

etwas weniger gut. Es entwickelt z. B. beim Uebergießen mit absolutem Alkohol sofort Aethan.

0.4570 g Sbst.: 0.3396 g AgBr. — 0.4797 g Sbst.: 0.0735 g MgO. — 0.2353 g Sbst.: 9.2 ccm N (23°, 758 mm).

$C_{11}H_{12}NMgBr$ . Ber. N 5.35, Br 30.47, Mg 9.28.

Gef. » 4.40, » 31.62, » 9.25.

469. Otto Diels und Emil Abderhalden:  
Zur Kenntniss des Cholesterins.

(II. Mittheilung.)<sup>1)</sup>.

[Aus dem Kgl. I. Berliner Universitäts-Laboratorium.]

(Eingegangen am 4. August 1904.)

Wie wir vor einiger Zeit mitgetheilt haben<sup>2)</sup>, gelingt es, das Cholesterin durch alkalische Bromlösung zu einer sehr charakteristischen Säure zu oxydiren, der wir damals die Formel  $C_{20}H_{32}O_3$  beilegt haben. Diese stützte sich in erster Linie auf das Ergebniss mehrerer Molekulargewichtsbestimmungen, die mit dem Aethylester der Säure ausgeführt waren. Sie schien uns besonders plausibel, weil wir in der neuen Säure die doppelte Bindung des Cholesterins nicht mehr nachweisen konnten, sodass die Annahme gerechtfertigt erschien, dass mit der Oxydation gleichzeitig eine Spaltung vor sich gegangen war. Allein bereits in unserer ersten Publication haben wir That-sachen aufgefunden, die mit der angenommenen Formel nicht recht in Einklang zu bringen waren.

Vor allem konnten wir die Function des dritten Sauerstoffatoms der Säure  $C_{20}H_{32}O_3$  nicht feststellen und sprachen daher die Vermuthung aus, dass es zu einer tertiären Hydroxylgruppe gehöre. Weiter gelang uns die Ueberführung der Säure in ein sehr charakteristisches Silbersalz, dessen analytische Werthe die Annahme eines recht complicirten Moleküls nöthig machten. — Die weitere Beschäftigung mit der erwähnten Säure bestärkte die Zweifel an der Richtigkeit der aufgestellten Formel immer mehr.

Zunächst gelang es trotz vieler darauf verwendeter Mühe nicht, den aus 7 Kohlenstoffatomen zusammengesetzten Rest zu isoliren, der

<sup>1)</sup> Die zur Cholesterindarstellung erforderlichen Gallensteine wurden uns von den HHrn. Prof. Bostroem (Giessen), Geh. Rath Prof. Orth (Berlin) und Prof. Langerhans (Berlin) freundlichst zur Verfügung gestellt. Wir erlauben uns, den genannten Herren auch an dieser Stelle herzlich zu danken.

<sup>2)</sup> Diese Berichte 36, 3177 [1903].

nach der angenommenen Formel aus dem Cholesterinmolekül abgespalten sein musste.

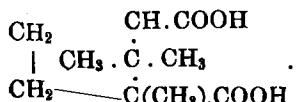
Auch die Hoffnung, die Säure leichter und glatter als das Cholesterin selbst zu einfacheren Verbindungen zu oxydiren, erfüllte sich in keiner Weise.

Endlich verließen alle Versuche, die Anwesenheit des tertiären Hydroxyls zu beweisen, ergebnisslos.

Diese Erfahrungen veranlassten uns, die Formel der Säure einer genauen Revision zu unterziehen, und wir gelangten zu dem Resultate, dass die von uns früher aufgestellte Formel unrichtig ist und durch  $C_{27}H_{44}O_4$  ersetzt werden muss.

Die Analysen können natürlich darüber keinen Aufschluss geben, da die Werthe der Säure, des Silbersalzes und des Esters nach der alten und neuen Formulirung fast identisch sind. Dagegen beweist die Titration der Säure mit aller Schärfe ihre Zweibasicität. Zwar gelingt es mit Natronlauge nur eine Carboxylgruppe nachzuweisen, eine Erscheinung, die auf der Bildung eines sehr schwer löslichen, sauren Natriumsalzes beruht. Dagegen documentirt die Säure bei der Titration mit Kalilauge ihre zweibasische Natur.

Dementsprechend verhält sich der früher beschriebene Monoäthylester wie eine einbasische Säure und lässt sich als solche titriren. Die Darstellung eines neutralen Esters gelingt leicht durch Umsetzung des Silbersalzes  $C_{27}H_{44}O_4Ag_3$  mit Jodmethyl. Dagegen erhält man bei der Veresterung der freien Säure stets die entsprechenden sauren Ester. Dieses Resultat ist bemerkenswerth und erinnert auffallend an die bei der Veresterung der Camphersäure gemachten Beobachtungen:



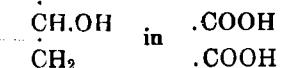
Wie Brühl<sup>1)</sup> gezeigt hat, wird nämlich hierbei das eine Carboxyl viel rascher verestert als das andere, und es ist das tertiär gebundene Carboxyl, welches der Veresterung einen hartnäckigen Widerstand entgegengesetzt. Wenn man diese Erfahrungen auf unsere Säure  $C_{27}H_{44}O_4$  überträgt, so erscheint der Schluss berechtigt, dass die eine Carboxylgruppe primär oder secundär, dagegen die zweite tertiär gebunden ist.

Aber noch andere Schlüsse lassen sich aus der Zusammensetzung  $C_{27}H_{44}O_4$  der erwähnten Säure ziehen. Die Abwesenheit des Hydroxyls lässt die Vermuthung aufkommen, dass es gewissermaassen den Angriffspunkt für die Oxydation bildet.

<sup>1)</sup> Diese Berichte 25, 1796 [1892].

Mit dieser Anschauung stimmen unsere Beobachtungen überein, wonach alle diejenigen Cholesterinderivate, deren Hydroxyl substituirt ist, z. B. Acetyl-, Benzoyl-Cholesterin, ferner Cholesten, welches überhaupt keinen Sauerstoff enthält, von alkalischer Bromlösung nicht angegriffen werden.

Wenn man daher von der wahrscheinlichen Annahme ausgeht, dass bei der Oxydation des Cholesterins mit alkalischer Bromlösung eine einfache Umwandlung von



stattfindet, und wenn man ferner die Zusammensetzung  $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}_4$  des Reactionsproductes in Betracht zieht, so kommt man zu dem zwingenden Schluss, dass die Säure durch Oxydation eines ringförmigen Systems entsteht, und dass auch das Hydroxyl des Cholesterins an einem Ringe steht.

Die doppelte Bindung des Cholesterins scheint also bei der Oxydation in keiner Weise betheiligt zu sein und muss — wie ja auch aus der Formel  $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}_4$  hervorgeht — noch im Molekül der Säure vorhanden sein. Trotzdem ist uns bis jetzt ihr directer Nachweis noch nicht gelungen, wenngleich das Verhalten der Säure gegen Brom, sowie gegen Permanganat auf ihre Anwesenheit zu deuten scheint. Nimmt man nicht tiefgreifende Umlagerungen an, die bei der Oxydation des Cholesterins zu der Säure ja immerhin stattfinden könnten, so wird man für diese Indifferenz der Doppelbindung nach besonderen Ursachen suchen müssen.

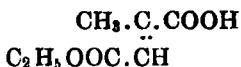
Dass eine Doppelbindung durch die üblichen Reagentien nicht oder sehr schwer nachweisbar ist, erscheint nicht besonders auffallend und liesse sich durch manches Beispiel illustrieren. Einer Erklärung bedarf nur die Thatsache, dass die Doppelbindung des Cholesterins beim Uebergang zur Säure  $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}_4$  ihren Charakter völlig verändert. Das Cholesterin addirt bekanntlich leicht und glatt 2 Atome Brom, und das entstehende Dibromid ist ziemlich beständig. Allein bereits beim Cholestenon kann man — wie wir im experimentellen Theile zeigen werden — beobachten, dass zwar die Doppelbindung sich noch ganz normal durch Brom nachweisen lässt, dass aber das Cholestenonbromid sehr zersetzblich ist.

Geht endlich die Oxydation weiter zur Säure  $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}_4$ , so wird die Wirkung auf die Doppelbindung noch stärker ausgeprägt sein müssen, wie das auch thatsächlich der Fall ist.

Sei es nun, dass die relativ erhebliche Negativität der Carboxylgruppe eine Rolle spielt, oder dass irgend welche räumlichen Hinde-

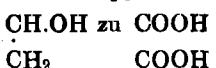
rungen die normalen Functionen der Doppelbindung stören, jedenfalls wird dieser unverkennbare Zusammenhang zwischen Carboxylgruppe und doppelter Bindung besonders plausibel, wenn man annimmt, dass die Letztere in  $\alpha, \beta$ -Stellung zum COOH-Rest steht.

Eine solche Annahme würde sich besonders gut mit den vorhin erwähnten, bei der Veresterung gemachten Beobachtungen vereinigen lassen, denn Anschütz<sup>1)</sup> hat gezeigt, dass die Mesaconsäure bei der Esterificirung zunächst stets einen sauren Ester



bildet, und dass das secundär gebundene Carboxyl hierbei zuerst angegriffen wird.

Wie wir oben gezeigt haben, verdankt die Säure  $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}_4$  ihre Entstehung der Oxydation der Gruppe



Es muss also — sofern man die für die  $\alpha, \beta$ -Stellung der Doppelbindung zur einen Carboxylgruppe angeführten Argumente als stichhaltig ansieht — das Hydroxyl des Cholesterins in  $\alpha, \beta$ - oder  $\beta, \gamma$ -Stellung zur doppelten Bindung sich befinden.

Wenngleich wir die Entscheidung dieser Frage noch nicht mit absoluter Sicherheit treffen konnten, so gelang uns doch die Auffindung von Thatsachen, welche die Nachbarstellung von Hydroxyl und Doppelbindung sehr wahrscheinlich machen.

Wir konnten hierzu die Beobachtung benutzen, dass Cholesterin bei hoher Temperatur mit Kupferoxyd zum entsprechenden Keton, dem bisher unbekannten Cholestenon,  $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}$ , oxydiert werden kann.

Das Cholestenon, welches als solches und durch mehrere Derivate charakterisiert wurde, verhält sich nach unseren bisherigen Erfahrungen wie ein  $\alpha, \beta$ -ungesättigtes Keton. Vor allem documentirt sich dies im Verhalten des Ketons gegen Hydroxylamin; denn ausser dem normalen Oxim beobachteten wir die Bildung eines Productes, welches zwar nicht in völlig reinem Zustande vorlag, aber nach dem Ergebniss der Analysen und seinem ganzen Verhalten als Anlagerungsproduct von Hydroxylamin an die doppelte Biudung aufgefasst werden muss.

Die Bildung derartiger Hydroxylaminabkömmlinge ist für die  $\alpha, \beta$ -ungesättigten Ketone besonders charakteristisch. —

Wir betonen indessen ausdrücklich, dass wir nach den Ergebnissen unserer Untersuchung die  $\alpha, \beta$ -ungesättigte Natur des Cholesterins, Cholestenons und der Säure  $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}_4$  zwar für wahrscheinlich,

<sup>1)</sup> Diese Berichte 80, 2651, 2653 [1898].

aber nicht für absolut sicher halten. Wir werden uns bemühen, durch ein weiteres eingehendes Studium die Entscheidung herbeizuführen<sup>1)</sup>.

Ausserdem haben wir die Oxydation des Cholesterins mit Ozon in Angriff genommen und hoffen, über die Resultate dieser Untersuchung alsbald berichten zu können.

### Säure $C_{27}H_{44}O_4$ .

Eine Zusammenstellung der analytischen Zahlen für  $C_{20}H_{32}O_3$  und  $C_{27}H_{44}O_4$  zeigt die Unmöglichkeit, auf diesem Wege eine Entscheidung zwischen den Formeln zu treffen:

$C_{20}H_{32}O_3$ . Ber. C 75.00, H 10.00.

$C_{27}H_{44}O_4$ . » » 75.00, » 10.18.

Gef. » 74.7, 74.9, 74.9, » 10.3, 10.2, 10.3.

Auch die früher gefundenen Werthe des Silbersalzes lassen sich gerade so gut mit der Formel  $C_{27}H_{42}O_4Ag_2$  vereinigen.

$C_{40}H_{61}O_6Ag_2$ . Ber. C 49.94, H 6.34. Ag 33.71.

$C_{27}H_{42}O_4Ag_2$ . » » 50.15, » 6.50, » 33.43.

Gef. » 49.50, 49.43, » 6.50, 6.67, » 32.87, 33.16.

Schliesslich seien die analytischen Zahlen des früher beschriebenen Aethylesters mit den nach der alten und der neuen Formulirung sich ergebenden Werthen verglichen:

$C_{22}H_{36}O_3$ . Ber. C 75.86, H 10.34.

$C_{29}H_{48}O_4$ . » » 75.65, » 10.43.

Gef. » 75.60, » 10.59.

Dagegen führt die Titration der freien Säure und des Aethylesters einwandfrei zu dem Schluss, dass eine zweibasische Säure vorliegt, und die Menge der verbrauchten Titrirflüssigkeit steht in so guter Uebereinstimmung mit der für eine Dicarbonsäure der Formel  $C_{27}H_{44}O_4$  verlangten, dass man diese Zusammensetzung als die richtige ansehen muss.

Freilich lässt sich — wie bereits erwähnt — mit Normal-Natronlauge als Titrirflüssigkeit nur eine Carboxylgruppe nachweisen, doch beruht diese Erscheinung auf der Ausscheidung eines sehr schwer löslichen, sauren Natriumsalzes.

<sup>1)</sup> Es dürfte verfrüht sein, die Resultate dieser Arbeit mit den von A. Windaus (diese Berichte 36, 3752 [1903] und 37, 2027 [1904]) aus den Ergebnissen seiner Versuche gezogenen Schlussfolgerungen zu vergleichen. Dagegen möchten wir Folgendes betonen: Windaus hat eine Ketodicarbonsäure der Formel  $C_{26}H_{42}O_3$  dargestellt, die sich offenbar von dem von uns beschriebenen Cholestenon ableitet. Es scheint uns, als ob diese Säure durch Aufspaltung eines anderen Ringes entsteht, als die von uns beschriebene Säure  $C_{27}H_{44}O_4$ . Windaus hat die Oxydation in saurer, wir dagegen in alkalischer Lösung vorgenommen. Es könnten sehr wohl bei so verschiedenen Arbeitsmethoden auch ganz verschiedene Effecte erzielt werden.

0.4909 g Sbst. verbrauchten 11.87 ccm  $1/10\text{-}n.$ -Natronlauge. — 0.6536 g Sbst. verbrauchten 15.65 ccm  $1/10\text{-}n.$ -Natronlauge.

Berechnet für  $C_{27}H_{44}O_4$  (einbasisch) 11.35 ccm resp. 15.47 ccm.

Bei Anwendung von Normal-Kalilauge erhält man die richtigen Werthe: 0.4848 g Säure verbrauchten 21.74 ccm  $1/10\text{-}n.$ -Kalilauge. — 0.1710 g Sbst. verbrauchten 7.69 ccm  $1/10\text{-}n.$ -Kalilauge.

Berechnet für  $C_{27}H_{44}O_4$  (zweibasisch) 22.53 ccm resp. 7.94 ccm.

Der früher beschriebene Aethylester erweist sich übereinstimmend mit dem Ergebniss der Analyse als eine Estersäure. Die Titration, die in alkoholischer Lösung mit Phenolphthalein als Indicator vorgenommen wurde, führte zu folgendem Ergebniss:

0.3052 g Sbst. verbrauchten 6.8 ccm  $1/10\text{-}n.$ -Kalilauge. — Berechnet für  $C_{29}H_{48}O_4$  (einbasische Estersäure) 6.65 ccm.

Die Molekulargewichtsbestimmungen dieses Esters lieferten folgende Zahlen:

0.3428 g Sbst.: 16.1 g Eisessig, 0.207° Depression. — 0.3835 g Sbst.: 23.12 g Eisessig, 0.151° Depression:

$C_{29}H_{48}O_4$ . Ber. M 460. Gef. M 401, 438.

Die Anwesenheit einer Doppelbindung im Moleküle der Säure liess sich bis jetzt einwandsfrei nicht feststellen. Zwar reducirt die alkalische Lösung der Säure Permanganat momentan, doch wird diese Reaction bedeutend verlangsamt, sobald man die Säure in kohensaurem Alkali gelöst zur Anwendung bringt. Auch die Einwirkung von Brom auf die Ester der Säure verläuft derartig, dass sie einen bindenden Schluss nicht zulässt. Die Entfärbung einer selbst sehr schwächen Bromlösung geht nur langsam vor sich und ist stets mit einer deutlichen Bromwasserstoffentwicklung verbunden.

Endlich sei erwähnt, dass auch die Addition von Wasserstoff nach den üblichen Methoden bis jetzt nicht gelungen ist.

#### Neutraler Methylester ( $C_{29}H_{48}O_4$ ) der Säure $C_{27}H_{44}O_4$ .

1.5 g des Silbersalzes  $C_{27}H_{42}O_4Ag_2$ , dessen Darstellung früher beschrieben ist, werden möglichst fein gepulvert und mit 3 ccm frisch destillirtem Jodmethil übergossen. Die Reaction tritt nach wenigen Augenblicken unter deutlicher Erwärmung ein und ist nach kurzer Zeit vollendet.

Nach mehreren Stunden wird die gelbe Masse mit kaltem, absolutem Alkohol durchgeführt, abgesaugt und mit kaltem Alkohol ausgewaschen. Der Rückstand besteht ausschliesslich aus Jodsilber, während das Filtrat den gebildeten Ester enthält. Es wird im Vacuum über Schwefelsäure eingedunstet, wobei die neue Verbindung sich in schönen, glänzenden Krystalldrusen abscheidet.

Zur Reinigung wird die Substanz am besten aus warmem Methylalkohol umkristallisiert; sie lässt sich so in prachtvollen, weissen Prismen gewinnen. Zur Analyse wurde der Ester im Vacuum über Schwefelsäure getrocknet:

0.1458 g Sbst.: 0.4003 g CO<sub>2</sub>, 0.1376 g H<sub>2</sub>O. — 0.1200 g Sbst.: 0.3313 g CO<sub>2</sub>, 0.1151 g H<sub>2</sub>O.

C<sub>29</sub>H<sub>46</sub>O<sub>4</sub>. Ber. C 75.65, H 10.48.  
Gef. » 74.87, 75.29, » 10.48, 10.65.

Im Capillarrohr erhitzt, sintert die Substanz von 67° ab und schmilzt bei 69°. Von kaltem Methyl- und Aethyl-Alkohol wird sie ziemlich schwierig, leicht dagegen in der Siedehitze aufgenommen. Sie krystallisiert aus diesen Lösungsmitteln in rosettenförmig angeordneten Prismen. In Aceton und Aether löst sie sich bereits in der Kälte ausserordentlich leicht.

#### Saurer Methylester (C<sub>28</sub>H<sub>46</sub>O<sub>4</sub>) der Säure C<sub>27</sub>H<sub>44</sub>O<sub>4</sub>.

Die Veresterung der Säure C<sub>27</sub>H<sub>44</sub>O<sub>4</sub> mit methylalkoholischer Salzsäure führt in der Wärme und in der Kälte zu demselben Producte, nämlich einem sauren Methylester.

A. 6 g Säure werden mit 120 ccm 4-prozentiger, methylalkoholischer Salzsäure etwa 17 Stunden geschüttelt. Nach dieser Zeit ist die Umwandlung in den Ester complet, und der Letztere hat sich grössttentheils (5 g) bereits während des Schüttelns abgeschieden. Zur Reinigung krystallisiert man die Substanz am besten aus wenig Aceton um.

B. 1 g Säure wird mit 10 ccm 4-prozentiger, methylalkoholischer Salzsäure 2 Stunden am Rückflusskühler gekocht. Die Veresterung, die hier offenbar schon nach wenigen Minuten vollendet ist, führt ebenfalls zu dem sauren Methylester, der in einer Menge von 0.9 g isolirt wurde.

Zur Analyse wurde die Substanz im Vacuum über Schwefelsäure getrocknet:

0.1426 g Sbst.: 0.3946 g CO<sub>2</sub>, 0.1338 g H<sub>2</sub>O.

C<sub>28</sub>H<sub>46</sub>O<sub>4</sub>. Ber. C 75.33, H 10.31.  
Gef. » 75.47, » 10.42.

Beim Erhitzen im Capillarrohr schmilzt die Verbindung bei 124° (corr. 125°). Sie ist in heissem Methyl- und Aethyl-Alkohol, sowie in Aceton recht leicht löslich und krystallisiert aus diesen Lösungsmitteln in dicken, sechsseitigen Tafeln. Von Benzol und Aether wird sie bereits in der Kälte leicht aufgenommen.

Beim Uebergieessen mit kalter, verdünnter Kalilauge verwandelt sich der Ester sofort in eine durchsichtige Gallerte. Die Letztere geht mit mehr 33-prozentiger Lauge in gelatinöse Flocken über, während die Flüssigkeit selbst wieder dünnflüssig wird. Arbeitet man in alkoholischer Lösung, so bleibt das entstehende Kaliumsalz in Lösung.

Cholestenon,  $C_{27}H_{44}O$ .

5 g Cholesterin werden in einem weiten, in einem Metallbade befindlichen Reagensglase geschmolzen und dann auf 280—300° (Badtemperatur) erhitzt. Hierauf trägt man 1 g feines Kupferoxyd (wie es zu organischen Elementaranalysen verwendet wird) in 3—4 Portionen in die geschmolzene Masse ein. Bald tritt lebhafte Reaction ein, welche sich durch die Entwicklung von Wasser und Wasserstoff zu erkennen giebt und nach 20—25 Minuten beendet ist. Man giesst die heisse Reactionsflüssigkeit in einen Kolben und bewirkt durch geeignetes Drehen des Letzteren, dass die beim Abkühlen zäb werdende Masse sich an den Wandungen vertheilt. Nach völligem Erkalten wird das Reactionsproduct zwei Mal mit je 25 ccm kaltem und möglichst wasserfreiem Methylalkohol so lange durchgeschüttelt, bis fast alles in Lösung gegangen ist. Hierauf fügt man Thierkohle hinzu, schüttelt nochmals einige Minuten kräftig und filtrirt sodann.

Das klare, leicht gelblich gefärbte Filtrat wird in einer tiefen Krystallisirschale im Vacuum über Schwefelsäure eingedunstet, wobei sich allmählich oft sehr schön ausgebildete, weisse Krystalldrusen abscheiden.

Die Ausbeute an Cholestenon ist schwankend, doch erhält man im Durchschnitt etwa 25—30 pCt. der Theorie.

Zur Reinigung kann man das Rohproduct aus 35—38° warmem Methylalkohol oder aus sehr wenig heissem Essigester umkrystallisiren. Zur Analyse wurde die Substanz im Vacuum über Schwefelsäure getrocknet:

0.1861 g Sbst.: 0.5742 g  $CO_2$ , 0.1910 g  $H_2O$ . — 0.1628 g Sbst.: 0.5054 g  $CO_2$ , 0.1700 g  $H_2O$ . — 0.1431 g Sbst.: 0.4446 g  $CO_2$ , 0.1477 g  $H_2O$ .

$C_{27}H_{44}O$ . Ber. C 84.37, H 11.45.  
Gef. » 84.15, 84.66, 84.73, » 11.40, 11.60, 11.47.

Das Cholestenon schmilzt bei 78°.

Es ist in den meisten organischen Lösungsmitteln schon in der Kälte löslich, so in Aether, Benzol, Petroläther und Schwefelkohlenstoff. Etwas weniger leicht wird es von Methyl- und Aethyl-Alkohol, sowie von kaltem Essigester aufgenommen.

Die Farbenreactionen des Cholestenons sind zwar denen des Cholesterins recht ähnlich, aber doch verschieden von diesen. Wird eine Lösung von wenig Cholestenon in Chloroform mit concentrirter Schwefelsäure geschüttelt, so färbt sich Letztere tief roth, während das Chloroform nur eine gelbe Farbe annimmt. Mit Essigsäureanhydrid und Schwefelsäure behandelt, giebt das Cholestenon eine Lösung, die erst gelb aussieht, sich hierauf roth, dann violett färbt und schliesslich dauernd eine grünblaue Färbung annimmt.

Die ungesättigte Natur des Cholestenons verräth sich durch die leichte Addition von Brom; doch ist das entstehende Bromid recht leicht zersetzlich, und es wurde daher auf seine Darstellung vorläufig verzichtet.

#### Cholestenon-phenylhydrazon.

1 g Cholestenon wird mit 2 g reinem Phenylhydrazin 4 Minuten im Reagensglase gekocht. Die heisse Flüssigkeit wird in 8 ccm Eisessig eingegossen und schnell verrührt. So bald die Masse fest geworden ist, zerkleinert man sie und saugt sie ab. Hierauf wird sie einmal mit 10, dann mit 5 ccm Methylalkohol aufgekocht und schliesslich möglichst schnell in wenig siedendem Essigester gelöst. Die auskrystallisirenden, gelblichen Krystallnadeln wurden zur Analyse im Vacuum über Schwefelsäure getrocknet:

0.1499 g Sbst.: 0.4587 g CO<sub>2</sub>, 0.1439 g H<sub>2</sub>O. — 0.1470 g Sbst.: 0.4499 g CO<sub>2</sub>, 0.1406 g H<sub>2</sub>O. — 0.1810 g Sbst.: 9.6 ccm N (20°, 760 mm).

C<sub>33</sub>H<sub>50</sub>N<sub>2</sub>. Ber. C 83.54, H 10.55, N 5.90.  
Gef. » 83.46, 83.46, » 10.66, 10.62, » 6.05.

Beim Erhitzen beginnt die Substanz, von 125° ab sich schwach gelbbraun zu färben und gegen 142° zu sintern. Bei 152° ist sie völlig zu einer braungelben Flüssigkeit geschmolzen.

Auch das *p*-Nitrophenylhydrazon des Cholestenons lässt sich ziemlich leicht darstellen: Eine Lösung von 1 g Cholestenon in 13 ccm 50° warmem Methylalkohol wird vermischt mit einer Lösung von 0.4 g Nitrophenylhydrazin in 9 ccm Methylalkohol und einige Minuten auf dem Wasserbade erwärmt. Als bald scheidet sich ein rothes Oel ab, welches nach etwa 2 Tagen zu krystallisiren beginnt, aber selbst bei öfterem Umrühren erst nach 5 Tagen völlig erstarrt ist. Die Krystalle werden aus wenig siedendem Aceton umgelöst, und bilden dann schön orangefarbene, oft verwachsene Prismen.

Zur Analyse wurde die Verbindung im Vacuum über Schwefelsäure getrocknet:

0.1291 g Sbst.: 0.3615 g CO<sub>2</sub>, 0.1118 g H<sub>2</sub>O. — 0.1733 g Sbst.: 11.5 ccm N (16°, 753 mm).

C<sub>33</sub>H<sub>48</sub>O<sub>2</sub>N<sub>3</sub>. Ber. C 76.30, H 9.44, N 8.09.  
Gef. » 76.36, » 9.62, » 7.67.

Der Schmelzpunkt dieser Substanz ist sehr unscharf: Beim Erhitzen fällt sie gegen 160° zusammen, ist aber erst gegen 195° völlig geschmolzen.

#### Cholestenon-semicarbazone.

Eine Lösung von 1 g Cholestenon in 70 ccm Methylalkohol wird mit einer methylalkoholischen Lösung von essigsaurem Semicarbazid (0.3 g Semicarbazidchlorhydrat in 1 ccm Wasser, dazu 0.3 g Kalium-

acetat in ca. 3 ccm Methylalkohol gelöst und vom Chlorkalium abfiltrirt) vermischt. Nach kurzer Zeit scheidet sich eine reichliche Menge weisser, gelatinöser Flocken ab, die sich innerhalb einiger Tage in feine Krystallnadeln verwandeln. Nachdem diese Umwandlung complett ist, filtrirt man das Semicarbazon ab und wäscht es gründlich mit Methylalkohol aus. Zur Analyse wurde ein Präparat verwendet, welches mehrere Stunden bei 100° getrocknet war:

0.1431 g Sbst.: 0.4033 g CO<sub>2</sub>, 0.1885 g H<sub>2</sub>O. — 0.1491 g Sbst.: 0.4173 g CO<sub>2</sub>, 0.1432 g H<sub>2</sub>O. — 0.1613 g Sbst.: 12.9 ccm N (17°, 751 mm).

C<sub>28</sub>H<sub>47</sub>ON<sub>3</sub>. Ber. C 76.19, H 10.88, N 9.52.

Gef. » 76.86, 76.33, » 10.75, 10.67, » 9.17.

Beim Erhitzen beginnt die Verbindung, gegen 222° sich schwach zu färben und zu sintern. Sie schmilzt dann bei 234° [corr. 240°] unter Gasentwickelung.

#### Versuche mit Hydroxylamin<sup>1)</sup>.

##### I. Cholestenon-oxim.

4 g reines Cholestenon werden in 300 ccm kaltem Methylalkohol gelöst und mit einer Auflösung von 0.8 g Hydroxylaminchlorhydrat in 12 ccm Methylalkohol versetzt. Nach 3-tägigem Stehen wird die Flüssigkeit im Vacuum über Schwefelsäure eingedunstet. Es hinterbleibt eine farblose, zähflüssige Masse, welche beim Verreiben mit viel Wasser alsbald krystallinisch erstarrt. Sie wird abgesaugt, mit Wasser ausgewaschen, getrocknet und aus heissem Essigester umkrystallisiert.

Die Verbindung krystallisiert daraus in feinen Nadelchen, die zur Analyse im Vacuum über Schwefelsäure getrocknet wurden.

0.1261 g Sbst.: 0.3773 g CO<sub>2</sub>, 0.1282 g H<sub>2</sub>O. — 0.1893 g Sbst.: 5.8 ccm N (23°, 762 mm).

C<sub>27</sub>H<sub>45</sub>ON. Ber. C 81.20, H 11.27, N 3.50.

Gef. » 81.60, » 11.29, » 3.46.

Beim Erhitzen im Capillarrohr schmilzt das Oxim scharf bei 150° [corr. 152°] und reducirt Fehling'sche Lösung nicht.

Aus der Essigestermutterlauge von diesem reinen Oxim krystallisiert eine Verbindung, welche sich durch ihr Aussehen, durch den sehr unscharfen Schmelzpunkt und durch die Reduktionswirkung auf Fehling'sche Lösung scharf von dem Oxim unterscheidet.

<sup>1)</sup> Wir haben uns bei der Ausführung dieser Versuche der von C. Harries ausgearbeiteten Vorschrift bedient. Vergl. Ann. d. Chem. 330, 185 [1904].

## II. Anlagerung von Hydroxylamin an die doppelte Bindung.

Während die Darstellung des eben beschriebenen, normalen Oxims bei warmer Witterung vorgenommen war, wurde bei ganz analog angesetzten Versuchen während der kühlen Jahreszeit in der Hauptsache ein anderes Product erhalten.

Die Verarbeitung des Cholestenons geschah genau nach den unter I gegebenen Vorschriften. Das sorgfältig getrocknete Rohproduct wurde aus siedendem Aceton umgelöst, wobei viereckige, schmale Blättchen auskristallisierten, die zur Analyse im Vacuum über Schwefelsäure getrocknet wurden.

0.1492 g Sbst.: 0.4296 g CO<sub>2</sub>, 0.1493 g H<sub>2</sub>O. — 0.1306 g Sbst.: 0.3749 g CO<sub>2</sub>, 0.1300 g H<sub>2</sub>O. — 0.1619 g Sbst.: 5.00 ccm N (17°, 756 mm).

C<sub>27</sub>H<sub>47</sub>O<sub>2</sub>N. Ber. C 77.69, H 11.27, N 3.35.  
Gef. » 78.52, 78.29, » 11.12, 11.06, » 3.57.

Beim Erhitzen im Capillarrohr beginnt die Substanz bereits bei etwa 135°, sich deutlich gelb zu färben und zusammenzuziehen und schmilzt zwischen 142° und 147°. Sie reducirt Fehling'sche Lösung beim Kochen sehr stark.

Der unscharfe Schmelzpunkt, ferner das Ergebniss der Analyse und die mikroskopische Untersuchung der Substanz weisen deutlich auf ein Gemenge hin, und man kann für diese Anschauung eine Stütze im Verhalten gegen Salzsäure erblicken, wobei offenbar das basische Anlagerungsproduct gelöst und das normale Oxim gebildet wird.

1 g des Gemenges wird mit einem Gemisch von 3 ccm verdünnter und 2 ccm rauchender Salzsäure kurze Zeit gekocht. Zunächst wird die Masse weich, erstarrt aber bald wieder. Man saugt das Reactionsproduct ab, wäscht es mit Wasser aus, trocknet es im Vacuum über Schwefelsäure und kristallisiert es aus heissem Aceton um.

0.1244 g Sbst.: 0.3679 g CO<sub>2</sub>, 0.1242 g H<sub>2</sub>O.  
C<sub>27</sub>H<sub>45</sub>ON. Ber. C 81.20, H 11.27.  
Gef. » 80.51, » 11.09.

Diese Analysenzahlen nähern sich denen des normalen Oxims, und der Schmelzpunkt der Substanz, der bei 149° liegt, deutet ebenfalls auf diese Verbindung hin.

### Anhang: Darstellung von Cholesterylcchlorid.

Wenn man Cholesterin mit einem Ueberschuss von Thionylchlorid versetzt, so löst es sich zunächst unter Schäumen auf, dann aber erstarrt die ganze Masse wieder, und die Reaction ist beendet. Zur Reinigung wird das so gewonnene Cholesterylcchlorid am besten mehr-

mals aus Aether umkristallisiert. Es schmilzt dann bei 96°, ist also völlig rein. Die Analyse ergab die richtigen Werthe.

0.1996 g Sbst.: 0.5856 g CO<sub>2</sub>, 0.2007 g H<sub>2</sub>O. — 0.3301 g Sbst.: 0.1179 g AgCl.

Ber. C 80.09, H 11.10, Cl 8.77.

Gef. » 80.18, » 11.29, » 8.81.

Dieses Verfahren der Cholesterylchlorid-Darstellung ist sehr einfach und besitzt gegenüber dem älteren wesentliche Vortheile.

Es ist uns nicht gelungen, das Chloratom durch die Amidogruppe zu ersetzen. Bei der Behandlung des Cholesterylchlorids mit methyl- oder äthyl-alkoholischem Ammoniak entstehen vielmehr krystallinische Cholesterilene, die bei 82° resp. 256° schmelzen.

---

#### 470. Emil Fischer und Peter Bergell: Spaltung einiger Dipeptide durch Pankreasferment.

[Aus dem I. chemischen Institut der Universität Berlin.]

(Eingegangen am 5. August 1904.)

Vor einem Jahre<sup>1)</sup> haben wir gezeigt, dass die Naphtalinsulfo- und Carbäthoxyl-Derivate des Glycyl-tyrosins und des Glycyl-leucins durch Pankreasferment hydrolysiert werden. Nachdem die freien Polypeptide durch die neuen synthetischen Methoden in grösserer Zahl zugänglich geworden waren, lag es nahe, ihr Verhalten gegen das Enzym ebenfalls zu studiren. Mit positivem Erfolge haben wir das bei dem Glycyl-*l*-tyrosin und dem inactiven Leucyl-alanin gethan. Bei dem ersten ist die Hydrolyse am leichtesten zu beobachten, weil das Tyrosin auskristallisiert. Da das Glycyl-*l*-tyrosin in stereochemischer Beziehung einheitlich sein muss, so war eine gleichmässige und schliesslich vollständige Hydrolyse durch das Enzym zu erwarten. In Wirklichkeit haben wir aber nicht die theoretische Menge von Tyrosin erhalten können. Wir werden auf diesen Punkt später zurückkommen. Das andere Dipeptid ist racemisch, und man durfte deshalb bei ihm eine asymmetrische Wirkung des Enzyms erwarten, wie wir sie früher beim Carbäthoxylglycyl-*d*-*l*-leucin beobachtet haben. Das ist in der That der Fall. Als Spaltungsproducte des Leucyl-alanins konnten wir *l*-Leucin und *d*-Alanin sicher nachweisen und die Bildung von aktivem Dipeptid sehr wahrscheinlich machen.

---

<sup>1)</sup> Diese Berichte 36, 2592 [1903].