

302. A. Windaus: Ueber Cholesterin.

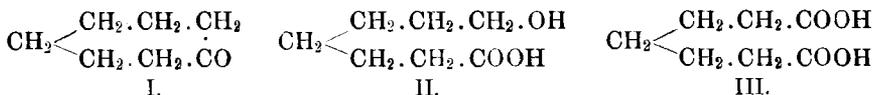
(II. Mittheilung.)

[Aus der medic. Abth. des Universitätslaboratoriums zu Freiburg i. B.]
 (Eingeg. am 3. Mai 1904; mitgetheilt in der Sitzung von Hrn. J. Colman.)

In meiner ersten Veröffentlichung¹⁾ habe ich die Oxydation des Cholestandions, $C_{27}H_{42}O_2$, zur Säure $C_{27}H_{42}O_5$, der Cholestanondisäure, beschrieben. Dieser Vorgang entspricht vollständig der Bildung von Camphersäure aus Campher, und es geht daraus hervor, dass hier ebenfalls ein Ring vorhanden ist, der eine $CO \cdot CH_2$ -Gruppe enthält und bei der Oxydation an der Ketogruppe aufgespalten wird.

Um diese Auffassung noch auf einem anderen Wege zu stützen, habe ich das Cholestandion mit Ammoniumpersulfat oxydirt. Baeyer und Villiger²⁾ haben nämlich in ihren Arbeiten über die Einwirkung von Caro's Reagens auf Ketone gezeigt, dass cyclische Ketone durch dieses Oxydationsmittel in Oxysäuren bezw. die entsprechenden Lactone umgewandelt werden.

Bei dieser merkwürdigen Reaction wird der Rest $\cdot CH_2 \cdot CO$ zu $\cdot CH_2 \cdot OH$ und $COOH$; so giebt z. B.³⁾ Suberon (I.) über ein ζ -Lacton, die Oxyönanthylsäure (II.), und diese kann durch andere Oxydationsmittel leicht in Pimelinsäure (III.) übergeführt werden.



Das Cholestandion verhält sich nun ganz ähnlich. Es liefert bei der Behandlung mit Ammoniumpersulfat in essigsaurer Lösung eine Oxyketocarbonsäure, und Letztere geht bei der Oxydation mit Chromsäure in dieselbe Ketodicarbonsäure (die Cholestanondisäure) über, welche auch direct mittels Chromsäure aus dem Keton erhalten werden kann.

Hierdurch ist für das Vorhandensein eines reducirten Ringes im Cholesterin ein neuer Beweis erbracht.

Die Cholestanondisäure liefert, wie bereits angegeben⁴⁾, ein ziemlich beständiges Anhydrid, verhält sich also wie ein Bernsteinsäure- bezw. Glutarsäure-Derivat, d. h. wie eine Dicarbonsäure mit den Carboxylresten in 1.4- oder 1.5-Stellung. Die Oxysäure, in der die $CH_2 \cdot OH$ -Gruppe dem einen Carboxyl der Cholestanondisäure entspricht, kann demnach nur eine γ - oder δ -Oxysäure sein. Die γ -Stellung für die Hydroxylgruppe ist ausgeschlossen, weil die Oxysäure bei ge-

¹⁾ Diese Berichte **36**, 3752 [1903].

²⁾ Diese Berichte **32**, 3625 1899]; **33**, 124, 858 [1900].

³⁾ Diese Berichte **33**, 862 [1900]. ⁴⁾ Diese Berichte **36**, 3758 [1903].

wöhnlicher Temperatur nicht in ihr Lacton übergeht; es bleibt demnach nur noch die δ -Stellung möglich; Carboxyl und Hydroxyl befinden sich also in 1.5-Stellung zu einander, und hieraus folgt, dass der ursprünglich im Cholesterin vorhandene Ring, bei dessen Aufspaltung die erwähnten Säuren entstehen, ein Pentamethylenring sein muss.

Dieser Befund wird sehr auffallend erscheinen, da Substanzen dieser Art bisher im Thierkörper nicht beobachtet worden sind. Indessen haben bereits Mauthner und Suida ¹⁾ vor einiger Zeit ähnliche Vorstellungen entwickelt. Sie erhielten nämlich bei energischer Oxydation des Cholesterins eine Anzahl amorpher Säuren, die sehr wahrscheinlich 2 Wasserstoffatome weniger enthalten als die entsprechenden Säuren der Paraffinreihe, und sie schlossen hieraus, dass in diesen Producten ein reducirter Ring vorhanden sei. Dieser kann indessen keinesfalls identisch sein mit dem von mir nachgewiesenen Pentamethylenring; denn Letzterer wird durch Oxydationsmittel an einer zur Carbonyl-Bildung befähigten Stelle glatt aufgespalten, während der nach Mauthner und Suida vorhandene Ring eine ganz ungewöhnliche Beständigkeit gegen Salpetersäure besitzt ²⁾

Das Vorkommen von reducirten Ringen im Cholesterin giebt schliesslich Anlass, auf Folgendes hinzuweisen: Mauthner und Suida ³⁾ haben bereits beobachtet, dass bei der Destillation des Cholesterins und des Cholesterylchlorids ein Product entsteht, das den hochsiedenden Fractionen des Petroleums auffallend gleicht. Ich habe nunmehr das Cholesterin unter Zusatz von Borsäureanhydrid und das Cholesterylacetat ohne Zusatz einer sehr langsamen (destructiven) Destillation unterworfen und dabei ein Gemisch von Kohlenwasserstoffen erhalten, das, so weit die oberflächliche Untersuchung einen Schluss gestattet, dem Petroleum sehr ähnlich ist. Das Cholesterin ist nun in der belebten Natur theils frei, theils in Form von Estern sehr verbreitet und auch im Fett enthalten. Das Fett soll aber gerade nach Engler's ⁴⁾ Hypothese die Quelle für das Petroleum sein, und es ist sicher, dass dann auch das Cholesterin an der Petroleumzeugung betheiligt ist; möglicher Weise stehen die gesättigten cyclischen Kohlenwasserstoffe $C_n H_{2n}$, welche sich in wechselnder Menge in den verschiedenen Petroleumsorten finden, in nahem Zusammenhang mit dem Cholesterin.

¹⁾ Monatsh. für Chem. 24, 12; siehe auch Monatsh. für Chem. 15, 114.

²⁾ Enthält das Cholesterin ausser der Doppelbindung wirklich mindestens zwei reducirte Ringe, so ist, wie sich aus der Zahl seiner Wasserstoffatome ergibt, das Vorhandensein eines präformirten Benzolkernes in seinem Molekül ausgeschlossen.

³⁾ Monatsh. für Chem. 17, 41; 24, 494.

⁴⁾ Diese Berichte 30, 2358 [1897].

Oxydation des Cholestandions mit Ammoniumpersulfat.

Zunächst versuchte ich, die Oxydation des Ketons mit Kaliumpersulfat oder Ammoniumpersulfat unter Zusatz von concentrirter Schwefelsäure vorzunehmen, wie es Baeyer und Villiger¹⁾ bei ihren Arbeiten gethan haben. Indessen wirkt bei niedriger Temperatur das Oxydationsmittel nicht ein, bei höherer Temperatur wird das Material unter Dunkelfärbung in schmierige Producte verwandelt. Doch gelingt die Oxydation gut ohne Zusatz von Schwefelsäure auf folgende Weise:

Man übergießt 5 g Cholestandion mit 200 ccm Eisessig, fügt 10 g Ammoniumpersulfat, gelöst in 20 ccm Wasser, hinzu und erwärmt die Masse 3 Stunden auf 70 — 75°. Dann verdünnt man mit 300 ccm Wasser, schüttelt die trübe Lösung wiederholt mit Aether aus, behandelt diesen, um die Essigsäure zu entfernen, mit Wasser und darauf, um die sauren Producte zu gewinnen, mit verdünnter Kalilauge. Die Kaliumsalslösung säuert man mit Salzsäure an und nimmt die abgetrennten Säuren mit viel Aether auf. Dieser hinterlässt beim Abdestilliren eine Krystallmasse, die mit gelbem Oel durchtränkt ist, das stark nach Isovaleriansäure riecht. Durch Behandeln mit kleinen Mengen Aceton, in welchem die Krystalle schwer löslich sind, lässt sich das gelbe Oel entfernen. Die zurückbleibende, reinweisse Krystallmasse (2 — 2.5 g) wird aus heissem Eisessig umkrystallisirt, aus dem sie sich beim Erkalten in Prismen abscheidet; die neue Säure ist leicht löslich in Chloroform, mässig löslich in Alkohol und Eisessig, wenig löslich in Aether, Aceton, Benzol, unlöslich in Petroläther und Wasser. Der Schmelzpunkt ist unscharf; beim Erhitzen im Capillarrohr beginnt die Substanz, bei 185° schwach zu sintern, ist aber erst bei 217° völlig geschmolzen. Auch nach häufigem Umkrystallisiren und Reinigen über das schön krystallisirte Natriumsalz ändert sich hieran nichts.

Dieses Verhalten beruht also nicht auf einer Verunreinigung, sondern wahrscheinlich darauf, dass die Oxysäure beim Erhitzen allmählich in ihr Lacton übergeht.

Die im Vacuum getrocknete Substanz gab bei der Analyse folgende Zahlen:

0.1663 g Sbst.: 0.4596 g CO₂, 0.1596 g H₂O. — 0.1516 g Sbst.: 0.4186 g CO₂, 0.1473 g H₂O.

C₂₇H₄₄O₄. Ber. C 74.92, H 10.28.
Gef. » 75.37, 75.31, » 10.76, 10.80.

Titration: 0.4604 g Sbst. verbrauchten 10.8 ccm $\frac{1}{10}$ -n. Natronlauge.

Äquivalentgewicht für C₂₇H₄₄O₄ einbasisch:
Ber. 432. Gef. 426.

¹⁾ loc. cit.

Daraus folgt, dass die Säure einbasisch ist und die Formel $C_{27}H_{44}O_4$ besitzt.

Von den Salzen krystallisirt das Natriumsalz ausserordentlich leicht. Es scheidet sich fast quantitativ aus, wenn man 1 Th. Säure, gelöst in 20 Th. heissem Alkohol, mit etwas überschüssiger, 10-procentiger Natronlauge versetzt. Aus heissem, 50 procentigem Alkohol umkrystallisirt, fällt es in grossen, glänzenden Krystallblättern aus.

0.3610 g Sbst.: 0.0520 g Na_2SO_4 .

$C_{27}H_{43}O_4Na$. Ber. Na 5.07. Gef. Na 4.67.

Das Kaliumsalz ist dagegen leicht löslich; andere Metallsalze wurden nicht untersucht.

Die beiden nicht der Carboxylgruppe zugehörigen Sauerstoffatome der Säure $C_{27}H_{44}O_4$ sind in Form von Carbonyl und primärem Hydroxyl vorhanden. Zum Nachweis der Carbonylgruppe versuchte ich zunächst die freie Säure in ein Oxim zu verwandeln; das entstehende Product hat indessen keine schönen Eigenschaften. Ich führte darum, ebenso wie früher bei der Cholestanondisäure¹⁾, zunächst die Säure in ihren Ester über und setzte diesen mit Hydroxylamin um.

Methylester: 2 g Säure wurden mit 50 ccm Methylalkohol und 5 g reiner Schwefelsäure $1\frac{1}{2}$ Stunden unter Rückfluss gekocht, die entstandene Lösung auf Eis und Bicarbonat gegossen, das ausgefallene Product mit Aether aufgenommen und dieser abdestillirt. Der Rückstand wurde im Minimum von Petroläther aufgelöst und stehen gelassen; allmählich schied sich der gesuchte Ester in feinen Krystalldrusen ab, die bei 105° schmolzen. Der Ester ist in allen organischen Lösungsmitteln ausserordentlich leicht löslich, ausser in Petroläther. Versucht man, ihn aus alkoholischer Lösung mit Wasser auszufällen, so bildet er steife Gallerten, die bei wochenlangem Stehen nicht krystallisiren. Wegen seiner geringen Krystallisationsfähigkeit war er schwer zu reinigen und lieferte demgemäss bei der Analyse keine scharfen Zahlen.

0.1567 g Sbst.: 0.4286 g CO_2 , 0.1521 g H_2O .

$C_{28}H_{46}O_4$. Ber. C 75.28, H 10.38.

Gef. » 74.60, » 10.86.

Dagegen kann das Oxim des Esters ausserordentlich leicht in reiner Form gewonnen werden. Zu seiner Darstellung wurden 1.5 g Ester in 40 ccm Methylalkohol gelöst, mit 0.5 g Hydroxylaminchlorhydrat, 0.5 g Natriumacetat, beide gelöst in 5 ccm Wasser, versetzt und 24 Stunden stehen gelassen. Dann wurde die Lösung erwärmt und Wasser bis zur Trübung zugegeben; beim Abkühlen fielen nun-

¹⁾ Diese Berichte 36, 3757 [1903].

mehr in reichlicher Menge glänzende Blättchen aus, die nach dem Umkrystallisiren aus Methylalkohol bei 148° schmolzen.

0.1846 g Sbst.: 0.4911 g CO_2 , 0.1767 g H_2O . — 0.1633 g Sbst.: 5.35 ccm N (15.0° , 757 mm).

$\text{C}_{28}\text{H}_{47}\text{O}_4\text{N}$. Ber. C 72.80, H 10.28, N 3.04.
Gef. » 72.55, » 10.64, » 3.82.

Der Nachweis, dass das vierte Sauerstoffatom der Säure $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}_4$ einer primären Alkoholgruppe zugehört, wurde durch Oxydation geführt. 3 g Säure wurden mit 150 ccm Eisessig und 20 ccm Chromsäuremischung versetzt, 3 Stunden auf 70° erwärmt und dann mit 100 ccm Wasser vermischt. Das krystallinisch ausgeschiedene Product wurde abfiltrirt, ausgewaschen und in 75 ccm Eisessig in der Hitze gelöst. Beim Erkalten schied sich aus der Lösung eine geringe Menge krystallisirten Materials ab, das für eine Untersuchung nicht ausreichte. Hiervon wurde abfiltrirt, die Lösung wiederum zum Sieden erhitzt und mit Wasser bis zur Trübung versetzt. Jetzt fielen in reichlicher Menge glänzende Nadeln aus, die denen der Cholestandisäure recht ähnlich sahen.

Die Identität wurde bewiesen durch den Schmelzpunkt der freien Säure und durch Ueberführung derselben in den sehr charakteristischen, schwer löslichen Dimethylester vom Schmp. 113° .

Letzterer wurde zum Ueberfluss noch in das Oxim verwandelt und von diesem eine N-Bestimmung ausgeführt.

0.3105 g Sbst.: 8.1 ccm N (18° , 736 mm).

$\text{C}_{29}\text{H}_{47}\text{O}_5\text{N}$. Ber. N 2.78. Gef. N 2.92.

Bromirung des Cholestandions.

12 g Cholestandion wurden in 100 ccm Chloroform gelöst und mit 4 ccm Brom, gelöst in 20 ccm Chloroform, versetzt. Alsbald begann eine sehr lebhaft Bromwasserstoff-Entwicklung. Nach 24-stündigem Stehen wurde die tief dunkel gefärbte Chloroformlösung mit schwefeliger Säure durchgeschüttelt, wobei sie fast farblos wurde, und dann vorsichtig abgedunstet. Der syrupartige Rückstand wurde mit 80-proc. Alkohol durchgerührt und erstarrte dabei vollständig zu einem schwach röthlich gefärbten Krystallbrei. Dieser wurde abgesaugt und aus 80-proc. Alkohol umkrystallisirt. Der neue Körper (Ausbeute 11 g) bildet derbe weisse Prismen, die bei raschem Erhitzen bei ca. 165° unter Schwarzfärbung und Gasentwicklung schmelzen. Gegen Lösungsmittel verhält er sich ähnlich wie das Cholestandion.

0.2085 g Sbst.: 0.4459 g CO_2 , 0.1397 g H_2O . — 0.2107 g Sbst.: 0.1423 g AgBr.

$\text{C}_{27}\text{H}_{40}\text{O}_2\text{Br}_2$. Ber. C 58.24, H 7.26, Br 28.74.

Gef. » 58.32, » 7.44, » 28.75.

Die Analyse zeigt also, dass 2 Atome Brom substituierend in das Molekül des Cholestandions eingetreten sind.

Das Dibrom-cholestandion zeigt folgende merkwürdige Farbenreaction: Wird ein wenig Substanz in Alkohol gelöst und mit einem Tropfen Kali- oder Natron-Lauge versetzt, so entsteht eine tiefrothe Färbung, die auf Zusatz von Säure wieder verschwindet. Sehr interessant ist es, dass sich dieselbe Reaction bei einem krystallisirten, halogenfreien Keton findet, das ich aus Caulostearin in fast quantitativer Ausbeute mittels Chromsäure gewann. Es ist sehr wahrscheinlich, dass hier die gegenseitige Lage von Doppelbindung und Keto-Gruppe eine Rolle spielt.

Bromirung der Cholestanondisäure.

Die Bromirung dieser Säure, sowie ihres Dimethylesters in Chloroformlösung führte zu keinem Resultat. In Eisessiglösung ergab die Säure bei 24-stündiger Behandlung mit Brom ein krystallinisches Reactionsproduct, das indessen nach dem Ausfall der Analyse noch 40 pCt. nicht bromirte Säure enthielt. Ich nahm darum die Bromirung unter Zusatz von Bromüberträgern vor; als solche bewährten sich sowohl Eisendraht wie Jod vorzüglich: 2 g Cholestanondisäure wurden in 40 ccm Eisessig gelöst und mit 1 ccm Brom, sowie 0.2 g Jod versetzt. Nach dem Stehen über Nacht war der Inhalt des Gefässes zu einem Krystallbrei erstarrt; derselbe wurde abgesaugt, mit Essigsäure gewaschen und aus 80-proc. Alkohol umkrystallisirt. Es bilden sich rasch cholesterinähnliche Blättchen mit metallischem Glanz, die nach dem Trocknen ausserordentlich zäh an einander haften (Ausbeute 1.5 g). Die Substanz schmilzt bei ca. 151° unter Dunkelfärbung und Gasentwicklung; doch hängt der Zersetzungspunkt sehr von der Raschheit des Erhitzens ab.

0.1594 g Sbst.: 0.3582 g CO₂, 0.1203 g H₂O. — 0.1790 g Sbst.: 0.0620 g AgBr.

C₂₇H₄₁O₅Br. Ber. C 61.69, H 7.86, Br 15.22.

Gef. » 61.29, » 8.44, » 14.74.

Es ist also ein Atom Brom in das Molekül der Cholestanondisäure eingetreten.

Da in den beschriebenen neuen Körpern das Brom, das sich zweifellos in Orthostellung zur Ketogruppe befindet, sehr leicht gegen andere Reste ausgetauscht werden kann, ist hier ein neuer Weg gefunden, um zu einheitlichen Abbauprodukten des Cholesterins zu gelangen¹⁾.

¹⁾ Auf andere Weise hat Hr. Stein dies im hiesigen Laboratorium unternommen. Er hat im Cholestanonol die Hydroxylgruppe mittels Phosphorpentachlorid durch Chlor ersetzt und hat ein Chlor-cholestanon vom Schmp. 170° erhalten, das er in Eisessiglösung mittels rauchender Salpetersäure zu krystallisirten Säuren hat oxydiren können. Hierüber wird nach Abschluss der Arbeit berichtet.