

Zur Kenntnis der Gallensäuren.

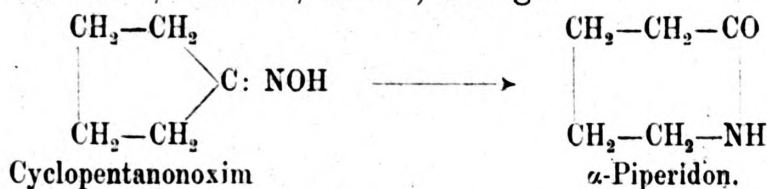
V. Mitteilung.

Von

Martin Schenck.

(Aus dem pharmazeutisch-chemischen Institut der Universität Marburg.)
(Der Redaktion zugegangen am 12. März 1919.)

In der vierten Mitteilung (Diese Zeitschrift, Bd. 89, S. 360 ff.)¹⁾ habe ich über Beckmannsche Oximumlagerung bei Cholsäureabkömmlingen berichtet, und zwar wurden beschrieben die Umlagerung des Dehydrocholsäuretrioxims und die des Biliansäuredioxims. Es wurde bereits hervorgehoben, daß die beiden Ketongruppen der Biliansäure wahrscheinlich ringförmig gebunden sind, daß aber auch m. E. die drei Carbonyle der Dehydrocholsäure als ringförmig gebundene Ketongruppen angesehen werden können entgegen der früheren Annahme, daß die Dehydrocholsäure zwei Aldehydgruppen und eine Ketongruppe enthalten sollte. Dementsprechend wurden die bei der Umlagerung der Oxime der genannten Säuren entstehenden Isoxime als Lactame angesprochen, deren Bildung analog dem Übergang von Cyclopentanoxim in α -Piperidon (vgl. Wallach, Ann. d. Chem., Bd. 312, S. 181) erfolgt:



¹⁾ Die ersten vier Mitteilungen über meine Untersuchungen in der Cholsäuregruppe sind in dieser Zeitschrift veröffentlicht: Bd. 63, S. 308; Bd. 69, S. 383; Bd. 87, S. 59; Bd. 89, S. 360. Diese Untersuchungen, die ich infolge des Krieges fast 4½ Jahre unterbrechen mußte, habe ich vor kurzem wieder aufgenommen.

Im Einklang mit der von mir gemachten Annahme, daß die Dehydrocholsäure drei ringförmig gebundene Ketongruppen enthält, steht die vor kurzer Zeit von W. Borsche und Emmy Rosenkranz¹⁾ mitgeteilte Beobachtung, daß die Dehydrocholsäure ($C_{24}H_{34}O_5$) bei der Reduktion eine mit Dehydrodesoxycholsäure isomere Desoxydehydrocholsäure ($C_{24}H_{36}O_4$) liefert, die bei der Oxydation in die mit Cholsäure isomere Pseudocholsäure ($C_{24}H_{36}O_7$) übergeht. Die Bildung der Desoxydehydrocholsäure und der Pseudocholsäure läßt sich wohl nur, wie es auch Borsche und Rosenkranz tun, unter der erwähnten Annahme erklären.

Die Umlagerung der Oxime in Isoxime wurde von mir zu dem Ende vorgenommen, die bei der Aufspaltung der letzteren zu erwartenden Aminosäuren abzubauen, um so eventuell zu neuen, charakteristischen Abbauprodukten der Cholsäure zu gelangen.

Inzwischen habe ich das Biliansäureisodioxim aufgespalten und dabei ein partiell aufgespaltenes Reaktionsprodukt erhalten. Ferner habe ich, in Ausführung einer bereits in der vierten Mitteilung angekündigten Absicht, das von mir früher dargestellte Oxim der Cholsäure in das entsprechende Isoxim umgelagert und auch dieses Isoxim der Aufspaltung unterworfen. Über diese Versuche soll im folgenden berichtet werden.

Partielle Aufspaltung des Biliansäureisodioxims: Biliansäureisoximaminocarbonsäure.

Die Darstellung des Biliansäureisodioxims geschah in der früher (Diese Zeitschrift, Bd. 89, S. 365) angegebenen Weise. Die Substanz zersetzte sich bei 258° , die Analyse des bei 120° getrockneten Materials ergab:

0,1540 g Substanz: 0,3400 g CO_2 u. 0,1046 g H_2O ; gef. 60,21% C u. 7,60% H;
0,2224 g , 11,7 ccm N bei 15° und 745,1 mm Hg; gef 6,11% N;
Ber. für $C_{24}H_{36}N_2O_8$: 59,96% C, 7,55% H und 5,85% N.

Nach einigen Vorversuchen erwies sich das folgende Verfahren zur Aufspaltung und zur Isolierung des Reaktionsproduktes als zweckmäßig.

¹⁾ Chem. Ber., Bd. 52, S. 342—345.

0,5 g Isodioxim wurden mit 20 ccm 20%iger Salzsäure eine Stunde lang am Rückflußkühler zum Sieden erhitzt, die Substanz ging dabei alsbald in Lösung. Die Lösung, die auch nach dem Erkalten klar blieb, wurde im Vakuum über Ätzkalk bei gewöhnlicher Temperatur zur Trockne gebracht. Es hinterließ ein zum großen Teil kristallinischer Rückstand, er wurde in wenig Natronlauge gelöst, die Lösung etwas verdünnt und durch Filtration von einigen ausgeschiedenen, braunen Flocken befreit. Dann wurde mit Essigsäure ganz schwach angesäuert und mit 5%iger Kupferacetatlösung gefällt. Die hellgrüne, amorphe Kupferfällung wurde abgesaugt, mit Wasser ausgewaschen und, nach dem Anreiben mit Wasser, heiß durch Schwefelwasserstoff zerlegt. Vom Schwefelkupfer wurde heiß abfiltriert, das Filtrat auf dem Wasserbade eingengt, wobei sich meist noch etwas Schwefelkupfer, das abfiltriert wurde, ausschied, und zur Trockne verdampft. Es resultierte ein etwas braun gefärbter, größtenteils kristallinischer, teilweise lackartiger Rückstand; er wurde zunächst mit 50%igem Alkohol ausgekocht, das vom Alkohol nicht Gelöste sah rein weiß aus und wurde aus heißem Wasser umkristallisiert. Die so erhaltenen Kristalle (Nadeln) zeigten unter dem Mikroskop gut ausgebildete, linealförmige Gestalt, sie wurden mit den gleich aussehenden, rein weißen Nadeln, die sich beim Abkühlen aus der schwach braun gefärbten, alkoholischen Lösung ausschieden, vereinigt. Die Kristalle zersetzten sich unter Braunfärbung bei 228—230°; die Analyse (Trocknen bei 120°) ergab:

0,1844 g Substanz: 0,3900 g CO₂ u. 0,1282 g H₂O; gef. 57,68% C u. 7,78% H;
 0,1256 „ „ 0,2644 „ CO₂ „ 0,0866 „ H₂O; „ 57,41% C „ 7,71% H;
 0,2232 „ „ 10,7 ccm N bei 14° und 741,2 mm Hg; gef. 5,56% N;
 0,2078 „ „ 10,8 „ N „ 18° „ 739,7 „ Hg; „ 5,93% N;

Ber. für C₂₄H₄₀N₂O₁₀: 55,77% C, 7,81% H und 5,44% N;

„ „ C₂₄H₃₈N₂O₉: 57,79% C, 7,68% H „ 5,63% N.

Da das Biliansäureisodioxim zwei Lactamringe enthalten muß, so folgt aus den erhaltenen Analysenwerten, daß bei der Einwirkung von siedender Salzsäure unter den angegebenen Bedingungen von diesen beiden Ringen nur der eine aufge-

spalten worden ist, während der andere intakt geblieben ist und relativ beständig zu sein scheint (vgl. das unten bei der Aufspaltung des Cholansäureisoxims Gesagte). Daß das erhaltene Produkt ein Gemisch von unverändert gebliebenem und von total aufgespaltenem Isodioxim sein könnte, halte ich nach dem einheitlichen Aussehen der Kristalle und dem nach dem Umkristallisieren konstant bleibenden Zersetzungspunkt für ausgeschlossen. Dem Reaktionsprodukt kommt also die Formel $C_{24}H_{38}N_2O_9$ zu, es mag als Biliansäureisoximamino-carbonsäure bezeichnet werden.

Die Aminosäure muß nach ihrer Entstehungsweise vier Carboxylgruppen aufweisen, von denen drei ursprünglich in der Biliansäure enthalten sind. Es wurde versucht, die Zahl der Carboxylgruppen maßanalytisch zu bestimmen. Dabei ergab sich, daß durch direkte Titration nur drei Carboxylgruppen nachweisbar sind, während die vierte unter dem Einfluß der Aminogruppe sich direkt nicht titrieren läßt, wohl aber, nach der Methode von Sörensen, nach Formolzusatz in Erscheinung tritt. Auch nach Formolzusatz wurde übrigens der volle Wert für Carboxyl nicht erreicht, die Zunahme ist aber so erheblich, daß ein Zweifel an der Anwesenheit von vier Carboxylgruppen in der Aminosäure nicht bestehen kann. Ich lasse die Resultate der Titrations unten folgen. Zur Ausführung der Bestimmungen sei bemerkt, daß die Substanz in ca. 100 ccm Wasser heiß gelöst wurde, die Lösung nach dem Erkalten mit $\frac{n}{10}$ -Natronlauge unter Verwendung von Phenolphthalein (10 Tropfen einer 1%igen alkoholischen Lösung) als Indikator titriert wurde (Versuch I). Bei den Versuchen II und III folgte auf die erste direkte Titration (II, a und III, a) eine zweite nach Zusatz von 10 ccm etwa 40%iger Formaldehydlösung (II, b und III, b), bei Versuch III auf die zweite noch eine dritte Titration nach weiterem Zusatz von 20 ccm Formaldehydlösung (III, c). Dieser weitere Zusatz von Formol erhöhte den Wert für Carboxyl nicht mehr wesentlich. Die zur Neutralisation der zugesetzten Formaldehydlösung erforderliche Menge Natronlauge wurde jedesmal abgezogen. Das Erkennen des Endes der Reaktion war bei den Titrations,

besonders bei denen mit Formol, nicht ganz leicht, auf besondere Genauigkeit sollen daher diese Bestimmungen auch keinen Anspruch machen, die Unterschiede der Titrationsen ohne und mit Formol sind aber in die Augen springend.

I.	0,1508 g Subst.	verbrauchen	9,2 ccm	n/10-NaOH;	gef. 27,45 %	Carboxyl;
II, a.	0,1500 "	"	9,1 "	"	"	27,30 % "
II, b.	0,1500 "	"	11,6 "	"	"	34,80 % "
III, a.	0,1330 "	"	8 "	"	"	27,07 % "
III, b.	0,1330 "	"	10,15 "	"	"	34,34 % "
III, c.	0,1330 "	"	10,25 "	"	"	34,68 % "
Ber. für $C_{24}H_{39}N_2O_9$:		3 Carboxylgruppen:	27,09 %	COOH;		
" " "		: 4	"	: 36,12 %	"	"

Es soll weiterhin versucht werden, auch den zweiten Lactamring des Biliansäureisodioxims aufzuspalten.

Umlagerung des Oxims der Cholansäure: Cholansäureisoxim.

Das Oxim der Cholansäure ist von mir bereits früher erhalten worden (vgl. Diese Zeitschrift, Bd. 69, S. 388 u. 389). Bezüglich seiner Darstellung sei noch folgendes bemerkt. Die Cholansäure scheint mit Hydroxylamin nur schwierig zu reagieren, dementsprechend wurden beim Oximieren nach der früher angegebenen Arbeitsweise stets mehr oder weniger große Mengen von Cholansäure unverändert gefunden, man erkennt dies daran, daß sich das isolierte und aus verdünntem Aceton umkristallisierte Reaktionsprodukt in 25%iger Salzsäure nicht vollständig löst. Das Oxim ist übrigens, beiläufig bemerkt, in salzsaurer Lösung, auch bei gewöhnlicher Temperatur, nicht sehr beständig. Liegt ein Gemisch von Oxim und Cholansäure vor, so kann man es zur Trennung mit 50%igem wässrigem Aceton (50 ccm Aceton, 50 ccm Wasser), ohne zu erwärmen, behandeln. Das Oxim geht dann in Lösung und läßt sich aus dem Filtrat durch Zusatz von Wasser kristallisiert erhalten. Eventuell wäre diese Behandlungsweise zu wiederholen. Zur möglichst vollständigen Bildung des Oxims wurde gegenüber der früheren Arbeitsweise die Menge des Hydroxylaminchlorhydrats verdoppelt, also etwa das Sechsfache der berechneten Menge angewandt, auch wurde die

Lösung mehrere Stunden auf dem Wasserbade erwärmt. In einem solchen Falle löste sich das isolierte Reaktionsprodukt vollständig in 25%iger HCl auf. Das Oxim beginnt, beim Erhitzen im Schmelzröhrchen, bei ca. 160° sich zu zersetzen, bei etwa 185–187° ist die Zersetzung vollständig (früher wurde für vollständige Zersetzung ca. 197° gefunden, die Substanz war damals wohl weniger rein). Eine Analyse¹⁾ ergab:
0,3553 g Subst.: 10,2 ccm N bei 13,5° und 759,8 mm Hg; gef. 3,42% N;
Ber. für $C_{24}H_{37}NO_7$: 3,11% N.

Da die Carbonylgruppe der Cholansäure wegen der großen Resistenz der Säure gegenüber Oxydationsmitteln nur eine ringförmig gebundene Ketongruppe sein kann, so war bei der Beckmannschen Umlagerung des Cholansäureoxims, analog den früher beschriebenen Oximumlagerungen, die Bildung eines Lactams zu erwarten.

Die Umlagerung geschah in der gleichen Weise, wie beim Dehydrocholsäuretrioxim und beim Biliansäuredioxim, nach dem — etwas modifizierten — Verfahren, das Wallach²⁾ für die Umlagerung der Oxime gesättigter, zyklischer Ketone anwandte.

0,5 g Oxim werden mit 6 ccm starker (etwa 90%iger) Schwefelsäure auf dem Wasserbade 20 Minuten erwärmt. Die Substanz geht dabei alsbald in Lösung und die Lösung färbt sich schwach braun. Nach dem Erkalten wird die Flüssigkeit in kaltes Wasser gegossen, wobei sofort eine weiße Ausscheidung eintritt. Diese wird nach mehreren Stunden abfiltriert, auf einem Tonteller getrocknet, in wenig Alkohol heiß gelöst und die Lösung mit heißem Wasser versetzt, worauf sich das Isoxim kristallinisch abscheidet. Auch aus Wasser allein, in dem es sehr schwer löslich ist, läßt sich das Isoxim umkristallisieren. Es bildet Nadeln, die unter dem Mikroskop als langgestreckte Sechsecke erscheinen und mitunter sternförmige Gruppierung zeigen. Im Schmelzröhrchen erhitzt, schäumt das

¹⁾ Ein Teil der Analysen wurde im hiesigen pharmakologischen Institut auf einem elektrischen Verbrennungssofen ausgeführt. Für die Erlaubnis zur Benutzung des Ofens bin ich dem Direktor des Instituts, Sr. Magnificenz Herrn Professor Gürber, zu großem Danke verpflichtet.

²⁾ Ann. d. Chem., Bd. 312, S. 171.

Isoxim unter Braunfärbung bei etwa 273—275° auf, nachdem es schon früher von 250—255° an schwaches Sintern gezeigt hat. Die Analyse (Trocknen bei 100—110°) lieferte folgende Werte:

0,1552 g Subst.: 0,3644 g CO₂ u. 0,1170 g H₂O; gef. 64,04% C u. 8,43% H;

0,3608 g Subst.: 11 ccm N bei 20° u. 734,4 mm Hg; gef. 3,43% N;

Ber. für C₂₄H₃₇NO₇: 63,81% C, 8,26% H und 3,11% N.

Sehr geeignet zur Unterscheidung des Oxims vom Isoxim ist wieder — wie bei den früher beschriebenen Oximen bzw. Isoximen — das Verhalten gegen siedende Säure. Beide Körper lösen sich in kalter (etwa 25%iger) Salzsäure auf; erhitzt man einige Zeit zum Sieden, so scheidet sich aus der Lösung des Oxims die sehr schwer lösliche Cholansäure aus, indem eine Zerlegung des Oxims in die Ketonsäure und Hydroxylamin stattgefunden hat, die Lösung des Isoxims bleibt dagegen, auch beim Abkühlen, vollständig klar, indem keine Veränderung des Isoxims eingetreten bzw. eine Aufspaltung zu der ebenfalls salzsäurelöslichen Aminosäure (s. unten) erfolgt ist.

Aufspaltung des Cholansäureisoxims:

Cholansäureaminocarbonsäure.

0,5 g Cholansäureisoxim wurden in 20 ccm 25%iger Salzsäure gelöst und die Lösung eine Stunde lang am Rückflußkühler gekocht. Beim Erkalten blieb die Lösung klar, auf Zusatz von Wasser erfolgte aber eine weiße Fällung. Es wurde nun so viel Wasser zugegeben, daß beim Kochen der Mischung die ganze Fällung bis auf minimale Mengen wieder in Lösung ging (die Gesamtflüssigkeitsmenge betrug etwa 375 ccm). Nach dem Filtrieren schied die Lösung beim Erkalten eine Kristallisation aus, die nach mehreren Stunden abgesaugt wurde. Nach Kristallform und Zersetzungspunkt (274—275°) lag unverändertes Isoxim vor, die Menge betrug etwa 60% des Ausgangsmaterials. Das Filtrat von der Kristallisation wurde auf dem Wasserbade eingeeengt, es blieb dabei zunächst klar, erst nach starkem Konzentrieren schieden sich Nadelchen, die unter dem Mikroskop die Form von langen Prismen zeigten, aus. Sie zersetzten sich bei 226—228°

(unscharf) und erwiesen sich als chlorhaltig. Die sehr spärliche Mutterlauge von diesen Prismen gab beim Verdünnen mit Wasser noch geringe Mengen einer kristallinischen Substanz, die nach ihrer Kristallform und dem Zersetzungspunkt (271—273°) aus unverändertem Isoxim bestehen mußte.

Die chlorhaltigen Nadelchen, in denen ich das Chlorhydrat der Aminosäure vermutete, wurden in wenig Wasser heiß gelöst; beim Erkalten gab die Lösung eine Kristallisation von feinen Blättchen, die unter dem Mikroskop die Gestalt von Rhomben, deren Ecken meist mehr oder weniger stark abgeschnitten waren, zeigten. Sie waren chlorfrei und wurden, nach dem Trocknen bei 100—110°, analysiert:

0,1626 g Subst.: 0,3650 g CO₂ u. 0,1238 g H₂O; gef. 61,22% C u. 8,52% H;
Ber. für C₂₄H₃₉NO₈: 61,36% C und 8,37% H.

Es lag somit die erwartete „Cholansäureaminocarbon-säure“ vor. Von einer Stickstoffbestimmung habe ich wegen Materialmangels vorerst Abstand genommen, zumal da der Unterschied im Stickstoffgehalt zwischen Isoxim (3,11%) und Aminosäure (2,99%) nur gering ist.

Sehr charakteristisch ist das Verhalten der Aminosäure beim Erhitzen im Schmelzröhrchen: bei 194—195° schmilzt die Substanz unter Aufschäumen zu einer farblosen Flüssigkeit, die aber bald wieder zu einer weißen, schaumigen Masse erstarrt; beim weiteren Erhitzen schäumt diese Masse bei 274—275° (dem Zersetzungspunkt des Isoxims) abermals, und zwar unter Braunfärbung, auf. Die Aminosäure geht offenbar beim Erhitzen unter Wasserabspaltung in das Lactam (Isoxim) über, ein Verhalten, das näher geprüft werden soll, sobald ich im Besitz von größeren Mengen Cholansäure sein werde.

Bei einem andern Versuch zur Aufspaltung des Cholansäureisoxims war das Verfahren das gleiche, wie eben beschrieben, nur wurde statt einer Stunde vier Stunden lang am Rückflußkühler gekocht. Bei diesem Versuch blieben ca. 26% vom angewandten Isoxim unverändert, dementsprechend wurde eine etwas größere Menge des Chlorhydrats der Aminosäure erhalten.

Aus den beschriebenen Versuchen geht hervor, daß der Lactamring des Cholansäureisoxims nicht leicht aufspaltbar ist, das erinnert an das Verhalten des zweiten Lactamringes des Biliansäureisodioxims, der gleichfalls relativ beständig zu sein scheint (s. oben). Nun wissen wir durch die vor kurzer Zeit veröffentlichten Untersuchungen von W. Borsche und Emmy Rosenkranz (l. c.), daß die Biliansäure ($C_{24}H_{34}O_6$) durch Reduktion in Cholansäure ($C_{24}H_{36}O_7$) übergeführt werden kann, daß beide Säuren sich also nur dadurch unterscheiden, daß an Stelle einer CO-Gruppe der Biliansäure in der Cholansäure eine CH_2 -Gruppe steht. Der der gemeinsamen (stellungsgleichen) CO-Gruppe entsprechende Lactamring dürfte der schwer aufspaltbare sein.
