

Die Oxydationsprodukte des Cholesterins in den tierischen Organen.

(Knochen — Blut.)

II. Mitteilung.

Von

J. Lifschütz-Bremen.

(Der Redaktion zugegangen am 30. Juli 1907.)

Vor einiger Zeit veröffentlichte ich in dieser Zeitschrift (Bd. L, S. 436 ff.) einige Notizen «über die Oxydation des Cholesterins», unter Hinweis auf das natürliche Vorkommen der dabei resultierenden Produkte im Schweißfette der Schafwolle. Bei dieser Gelegenheit wies ich auch daraufhin, daß die von Schulze und Winterstein¹⁾ beobachtete langsame Veränderung des Cholesterins am Licht an der Luft²⁾ nichts anderes sei, als eine Oxydation dieses Körpers zu den von mir an der bezeichneten Stelle kurz beschriebenen Produkten, die man mit Leichtigkeit durch Einwirkung von Oxydationsmitteln auf reines Cholesterin bei Wasserbadwärme in wenigen Minuten erhalten kann.

Konnte demnach mit Hilfe der obigen Schulze-Wintersteinschen Beobachtung die Bildung dieser Oxydationsprodukte auf der Oberfläche des Schafvlieses durch die Einwirkung von Licht und Luft auf das freie bzw. auf das während des Wachstums der Wollhaare durch Verseifung der darin befindlichen Cholesterinester vermittelt des Kaligehalts des Schweißes freigelegte Cholesterin³⁾ ihre befriedigende Erklärung finden, so

¹⁾ Diese Zeitschrift, 1904, Bd. XLIII, S. 316.

²⁾ Unter Lichtabschluß ist das Cholesterin auch an der Luft völlig unveränderlich.

³⁾ Die Ester der Cholesterine selbst sind gegen oxydierende Einwirkungen außerordentlich widerstandsfähig.

konnten immer noch Zweifel bestehen, ob dieser Oxydationsvorgang auch im Innern des tierischen Organismus stattfindet. Allein die erwähnte leichte Oxydationsfähigkeit des Cholesterins, mit der es in kürzester Zeit auch unter Lichtausschluß auf nassem Wege jene Oxydationsprodukte liefert, legten die Wahrscheinlichkeit nahe, daß dieser Oxydationsprozeß auch in den inneren tierischen Organen vor sich gehen könnte, wo das Cholesterin mit Sauerstoff unter geeigneten Umständen in Berührung kommt.

Die scharfen optischen Merkmale, welche wenigstens die ersten Stufen jener Oxydationsprodukte des Cholesterins, das Oxycholesterin $C_{26}H_{42}(OH)_2$ und dessen ätherartige Vorstufe $(C_{26}H_{43}O)_2O$, in Eisessiglösung mit konzentrierter Schwefelsäure in der Kälte in Farbe und Spektrum zeigen, gestatteten es in der Tat, zunächst diese zwei Oxydationsstufen des Cholesterins in den Fettgebilden der Knochen und des Blutes mit Sicherheit zu eruieren.

1. Knochenfett.

Bekanntlich enthalten die Knochenfette ziemlich erhebliche Mengen Cholesterin und geben demzufolge mit Essigsäureanhydrid und Schwefelsäure die Liebermannsche Cholestolreaktion mit großer Intensität. Löst man dagegen das Fett in Eisessig und gibt zur kalt filtrierten Lösung etwas konzentrierte Schwefelsäure, so erhält man weder die Grünfärbung noch das Absorptionsspektrum des Oxycholesterins. Verseift man jedoch das Fett — namentlich das sogenannte «Benzinknochenfett» des Handels — mit alkoholischem Kali und isoliert in üblicher Weise das Unverseifbare desselben, so gibt letzteres die Essigschwefelsäurereaktion in Farbe und Absorptionsspektrum in kräftiger und charakteristischer Weise. Es empfiehlt sich, das Unverseifbare nicht mit Benzin, sondern mit Äther aus dem Verseifungsgemisch auszuziehen, den Auszug mit stark verdünntem Spiritus wiederholt und sorgfältig von Alkali, Seife usw. auszuwaschen und die Lösung durch ein Doppelfilter klar zu filtrieren. Man erhält dann mit dem Extraktückstand die genannte Reaktion mit klarer und rein

tiefgrüner Farbe, sowie ein sehr prägnantes Oxycholesterinspektrum.

Daß diese Reaktion erst nach der Verseifung des Fettes und sorgfältiger Trennung der Fettsäuren vom Unverseifbaren, in diesem aufzutreten pflegt, erklärt sich dadurch, daß die Oxycholesterine in ihren Esterverbindungen mit höheren Fettsäuren, bezw. in Gegenwart von Ölsäure, die Essigschwefelsäurereaktion nicht geben.¹⁾

Um festzustellen, daß es sich hier nicht etwa um eine zufällige Beimengung irgend eines fremden Stoffes handelt, wurde ein bereits entfetteter «Knochenschrot» aus dem Handel bezogen und mit Benzin oder Äther extrahiert. Er ergab noch 0,6% fettartiger Substanz, die in ihrem Unverseifbaren die genannte Essigschwefelsäurereaktion in recht kräftiger Weise zeigte.

Nach dieser, zu wiederholten Malen vorgenommenen Feststellung konnte es kaum mehr zweifelhaft sein, daß auch das Blut, das ja bekanntlich gleichfalls cholesterinhaltig ist, auch die Oxycholesterine enthalten müßte. Der Versuch bestätigte dies auch in eklatantester Weise.

2. Blutfett.

Frisches, noch lebenswarmes Rinderblut wurde auf dem Wasserbade gut eingetrocknet. Die bräunlich-schwarze fast steinfeste Masse wurde möglichst fein zermahlen und mit Benzin 6—8 Stunden lang extrahiert. Nach der Beseitigung des Benzins bleibt eine dunkelrotbraune, weiche, sehr dickflüssige und ziemlich klebrige Fettmasse zurück, die selbst über 100° C. zwar völlig klar durchsichtig ist, aber doch schwer beweglich und dickflüssig bleibt. Sie betrug 1,5—1,8% vom Trockenblut. Sie löst sich leicht in allen Fettlösungsmitteln, aber schwer und nur teilweise in Alkohol. Sie ist auch sonst von durchaus fettartigem Habitus und erinnert lebhaft an das sogenannte

¹⁾ Auf die mir schon lange bekannte eigenartige Beeinflussung dieser Reaktion durch die Ölsäure werde ich demnächst bei einer eingehenderen Besprechung dieses Gegenstandes zurückkommen.

«Weichfett» des Wollfettes. (Vgl. Berliner Berichte, Bd. XXXI, S. 97 ff.) Sie gibt eine sehr starke Cholestolreaktion, und auch eine kräftige Grünfärbung mit tiefem und scharfem Oxycholesterinspektrum bei der Essigschwefelsäurereaktion. Die Farbe dieser Reaktion erscheint durch starke Verunreinigungen der rohen Fettmasse trübe und mißfarbig. Filtriert man jedoch das Reaktionsgemisch klar ab und wäscht das Filterchen mit etwas Eisessig nach, so erhält man eine rein- und tiefgrüne Lösung mit tiefem und scharfem Absorptionsspektrum im Rot (Oxycholesterin). Das Spektrum des Oxycholesterinäthers (im Gelb) erscheint in der Regel hier nicht.

Die rohe Fettmasse wurde nun mit alkoholischem Kali verseift. Nach dem Erkalten des Verseifungsgemisches schied sich eine erhebliche Menge krystallinischer Substanz aus. Das Gemisch wurde jedoch, ohne es zu filtrieren, mit etwa dem gleichen Volumen Wasser vermengt, 3mal mit Äther tüchtig ausgeschüttelt und die vereinigten ätherischen Lösungen gegen Phenolphthalein mit Wasser wiederholt gewaschen. Nach dem Verdunsten des Äthers und Verjagen des Wassers mit absolutem Alkohol auf dem Wasserbade scheidet sich zunächst eine erhebliche Menge weißer glänzender Blättchen aus, die unter dem Mikroskop die bekannten Cholesterintafeln erkennen lassen, und die nach dem völligen Eintrocknen der Substanz in einer wesentlich überwiegenden Menge hellgelber fester amorpher Masse eingebettet sind.

Das Unverseifbare (Alkohole),

so gewonnen, stellt eine hellgelbe, feste, krümelige, etwas fettige Substanz dar, die bei Wasserbadwärme noch nicht schmilzt und die Eigenschaften und Löslichkeitsverhältnisse eines Gemenges von Cholesterin und dessen neutralen Oxydationsprodukten besitzt, wie ich es wiederholt bei der nur teilweise bewirkten Oxydation des Cholesterins mit Permanganatlösung erhielt. Es gibt die Cholestolreaktion mit allen ihren Farben (rot-blau-grün) und Spektralerscheinungen. Die erwähnte Essigschwefelsäurereaktion gibt es mit solcher Stärke und Farbenschönheit, wie sie nur die aus reinem

Cholesterinkünstlich hergestellten Oxycholesterine zeigen.¹⁾ Außer den Absorptionsspektren der letzteren im Rot und Gelb treten hier noch zwei Bänder im Grün und Blau des Spektrums auf, die allem Anscheine nach von einem neuen Neutralkörper herühren. Um das komplizierte Absorptionsspektrum am besten zu beobachten, verfährt man zweckmäßig folgendermaßen:

In einem schmalen Reagenzglaschen werden einige Milligramm des Unverseifbaren in ca. 3 ccm Eisessig gelöst und mit 6—8 Tropfen konzentrierter Schwefelsäure vorsichtig unterschichtet. Die untere Schicht färbt sich kirschrot, die mittlere Berührungszone tiefblau, während die obere Schicht prachtvoll hellblau mit violetter Durchsicht erscheint. Das Absorptionsspektrum dieser oberen Schicht (im Lampenlicht) zeigt dann einen feinen Streifen im Rot (etwa zwischen den Fraunhoferschen Linien C und d) und ein Band auf D (im Gelb). Diese Spektren fallen genau mit den bereits beschriebenen Spektren der beiden Oxycholesterine zusammen. Außerdem erscheint hier ein breites Band im Grün ziemlich nahe dem Blau, und ein etwas schmäleres Band im Blau, dicht an der Grenze des Grün. Das Band auf D ist wesentlich tiefer und schärfer als die letzteren zwei Bänder, die auch etwas verschwommene Ränder zeigen. Nach dem Durchschütteln des Reaktionsgemisches verläuft die Reaktion in Farben und Spektren wie bei den Oxycholesterinen (s. diese). Die Lösung bleibt lange blau, scheidet allmählich einen gelben krystallinischen Körper aus, wird dann tief und rein grün, und nimmt schließlich — je nach den Lichtverhältnissen — nach 24—48 Stunden, wie das künstliche Oxycholesterin, eine violettrote Farbe an. Das Absorptionsspektrum des Oxycholesterins ist dann verschwunden. Während die Spektren der beiden Oxycholesterine (im Rot und Gelb) den seinerzeit geschilderten Wandlungen und Veränderungen unterliegen, bleiben die erwähnten zwei Bänder im Grün und Blau während der ganzen Reaktionsdauer unverändert, und sind auch nach dem Verschwinden des letzten Oxycholesterinstreifens (aus dem Rot) noch recht deutlich zu erkennen. Bei

¹⁾ s. Diese Zeitschrift, Bd. L, S. 436 ff.

der Cholestolreaktion des obigen Unverseifbaren erscheinen diese zwei Bänder nicht. Auch bei der Essigschwefelsäurereaktion der künstlich aus Cholesterin hergestellten oder der aus dem Unverseifbaren des Wollfettes isolierten Oxycholesterine habe ich diese zwei Spektralbänder bislang nicht beobachten können.

Daß diese zwei Bänder einem von den genannten Oxycholesterinen verschiedenen Körper angehören müssen, folgt auch aus dem Umstande, daß beim Anwenden verschiedenartiger Extraktionsmittel zur Isolierung der Fettsubstanz aus dem Trockenblute unter sonst gleichen Bedingungen diese Spektralbänder stärker oder schwächer (neben dem stets gleichmäßig erscheinenden Oxycholesterinspektrum) aufzutreten pflegen: offenbar deshalb, je nachdem der fragliche Körper im betreffenden Lösungsmittel leichter oder schwerer löslich ist.

Isocholesterin war weder im Knochenfette noch im Blutfette vorhanden.

Aus dem ganzen Habitus dieses Unverseifbaren des Rinderblutfettes, aus den Löslichkeitsverhältnissen seiner einzelnen Bestandteile, namentlich aber aus der großen Intensität seiner Essigschwefelsäurereaktion geht deutlich hervor, daß hier die Oxycholesterine gegenüber dem Cholesterin in wesentlich überwiegenderer Menge vorhanden sein müssen. Der Frage nach den quantitativen Mengenverhältnissen zwischen dem Cholesterin und dessen Derivaten usw. kann erst nach Beschaffung größerer Mengen Materials näher getreten werden. Von regem Interesse dürfte auch die demnächst zu erörternde Frage sein, ob die Oxydation des Cholesterins — etwa analog der des Hämoglobins — in den Arterien bzw. in welchen sonstigen Organen vor sich geht.

Der verseifbare Teil (Fettsäuren)

des Blutfettes wurde aus dem vom Unverseifbaren mit Äther getrennten Verseifungsgemisch vorläufig wie folgt isoliert:

Die spirituöswässrige Unterlage nebst den vom ätherischen Auszug derselben getrennten alkalischen Waschwässern wurden bis zur Trocknis eingedampft und der dunkelbraune

Rückstand (Seifenmasse) mit Wasser aufgenommen. Die völlig klare Lösung wurde mit verdünnter Salzsäure angesäuert, wobei die Fettsäuren in braunen Flocken ausfielen. Der Niederschlag filtriert schnell und klar; das Filtrat ist jedoch stark braungelb gefärbt und trübt sich stark beim stärkeren Ansäuern, was wohl auf den Abgang wasserlöslicher Fettsäuren zurückzuführen ist. Der Niederschlag wurde bis zum Verschwinden der Mineralsäure ausgewaschen und an der Luft oder im Vakuum über CaCl_2 von der Hauptmenge der Feuchtigkeit befreit. Mit Äther aufgenommen, bleibt ein ziemlich beträchtlicher Teil des Niederschlages in braunen Flocken ungelöst zurück.¹⁾ Die klar filtrierte ätherische Lösung hinterläßt nach dem Verdunsten und Trocknen mit Alkohol auf dem Wasserbade ein dunkelbraunes, klares und leicht bewegliches Öl, das in der Kälte mit der Zeit zu einem braunen talgartigen und krystallinischen Fettkuchen erstarrt.

Das so erhaltene Fettsäuregemisch zeigte weder die Cholestol- noch die Essigschwefelsäurereaktion, ist unlöslich in Wasser und leicht löslich in absolutem Alkohol. Methylalkohol läßt einen Teil davon ungelöst.

Die Säurezahl dieses Gemisches beträgt nach den bisherigen Versuchen **181,44**.

Löst man diese Fettsäuremasse in Benzin, so bleibt ein kleinerer Teil als rotbrauner Rückstand zurück, der sich auch beim anhaltenden Kochen nicht löst. Nach dem Abfiltrieren, Nachwaschen und Trocknen erhält man eine rotbraune, harzartig harte und spröde Substanz, die sich zwischen den Fingern zum feinen Pulver zerreiben läßt. Mit etwas Alkohol, in dem sie ziemlich leicht löslich ist, angefeuchtet, löst sie sich klar auch in wässrigem Alkali und fällt mit Säuren wieder aus. Ihre Eigenschaften (namentlich ihre harzsäureartige Natur) erinnern lebhaft an die von Windaus durch Abbau des Cholesterins erhaltenen Cholesterin-Carbonsäuren. Da die

¹⁾ Die abfiltrierten Flocken trocknen zu einem grauen Pulver ein, das auf dem Platinblech leicht abbrennt und ziemlich viel Asche hinterläßt, welche hauptsächlich aus Kalk und einer kleinen Menge Eisenoxyd besteht.

etwaige Bestätigung dieser Vermutung für die Erkenntnis des Schicksals des Cholesterins im Blute von erheblichem Interesse sein dürfte und die relativ einfache Isolierung dieser harzsäureartigen Substanz aus dem obigen Fettsäuregemenge zum näheren Studium und zur Charakterisierung derselben ermutigt, so hoffe ich in einer der nächsten Mitteilungen näheres darüber zu berichten.

Soweit es mir das bisher zur Verfügung stehende Material gestattete, sind bei dieser Voruntersuchung auch die Mengenverhältnisse der Hauptbestandteile des Rinderblutfettes möglichst berücksichtigt worden. Die dabei gewonnenen diesbezüglichen Daten sind folgende:

5,10 g des rohen Blutfettes ergaben:	
Unverseifbares (Alkohole und etwaige sonstige Neutralstoffe)	1,70 g
Wasserunlösliches Fettsäuregemenge	1,90 »
Zusammen	3,60 g

Der fehlende Rest dürfte wohl dem Abgang der wasserlöslichen Säuren, sowie dem Abfall der obenerwähnten kalkhaltigen (ätherunlöslichen) Substanz zuzuschreiben sein.

Auf greifbare Mengen Glycerins bin ich im Laufe dieser Voruntersuchung nicht gestoßen. Ob dieser Bestandteil in dem von mir bisher verarbeiteten Fettgebilde des Rinderblutes überhaupt enthalten ist, erscheint — angesichts der im Verhältnis zu den Fettsäuren großen Menge des in Wasser unlöslichen und festen unverseifbaren Teils — sehr fraglich.

Die Untersuchungen der anderen tierischen Organe wie Hirn, Leber, Pankreas usw. auf Cholesterinoxide sind bereits im Gange und ich behalte mir vor, die Resultate in den folgenden Mitteilungen zu veröffentlichen.

Bremen, im Juli 1907.

J. Lifschütz.