

Beiträge zur Kenntniss des Cholesterins.

Von

Kuno Obermüller in Berlin.

(Aus der chemischen Abtheilung des physiologischen Instituts in Berlin.)

(Der Redaction zugegangen am 2. August 1890.)

Von den im Thier- und Pflanzenreich vorkommenden Homologen und Isomeren des Cholesterins ist bisher nur das Isocholesterin genauer untersucht und durch scharfe Merkmale vom Cholesterin unterschieden. Weder die Formel des Cholesterins noch die eines andern Angehörigen dieser Körpergruppe kann als sichergestellt betrachtet werden, man hat z. B. für das Cholesterin die Formeln $C_{26}H_{44}O$ oder $C_{27}H_{46}O$ vorgeschlagen und es existirt kein zwingender Beweis für die Annahme einer derselben.

Diese mangelhafte Kenntniss der Cholesterine ist um so empfindlicher, da wir in ihnen Substanzen vor uns haben, welche zu den primären Bestandtheilen der Zelle gerechnet werden müssen und welche demgemäss die weiteste Verbreitung durch alle Gewebe zeigen.

Die Charakterisirung der einzelnen einander sehr ähnlichen Alkohole, die wir unter dem Namen der Cholesterine zusammenfassen, kann nur dadurch bewirkt werden, dass eine grössere Anzahl von Derivaten derselben dargestellt, in ihren Eigenschaften genau untersucht und unter einander verglichen werden.

Ich habe, von diesen Gesichtspunkten geleitet, auf Veranlassung von Herrn Prof. Dr. A. Kossel in der chemischen Abtheilung des physiologischen Instituts die Darstellung einiger

neuen Derivate dieser Alkohole unternommen und theile im Folgenden die ersten Ergebnisse, die sich auf das Cholesterin beziehen, mit.

Cholesterinkalium.

Die Darstellung dieser Verbindung ist analog der von Lindenmeyer¹⁾ und Reinitzer²⁾ beschriebenen Darstellung von Cholesterinnatrium. Statt des von den früheren Autoren angewandten Steinöls benutzte ich zur Lösung des Cholesterins Aether, welcher sich für die Darstellung geeigneter erwies. Sobald das Kalium in die ätherische Lösung des Cholesterins hineingebracht wurde, erfolgte schon in der Kälte die Reaction mit grosser Heftigkeit unter energischer Wasserstoffentwicklung. Dieses Experiment genügt, um die Ansicht Walitzky's, nach welcher bei der Einwirkung von Natrium auf Cholesterin keine Wasserstoffentwicklung erfolgen solle, zu widerlegen, da nicht vorauszusetzen ist, dass die Einwirkung des Natriums in anderer Weise verlaufe. Das Cholesterinkalium gleicht in allen seinen Eigenschaften der entsprechenden Natriumverbindung. Die Zusammensetzung dieser Substanz wurde durch die Einwirkung von verdünnter Salzsäure auf eine abgewogene Menge der Kaliumverbindung ermittelt, es scheidet sich hierbei Cholesterin ab. Die vom Cholesterin abfiltrirte, das Kalium enthaltende Flüssigkeit wurde eingedampft und der Rückstand gewogen, das abgeschiedene Cholesterin wurde der Analyse unterworfen, ich fand auf diese Weise Folgendes:

Es lieferten:

	I. Substanz	0,2102	II. Substanz	0,2201
	K	0,0193		0,0201
	CO ₂	0,5970		0,6252
	H ₂ O	0,2043		0,2124
	Berechnet in % für		Gefunden:	
	C ₂₆ H ₄₃ OK: C ₂₇ H ₄₅ OK:		I.	II.
K	9,51	9,19	9,18	9,13
C	76,09	77,59	77,44	77,46
H	10,48	10,61	10,75	10,72

¹⁾ Journal für pract. Chemie, Bd. 90, S. 321.

²⁾ Monatshefte für Chemie, Bd. 9, S. 421.

Cholesterylpropionat. $C_{27}H_{46}COOC_2H_5$.

Diese Verbindung ist von besonderem Interesse, weil sie die von früheren Autoren bereits bemerkten Farbenercheinungen beim Abkühlen der geschmolzenen Verbindung schöner zeigt, als irgend ein anderes Derivat des Cholesterins.

Die Darstellung dieser Substanz geschieht in folgender Weise:

Man mischt 10 gr. (bei 100°) gut getrocknetes Cholesterin mit etwa 5 gr. Propionsäureanhydrid in einem Rundkolben mit aufgesetztem Kühler und erhitzt das Gemisch auf dem Wasserbade eine halbe Stunde lang; es bildet sich bald eine weingelbe Lösung, aus welcher bei dem Erkalten eine weisse fettglänzende zähe Masse ausscheidet, die krystallinisches Gefüge besitzt. Aus ihrer ätherischen Lösung fällt nach Zusatz von Alkohol der Propionsäure-Ester des Cholesterins, zu ihrer vollständigen Reinigung wiederholt man die Ausfällung aus der ätherischen Lösung mehrmals. Die Verbindung krystallisirt in cholesterinartigen rhombischen Blättchen, die bei 98° schmelzen, sie ist leicht löslich in Aether, Benzol, Schwefelkohlenstoff, schwerer in Alkohol; am besten erhält man die Krystalle durch langsames Verdunsten einer ätheralkoholischen Lösung.

Analyse.

Berechnet in Procenten für

$C_2H_5COOC_{26}H_{43}$:	$C_2H_5COOC_{27}H_{45}$:
81,28	81,44% C.
11,21	11,31% H.

Gefunden:

81,37% C.

11,51% H.

Dieses Propionsäure-Cholesterin, wie ich es kurz bezeichnen will, zeigt nun geschmolzen bei seiner allmählichen Abkühlung ein prachtvolles Farbenspiel von ganz ausgezeichneter Schärfe, welches wohl im Stande ist, das Propionsäure-Anhydrid als brauchbares Reagens auf Cholesterin erscheinen zu lassen, um so mehr, als weder die Alkohole der fetten, noch der aromatischen Reihe, noch auch die Terpene, zu welchen allen

das Cholesterin eine Beziehung hat, auch nur annähernd ähnliche Erscheinungen zeigen; ausserdem kann der Versuch mit den geringsten Mengen von Cholesterin dargestellt werden (cf. unten).

Beim Propionat ist nun Folgendes zu beobachten: Die geschmolzene Verbindung wird beim Abkühlen zunächst violett, dann allmählich blau, grün, dunkelgrau, orange, carminroth und kupferroth. Die prachtvoll tiefblaue Farbe, sowie die grüne erhalten sich längere Zeit ungemein scharf. Bei plötzlichem Abkühlen der Schmelze entsteht die kupferrothe Farbe, welche ebenfalls längere Zeit anhält, die blaue Farbe kann lange Zeit in der Weise erhalten werden, dass man die in einem Kölbchen befindliche Substanz in eine auf 98° erwärmte Glycerinlösung taucht und so zum Schmelzen bringt, die andern Farben thun dies nicht. Man beobachtet die Erscheinungen im reflectirten Lichte am besten, im durchfallenden sind die Complementärfarben sichtbar. Bei der Betrachtung unter dem Mikroskop im durchfallenden Lichte treten folgende Vorgänge auf: Die geschmolzene Substanz ist zuerst bleigrau, dann blaugrau, hellblau und dabei in fortwährender Bewegung, plötzlich tritt ein Stillstand ein, es erscheinen Gruppen von sphäroidisch angeordneten Krystallen, welche bei gekreuzten Nicols ein schwarzes Kreuz haben, also aus radiär gestellten doppelbrechenden Krystallen bestehen. Die Masse geräth wieder in Bewegung, die Kreuze verschwinden, es entsteht eine weingelbe Farbe, gemischt mit rosaroth, dann eine violette, blaue, hellgrüne und dunkelgrüne, letztere verschwindet plötzlich und man sieht nun wieder sphärische Aggregate von doppelbrechenden Krystallen, welche bedeutend grösser sind als die ersten. Die beim Schmelzen der Cholesterinderivate auftretenden Farbenercheinungen wurden von Lehmann¹⁾ genauer untersucht, aber es ist bisher nicht möglich gewesen, das Zustandekommen dieser Phänomene zu erklären. Leh-

¹⁾ Mitgetheilt in der oben citirten Arbeit von Reinitzer; siehe ferner Lehmann, *Molecularphysik*, Leipzig 1889, Bd. II, S. 586.

mann beobachtete am Acetat und Benzoat, dass diese Erscheinungen mit der Ausscheidung und Wiederauflösung einer bis jetzt unbekanntem krystallisirten Substanz zusammenhängen, dasselbe geht auch aus obigen Untersuchungen am Propionat hervor. Beim Cholesterylacetat fand Lehmann drei Krystallformen, deren zwei monosymmetrisch sind, während die dritte nicht bestimmt werden konnte, auch das Benzoat existirt nach den Untersuchungen von Lehmann in drei Modificationen, deren erste die leicht zu beobachtenden tetragonalen Krystalle sind, die zweite Modification ist rhombisch, die dritte ist noch nicht bestimmt. Diese Modificationen stehen beim Benzoat zu einander im Verhältniss der Monotropie, beim Acetat sind sie zu einander zum Theil enantiotrop, zum Theil monotrop. Wie schon oben angeführt, lässt sich die Farbenercheinung mit Hülfe sehr geringer Mengen von Cholesterin hervorrufen und kann desshalb zur Unterscheidung des Cholesterins von andern ähnlichen Substanzen benutzt werden.

Ausführung der Reaction.

Zur Ausführung der Reaction verfährt man folgendermassen: Man sucht das in einem Körper etwa vorhandene Cholesterin so gut wie möglich zu isoliren — das Cholesterin findet sich meist den Fetten beigemischt, welche zu seiner Isolirung verseift werden müssen, diese Verseifung wird am einfachsten nach dem von Kossel und mir im vorigen Heft dieser Zeitschrift beschriebenen Verfahren ausgeführt, wobei man das gesuchte Cholesterin nahezu rein erhält — ein ganz kleines Quantum der isolirten und völlig getrockneten Substanz wird in einem trocknen Reagensglas mit Propionsäure-Anhydrid (2—3 Tropfen) versetzt, das Gemenge vorsichtig über einer kleinen Flamme des Bunsenbrenners geschmolzen, es bildet sich bei raschem Erkalten die oben erwähnte fettglänzende Masse. Die Farbenercheinung ist sehr deutlich zu beobachten, wenn man einige Körnchen dieser Masse an einem Glasstab bis zum Schmelzen erhitzt und den Stab dann

während des Abkühlens vor einem dunklen Hintergrund betrachtet¹⁾).

Cholesterylbenzoat. $C_{27}H_{45}C_7H_5O_2$.

Dieser Körper, welcher sich durch seine schönen tetragonalen Krystalle auszeichnet, wurde zuerst von Berthelot (Ann. d. chim., [3], Bd. 56, S. 54) durch Erhitzen mit Benzoesäure, später von Schulze (Journ. f. pr. Chem., [2], Bd. 7, S. 170) durch Erhitzen mit Benzoesäureanhydrid dargestellt. Ich wandte ebenfalls die letztere Darstellungsweise an und schmolz im Oelbade bei einer Temperatur von 160° Cholesterin mit überschüssigem Benzoesäureanhydrid zusammen. Bei dieser Darstellung fand ich jedoch, dass die Ueberführung in den Ester wenig vollständig war, 85% des angewandten Cholesterins gingen in Reaction ein und eine harzige kolloidumartige Masse blieb zurück, welche durch Auskochen mittelst Aetheralkohol entfernt wurde. — Ich fand eine sehr bequeme Darstellungsweise dieses Körpers in der Einwirkung des Benzoylchlorids auf Cholesterin. Die Reaction verläuft fast quantitativ, wenn man in folgender Weise verfährt: Man erhitzt Cholesterin mit einem geringen Ueberschuss von Benzoylchlorid im Kölbchen auf 160°, nach wenigen Minuten ist der Benzoesäureester gebildet. Tafelförmig ausgebildete Krystalle erhält man durch langsames Verdunsten einer Lösung in Aether, die mit so viel Alkohol versetzt ist, als sie ohne Trübung ertragen kann.

Analys e.

- I. 0,2103 gr. Substanz gaben 0,6416 gr. CO_2 und 0,1962 gr. H_2O .
- II. 0,2203 gr. Substanz gaben 0,6732 gr. CO_2 und 0,2052 gr. H_2O .

¹⁾ Beim Cholesterylchlorid treten während des Erkaltens der geschmolzenen Verbindung dieselben Erscheinungen auf und hier hält sich die blaue fluorescirende Farbe mehrere Tage lang; ich machte ferner bei dieser Verbindung die Beobachtung, dass, wenn man ihre ziemlich concentrirte ätherische Lösung in einem Reagensglas durchschüttelt und die Lösung ausgiesst, das Reagensglas im auffallenden Licht eine schön blaue Färbung annimmt, welche sich längere Zeit erhält.

Berechnet für			
	$C_{26}H_{43}O_2$	$C_{27}H_{45}O_2$	
C	83,16	83,26	C
H	10,08	10,20	H
Gefunden:			
	I.	II.	
C	83,16	83,20	C
H	10,36	10,30	H

Mit Hülfe dieser Reaction konnte ich auch die Benzoesäure-Ester des Cholesterins und Isocholesterins aus dem Verseifungsproducte des Wollfettes gewinnen, welches nach dem von Kossel und mir beschriebenen Verfahren (im vorigen Heft dieser Zeitschrift) dargestellt ist. Ich fand die Krystalle genau in der von Schulze¹⁾ beschriebenen Weise vor. Die Substanz zeigt zwei Schmelzpunkte bei 145,5 und bei 178,5, sie giebt bei ihrem Erkalten aus dem Schmelzflusse die bekannten Farbenercheinungen.

Phtalsäurecholesterin.



Diese Verbindung wird ebenso wie der Benzoesäure-Ester durch Zusammenschmelzen von Phtalsäureanhydrid mit wasserfreiem Cholesterin erhalten; man schmilzt beides bei 180° im Rundkolben. Die kolophonumartige Schmelze wird in Aether gelöst, auf Zusatz von gewöhnlichem 95% Alkohol fällt eine weisse krümelige Masse nieder, welche in siedendem Aether gelöst wird, man filtrirt und setzt zum Filtrat einige Tropfen Alkohol, nach einiger Zeit scheiden sich tafelförmige Krystalle aus. Der Schmelzpunkt der Verbindung liegt bei 182,5°. Die Verbindung zeichnet sich durch ihre Schwerlöslichkeit in Aether aus, nur durch längere Einwirkung von siedendem Aether ist eine Lösung zu bewerkstelligen. Leicht löslich ist die Verbindung in Schwefelkohlenstoff und Chloroform. Eine bessere Ausbeute bei der Darstellung der Ver-

¹⁾ Journal f. pract. Chemie, [2], Bd. 7, S. 170.

bindung erhält man, wenn Cholesterin und Phtalsäureanhydrid in geschlossenem Rohr auf 180° erhitzt werden.

Analyse.

- I. 0,2103 gr. Substanz gaben 0,6358 gr. CO₂ und 0,1989 gr. H₂O.
 II. 0,2202 gr. Substanz gaben 0,6655 gr. CO₂ und 0,2079 gr. H₂O.

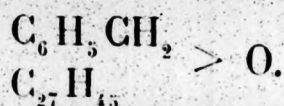
Berechnet für

	$C_6H_4 < \begin{matrix} COOC_{26}H_{43}: \\ COOC_{26}H_{43}: \end{matrix}$		$C_6H_4 < \begin{matrix} COOC_{27}H_{45}: \\ COOC_{27}H_{45}: \end{matrix}$
C	82,37	C	82,48
H	10,29	H	10,48

Gefunden:

	I.	II.
C	82,45	82,46
H	10,50	10,49

Benzyläther des Cholesterins.



Ich erhielt diesen Aether durch 12stündiges Erhitzen von Cholesterinnatrium und Benzylchlorid in der geschlossenen Röhre bei 100°. Nach dem Oeffnen der Röhre wird der Inhalt mittelst Aetheralkohol ausgezogen und filtrirt; nach kurzer Zeit scheiden sich Krystalle ab. Die Krystalle sind knollig gruppirte dünne Blättchen, sie sind etwas milchig getrübt und schmelzen bei 78°.

Analyse.

- I. 0,2301 gr. Substanz gaben 0,7230 gr. CO₂ und 0,2268 gr. H₂O.
 II. 0,2202 gr. Substanz gaben 0,6915 gr. CO₂ und 0,0241 gr. H₂O.

Berechnet für

	$C_6H_5CH_2 > O:$		$C_6H_5CH_2 > O:$
	$C_{26}H_{43}$		$C_{27}H_{45}$
C	85,34	C	85,71
H	10,84	H	10,92

Gefunden:

	I.	II.
C	85,67	85,64
H	10,95	10,97

Bromirte Ester des Cholesterins.

Beim Bromiren nachfolgender Ester des Cholesterins erhielt ich gut krystallisirte Verbindungen.

Bromcholesterylpropionat.



Wie Wislicenus und Moldenhauer (Ann. d. Chem. u. Pharm., Bd. 146, S. 178) zeigten, entsteht bei Einwirkung von in Schwefelkohlenstoff gelöstem Brom auf eine Lösung von ganz reinem Cholesterin, Cholesterindibromür $\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{Br}_2\text{O}$, ein Additionsproduct. Reinitzer (Wiener Monatshefte, 1888, Heft 5) stellte in derselben Weise das Bromadditionsproduct des Cholesterylacetats dar, ich habe die Reaction auch an dem Propionat und Benzoat ausgeführt.

Zur Darstellung des Bromcholesterylpropionat wird das trockene völlig reine Propionsäure-Cholesterin in wenig trockenem sehr reinem Schwefelkohlenstoff gelöst und unter Abkühlung durch kaltes Wasser so lange eine Auflösung von reinem (chlorfreiem) Brom in Schwefelkohlenstoff eingetragen, bis sich eine bleibende Gelbfärbung bemerkbar macht. Das Brom muss ganz langsam, und unter fortwährendem Umschütteln, zugesetzt werden. Es tritt Anfangs eine gelbe Farbe auf, welche aber beim Umschütteln wieder verschwindet, bis das Ende der Reaction erreicht ist. Während der Einwirkung bemerkte ich keine Entwicklung von Bromwasserstoff. Die braungelbe Flüssigkeit lässt man bei gewöhnlicher Temperatur verdunsten, eine harzige spröde Masse bleibt zurück, welche fein zerrieben werden kann, man löst dieselbe in möglichst wenig Aether und fällt sie mit Alkohol aus, durch wiederholtes Umkrystallisiren aus Aetheralkohol erhält man die Verbindung in grossen weissen quadratischen Blättchen. Schmelzpunkt 110° .

Die Darstellung dieser Bromverbindung ist, wie schon Reinitzer erkannte, zur Feststellung der Formel des Cholesterins zu verwenden, da das Verhältniss zwischen Kohlenstoff und Brom, besser als das zwischen Kohlenstoff und

Wasserstoff zur Feststellung der Atomzahl des Kohlenstoffes dienen kann: freilich sinkt der Werth der gewonnenen Verhältnisszahlen um so mehr, je grösser die an das Cholesterin angefügte Atomgruppe ist.

Zur Analyse dieser Verbindung verfuhr ich in folgender Weise:

Die über Schwefelsäure getrocknete Substanz löste ich in Aetheralkohol, setzte so viel Wasser hinzu, als sie ohne Trübung ertragen konnte, und trug Natriumamalgam ein; nach dem Eindampfen wurde mit siedendem Wasser ausgewaschen und in der wässerigen Lösung das Brom als Silberbromid bestimmt.

Eine zweite Brombestimmung machte ich in der Art, dass ich die Verbindung in rauchender Salpetersäure, welcher ich salpeters. Silber zusetzte, zerlegte und das gebildete Bromsilber bestimmte.

Analyse.

- I. 0,3452 gr. Substanz lieferten 0,0917 gr. Br.
 II. 0,2103 gr. Substanz lieferten 0,4605 gr. CO₂ und 0,1584 gr. H₂O.
 III. 0,4623 gr. Substanz lieferten 0,1227 gr. Br.
 IV. 0,2302 gr. Substanz lieferten 0,5038 gr. CO₂ und 0,1737 gr. H₂O.

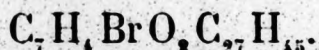
Berechnet für

C ₂₆ H ₄₃ Br ₂ C ₃ H ₅ O ₂ :		C ₂₇ H ₄₅ Br ₂ C ₃ H ₅ O ₂ :	
C	59,18	C	59,80
H	8,16	H	8,30
Br	27,21	Br	26,57

Gefunden:

	I.	II.	III.	IV.
C	—	59,68	—	59,68
H	—	8,36	—	8,38
Br	26,56	—	26,54	—

Monobromcholesterylbenzoat.



Diese in grossen seidenglänzenden Nadeln krystallisirende Verbindung wird ebenso erhalten wie das Brom-

cholesterylpropionat. Es ist aber nicht, wie dieses, ein Additionsproduct, sondern ein Substitutionsproduct. Man löst den Benzoesäure-Ester in Schwefelkohlenstoff und lässt unter starker Abkühlung langsam Brom, welches in Schwefelkohlenstoff gelöst ist, zufließen, so lange bis die braungelbe Flüssigkeit beim Umschütteln nicht mehr entfärbt wird. Der Schwefelkohlenstoff wird verdunstet, das Ganze erstarrt zu einer harzartigen Masse von braunrother Farbe, welche beim Zerreiben verschwindet (Abgang von überschüssigem Brom). Die pulverisirte Substanz wird in Aether gelöst und aus Aetheralkohol umkrystallisirt. Wird die Verbindung in Aetheralkohl, dem man etwas Wasser zusetzt, mit Natriumamalgam behandelt, so erhält man kein Bromnatrium, bei längerem Kochen mit alkoholischer Kalilauge erhält man Bromkalium und benzoesaures Kalium. Die Verbindung ist sehr beständig, in die nicht leuchtende Bunsenflamme gebracht, verpufft sie. Nach dem Verhalten dieser Substanz ist anzunehmen, dass man es hier mit einem Substitutionsproduct zu thun hat, und die Analyse ergiebt, dass ein Monobromcholesterylbenzoat vorliegt. Ich führte zwei Brombestimmungen aus; die eine durch Zersetzung der Substanz im geschlossenen Rohr mit salpetersaurem Silber und Salpetersäure bei 120° , die andere durch Zerstörung mit rauchender Salpetersäure unter Zusatz von salpetersaurem Silber; beide Methoden lieferten dasselbe Resultat. Das letztere Verfahren habe ich schon bei vielen organischen Verbindungen angewandt und stets gute Resultate erhalten. Die Elementaranalyse wurde mit Kupferoxyd im Sauerstoffstrom unter Vorlage einer Silberspirale vorgenommen. Das Ergebniss der Analyse ist folgendes:

Analyse.

- I. 0,3562 gr. Substanz lieferten 0,0501 gr. Br.
- II. 0,2103 gr. Substanz lieferten 0,5526 gr. CO_2 und 0,1638 gr. H_2O .
- III. 0,4721 gr. Substanz lieferten 0,0663 gr. Br.
- IV. 0,2202 gr. Substanz lieferten 0,5786 gr. CO_2 und 0,1719 gr. H_2O .

Berechnet für

$C_7H_4BrO_2C_{26}H_{43}$:		$C_7H_4BrO_2C_{27}H_{45}$:	
C	71,35	C	71,70
H	8,46	H	8,61
Br	14,41	Br	14,06

Gefunden:

	I.	II.	III.	IV.
C	—	71,65	—	71,66
H	—	8,65	—	8,67
Br	14,06	—	14,04	—

Der Schmelzpunkt der Verbindung liegt bei 136° , bei welcher Temperatur Bromdämpfe entweichen.