

und wurde nach den Erfahrungen bei der Untersuchung des Cetylpalmitats und des *n*-Triakontans (gerade Anzahl C-Atome, rhombisch und nicht monoklin, große Translation in Richtung der Molekülachse) auch nicht als wahrscheinlich angesehen. Hiernach ist sicher, daß ein so einfacher Zusammenhang zwischen dem Bau geradzahligter und ungeradzahligter *n*-Paraffine, wie er von A. Müller im Anschluß an seine Untersuchung des *n*-Nonakosans vermutet wurde, nicht bestehen kann und nach den bisherigen Ergebnissen über das Bestehen polymorpher Modifikationen, die gerade bei den langkettigen aliphatischen Verbindungen so häufig und bei dem Aufstellen einer Regel zu berücksichtigen sind, auch nicht wahrscheinlich ist.

Zum Schluß danke ich Hrn. Prof. Dr. P. A. Thiessen für die Förderung dieser Arbeit und der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Bereitstellung von Hilfsmitteln.

37. Martin Schenck und Johannes Reschke: Über das Verhalten von Isonitroso- und Isonitroverbindungen unter den Bedingungen der van Slykeschen Aminostickstoffbestimmung.

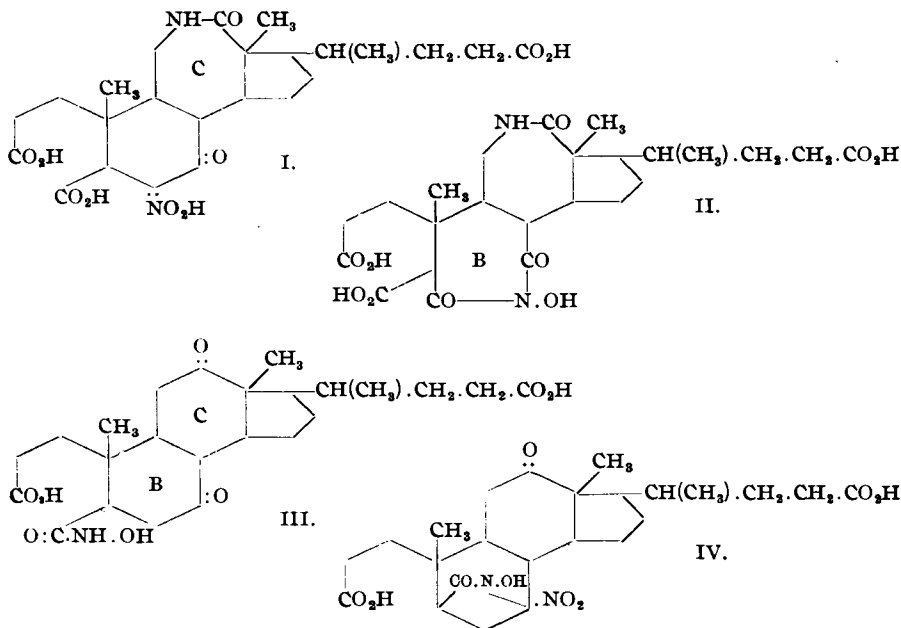
[Aus d. Physiol.-chem. Abteil. d. Veterinär-physiol. Instituts d. Universität Leipzig.]
(Eingegangen am 9. Februar 1940.)

Die aus Cholsäure durch eine Reihe von Umwandlungen erhaltliche Nitroketo-lactamtricarbonsäure $C_{24}H_{34}N_2O_{10}$ (I, α -Säure) wird durch heiße 90-proz. Schwefelsäure zu einer isomeren Verbindung (β -Säure) umgelagert, der sehr wahrscheinlich das Symbol II zukommt, das in Ring B die anhydridartige Vereinigung einer Hydroxamsäuregruppe mit einer Carboxylgruppe aufweist (u. U. könnte diese Vereinigung auch die Gestalt: $—C(:NOH) —O—CO—$ haben¹⁾). Durch alkal. Permanganatlösung von Raumtemperatur wird die β -Säure im Gegensatz zur α -Säure unter Entwicklung eines farblosen Gases, das im wesentlichen aus Stickstoff besteht, oxydiert²⁾. Auch Verbindungen mit freier Hydroxamsäuregruppe zeigen unter den gleichen Bedingungen eine Gasentbindung, und zwar besteht das Gas in je nach der Art der geprüften Hydroxamsäure wechselndem Verhältnis aus Stickstoff und Stickoxydul, dergestalt, daß das letztere auch ganz überwiegen kann und ihm nur wenig Stickstoff beigemischt ist³⁾. Auch aus der β -Säure dürfte neben Stickstoff etwas Stickoxydul gebildet werden, das aber in der alkal. Permanganatlösung gelöst bleibt. Wie die Gasbildung aus Hydroxamsäuren zu erklären ist, muß dahingestellt bleiben, ein Erklärungsversuch ist an anderer Stelle gegeben worden³⁾. Da auch Hydroxylamin-hydrochlorid durch alkal. Permanganatlösung unter Bildung von N_2 und N_2O zersetzt wird, hätte man daran denken können, daß die Hydroxamsäuren zunächst Hydroxylamin abspalten, das dann die Gase liefert. Das ist aber offenbar nicht der Fall, denn keine der bisher geprüften Hydroxamsäuren ließ bei Raumtemperatur eine Abspaltung von Hydroxylamin durch Lauge erkennen (negativer Ausfall

¹⁾ Ztschr. physiol. Chem. **248**, 174 [1937].

²⁾ Ztschr. physiol. Chem. **253**, 244 [1938].

³⁾ Ztschr. physiol. Chem. **262**, 47 [1939]; M. Schenck u. L. Wolf, B. **73**, 25 [1940].



der Fehlingschen Probe)⁴⁾. Inzwischen ist beobachtet worden, daß die β -Säure auch mit Salpetersäure (d 1.4) ein farbloses Gas entwickelt, das allem Anschein nach aus viel Stickoxydul und wenig Stickstoff besteht. Da auch Hydroxylamin selbst mit Salpetersäure (d 1.4) die gleichen Gase (viel N_2O neben wenig N_2) liefert, könnte man hier daran denken, daß aus der β -Säure zunächst freies Hydroxylamin abgespalten wird, das dann unter Bildung der Gase zerfällt.

Noch bei einer anderen Reaktion liefert die β -Säure (II) elementaren Stickstoff, nämlich in der van Slykeschen Apparatur zur Bestimmung von Aminostickstoff. Dies war der Grund, weshalb man in der β -Säure früher eine NH_2 -Gruppe angenommen hatte. (Bei der van Slyke-Analyse der β -Säure wurden bei 3-stdg. Versuchsdauer 78% der einer NH_2 -Gruppe entsprechenden Stickstoffmenge — 1 Mol. N_2 pro Mol. Substanz = 100% — gefunden⁵⁾). Auf Grund von zwei später beobachteten Reaktionen (braunrote Färbung mit EisenIII-chlorid und Reduktion Fehlingscher Lösung bzw. ammoniakalischer Silberlösung nach Kochen mit Salzsäure) wurde für die β -Säure die Strukturformel II aufgestellt¹⁾. Die Stickstoffbildung im van Slykeschen Versuch mußte dann im wesentlichen auf die anhydridartig gebundene Hydroxamsäuregruppe bezogen werden, die Lactamgruppe schien hierfür weniger in Betracht zu kommen, denn ein Gallensäurederivat, das denselben Lactamring wie II aufweist, aber an Stelle des stickstoffhaltigen Siebenringes B den Ketoring B wie in Formel III enthält, lieferte im van Slykeschen Apparat nur wenig Stickstoff (vergl. u.). Es war demnach zu erwarten, daß auch andere Verbindungen mit Hydroxamsäuregruppen nach der van Slykeschen Methode Stickstoff entwickelten. Zur Prüfung dieser

⁴⁾ Ztschr. physiol. Chem. **263**, 59, 60 [1940].

⁵⁾ Ztschr. physiol. Chem. **191**, 92 [1930].

Annahme sind einige Versuche ausgeführt worden, von denen nachher die Rede sein wird.

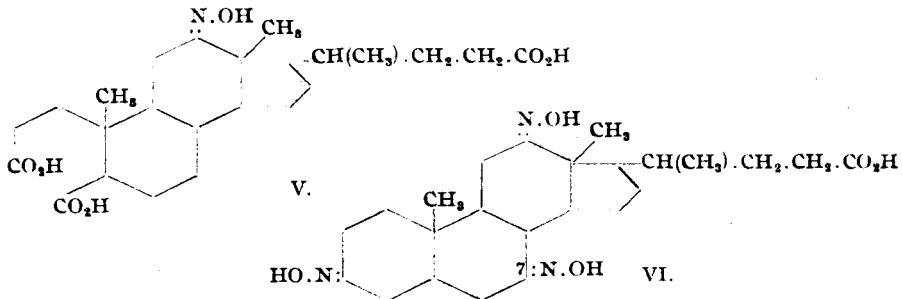
Die Reaktion der primären Aminogruppe mit salpetriger Säure ist von van Slyke ursprünglich zu einer Bestimmungsmethode für diese Gruppe in Eiweißaminosäuren und Proteinen ausgearbeitet worden. Später hat man dann die van Slykesche Methode bei zahlreichen anderen Aminen und Säureamiden und auch bei solchen stickstoffhaltigen Verbindungen versucht, die von vornherein keine NH_2 -Gruppe enthalten, bei denen diese Gruppe sich vielmehr erst nach Umlagerung, Hydrolyse oder Ringsprengung bildet. Der Umfang, in dem sich die Stickstoffbindung vollzieht, ist von verschiedenen Bedingungen, wie Löslichkeit der betreffenden Substanz in der Flüssigkeit des Reaktionsgefäßes, Temperatur, Wasserstoffionenkonzentration, Tempo der Gasentwicklung und Versuchsdauer abhängig⁶⁾. Wir selbst haben uns mit der Frage beschäftigt, ob und inwieweit die Methode bei stickstoffhaltigen Gallensäurederivaten anwendbar ist⁷⁾. Dabei hat sich ergeben, daß solche Derivate, die nur eine Aminogruppe und keine weitere Stickstoffgruppe enthalten, bei geeigneter, aber für die einzelnen Vertreter verschieden langer Versuchsdauer quantitativ reagieren. So lieferten 2 Verbindungen bei 10 Min. langer Versuchsdauer 100 % Stickstoff, eine dritte aber gab in 20 Min. nur 25 %. Läßt man die Versuche jedoch lange Zeit (3 bis 24 Stdn.) gehen, so werden zu hohe Werte gefunden (in einem Fall bis an 300 %); der überschüssige Stickstoff ist hier auf eine Reduktion von salpetriger Säure durch das zunächst entstandene Carbinol zurückzuführen. In anderen Fällen enthielten die Gallensäureabkömmlinge außer dem Aminostickstoff noch andere stickstoffhaltige Gruppen (Lactam-, Isonitroso-, Isonitrostickstoff, in einem Falle vielleicht auch Nitrilstickstoff), auch bei diesen Verbindungen wurden bei stundenlanger Versuchsdauer mit einer Ausnahme, bei der der theoretische Wert (100 %) nicht ganz erreicht wurde, zu hohe Zahlen erhalten; es ist aber hier nicht zu entscheiden, wieviel von dem überschüssig entwickelten Gas auf die eben genannte Ursache und wieviel auf das Mitreagieren der anderen Stickstoffgruppen zu beziehen ist. Eine dritte Art von Gallensäurederivaten enthielt überhaupt keinen Aminostickstoff, sondern nur Lactam-, Isonitroso- und Isonitrogruppen. Von diesen Verbindungen lieferte die Ketolactamtricarbonsäure $\text{C}_{24}\text{H}_{35}\text{O}_8\text{N}$ (Formel wie II, aber an Stelle des stickstoffhaltigen Siebenringes B Ketting B wie in III) in 6 Stdn. nur sehr wenig Gas (3 %), größere Mengen Stickstoff gaben in der gleichen Zeit Biliansäure-dioxim $\text{C}_{24}\text{H}_{36}\text{O}_8\text{N}_2$ (Formel wie III, aber an Stelle der beiden Ketogruppen Ketoximgruppen und an Stelle der Hydroxamsäuregruppe eine Carboxylgruppe) (104 %) und Biliansäure-oximlactam $\text{C}_{24}\text{H}_{36}\text{O}_8\text{N}_2$ (Oxim der eben genannten Ketolactamtricarbonsäure $\text{C}_{24}\text{H}_{35}\text{O}_8\text{N}$) (90 %), ferner die α -Säure I in 3 Stdn. 92 % (β -Säure II in der gleichen Zeit, wie bereits oben erwähnt, 78 %) und Nitrobiliansäure $\text{C}_{24}\text{H}_{33}\text{O}_{10}\text{N}$ (Formel wie I, nur an Stelle des Lactamringes C Ketting C wie in III) in 8 Stdn. 55 %. In der α -Säure und in der Nitrobiliansäure hatte man auf Grund dieses Verhaltens wie bei der β -Säure zunächst irrümlicherweise eine NH_2 -Gruppe angenommen.

Es sind jetzt noch 8 Hydroxamsäuren und 2 Oximsäuren in der van Slykeschen Apparatur unter jedesmal gleichen Bedingungen geprüft worden. Von diesen Verbindungen gab Acethydroxamsäure nur sehr wenig Stickstoff (etwa 3%), Benzhydroxamsäure 19%, Diketohydroxamsäure $\text{C}_{24}\text{H}_{35}\text{O}_8\text{N}$ (III)

⁶⁾ Vergl. die einschlägigen Handbücher, z. B. Abderhalden, *Biochem. Arbeitsmethoden*, Bd. V, 2 [1912], S. 995; Bd. VI [1912], S. 278; ferner u. a. R. H. A. Plimmer, *Journ. chem. Soc. London* **127**, 2651 [1925]; A. Hynd u. M. G. Macfarlane, *Biochem. Journ.* **20**, 1264 [1926]; L. Rosenthaler, *Biochem. Ztschr.* **207**, 298 [1929]; Falconer, Gulland, Hobday u. Jackson, *Journ. chem. Soc. London* **1939**, 907 (P—N-Bindung).

⁷⁾ Die ersten Versuche dieser Art sind von dem einen von uns (Sch.) gemeinsam mit H. Kirchhof ausgeführt worden: *Ztschr. physiol. Chem.* **166**, 142 [1927]; **172**, 159 [1927]; **189**, 85 [1930]; **191**, 91 [1930], die übrigen Versuche gemeinsam mit J. Reschke, *Ztschr. physiol. Chem.* **216**, 81 [1933]; **220**, 63 [1933]; **242**, 81 [1936]; **248**, 177 [1937].

17%. Die Oximinoketohydroxamsäure $C_{24}H_{36}O_8N_2$ (Formel wie III, aber an Stelle der Ketogruppe in Ring B die Ketoximgruppe) lieferte 114%, die Oximinolactamhydroxamsäure $C_{24}H_{36}O_8N_2$ (Formel wie III, aber an Stelle der Ketogruppe in Ring B die Ketoximgruppe und an Stelle des Ketorings C Lactamring C wie in I und II) 128% N_2 . In drei weiteren Hydroxamsäuren, die untersucht wurden, ist die Hydroxamsäuregruppe allem Anschein nach nicht in freier Form zugegen, sondern in irgendeiner Weise „blockiert“, etwa so, wie es die Formel IV zeigt. Auch enthalten diese 3 Säuren noch eine Nitrogruppe⁸⁾. Die Nitroketohydroxamsäure $C_{24}H_{34}O_9N_2$ (IV) gab im van Slykeschen Versuch 9 bzw. 6% Stickstoff, die Nitrooximinohydroxamsäure $C_{24}H_{35}O_9N_3$ (Formel wie IV, aber an Stelle der Ketogruppe in Ring C die Ketoximgruppe) 19%, die Nitrolactamhydroxamsäure $C_{24}H_{35}O_9N_3$ (Formel wie IV, aber an Stelle des Ketorings C Lactamring C wie in I und II) 12%. Schließlich sind noch 2 Oximsäuren nach van Slyke geprüft worden: die Säure V ($C_{24}H_{37}O_7N$, Oxim der Desoxybiliansäure) lieferte 23%, Verbindung VI ($C_{24}H_{37}O_5N_3$, Trioxim der Dehydrocholsäure) 117% N_2 . Wie man sieht,



sind die aus den einzelnen Verbindungen erhaltenen Stickstoffmengen sehr verschieden. Für den Umfang der Stickstoffentbindung ist offenbar nicht sowohl die eine oder andere stickstoffhaltige Gruppe als solche maßgebend, als vielmehr die Stellung bzw. die Nachbarschaft der Gruppe im Molekül. Besonders die NOH-Gruppe an C7 scheint zur Stickstoffentwicklung befähigt zu sein, wie dies auch früher schon beim Biliansäure-dioxim und beim Biliansäure-oximlactam (s. o.) beobachtet worden war. Wie ist nun die Stickstoffbildung zu erklären? Am einfachsten liegen die Dinge bei der Lactamgruppe: sie wird, wenn auch in bei den einzelnen Verbindungen verschiedenen Maße, hydrolytisch aufgespalten werden und die so entstehende Aminogruppe dann in normaler Weise mit salpetriger Säure reagieren. Das hierbei gebildete Carbinol könnte nach dem oben Gesagten reduzierend auf salpetrige Säure einwirken. Die anderen in Betracht kommenden Gruppen sind die Isonitroso-, Isonitro- und, bei den 3 Nitrohydroxamsäuren, die nach Annahme tertiär gebundene Nitrogruppe. Bei den Oximen (auch die β -Säure und die Hydroxamsäuren könnten in der Oximform in Reaktion treten; in den 3 Nitrohydroxamsäuren müßte dann der angenommene stickstoffhaltige Fünfring entsprechend umgestaltet werden: $\text{---CH---C(:NOH)---O---C(NO}_2\text{)---}$) kann man daran

denken, daß zunächst durch Hydrolyse Hydroxylamin entsteht, das dann unter Gasbildung zersetzt wird. Hydroxylamin selbst liefert aber

⁸⁾ Ztschr. physiol. Chem. **263**, 55 [1940].

unter den Bedingungen des van Slykeschen Versuchs nur eine sehr geringe Menge Stickstoff (2%). Eine Stickstoffbildung aus primär abgespaltenem Hydroxylamin könnte sich also bei den Oximen nur in geringem Umfang vollziehen (verhältnismäßig am meisten noch bei der Acethydroxamsäure, vergl. oben). Andere Möglichkeiten, die Gasbildung bei den Isonitrosoverbindungen zu erklären, bestehen zwar, es haben sich aber bis jetzt Anhaltspunkte für eine bestimmte Erklärungsweise noch nicht ergeben. Das letztere gilt auch für die Isonitrokörper (α -Säure I und Nitrobiliansäure). In den 3 Nitrohydroxamsäuren dürfte die Nitrogruppe kaum an der Gasbildung beteiligt sein. Bemerkte sei noch, daß in einzelnen Fällen versucht wurde, die nach Beendigung der Gasentwicklung restierenden Körper zu isolieren; es ist aber bisher noch nicht gelungen, hier zu reinen Verbindungen zu gelangen.

Beschreibung der Versuche.

Die Versuche wurden wieder wie früher in dem Apparat vorgenommen, den van Slyke im Abderhaldenschen Handbuch der Biochemischen Arbeitsmethoden⁹⁾ beschrieben hat. Die Acet- und die Benzhydroxamsäure verdanken wir der Freundlichkeit von Hrn. Kollegen C. Weygand, Leipzig, die Gallensäurepräparate wurden nach früher gegebenen Vorschriften¹⁰⁾ hergestellt. Die Proben (mit Ausnahme von 6 und 11) löste man unter Erwärmen in je 5 ccm Eisessig und brachte die Lösungen durch die Einfüllbürette in das Reaktionsgefäß unter Nachspülen mit je 5 ccm Eisessig in einzelnen Portionen. Probe 6 wurde in 0.5 ccm 10-proz. Natronlauge und 1 ccm Wasser gelöst, Nachspülen mit 4 ccm Wasser und 5 ccm Eisessig, Probe 11 in 5 ccm Wasser, Nachspülen mit 5 ccm Wasser und 5 ccm Eisessig. In den Versuchen 6, 9 und 10 schieden sich die Substanzen nach Einfüllen der Lösungen im Reaktionsgefäß wieder aus, in Versuch 9 löste sich die Ausscheidung später wieder auf, in den Versuchen 6 und 10 blieb sie bestehen, (bei Probe 6 schien der größte Teil der Substanz unangegriffen zu bleiben und nur eine kleine Menge unter Gasbildung zu reagieren). In allen anderen Fällen enthielt das Reaktionsgefäß von Anfang an klare Lösungen. Die Versuchsdauer betrug jedesmal $5\frac{1}{2}$ bis 6 Stunden. Am Ende des Versuchs und einige Male zwischendurch wurde das Reaktionsgefäß kurze Zeit geschüttelt, im übrigen blieb es sich selbst überlassen. Bei den geprüften Substanzen war damit zu rechnen, daß sich neben Stickstoff in geringerem oder größerem Umfang auch Stickoxydul bildete. Dieses Gas wird sich aber wegen seiner leichten Löslichkeit im van Slykeschen Versuch im allgemeinen nicht zu erkennen geben, da es in der alkal. Permanganatlösung bzw. in dem angesäuerten Wasser, über dem die Ablesung vorgenommen wird, gelöst bleibt. Um ganz sicher zu gehen, haben wir das entwickelte Gas, nachdem bei den Ablesungen Volumkonstanz eingetreten war, anfangs in eine mit Wasser gefüllte Pipette, bei den späteren Versuchen in das mit Wasser gefüllte Reaktionsgefäß des Apparates übergetrieben und mit dem Wasser geschüttelt. Es trat in den meisten Fällen keine nennenswerte Abnahme des Gasvolumens mehr ein, nur beim Hydroxylaminhydrochlorid und bei der Acethydroxamsäure

⁹⁾ Bd. VI, S. 278 [1912].

¹⁰⁾ Ztschr. physiol. Chem. **230**, 205, 203 [1934]; **226**, 51 [1934]; **223**, 263, 264 [1934]; **166**, 148 [1927]; **69**, 388 [1910]; **104**, 288 [1919]; **181**, 193 [1929].

war eine Volumverminderung festzustellen. Das restierende Gas dürfte im wesentlichen als Stickstoff anzusehen sein, eine Bildung von Kohlenoxyd in irgendwie nennenswerter Menge kann unter den milden Bedingungen des Versuchs als ausgeschlossen gelten. In einem früher mit einem Gallensäurederivat ausgeführten Versuch ist das entwickelte Gas nach gasanalytischer Methode von Hrn. L. Wolf, Leipzig, untersucht worden: es erwies sich als reiner Stickstoff, dem nur eine ganz geringfügige Menge von Sauerstoff beigemischt war¹¹⁾. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, daß O. Gerngroß und W. Deseke¹²⁾ den aus Glycyl-glycin im van Slykeschen Versuch entwickelten Stickstoff untersucht und darin 0.6% N₂O und 0.4% CO nachgewiesen haben. Die nachstehend angegebenen Werte beziehen sich auf feuchten Stickstoff, der blinde Wert ist bereits abgezogen. Die Berechnung in Prozenten ist, wie bereits oben gesagt, so zu verstehen, daß — um vergleichbare Zahlen zu erhalten — bei allen Stoffen 1 Mol. N₂ pro Mol. der angewandten Substanz mit 100% angesetzt wurde.

- 1) Acethydroxamsäure. 0.1122, 0.1270 g Sbst.: 1.0 ccm N (12°, 757 mm), 1.4 ccm N (17°, 754 mm).
C₂H₅O₂N. Gef. N 2.8, 3.4.
- 2) Benzhydroxamsäure. 0.0858 g Sbst.: 2.8 ccm N (12°, 757 mm).
C₆H₇O₂N. Gef. N 18.8.
- 3) Diketohydroxamsäure. 0.1182 g Sbst.: 1.0 ccm N (15°, 768.4 mm).
C₂₄H₂₆O₈N. Gef. N 16.7.
- 4) Oximinoketohydroxamsäure. 0.1124 g Sbst.: 6.5 ccm N (16°, 749.4 mm).
C₂₄H₃₀O₈N₂. Gef. N 114.0.
- 5) Oximinolactamhydroxamsäure. 0.1248 g Sbst.: 7.8 ccm N (17.5°, 760 mm).
C₂₄H₃₀O₈N₂. Gef. N 127.9.
- 6) Nitroketohydroxamsäure. 0.1116, 0.1204 g Sbst.: 0.5 ccm N (16°, 774.1 mm),
0.35 ccm N (19.5°, 759.8 mm).
C₂₄H₃₄O₉N₂. Gef. N 9.3, 5.9.
- 7) Nitrooximinohydroxamsäure. 0.1121 g Sbst.: 1.0 ccm N (15.5°, 774.5 mm).
C₂₄H₃₆O₉N₃. Gef. N 19.2.
- 8) Nitrolactamhydroxamsäure. 0.1188 g Sbst.: 0.7 ccm N (16°, 746.1 mm).
C₂₄H₃₆O₉N₃. Gef. N 12.3.
- 9) Desoxybiliansäure-oxim. 0.1200 g Sbst.: 1.5 ccm N (16.5°, 763 mm).
C₂₄H₃₇O₇N. Gef. N 23.4.
- 10) Dehydrocholsäure-trioxim. 0.1154 g Sbst.: 7.25 ccm N (16°, 762.5 mm).
C₂₄H₃₇O₈N₃. Gef. N 116.9.
- 11) Hydroxylamin-hydrochlorid (p. a. Merck). Etwa 0.1, 0.1214 g Sbst.: 0.7 ccm N (16.5°, 748.7 mm), 0.7 ccm N (17°, 751 mm).
NH₄OCl. Gef. N 2.0, 1.6.

¹¹⁾ Ztschr. physiol. Chem. **216**, 82 [1933].

¹²⁾ B. **66**, 1814 [1933].