisje aan beide einden toegesmolten. Het buisje wordt met behulp van canadabalsem aan een object-

<sup>1)</sup> Ber. 37, 1754, [1904].



glaasje vastgekleefd en in een Petri-schaal met water gelegd (om te zorgen voor gelijkmatige temperatuur en gemakkelijke aflezing; door den opwaartschen druk van het water liet de canadabalsem vaak los, zoodat we later in de plaats daarvan zegellak gebruikt hebben). Met behulp van een oculair-micrometer wordt nu de lengte van de zuiltjes gemeten. Indien de oplossingen isotonisch zijn, dan zal de lengte van alle zuiltjes constant blijven; in het tegenovergestelde geval zal uit de meer verdunde oplossing, oplosmiddel overdestilleeren naar de meer geconcentreerde, totdat ze isotonisch zijn geworden.

Bij onderzoek bleek aan BARGER, dat met deze methode een nauwkeurigheid van 5 à 10 % bereikt wordt. Ze heeft het voordeel, dat we slechts zeer geringe hoeveelheden materiaal nodig hebben en dat we de oplosmiddelen niet bijzonder behoeven te zuiveren, indien we natuurlijk slechts zorgen, dat voor alle oplossingen hetzelfde oplosmiddel gebruikt wordt (zelfs kunnen mengsels van oplosmiddelen, bijv. 90 % alcohol gebruikt worden).

Om nu volgens deze methode het mol.gew. van het uit aceton verkregen monobroomdehydrocholzuur van ontledingspunt  $180^{\circ}$  te bepalen, werd een oplossing van 0.0480 gr. (0.1 milli-mol., berekend voor 't enkelvoudige molecuul) vergeleken, wat haar dampdruk betreft, met een oplossing van 0.0138 gr. (0.1 milli-mol.) salicylzuur en met een oplossing van 0.0069 gr. (0.05 milli-mol.) salicylzuur elk in 2 gr. aceton. Indien nu de oplossing van het broomproduct een dubbelmolecuul bevatte, dan zou ze isotonisch zijn met de laatste salicylzuur-oplossing, in geval van een enkelvoudig molecuul, met de eerste. Bij proefneming bleek de broomdehydrocholzuur-oplossing isotonisch te zijn met de oplossing van 0.1 milli-mol., waaruit dus volgt, dat er in de oplossing een enkelvoudig molecuul aanwezig is.

Het nog niet geheel zuivere broomdehydrocholzuur lost gemakkelijk op in aceton, ook in de kou. Het zuivere product is echter in de gewone oplosmiddelen (aceton, alcohol, azijnzuur,



benzol en homologen, chloroform, aether, petroleumaether) in de kou slechts weinig oplosbaar; nog het beste in aceton. Op de gewone wijze werd nu de oplosbaarheid in aceton bepaald. Het zuivere product werd geruimen tijd (2—24 uur) in een thermostaat bij 20° geschud met zoo weinig aceton, dat niet alles is opgelost. 't Zij we van naaldjes of van oktaëdertjes uitgaan, na eenigen tijd is het „Bodenkörper” in naaldjes overgegaan. Na het schudden wordt een deel van de oplossing (gefiltreerd door een vóór de pipet aangebracht watje) afgepipeteerd, snel in een weegfleschje gebracht, gewogen, het aceton weggedampt, en weer gewogen.

Zoo werd gevonden:

Na eenige uren schudden:

afgepipeteerd  $14.3753 - 12.9833 = 1.3920$  gr. oplossing.

na indampen:  $13.063 - 12.9833 = 0.0530$  gr. residu.

In  $1.3920 - 0.0530 = 1.3390$  gr. aceton is dus opgelost  $0.0530$  gr. broomdehydrocholzuur +  $\frac{1}{3}$  mol. aceton. De oplosbaarheid bedraagt dus  $3.9\%$ .

Na 24 uur schudden:

afgepipeteerd  $29.1550 - 26.2416 = 2.9134$  gr. oplossing.

na indampen:  $26.3454 - 26.2416 = 0.1038$  gr. residu.

In  $2.9134 - 0.1038 = 2.8096$  gr. aceton is dus opgelost  $0.1038$  gr. broomdehydrocholzuur +  $\frac{1}{3}$  mol. aceton; waaruit volgt voor de oplosbaarheid:  $3.7\%$ .

Het blijkt dus, dat zich hier, bij de zuivere stof, na eenige uren het evenwicht ingesteld heeft.

Hier mogen vermeld worden verschillende eigenaardigheden, die we vonden bij het bromeeren van dehydrocholzuur.

Het bleek dat deze reactie zeer versneld wordt door de aanwezigheid van zoutzuur of broomwaterstofzuur, wat ook heel goed overeenkomt met het verloop van de inwerking zonder toevoeging van broomwaterstof: de reactie gaat dan eerst heel langzaam, later (als zich broomwaterstof gevormd heeft) veel sneller. De sterke invloed van de broomwaterstof blijkt wel uit deze proef: 4 gr. dehydrocholzuur wordt opgelost



in ijszijn en een aequivalente hoeveelheid broom toegevoegd, verder een oplossing van ruim 1.5 gr. natriumacetaat in ijszijn, waardoor eventueel gevormde broomwaterstof gebonden wordt. De oplossing, die zich in een stopflesch bevindt, wordt gedurende eenige dagen aan het zonlicht blootgesteld. Er heeft geen merkbare inwerking plaats gegrepen.

Dat de bromering een substitutie-, geen additieproces is, werd bij den aethylester (waarbij de bromering onder vorming van weinig bijproducten verloopt) quantitatief aangetoond:

1.1180 gr. aethylester van dehydrocholzuur werden in een maatkolpje van 100 cM<sup>3</sup>. opgelost in  $\pm 10$  cM<sup>3</sup> ijszijn + 1 druppel zwavelzuur (in plaats van broomwaterstof, om de reactie te versnellen). In een toegesmolten glazen buisje werd 0.4140 gr. broom afgewogen, dit in het maatkolpje gebracht en na sluiten met de glazen stop, door schudden verbrijzeld. Na  $\pm 10$  minuten is het mengsel ontkleurd.

Nu voegen we water toe, tot juist 100 cM<sup>3</sup>.; na goed omschudden wordt gefiltreerd en van het filtraat 25 cM<sup>3</sup>. afgepipeteerd. Bij deze 25 cM<sup>3</sup>. wordt nog wat water, een weinig salpeterzuur en overmaat zilvernitraat gevoegd. Er ontstaat een dik, vlokkig neerslag van broomzilver. Dit weegt 0.1224 gr., wat overeenkomt met 0.052 gr. broom. In de geheele hoeveelheid vloeistof dus  $4 \times 0,052 = 0.208$  gr. broom. Er is 0.414 gr. broom toegevoegd. Juist de helft is dus in broomwaterstof overgegaan; het broom heeft derhalve zuiver substitueerend gewerkt.

Ook bleek het licht van grooten invloed op de reactiesnelheid te zijn. Bij het licht van elektrische metaaldraadlampjes heeft de reactie, ook in tegenwoordigheid van een overmaat broomwaterstof, slechts zeer langzaam plaats; kan echter door verwarmen bespoedigd worden. Ook het licht van een elektrische booglamp of van een Uviollamp versnelt de reactie, zoodat die, evenals in het diffuse daglicht, in 10 à 20 minuten verloopt.

Werken we 's zomers in het directe zonlicht, dan verloopt de reactie nagenoeg momenteel.



Ten slotte werd de volgende bereidingswijze gebruikt: een afgewogen hoeveelheid dehydrocholzuur wordt opgelost in weinig azijnzuur; aan deze oplossing een weinig 48 % broomwaterstofzuur toegevoegd. Nu laten we, in het directe zonlicht, uit een in 0.01 cM<sup>2</sup> verdeelde pipet, een berekende hoeveelheid broom onder schudden toevloeien; direct daarop wordt de vloeistof met vele malen haar volume water verdund. Er ontstaat dan een dik, wit neerslag, dat wordt afgefiltreerd, en eenige malen uit aceton of azijnzuur omgekristalliseerd. Het filtraat geeft bij uur 24 staan nog een gering neerslag van fijne naaldjes, direct van smeltpunt 180°.

Om nu dit eindelijk geheel zuiver verkregen broomdehydrocholzuur nader te onderzoeken, lag 't voor de hand, om het broom-atoom te vervangen door verschillende andere elementen of groepen. Eerst werd getracht de O II-groep in te voeren. Het bleek echter, dat de stof zeer onbestendig is tegen loog en tegen alcalisch reageerende stoffen in het algemeen. De oplossing wordt dan onmiddellijk geel gekleurd, na langeren tijd inwerking donkerder, tot donkerbruin toe. Natriumcarbonaat-oplossing, ammonia, pyridine, aethylamine, hebben op den duur geheel dezelfde werking als natriumhydroxyde-oplossingen.

Nu bestond de mogelijkheid, dat uit die gele oplossing een bepaald, gedefinieerd lichaam zou te isoleeren zijn, dat misschien zou kunnen bijdragen om de structuur van het cholzuur op te helderen. Daarom werd de volgende proef genomen:

Broomdehydrocholzuur werd overgoten met een weinig alcohol en hieraan toegevoegd een overmaat alcoholische natronloog. Na eenigen tijd is alles in oplossing gegaan. De geelbruine vloeistof wordt nu met water verdund en zuur gemaakt; er ontstaat hierdoor een lichte troebeling. De vloeistof wordt dan eenige malen uitgeschud met aether, waarin de bruingele stof overgaat. De vereenigde aetherische oplossingen worden gedroogd met watervrij natriumsulfaat; daarna wordt gefiltreerd, en aan de aetherische oplossing petroleumaether toegevoegd.



Er slaat dan een bruingele olie neer, die uiterst goed oplosbaar is in alcohol; zij wordt nu met behulp van wat alcohol overgebracht in een destilleerkolfje; eerst wordt op het waterbad de alcohol weggedampt, en daarna getracht de achterblijvende vloeistof in vacuo ( $\pm 3$  c.M.) te destilleeren. Bij matig verhitten zwelt de massa echter sterk op en wordt tenslotte bruinzwart, maar er gaat niets over. Ook werd nog geprobeerd uit de olie met salpeterzuur of met andere oxydatiemiddelen een kristalliseerbaar product te isoleeren, echter zonder resultaat.

De vraag bleef nu nog te beantwoorden over, hoe de loog op het broomdehydrocholzuur inwerkt: wordt het halogeen afgesplitst (quantitatief) of niet?

Bij onderzoek bleek, dat het broom volkomen quantitief uit 't molecuul verwijderd werd, zóó dat ik meermalen van de broombepalingen de duplo-analyse gemaakt heb, door het lichaam met loog te ontleden (vgl. blz. 45). Een enkele keer (loog niet lang genoeg ingewerkt?) werd bij de bepaling met loog een veel te laag (wel tot 1 % toe) gehalte gevonden.

Om te zien, of mogelijkerwijze de ester bestendiger zou zijn tegen de inwerking van loog, werd de aethylester van het broomdehydrocholzuur gemaakt. Dit werd gedaan op twee verschillende wijzen: 1<sup>e</sup> door den aethylester van dehydrocholzuur te bromeeren en 2<sup>e</sup> door broomdehydrocholzuur te esterificeren.

1<sup>o</sup>. Bromeeren van den ester:

7 gr. dehydrocholzuur werd eenige uren aan een opstijgenden koeler gekookt met  $\pm 50$  c.M.<sup>3</sup> absoluten alcohol en eenige druppels geconcentreerd zwavelzuur. Na eenige uren koken heeft er in de heldere vloeistof een kristalafscheiding plaats; de geheele inhoud van het kolfje wordt nu uitgegoten in ongeveer 1 L. kokende, zeer verdunde sodaoplossing. Er scheidt zich dan een neerslag van fijne naaldjes af; na bekoelen laten we 24 uur staan. Het neerslag wordt nu afgefiltreerd en uit-



gewasschen met water. Na drogen weegt het residu  $\pm 7$  gr. en heeft een smeltpunt van  $220^{\circ}$ . (Uit de sodaoplossing scheidt zich na aanzuren nog een zeer gering neerslag af; een bewijs dus, dat nog niet alle dehydrocholzuur veresterd was).

Om dezen aethylester te bromceeren, wordt 7.05 gr. ervan afgewogen, opgelost in  $\pm 100$  cM.<sup>3</sup> ijsazijn + eenige druppels 48 % broomwaterstofzuur, en nu 2.624 gr. broom toegevoegd. Zoodra het vrije broom verdwenen is, wordt de vloeistof uitgegoten in  $\pm 1$  L. water. Het dikke, witte neerslag, dat zich hierbij vormt, wordt afgefiltreerd, uitgewasschen met water, en daarna uitgekookt met  $\pm 100$  cM.<sup>3</sup> alcohol van 96 %.

Hierbij lost niet alles op, maar het achterblijvende wordt kristallijn. Na bekoelen laten we over nacht staan en filtreren dan de witte, oktaëderachtige, kristalletjes af van de geelgekleurde moederloog. Zoo werd er verkregen 5.8 gr. aethylester van broomdehydrocholzuur van smeltpunt  $\pm 180^{\circ}$ .

#### 2°. Esterificeeren van broomdehydrocholzuur:

2 gr. broomdehydrocholzuur wordt eenige uren gekookt met 100 cM.<sup>3</sup> absoluten alcohol en 1 à 2 cM.<sup>3</sup> geconcentreerd zoutzuur. De oplossing wordt eenigszins geel gekleurd.

Bij bekoelen scheidt zich 1.3 gr. ester af; van smeltpunt  $\pm 170^{\circ}$ . Dat werkelijk alles of bijna alles geësterificeerd is, blijkt daaruit, dat een weinig van het product opgelost in aceton, bij uitgieten in verdunde sodaoplossing, een wit neerslag geeft. Wordt dit afgecentrifugeerd, dan geeft de oplossing bij aanzuren met zoutzuur geen neerslag meer.

Door het kristallijne product nog eens om te kristalliseeren uit aceton, onder toevoegen van beenderkool, wordt het smeltpunt  $\pm 180^{\circ}$ .

Zoowel de volgens de eerste als de volgens de tweede methode verkregen ester kristalliseert uit alcohol in oktaëderachtige kristallen. Door herhaaldelijk omkristalliseeren uit azijnzuur, kon een mengsel van naaldjes en oktaëdertjes verkregen worden; 't is me echter niet mogen gelukken een product van enkel naaldjes te krijgen. Het ontledingspunt van



het mengsel van naaldjes en oktaëdertjes ligt bij  $\pm 190^\circ$ . Het smeltpunt van den ester is dus hooger dan van het zuur zelf; bij het niet gebromeerde dehydrocholzuur is dit juist andersom.

Een innig mengsel van de uit alcohol verkregen oktaëdertjes van de eerste bereidingswijze (ontledingspunt  $180^\circ$ ) met de uit alcohol verkregen oktaëdertjes van de tweede bereiding (ontledingspunt  $180^\circ$ ) begint zich weer bij  $180^\circ$  te ontleden, wat er voor pleit, dat we hier met dezelfde stof te doen hebben.

Van het uit alcohol omgekristalliseerde product werden broombepalingen verricht, met het volgend resultaat:

1<sup>e</sup> van het door bromeeren van den aethylester van dehydrocholzuur verkregen product:

0.203<sup>o</sup> gr. stof gaf:

0.0764 gr. Ag Br.

Dus gevonden: 16.0 % Br.

2<sup>e</sup> van het door esterificeeren van broomdehydrocholzuur verkregen product:

0.2323 gr. stof gaf:

0.0850 gr. Ag Br.

Dus gevonden: 15.6 % Br.

Berekend voor  $C_{26}H_{37}O_5$  Br: 15.7 % Br.

Bij behandelen van een oplossing van dezen, op de boven beschreven wijzen verkregen, ester, met verdunde loog, kleurt de oplossing zich direct geel; een teeken dus, dat tegelijk met de verzeeping, de verharsing plaats grijpt. Gieten we een oplossing van den ester in alcohol uit in verdunde soda-oplossing, dan ontstaat eerst een wit neerslag; bij verwarmen echter weer de geelgekleurde oplossing.

Indien nu het broom-atoom in het dehydrocholzuur is ingetreden in een  $CH_2$ -groep, die aan een aldehyde-groep verbonden is, dan zou er dus, na vervanging van dat halogeen door

OH, een lichaam ontstaan zijn, dat de voor suikers karakter-

ristieke groep  $\begin{array}{c} | \\ \text{C} = \text{O} \\ | \\ \text{C} - \text{OH} \\ || \end{array}$  heeft.

Lossen we nu een weinig broomdehydrocholzuur op in loog, en maken de oplossing daarna neutraal, dan blijkt deze nog zuiver bitter te smaken. Dat er echter door behandelen van broomdehydrocholzuur met loog een lichaam is ontstaan met

de groep  $\begin{array}{c} | \\ \text{C} = \text{O} \\ | \\ \text{CHOH} \\ | \end{array}$  wordt wel waarschijnlijk door het feit, dat

de zóó verkregen oplossing bij koken oogenblikkelijk FEHLING'S proefvocht en een ammoniakale zilver-oplossing reduceert; terwijl die reagentiën op dehydrocholzuur zelf van geen invloed zijn.

Om te trachten het lichaam te isoleeren, dat ontstaat bij de oxydatie met zilveroxyde, werd eenig broomdehydrocholzuur opgelost in ammonia en eenigen tijd gekookt met een overmaat ammoniakale zilveroplossing; daarna werd afgecentrifugeerd van het neergeslagen zilver en de bruine oplossing aangezuurd met salpeterzuur; er ontstaat dan een bruin, colloïdaal neerslag (zeer veel gelijkend op het neerslag van ferrihydroxyde, dat bij toevoegen van loog aan ferrizoutoplossing te voorschijn komt). Dit neerslag lost op in aceton; maar bij verdampen van het aceton wordt het niet kristallijn, ook niet bij toevoegen van aether + petroleumaether aan de oplossing in aceton, en evenmin bij oplossen in alcohol; hierbij worden wel mooie, lange, naaldvormige kristallen verkregen; deze blijken echter gemakkelijk te sublimeeren, en geven dan de nitron-reactie op salpeterzuur en de reactie met platinachloride op ammonium, zijn dus kristallen van ammoniumnitraat.

Indien het met loog behandelde broomdehydrocholzuur de

groep  $\begin{array}{c} | \\ \text{CHOH} \\ | \\ \text{C} = \text{O} \\ | \end{array}$  bevat, dan zou de mogelijkheid bestaan, dat



met phenylhydrazine een osazon werd gevormd. Op verschillende wijzen werd nu getracht het broomdehydrocholzuur (of het eventueel daaruit ontstane oxydehydrocholzuur) te condenseeren met phenylhydrazine:

1°. Broomdehydrocholzuur wordt opgelost in verdunde loog, en deze oplossing vermengd met een overmaat van zoutzuur-phenylhydrazine; het hierbij ontstane neerslag wordt door een even toereikende hoeveelheid loog weer weggenomen. Het mengsel wordt nu eenige uren op het waterbad verwarmd. In dien tijd slaat er langzamerhand een zwarte, harsachtige massa neer, waaruit geen kristallijn product te krijgen is.

2°. Een weinig broomdehydrocholzuur wordt opgelost in alcohol en hierbij gevoegd een oplossing van zoutzuur-phenylhydrazine + natriumacetaat in zeer weinig water. Na eenigen tijd verwarmen op het waterbad, ontstaat er een bruinzwart, amorf neerslag; dit lost zeer gemakkelijk op in pyridine en kan hieruit door alcohol worden neergeslagen; 't is echter niet mogen gelukken het product in kristallijnen toestand te verkrijgen.

3°. Een weinig van het gebromeerde dehydrocholzuur wordt opgelost in azijnzuur, en deze oplossing vermengd met een overmaat van een azijnzure oplossing van versch in vacuo gedestilleerd phenylhydrazine. Er ontstaat dan een zwart, amorf neerslag, waarmee niets is aan te vangen.

4°. Een weinig broomdehydrocholzuur wordt verwarmd met zuiver phenylhydrazine; ook hierbij ontstaat een zwarte, amorfte verbinding.

Langs al deze wegen was dus geen kristallijn reactieproduct van broomdehydrocholzuur met phenylhydrazine te verkrijgen.

Om te trachten een tegen de inwerking van alkaliën bestendiger lichaam te verkrijgen, werd beproefd het broomdehydrocholzuur te condenseeren met de aldehyde-reagentiën semicarbazide en hydroxylamine. Hierbij werd zóó te werk gegaan, dat het in methylalcohol opgeloste broomdehydrocholzuur werd



vermengd met een methylalcoholische oplossing van zoutzuur semicarbazide en een andere portie met een oplossing van semicarbazide zelf (verkregen door bij de oplossing van het zoutzure zout in methylalcohol, een aequivalente hoeveelheid natriummethylaat-oplossing te voegen, en daarna af te filtreeren van het gevormde chloornatrium); en evenzoo met een oplossing van zoutzuur-hydroxylamine of van neutraal hydroxylamine (op dezelfde wijze verkregen).

Bij verwarmen van al deze mengsels werd de massa geel tot roodbruin toe; er kon echter geen kristallijn product geïsoleerd worden.

Er bestaat nu natuurlijk ook nog een andere weg, waarlangs we misschien tot het oxim of semicarbazon van het broomdehydrocholzuur kunnen komen, en wel het bromereen van het oxim of semicarbazon van dehydrocholzuur zelf. Wel bestaat het gevaar, dat het broom op de  $\text{NOH}$  resp. op de  $\text{NH}_2$  groep inwerkt (wat ook inderdaad bij een bepaalde modificatie van de proef gevonden werd; zie onder); maar, waar er in het dehydrocholzuur zich een waterstofatoom bevindt, dat zeer gemakkelijk door broom vervangen wordt, was de mogelijkheid toch niet buitengesloten, op deze wijze tot het gewenschte lichaam te komen.

Het oxim van dehydrocholzuur is reeds bekend en door MYLIUS <sup>1)</sup> geïdentificeerd als trioxim. Op bijna gelijke manier als reeds door MYLIUS gedaan was (alleen werd niet een even voldoende hoeveelheid, maar een groote overmaat loog genomen) werd nu het trioxim van dehydrocholzuur bereid; kristalliseerend in de typische kleurloze staafjes van ontledingpunt boven  $270^\circ$ .

Dit trioxim werd nu opgelost in azijnzuur + een weinig broomwaterstofzuur en daarna 1 mol. broom toegevoegd. In het zonlicht is 't vrije broom spoedig verdwenen; de vloeistof wordt nu met water verdund; er ontstaat een volumineus

<sup>1)</sup> Ber. 19. 2000 [1886].



wit neerslag. Tot zoover is dit proces dus geheel analoog aan het bromeren van dehydrocholzuur. In tegenstelling echter met het in dit laatste geval verkregen neerslag, dat bij omkristalliseeren uit alcohol direct kristallijn wordt, is dit uit het oxim verkregen neerslag nòch uit alcohol, nòch uit aceton of azijnzuur, kristallijn te krijgen.

Een andere portie van het trioxim werd opgelost in loog en, om een fijne suspensie te verkrijgen, voorzichtig uitgegoten in verdund broomwaterstofzuur. Bij de zoo ontstane suspensie wordt broom gevoegd. Na eenigen tijd wordt het mengsel ontkleurd met natriumbisulfiet en uitgetrokken met aether. Na drogen van de intensief blauwgekleurde aetherische oplossing, ontstaat met petroleumaether een week amorf neerslag van het blauwe broom-nitroso-lichaam.

De inwerking van semicarbazide op dehydrocholzuur heb ik in de litteratuur niet kunnen vinden. Om deze reactie te onderzoeken, werden 7 gr. dehydrocholzuur opgelost in ijsazijn, en hierbij gevoegd een oplossing van 10 gr. zoutzuur-semicarbazide + 10 gr. natriumacetaat in weinig water.

Wordt nu de op die wijze verkregen heldere oplossing eenigen tijd verwarmd, dan stolt de geheele massa tot een dikke gelei (evenals een kiezelzuur-gel.). Wordt deze gel opgelost in verdunde soda-oplossing, dan ontstaat bij aanzuren van de oplossing, weer een gel. Bij verwarmen op het waterbad van de gel met zeer verdund zoutzuur ontstaan wel naaldjes, maar dit blijken naaldjes van dehydrocholzuur te zijn. Bij indampen van de gelei in het absolute vacuum boven zwavelzuur en ongebluschte kalk, ontstaat een harde, donkergekleurde massa, die zeer moeilijk oplosbaar is in de gewone oplosmiddelen, maar door lang koken met sterk azijnzuur in oplossing gaat. Bij afkoelen van deze oplossing ontstaat weer de gel.

De ingedroogde gel wordt nu gepoederd en uitgekookt met water, om de overmaat semicarbazide en natriumacetaat eruit te trekken, daarna op een poreuze plaat gedroogd. Een



afgewogen hoeveelheid hiervan wordt opgelost in veel ijsazijn + eenige druppels 48% broomwaterstofzuur en daarna de berekende hoeveelheid broom toegevoegd. In het zonlicht heeft snel ontkleuring plaats. Het mengsel wordt nu uitgegoten in water, en het hierbij ontstane neerslag van misschien het semicarbazide van broomdehydrocholzuur, opgelost in kokenden alcohol. Bij bekoelen van deze oplossing scheidt zich echter weer een geleachtige massa af.

Ook op deze wijze is dus het oxim of het semicarbazide van het broomdehydrocholzuur niet in zuiveren toestand te verkrijgen.

Waar nu door middel van loog wel gemakkelijk het broom-atoom uit broomdehydrocholzuur verwijderd kan worden, maar dan tevens door die loog verharsing optreedt, daar bleef nog de mogelijkheid over, dat minder sterk basische lichamen, misschien nog wel het broom-atoom zouden kunnen wegnemen, zonder dat verharsing zou optreden.

In de eerste plaats werd hiertoe nagegaan de inwerking van loodhydroxyde.

Broomdehydrocholzuur werd gesuspendeerd in water en hierbij een suspensie van versch geprecipiteerd en goed uitgewasschen loodhydroxyde gevoegd. Onder schudden werd nu eenige uren gekookt. Dit schudden werd eenvoudig bewerkstelligd door het ERLMMEYER-kolfje, waarin zich het mengsel bevond, met behulp van een goed sluitende kurk en een koperdraadje vast te binden aan een langen koeler. Deze werd van boven in een dunne statiofkleem geklemd en het kolfje door middel van een, door een electromotor bewogen excentriek, heen en weer geschud.

Onder het koken werd het neerslag al langzamerhand bruin-geel gekeurd. Dit wijst dus al op verharsing. Na eenige uren wordt het geheele mengsel afgecentrifugeerd. De bovenstaande heldere vloeistof wordt afgeschonken en met aether uitgeschud. (na aangezuurd te zijn met azijnzuur). In den aether gaat echter niets over.

Het in de centrifugebuis achtergebleven neerslag wordt op-



gekookt met ijsazijn. Het loodhydroxyde gaat dan natuurlijk als loodacetaat in oplossing en het dehydrocholzuur-derivaat blijkt ook op te lossen. De oplossing wordt nu met zooveel water verdund, tot het ontstane neerslag bij opkoken juist nog verdwijnt, en dan afgekoeld; er ontstaat een geelgroen, amorf neerslag, dat niet kristallijn is te krijgen.

In plaats van met loodhydroxyde, werd een andere portie broomdehydrocholzuur in water gesuspendeerd en gekookt met bariumcarbonaat (verkregen door in een baryt-oplossing zoolang koolzuur te leiden, tot er met phenolphthaleïne geen roodkleuring meer ontstaat). Het resultaat is echter hetzelfde: het neerslag wordt langzamerhand donkergeel en, na oplossen in azijnzuur en verdunnen met water, verkrijgen we een amorf, geelgekleurd neerslag.

Een andere hoeveelheid broomdehydrocholzuur wordt opgelost in alcohol en 24 uur geschud en gekookt met versch geprecipiteerd kwikoxyde. (Dit was eerst eenige malen met water, daarna met alcohol uitgewasschen). Het residu wordt dan door centrifugeeren van de oplossing gescheiden; deze oplossing bevat geen broomdehydrocholzuur meer, want bij indampen ontstaan niet de typische oktaëdertjes, maar er blijft bijna geen rest.

Het residu wordt nu uitgekookt met azijnzuur. Hierbij gaat niet alles in oplossing; door centrifugeeren wordt het mengsel gescheiden in een roodbruine oplossing en een wit neerslag. Van dit witte neerslag wordt een gedeelte na drogen in een klein platinakroesje samengesmolten met soda en potasch. Op een erboven gehouden voorwerp-glaasje ontstaat een beslag van kwikdruppeltjes. De smelt, uitgetrokken met water, geeft, na aanzuren met salpeterzuur, een neerslag met zilvernitraat. Het witte neerslag is dus mercuri- of mercurio-bromide; daar het neerslag niet in water oplosbaar is, ook niet bij koken, blijkt het mercurio-bromide te zijn; dit wordt hierdoor bevestigd, dat het, met ammoniak bevochtigd, zwart wordt.



Uit de bruine vloeistof scheiden zich bij bekoelen mooie, zeskantige blaadjes af; dit blijken echter kristalletjes van mercuriacetaat te zijn.

Na afcentrifugeeren van dit mercuriacetaat wordt de bruine vloeistof verdund met veel water. Er ontstaat een volumineus, lichtgeel, vlokkig neerslag. Het is oplosbaar in loog, en slaat bij aanzuren weer neer, maar is dan donkerder gekleurd. Het neerslag geeft nog zwak de reactie met de koperoxyde-parel; maar, bij oplossen in loog, aanzuren met salpeterzuur, affiltreren van het neerslag, blijkt het filtraat met zilvernitraat nagenoeg geen neerslag meer te geven.

Met FEHLING's proefvocht ontstaat een groenachtige vloeistof, maar geen duidelijke reductie.

Bij oplossen in aceton blijft er een rest achter, die uit kwikbromuur blijkt te bestaan. Bij neerslaan van deze oplossing in aceton, ontstaat er een melkachtige troebeling, die niet gecentrifugeerd kan worden. De vloeistof wordt daarom uitgeschud met aether; bij verdampen van den aether blijft er een gele, amorphe rest, die niet kristallijn is te krijgen.

Reeds boven hebben we gezien, dat er bij inwerking van ammoniakale zilveroplossing niet een goed gedefinieerd lichaam is te isoleeren. De mogelijkheid bestaat nu nog, dat het ammoniak storend werkt, terwijl het zilveroxyde alleen misschien een meer behoorlijk product zou opleveren.

Daarom werd 1 gr. broomdehydrocholzuur opgelost in aceton, en hierbij versch gepraecipiteerd zilveroxyde gevoegd. (Dit was verkregen door 4 gr. zilvernitraat op te lossen in water, te bedeelelen met een niet geheel toereikende hoeveelheid loog en het neergeslagen zilveroxyde op de centrifuge uit te wasschen, eerst eenige malen met gedestilleerd water, daarna met aceton). Dit mengsel van zilveroxyde en broomdehydrocholzuur-oplossing wordt nu 24 uur te schudden gezet bij kamertemperatuur; daarna afgecentrifugeerd. Uit de aceton-oplossing blijkt het broomdehydrocholzuur verdwenen te zijn, want bij verdunnen



met water ontstaat geen neerslag. Door toevoegen van zoutzuur ontstaat echter een gering neerslag van chloorzilver; in het aceton is dus een geringe hoeveelheid van een zilverzout in oplossing.

Het residu wordt eenigen tijd geschud met water om een mogelijkerwijs ontstaan, in water oplosbaar zilverzout, in oplossing te brengen. Er blijkt echter aan het water nagenoeg niets afgegeven te worden. Nu wordt de overblijvende vaste stof geschud met verdund salpeterzuur, hierbij gaat dan de meeste anorganische stof in oplossing, echter bijna geen organische. Wordt echter, wat er na behandelen met salpeterzuur is achtergebleven, uitgetrokken met aceton, dan blijkt hierin zeer veel op te lossen (wat niet oplost in aceton, lost ook niet op in sterk salpeterzuur, wel echter in ammonia; er is dus wel een weinig broomzilver ontstaan).

Deze oplossing in aceton geeft nu met zoutzuur een dik, kaasachtig neerslag van chloorzilver, vooral na toevoegen van een weinig water. Het blijkt dus, dat er een organisch zilverzout in oplossing is gekomen. (Dat er in de oorspronkelijke aceton-oplossing bijna geen zilverzout aanwezig was, zal wel te verklaren zijn door de vorming van basische zilverzouten). Bij verdunnen van de aceton-oplossing (na affiltreeren van het chloorzilver) met veel water, ontstaat een melkachtige troebeling, die zich, na 24 uur staan, aan den wand van het kolfje afscheidt als een harsachtige bedekking. Na afgieten van de vloeistof, wordt de hars in de kou behandeld met weinig alcohol; daarbij krijgen we een lichtgeel gekleurde oplossing, terwijl typische oktaëdertjes van het broomdehydrocholzuur achterblijven (bij oplossen in loog geven deze oktaëdertjes de karakteristieke gele oplossing, die ook broomkalium blijkt te bevatten).

De alcoholische oplossing, voorzichtig verdund met water, geeft nu een harsachtig, niet kristallijn te krijgen, neerslag.

Behalve het broomdehydrocholzuur werd ook de aethylester



ervan gedurende  $2 \times 24$  uur geschud met versch gepraecipiteerd, met water en met aceton uitgewasschen zilveroxyde. Op dezen aethylester schijnt echter het zilveroxyde van nagenoeg geen invloed te zijn; werd n.l. de aceton-oplossing afgefiltreerd van de vaste stof, dan kan er bij verdunnen met zooveel water, tot er bij koken nog juist geen neerslag ontstaat, uit 1.2 gr. ester, waarvan we uitgegaan waren, 0.9 gr. in typische, oktaëdrische kristalletjes teruggewonnen worden. Daar er in de aceton-waterige vlocistof nog een vrij groote hoeveelheid ester aanwezig is, blijkt er dus òf in het geheel, òf nagenoeg geen inwerking te hebben plaats gevonden.



## Physiologisch-chemische Experimenten.

---

Uit 't voorgaande is wel gebleken, dat er tot op 't oogenblik nog maar weinige karakteristieke afbrekingsproducten verkregen zijn, die ons een inzicht geven in den bouw van het cholzuur-molecuul. De mogelijkheid bestond nu, dat, wat in een reageerbuisje niet gelukt, gemakkelijk door de levende cel wordt tot stand gebracht. De volgende overwegingen leidden ons er toe, om dit experimenteel te onderzoeken.

Op grond van verschillende onderzoekingen (waarop we hieronder terugkomen), mogen we wel aannemen, dat de cholzuren, die met de gal in den darm uitgestort worden, slechts voor een deel in de faeces overgaan, en voor 't grootste deel door den darmwand geresorbeerd worden. 't Was nu maar de vraag: gaat het cholzuur hierbij onveranderd door den darmwand, of wordt het eerst in eenvoudiger stoffen gesplitst, die dan later in de lever weer tot cholzuur opgebouwd worden. Voor 't eerste pleit, dat het cholzuur nu niet zoo'n groot mol. gewicht heeft (mol. gewicht ongeveer 400), al is dit dan toch grooter dan dat van de vetzuren, koolhydraten of aminozuren. Maar voor de tweede mogelijkheid pleit 't feit, dat er tot nu toe in 't bloed nooit cholzuur is aangetoond, terwijl er toch een zeer gevoelige reactie op bestaat.

Geven we nu eerst een overzicht van de verschillende onderzoekingen die reeds gedaan zijn over de resorptie van cholzuur door den darmwand. In 1878 verrichtte TAPPEINER een uitgebreid onderzoek over deze vraag.<sup>1)</sup> In 't eerste deel van zijn publicatie vermeldt hij, wat er tot dusver over bekend

---

<sup>1)</sup> Wiener Sitz. Ber. 77, 281 [1878].



was. De wegen waarlangs de oplossing van het vraagstuk beproefd was, onderscheidt hij in drieën.

De eerste weg berust dan op de quantitatieve vergelijking van de hoeveelheid cholzuur, die in den darm uitgestort wordt en de hoeveelheid, die met de faeces het lichaam verlaat. HOPPE SEYLER <sup>1)</sup> sloeg dezen weg in; hij analyseerde de faeces van een 8 K.G. zwaren hond, en vond hierin hoogstens 0.5 gr. cholzuur pro die, terwijl volgens BIDDER en SCHMIDT bij zoo'n hond minstens 4 gr. cholzuur per dag in den darm uitgestort wordt. Dit wijst dus op sterke resorptie.

Tot juist 't tegenovergestelde resultaat komt NAWROCKY, die bij een hond een galfistel en een duodenum-fistel aanlegde. De uit de galfistel vloeiende secreten werden voor een klein deel geanalyseerd, voor de rest in 't duodenum gebracht. Door nu de faeces te analyseeren, bleek hem, dat hierin evenveel cholzuur te voorschijn kwam als in 't duodenum ingebracht was.

De tweede weg werd door RÖHRIG <sup>2)</sup> ingeslagen. Deze gebruikte den door hem ontdekten invloed van het cholzuur op de hartswerking, om na te gaan, of bij injectie van sterke oplossingen van cholzure zouten, deze door den darm geresorbeerd worden. RÖHRIG neemt dus daarbij stilzwijgend aan, dat het cholzuur (beter: natriumcholaat) als zoodanig door den darmwand gaat of dat zijn splitsingsproducten evenzoo op 't hart werken als 't cholzuur zelf.

RÖHRIG vond nu, dat bij injecties in het ileum die werking duidelijk te bespeuren was; niet ochter bij injectie in het jejunum (dit laatste verklaarde RÖHRIG dan gedeeltelijk daardoor, dat door 't hier aanwezige zuur uit 't maagsap, de cholzuren uit hun zouten worden neergeslagen, en zóó voor resorptie ongeschikt worden gemaakt).

Een combinatie van de eerste en tweede methode werd beproefd door SCHÜLEIN <sup>3)</sup>, een leerling van TAPPEINER. De

<sup>1)</sup> VIRCHOW'S Archiv Bd. 26, 519.

<sup>2)</sup> Archiv der Heilkunde 1863, 385.

<sup>3)</sup> Zeitschr. f. Biol. 1876.



bedoeling was een galfistel hond zooveel galzure natron per os in te geven, tot de door RÖHRIG ontdekte hartswerking (polsverlangzaming) optrad. Het verschil tusschen ingevoerd en in de faeces teruggevonden cholzuur geeft dan de geresorbeerde hoeveelheid aan. Hiermee kan dan tegelijk uitgemaakt worden, of het geresorbeerde cholzuur als zoodanig in het bloed werd opgenomen (of als producten, die op eenzelfde wijze op de hartswerking invloed hebben als het cholzuur zelf) dan wel of 't geresorbeerde cholzuur in producten wordt gesplitst, die niet meer giftig op 't hart werken.

Het bleek echter, dat 't niet mogelijk was deze proef uit te voeren, omdat reeds een gift van 0.2 gr. cholzuurnatrium per K.G. hond een sterke, 1 à 2 uur durende diarrhoe, teweeg brengt. Wel vindt SCHÜLEIN, in overeenstemming met RÖHRIG, dat bij injectie van galzuren in de maag geen polsverlangzaming was te constateeren.

In tegenspraak met de proeven van de beide laatstgenoemde onderzoekers, vond SCHIFF <sup>1)</sup>, dat bij inspuiten van 70—200 cM<sup>3</sup> ossengal in duodenumfistels bij honden, een polsverlangzaming optreedt, ten teeken (volgens SCHIFF), dat er gal in het bloed is opgenomen.

Om deze tegenspraak op te heffen, wil TAPPEINER nu aannemen, dat die groote hoeveelheid gal ongetwijfeld heftige diarrhoe moet veroorzaken en dat deze dan de polsverlangzaming zou ten gevolge hebben.

De derde weg, waarlangs men de oplossing der vraag of, en zoo ja, in welken vorm de galzuren door den darmwand geresorbeerd worden, beproefd heeft, bestaat in de onderzoeking van de chylus en van het poortaderbloed. Deze weg is door HOPPE-SEYLER en verschillende andere physiologisch-chemici betreden. Door allen werd echter een negatief resultaat verkregen.

Na dit overzicht van wat door zijn voorgangers was ge-

<sup>1)</sup> Pflügers Archiv Bd. III. 598. [1870].



vonden, komt TAPPEINER nu tot de beschrijving van zijn eigen onderzoekingen.

In de eerste plaats heeft hij 150 cM<sup>3</sup>. chylus, die in 2 uur tijdens 't verteren van een vetrijken maaltijd door een hond met een fistel van den ductus thoracicus geleverd was, onderzocht op de aanwezigheid van cholzuur; hij verkroeg daarbij een zeer duidelijke reactie van PETTENKOFER. TAPPEINER geeft daarbij aan, dat hij deze reactie volgens de modificatie van NEUKOMM toepaste; ook dat hij vooraf de vetten door extractie met aether en de vetzuren door neerslaan met bariumacetaat verwijderd had. Hij vermeldt echter niet, of eerst de eiwitten (die ook de reactie van PETTENKOFER geven) verwijderd waren, en of het spectrum de beide voor het cholzuur karakteristieke strepen vertoonde.

Waar nu de algemeene regel geldt, dat door de lymphbaan de in water onoplosbare stoffen, door het bloed de in water oplosbare vervoerd worden, zou men moeten aannemen, dat het cholzuur als zoodanig en niet in den vorm van zijn natriumzout geresorbeerd was.

Verder ging TAPPEINER ter beantwoording der vraag of er al of niet resorptie van galzuren plaats vindt, en zoo ja, door welke gedeelten van den darm, als volgt te werk:

Van een hond, die 48 uren gevast had, werd onder chloroform-narcose de buikwand geopend, een bepaald stuk van den darm afgebonden, en in deze lis een bekende hoeveelheid gal of van een oplossing van taurocholzuur, glycocholzuur of cholzuur gebracht. Dan werd de buikwand weer toegenaaid, en het geheel 3—5 uur aan zichzelf overgelaten. Daarna werd de lis uit het lichaam genomen en de inhoud ervan quantitatief onderzocht.

TAPPEINER komt hierbij tot het resultaat, dat in het duodenum nòch uit glycocholzuur-, nòch uit taurocholzuur- of uit cholzuuroplossingen iets opgenomen wordt; dat het jejunum glycocholzuur resorbeert, maar niet cholzuur en taurocholzuur en eindelijk dat in het geheele ileum resorptie van alle 3 bovengenoemde zuren plaats vindt.



In welken vorm ('t zij als zoodanig, 't zij als afbrekingsproducten) de galzuren door den darmwand heengaan, is door TAPPEINER niet onderzocht.

Latere onderzoekers (vooral SCHIFF<sup>1)</sup> en STADELMANN<sup>2)</sup>) vonden, dat ingeven per os van galzuren bij galfistel-honden, een sterke vermeerdering der galzuur-afscheiding door de lever tengevolge heeft. Door SCHIFF werd zelfs de hypothese opgesteld, dat de galzuren een intermediären kringloop zouden ondergaan: door den darm geresorbeerd worden, in het bloed opgenomen (als zoodanig; of in den vorm van afbrekingsproducten?) en weer aan de lever afgestaan worden, waaruit ze dan, via de galblaas, weer in den darm komen.

Uit het bovenstaande blijkt wel, dat het de moeite zou loonen, eens na te gaan, in welken vorm het cholzuur door den darmwand heengaat: als zoodanig of op de een of andere wijze gesplitst. Ook indien al niet, zooals gehoopt werd, het cholzuur uiteengeslagen wordt, dan zou 't toch interessant zijn, indien het gelukte aan te toonen, dat het geheele cholzuur-molecuul door den darmwand in het bloed overgaat.

Nu hebben we in de studie van de „overlevende” darm een zeer fraaie methode voor dit onderzoek; we kunnen het door de arteriën en venen stroomende bloed vervangen door de vloeistof van RINGER die, indien we er de glucose uit weglaten, in 't geheel geen organische stoffen bevat. In deze vloeistof zal het natuurlijk veel gemakkelijker zijn kleine hoeveelheden van een of andere organische stof aan te toonen, dan in het zoo uitermate gecompliceerde bloed.

Om nu dit onderzoek uit te voeren, werd van een grooten hond ( $\pm$  15 Kg. zwaar), onder chloroform-narcose, de buikwand geopend en van het ileum een stuk van 2 dM. lengte afgebonden; nu worden de corresponderende arterie en vene opgezocht, en hierin canules gebonden. Daarna wordt de darmlis met het

1) Archiv der Physiologie 1892, 594.

2) Zeitschr. f. Biologie 34, 1-34 [1896].



bijbehoorende mesenterium in een op 39° verwarmd bad met physiologische zoutsolutie gebracht. Door de met arterie verbonden canule wordt vanuit een  $\pm 75$  cM. hooger staande voorraadsflesch een constante stroom vloeistof van RINGER, zonder glucose erin, geleid; deze druppelt af uit de met de vene verbonden canule. Nadat al het bloed (tenminste zoo oppervlakkig gezien) uit het vaatsysteem verdwenen is en vervangen door de vloeistof van RINGER, wordt de darmlis eenige malen doorgespoeld met physiologische zoutsolutie, waarna ik er 9 cM<sup>3</sup> 2 0/0-oplossing van natriumcholaat in bracht en de lis aan beide einden stevig afbond. Indien er nu cholzuur als zoodanig, of in den vorm van zijn splitsingsproducten door den darmwand heengaet, dan zal dit in de door het vaatsysteem stroomende vloeistof van RINGER oplossen. In ongeveer een uur wordt van deze uit de vene gedruppelde vloeistof opgevangen  $\pm 300$  cM<sup>3</sup>. Deze vloeistof wordt op het waterbad ingedampt tot een groot deel van het keukenzout is uitgekristalliseerd. Met een proefje van de zoo verkregen geconcentreerde oplossing voerde ik de reactie van PETTENKOFER uit. Deze gaf evenwel een negatief (in alle geval niet duidelijk positief) resultaat. Van te voren had ik mij met een afzonderlijk proefje natriumcholaat overtuigd, dat deze reactie niet gestoord wordt door de overmaat chloornatrium (afkomstig uit de vloeistof van RINGER).

De vloeistof wordt nu geheel tot droog ingedampt en uitgetrokken met alcohol. Er blijkt hierin echter nagenoeg niets in oplossing te gaan, behalve een weinig chloornatrium. Ook aan aether wordt niets afgegeven. Met het residu werd nog de reactie van LIEBERMANN—SALKOWSKI op cholesterine uitgevoerd, evenwel met negatief resultaat.

De darmlis zelf was aan het einde van de proef sterk opgezwollen en bij openknippen spuit de vloeistof er uit. Deze vloeistof bevat nog een groote hoeveelheid cholzuur.

Uit deze proef zonder meer zou men geneigd zijn, om aan te nemen, dat het cholzuur, in tegenstelling met het door



TAPPEINER gevonden resultaat, niet door den wand van het ileum heengaat. Het bleek echter bij deze en volgende proeven, dat de inrichting daarvan nog voor verschillende verbeteringen vatbaar was.

In de eerste plaats bleek het wenschelijk, een wat grootere lis te nemen; dan is het corresponderend vaatsysteem ook grooter, en stroomt er dus in den zelfden tijd meer vloeistof door de lis. Zoo bleek bij een lis van ongeveer 1 M. lang, in 4 uur 8 liter vloeistof uit de vene te stroomen. Maar bij dit snelle doorstroomen, krijgen we slechts een uiterst verdunde oplossing van het eventueel door den darm aan de vloeistof afgegeven product. Daarom werd later de vloeistof (een hoeveelheid van  $\pm 500$  cM.<sup>3</sup>), telkens als ze door het vaatsysteem gestroomd was, heftig met zuurstof geschud en in de voorraadsflesch gebracht, om weer door de arteriën en venen heen te gaan.

Dan werd in het begin het bezwaar ondervonden, dat het moeilijk was, de juiste, met een bepaald darmstuk corresponderende, arterie en vene op te zoeken, en hierin canules te brengen. Daarom werd later de geheele darm met bijbehorend mesenterium en vaatsysteem uit het lichaam genomen en gebracht in een vat met physiologische zoutsolutie van 39°, die gemakkelijk ververscht kon worden. Dan werd de arterie en de vene zoo hoog mogelijk opgezocht en kon ik in deze wijde vaten gemakkelijk canules binden; nu werd een stuk darm van  $\pm 5$  dM. lang afgeknipt en alle daarmede corresponderende arteriën en venen zoo hoog mogelijk bij hun oorsprong afgebonden en weggeknipt. Om na te gaan of alle niet met de te onderzoeken darmlis corresponderende arteriën en venen afgebonden waren, lieten we eerst door het vaatsysteem gedefibrineerd bloed stroomen (verkregen door den hond vóór de proef te laten verbloeden), dat door zijn kleur gemakkelijk verraadt of er ergens nog een niet afgebonden opening is. Zijn alle openingen afgebonden, dan wordt het bloed vervangen door vloeistof van RINGER en daarna in de lis, na doorspoelen met physiologische



zoutsolutie, een mengsel van gelijke volumina 2% natriumcholaat-oplossing en 0.9% keukenzout-oplossing gebracht.

De (eenige malen) door het met de lis corresponderende vaatsysteem gestroomde vloeistof van RINGER werd na de proef ingedampt totdat er zich nog juist geen chloornatrium afscheidt; daarna aangezuurd (om uit eventueel aanwezig natriumcholaat cholzuur vrij te maken) en eenige malen uitgeschud met aether.

Indien we nu het residu, na het verdampen van de aetherische oplossing, oplossen in een weinig soda-oplossing, dan geeft deze vloeistof zeer fraai de reactie van PETTENKOFER (met de beide absorptiestrepen even vóór D en even vóór F) en de fluorescentie-reactie bij behandelen met sterk zwavelzuur.

Het verkregen resultaat werd, bij herhaling der proef op meerdere honden, steeds bevestigd.

Waar 't ons niet gelukt is, bij de geringe hoeveelheid waarmee we moesten werken, het cholzuur als zoodanig zuiver af te scheiden, hebben we wel niet als absoluut zeker bewezen, dat het cholzuur ongesplitst den darmwand passeert; maar toch is het feit, dat zoowel de reactie van PETTENKOFER als de fluorescentie-proef duidelijk positief uitvallen, een zeer krachtig argument ervoor, om aan te nemen, dat het cholzuurmolecuul in zijn geheel door den darm aan het bloed wordt afgestaan.



## Overzicht der verkregen resultaten.

---

Bij de pogingen tot maximale bromering van cholzuur of van dehydrocholzuur met droog, vloeibaar of gasvormig broom (jodium als katalysator), werd een bruin, amorf lichaam (of een mengsel van stoffen) verkregen, dat zooveel broom bevat, als berekend wordt voor een product, dat ontstaan zou zijn, indien in cholzuur 7 atomen waterstof waren vervangen door broom. Het lichaam kon niet kristallijn verkregen worden.

Door loog wordt het ontleed en verliest het een deel van het broom. Door reductie met zinkstof + alcoholisch zoutzuur of met aluminium + amalgaam kon geen broomvrij lichaam verkregen worden.

Bij de bromering in azijnzure oplossing van dehydrocholzuur met broom, werd aangetoond, dat de reactie versneld wordt door het zonlicht (ook door het licht van een uviol- of een booglamp) en door toevoeging van waterstof-ionen (door natrium-acetaat wordt de bromering geheel belet). Er werd aangetoond, dat deze bromering een substitutie-proces is, waarbij juist de berekende hoeveelheid broomwaterstof ontstaat.

Het bromeringsproduct kan niet gezuiverd worden door omkristalliseeren uit *alcohol*; de eerste en de laatste fractie hebben hetzelfde, te hooge, broomgehalte. Het lichaam kan echter zuiver verkregen worden, door meerdere malen omkristalliseeren uit azijnzuur of uit aceton; het kristalliseert dan in naaldjes van ontloedingpunt van  $\pm 180^{\circ}$  en bevat, naar gelang uit aceton of azijnzuur is omgekristalliseerd,  $\frac{1}{3}$  mol. kristalaceton of  $\frac{1}{2}$  mol. kristalazijnzuur.



Door omkristalliseeren van deze naaldjes van ontledingspunt  $\pm 180^\circ$  uit acohol ontstaan oktaëderachtige kristallen, van ontledingspunt  $\pm 140^\circ$ . Deze bevatten geen kristalvloeistof. Bij omkristalliseeren uit azijnzuur of uit aceton gaan ze weer over in naaldjes van ontledingspunt  $\pm 180^\circ$ .

Bij omkristalliseeren van het monobroomdehydrocholzuur uit benzol, toluol of xylol, ontstaan staafjes met kristalbenzol resp. — toluol of — xylol, die aan de lucht direct verweeren en overgaan in een wit poeder van ontledingspunt  $\pm 140^\circ$ .

Bij omkristalliseeren uit chloroform ontstaan glinsterende blaadjes, die kristal-chloroform bevatten. Deze kristallen houden, in tegenstelling met die uit benzol en homologen, hun kristalvloeistof zeer stevig vast; door eenigen tijd verhitten op  $100^\circ$  in het absolute vacuum ontstaat geen noemenswaard gewichtsverlies.

De bereiding van den ester van dit monobroomproduct bleek te kunnen geschieden, zoowel door bromeeren van den ester van dehydrocholzuur, als door esterificeeren van broomdehydrocholzuur.

Door inwerking van loog of van alcalisch reageerende vloeistoffen op dehydrocholzuur of op den aethylester ervan, bleek ontleding plaats te hebben; het broom wordt hierbij quantitatief afgesplitst; er ontstaat een bruingele olie, die nòch in vasten toestand te krijgen, nòch in vacuo te destilleeren is.

Verder werd gevonden, dat, terwijl het dehydrocholzuur zelf het proefvocht van FEHLING of een ammoniakale zilveroplossing bij koken niet reduceert, dit met het uit broomdehydrocholzuur door loog ontstane lichaam wel het geval is.

Door inwerking van loodhydroxyde, van bariumcarbonaat, van kwikoxyde of van zilveroxyde op het broomproduct ontstaan stoffen, die niet kristallijn konden verkregen worden.

Bij reductie van het monobroomdehydrocholzuur met zinkstof of met magnesium, ontstaat weer het dehydrocholzuur.

Door proeven met „overlevende” darmen werd zeer waarschijnlijk gemaakt, dat het cholzuur als zoodanig den darmwand passeert.



## STELLINGEN.

---

### I.

Cholzuur passeert als zoodanig den darmwand.

### II.

Door KNORR is voor het eerst overtuigend aangetoond, dat in den acetylazijnester zoolwel een keton- als een enolmodificatie, in evenwichtstoestand, voorkomt.

### III.

Tannine is een mengsel van een glucoside en een tot nu toe onbekende stof.

### IV.

De invoering van het begrip „homochromisomerie” door HANTZSCH is geheel overbodig (vgl. BIILMANN, Ber. **44**, 827 [1911]).



## V.

De passiviteit van het ijzer is tot nu toe niet verklaard.

## VI.

De critiek van DITTLER (Zeitschr. f. anorg. Chem. **69**, 273 [1911]) over het werk van DAY en ELLEN is ongegrond.

## VII.

De werking der darmlipase wordt versterkt door gal (vgl. daarentegen: BOLDYREFF, Archives des sciences biolog., St. Pétersbourg, Tome XI, 1905).

## VIII.

De door POTTEVIN (Bull. Soc. Chim. de Paris **35**, 693 [1906]) genomen proeven zijn geen afdoend bewijs voor de omkeerbaarheid der lipase-reactie van het pancreassap.

## IX.

De opgave der handboeken (OPPENHEIMER'S Handb. der Biochemie I, 824; ABDERHALDEN'S biochem. Handlex. III 323; ABDERHALDEN'S Handb. d. biochem. Arbeitsmethoden II, 662.), dat dehydrocholzuur uit alcohol mag omgekristalliseerd worden, is onjuist.

## X.

De in BOSSCHA, Leerboek der Natuurkunde, IV, 1, 180, gegeven berekening voor de afdwaling wegens bolvormigheid, is foutief.

## XI.

De in een  $p-v-T$ -diagram afgebeelde toestandsveranderingen zijn altijd reversibel.

## XII.

Aan te bevelen is de voorslag van ABDERHALDEN (Ber. 38, 2331 [1905]) om lichamen, die niet kristallijn verkregen zijn, geen polypeptiden te noemen.

---



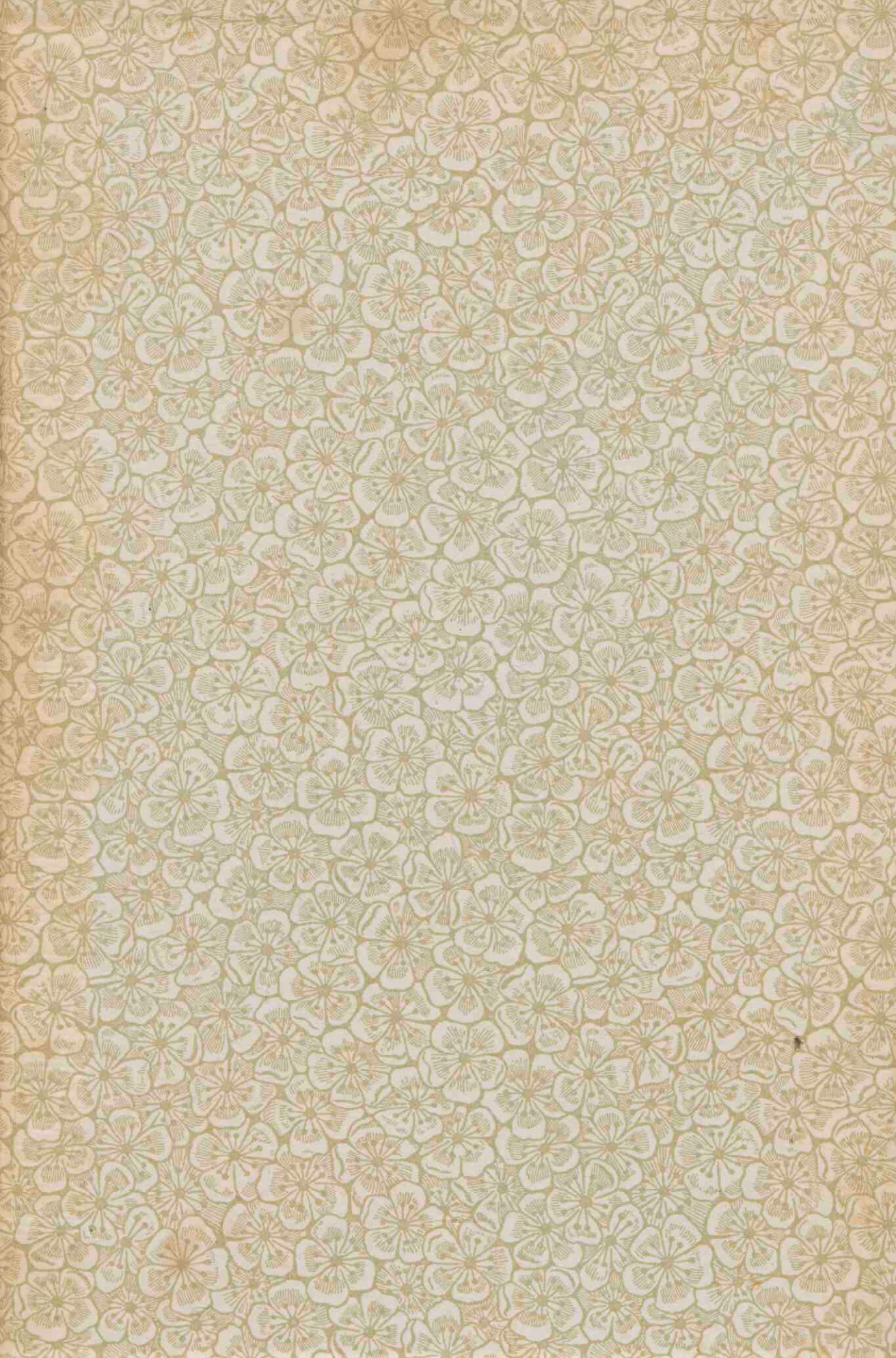














A  
1