

## Weitere Beiträge zur quantitativen Bestimmung des Cholesterins.

Von

**Kuno Obermüller.**

---

(Der Redaction zugegangen am 21. August 1891.)

---

Die quantitative Bestimmung des Cholesterins (resp. der Cholesterine), seine Trennung von den thierischen und pflanzlichen Fetten, bildet seit langer Zeit den Gegenstand eingehender Untersuchungen. Es waren hauptsächlich Hoppe-Seyler, Schulze und Barbieri, welche sich zuerst mit dieser Aufgabe beschäftigt haben. Auf Veranlassung des Herrn Prof. Kossel hatte ich in der chemischen Abtheilung des physiologischen Instituts seit längerer Zeit umfassende Versuche angestellt, zum Zweck, das Cholesterin und das von Schulze im Wollfett entdeckte Isocholesterin mit einander zu vergleichen und auch den Weg zu finden, auf welchem es möglich wäre, zu einer neuen quantitativen Bestimmungsmethode des Cholesterins in den Fetten resp. Fettsubstanzen zu gelangen. Zu Beginn der Frühjahrsferien der Universität hatte ich diese Versuche im Laboratorium von Dr. C. Scheibler (R. Fiebig) fortgesetzt.

Hoppe-Seyler zeigt uns in seinem Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chem. Analyse, 1883, eine quantitative Trennung des Cholesterins von den Fetten wie folgt: «Die Fette werden zunächst in Barytseifen übergeführt, welche man in Wasser zertheilt, aus den Barytseifen werden mittelst Salzsäure die fetten Säuren abgeschieden und durch Schütteln mit Aether in diesen aufgenommen. Alsdann wird

die abgegossene ätherische Lösung mit sehr verdünnter Natronlauge geschüttelt und nach Abheben der ätherischen Lösung diese nochmals mit Wasser versetzt und geschüttelt.»

Wenn diese Methode auch in der Hand geübter Forscher zu brauchbaren Resultaten führen mag, so stehen der allgemeinen Anwendung derselben doch einige Bedenken entgegen, welche ich erwähnen möchte. Mit Schulze und Barbieri stimme ich darin überein, dass die erhaltenen Resultate bei obiger Methode nicht ganz genau werden und ohne Zweifel auch schwer unter einander zu vergleichen sind. Die Seifen werden durch Zusatz von Wasser entfernt, was eben zunächst die Fehler verursacht. Schüttelt man die verseifte Substanz mit Aether aus, so wird dadurch nicht allein das Cholesterin in denselben aufgenommen, sondern zu gleicher Zeit eine Quantität Seife, die immerhin wesentliche Differenzen beim Abwägen herbeiführt, der Aether ist einerseits allein im Stande, Seifen zu lösen (namentlich wenn die Fette ölsäurehaltige sind), andererseits kann er Wasser aufnehmen und so auch palmitin- und stearinsäures Alkali — welche in wasserfreiem Aether schwer löslich sind — auflösen (der Aether nimmt bei mittlerer Temperatur  $\frac{1}{36}$  seines Volums an Wasser auf und 1 Theil Aether löst sich bei  $12^{\circ}$  in 14 Theilen Wasser). Man hat nun aber ausserdem noch eine alkoholische Seifenlösung, durch welche die Seifenaufnahme in Aether gefördert wird, andererseits aber wieder Cholesterin verloren geht, da eine alkoholische Seifenlösung leicht im Stande ist, Cholesterin in Lösung zu halten, sehen wir ja schon, dass das Cholesterin, welches sich in der Galle vorfindet und im Wesentlichen alsdann die Gallensteine bildet, sich darin in Seifen gelöst befindet. Kurzum, es bietet dieses Verfahren immerhin einige Schwierigkeit, da das Cholesterin in der wässerigen wie in der ätherischen Lösung enthalten ist und ebenso die Seifen; auch habe ich ausserdem die Beobachtung gemacht, dass die syrupartige Seifenmasse, welche nach dem Abdunsten des Alkohols, bei der nach Hehner angegebenen Verseifungsmethode, übrig bleibt, allerdings bei einer Temperatur von  $100^{\circ}$  Cels. im Stande ist, Cholesterin zu lösen, und glaube die Vermuthung aussprechen

zu dürfen, dass bei dieser Methode jedenfalls leichter Cholesterin in der Seife zur Lösung gebracht wird, als bei der von Kossel und mir seiner Zeit bekannt gegebenen<sup>1)</sup>). Die wässrige Seifenlösung bedingt die Anwendung des Scheidetrichters, ein Ausschütteln in demselben, wodurch leicht die widerwärtigen Emulsionen entstehen; die ätherische Schichte von der wässrigen ganz genau trennen zu können, bezweifle ich. Bei Anwendung der Hehner'schen Verseifungsmethode möchte ich folgenden Vorschlag zu einer Modification machen: durch successive Anwendung von möglichst wasserfreiem Aether kann man aus der ursprünglich alkoholischen Seifenlösung die Seifen niederschlagen und dann zum Schluss ein- bis zweimal mit Wasser ausschütteln, dessen Quantität dann weit geringer ist. In wie weit diese Modification von Nutzen ist, konnte ich unter Anderem auch bei einer Darstellung des Isocholesterins aus Lanolin sehen. Verseift man durch intensives Kochen (womöglich unter Druck) mittelst alkoholischem Kali das Lanolin, setzt einmal zur Seife Wasser, extrahirt die wässrige Seifenlösung einmal mit Aether, so bleibt nach Verdunsten desselben ein sehr kleiner Rückstand einer braungelben, wachsartigen Masse; schüttelt man zum zweiten Male aus, so erhält man nur noch eine Spur von dieser Masse, von welcher eben der grösste Theil fest von der Seife zurückgehalten wird [in dieser Masse ist Cholesterin und Isocholesterin enthalten<sup>2)</sup>], setzt man aber zu der alkoholischen Wollfettseifenlösung einfach Aether, dann fällt von vorneherein der grösste Theil der Seife aus, nach viermaligem Ausschütteln der klaren ätherischen Lösung und Abdestilliren derselben bleibt die Gesamt-Quantität der obigen braungelben Masse.

Ich stellte nun, behufs Auffindung einer neuen Methode, weitere Versuche an und mischte Fett mit Cholesterin. Die erhaltene Natronseife mischte ich diesmal mit Sand, um sie auf diese Weise vollständiger zu trocknen, alsdann extrahirte ich das Gemisch längere Zeit im Soxhlet-Apparat. Bei dem

<sup>1)</sup> Cf. Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XIV, Heft 6.

<sup>2)</sup> Cf. Schulze, Berichte der deutsch. chem. Gesellschaft, 1876.

Trocknen machte ich jedoch die Beobachtung, dass die Seife mit dem Cholesterin zu einzelnen Klümpchen sich vereinigte und nicht zu einem gleichmässigem Pulver zerrieben werden konnte, aus diesem konnte das Cholesterin nur theilweise extrahirt werden. Nun führte ich die Natronseifen durch Behandlung ihrer wässerigen Lösung mit Chlorbaryum in die schwerer löslichen Barytseifen über und behandelte ferner zum gleichen Zwecke das das Cholesterin enthaltende Fett im geschlossenen Rohre bei  $100^{\circ}$  mit in Methylalkohol gelöstem Baryumhydroxyd, auch diese Methoden lieferten keine genügenden Resultate. Die Barytseifen aus festen Fetten zeigten auch mehrere Klümpchen, die nicht zu pulverisiren waren, die Barytseifen aus flüssigen Fetten waren kaum zu zerreiben, was entschieden davon herrührt, dass das ölsaure Baryum, dazu noch in Verbindung mit Cholesterin, schon bei  $100^{\circ}$  zusammenbackt<sup>1)</sup>.

Die im vorigen Jahre in dieser Zeitschrift (Bd. XIV, S. 599) in Gemeinschaft mit A. Kossel mitgetheilte neue Methode zur Verseifung von Fettsäure-Aethern brachte mich auf neue Wege; ich machte schon damals eine kurze Andeutung über die Wiedergewinnung des Cholesterins aus künstlichen Gemischen von Fett und Cholesterin, sowie dessen Gewinnung aus Eidotter, ferner erwähnte ich die Isolirung des Cholins aus den Zersetzungsproducten des Lecithins. Wenn dieses neue Verseifungsverfahren für die quantitative Bestimmung des Cholesterins in den Fetten Verwendung finden sollte, müsste erst der Nachweis geliefert werden, ob die Verseifung eine vollständige in nicht allzu langer Zeit ist und ob dabei eine Bildung von Triäthylin vor sich geht. Eingehende Versuche hierüber erwiesen, dass die Verseifung in kurzer Zeit bei gewöhnlicher Temperatur eine vollständige ist und eine Bildung von Triäthylin nicht stattfindet (cf. Spätere Mittheilung über die Verseifung mit Natriumalkoholat). Auf Grund dieser Ergebnisse stellte ich nun in folgender Weise meine quantitativen Cholesterinbestimmungen an:

<sup>1)</sup> Seifen ohne Cholesterinzusatz lassen sich leicht pulverisiren, insbesondere die Natronseifen.

Je 1 gr. Fett (zunächst Hammeltalg, der heiss filtrirt und bis zum constanten Gewicht bei  $120^{\circ}$  getrocknet war) wurde mit einer genau abgewogenen Menge Cholesterin zusammen in Aether gelöst und zu dieser Lösung eine Natriumalkoholatlösung hinzugefügt, die durch Auflösen von 0,15 gr. Natrium in einer möglichst geringen Menge von 99% Alkohol in der Wärme hergestellt war. Man bedarf zu dem letzteren Zwecke nur  $1-1\frac{1}{2}$  cbcm. Alkohol, die Masse muss beim Erkalten schnell erstarren, so hat man die beste Concentration der Natriumalkoholatflüssigkeit, beim Eingiessen in die ätherische Flüssigkeit verschwindet das Natriumalkoholat nach kurzem Schütteln und es beginnt zugleich die energische Verseifung, die nach dreistündigem Stehen bei gewöhnlicher Temperatur beendet ist. Die zugesetzte Menge Aether muss so gross gewählt werden, dass die ausgeschiedenen Seifen beim Umschwenken des Kolbens, in welchem man den Process vornimmt, einen nicht zu dicken Brei bilden, es bleiben sonst an den Wandungen Seifenreste mit Fett hängen, 80 cbcm. werden im Allgemeinen ausreichen, bei 50—60 cbcm. tritt ferner eine Gelbfärbung des Aethers ein, welche allerdings durch Auskochen der Lösung mit guter Thierkokle zu beseitigen ist (dass durch Thierkohle ein Verlust an Cholesterin stattfindet, konnte nicht nachgewiesen werden), aber auf einfacherem Wege durch Mehrzusatz von Aether entfernt werden kann. Oefteres Umschwenken ist zu empfehlen, hauptsächlich aber bei ölsäurereichen Fetten, weil die Seife hier leicht in langen dickfädigen Massen ausgeschieden wird, so beim Olivenöl; bei festen Fetten, wie Hammeltalg, zeigt die Seife ein feinkörniges Aussehen. Nach dreistündigem Stehen bringt man die Seife auf ein Filter, saugt schwach ab und wäscht unter vorsichtigem Durchrühren mit einem Glasstabe mit Aether gehörig aus. (Die erhaltene Seife löst sich klar in heissem Wasser, wenn sie gut ausgewaschen ist, im andern Falle enthält sie noch Cholesterin.) Diese Operation geht bei richtigem Verfahren sehr schnell von statten und erfordert höchstens noch 150 cbcm. Aether, welche aber durch Abdessilliren wieder zu gewinnen sind. Hat man nun möglichst

wasserfreien Aether gewonnen, so scheidet sich auf's Neue eine kleine Quantität Seife aus, welche man durch Filtration entfernen kann; diese Ausscheidung zeigt sich schon bei einem Aether, welcher zwei Tage mit Chlorcalcium vermischt gestanden hat, das Filtrat fängt man in einem Kolben auf, destillirt den Aether ab, entfernt, bei festen Fetten (cf. unten) die noch zurückbleibende Menge Alkohol durch Aussaugen der Luft aus dem Kolben unter Eintauchen desselben in ein siedendes Wasserbad und trocknet schliesslich den Inhalt bei  $100-120^{\circ}$ . Nun wird dieser Rückstand mit möglichst wenig absolutem Aether (höchstens 10 ccm.) übergossen, einige Stunden stehen gelassen und dann, wenn ein sichtbarer Rest ungelöst geblieben ist, von diesem durch Filtration getrennt. Das Filtrat liefert nach dem Abdunsten und kurzem Erhitzen auf  $120^{\circ}$  das Cholesterin in wägungsfähigem Zustande.

Die Resultate der Fundamental-Versuche sind nun folgende:

Angewandt 1 gr. Fett, 0,15 gr. Na, 5 ccm. Alkohol und 80—100 ccm. Aether.

Versuch	I.	Angewandtes Cholesterin	0,1030,	erhalten	0,1044.
»	II.	»	»	0,1049,	» 0,1025.
»	III.	»	»	0,0963,	» 0,0982.
»	IV.	»	»	0,0814,	» 0,0829.
»	V.	»	»	0,1237,	» 0,1250.
»	VI.	»	»	0,1310,	» 0,1320.
»	VII.	»	»	0,0762,	» 0,0771.
»	VIII.	»	»	0,0792,	» 0,0819.
»	IX.	»	»	0,0675,	» 0,0692.
»	X.	»	»	0,1206,	» 0,1224.

Blinder Versuch, 1 gr. Fett, 0,15 Na und 5 ccm. Alkohol.

A. Rückstand	0,00140	/	Mittel	0,0013.
B. »	0,00120	)		

Bringt man bei den erhaltenen Resultaten die Durchschnittszahl 0,0013, welche die beiden blinden Versuche lieferten, in Abzug, so erhält man Differenzen in der vierten Decimalstelle.

Mit Ausnahme des 6. und 7. Versuches zeigen die Resultate, dass Cholesterin nicht verloren geht. Nicht so günstig fielen die Resultate bei Anwendung von Olivenöl aus:

Angewandt wurde 1 gr. Oel, 0,25 Na.

Blinde Versuche:	I. Rückstand .	0,0058	} Im Mittel 0,0055.
	II. » .	0,0052	
Versuch I.	Angewandtes Cholesterin	0,0837,	erhalten 0,0932.
» II.	»	0,1073,	0,1138.
» III.	»	0,0927,	0,1002.
» IV.	»	0,1035,	0,1164.

Diese Resultate zeigen einen erheblichen Unterschied von den oben angeführten, bei welchen Hammeltalg angewandt wurde. Es liegt unfehlbar am ölsauren Natron, dass sich hier schon Differenzen in der dritten Decimalstelle zeigen.

Wie weit nun auch die Ueberführung in die Barytseife verbessernd auf die Resultate einwirkt, zeigt nachstehender Versuch, welchen ich in der Art anstellte, dass ich den von der Seife abfiltrirten ätherischen Auszug zunächst bis zum letzten Aetherrest eindunstete, Alkohol hinzufügte und mit  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  kochte (durch Anwendung einer alkoholischen Barytlösung wird ein Zusammenbacken der Barytseifen vermieden).

Versuch IV lieferte hierbei 0,1151 Cholesterin, ebenfalls kein brauchbares Resultat.

Ich glaube durch die obigen Versuche klar gelegt zu haben, dass nur bei festen Fetten einigermaßen zufriedenstellende Resultate mittelst dieser Methode zu erwarten sind.

Im Folgenden möchte ich nun eine andere, wesentlich neue Methode beschreiben, welche ich in der letzten Zeit im Dr. C. Scheibler'schen Laboratorium (R. Fiebig) ausgeführt habe.

Wislicenus und Moldenhauer zeigten zuerst, dass das Cholesterinmolekel 2 Atome Brom addirt. Mit den bromirten Verbindungen des Cholesterins, insbesondere den bromirten Estern desselben, habe ich mich, hierdurch angeregt, schon früher beschäftigt<sup>1)</sup>, auch noch weitere bromirte Ester, wie die der Bernsteinsäure und Phtalsäure u. s. w., her-

<sup>1)</sup> Cf. Zeitschrift f. physiol. Chemie, Bd. XV, S. 45.

gestellt und dabei auf's Neue diese Bromaufnahme bestätigt gefunden. Bei meinen Untersuchungen über die Eigenschaften des Isocholesterins, im Vergleich zum Cholesterin, habe ich die beiden Körper bromirt, zunächst um den Schmelzpunkt der beiden Br-haltigen Körper zu ermitteln; zur Darstellung des Cholesterinbromids verwandte ich etwa 10 gr. Cholesterin, die rasche und energische Aufnahme von Brom seitens des Cholesterins wurde mir hierbei auf's Deutlichste sichtbar, und so fing ich an, das Cholesterin durch Anwendung von Brom zu bestimmen.

Ich mischte wieder 1 gr. Olivenöl mit einer genau abgewogenen Menge Cholesterin, verseifte dasselbe, verfuhr hierbei wie oben angeführt, alsdann löste ich den Rückstand im Schwefelkohlenstoff und setzte so lange von einer bromhaltigen Schwefelkohlenstofflösung von bestimmtem Gehalt zu, bis eine in's Gelbroth stechende Farbenerscheinung auftrat. Die Anwendung einer 2,97% Br-Lösung ergab folgende Resultate:

Versuch I. Angew. Cholesterin	0,0999, erhalten 0,0987. 1,38 cbcm. von der bromhaltigen Schwefelkohlenstofflösung (BrCS <sub>2</sub> ) verbraucht.
II.	0,0896, erhalten 0,0894. 1,25 cbcm. BrCS <sub>2</sub> verbraucht.
III.	0,1463, erhalten 0,1467. 2,05 cbcm. BrCS <sub>2</sub> verbraucht.
IV.	0,1130, erhalten 0,1123, 1,57 cbcm. BrCS <sub>2</sub> verbraucht.
V.	0,1835, erhalten 0,1835, 2,57 cbcm. BrCS <sub>2</sub> verbraucht.
VI.	0,0672, erhalten 0,0679. 0,95 cbcm. BrCS <sub>2</sub> verbraucht.
VII.	0,0612, erhalten 0,0607. 1,85 cbcm. BrCS <sub>2</sub> verbraucht.
VIII.	0,0732, erhalten 0,0727. 1,02 cbcm. BrCS <sub>2</sub> verbraucht.
IX.	0,1042, erhalten 0,1036. 1,45 cbcm. BrCS <sub>2</sub> verbraucht.
X.	0,1543, erhalten 0,1537. 2,15 cbcm. BrCS <sub>2</sub> verbraucht.

Ich hatte zuerst auch Versuche mit in Chloroform gelöstem Brom angestellt, doch fand ich, dass nach kurzem Schütteln eine Entfärbung unter Rauchentwicklung eintrat, Chloroform wird also nicht für den vorliegenden Fall zu verwerthen sein; Versuche, das Gemisch von Fett und Cholesterin gleich im Schwefelkohlenstoff zu lösen, habe ich nicht angestellt, bezweifle aber, gute Resultate zu erhalten, ohne das Fett verseift zu haben; einerseits wäre man hier genöthigt, mehr Schwefelkohlenstoff anzuwenden, andererseits haben manche Fette, so ganz besonders die Thrane, die Eigenschaft, eine bromhaltige Schwefelkohlenstofflösung sofort zu entfärben, je weniger man auch Schwefelkohlenstoff anwendet, desto schärfer tritt der Uebergang von gelb in gelbroth hervor, bei obigen Versuchen hatte ich 1,5—2 cbcm. Schwefelkohlenstoff, ein Verlust an Cholesterin ist überdies bei der Verseifung mit Natriumalkoholat nicht zu constatiren. Wie sich das Brom anderen dem Cholesterin ähnlichen Körpern gegenüber verhält, ist noch nicht bekannt, beim Isocholesterin konnte ich feststellen, dass dasselbe ebenfalls 2 Br aufnimmt; es würde interessant sein zu erfahren, wie Brom auf das Phytosterin, Caulosterin und Ambrain einwirkt.

Nach meinem Abschluss der oben beschriebenen Versuche theilt mir indess Herr Prof. Kossel mit, dass in seinem Laboratorium seit einiger Zeit ebenfalls Versuche zur volumetrischen Bestimmung des Cholesterins mit Brom angestellt werden, und dürfen wir demnach einer weiteren Vervollständigung dieser Methode entgegensehen.

Berlin, August 1891.

Kuno Obermüller.