(Aus dem physiologischen Institut der Universität Graz.)

Ueber Eigenschaften und Darstellung zweier Derivate der Cholalsäure.

- (1. Anhydrid der ihr entsprechenden einwerthigen Monocarbonsäure.
2. Biliansäure.)

Von

Dr. **Fritz Pregl**, Assistenten am Institute.

I.

Vor einiger Zeit habe ich in diesem Archiv¹⁾ davon Mittheilung gemacht, dass siedende Jodwasserstoffsäure die drei alkoholischen Hydroxylgruppen der Cholalsäure reducirt und zu einer Säure führt, die ausser in der Carboxylgruppe, sonst kein Sauerstoffatom enthält. Diese einwerthige Monocarbonsäure war mir damals nur mit grosser Mühe und in sehr geringer Menge zugänglich, weil bei der Behandlung der Cholalsäure mit siedender JH-Säure bei Gegenwart von rothem Phosphor neben der Reduction auch theilweise Jodirung eintritt und die Isolirung des jodfreien Körpers aus diesem Gemische nach der mühsamen Methode der fractionirten Ausschüttelung nur mit einem grossen Aufwande an Material und auch dann nur in sehr geringer Ausbeute gelingt.

Ich war daher seitdem bestrebt, mir diesen Körper in grösserer Menge dadurch zugänglich zu machen, dass ich das Jod daraus zu entfernen suchte. Da mir Natriumamalgam in alkalischer Lösung keine befriedigenden Resultate lieferte, versuchte ich es mit Zinkstaub in eisessigsaurer Lösung, wodurch ich zum erwünschten Ziele kam. Da auch in anderer Beziehung das Verfahren der Darstellung

1) F. Pregl, Ueber die Darstellung und einige Reactionen der Cholalsäure. Pflüger's Archiv Bd. 71 S. 303—317. 1898.

geändert und vereinfacht worden, soll es im Folgenden mitgetheilt werden.

10 gr bei 130° getrockneter reiner Cholalsäure¹⁾ werden in einem Kölbchen mit 50–100 g frisch über einem erbsengrossen Stückchen gelben Phosphors abdestillirter JH-Säure vom Siedepunkt 127° C. übergossen, ein Stückchen gelben Phosphors zugefügt und am Drahtnetz, am besten unter Rückfluss, so lange gekocht, bis die Flüssigkeit und das Reactionsproduct entfärbt sind. Zur Vorsicht kocht man noch einige Stunden weiter. Nach dem Abkühlen wird die Jodwasserstoffsäure abgegossen, Kölbchen sammt Inhalt mit destillirtem Wasser ausgespült und das Reactionsproduct im Kölbchen durch kochenden Eisessig in Lösung gebracht. In die kochende Lösung trägt man in ganz kleinen Portionen Zinkstaub nach und nach ein, filtrirt heiss durch ein Faltenfilter in Wasser und wäscht mit siedendem Eisessig nach. Im Wasser fällt der Körper grösstentheils klumpig aus, zum Theil ist er darin durch Essigsäure in Lösung gehalten. Stumpft man daher die Säure mit Natronlauge bis zur schwach sauren Reaction ab, dann erhält man noch einen Niederschlag, der am Filter gesammelt werden kann. Das Ganze wird in sehr verdünnter Kalilauge am Wasserbade gelöst, nach dem Filtriren und Erkaltenlassen mit der eben hinreichenden Menge Essigsäure als flockige, gequollene Masse gefällt. Beim vorsichtigen Erwärmen am Wasserbade auf etwa 50–60° fällt das Anhydrid als sandiger Niederschlag zu Boden, der sich nach dem Abkühlen an der Pumpe rasch absaugen und waschen lässt. Dieser Körper ist vollkommen jodfrei, er enthält aber noch etwas Asche. Um ihn davon zu befreien, löst man ihn nochmals in einem grossen Volum sehr verdünnter Kalilauge und behandelt ihn wie zuvor weiter, nur mit dem Unterschiede, dass jetzt verdünnte Salzsäure zum Fällern in Verwendung kommt. Nach dem Erwärmen wird das gefällte Anhydrid an der Pumpe abgesaugt, gewaschen und im Vacuum getrocknet. Ausbeute fast quantitativ.

0,1803 g lieferten bei der Verbrennung nach Lippmann-Fleissner²⁾ 0,1694 g H₂O und 0,5322 g CO₂

1) Ueber die Darstellung siehe Pregl, l. c.

2) E. Lippmann und F. Fleissner, Ueber die Bestimmung des Kohlenstoffs und Wasserstoffs mittelst Kupferoxydasbest. Monatshefte f. Chemie Bd. 7 S. 9–19. 1886.

Gefunden:		Berechnet für das Anhydrid
		$C_{48}H_{78}O_3$:
C %	80,52	81,97
H %	10,52	11,19

Dieser Körper zeigt, wie die jodfreien, oder besser jodärmsten Fractionen der früheren Darstellung die Pettenkofer'sche Gallensäurenreaction und die von mir schon früher¹⁾ mitgetheilte Fällbarkeit seiner Kalisalzlösungen durch Kohlensäure. Dieses Anhydrid schmilzt grösstentheils zwischen 76 und 80°; daraufhin halte ich es für identisch mit dem Cholylsäureanhydrid von Senkowski, dessen Arbeit mittlerweile erschienen ist²⁾. Daraus entnehme ich ferner, dass Senkowski diesen Körper in etwas anderer Weise darstellt. Er erhitzt nämlich Cholsäure mit Jodwasserstoffsäure, deren Stärke nicht näher angegeben wird, mit rothem Phosphor in einer Druckflasche oder in der Bombe durch 24 Stunden auf 100° C. und entfernt das Jod ebenfalls durch Reduction mit Zinkstaub in Eisessig. Ein Vortheil meiner Darstellungsart gegenüber dieser ist wohl auch der, dass man binnen wenigen Stunden von der Cholsäure zum Cholylsäureanhydrid gelangt. Ich muss aber ausdrücklich betonen, dass dazu die Jodwasserstoffsäure den Siedepunkt 127° haben muss, weil, wie ich mich überzeugt, eine verdünntere diese Reduction in der angegebenen Zeit nicht bewirkt.

Hervorzuheben wäre noch, dass ich im Gegensatz zu Senkowski wie früher annehme, dass die der Cholsäure entsprechende einwerthige Monocarbonsäure nicht nur als Anhydrid, sondern auch als freie Säure vorkommt, und stütze mich dabei auf folgenden Reagenzrohrversuch. Bringt man zu einer geringen Menge des Anhydrides in einer Eprouvette Wasser und einige Tropfen Kalilauge, so bleibt die Hauptmenge darin ungelöst, erst beim Kochen geht alles in Lösung. Fügt man der vollständig erkalteten Flüssigkeit Salzsäure bis zur sauren Reaction zu, dann tritt eine Fällung in Form gallertiger Flocken ein, die sich in der Kälte auf Zusatz von Kalilauge beim Umschütteln vollkommen lösen. Erwärmt man aber nach der Fällung mit Salzsäure vorsichtig am Wasserbade, so geht der flockige Niederschlag schon bei einer Temperatur von 50—60°, also weit unter

1) Pregl, l. c. S. 312.

2) M. Senkowski, Ueber die Einwirkung der Reductionsmittel auf Cholsäure. Monatshefte f. Chemie Bd. 19 H. 1. 1898.

dem Schmelzpunkte des Anhydrides in die sandige Form über, welche sich nach dem Abkühlen als in Kalilauge grossentheils unlöslich erweist. Da diese Zustandsänderung so weit unter dem Schmelzpunkte erfolgt, bin ich geneigt, diese nicht für eine einfache Ballung des Niederschlages zu halten, sondern halte die Fällung mit Salzsäure in der Kälte für die freie Monocarbonsäure, und das sandige Pulver für ihr Anhydrid. Für die Darstellung ist es aber viel vortheilhafter, stets auf das Anhydrid hinarbeiten, weil sich dieses im Gegensatze zu der freien Säure ausserordentlich leicht an der Pumpe absaugen und waschen lässt.

Bei der Behandlung dieses Körpers mit siedender concentrirter Salpetersäure bin ich jetzt, seit mir durch die eben mitgetheilte Darstellung mehr Ausgangsmaterial zugänglich geworden, zu Resultaten gekommen, die von meinen früheren etwas abweichen. Ich möchte darüber vorläufig nur erwähnen, dass ich in diesem Reactionsproducte auch auf einen in zu Drusen vereinigten Nadelchen krystallisirten Körper gestossen bin.

II. Darstellung der Biliansäure.

Da eine Spaltung der Biliansäure an der Stelle ihrer beiden Ketongruppen unsern Einblick in die Constitution der Cholsäure wesentlich fördern würde, stellte ich mir, um einige Spaltungsreactionen versuchen zu können, nach dem von Mylius angegebenen Verfahren Biliansäure dar. Dabei bin ich auf eine wesentliche Verbesserung der Ausbeute und auf eine grosse Vereinfachung der Darstellungsmethode gekommen; ich glaube daher am besten zu thun, wenn ich vorerst das Verfahren von Mylius anführe. Er schreibt¹⁾:

„Man geht zur Gewinnung der Biliansäure nach Latschinoff's Vorschlag zweckmässig von der Cholsäure aus, welche man in folgender Weise verarbeitet: 20 g feingepulverter, durch Erhitzen bei 100° vom Alkohol befreite Cholsäure wird in eine Mischung von 60 gr H₂SO₄, 160 g Wasser und 40 g Kaliumdichromat eingetragen. Innerhalb einer halben Stunde erwärmt sich das Gemisch beträchtlich, die Gallensäure wird jedoch nicht gelöst, sondern bleibt in Suspension. Man hat durch Umschwenken dafür zu sorgen, dass sie gleichmässig in der Mischung vertheilt bleibe. Indem man eine

1) Mylius, Ueber die Cholsäure. Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft Bd. 20 S. 1968—1989. 1887.

stürmische Reaction zu vermeiden sucht, erwärmt man zuletzt auf dem Wasserbade, bis die Farbe der Mischung in Grün übergegangen ist. Das Oxydationsproduct wird abfiltrirt und mit Wasser gewaschen, zur Entfernung des anhaftenden Chromsalzes in Natronlauge gelöst und aus dem Filtrat durch Salzsäure gefällt. Auch für die Reinigung der Biliansäure habe ich das Verfahren von Latschinoff innegehalten. Um die Biliansäure von der daneben vorhandenen Dehydrocholsäure zu befreien, führt man sie in ein in Alkohol unlösliches Salz über. Latschinoff hat sich des sauren Baryumsalzes bedient; mir schien es zweckmässiger, die Kaliumverbindung als Trennungsmittel zu benützen. Eine Lösung des Oxydationsproductes in absolutem Alkohol wird mit einer beschränkten Menge alkoholischer Kalilauge versetzt; es fällt ein pulveriges, kaum in Alkohol lösliches Kaliumsalz aus, welches mit heissem Alkohol gewaschen werden kann. Im Filtrat befindet sich die Dehydrocholsäure, deren Kaliumverbindung in Alkohol leicht löslich ist. Die aus dem sauren Kaliumsalze in wässriger Lösung mit Hülfe von Salzsäure ausgeschiedene Biliansäure ist aber noch keineswegs rein, sie lässt sich aus Lösungsmitteln nicht krystallisirt erhalten und wird darum zunächst in ihren Diäthylester übergeführt. Latschinoff bewirkt dies, indem er das Bleisalz mit Jodäthyl behandelt; ich habe es vorgezogen, die Verbindung durch Einleiten von Chlorsäure in die alkoholische Lösung der Säure herzustellen. Man kühle die Mischung dabei; ist dieselbe concentrirt, so erhält man nach kurzer Zeit eine Ausscheidung gut ausgebildeter Nadeln, welche abfiltrirt, mit Aether gewaschen und aus wenig Alkohol umkrystallisirt werden können. Sie schmelzen bei 190° und stellen den reinen Diäthylester der Biliansäure dar, $C_{24}H_{32}O_8(C_2H_5)_2$. — Durch Fällung dieses mit Natronlauge verseiften Esters mit Salzsäure, isolirte dann Mylius die reine krystallisirte Biliansäure.

So oft und so sorgfältig ich auch nach diesem Verfahren von Mylius gearbeitet haben mochte, immer entstanden bei der Reaction so erhebliche Mengen von Dehydrocholsäure, dass die Ausbeute an Biliansäure stets eine sehr schlechte blieb. Ueberdies ist das Verfahren so umständlich und zeitraubend, dass ich mit dem nachstehend Mitgetheilten einem Bedürfnis zu entsprechen glaube.

Da die Dehydrocholsäure als erste Oxydationsstufe der Cholsäure bei weiterer Oxydation in Biliansäure übergeht, trachtete ich, auch alle Dehydrocholsäure in Biliansäure überzuführen, indem ich

zuerst 20 g Cholalsäure genau so, wie Mylius es angibt, oxydirte, bis die Lösung grün erschien, nach dem Abkühlen unter dem Wasserstrahle über dünner Gaze das Reactionsproduct, welches kleine Krümelchen bildet, abcolirte und auf's Feinste zerrieb. Letzteres ist für das Gelingen von grösster Bedeutung. Das Zerriebene spült man aus der Reibschale mit einem frisch bereiteten Gemische von 20 g Kaliumdichromat, 30 g Schwefelsäure und 80 g Wasser in ein kleines Kölbchen und erwärmt es im lebhaft siedenden Wasserbade unter fortwährendem Drehen durch eine Viertelstunde. Man bemerkt dabei, dass es nicht mehr zur Bildung von Krümelchen kommt, sondern dass die Masse in feinsten Suspension bleibt. Sollte dies aber doch eintreten, so hätte man wieder zu coliren, zu zerreiben und im Chromsäuregemisch von Neuem zu erwärmen. Nach dem Abkühlen saugt man das Reactionsproduct ab, wäscht es, löst es in überschüssiger Natronlauge, digerirt am Wasserbade, bis alles Chromhydroxyd ausgefallen, und fällt das Filtrat davon mit verdünnter Salzsäure. Diese Fällung ist äusserst feinflockig, während jene, die man erhält, wenn Dehydrocholsäure zugegen ist, meist grosse, klebrige Flocken und Klumpen bildet. Nach dem Absaugen, Waschen und Trocknen hat man ca. 18 g einer blendend weissen Masse, die aus nahezu reiner Biliansäure besteht und ohne Weiteres aus verdünnter Essigsäure (nicht Eisessig!) heiss umkrystallisirt werden kann. Nach dem Abkühlen trübt sich das Filtrat und geseht nach einiger Zeit zu einer milchigen Gallerte. Meist schon nach 12stündigem Stehen findet man Alles in schön ausgebildeten, bis zu 2 mm langen, glänzenden Prismen krystallisirt.

Es ist gut, das abgekühlte Filtrat mit Krystallen, die man sich in einem Reagensrohre hergestellt, zu impfen. Die von den Krystallen abgesaugte und geimpfte Mutterlauge bringt man durch mehrmaligen, vorsichtigen Wasserzusatz zum Krystallisiren und kann auf diese Weise aus 20 g Cholalsäure bei sorgfältigem Arbeiten 15–16 g krystallisirter Biliansäure erhalten, die bis auf den geringen Gehalt an der ihr isomeren Isobiliansäure, deren Calciumsalze leicht in der Hitze zu trennen sind, rein ist.

Der so gewonnene Körper lässt sich mit alkoholischer Kalilauge aus alkoholischer Lösung als saures Kalisalz ausfällen, mit Phenylhydrazin in essigsaurer Lösung liefert er ein schön krystallisirtes Hydrazon, und beim Verbrennen am Platinblech verbreitet er den charakteristischen Bernsteinengeruch.

Schmelzpunkt der Krystalle 266° .

0,3419 g der lufttrockenen Krystalle verloren nach mehrstündigem Erhitzen auf 130° 0,0244 g = 7,14% an Gewicht. Berechnet für 2 Moleküle H_2O : 7,48%.

0,1151 g der so getrockneten Krystalle lieferten bei der Verbrennung nach Lippmann-Fleissner 0,0840 H_2O und 0,2697 CO_2 .

Gefunden:

Berechnet für $\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{O}_8$:

C % 63,92

63,97

H % 8,16

7,62

Bisher habe ich nur mit Bromwasser darauf einzuwirken versucht. Da bei gewöhnlicher Temperatur selbst bei tagelangem Stehen keine Entfärbung zu bemerken war, wurde bei 110° in der Bombe gearbeitet. Grosse Mengen Brom wurden dabei verbraucht, und als Reactionsproduct hinterblieb eine schwarzbraune, nicht krystallisirbare, harzige Masse, die zu einer Analyse keineswegs einladend aussah.