

Energetische Oxydation des Cholesterins mit Salpetersäure.

Von
Adolf Windaus.

(Aus dem Allgemeinen Chemischen Universitäts-Laboratorium Göttingen.)
(Der Redaktion zugegangen am 22. April 1918.)

Schon vor längerer Zeit haben Mauthner und Suida¹⁾ die Einwirkung heißer Salpetersäure auf Cholesterin studiert und hierbei amorphe Säuren erhalten, die vielleicht die Formel $C_{13}H_{16}O_8$ und $C_{13}H_{18}O_8$ besitzen und als Carboxylderivate von gesättigten cyclischen Kohlenwasserstoffen C_nH_{2n} aufzufassen sind. Leider ist es nicht gelungen, die Säuren selbst oder eines ihrer Derivate in krystallisierter Form zu gewinnen, sodaß die Einheitlichkeit dieser Stoffe zweifelhaft ist.

Auch ich bin diesen Säuren, die das Hauptprodukt der Einwirkung von Salpetersäure auf Cholesterin darstellen, wiederholt bei Oxydationsversuchen begegnet; neben ihnen entstehen aber in geringer Menge noch andere Stoffe, die leichter zu charakterisieren sind und über die ich kurz berichten will:

Die Oxydation geschah in folgender Weise: In einem Kolben mit eingeschliffenem Kühler wurden 15 g Cholesterin mit 300 g Salpetersäure (Gemisch aus 1 T. rauchender 1,525 und 3 T. konz. 1,4) übergossen; das Cholesterin verflüssigte sich nach kurzer Zeit, und an der Oberfläche sammelte sich ein gelbes Öl an, das allmählich eine grüne Farbe annahm; dabei entwickelten sich in reichlicher Menge Oxyde des Stickstoffs. In der Kälte trat dann keine weitere Reaktion ein; es wurde darum vorsichtig erwärmt, dabei ging das grüne Öl allmählich in Lösung und nach halbstündigem Kochen hatte sich eine gleichförmige Lösung gebildet, während ständig große Mengen roter Dämpfe entwichen. Nach mehrstündigem Kochen

¹⁾ Monatshefte für Chemie, Bd. 24, S. 175 (1903).

zeigten sich im Kühlrohr Öltropfen und nach sechzehnständiger Einwirkung schien die Oxydation vollendet. Es wurde darum unterbrochen und, um die flüchtigen Produkte zu gewinnen, etwa die Hälfte der Lösung abdestilliert. (Destillat I.) Das Destillat I wurde mit Pottasche neutralisiert und wiederum der Destillation unterworfen. Schon mit den ersten Kubikzentimetern Flüssigkeit gingen farblose Öltropfen über, die in der Vorlage oder schon im Kühler zu Krystallen von kampferähnlichem Aussehen erstarrten; diese sind beim Liegen an der Luft ziemlich flüchtig, sie sind unlöslich in Wasser und Natronlauge, leicht löslich in organischen Lösungsmitteln. Der Schmelzpunkt liegt bei 52° . Die beobachteten Eigenschaften passen gut auf das Dinitroisopropan $(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{NO}_2)_2$ und tatsächlich liegt, wie die Analyse beweist, diese Verbindung vor.

0,1581 g Substanz : 29,4 ccm N (über 25% Kalilauge aufgefangen, 19° und 741 mm).

$\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_4\text{N}_2$. Ber.: 20,90% N Gef.: 20,82% N.

Das Dinitroisopropan entsteht, wie Bredt¹⁾ gezeigt hat, bei energischer Einwirkung von Salpetersäure auf Verbindungen mit einer Isopropylgruppe z. B. auf Isovaleriansäure.

Um auch die sauren flüchtigen Produkte zu gewinnen, wurde das neutralisierte Destillat I mit Schwefelsäure bis zur deutlichen Reaktion auf Tropäolinpapier angesäuert und wiederum destilliert. Das neue Destillat wurde eine viertel Stunde mit Silbercarbonat gekocht, wobei sich metallisches Silber abschied; die heiß filtrierte Flüssigkeit wurde im Vakuum verdunstet und hinterließ etwa 2 g eines Silbersalzes, das in Nadeln krystallisierte und bei der Analyse folgende Zahlen gab.

0,1511 g Substanz : 0,0965 g Ag

$\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3\text{Ag}$. Ber.: 64,63% Ag

$\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3\text{Ag}$. » : 59,62% Ag

Gef.: 63,87% Ag.

Es geht daraus hervor, daß bei weitem die Hauptmenge der flüchtigen Säuren aus Essigsäure bestand.

Nach Abtrennung der flüchtigen Bestandteile wurde die salpetersaure Lösung in einer Platinschale unter öfterem Zusatz

¹⁾ Chem. Ber., Bd. 15, S. 2323 (1882).

von Wasser eingedampft, um die Salpetersäure zu entfernen. Der Rückstand bestand aus einem gelben Sirup, der auf Zusatz von viel Wasser etwas zähes Harz abschied. Die nach Abtrennung des Harzes gewonnene wässerige Lösung wurde mit Kalkmilch neutralisiert, der gebildete Niederschlag, der reich an oxalsaurem Calcium war, abfiltriert und das Filtrat mit Bleiacetat versetzt, so lange noch ein Niederschlag entstand. Auch diese Fällung, die die Bleisalze der eingangs erwähnten Säuren $C_{12}H_{16}O_8$ und $C_{13}H_{18}O_8$ enthält, wurde abfiltriert und das Filtrat mit verdünnter Schwefelsäure in geringem Überschuß versetzt. Nach Abtrennung des ausgefällten Bleisulfats wurde die Lösung konzentriert und dann im Extraktionsapparat erschöpfend mit Äther extrahiert. Die weitere Untersuchung geschah nach einem von Bouveault¹⁾ angegebenen Verfahren. Der eingedampfte Ätherextrakt wurde in eine Retorte gebracht und zunächst im Luftbad auf etwa 220° erhitzt, dann wurde er erkalten gelassen, die Retorte auf etwa 20 mm Druck evakuiert und langsam bis auf 170° erhitzt. Hierbei wurde ein Destillat (A) erhalten. Nunmehr wurde die Temperatur allmählich auf 250° gesteigert und so ein weiteres Destillat (B) gewonnen.

Destillat A wurde in heißem Wasser gelöst und mit Barytwasser in geringem Überschuß versetzt und eingekocht. Hierbei schied sich allmählich ein schwer lösliches Baryumsalz ab, das quantitativ mit verdünnter Schwefelsäure zersetzt wurde. Die von Ba und SO_4 freie Lösung wurde auf ein kleines Volumen eingedampft und schied hierbei Krystalle ab, die bei 181° schmolzen. Nach dem Umkrystallisieren aus wenig Wasser stieg der Schmelzpunkt auf 185° . Die Krystalle sind stickstofffrei, leicht löslich in heißem Wasser und Alkohol, schwer löslich in absol. Äther, unlöslich in Benzol und Petroläther. Wie die Analyse zeigte, liegt Bernsteinsäure vor.

0,1336 g Substanz : 0,1971 g CO_2 , 0,0643 g H_2O .

$C_4H_6O_4$. Ber.: 40,67% C 5,12% H

Gef.: 40,25% C 5,39% H.

Das Filtrat des bernsteinsauren Baryums wurde mit Salzsäure angesäuert und wiederum erschöpfend mit Äther extra-

¹⁾ Bull. Soc. chem. France (III), Bd. 19, S. 562 (1898).

hiert. Der Ätherextrakt hinterließ beim Eindunsten einen geringen Rückstand, der mit kochendem Benzol behandelt wurde. Der nach dem Erkalten ungelöst bleibende Anteil bestand aus fast reiner Bernsteinsäure; die benzolische Lösung wurde mit viel Petroläther vermischt und ließ allmählich und in geringer Menge ein Krystallpulver ausfallen, das noch zweimal auf dieselbe Weise umkrystallisiert wurde. Die so erhaltenen Krystalle waren leicht löslich in Wasser, Alkohol und Aceton, schwer löslich in Benzol, unlöslich in Petroläther. Ihr Schmelzpunkt lag bei 107—109°.

Analyse:

4,017 mg Substanz : 6,67 mg CO₂, 2,15 mg H₂O.

C₅H₈O₄. Ber.: C 45,45 % H 6,11 %

Gef.: C 45,29 % H 5,99 %

Titration:

0,0880 g Substanz verbrauchten 13,3 ccm n/10-Lauge.

Äquivalentgewicht für C₅H₈O₄ (zweibasisch). Ber.: 66. Gef.: 66.

Der Stoff ist also eine zweibasische Säure der Formel C₅H₈O₄. Da es sich nach der Art der Gewinnung nicht um eine substituierte Malonsäure handeln kann, kommt nur noch Glutarsäure und Methylbernsteinsäure in Betracht. Glutarsäure schmilzt bei 97,5°, Methylbernsteinsäure bei 112°. Zweifellos besteht die hier vorliegende Säure wesentlich aus Methylbernsteinsäure.

Das Destillat B wurde ebenfalls in heißem Wasser gelöst, filtriert, zur Trockne eingedampft und der Rückstand aus Benzol und Petroläther umkrystallisiert. Der Schmelzpunkt der erhaltenen Krystalle lag zunächst bei 70° und stieg nach wiederholter Reinigung bis auf 77°, wo er konstant blieb.

Analyse:¹⁾

3,970 mg Substanz : 7,155 mg CO₂, 2,33 mg H₂O.

C₆H₁₀O₄. Ber.: C 49,31 % H 6,90 %

Gef.: C 49,15 % H 6,57 %

Titration:

0,1635 g Substanz verbrauchten 22,0 ccm n/10-Lauge.

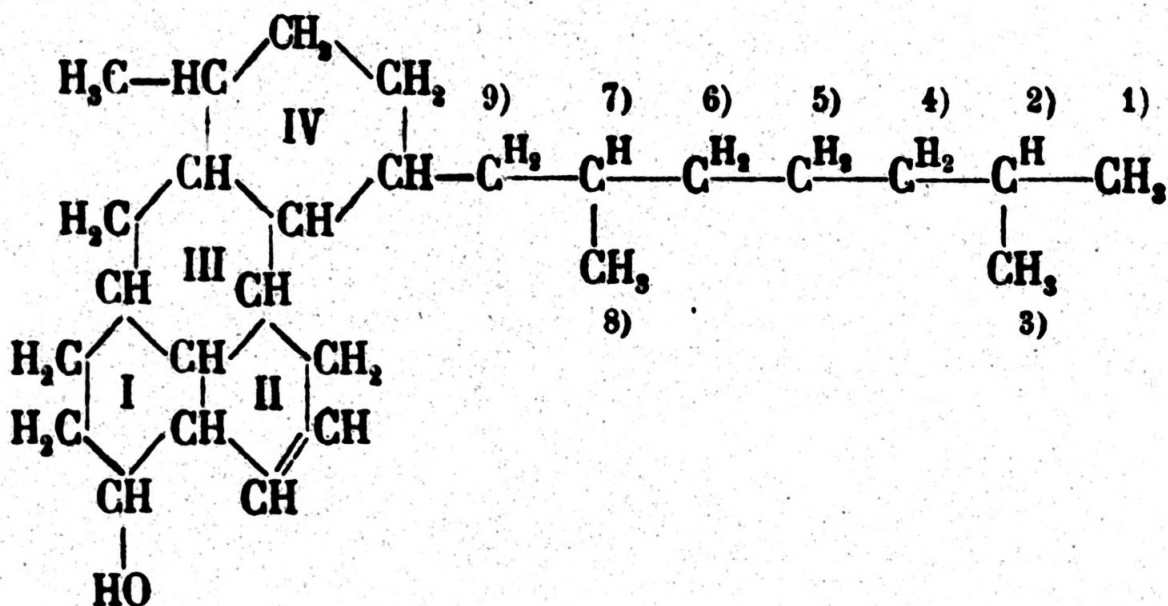
Äquivalentgewicht für C₆H₁₀O₄ (zweibasisch). Ber.: 73. Gef.: 74.

¹⁾ Für die Ausführung der Mikroanalysen nach Pregl danke ich Herrn Dr. Lieb-Graz vielmals.

Auf Grund des Schmelzpunkts, der Analyse und der Titration ist es nicht zweifelhaft, daß die hier erhaltene Säure reine α -Methylglutarsäure ist. Auch das Verhalten gegen Lösungsmittel entspricht ganz den Angaben der Literatur über α -Methylglutarsäure.

Die Ausbeuten an Bernsteinsäure sind ziemlich gering, an Methylbernsteinsäure und α -Methylglutarsäure sehr gering, so daß ich über 300 g Cholesterin oxydieren mußte, um genügend Material zur Charakterisierung der Säuren zu erhalten.

Vor einigen Jahren haben Resau und ich¹⁾ gezeigt, daß bei der Oxydation des Cholesterins Aceton und Methylheptanon entstehen, und haben angenommen, daß eine Isooktylseitenkette im Cholesterin vorhanden sein könnte. Eine Formel, die mit dieser Annahme in Einklang steht, sei hier wiedergegeben:



Während Mauthner und Suidas Säuren $C_{15}H_{16}O_8$ und $C_{13}H_{18}O_8$ noch den Ring III oder IV des Cholesterins enthalten, könnten die niedrig molekularen Produkte, die bisher beim Abbau des Cholesterins erhalten worden sind, aus dieser Isooktylseitenkette hervorgehen, und zwar

1. Dinitroisopropan	aus Kohlenstoffatom	1—3
2. Aceton	»	1—3
3. Oxyisobuttersäure ²⁾	»	1—4
4. Bernsteinsäure	»	4—7
5. Methylbernsteinsäure	»	5—9

¹⁾ Berl. Ber., Bd. 46, S. 1246 (1913).

²⁾ Berl. Ber., Bd. 41, S. 2567 (1908).

- | | | |
|--------------------------------|---------------------|------|
| 6. α -Methylglutarsäure | aus Kohlenstoffatom | 4—9 |
| 7. Methylheptanon | » | 1—8 |
| 8. Oktan ¹⁾ | » | 1—8. |

Zu interessanten Ergebnissen führt schließlich ein Vergleich mit den Produkten, die aus der Cholsäure bei energischer Oxydation von Salpetersäure erhalten worden sind.

Während Dinitroisopropan hierbei nicht entsteht, da der Cholsäure die Isopropylgruppe des Cholesterins fehlt,²⁾ sind Bernsteinsäure und α -Methylglutarsäure von Panzer³⁾ mit Sicherheit unter den Oxydationsprodukten der Cholsäure aufgefunden worden; auch das Baryumsalz einer Säure $C_5H_8O_4$, die wohl Methylbernsteinsäure sein könnte, hat derselbe Forscher erhalten.

¹⁾ Monatshefte f. Chemie, Bd. 17, S. 42 (1896).

²⁾ Diese Zeitschr., Bd. 100, S. 167 (1917).

³⁾ Diese Zeitschr., Bd. 60, S. 376 (1909).