

### 50. Harry Sobotka und Jos Kahn: Über Acetessigester-Choleinsäure.

[Aus d. Laborat. d. Mount Sinai-Hospitals zu New-York.]

(Eingegangen am 28. November 1931.)

Im Laufe von Untersuchungen über Choleinsäuren<sup>1)</sup> legten wir uns die Frage vor, welche Beziehungen zwischen Choleinsäure-Bildung und den verschiedenen Arten von Isomerie bestehen. Über die Aufspaltung von Racematen durch die ungleiche Löslichkeit der Choleinsäuren optischer Antipoden wurde vor kurzem berichtet<sup>2a)</sup>. Die vorliegenden Versuche behandeln die Beziehung von Keto-Enol-Tautomerie zur Komplexbildung mit Gallensäuren. Wir finden, daß aus dem Äthylester der Acetessigsäure mittels der üblichen Methoden<sup>2)</sup> eine Choleinsäure von der Zusammensetzung 3 Desoxy-cholsäure + 1 Acetessigester hergestellt werden kann. Näheres über die Herstellung und Analyse dieser Verbindung, sowie der analog gebauten Acetyl-aceton-Tri-choleinsäure und Benzoyl-aceton-Tri-choleinsäure wird in anderem Zusammenhang veröffentlicht werden<sup>3)</sup>.

Schmelzpunkt der Acetessigester-Choleinsäure 154° (korr.); Säure-Äquivalent gef. 433, 442; ber. für Koordinationszahl 3: 435,6; Acetessigester gef. als Aceton 9,1%, ber. 9,95%; nichtflüchtig mit Wasserdampf 89,98%, ber. 90,05%.

Zur Untersuchung, ob der Acetessigester in dieser Molekularverbindung in der Enol- oder in der Keto-Form vorliegt, bedienten wir uns der K. H. Meyerschen Brom-Titrationsmethode in ihrer verbesserten Ausführungsform<sup>4)</sup>. Wie aus den in der Tabelle angeführten Titrations-Ergebnissen zu ersehen ist, enthält die Acetessigester-Choleinsäure vollkommen oder nahezu vollkommen enolisierten Ester, während der freie Ester nach K. H. Meyer nur 7% Enol und eine alkohol. Lösung etwa 11% aufweist.

Diese Befunde weisen einen Weg zur Entscheidung der Frage nach der Beständigkeit der Choleinsäuren in Lösung, eines für die Beurteilung der Mitwirkung des Choleinsäure-Prinzips bei der Resorption aus dem Darmtrakt und für andere Phasen des Lipoid-Transportes bedeutungsvollen Problems.

Die gewöhnlichen Methoden der Molekulargewichts-Bestimmung versagen bei den Choleinsäuren wegen der Affinität der Desoxy-cholsäure zum Lösungsmittel, wegen der offenbaren Labilität der Choleinsäuren bei erhöhten Temperaturen und ihrer beschränkten Löslichkeit bei niedrigen. Unveröffentlichte Versuche mit A. Goldberg, das Molekulargewicht von Choleinsäuren bei 30° mit der Signerschen Ausführungsform<sup>5)</sup> der isothermen Destillationsmethode Bargers<sup>6)</sup> zu bestimmen, ergaben, daß beispielsweise Stearinsäure-Choleinsäure und Sebacinsäure-Choleinsäure in

<sup>1)</sup> Choleic Acids, I.—III. (in Vorbereitung).

<sup>2a)</sup> Naturwiss. 19, 595 [1931]. — In dieser Mitteilung ist bedauerlicherweise eine Untersuchung von A. Windaus, F. Klönhardt u. R. Weinhold, Ztschr. physiol. Chem. 126, 308 [1922/3], über Digtonide von  $\alpha$ -Terpineol, *ac*-Tetrahydro- $\beta$ -naphthol und Carvomenthol unerwähnt gelassen worden, in welcher das Prinzip der Spaltung von Racematen durch Komplexbildung mit Erfolg angewendet worden war. H. Sobotka.

<sup>2)</sup> H. Sobotka u. A. Goldberg, Choleic Acids, I.

<sup>3)</sup> H. Sobotka u. J. Kahn, Choleic Acids, III.

<sup>4)</sup> K. H. Meyer u. P. Kappelmeier, B. 44, 2718 [1911].

<sup>5)</sup> R. Signer, A. 478, 246 [1929/30]. <sup>6)</sup> G. Barger, B. 37, 1754 [1904].

alkohol. Lösung (innerhalb der Genauigkeitsgrenzen der Methoden) vollkommen in ihre molekularen Bestandteile dissoziieren.

Auf die Frage, ob der hohe Enol-Gehalt der krystallinischen Choleinsäure auch in Lösung bestehen bleibt, ließ sich bereits aus dem Verhalten der Substanz bei dem Brom-Titrationsverfahren eine negative Antwort erwarten. Die Lösung von Acetessigester-Choleinsäure in absol. Alkohol ergab nach 44 Stdn. Enol-Gehalte von 15.7 und 17.0%, Werte, die höher liegen als der Enol-Gehalt einer Lösung des Esters (11%). Auch die Analyse einer synthetischen Lösung gleicher Zusammensetzung, erhalten durch Zusammenschütten alkohol. Lösungen von Desoxy-cholsäure und Acetessigester, zeigte nach gleicher Zeit einen Enol-Gehalt von 13%. Das Keto-Enol-Gleichgewicht ist also durch die Anwesenheit der Gallensäure nach der Enol-Seite verschoben. Eine analoge Verschiebung des Gleichgewichtes trat sowohl bei der Choleinsäure, als auch bei der synthetischen Mischung in 95-proz. Alkohol von 8 auf 13% Enol und in Amylalkohol von 16 auf 23% auf. Diese Gleichgewichts-Verschiebung kann auf verschiedene Weise gedeutet werden: Entweder verändert die Desoxy-cholsäure den enolisierenden Einfluß des Lösungsmittels<sup>7)</sup>, oder es bleibt ein geringer Anteil der Acetessigester-Choleinsäure undissoziiert.

Zufolge der letzteren Annahme würde man beispielshalber die folgenden Ziffern aus Tab. I Vers. 8 erhalten: Während sich das Verhältnis Keton + Enol in Amylalkohol auf 84 : 16 beziefft, ergibt sich der Endwert nach Auflösung von Acetessigester-Choleinsäure zu 77 Tln. Keton, 14.7 Tln. Enol nebst 8.3 Tln. Enol-Choleinsäure, zusammen 23 Tle. Enol.

In zwei Parallelversuchen, bei welchen Cholsäure bzw. Dehydrocholsäure einer Lösung von Acetessigester in absol. Alkohol zugesetzt worden war, fanden wir, ebenso wie bei Gegenwart von Desoxy-cholsäure, erhöhte Endwerte, nämlich beide Male 16%, ein Ergebnis, das eher für den ersteren Erklärungsversuch spricht. Um zu entscheiden, ob diese Verschiebung des Gleichgewichtes nach der Enol-Seite durch Gallensäuren eine Wasserstoffionen-Wirkung ist, wurde 95-proz. Alkohol durch Zusatz von Essigsäure (0.0045-n. = endgültige Essigsäure-Konzentration) auf eine Acidität gebracht, welche einer Lösung von 0.5 g Gallensäure in 30 ccm Alkohol, der üblichen Konzentration in unseren Versuchen, entsprach (Indicator Brom-phenolblau: grünlich-gelb). In diesem Alkohol wurde 72 Stdn. nach der Auflösung von 0.500 g Acetessigester ein Enol-Gehalt von nur 7.4%, entspr. 5.7 ccm  $n_{10}^{20}$ -Thiosulfat, gefunden in Übereinstimmung mit dem Wert für freien Acetessigester in 95-proz. Alkohol (Tab. I, Vers. 5). Die Wirkung der Gallensäuren ist also nicht eine unspezifische Wasserstoffionen-Wirkung. Unter den obigen Bedingungen ergab sich ein Gleichgewicht mit 11% Enol in Gegenwart von 0.5 g Cholesterin und von 13% bei 0.5 g Digitonin. Es scheint, daß diese Substanzen mit den Gallensäuren zu einer Gruppe von Körpern gehören, die den enolisierenden Einfluß des Lösungsmittels modifizieren.

#### Kinetik der Tautomerisierung.

Wenn auch die beobachtete Gleichgewichts-Verschiebung nicht auf unvollkommene molekulare Dissoziation im Sinne der zweiten Annahme zurückgeführt wird, so bietet dennoch die Enol-Titration eine willkommene Methode,

<sup>7)</sup> K. H. Meyer, B. 47, 826 [1914].

Tabelle I.

Einfluß von Temperatur und Lösungsmittel auf die Tautomerisation von Acetessigester-Choleinsäure.

Versuch Nr.	Substanz	mg	Lösungs- mittel u. Temp.	Zeitspanne zwischen. Auflösg. u. Titration	n/10-Thio- sulfat ccm	Enol-Gehalt, ber. auf Cholein- säure	Acet- essig- ester
1	Acetessigester- Choleinsäure ..	358.5	95-proz. Alkohol	10 Sek.	5.43	7.34	73.8
		563		20 Sek.	6.65	7.68	77.2
		299		30 Sek.	3.87	8.43	84.7
		298		30 Sek.	3.72	8.12	81.6
		472	(0°)	2 Min.	5.06	6.97	70.0
		472		4 Min.	4.13	5.68	57.1
		536		11 Min.	1.97	2.39	24.0
		472		18 Stdn.	1.00	1.38	13.8
2	dgl. ....	308.5	dgl.	2 Min.	3.80	8.01	80.5
		308.5		30 Min.	3.30	6.94	69.7
		308.5		(-10°) 75 Min.	2.90	6.13	61.6
		308.5		17 Stdn.	0.65	1.36	13.6
3	dgl. ....	539	dgl.	5 Min.	1.43	1.73	17.4
		539		(+30°) 10 Min.	1.20	1.45	14.5
4	dgl. vorher 5 Min. geschmolzen ..	502	dgl. (-5°)	30 Sek.	4.15	5.39	54.2
5	Acetessigester ...	500	dgl.	mehr als 24 Stdn.	6.15	—	8.0
	Acetessigester ...	500			10.45	—	13.6
	Desoxy-cholsäure.	5000			—	—	—
	Desoxy-cholsäure.	500			< 0.10	—	—
6	Acetessigester ...	1000	absol. Alkohol	mehr als 24 Stdn.	16.80	—	10.9
	Acetessigester- Choleinsäure...	500			1.30	1.69	17.0
	dgl. ....	2383			5.90	1.56	15.7
	Acetessigester ...	250			5.00	—	13.0
	Desoxy-cholsäure.	2500			—	—	—
7	Acetessigester ...	306	dgl.	mehr als 24 Stdn.	7.55	—	16.0
	Cholsäure .....	2500			—	—	—
8	Acetessigester ...	1020	Amyl- alkohol	mehr als 24 Stdn.	25.5	—	16.3
	Acetessigester- Choleinsäure...	498.5			1.75	2.28	22.9
	Acetessigester ...	250			8.95	—	23.3
	Desoxy-cholsäure.	2500			—	—	—

die Geschwindigkeit dieser molekularen Dissoziation zu untersuchen. Keto-Enol-Mischungen streben dem Gleichgewicht nach K. H. Meyer<sup>8)</sup> mit einer Geschwindigkeit zu, welche der Gleichung:

$$k_1 + k_2 = \frac{1}{t_2 - t_1} \ln \frac{\xi - x_2}{\xi - x_1}$$

Genüge tut. Hierbei bedeutet  $k_1 + k_2$  die algebraische Summe der Konstanten der Ketonisierungs- und Enolisierungs-Geschwindigkeit,  $\xi$  den Enol-Gehalt

<sup>8)</sup> K. H. Meyer, A. 380, 220 [1911].

im Gleichgewicht, und  $x_1, x_2, \dots$  den Enol-Gehalt zur Zeit  $t_1, t_2, \dots$ . Wir verfolgten diese Konstante für eine Lösung von Acetessigester-Choleinsäure in 95-proz. Alkohol bei  $0^\circ$  und bei  $-10^\circ$  (Tab. II, Vers. 1 und 2).  $(k_1 + k_2)$  ergibt sich bei  $0^\circ$  zu  $0.034-0.047$ , bei  $-10^\circ$  zu  $0.0049-0.0063$ . Zum Vergleich bestimmten wir die Reaktionskonstante für freien Acetessigester, der durch Vakuum-Destillation an Enol angereichert worden war, unter ähnlichen Bedingungen und fanden  $(k_1 + k_2) = 0.0069-0.0088$  bei  $0^\circ$  und  $0.0032-0.0057$  bei  $-10^\circ$  (Tab. II, Vers. 3 und 4). Die Geschwindigkeit der Ketonisierung bei  $-10^\circ$  ist demnach für eine Lösung von enol-reichem Acetessigester und für eine Lösung seiner Choleinsäure gleich. Bei  $0^\circ$  dagegen ketonisiert sich die Lösung der Choleinsäure schneller als die des freien Esters. Dieser Unterschied konnte nicht durch die erniedrigte  $h$  der gallensauren Lösung erklärt werden. Denn in Vers. 5 ergab sich  $(k_1 + k_2)$  zu  $0.0078$  bis  $0.0083$  für eine Lösung freien Acetessigesters, die durch Essigsäure — in gleicher Weise wie bei der oben erwähnten Bestimmung der Lage des Gleichgewichts — gesäuert worden war.

Der Unterschied zwischen der Ketonisierungs-Geschwindigkeit der Choleinsäure und des Esters besteht auch zwischen enol-reichen Ester-Lösungen mit und ohne Gallensäure-Zusatz (vergl. Vers. 6 mit 3 in Tab. II). Bei einem Zusatz der 9-fachen Menge Desoxy-cholsäure zu Acetessigester, entsprechend den Mengen-Verhältnissen in der Choleinsäure, ist  $(k_1 + k_2)$  bei  $0^\circ$  in 95-proz. Alkohol  $0.042$  in guter Übereinstimmung mit den Reaktionskonstanten für die Choleinsäure. Bei Zusatz von Desoxy-cholsäure im Gewichtsverhältnis 1 : 1 zum Ester ergab sich  $(k_1 + k_2)$  zu  $0.013-0.022$ , etwa doppelt so hoch wie für den freien Ester. Die unwahrscheinliche Annahme, daß sich die koordinativ gebundene Enol-Form schneller als das freie Enol tautomerisiert, wird durch die letzteren Versuche ausgeschlossen. Vielmehr kommt den Gallensäuren eine spezifische katalytische Wirkung auf die Einstellung des Gleichgewichtes zu, welche vom ursprünglichen Bestehen einer Koordinationsverbindung unabhängig ist.

K. H. Meyer hat bei Auflösung von enol-armem, sog. „Gleichgewichts“-Ester in absol. Alkohol bei  $0^\circ$   $(k_1 + k_2)$  zu  $0.08-0.09$  gefunden. Da diese Zahl die unsrige mit enol-reichem Ester in 95-proz. Alkohol etwa um das 10-fache übertrifft, wiederholten wir Vers. 3 in absol. Alkohol (Vers. 7), ohne eine wesentliche Beschleunigung der Tautomerisation beobachten zu können. Auch bei Bestimmung von  $(k_1 + k_2)$  von der Keto-Seite her wurde ein ähnlich niedriger Wert gefunden (Vers. 8). Es scheint, daß die Tautomerisierungs-Geschwindigkeit noch auf verschiedene katalytische Einflüsse hin untersucht werden sollte.

#### Molekulare Dissoziation der Choleinsäure.

Es soll nicht unerörtert bleiben, daß die höchsten Enol-Werte erst 30 Sek. nach dem Lösen in eiskaltem Alkohol erhalten wurden. Nach 10 und 20 Sek. wurden stets 5–10% niedrigere Werte beobachtet, obwohl die Lösung der feingepulverten Substanz bei schnellem Hin- und Herschwenken bis auf nicht nennenswerte Spuren augenblicklich erfolgt. Eine so schnelle Auflösung konnte bei  $-10^\circ$  nicht durchgeführt werden. Auch bei der Acetyl-aceton- und der Benzoyl-aceton-Tri-choleinsäure<sup>3)</sup> wurden 10 Sek. nach der Auflösung 91% bzw. 75 und 82% Enol mittels Brom-Titration

Tabelle II.

Einfluß von Gallensäure auf die Tautomerisierungs-Geschwindigkeit von Acetessigester.

(Als Lösungsmittel diente 95-proz. Alkohol, außer in Vers. 7 u. 8).

Vers. Nr.	Temp. Grad	Zeit Min.	Enol %	( $k_1 + k_2$ )	
1a	Acetessigester-Choleinsäure . . . . .	0	0	61.0	
			5	51.6	0.0442
			15.5	37.3	0.0448
			24.5	28.6	0.0470
					0.0453
1b	dgl. (Fortsetzung von Vers. 1a, bezogen auf o-Wert von 1a)	0	34.5	27.0	0.0367
			52	21.7	0.0340
			70	18.1	0.0337
			103.5	14.6	0.0373
					0.0356
2	dgl.	—10	0	80.5	
			28	69.7	0.0063
			73	61.6	0.0049
					0.0056
3	Freier Acetessigester . . . . .	0	0	22.8	
			4	22.4	0.0069
			8	21.8	0.0088
			42	18.45	0.0083
					0.0080
4	dgl.	—10	0	16.3	
			39	14.65	0.0057
			272	11.5	0.0032
					0.0044
5	dgl., angesäuert	0	0	19.25	
			21	17.55	0.0078
			49	15.5	0.0083
					0.0080
6	Freier Acetessigester + Desoxy-chol-säure	0	0	22.15	
			7 <sup>1</sup> / <sub>4</sub>	20.0	0.0402
			16	18.0	0.0416
			33 <sup>3</sup> / <sub>4</sub>	15.5	0.0446
					0.0421
7	Freier Acetessigester in absol. Alkohol	0	0	23.1	
			66	18.2	0.0096
			99 <sup>1</sup> / <sub>4</sub>	14.8	0.0117
			129 <sup>1</sup> / <sub>2</sub>	14.4	0.0098
					0.0103
8	dgl. (Enol-armer „Gleichgewichts“-Ester)	0	0	7.67	
			104	9.3	0.0065
			165	10.25	0.0088
			218	10.45	0.0081
					0.0078

Bei der Berechnung von ( $k_1 + k_2$ ) wurde für  $\xi$  in Vers. 1, 2 u. 6 13.6% Enol, in Vers. 3—5 8.0 und in Vers. 7 u. 8 11.0 eingesetzt.

gefunden. Das Maximum von 99% Enol wird bei beiden Diketonen nach 1 Min. erreicht. Im Falle des Benzoyl-acetons bleibt es freilich bestehen und bildet den Endwert, da auch freies Benzoyl-aceton praktisch vollkommen enolisiert ist.

Versuche, die Brom-Aufnahme der in Hexan suspendierten Acetessigester-Choleinsäure zu bestimmen, verliefen resultatlos. Andererseits führten Versuche, die Aufnahme von Brom durch feste Choleinsäure beim Überleiten eines brom-haltigen Stickstoffstromes zu bestimmen, zu gefärbten Substitutionsprodukten. Die feste, undissoziierte Acetessigester-Choleinsäure scheint also Brom nicht zu addieren. Dafür, daß sie nicht nur im festen, sondern auch im geschmolzenen Zustand keine merkliche Tautomerisation erleidet, spricht der folgende Versuch: Acetessigester-Choleinsäure (Schmp.  $154^{\circ}$ , kor.) wurde 5 Min. im Schmelzfluß ( $160-170^{\circ}$ ) gehalten; ein noch längeres Verweilen würde zu merklichen Verlusten durch Verflüchtigung des Esters geführt haben. Die Schmelze wurde durch Abkühlung des Tiegels von außen abgeschreckt, pulverisiert, eingewogen und 30 Sek. nach der Auflösung in kaltem Alkohol mit Brom titriert (Tab. I, Vers. 4). Den gefundenen Enol-Gehalt von 54.2% vergleiche man mit dem niedrigen Wert, der innerhalb 5 Min. in gelöstem Zustande bei  $30^{\circ}$  erreicht wird (Tab. I, Vers. 3).

Es scheint, daß derartige Enol-Choleinsäuren nicht (oder nur teilweise) unmittelbar nach der Auflösung in Alkohol mit Brom titrierbar sind und erst eine Veränderung ihrer molekularen oder koordinativen Struktur erleiden müssen, bevor Brom an die Doppelbindung angelagert werden kann. Das Verhalten fester und geschmolzener Acetessigester-Choleinsäure legt den Schluß nahe, daß diese Veränderung nichts anderes ist als die molekulare Dissoziation der Koordinationsverbindung. Die Geschwindigkeit dieser Reaktion ist von einer höheren Größenordnung als die Geschwindigkeit der Tautomerisierung.

Die Übertragung dieses Versuchs auf die Acetessigsäure ist kaum durchführbar, da die Labilität dieser Substanz ihre Titrierung mittels der Meyerschen Methode verhindert. Wir glauben aber, daß die dargetane Affinität einer Gallensäure für die Enol-Form des Acetessigesters in dem Falle der freien  $\beta$ -Ketosäuren ihr Gegenstück finden mag, und daß den Gallensäuren eine Rolle bei dem  $\beta$ -oxydativen Abbau der Fettsäuren zufällt.

## 51. A. Orechoff und G. Menschikoff: Über die Alkaloide von *Anabasis aphylla*, II. Mitteil.: Zur Konstitution des Anabasisins.

[Aus d. Alkaloid-Abteil. d. Staatl. Chemisch-pharmazeut. Forschungs-Instituts Moskau.]  
(Eingegangen am 2. Dezember 1931.)

In unserer ersten Mitteilung<sup>1)</sup> haben wir gezeigt, daß das Hauptalkaloid von *Anabasis aphylla* L., das Anabasin,  $C_{10}H_{14}N_2$ , bei der Dehydrierung einen Körper  $C_{10}H_8N_2$  liefert, dessen Eigenschaften mit denen des  $\alpha, \beta$ -Dipyridyls weitgehend übereinstimmen, und wir haben auch Versuche zur Identifizierung mit dem synthetischen Produkt angekündigt. Inzwischen haben wir diese Lücke in unserer Beweisführung ausgefüllt und gefunden, daß das aus *m*-Phenylendiamin über Phenanthrolin und Dipyridyl-dicarbon-

<sup>1)</sup> Orechoff u. Menschikoff, B. 64, 266 [1931].