

Ueber die Fettsäure-Cholesterin-Ester des Blutserums.

Von

Prof. **K. Hürthle** in Breslau.

(Die Untersuchungen sind mit Unterstützung des Elizabeth Thompson Science Fund in Boston ausgeführt.)

(Der Redaction zugegangen am 5. December 1895.)

Wenn man Blutserum in der Weise behandelt, dass man es erst mehrmals mit Alkohol und dann mit einer Mischung von Alkohol und Aether extrahirt, so erhält man aus den Extracten schön krystallisirende Substanzen vom Schmelzpunkte 43° bzw. 77° C., welche durch die Regelmässigkeit der Krystallbildung und die Constanz der Schmelzpunkte keinen Zweifel darüber aufkommen lassen, dass man es mit neuen einheitlichen Körpern zu thun hat. Zur Erkenntniss der Zusammensetzung dieser Körper haben im Wesentlichen die beiden folgenden Reactionen geführt:

1. Bei der Behandlung mit concentrirter Schwefelsäure zeigen beide Reactionen, welche denen des Cholesterins ähnlich sind; auch geben sie die anderen bekannten Cholesterinreactionen in etwas modificirter Weise; sie müssen daher zum Cholesterin in irgend einer Beziehung stehen¹⁾).
2. Den eigentlichen Schlüssel zum Verständniss der Natur dieser Körper lieferte die Behandlung mit alkoholischer

¹⁾ Diese Reaction hatte mich veranlasst, dem zuerst gefundenen Körper vom Schmelzpunkt 43° C., über welchen ich der schlesischen Gesellschaft für vaterl. Cultur schon Mittheilung gemacht habe (Sitzung vom 17. Mai 1895), den Namen Hämosterin beizulegen, eine Bezeichnung, welche ich mit Rücksicht auf die folgenden Befunde wieder fallen lassen möchte.

Kalilauge, durch welche sie in Cholesterin und fettsaures Kali zerlegt wurden; sie sind daher als Fettsäureester des Cholesterins zu betrachten. Als Fettsäuren fanden sich in den beiden Körpern: Oelsäure bzw. Palmitinsäure. Es finden sich daher als normale Bestandtheile im Blutserum: Oelsäure-Cholesterinester und Palmitinsäure-Cholesterinester.

In den folgenden Abschnitten wird nun behandelt:

A. Die Cholesterinester des Blutserums.

I. Cholesteryloleat.

1. Gewinnung aus Blutserum.
2. Eigenschaften.
3. Künstliche Darstellung.

II. Cholesterylpalmitinat.

III. Cholesterylstearat.

IV. Quantitative Angaben über die Ester des Blutserums.

B. Historisches.

- I. Vergleich der vorliegenden Befunde mit den Angaben Hoppe-Seyler's über das Vorkommen von Cholesterin im Blut.
- II. Die schon bekannten Ester des Thierkörpers.

A. Die Fettsäure-Cholesterin-Ester des Blutserums.

I. Cholesteryloleat $C_{26}H_{43}O(C_{18}H_{33}O)$.

1. Darstellung aus Blutserum.

Obwohl der Oelsäure-Cholesterinester in Alkohol sich nur wenig löst, wird er doch aus Blutserum am Besten durch Extraction mittelst Alkohols gewonnen, da er aus diesem am Besten krystallisirt, während er aus besseren Lösungsmitteln, wie Aether, Chloroform, leicht ölig ausfällt oder verharzt. Zur Darstellung des Esters wird das Serum mit dem dreifachen Volum Alkohol von 96% gefällt (Alkohol I), gut durch-

geschüttelt und über Nacht stehen gelassen. Dann wird die Flüssigkeit auf einer Nutsche abgesaugt und in die Kälte gestellt, wo meist bis zum nächsten Tage einige Nadeln ausfallen, die aus Cholesterylöleat bestehen; ihre Menge ist jedoch sehr gering, so dass man das erste Filtrat füglich weggiessen kann.

Der von Flüssigkeit möglichst befreite Serum-Rückstand wird weiter mit Alkohol zerrieben und zwar wieder mit der dreifachen Menge des ursprünglich verwendeten Serums: Alkohol II. Der Brei wird in eine Flasche gebracht und mindestens über einen, besser über zwei bis sechs Tage bei 30—40° C. extrahirt, wobei die Flasche häufig umzuschütteln ist. Nach dieser Zeit wird der Alkohol wieder abgesaugt und enthält nun fast die ganze Menge des im Serum vorhandenen Oelsäureesters in Lösung. Die Flüssigkeit wird nun in die Kälte gestellt, wo sie bald trübe wird und bis zum nächsten Tage mit nadelförmigen Krystallen erfüllt ist, die den Ester darstellen. War er in reichlicher Menge im Serum enthalten, so fällt ein Theil schon bei Zimmertemperatur aus; um ihn vollständig zu gewinnen, ist es nöthig, den Alkohol mit Wasser zu verdünnen und in der Kälte stehen zu lassen; die letzten Reste lassen sich aber nur durch Verdampfen des Alkohols gewinnen (vgl. Abschnitt IV).

In manchen Fällen treten im Alkohol II vor der Bildung der langen Nadeln des Oelsäure-Esters sehr kleine Nadeln oder Blättchen auf, welche zuerst ein Häutchen an der Oberfläche der Flüssigkeit bilden; sie müssen auf einem Filter gesammelt und getrennt aufbewahrt werden, da sie nicht den Oelsäure-, sondern den Palmitinsäureester des Cholesterins darstellen. Reichlicher treten dann diese Blättchen in den weiteren Extracten des Serums auf.

Die aus dem Alkohol II gewonnenen Krystalle zeigen häufig, wie der Alkohol selbst, eine gelbliche Färbung und schmelzen zwischen 37 und 40° C. Zur Reindarstellung werden sie ein- oder mehrere Mal bis zur Constanz des Schmelzpunktes umkrystallisirt, am besten wiederum aus Alkohol; man stellt die Krystalle mit Alkohol in den Wärmeschrank (40° C.) und schüttelt öfters um; zweckmässig ist es ferner, nicht gleich

die ganze zur Lösung nöthige Alkoholmenge zuzusetzen, sondern fractionirt zu lösen, da der höher schmelzende Ester, falls er dem Präparat beigemischt ist, als der schwerer lösliche erst in den zweiten oder dritten Alkoholauszug übergeht.

Hat man zum Umkrystallisiren nicht soviel Zeit zur Verfügung, so kann man die Krystalle auch in Aether lösen, filtriren und das Filtrat unter beständigem Umrühren in heissem Alkohol eintragen, dem etwas Aether zugesetzt ist. In diesem Falle ist aber darauf zu achten, dass der Ester beim Eintragen in den Alkohol nicht schon ausfällt, denn sonst krystallisirt er nicht mehr, sondern bleibt ölig. Die Krystallbildung geht stets sehr langsam vor sich und der Alkohol darf daher nicht zu rasch erkalten und der Aether nicht zu rasch verdunsten. Niemals krystallisirt der Ester auch in reinem Zustand so schnell, wie z. B. das Cholesterin.

Aus diesem Grunde ist es auch nicht zweckmässig, die Krystalle aus reinem Aether oder Chloroform umzukrystallisiren, in welchem sie sich sehr leicht lösen; der Ester fällt dann meist ölig aus oder verharzt sehr leicht, wenn er krystallisirt.

In der beschriebenen Weise wurde der Oelsäurecholesterinester bisher aus Serum vom Hund, Schwein, Hammel, Rind und Pferd dargestellt; ferner wurde er mehrmals aus Hundelymphe, die aus dem ductus thoracicus aufgefangen war, gewonnen.

2. *Eigenschaften und Analyse des Oelsäure-Cholesterinesters.*

a) Krystallform.

Der Ester krystallisirt in langen dünnen Nadeln, die häufig fächerförmig von einem Punkt ausstrahlen; öfter setzen sich auch kleinere Nadeln schräg auf die Längsaxe der grossen, welche dadurch das Aussehen von Federfahnen bekommen. Die Axe optisch grösster Elasticität fällt mit der Längsrichtung zusammen (Dr. Mitch).

b) Der Schmelzpunkt

der aus verschiedenen Blutarten gewonnenen Substanzen ist nicht genau derselbe. Die aus Pferde- und Rinderserum ge-

wonnenen Krystalle schmelzen bei 43° C., die aus Hundeserum gewonnenen etwas niedriger, bei 41° , und die aus Schweinsserum dargestellten etwas höher, bei 45° C., eine Abweichung, für welche ein Grund vorläufig nicht anzugeben ist. Ferner zeigt sich sowohl bei der ersten Gewinnung der Krystalle aus Serum, als beim Umkrystallisiren, dass die später ausfallenden Krystalle jeweils etwas niedrigeren Schmelzpunkt haben als die vorhergehenden; als Beispiel sind im Folgenden die Schmelzpunkte der Krystalle zusammengestellt, welche der Reihe nach aus dem zweiten Extract (Alkohol II) von Pferdeserum gewonnen wurden:

Krystalle.	Schmelzpunkt.
1.	$75-77^{\circ}$ C.
2.	$43,9-46^{\circ}$ C.
3.	$43,6-46^{\circ}$ C.
4.	$42,8-44,5^{\circ}$ C.
5.	$42,5-43,3^{\circ}$ C.
6.	$40,8-41,8^{\circ}$ C.

Bei weiterem Umkrystallisiren differiren die Schmelzpunkte höchstens um 1° C. Die geschmolzenen Krystalle zeigen bläuliche Fluorescenz und erstarren nicht krystallinisch.

c) Löslichkeit.

Der Ester ist leicht löslich in Aether, Chloroform, Benzol, heissem Aceton; in Alkohol ist er nur wenig löslich, schwerer als Cholesterin; in Wasser, neutralem, alkalischem oder angesäuertem, ist er ganz unlöslich; wodurch er im Blutserum in Lösung gehalten wird, lässt sich vorläufig nicht angeben. Um die Löslichkeit des Esters in absolutem Alkohol mit der des Cholesterins zu vergleichen, wurde von beiden Substanzen eine gesättigte Lösung bei $17,5^{\circ}$ C. hergestellt. Es fanden sich nun:

In 5 cem. Cholesterinlösung	0,0543 gr. Cholesterin.
» 5 » Esterlösung	0,0189 » Oelsäure-Cholesterinester.

Daraus ergibt sich, dass das Cholesterin bei Zimmertemperatur sich in absolutem Alkohol etwa zu 1% , der Oelsäureester aber sich nicht ganz zu $0,4\%$ löst.

d) Reactionen.

Der Ester zeigt die Reactionen des Cholesterins in etwas modificirter Weise. Im Folgenden sind diese (nach Hoppe-Seyler, Handbuch der chem. Analyse) und die des Oelsäureesters zum Vergleich zusammengestellt:

Durch concentrirte Schwefelsäure und ein wenig Jod wird krystallisirtes Cholesterin bald violett, blau, grün und roth gefärbt.	der Oelsäureester gelbroth gefärbt; an manchen Stellen sieht man schmutzig grüne Färbung der Krystalle.
--	---

Gegen verdünnte Schwefelsäure verhalten sich Cholesterin und der Oelsäure-Ester folgendermaassen:

Cholesterin.		Oelsäureester.
carminroth	5 H ₂ SO ₄ + 1 H ₂ O . . .	ziegelroth,
blau	4 » + 1 » . . .	sehr langsam ziegelroth.
violett	3 » + 1 » . . .	keine Färbung,
lila	2 » + 1 » . . .	» »

Löst man eine Probe Cholesterin in etwas Chloroform im Probirglas und fügt ein dem Chloroformvolumen gleiches Volumen concentrirter Schwefelsäure hinzu, so färbt sich die Lösung

des Cholesterins
schnell blutroth, dann kirschroth und purpurfarbig.

des Oelsäureesters
nach einigen Minuten gelbroth, dann kirschroth und wird nach längerer Zeit purpurfarbig.

Giesst man die Lösung in eine Schale aus, so färbt sie sich bald

blau, grün, endlich gelb.

schmutzig blau, grün und gelb.

Die Schwefelsäure unter einer Chloroformlösung zeigt eine deutlich grüne Fluorescenz, verdünnt man sie mit Eisessig, so wird die Lösung erst rosa- bis purpurroth und behält die grüne Fluorescenz.	der Chloroformlösung zeigt grünliche Fluorescenz, welche deutlich hervortritt, wenn man die Schwefelsäure mittelst einer Pipette entfernt und in einem Reagenzglas betrachtet.
---	--

Die Krystalle werden in wenig Chloroform im trocknen Probirglas gelöst, zwei bis drei Tropfen Essigsäureanhydrid, dann vorsichtig tropfenweise concentrirte Schwefelsäure hinzugefügt; es tritt dann

beim Cholesterin zunächst eine rosenrothe, darauf schön blaue Färbung ein, die dann später in Grün übergeht.	beim Oelsäureester erst gelbrothe, dann bläulichrothe Färbung ein, die schliesslich in Grün übergeht.
--	---

Dampft man auf einer Porzellanplatte (Tiegeldeckel) über freier Flamme eine sehr kleine Probe der Krystalle mit einem Tropfen concentrirter Salpetersäure ab, so erhält man einen gelben Fleck, der noch warm mit Ammoniak übergossen

beim Cholesterin schön roth wird.	beim Oelsäureester gelbroth wird.
-----------------------------------	-----------------------------------

Die Probe gelingt gut, wenn man vorsichtig und nicht zu stark erhitzt.

Die Reaction mit Propionsäure-Anhydrid ist mir mit Cholesterin, nicht aber mit dem Oelsäureester gelungen.

e) Drehungsvermögen.

Der Ester dreht die Ebene des polarisirten Lichts nach links. In einem Versuche, in welchem der Oelsäureester aus Hundeserum dargestellt und in gleichen Theilen Alkohol und Chloroform gelöst war, betrug der Drehungswinkel $18,8^\circ$. In diesem Versuche war die

Concentration der drehenden Flüssigkeit $c = 7,940$,
die Länge des Rohres $l = 2$ dm,
der beobachtete Winkel $\alpha = 3^\circ 00'$.

Daraus berechnet sich der Drehungswinkel

$$\alpha_D = \frac{100 \cdot 3}{2 \cdot 7,94} = 18^\circ 48'$$

f) Die Analyse des Esters

liefert Zahlenwerthe, welche mit den theoretisch verlangten befriedigend übereinstimmen, wie die beiden folgenden Tabellen zeigen: Tabelle I enthält den theoretisch berechneten Procent-

gehalt des Esters an C und H und zwar a) unter Zugrundelegung der älteren Cholesterinformel, b) der neueren von Mauthner und Suida¹⁾ aufgestellten. Tabelle II enthält die Ergebnisse von sieben Analysen; dreimal stammte die verwendete Substanz aus Serum vom Hund, zweimal vom Pferd, einmal vom Schwein und einmal vom Rind.

Tabelle I.
Berechnete Werthe.

Formel des		Liefert	
Cholesterins.	Oelsäure-Cholesterinesters.	% C.	% H.
a) ältere $C_{26}H_{43}OH$. . .	$\left. \begin{matrix} C_{26}H_{43} \\ C_{18}H_{33}O \end{matrix} \right\} O = C_{44}H_{76}O_2$	83,02	11,95
b) neuere (Mauthner und Suida) $C_{27}H_{43}OH$	$\left. \begin{matrix} C_{27}H_{43} \\ C_{18}H_{33}O \end{matrix} \right\} O = C_{45}H_{76}O_2$	83,33	11,73

Tabelle II.
Gefundene Werthe.

No.	Substanz aus	Schmelzpunkt.	Menge der angewandten Substanz.	Liefert					
				CO ₂ .	C.	H ₂ O.	H.	% C.	% H.
1.	Hundeserum . .	41°	0,1536	0,4674	0,12747	0,1655	0,01839	82,99	11,96
2.	» . .	41°	0,1856	0,5655	0,15422	0,1956	0,02173	83,08	11,71
3.	» . .	41°	0,1909	0,5778	0,15758	0,1998	0,02220	82,54	11,62
4.	Schweineserum	45°	0,2252	0,6804	0,18556	0,2429	0,02699	82,39	11,98
5.	Rinderserum .	43°	0,1755	0,5332	0,1454	0,1868	0,02075	82,85	11,82
6.	Pferdeserum . .	43°	0,1446	0,4396	0,1199	0,1490	0,01655	82,92	11,44
7.	» . .	43°	0,1482	0,4518	0,1232	0,1586	0,01762	83,14	11,89
							Mittel	82,84	11,77

Das Mittel aus den einzelnen Analysen ergibt für den Ester einen Gehalt

$$\text{an C} = 82,84\%$$

$$\text{an H} = 11,77\%$$

Vergleicht man damit die theoretisch berechneten Werthe der Tabelle I, so stimmt der C-Gehalt besser bei Benützung der

¹⁾ Mauthner und Suida. Beiträge zur Kenntniss des Cholesterins (II. Abhandlung). Wiener Sitzungsber., math.-nat. Cl., Bd. CIII. Abth. II. 6. Mai 1894.

älteren Cholesterinformel und ist in diesem Falle 0,18% zu klein; der H-Gehalt dagegen ist für diese Formel um 0,18% zu hoch, während er für die neuere Formel fast genau stimmt. Einzelne Analysen, nämlich No. 2 und 7, stimmen besser zu den Zahlenwerthen, welche sich bei Benützung der neueren Formel ergeben. Die Analysen des Oelsäureesters sind somit weder für die neuere, noch für die ältere Formel des Cholesterins entscheidend.

g) Verseifung des Esters.

Zum Nachweis der Esternatur wird etwa 1 gr. der in Rede stehenden Substanz verseift: man löst die Krystalle in kochendem Alkohol, setzt der Lösung Kalilauge im Ueberschuss zu (etwa 1 gr. in möglichst wenig Wasser gelöst) und lässt das Ganze im Kolben auf dem Wasserbade leicht kochen. Nach einer Stunde ist die Trennung in Cholesterin und die Seife vollendet; die leichte Trübung wird durch Filtriren beseitigt. Aus dem klaren Filtrat gewinnt man das Cholesterin, indem man den grössten Theil des Alkohols auf dem Wasserbade verjagt, den Rest mit Wasser versetzt und 24 Stunden in der Kälte stehen lässt. Nach dieser Zeit ist das Cholesterin vollständig ausgefallen und wird auf dem Filter gesammelt. Filtrirt man früher, so ist man nicht sicher, dass das Cholesterin vollständig ausgefallen ist. Das auf dem Filter liegende Cholesterin wird mit verdünntem Alkohol ausgewaschen, getrocknet und in wenig wasserfreiem Aether gelöst; bei der Verdunstung desselben krystallisirt es in den bekannten Cholesterintafeln aus, die bei 145° schmelzen.

Das klare, die Seife enthaltende Filtrat wird in einer Schale auf etwa 30 ccm. eingedampft und mit verdünnter Salzsäure angesäuert, worauf binnen kurzer Zeit Oeltropfen auf der Oberfläche erscheinen. Die Flüssigkeit wird nun im Scheidetrichter zweimal mit dem dreifachen Volum Aether ausgeschüttelt, der Aether filtrirt und verdampft. Als Rückstand findet man ein gelbliches Oel (etwa 10 Tropfen von 1 gr. des Esters), welches den Geruch der Oelsäure hat und auch bei tagelangem Stehen nicht fest wird (NB. wenn man

das Cholesterin in der angegebenen Weise vollständig ausgefällt hat; ist dies nicht der Fall, so erstarrt das Oel mit dem beigemengten Cholesterin).

Dass die ölige Flüssigkeit aus Oelsäure besteht, lässt sich durch folgende Reactionen nachweisen:

α) Durch Bildung von ölsaurem, in Aether löslichem Blei: Drei Tropfen des Oels werden in Wasser unter Zusatz von Soda in der Wärme gelöst; dabei entsteht eine stark schäumende Seifenlösung, welche auf Zusatz von Bleizuckerlösung eine bald in Form einer pflasterartigen Masse sich ausscheidende Fällung gibt. Dieses Bleipflaster löst sich mit Hinterlassung eines geringen Rückstandes von kohlen-saurem Blei in Aether.

β) Durch das Bromadditionsvermögen der Oel-säure. Drei Tropfen des Oels werden in Wasser zertheilt; fügt man nun tropfenweise Bromwasser hinzu, so wird dieses beim Schütteln entfärbt, bis schliesslich durch weiter zuge-fühtes Bromwasser keine Entfärbung mehr eintritt.

Schöner ist dieser Versuch, wenn man das Oel in Eis-essig löst und dazu tropfenweise eine Lösung von Brom in Eisessig giesst. In diesem Falle tritt augenblicklich ohne Schütteln Entfärbung ein, die man bei vorsichtigem Brom-zusatz einige Mal wiederholen kann.

γ) Ein weiterer Beweis, dass in dem beschriebenen Körper der Oelsäureester des Cholesterins vorliegt, wird durch die Uebereinstimmung desselben mit dem künstlich dargestellten Ester erbracht.

3. Künstliche Darstellung des Oelsäure-Cholesterinesters.

Der erste Versuch, die Esterbildung durch Zusatz von Phosphoroxchlorid zu einer Mischung von Cholesterin und Oelsäure und Erwärmung des Gemisches herbeizuführen, hatte kein günstiges Ergebniss und soll deshalb auch nicht weiter beschrieben werden; dagegen gelang die Darstellung des Esters leicht, als Cholesterin mit der fünffachen Gewichtsmenge Oel-säure im Oelbad während drei Stunden auf 200° erhitzt wurde

(im offenen Kolben). Beim Eintritt der Reaction nahm die geschmolzene Masse eine braune Farbe an.

Um den gebildeten Ester von der im Ueberschuss beigemengten Oelsäure zu trennen, wurde der Inhalt des Kolbens, der nach dem Erkalten zu einer festen Masse erstarrt war, längere Zeit mit Alkohol geschüttelt, in welchem sich ein Theil der Masse unter Gelbfärbung löste. Die Lösung wurde abgossen und stehen gelassen. Am zweiten Tage hatten sich in derselben Krystalle gebildet, die auf dem Filter gesammelt wurden; das Filtrat, welches im Wesentlichen jedenfalls nur die in Alkohol leicht lösliche Oelsäure enthielt, wurde weggegossen. Die auf dem Filter gebliebenen Krystalle, welche eine gelbe, klebrige Masse darstellten, wurden nun zur Reinigung in alkoholischer Lösung mit Thierkohle gekocht, filtrirt und das noch schwach gelblich gefärbte Filtrat in die Kälte gestellt. Nach zwei Tagen waren wieder feine Nadeln auskrystallisirt, die gesammelt und getrocknet zwischen 41 und 45° C. schmolzen. Nach weiterem Umkrystallisiren blieb der Schmelzpunkt auf 42° stehen; doch waren die Krystalle nicht so schön ausgebildet wie die aus Blutserum gewonnenen und nicht ganz farblos.

Der Rückstand, welcher bei der ersten Behandlung der den Ester enthaltenden Masse mit Alkohol geblieben war, wurde in einer Mischung von Alkohol und Aether gelöst. Auch in dieser Lösung bildeten sich Krystalle, welche gesammelt und in gleicher Weise wie die aus der ersten Lösung gewonnenen behandelt wurden; sie zeigten schliesslich gleichfalls einen Schmelzpunkt von 42° C.

Die Analysen des künstlichen Esters ergaben folgende Zahlenwerthe:

Tabelle III.

Menge der angewandten Substanz.	Liefert		Daraus berechnet.	
	% CO ₂ .	H ₂ O.	% C.	% H.
0,1488	0,4498	0,1648	82,44	12,30
0,1548	0,4684	0,1693	82,53	12,15

Diese Zahlen kommen den theoretisch verlangten (s. Tab. I S. 338) zwar nicht so nahe, wie die des natürlichen

Esters (Tab. II), unterscheiden sich aber von den letzteren so wenig, dass man die Identität beider Substanzen annehmen darf, für welche auch die Uebereinstimmung der Schmelzpunkte spricht.

II. Cholesterylpalmitat $C_{26}H_{48}O$ ($C_{16}H_{31}O$).

1. Darstellung aus Blutserum.

Wie schon erwähnt, wird aus Blutserum durch Alkohol ausser dem Oelsäureester des Cholesterins noch ein zweiter Körper extrahirt, welcher sich von dem ersteren durch seine Krystallform, seinen Schmelzpunkt und sein Lösungsvermögen unterscheidet und deshalb unschwer von ihm getrennt werden kann. Lässt man nämlich das zweite Alkoholextract des Blutserums stehen, so sieht man in manchen Fällen zuerst kleine Blättchen auftreten, welche auf der Oberfläche ein Häutchen bilden. Werden diese auf dem Filter gesammelt, so zeigen sie beim Trocknen starken Seidenglanz und einen Schmelzpunkt, der in verschiedenen Versuchen zwischen 70 und 80° C. liegt.

Dieser Körper stellt, wie nachher gezeigt wird, den Palmitinsäureester des Cholesterins dar; um ihn vollständig aus dem Serum zu gewinnen, muss man dasselbe, nachdem es schon zweimal mit Alkohol behandelt worden ist, mit einer Mischung von Alkohol und Aether mehrere Tage bei etwa 40° C. extrahiren, so oft als diese noch etwas aus dem Serum aufnimmt. Lässt man die vereinigten Extracte stehen, so krystallisirt zuerst der Palmitinsäureester aus und nachher häufig noch eine gewisse Menge des Oelsäureesters. Um den Zeitpunkt nicht zu verpassen, in welchem der Palmitinsäureester ausgefallen ist und der Oelsäureester auszufallen beginnt, thut man gut, die gebildeten Krystalle zu wiederholten Malen zu sammeln und ihren Schmelzpunkt zu bestimmen.

Zur Reindarstellung werden die Krystalle in Aether gelöst und filtrirt, das Filtrat bis zur leichten Trübung mit absolutem Alkohol versetzt und zur Krystallisation in die Kälte gestellt. Auch heisses Aceton eignet sich zum Umkrystallisiren für den Palmitinsäureester.

2. Eigenschaften.

Die reinen Krystalle verlieren etwas von dem ursprünglichen Seidenglanz der Substanz und erscheinen als schneeweisse Blättchen; ihr Schmelzpunkt liegt bei 77 oder 78° C. Sie lösen sich in Alkohol sehr schwer, noch schwerer als die des Oelsäureesters; in Aether, Chloroform, heissem Aceton lösen sie sich ziemlich leicht, aber gleichfalls weniger leicht als der Oelsäureester. Was die Cholesterinreactionen betrifft, so zeigt sie das Palmitinat weniger schön als das Oleat. Mit concentrirter Schwefelsäure zusammengebracht, wird das Palmitat schwefelgelb, indem es zerfliesst; erst nach längerer Zeit tritt im Gelb ein röthlicher Ton auf. Löst man eine Probe der Krystalle in wenig Chloroform und fügt Schwefelsäure hinzu, so färbt sich die Chloroformlösung sehr langsam gelb, nach 5 Minuten dunkelroth.

Die durch diese Reactionen nahe gelegte Vermuthung, dass hier der Cholesterinester einer höheren Fettsäure vorliege, wurde durch die Verseifung der Substanz bestätigt. Zu diesem Zwecke wurde 1 gr. der Krystalle mit etwa 400 ccm. absolutem Alkohol gekocht und löste sich darin ziemlich rasch beim Zufügen von Aetzkali (1 gr. in möglichst wenig Wasser gelöst). Nach zweistündigem Kochen wurde die leichte Trübung durch Filtration beseitigt, der Alkohol zum grossen Theil auf dem Wasserbade verdampft, der Rest mit Wasser versetzt und in die Kälte gestellt. Der sich bildende weisse Niederschlag wurde nach 24 Stunden auf dem Filter gesammelt, mit verdünntem Alkohol gewaschen, getrocknet und in Aether gelöst; nach dem Verdunsten desselben blieben die charakteristischen Cholesterintafeln zurück, die getrocknet bei 145° schmolzen. Beim Ansäuern des vom Cholesterin befreiten Filtrats schieden sich weisse Flocken aus, die auf dem Filter gesammelt, mit Wasser gewaschen und aus einer kleinen Menge heissen Alkohols umkrystallisirt wurden; es bildeten sich blättrige Krystalle, welche getrocknet bei 62° schmolzen; dies ist aber der Schmelzpunkt der Palmitinsäure. Es war somit in hohem Grade wahrscheinlich, dass in der verseiften Substanz der Palmitinsäureester des

Cholesterins vorliegt. Diese Wahrscheinlichkeit wurde nun ferner gesichert durch das Ergebniss der Analyse der Substanz und ihre Uebereinstimmung mit dem künstlich dargestellten Palmitinsäure-Cholesterinester. Das Ergebniss der Analyse ist in folgender Tabelle enthalten:

Tabelle IV. (Gefundene Werthe.)

Menge der angewandten Substanz.	Liefert		Daraus berechnet.	
	CO ₂ .	H ₂ O.	% C.	% H.
0,1348	0,4076	0,1522	82,46	12,54

Die theoretisch verlangten Zahlen sind in folgender Tabelle zusammengestellt:

Tabelle V. (Berechnete Werthe.)

Cholesterins.	Formel des		Liefert	
	Palmitinsäure-Cholesterinesters.		% C.	% H.
a) ältere C ₂₆ H ₄₃ OH . . .	$\left. \begin{array}{l} C_{26}H_{43} \\ C_{16}H_{31}O \end{array} \right\}$	O = C ₄₂ H ₇₄ O ₂	82,62	12,13
b) neuere (Mauthner und Suida) C ₂₇ H ₄₃ OH.		$\left. \begin{array}{l} C_{27}H_{43} \\ C_{16}H_{31}O \end{array} \right\}$	O = C ₄₃ H ₇₄ O ₂	82,95

Die Analyse stimmt mit dem theoretisch verlangten Werthe befriedigend überein, wenn man für das Cholesterin die ältere Formel zu Grunde legt; in diesem Falle wurde der Werth für C 0,16% zu niedrig, der für H 0,41% zu hoch gefunden.

3. Zur künstlichen Darstellung

des Esters wurde ein Gewichtstheil Cholesterin mit der fünf-fachen Menge Palmitinsäure gemischt und drei Stunden lang im Oelbad auf 200° erhitzt (im offenen Kolben), wobei die Masse eine braune Farbe annahm. Der gebildete Ester, der in Alkohol sehr wenig löslich ist, wurde von der beigemengten Fettsäure dadurch befreit, dass das Gemenge mehrmals mit Alkohol gekocht und die alkoholische Lösung, die fast ausschliesslich die Fettsäure enthielt, beseitigt wurde.

Der den Ester enthaltende Rückstand wurde aus heissem Aceton umkrystallisirt, wobei ein gelbes Pulver gewonnen wurde; dieses wurde in alkoholisch-ätherischer Lösung mit Thierkohle gekocht, filtrirt und zur Krystallisation in die Kälte gestellt; hier bildeten sich seideglänzende Blättchen, die einen gelblichen Schimmer hatten, im Uebrigen dem aus Blutserum gewonnenen Palmitinsäureester gleichen. Nach mehrfachem Umkrystallisiren aus alkoholisch-ätherischer Lösung wurden die Krystalle schneeweiss und der Schmelzpunkt blieb auf 78° C. stehen. Die Analyse des künstlichen Esters ist in folgender Tabelle enthalten:

Tabelle VI. (Gefundene Werthe.)

Menge der angewandten Substanz.	Liefert		Daraus berechnet	
	CO ₂ .	H ₂ O.	% C.	% H.
0,1560	0,4719	0,1738	82,50	12,37

Diese Werthe stimmen mit den theoretisch verlangten (vergl. Tab. V) befriedigend, mit den beim natürlichen Ester gefundenen Werthen (Tab. IV) sehr gut überein; der natürliche enthält nämlich nach den vorliegenden Analysen nur 0,04% C weniger und 0,17% H mehr als der künstliche.

Es sprechen somit die Analyse, die Verseifung, sowie der Vergleich mit dem künstlich dargestellten Palmitinsäure-Cholesterinester übereinstimmend dafür, dass diese Substanz im normalen Blutserum vorkommt.

III. Cholesterylstearat $C_{26}H_{43}O(C_{18}H_{35}O)$.

Nachdem im Blutserum der Oelsäure- und Palmitinsäure-ester des Cholesterins nachgewiesen war, lag die Vermuthung nahe, dass auch der Stearinsäureester darin enthalten sein werde. Um seine Auffindung zu erleichtern, wurde derselbe zunächst künstlich dargestellt, genau in der gleichen Weise wie der Palmitinsäureester; er fiel aus der Lösung in heissem Aceton zunächst als gelbes Pulver aus, das bei 80° schmolz; dieses wurde in alkoholisch-ätherischer Lösung mit Thierkohle gekocht, mehrmals umkrystallisirt und erschien zuletzt in Form

von weissen Blättchen, die bei 82° C. schmolzen. Die Analyse dieser Blättchen lieferte Werthe, welche mit den theoretisch für den Stearinsäure-Cholesterinester verlangten befriedigend übereinstimmen, wie die beiden folgenden Tabellen zeigen.

Tabelle VII. (Gefundene Werthe.)

Menge der angewandten Substanz.	Liefert		Daraus berechnet	
	CO ₂ .	H ₂ O.	% C.	% H.
0,1349	0,4120	0,1500	83,24	12,35

Tabelle VIII. (Berechnete Werthe.)

Cholesterins.	Formel des		Liefert.	
	Stearinsäure-Cholesterinesters.		% C.	% H.
a) ältere C ₂₆ H ₄₃ OH	C ₂₆ H ₄₃ C ₁₈ H ₃₅ O	} O = C ₄₄ H ₇₈ O ₂	82,75	12,22
b) neuere (Mauthner und Suida) C ₂₇ H ₄₃ OH.	C ₂₇ H ₄₃ C ₁₈ H ₃₅ O	} O = C ₄₅ H ₇₈ O ₂	83,07	12,00

Der Stearinsäureester des Cholesterins ist ähnlich dem Palmitinsäureester äusserst wenig löslich in absolutem Alkohol, in Aether, Chloroform und heissem Aceton weniger leicht löslich als der Palmitinsäureester. Durch Schwefelsäure werden die Krystalle gelb gefärbt, indem sie darin zerfliessen, und nehmen erst nach längerer Zeit einen röthlichen Ton an.

Das Cholesterylstearat ist schon von Berthelot¹⁾ dargestellt worden durch 8—10stündiges Erhitzen von Cholesterin mit der 4—5fachen Menge Stearinsäure im geschlossenen Rohr. Berthelot erhielt kleine weisse, glänzende Nadeln, die gegen 65° sich in eine durchscheinende Flüssigkeit verwandelten; zu diesem Schmelzpunkt bemerkt Berthelot: «Ses points de fusion et surtout de solidification sont difficiles à déterminer exactement, parce qu'elle participe à quelques égards des propriétés des résines». Berthelot hat anscheinend kein reines Präparat gehabt.

¹⁾ Berthelot, Ann. de Chimie et de Physique [3], T. 56, p. 57, 1858.

Zur Auffindung des Stearinsäureesters wurde Blutserum vom Pferde und vom Kalb erst mit Alkohol, dann mit einer Mischung von Alkohol und Aether, schliesslich mit reinem Aether extrahirt und die Krystalle fractionirt gesammelt. In keiner dieser Fractionen wurde aber ein Körper gefunden, der einen Schmelzpunkt von mehr als 78° C. gezeigt hätte; die gewonnenen Krystalle schmolzen vielmehr glatt bei 42 oder 43 und bei 76 oder 77° C.

Aus diesem Befunde geht mit Wahrscheinlichkeit hervor, dass der Stearinsäureester in den beiden untersuchten Blutarten nicht vorhanden war; mit Sicherheit lässt sich dieser Schluss aber nicht ziehen; denn es wäre möglich, dass die Trennung des Stearinsäureesters vom Palmitinsäureester, dem er in Bezug auf Löslichkeit und Schmelzpunkt sehr nahe steht, äusserst schwierig ist und dass der Schmelzpunkt der vereinigten Ester dem des Palmitinsäureesters sehr nahe liegt.

Um in dieser Frage ein Urtheil zu gewinnen, wurde noch folgender Versuch angestellt:

Gleiche Mengen des künstlichen Cholesterylpalmitats und -stearats vom Schmelzpunkt 78 bzw. 82° C. wurden in Aether gelöst, die Lösung mit Alkohol bis zur leichten Trübung versetzt und in die Kälte gestellt; die gebildeten Krystalle wurden in zwei Fractionen gesammelt und getrocknet; sie bildeten makroskopisch ein weisses Pulver, das erst unter dem Mikroskop krystallinisches Gefüge zeigte; doch waren die Krystalle lange nicht so schön ausgebildet, wie die der reinen Ester; beide Fractionen schmolzen nicht glatt, sondern über 4 Grade weg, zwischen 72 und 76° C., also niedriger, als der Palmitinsäureester (78°). Im Gegensatz zu diesen Mischproducten zeigte der aus Serum gewonnene Palmitinsäureester einen glatten Schmelzpunkt und wesentlich schöneres Krystallisationsvermögen; es ist daher nicht wahrscheinlich, dass ihm der Stearinsäureester beigemischt ist, wenn dies auch nicht mit voller Sicherheit behauptet werden kann. Es ist aber sehr wohl möglich, dass sich das Cholesterylstearat bei anderen Thieren oder nach bestimmter Fütterung im Blut findet.

IV. Quantitative Angaben über die im Serum vorkommenden Ester.

Die quantitativen Versuche, welche im Folgenden mitgetheilt sind, sind leider nicht von grossem Werthe. Der erste dieser Versuche, in welchem der Einfluss verschiedener Ernährung auf die Menge des Esters festgestellt werden sollte, wurde nämlich im Anfang meiner Arbeit ausgeführt, als nur das Vorkommen des Oelsäureesters im Serum festgestellt war; in Folge dessen ist der Palmitinsäureester nicht mitbestimmt worden, sondern wurde, soweit er überhaupt extrahirt war, beseitigt. Die beiden späteren Bestimmungen wurden beliebig gemacht, als grössere Quantitäten Serum zur Gewinnung der Ester für die chemische Untersuchung verarbeitet wurden. Das Serum wurde in der oben geschilderten Weise mit Alkohol und Aether möglichst vollständig extrahirt, allein es hat sich erst nach Abschluss der Versuche gezeigt, dass aus den Extracten die Ester nicht vollkommen wiedergewonnen wurden; denn beim Abdampfen der aus vielen Versuchen vereinigten Extracte, aus welchen die Ester schon auskrystallisirt waren, fand sich ein Rückstand, der noch erhebliche Mengen Cholesteryloleat enthielt. Die blosse Verdünnung der Extracte mit Wasser und die Abkühlung derselben genügen also nicht, um die ganze Menge der extrahirten Ester zu gewinnen, sondern es ist nöthig, zur Entfernung der letzten Reste den Alkohol bezw. den Aether zu verjagen, allerdings auf Kosten schöner Krystallbildung. Die folgenden Angaben sind daher etwas zu klein; trotz dieses Fehlers mögen sie zum Vergleich mit späteren angeführt werden:

1. Anfangs Januar 1895 wurde ein grosser Hund von 17,20 Kgr. Körpergewicht eingestellt, bei welchem der Gehalt des Serums an Cholesteryloleat unter dem Einfluss verschiedener Kost bezw. des Hungers bestimmt wurde. Nachdem derselbe drei Tage gehungert hatte, wurde ihm aus einem oberflächlichen Seitenast der Art. cruralis (er geht etwa in der Mitte des Oberschenkels medianwärts ab und ist durch die Haut durchzufühlen) 200 ccm. Blut entzogen. Diese Operation wurde aseptisch ohne Narkose ausgeführt (nur eine

Cocaininjection wurde einige Minuten vor dem Hautschnitt gemacht), da das Thier bei freundlicher Zusprache ganz ruhig hielt. Das aufgefangene, geronnene Blut wurde zur Abscheidung des Serums zwei Tage in die Kälte gestellt, das gewonnene Serum in der oben angegebenen Weise verarbeitet und aus dem gefundenen Werthe der Gehalt an Cholesteryloleat auf 100 cbcm. Serum berechnet. Darauf wurde das Thier eine Reihe von Tagen mit bestimmter Kost gefüttert und die Blutentziehung in derselben Weise wiederholt u. s. w. Die Ergebnisse dieses Versuches sind in folgender Tabelle zusammengestellt:

Tabelle IX.

No.	Datum.	Körpergew. am letzten Tage.	Kost.	Gehalt des Serums an Cholesteryloleat in %.	Bemerkungen.
1.	7.—10. Januar	16,30 Kgr.	{ Hunger (Wasser wird gereicht) }	0,22	
2.	10.—15. »	16,75 »	{ 2 Pfund mageres Pferdefleisch tägl. }	0,13	
3.	15.—24. »	16,75 »	{ 1 Pfd. mag. Fleisch u. 1200 gr. Kartoff. }	0,12	
4.	24. Jan. b. 5. Febr.	18,65 »	{ 1 Pfd. Fleisch u. 1 Pfd. Speck }	0,18	
5.	5.—8. Febr. . .	20,00 »	Reichliche Fütte- rung	—	Keine Blut- entziehung.
6.	8.—11. » . .	18,30 »	Hunger	0,20	

Auffallend in diesem Versuche ist, dass die grössten Werthe des Esters nach einer Hungerperiode (1 und 6) auftreten und besonders, dass sie grösser sind, als die nach Fleisch- und Fettkost (4) beobachteten. Es scheint daher, dass der Ester im Hungerzustand an Bedeutung gewinnt.

2. Bei der zweiten quantitativen Bestimmung lieferten 3250 cbcm. Pferdeserum folgende Mengen der Ester:

Cholesteryl-	
Oleat.	Palmitat.
0,588 gr.	0,135 gr.
1,90 »	0,080 »
0,14 »	—
Summa: 2,628 gr. = 0,08 %.	0,215 gr. = 0,006 %.

3. Die dritte Bestimmung wurde mit 1300 cbcm. Kalbserum ausgeführt; daraus wurde erhalten:

Cholesteryl.	
Oleat.	Palmitat.
1,075 gr.	0,10 gr.
0,075 »	—
0,06 »	—
Summa: 1,21 gr. = 0,09 ‰.	0,10 gr. = 0,008 ‰.

B. Historisches.

I. Vergleich der vorliegenden Befunde mit den Angaben Hoppe-Seyler's über das Vorkommen von Cholesterin im Blut.

Bei der im Vorhergehenden geschilderten Behandlungsweise wurden aus dem Blutserum stets nur die genannten Ester des Cholesterins und niemals reines Cholesterin gewonnen. Dem gegenüber steht die Angabe Hoppe-Seyler's, dass reines Cholesterin in nicht unbeträchtlicher Menge (bis 0,314 ‰) im Blute vorkommt¹⁾. Die Ursache dieses Widerspruchs wird aber sogleich klar, wenn man die Darstellungsweise Hoppe-Seyler's mit der oben beschriebenen vergleicht: Hoppe-Seyler extrahirte das Blutserum so lange mit Aether, als dieser etwas aufnahm und verdampfte die vereinigten Aetherauszüge auf dem Wasserbade. «Ein Theil des Rückstandes oder das Ganze wurde dann mit überschüssiger klarer concentrirter alkoholischer Lösung von Aetzkali auf dem Wasserbade mehrere Stunden im Sieden erhalten, endlich der Alkohol verdunstet, der Rückstand in Wasser gelöst, so dass eine dünnflüssige Lösung entstand und mit Aether geschüttelt, nach Absitzen und Abgiessen des Aethers noch mehrmals in gleicher Weise mit Aether behandelt. Dieser ätherische Auszug enthält das Cholesterin gewöhnlich fast völlig rein».

¹⁾ F. Hoppe-Seyler: Ueber das Vorkommen von Cholesterin und Protagon und ihre Betheiligung bei der Bildung des Stroma der rothen Blutkörperchen. Medicin.-chemische Untersuchungen, Heft 1. Berlin 1866, S. 140.

Auf Grund dieser Schilderung erklärt sich die Verschiedenheit der Befunde einfach durch folgende Unterstellung: Hoppe-Seyler hat im Aetherextract des Blutserums nicht reines Cholesterin, sondern die Fettsäureester desselben vor sich gehabt; in der Absicht, das vermeintliche Cholesterin von beigemengtem Fett durch Verseifung des letzteren zu befreien, hat er den Aetherrückstand mit Aetzkali behandelt, durch diesen Eingriff aber die Ester zerlegt und auf diese Weise reines Cholesterin erhalten.

Diese Erklärung findet eine Bestätigung in der weiteren Angabe Hoppe-Seyler's (l. c. S. 145), «dass der Gehalt des Serums an Cholesterin sehr verschieden ist, dass er sich erhebt, wenn das Serum reich an Fetten ist, dass er dagegen fällt, wenn es daran arm ist». Da eben das Cholesterin im Blut an Fettsäuren gebunden vorkommt, muss natürlich die Menge des Cholesterins und der Fette gleichzeitig zu- oder abnehmen.

Die einfache Methode Hoppe-Seyler's ist daher wohl geeignet, um die Gesamtmenge des im Blutserum enthaltenen Cholesterins zu bestimmen, ist aber nicht brauchbar, um das Cholesterin in seinen natürlichen Verbindungen aus dem Serum zu gewinnen.

Dagegen werden wahrscheinlich die Angaben Hoppe-Seyler's über das Vorkommen von Cholesterin in den rothen Blutkörperchen zurecht bestehen bleiben; dies muss wenigstens aus der Bemerkung Hoppe-Seyler's geschlossen werden (l. c. S. 143), «dass die Blutkörperchen keine Fette, sondern nur Cholesterin und Protagon im Aetherauszuge enthalten». Wäre das Cholesterin in den Körperchen als Fettsäureester enthalten, so hätte Hoppe-Seyler das Fett bei der Verseifung gefunden. Das Cholesterin scheint demnach in den Blutkörperchen in freiem Zustand vorzukommen. Mit diesen Angaben Hoppe-Seyler's stimmen allerdings spätere von Manasse¹⁾ nicht überein, welcher zur Gewinnung des

¹⁾ Manasse: Ueber das Lecithin und Cholesterin der rothen Blutkörperchen. Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XIV, S. 437, 1890.

Cholesterins aus den rothen Blutkörperchen die ätherischen und alkoholischen Extracte mit Kalilauge behandelte und dabei Cholesterin und Kaliseifen erhielt.

Dagegen hat schon Boudet¹⁾ i. J. 1833 im menschlichen Gesamtblut Cholesterin erkannt, welches aus dem alkoholischen Extract ohne vorhergehende Kalibehandlung ausgefallen war und hat seine Identität mit dem Cholesterin der Gallensteine nachgewiesen.

Eigene Untersuchungen über diesen Punkt habe ich nicht angestellt.

Da bei vielen Angaben über das Vorkommen von Cholesterin im Pflanzen- und Thierkörper das Cholesterin zur Trennung von beigemengtem Fett mit Aetzkali behandelt wurde (z. B. von Schulze und Barbieri²⁾, Jakobson³⁾ u. A.), so liegt die Möglichkeit vor, dass in diesen Fällen gleichfalls vorhandene Ester des Cholesterins zerstört wurden; es wird daher nöthig sein, diese Angaben von Neuem darauf hin zu prüfen, ob das Cholesterin in freiem Zustand oder als Ester an den betreffenden Orten vorkommt.

Desgleichen machen die vorliegenden Befunde eine Revision der Angaben über den Fettgehalt des Blutes erforderlich.

II. Historisches über das Vorkommen von Estern im Thierkörper.

Schon lange bekannt ist das Vorkommen von Estern im Bienenwachs und im Wallrath.

Dem Wallrath ähnlich scheint das Sekret der Bürzeldrüse der Vögel zu sein; über dieses liegt eine Untersuchung

¹⁾ Boudet: Nouvelles recherches sur la composition du sérum du sang humain. Annales de Chimie et de Physique. T. LII, p. 337, Paris 1833.

²⁾ E. Schulze und J. Barbieri: Zur Kenntniss der Cholesterine. Journ. f. prakt. Chemie, N. F., Bd. 25, S. 159, 1882.

³⁾ Jacobson: Ueber einige Pflanzenfette. } Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XIII, S. 32, 1889.

von de Jonge¹⁾ vor, in welcher der Autor zu folgendem Schlusse kommt: «Somit glaube ich den Nachweis geführt zu haben, dass das Sekret der Bürzeldrüse Cetylalkohol und zwar in beträchtlicher Menge enthält. Wie im Wallrath scheint auch hier der Cetylalkohol wesentlich an Palmitinsäure oder andere hohe fette Säuren gebunden zu sein».

Bekannt ist ferner das Vorkommen von Cholesterinestern im Wollfett, bei dessen Untersuchung Schulze²⁾ zu folgendem Ergebniss kam: S. 175: «Aus den im Vorigen mitgetheilten Thatsachen ergibt sich, dass der im Weingeist unlösliche Theil des Wollfetts zusammengesetzte Aether des Cholesterins und des Isocholesterins enthält. Mit einer genaueren Untersuchung der daraus abgeschiedenen Säuren bin ich beschäftigt; doch kann man nach den früher ausgeführten Untersuchungen wohl schon annehmen, dass es Glieder der Fettsäure-Reihe und Oelsäure sind. Der in Weingeist lösliche Wollfett-Theil enthält freies Cholesterin, daneben vermuthlich auch freies Isocholesterin in geringer Menge und vielleicht Aether-Verbindungen der beiden Alkohole mit Essigsäure und Buttersäure».

Ferner gehört hierher die Angabe von Baumstark³⁾, dass im Aetherextract des Gehirns neben freiem Cholesterin ein Körper vorkommt, der beim Kochen mit Kalilauge Cholesterin liefert; Baumstark schreibt darüber: «Wenn man aber die ölige gelbe Masse, nachdem kein Cholesterin mehr auf ein oder dem anderen Wege auskrystallisirt, mit weingeistigem Kali verseift, den Alkohol von der Seifenlösung verjagt und die wässerige Lösung mit Aether ausschüttelt, so werden aufs Neue grosse Mengen von Cholesterin erhalten.

¹⁾ D. de Jonge: Ueber das Secret der Talgdrüsen der Vögel und sein Verhältniss zu den fetthaltigen Hautsecreten der Säugethiere, insbesondere der Milch. Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. 3, S. 225, 1879.

²⁾ E. Schulze: Ueber die Zusammensetzung des Wollfetts. Journal für prakt. Chemie, N. F., Bd. 7, S. 163, 1873.

³⁾ F. Baumstark: Ueber eine neue Methode, das Gehirn chem. zu erforschen, und deren bisherige Ergebnisse. Zeitschr. f. physiolog. Chemie, Bd. IX, S. 164, 1885.

Ein Fingerzeig, wie mir scheint, dass neben freiem Cholesterin auch eine Verbindung desselben im Aetherextracte des Gehirnes vorkommen muss. Ein solches Vorkommen ist von E. Schulze auch im Wollfett nachgewiesen; allerdings in dem im Weingeist unlöslichen Theile des Wollfettes.

Welcher Natur diese Cholesterin-Verbindung ist, entzieht sich bis jetzt noch unserer Kenntniss. Ich vermuthete, dass es eine Oelsäureverbindung sei, denn die mit Salzsäure zersetzte Kaliseife gab bedeutende Mengen Oelsäure. Jedoch konnte ich bis jetzt keinen Oelsäure-Cholesterin-Aether aus dem Oele isoliren, der identisch gewesen wäre mit dem von mir synthetisch aus Oelsäure und Cholesterin durch Erhitzen im Rohre auf 200° dargestellten».

Ueber die Eigenschaften des letzteren macht Baumstark leider keine Angaben.

Dies ist wohl Alles von den in Betracht kommenden Estern im Thierkörper, was bisher bekannt geworden ist¹⁾. Auffallend aber ist — und das soll zum Schlusse noch eingehender dargestellt werden —, dass der im Blut vorkommende Oelsäureester des Cholesterins, wenn auch nicht als solcher erkannt, jedoch ohne Zweifel schon einmal entdeckt und beschrieben worden ist und zwar schon im Jahre 1833 unter dem Namen Serolin von Boudet²⁾. Seine Darstellung beschreibt Boudet in derselben Abhandlung, in welcher das Vorkommen von Cholesterin im Blut nachgewiesen ist, folgendermaassen:

«Ce liquide (menschliches Blut von 3 starken Aderlässen) desséché à une douce chaleur, épuisé par l'eau bouillante et desséché de nouveau, a été réduit en poudre et traité par

¹⁾ Während des Druckes dieser Abhandlung erschien im letzten Heft dieser Zeitschrift eine Arbeit von W. G. Ruppel «Ueber die Vernix caseosa»; in diesem Secret wurden ausser Cholesterin und Isocholesterin Cholesterinfette (Fettsäureester) neben Glycerinfetten nachgewiesen. Ferner sind in dieser Abhandlung die Untersuchungen von O. Liebreich »Ueber Cholesterinfette und das Lanolin« besprochen, welche mir leider bisher nicht bekannt waren.

²⁾ Boudet: Nouvelles recherches sur la composition du serum du sang humain. Annales de Chimie et de Physique. T. LII, p. 337. Paris 1833.

l'alcool bouillant. Les liqueurs alcooliques réunies étaient incolores; elles se sont troublées par le refroidissement et ont laissé déposer avec beaucoup de lenteur des flocons blancs que le filtre en a séparés. Ces flocons, d'un aspect gras et nacré, se présentaient en petites plaques légèrement translucides mais sans forme cristalline. Ils m'ont paru constituer un principe immédiat que j'ai désigné par le nom de séroline ».

Von diesem Serolin gibt Boudet folgende Beschreibung: «Vue au microscope, cette matière semble formée de filaments renflés de distance en distance par des petits globules blancs et opaques qui leur donnent l'apparence de chapelets (Rosenkranz). Elle se fond à $+ 36^{\circ}$, se montre sans action sur les papiers réactifs et rougit comme la cholestérine au contact de l'acide sulfurique concentré.

Elle ne fait point émulsion avec l'eau froide, et si on chauffe elle vient flotter à la surface du liquide sous forme d'une huile incolore.

L'éther sulfurique la dissout facilement même à froid. L'alcool à 36° au contraire n'en dissout que des traces à la température de l'ébullition, et n'exerce pas la moindre action sur elle lorsqu'il est employé à froid.

Traitée à chaud pendant 6 heures par l'eau de potasse, elle ne paraît éprouver aucune modification, et l'acide hydrochlorique ne produit pas le moindre trouble dans la liqueur alcaline.

Les acides acétique et hydrochlorique ne lui font éprouver aucune altération apparente ni à froid ni à chaud. Chauffée pendant longtemps avec l'acide nitrique, elle n'est point dissoute, mais devient soluble dans l'eau de potasse, qu'elle colore en brun.

Destillée à la lampe dans un petit tube de verre, elle répand une odeur très caractéristique, fournit des vapeurs alcalines, un léger résidu charbonneux, et semble se volatiliser en partie ».

Nach dieser Beschreibung ist es kaum zweifelhaft, dass Boudet den Oelsäure-Cholesterinester vor sich gehabt hat

und eine Nachprüfung der Boudet'schen Darstellungsmethode beseitigt jeden Zweifel; ich habe dieselbe mit dem Unterschiede wiederholt, dass ich defibrinirtes und getrocknetes Hundeblut nicht erst mit Wasser ausgekocht, sondern gleich mit Alkohol extrahirt habe. In diesem Extract bildeten sich in der Kälte Krystalle, welche gesammelt und getrocknet eine gelbbraune Färbung zeigten und zwischen 60 und 70° C. schmolzen; sie wurden in Aether gelöst, filtrirt und das Filtrat in eine grössere Menge erwärmten Alkohol eingetragen. Auf dem Filter blieb eine braune Masse zurück, die beim Trocknen hart wurde und beim Verbrennen nach verbrannten Federn roch. Die in der alkoholisch-ätherischen Lösung sich bildenden Krystalle waren schwach gelbliche Nadeln, die getrocknet bei 42° C. schmolzen und die Reactionen des Oelsäure-Cholesterinesters zeigten.

Man muss sich daher fragen, wie es möglich ist, dass dieser Körper, einmal dargestellt, in der folgenden Zeit aus der Literatur wieder verschwand. Dies scheint darin seinen Grund zu haben, dass die späteren Untersucher zum Theil nicht mehr die einfache Methode Boudet's verwendeten, zum Theil aber auch mit der Boudet'schen Methode nicht stets dieselbe Substanz erhielten. So beschreiben Verdeil und Marcet¹⁾ i. J. 1851 eine Methode zur Gewinnung des Serolins aus defibrinirtem Rinderblut, deren Brauchbarkeit schon von vornherein Zweifel erwecken muss, da bei ihr das Serolin in wässriger Lösung extrahirt wird; es wird nämlich defibrinirtes Rinderblut mit der Hälfte Wasser vermischt, durch Hitze coagulirt und filtrirt; «ce liquide — das Filtrat — tient en dissolution tous les principes du sang, excepté la fibrine, l'albumine et les globules sanguins». Unter diesen «principes» haben Verdeil und Marcet auch das Serolin gefunden, das sie aber nicht näher beschreiben. Die von Verdeil und Marcet angegebene Methode habe ich gleichfalls

¹⁾ Verdeil et Marcet: Recherches sur les principes immédiats qui composent le sang de l'homme et des principaux mammifères. Journal de Pharmacie de Chimie (3^e série) T. XX, Paris 1851, p. 89.

nachgeprüft und zwar mit Blut von demselben Hunde, aus welchem ich den Oelsäureester nach der Methode Boudet's gewonnen habe; nach der Methode von Verdeil und Marcet habe ich aber keine Spur des Esters erhalten und bin deshalb überzeugt, dass Verdeil und Marcet nicht Boudet's Serolin vor sich gehabt haben.

Ein Jahr später, i. J. 1852, hat aber Goble¹⁾ der Existenz des Serolins ein Ende gemacht, indem er es für ein Gemenge von Fetten mit Cholesterin und Eiweiss erklärte. Zur Darstellung der Substanz scheint er mehrere Methoden verwendet zu haben, gibt aber nur eine kurze Beschreibung der Boudet'schen und fährt dann fort:

« La séroline constitue-t-elle, comme le pense M. Boudet, un corps particulier, un principe immédiat? Les recherches auxquelles je l'ai soumise ne me permettent pas d'admettre cette opinion. Pour qu'un corps puisse être regardé comme un principe immédiat, il faut que, préparé par des méthodes différentes et après avoir été soumis à l'action des dissolvants, il se présente avec les mêmes propriétés. On sait aussi que le point de fusion est un des meilleurs caractères pour reconnaître les corps gras et que cette propriété est invariable pour chacun d'eux: Or la séroline ne présente pas cette constance dans ses propriétés et mes expériences tendent à la faire considérer comme un corps complexe qui serait formé, dans le plus grand nombre des cas, d'oléine, de margarine, de cholestérine et de matière albumineuse entraînée.

Le point de fusion de la séroline varie selon la quantité d'alcool employé, et selon son degré alcoolimétrique. Or on sait que la température à laquelle fond un principe immédiat gras est toujours la même quel que soit le dissolvant qui ait servi à l'obtenir.

La séroline de M. Boudet donne des produits ammoniacaux. Lorsqu'on la traite par l'éther et qu'on filtre la

¹⁾ M. Goble: Recherches chimiques sur les matières grasses du sang veineux de l'homme. Journal de Pharmacie et de Chimie (3^e série) T. XXI, Paris 1852, p. 241.

liqueur, il reste sur le papier une petite quantité d'une substance insoluble renfermant de l'azote, et qui n'est autre chose que de l'albumine entraînée. La liqueur évaporée donne une matière qui ne renferme pas d'azote. L'ammoniaque que fournit la séroline provient donc de la substance albumineuse entraînée, et en effet la graisse obtenue, chauffée dans un tube de verre, donne des produits acides, laisse un léger résidu charbonneux et se volatilise en grande partie.

Les expériences que je viens de faire connaître prouvent, ce me semble, que la séroline est une substance complexe dont l'existence comme principe immédiat du sang ne peut être admise».

Zu dieser Goble'y'schen Kritik des Serolins ist Folgendes zu bemerken:

1. Goble'y hat kein reines Präparat des Serolins untersucht, sondern ein durch Eiweiss verunreinigtes. Dass Boudet's Serolin diese Verunreinigung nicht hatte, geht aus seiner Angabe hervor, dass das Serolin in Aether sich leicht löst und bei der Verbrennung einen sehr charakteristischen Geruch verbreitet; beigemengtes Eiweiss hätte Boudet vermuthlich durch den Geruch erkannt.

2. Die Inconstanz des Schmelzpunktes hat jedenfalls zum grössten Theil in dieser Verunreinigung ihren Grund, zum Theil mag sie dadurch veranlasst sein, dass Goble'y ausser dem Oelsäureester auch wechselnde Mengen des Palmitinsäureesters extrahirt und beide vereinigt hat; denn er hat das Blut in verschiedenen Fällen mit verschiedenen Mengen reinen oder verdünnten Alkohols extrahirt.

3. Das eigentliche im Aether gelöste Serolin hat Goble'y, wie es scheint, nicht zur Krystallisation gebracht und hat es für Fett gehalten.

Goble'y's Kritik hat genügt, das Serolin aus der Literatur zu verbannen; denn seit dieser Zeit ist dasselbe nicht mehr gesehen oder als nicht einheitlicher Körper nicht weiter beachtet worden. Boudet's Entdeckung aber ist ein Beispiel, dass ältere Beobachtungen, auch wenn sie mit unvoll-

kommenen Hilfsmitteln angestellt sind, mehr Beachtung verdienen, als ihnen häufig zu Theil wird.

Zum Schlusse ist es mir eine angenehme Pflicht, Herrn Professor Baumann in Freiburg für die gütige Erlaubniss, einen Theil der beschriebenen Versuche, insbesondere die künstliche Darstellung der Ester, während der Ferien in seinem Laboratorium auszuführen, sowie für seine freundliche Unterstützung herzlichen Dank auszusprechen.
