

# Untersuchungen über die Gallensäuren.

## IX. Mitteilung.

### Über den Mechanismus der Wasserabspaltung aus den Gallensäuren.

Von

Heinrich Wieland und Erich Boersch.

(Aus dem organ.-chem. Laboratorium der Technischen Hochschule zu München.)  
(Der Redaktion zugegangen am 18. April 1920.)

Wenn man Cholsäure auf Temperaturen über 300° erhitzt, so geht sie unter Abspaltung von 3 Mol. Wasser in Cholatriensäure  $C_{24}H_{34}O_2$ <sup>1)</sup> über, die sich im Vakuum abdestillieren läßt. In gleicher Weise entsteht aus Desoxycholsäure unter Abgabe zweier Mol. Wasser Choladiensäure<sup>2)</sup>  $C_{24}H_{36}O_2$ .

Wir haben diese Reaktionen früher immer so aufgefaßt, daß aus den sekundären Alkoholgruppen einfach Wasser abgespalten wird



wodurch dann jeweils eine Doppelbindung entsteht.

Und doch ist der Verlauf ein etwas komplizierterer. Schon gegen 200° verlieren nämlich die beiden Säuren Wasser, ohne daß eine Doppelbindung gebildet wird. Die quantitative Untersuchung ergab, daß bei dieser Temperatur beide Säuren ziemlich genau  $\frac{1}{2}$  Mol. Wasser abgeben, daß also eine An-

<sup>1)</sup> Diese Zeitschr. Bd. 80, S. 296 (1912).

<sup>2)</sup> Ebenda Bd. 98, S. 59 (1916).

hydridbildung zwischen 2 Mol. Säure stattfindet. Die Schmelze der Cholsäure erwies sich zusammengesetzt aus Cholsäureanhydrid, das wir rein dargestellt haben, und einem sauren dimolekularen Anhydrid, einem sog. Dyslysin. Hierbei hat sich eine alkoholische Hydroxylgruppe mit der Carboxylgruppe des 2. Moleküls verestert. In der Desoxycholsäureschmelze ist überwiegend Desoxycholsäureanhydrid enthalten.

Bemerkenswert ist die außerordentliche Beständigkeit der beiden Säureanhydride. 12stündiges Erhitzen mit Alkohol auf  $130^{\circ}$  und 6stündiges Erhitzen mit Anilin auf 200 bis  $210^{\circ}$  lassen das Cholsäureanhydrid unverändert. Alkalien greifen äußerst langsam an. Nur durch mehrstündiges Erhitzen mit Äthylat auf  $130^{\circ}$  war eine glatte und quantitative Aufspaltung möglich.

Erhitzt man die Schmelzen, deren Zusammensetzung wir somit festgestellt haben, im Vakuum weiter, so destillieren in bekannter Weise die ungesättigten Säuren über. Auch die reinen Säureanhydride gehen unter diesen Umständen in die ungesättigten Säuren über. Es ergibt sich daher folgender Einblick in die Reaktion: An der ersten Phase der Anhydrisierung sind die Carboxylgruppen beteiligt. Erst später werden Doppelbindungen gebildet. Das hierbei frei werdende Wasser zerlegt die anfangs entstandenen Anhydridgruppen wieder unter Bildung der ungesättigten Säuren.

Mit dem Studium der Wasserabspaltung aus Cholsäure und Desoxycholsäure hat sich schon im Jahr 1887 Latschinoff<sup>1)</sup> beschäftigt, ohne daß er dabei zu exakten Resultaten gekommen wäre. In der Zusammensetzung seines Cholsäureanhydrids, der rohen Schmelze, glaubt er eine Stütze für die von ihm vertretene Auffassung der Cholsäure als  $C_{25}H_{42}O_5$  zu finden.

Wir haben weiterhin noch einige Versuche angestellt, um die Wasserabspaltung aus der Cholsäure auf chemischem Weg zu bewirken. Namentlich haben wir uns mit der Einwirkung von konzentrierter Salzsäure beschäftigt, die in der Tat

<sup>1)</sup> B. 20, S. 1043 (1887).

wasserabspaltend und nicht unter Ersatz von Hydroxyl durch Chlor mit Cholsäure reagiert. Es war uns in diesem Zusammenhang darum zu tun, näheres über die sog. Dyslysine zu erfahren, die frühere Bearbeiter<sup>1)</sup> auf diesem Wege erhalten haben und die als intermolekulare Ester der Cholsäure gelten. Diese Auffassung kann nicht aufrecht erhalten werden; unter den von uns angewandten Bedingungen entsteht in der Hauptsache ein Gemisch ungesättigter Säuren, dem wir keine einheitliche Substanz entziehen konnten.

Bei der Einwirkung von Salzsäuregas auf in Eisessig gelöste Cholsäure erhielten wir die bisher nicht bekannt gewordene Triacetylcholsäure als schön kristallisierte Verbindung.

Auch bei der Desoxycholsäure ist uns eine glatte Wasserabspaltung durch wasserentziehende Mittel nicht gelungen. Ein Versuch mit Ameisensäure hat uns die gut charakterisierte Diformyl-desoxycholsäure geliefert, die sich zum Nachweis der Desoxycholsäure gut eignet. Beim längeren Kochen von Desoxycholsäure mit Eisessig findet Acetylierung statt, worauf bei der Reinigung dieser Säure zu achten ist (vgl. VIII. Mitteilung S. 130).

### I. Die Anhydrierung der Cholsäure.

Für die Versuche wurde reinste Cholsäure vom Schmelzpunkt  $197^{\circ}$  verwendet, die aus Alkohol umkristallisiert und durch mehrstündiges Erhitzen im Vakuum auf  $120^{\circ}$  vollkommen von Kristallalkohol befreit war. Je ungefähr 2 g der Säure wurden in einem dickwandigen Filtrierröhrchen im Metallbad an der Wasserstrahlpumpe etwa 2 Stunden lang auf  $200\text{--}210^{\circ}$  erhitzt. Bei längerem Erhitzen fand keine Gewichtsabnahme mehr statt.

So verloren

2,2108 g	Cholsäure	0,053 g	Wasser	= 2,403 %
1,8418 g	"	0,044 g	"	= 2,389 %
1,8194 g	"	0,0406 g	"	= 2,232 %

<sup>1)</sup> z. B. Strecker, A. 67, 27.

Für die Abspaltung von 1 Mol. Wasser aus 2 Mol. Cholsäure berechnen sich 2,21%. Die Schmelze erstarrt beim Erkalten zu einem schwach gelblichen, spröden, kolophoniumartigen Harz, zerrieben bildet es ein weißes Pulver. Die Analyse des Rohprodukts bestätigt den aus dem Gewichtsverlust erschlossenen Reaktionsverlauf.

0,2002 g: 0,5326 CO<sub>2</sub> und 0,1740 H<sub>2</sub>O.

C <sub>48</sub> H <sub>78</sub> O <sub>9</sub>	Ber.: C 72,18	H 9,77
	Gef.: C 72,55	H 9,72

Bei der Titration mit  $\frac{n}{10}$  KOH in Alkohol wurde als Durchschnitt aus vier Präparaten die Äquivalentzahl 833 gefunden. Daraus ergibt sich ohne weiteres die Zusammensetzung der Schmelze, da das saure Esteranhydrid, die Cholylocholsäure, von der drei Isomere entstehen können, das Äquivalent 798 hat, während Cholsäureanhydrid überhaupt kein Alkali verbraucht. Die Schmelze enthält 95% an sauren Anhydriden, 5% an Cholsäureanhydrid.

Die gepulverte Schmelze ist in Essigester, Petroläther, Äther vollkommen unlöslich, schwer löslich in siedendem Chloroform und Methylalkohol, von Alkohol und Eisessig wird sie beim Kochen fast vollständig gelöst. Gegen Permanganat ist sie gesättigt, wenigstens in gleichem Maße wie Cholsäure selbst. Bei 3stündigem Erhitzen mit zwei Äquivalenten Äthylat in der 10fachen Menge Alkohol im Einschlußrohr auf 120—125° wird quantitativ Natriumcholat zurückgebildet, das zum größten Teil beim Erkalten auskristallisiert. Schmelzpunkt der daraus hergestellten Cholsäure 196—197°.

Zur Darstellung des Cholsäureanhydrids wird die fein gepulverte Schmelze aus 20 g Cholsäure in 100 ccm siedenden Alkohols eingetragen. Die anfangs klare Lösung scheidet bald in der Hitze das Säureanhydrid sehr fein kristallisiert aus.

Man kocht nach dem Eintragen noch einige Zeit weiter, saugt heiß ab und wäscht den Niederschlag mit heißem Alkohol nach. Es wird nun in der Hitze, in Alkohol suspendiert, mit alkoholischem Kali behandelt, bis die alkalische Reaktion (Phenolphthalein) 10 Minuten lang stehen bleibt. Dann wird

abgesaugt, heiß gewaschen und getrocknet. Das so erhaltene Cholsäureanhydrid bildet ein klein kristallinisches farbloses Pulver und schmilzt bei  $320-323^{\circ}$  unter Aufschäumen (Wasserabspaltung).

0,1792 g: 0,4760  $\text{CO}_2$  und 0,1558  $\text{H}_2\text{O}$ .

$\text{C}_{48}\text{H}_{78}\text{O}_9$  Ber.: C 72,18    H 9,77

Gef.: C 72,44    H 9,72

Das Anhydrid ist in den üblichen organischen Lösungsmitteln auch in der Hitze sehr schwer löslich. Durch 6stündiges Erhitzen mit Äthylat auf  $130^{\circ}$  wird es vollständig zu Natriumcholat aufgespalten. 4 g der Substanz gaben, im Schwertkolben im Vakuum nach der bekannten Methode destilliert, in der auch mit Cholsäure erhaltenen Ausbeute Cholatriensäure. Schmelzpunkt der aus Alkohol zweimal umkristallisierten Säure  $162-163^{\circ}$ , Mischschmelzpunkt mit reiner Cholatriensäure  $163^{\circ}$ .

## II. Die Anhydrisierung der Desoxycholsäure.

Die Operation wurde in der gleichen Weise wie bei der Cholsäure vorgenommen. Ein Unterschied im Verhalten der ersten Anhydridstufe gegen dort besteht darin, daß bei der Temperatur, bei der das erste Mol. Wasser abgespalten wird, auch langsam ein weiterer Wasserverlust stattfindet. Man kommt hier bei  $200-210^{\circ}$  nicht zu einem festen Haltepunkt. Demgemäß wurde der Gewichtsverlust bei drei quantitativen Bestimmungen etwas zu hoch gefunden.

Als Material diente die reine Eisessigverbindung der Desoxycholsäure, die zuvor im Vakuum bei  $120^{\circ}$  vollständig von Eisessig befreit war (Konstanzwägung). Es wurde zwei Stunden lang auf  $200-210^{\circ}$  erhitzt.

Wasserverlust:

2,3325 g Desoxycholsäure verloren 0,063 g  $\text{H}_2\text{O} = 2,70\%$

1,7968 g                   "                   "    0,0518 g  $\text{H}_2\text{O} = 2,88\%$

2,0758 g                   "                   "    0,0592 g  $\text{H}_2\text{O} = 2,85\%$

Für 2 Mol. Desoxycholsäure minus 1  $\text{H}_2\text{O}$  berechnen sich  $2,29\%$ .

Nach 4stündigem Erhitzen stieg die Abnahme auf 3,22%, nach 8stündigem auf 3,52%. Die erstarrte Schmelze gleicht vollkommen der aus Cholsäure erhaltenen, die Farbe ist stärker gelb. Das Säureanhydrid bleibt beim öfteren Auskochen des fein gepulverten Harzes ungelöst zurück; zur vollkommenen Reinigung wurde noch mehrere Tage im Soxhlet-Apparat mit Alkohol extrahiert. Die geringe Löslichkeit der Substanz verhinderte die Umkristallisation.

Das gereinigte Desoxycholsäureanhydrid, das in seinen Eigenschaften mit dem Anhydrid der Cholsäure durchaus übereinstimmt, schmilzt bei 275—280° unter Schäumen.

0,1611 g: 0,4463 CO<sub>2</sub> und 0,1487 H<sub>2</sub>O.

C<sub>48</sub>H<sub>79</sub>O<sub>7</sub> Ber.: C 75,20 H 10,18

Gef.: C 75,55 H 10,33

Durch Verseifung mit Äthylat (2<sup>1</sup>/<sub>2</sub> Stunden auf 130—140° erhitzt) entsteht glatt Desoxycholat, das in schöner Kristallisation herauskommt. Die Säure, die daraus isoliert wurde, wie auch die aus der Mutterlauge erhaltene, schmolz nach dem Umkristallisieren aus Eisessig bei 142—143°, wie ein Kontrollpräparat der Eisessigverbindung der Desoxycholsäure. Die Destillation von Desoxycholsäureanhydrid lieferte in guter Ausbeute Choladiensäure. Das aus Alkohol umkristallisierte Destillat schmolz scharf bei 132°, bei der gleichen Temperatur schmolz ein Gemisch des Präparats mit reiner Choladiensäure.

### III. Einwirkung von konzentrierter Salzsäure auf Cholsäure.

Da feste Cholsäure von konzentrierter wäßriger Salzsäure nur sehr langsam und unvollständig in der Kälte angegriffen wird, haben wir uns mit Erfolg des kleinen Kunstgriffs bedient, konzentrierte wäßrige Natriumcholatlösung unter Schütteln in die Säure einfließen zu lassen. Dabei kommt die Cholsäure gar nicht zur Ausscheidung und wird vollkommen umgesetzt.

10 g Natriumcholat, in 40 ccm Wasser gelöst, wurden so in kleinen Anteilen in 750 ccm konzentrierter Salzsäure bei ca. 15° eingegossen. Die klare Lösung färbte sich nach

einiger Zeit rosenrot, nach mehreren Stunden war sie schön blauviolett geworden. Diese auffallende Halochromieerscheinung der Cholsäure bzw. eines ihrer Reaktionsprodukte hat schon Hammarsten<sup>1)</sup> beobachtet. Nach 12stündigem Stehen hatte sich ein Teil der neu gebildeten Substanzen als schwach rötliche Kruste an der Oberfläche abgeschieden (4 g), der Rest wurde durch Verdünnen der Salzsäure mit Wasser ausgefällt (3,8 g). Das schwach gelblich gefärbte halogenfreie, gegen Permanganat ungesättigte Präparat besitzt ganz andere Eigenschaften als die sog. Dyslysine. Es ist sehr leicht löslich in Benzol, Essigester, Äther, Alkohol, Eisessig. Analyse und Titration zeigen, daß ein Gemisch verschiedener Säuren vorliegt; die Isolierung einer einheitlichen Verbindung ist nicht gelungen. Die ammoniakalische Lösung des Säuregemisches wird durch Baryumchlorid gefällt. Die aus den Baryumsalzen durch Umkochen mit Soda wieder isolierten Säuren ließen sich ebenfalls nicht entwirren. Unter der katalytischen Wirkung von Palladiumschwarz nimmt das Gemisch Wasserstoff auf. Brom in Eisessiglösung wird auch sofort aufgenommen.

Zwei Analysen stimmten auf die Zusammensetzung  $C_{48}H_{74}O_7$  (C 75,54, 75,62, H 9,99, 9,81; ber.: C 75,59, H 9,71), die Äquivalentzahl bei der Titration ist 420. Daraus ergibt sich, daß ein geringer Betrag (5–10 %) eines dimolekularen Anhydrids ungesättigter Säuren mit diesen ungesättigten Säuren selbst in dem Reaktionsprodukt von konzentrierter Salzsäure und Cholsäure vereinigt ist. Die ungesättigten Säuren sind zweifellos die einfache Anhydrocholsäure  $C_{24}H_{38}O_4$  und die zweifache Anhydrosäure  $C_{24}H_{36}O_8$ , die, in äquivalenten Anteilen vorhanden, die Zusammensetzung  $C_{48}H_{74}O_7$  ergeben. Die Schwierigkeiten der Trennung, die übrigens nicht bis zur Erschöpfung aller Möglichkeiten bearbeitet wurde, erhöhen sich noch dadurch, daß die beiden ungesättigten Säuren in je drei isomeren Formen auftreten können, wobei die Wasserabspaltung aus je einer Carbinolgruppe nur nach einer Richtung hin angenommen wird.

<sup>1)</sup> Diese Zeitschr. Bd. 61, S. 495 (1909).

## IV. Triacetylcholsäure.

In die Lösung von 10 g Cholsäure in 100 ccm Eisessig wird bei 20° bis zur Sättigung Salzsäuregas eingeleitet. In einigen Fällen hat sich dabei in schönen farblosen Kristallen das schon beschriebene Chlorhydrat der Cholsäure, wahrscheinlich ein Oxoniumsalz, ausgeschieden. Es geht nach einiger Zeit wieder in Lösung. Die Farbe wird hellbraun, nach 12stündigem Stehen ist sie wie mit wässriger Salzsäure violett geworden. Man gießt jetzt in 750 ccm Wasser und erhält 10,8 g eines flockigen Niederschlags, der schwach halogenhaltig und gegen Permanganat ungesättigt ist. Durch Umkristallisieren aus Essigester läßt sich aus dem Rohprodukt die reine Triacetylcholsäure in feinen farblosen Nadelchen vom Schmelzpunkt 257° gewinnen. Wiederholte Reinigung mit dem gleichen Lösungsmittel verändert ihren Schmelzpunkt nicht.

0,1693 g: 0,4190 CO<sub>2</sub> und 0,1332 H<sub>2</sub>O; 0,1838 g: 0,4538 CO<sub>2</sub> und 0,1460 H<sub>2</sub>O.

C <sub>30</sub> H <sub>46</sub> O <sub>8</sub>	Ber.: C 67,41	H 8,61
	Gef.: C 67,49, 67,33	H 8,80, 8,88

Im Essigester befindet sich noch ein Teil der gebildeten Triacetylcholsäure gelöst, den man wie folgt isoliert. Nachdem das Lösungsmittel abgedampft ist, nimmt man den Rückstand in verdünntem Ammoniak auf und fällt mit Baryumchlorid. Im Filtrat von den unlöslichen Baryumsalzen bleibt das Triacetylcholat gelöst, die Säure wird ausgefällt und nach dem Trocknen aus Essigester umkristallisiert. Die zweite Analyse ist mit einem derart isolierten Präparat ausgeführt. Aus dem unlöslichen Salz stellt man nach dem Umkochen mit Soda die freie Säure her, die ein Gemisch darstellt und neben den Komponenten des im vorigen Abschnitt behandelten Reaktionsprodukts (Anhydrosäuren) wahrscheinlich die schon von Mylius<sup>1)</sup> in amorphem Zustand erhaltene Diacetylcholsäure enthält. Beim Verseifen der Rohsäure mit Äthylat am Wasserbad schied sich in ansehnlicher Menge Cholat aus.

<sup>1)</sup> B. 19, S. 2000 (1886).

Um die Konstitution der Triacetylcholsäure ganz sicherzustellen, wurden 0,5 g der Substanz in der üblichen Weise mit einem Überschuß von Äthylat durch vierstündiges Kochen verseift. Abscheidung von Natriumcholat. Schmelzpunkt der daraus frei gemachten Cholsäure 196°. Im eingedampften Filtrat wurde Essigsäure in bekannter Weise nachgewiesen.

### Di-formyl-Desoxycholsäure.

2 g Desoxycholsäure (Eisessigverbindung) werden mit 10 ccm 95%iger Ameisensäure im offenen Kolben einige Stunden auf dem Wasserbad erwärmt. Die hierbei eingeeengte Lösung erstarrt beim Erkalten und Reiben zu einem Kristallbrei, dessen fester Inhalt durch Zugabe von Äther isoliert wird und nach dem Umkristallisieren aus Alkohol die reine Di-formylverbindung darstellt. Prachtvolle farblose Prismen vom Schmelzpunkt 193°.

0,1328 g: 0,3388 CO<sub>2</sub> und 0,1091 H<sub>2</sub>O.

C <sub>28</sub> H <sub>40</sub> O <sub>5</sub>	Ber.: C 69,64	H 8,93
	Gef.: C 69,58	H 9,21

Die Säure ist in den meisten Lösungsmitteln leichter löslich als Desoxycholsäure, so in Benzol, Essigester, Aceton, Chloroform. In Alkohol und Eisessig löst sie sich schwieriger. In Äther ist sie auch schwer löslich. Durch Verseifung mit alkoholischem Kali wird Desoxycholsäure zurückgebildet.

### Acetyl-desoxycholsäure (bearbeitet von P. Weyland).

Bei der Reinigung der Desoxycholsäure durch Kristallisation aus Eisessig muß längeres Kochen vermieden werden. Geschieht dies nicht, so kristallisiert die Säure aus der dreifachen Menge des Lösungsmittels in der Kälte nicht aus; die mono-acetylierte Desoxycholsäure ist entstanden. Zur Isolierung wird der Eisessig verdampft und der Rückstand in Äther aufgenommen. Nachdem der Äther bis auf ein kleines Volumen abdestilliert ist, kristallisiert nach einigem Stehen die Acetylverbindung aus. Man reinigt sie durch Extraktion mit Äther in der Hülse und erhält sie so in prächtigen farblosen rhomboedrigen Plättchen, die Kristalläther enthalten

und bei 115° unter Aufschäumen schmelzen. Aus sehr wenig Alkohol kommt die acetylierte Säure ebenfalls in prächtigen Kristallen, die bei 95° unter Aufschäumen schmelzen, dann wieder fest werden, um dann bei 161—162° scharf zum zweitenmal zu schmelzen. Im Hochvakuum bei 110° getrocknet, verlor die Substanz 9% an Gewicht, das ist nicht ganz 1 Mol. Alkohol.

6,717 mg: 17,745 CO<sub>2</sub> und 6,027 H<sub>2</sub>O.

C <sub>26</sub> H <sub>42</sub> O <sub>5</sub>	Ber.: C 71,83	H 9,75
	Gef.: C 72,05	H 10,02.

Acetyldesoxycholsäure ist in den üblichen Lösungsmitteln leichter löslich als Desoxycholsäure. Ihr Baryumsalz ist auch in Wasser schwer löslich. Es fällt direkt in Flocken aus, während Baryumdesoxycholat stets zu Anfang schmierig herauskommt. Durch Kochen mit Lauge wird die acetylierte Säure zu Desoxycholsäure verseift.