

Die Oxydationsprodukte des Cholesterins in den tierischen Organen.

III. Mitteilung.

Von

J. Lifschütz.

(Der Redaktion zugegangen am 7. November 1908.)

Bevor ich zur weiteren Erörterung dieses Gegenstandes schreite, mögen einige ergänzende Versuche und erläuternde Bemerkungen zu den Mitteilungen I und II ¹⁾ hier ihren Platz finden.

Die Auffindung der Oxydationsprodukte des Cholesterins auch in den inneren tierischen Organen ²⁾ hinterläßt keinen Zweifel, daß das Cholesterin — entgegen den bisherigen Anschauungen — nicht so unangetastet und an den wechselvollen Vorgängen innerhalb der lebenden Zelle unbeteiligt durch alle Organe des tierischen Organismus seine Wanderung vollzieht, sondern daß es vielmehr berufen erscheint, eine bedeutsame aktive Rolle in der Ökonomie des tierischen Organismus zu spielen. Bedeuten die genannten Cholesterinoxide, die ich neben den Pflanzencholesterinen ³⁾ bisher nicht beobachtet habe, die Einleitung eines Verbrennungsprozesses des Cholesterins im tierischen Organismus, so erscheint es mir im Interesse der

¹⁾ Diese Zeitschrift 1907, Bd. L, S. 436 ff. und Bd. LIII, S. 140 ff.

²⁾ Über das Vorkommen dieser Verbindungen auf der Oberfläche des Schafvließes, siehe Ber. XXXI, S. 1122 ff.; Diese Zeitschrift, Bd. L, S. 439, und Monatshefte f. prakt. Derm., Bd. XLV, S. 238 und S. 391 ff.

³⁾ Auch das Phytosterin geht bei der künstlichen Oxydation (z. B. mit KMnO_4 oder Benzoylhydroperoxyd) in Oxycholesterine über, die die Essigschwefelsäurereaktionen geben.

Aufklärung und Weiterverfolgung dieses wichtigen physiologischen Vorganges, den Weg zur Ermittlung und Feststellung dieser Cholesterinderivate in den Organen, wie er sich im Laufe meiner bisherigen Untersuchungen am gangbarsten gestaltete, weiteren Kreisen bekannt zu geben.

Die relativ hohe Beständigkeit und Widerstandsfähigkeit des Cholesterins gegenüber mäßigen chemischen Einwirkungen lassen zwar die Isolierung der neben unangegriffenem Cholesterin in den tierischen Organen präformiert vorkommenden Oxycholesterine durch Verseifung der Ätherextrakte der vorsichtig getrockneten Organe mit etwa $\frac{1}{2}$ normaler alkoholischer Kalilauge und üblicher Trennung des Unverseifbaren von den Kalisalzen unbedenklich erscheinen, und eine etwaige Oxydation nicht befürchten.¹⁾ Es bleibt jedoch stets von Interesse — schon des wesentlich kürzeren Weges und der leichteren Orientierung wegen —, die in Rede stehenden Cholesterinderivate unmittelbar und auch unter tunlichster Vermeidung jeglichen chemischen Eingriffs, etwa nur mit indifferenten Lösungsmitteln aus den betreffenden Organen abzuscheiden. Diese Art der Abscheidung der genannten Verbindungen ist indessen von folgenden Umständen abhängig:

1. Von den Mengen, in welchen sie im betreffenden Organe vorkommen. Geringe Mengen davon pflegen von Rückstand des Ätherextraktes so festgehalten zu werden, daß ein negatives Bemühen, sie mit Lösungsmitteln abzuscheiden, nicht immer auch ihre völlige Abwesenheit gewährleistet.

2. Da die qualitative Ermittlung der Oxycholesterine auf der wiederholt beschriebenen charakteristischen Farben- und Spektralreaktion mit Essigschwefelsäure beruht, die Fettsäureester dieser Verbindungen aber diese Reaktion nicht geben,²⁾

¹⁾ Die von Darmstaedter und mir nachgewiesene Veränderung des Cholesterins mit alkoh. KOH geschah unter sehr energischen Reaktionsbedingungen. Dagegen ist eine merkliche Veränderung des Cholesterins nach einstündigem Kochen mit $\frac{n}{2}$ -KOH nicht wahrzunehmen. (Vgl. Berl. Berichte, Bd. XXXI, S. 1126).

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. LIII, S. 142. — Monatshefte f. prakt. Derm., Bd. XLV, 1907, S. 238.

so kann naturgemäß von einem sicheren Nachweis der Oxycholesterine vor der Verseifung des Ätherextraktes des Organs nur dann die Rede sein, wenn sie darin im freien Zustande und nicht als Ester vorkommen.

3. Bekanntlich kommen die Cholesterine und auch ihre Derivate stets als Begleiter der Fettarten in den Organen vor. Enthält aber das zu untersuchende Ätherextrakt außer den Estern auch freie Ölsäure den gesuchten Oxycholesterinen gegenüber im Überschuß, so erhält man beim Ausziehen der Alkohole aus dem Ätherextrakt nur mit Lösungsmitteln stets auch Ölsäure daneben, die das Auftreten der Oxycholesterinreaktion mit Essigschwefelsäure, vermutlich durch Esterifizierung der Alkohole mit der Ölsäure, zu verhindern pflegt.

Trotz aller dieser Schwierigkeiten ist in den meisten Fällen eine Vorprüfung der Ätherextrakte der Organe auf die Oxycholesterine mit positivem Erfolg auch vor ihrer totalen Abscheidung durch Verseifung der Extrakte sehr gut möglich. Eine solche Möglichkeit habe ich bereits in meiner zweiten Mitteilung bei der **Untersuchung des Blutes** angedeutet. Der bedeutende Gehalt des Blutextraktes an Oxycholesterinen ermöglichte hier die Ermittlung der letzteren durch die Essigschwefelsäurereaktion schon unmittelbar beim rohen Benzinextrakt. Einige Vorsicht ist freilich auch hier geboten. Bei der Ausführung der genannten Reaktion mit dem rohen Blutfettkörper entstehen nämlich in Eisessig schwerlösliche H_2SO_4 -Verbindungen der Oxycholesterine, die erst dann die Farben- und Spektralreaktion in Erscheinung treten lassen, wenn sie in Lösung gehen. Ist daher zuviel Substanz im Verhältnis zum Eisessig zur Anwendung gekommen, so erhält man einen mißfarbigen, flockigen Brei, der in diesem Zustande nichts von den schönen optischen Merkmalen dieser charakteristischen Reaktion verrät. Wie schon an der zitierten Stelle angedeutet, können jedoch Farbe und Spektrum dieser Reaktion in der Weise nachträglich hervorgerufen werden, daß man das breiige Reaktionsgemisch auf ein Filterchen wirft und den darauf zurückgebliebenen Niederschlag vorsichtig mit kleinen Mengen Eisessig nachwäscht. Der größte Teil des braunen Niederschlages löst

sich mit tiefgrüner Farbe auf und ruft gleichzeitig durch Verdünnung des mißfarbigen ersten Filtrates auch bei diesem eine tiefe, rein grüne Farbe mit dem beschriebenen scharfen Absorptionsspektrum hervor.

Wesentlich sicherer zum Ziele führend ist folgender Weg: Das rohe Blutfettgemenge wird mit absolutem Alkohol ausgekocht, nach dem Erkalten klar filtriert, und das Filtrat durch Abdampfen in einem tiefen Glasschälchen vom Alkohol befreit. Der Rückstand wird mit möglichst wenig Methylalkohol übergossen, mit einem Uhrglas bedeckt — tunlichst bis zur Lösung —, aufgeköcht und 2—3 Stunden in der Kälte sich selbst überlassen. Der dabei ausgeschiedene krystallinische Niederschlag (hauptsächlich Cholesterin) wird abfiltriert, abgesaugt, aber nicht nachgewaschen. Der gut getrocknete, hell- bis braungelbe, größtenteils amorphe Rückstand des abgedampften Filtrates gibt nunmehr die Essigschwefelsäurereaktion der Oxycholesterine mit allen ihren schönen Farben (rot, blau und grün) und prägnanten Absorptionsspektren in charakteristischster Weise.

Freilich steht die Reaktion der so erhaltenen, immerhin noch recht rohen Oxycholesterine, so charakteristisch sie auch hier auftritt, der Reaktion des durch Verseifung usw. aus dem Blutfett sorgfältig abgeschiedenen Unverseifbaren an Echtheit und Schönheit der Farben, Schärfe der Absorptionsspektren, sowie an Länge der Reaktionsdauer erheblich nach. Es ist dies offenbar eine Folge der durch Lösungsmittel allein nicht zu beseitigenden Verunreinigungen wie freie Fettsäuren, Kohlenwasserstoffe, Lecithin und dergl.

Der Ermittlung der Oxycholesterine ohne vorherige Verseifung im rohen

Knochenmark

tritt der oben unter 3. erwähnte Übelstand in den Weg. Aber auch hier ist bei der Vorprüfung auf Oxycholesterine eine Verseifung leicht zu umgehen. Um die freien Fettsäuren zu beseitigen, wird eine Probe des extrahierten Knochenfettes in Äther gelöst, gegen Phenolphthalein bei gewöhnlicher Temperatur mit verdünnter alkoholischer Kalilauge genau neutralisiert

und mit verdünntem, wässerigem Alkohol ausgeschüttelt. Die ätherische Lösung wird mit Wasser bis zur völligen Beseitigung der Seifen wiederholt gewaschen, filtriert, und nach Beseitigung des Äthers das Neutralfett auf dem Wasserbade durch wiederholtes Übergießen mit absolutem Alkohol und Trocknen auch vom Wasser völlig befreit. Das so erhaltene Gemenge der neutralen Ester und des freien Unverseifbaren (Alkohole) wird — behufs Isolierung des letzteren — genau so und mit demselben Erfolge weiter behandelt, wie oben das rohe Blutfett.

Diese Verfahrensweisen sind bei meinen diesbezüglichen zahlreichen Versuchen wiederholt zur Anwendung gelangt und zwar stets mit gleichem Erfolg.

Die Präformierung der Oxycholesterine im Blute und Knochenmark

dürfte wohl aus dem oben Gesagten mit Sicherheit hervorgehen. Da aber das Blut zunächst einer, wenn auch nur sehr vorsichtigen Trocknung¹⁾ unterworfen war, wurde, um jedem Schatten eines Einwandes, das Cholesterin des Blutes könnte sich während des Trocknens des letzteren oxydiert haben, zu begegnen, folgender Weg zur Prüfung des **frischen Blutes** auf Oxycholesterine eingeschlagen:

2 Liter des frischen defibrinierten Rinderblutes wurden mit viel Äther ausgeschüttelt. Dieser emulgierte sich so stark mit dem Blute, daß er sich erst nach langem Stehen, und auch dann nur teilweise, klar abschied. Der Ätherauszug hinterließ eine kleine Menge (1,0 g) eines hellgelben, mit Krystallen durchsetzten Öls, das sich zu Lösungsmitteln wie ein Olein verhielt und auch eine recht kräftige Oleinreaktion²⁾ zeigte. Aus dem oben angegebenen Grunde gab das Öl keine der Essigschwefelsäurereaktionen der Oxycholesterine. Das Öl wurde mit Alkohol-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. LIII, 1907, S. 142.

²⁾ Siehe Diese Zeitschrift. 1908, Bd. LVI, S. 446 f.: «Spektralreaktion auf Oleinsäure».

Äther aufgenommen, mit KOH kalt neutralisiert, mit wässerigem Alkohol und Äther ausgeschüttelt, die Ätherlösung mit Wasser 3 mal gewaschen und eingedampft. Das zurückgebliebene, neutrale Öl wurde mit Methylalkohol aufgenommen, ausgekocht und nach 2—3 Stunden vom ungelösten Ölrückstand abfiltriert. Nach Verdunsten des Methylalkohols gab der amorphe Rückstand die Essigschwefelsäurereaktion der Oxycholesterine mit allen ihren prachtvollen Farben (violettrot-blau-grün) und Spektren so intensiv, daß die Lösung erst verdünnt werden mußte, um den Verlauf der einzelnen Stadien durch das Spektroskop verfolgen zu können.

Hierdurch ist die **Präformierung** der Oxycholesterine auch im Blut außer jeden Zweifel gesetzt.

Bemerkenswert ist, daß von den in der II. Mitteilung¹⁾ beschriebenen zwei neuen Bändern (im Grün und Blau) hier nur das eine im Grün recht tief und kräftig erschien, und zwar noch bevor sich das Oxycholesterinspektrum zeigte, also in den ersten Minuten, d. h. im roten Stadium der Reaktion. Das Band überdauerte auch hier alle Spektralerscheinungen der Oxycholesterine und verstärkte sich noch wesentlich zur Zeit, wo das Oxycholesterinspektrum schon in der Abnahme war. Es scheint also, daß jene zwei fremden Bänder zwei verschiedenen Körpern angehören.

Zur Identifizierung der Oxycholesterine

der tierischen Organe eignet sich vortrefflich die künstliche Oxydation des reinen Cholesterins in Eisessiglösung vermittelt Benzoylsuperoxyd, die ich vor einiger Zeit in den Berichten der Deutschen chemischen Gesellschaft (Bd. XLI, S. 252; siehe auch weiter unten) beschrieben und zu diesem Zwecke empfohlen habe. Es sei hier darauf verwiesen.

Meine bisherigen Untersuchungen über die natürlichen Cholesterinoxydate beschränken sich vorderhand auf die Ermittlungen der ersten zwei auf einander folgenden Oxyda-

¹⁾ Siehe Diese Zeitschrift, 1907, Bd. LIII, S. 144, 145.

tionsstufen des Cholesterins in den inneren tierischen Organen, und zwar auf die Verbindungen, die ich aus den in der zitierten I. Mitteilung¹⁾ angedeuteten Gründen vorläufig — bis auf weitere analytische Belege — als Oxycholesterine: $(C_{26}H_{43}O)_2O$ (I. Oxydationsstufe) und $C_{26}H_{44}O_2$ (II. Oxydationsstufe) bezeichnet habe. Daß es tatsächlich zwei untereinander, wie auch mit ihrer Muttersubstanz (dem Cholesterin) unmittelbar zusammenhängende Körper sind, habe ich bereits in meiner I. Mitteilung bei der Besprechung ihrer künstlichen Entstehung durch direkte Oxydation des Cholesterins dargetan, indem ich nachwies, daß das Oxycholesterin II ($C_{26}H_{44}O_2$) einerseits durch **Reduktion** mit Zinkstaub leicht in die Oxyverbindung I übergeht, während sie andererseits durch weitere Oxydation die entsprechende Dicarbonsäure liefert. Hier mag noch eine weitere umgekehrte Reaktion durch **Oxydation** jene Darlegungen ergänzen:

Wie in der oben zitierten Arbeit (Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XLI, S. 252 ff.) dargetan ist, erhält man die Oxycholesterine mit Leichtigkeit beim ein- bis zweimaligen Aufkochen einer verdünnten Cholesterinlösung in Eisessig mit Benzoylsuperoxyd. Um vorzugsweise das Oxycholesterin I [$(C_{26}H_{43}O)_2O$] zu erhalten, verfährt man zweckmäßig folgendermaßen: Etwa 5 mg reinen Cholesterins werden in 3—4 ccm Eisessig gelöst. Zur abgekühlten Lösung werden ca. 5 mg des genannten Peroxyds zugesetzt und ein- bis zweimal aufgekocht. Die Lösung enthält dann der Hauptmenge nach die Oxyverbindung I und fast gar kein unverändertes Cholesterin. Setzt man dieser Lösung in der Kälte 4—5 Tropfen konzentrierter Schwefelsäure zu, so erhält die Lösung die in den ersten Mitteilungen wiederholt beschriebene tief blaue Farbe mit violettroter bis rein violetter Durchsicht im Lampenlicht nebst dem korrespondierenden breiten Absorptionsband (im Gelb und Grün des Spektrums) der Oxyverbindung I. Der Streifen C—d (im Rot) des Oxycholesterins II erscheint zunächst entweder garnicht oder nur andeutungsweise als mehr oder minder feine Linie. Farbe und Spektrum halten

¹⁾ Siehe Diese Zeitschrift, 1907, Bd. L, S. 438 ff.

sich stundenlang, bis sie durch Autooxydation in die rein grüne Farbe mit dem genannten Streifen der II. Oxydationsstufe übergehen. Setzt man nun der tief- und reinblauen oder violett-blauen kalten Lösung selbst am Anfang der Reaktion, wo die Farbe am echtsten ist, einen Tropfen Eisenchloridlösung hinzu, so verschwindet momentan die genannte Farbe, um einer auch im durchfallenden Lampenlicht rein grünen Farbe Platz zu machen. Demgemäß verschwindet auch das genannte Spektrum ebenso schnell und vollständig unter sofortigem Auftauchen des Streifens C—d (der zweiten Oxydationsstufe) in seiner vollen Tiefe und Schärfe.

Nach dieser die oben erwähnte Reaktion durch Reduktion mit Zinkstaub ergänzenden umgekehrten Reaktion durch Oxydation mit Fe_2Cl_6 unterliegt es wohl keinem Zweifel mehr, daß man es hier tatsächlich mit zwei unmittelbar aufeinander folgenden Oxydationsstufen des Cholesterins zu tun hat.

Versetzt man dann die durch Fe_2Cl_6 rein grün gewordene, gleichfalls kalte Lösung mit einem Tropfen 10%iger Chromsäurelösung in Eisessig, so verschwindet sofort die tiefgrüne Farbe und läßt nunmehr eine hellgelbe, klare Lösung entstehen, die kein Absorptionsspektrum mehr zeigt. Ob hier die in der ersten Mitteilung¹⁾ geschilderte dritte Oxydationsstufe des Cholesterins eingetreten und die dort kurz beschriebene Chollansäure entstanden ist, soll bei der weiteren Untersuchung ermittelt werden.

Diese drei Hilfsreaktionen mit Zinkstaub, Eisenchlorid und Chromsäure liefern dem physiologischen Chemiker recht wertvolle weitere Merkmale für die Essigschwefelsäurereaktion bei der Ermittlung der natürlichen Oxycholesterine bzw. bei der Identifizierung derselben mit den entsprechenden künstlich aus Cholesterin hergestellten Verbindungen. Diese Reaktionen haben sich auch im Laufe meiner diesbezüglichen Untersuchungen tatsächlich vorzüglich bewährt.

¹⁾ Diese Zeitschrift, 1907, Bd. L, S. 437.

Der leichte Übergang der ersten Oxydationsstufe des Cholesterins in die zweite

veranlaßt mich, noch folgendes zu bemerken:

Bei der Herstellung dieser Verbindung mit KMnO_4 ¹⁾ setzt sich der MnO_2 beim Stehen in der Wärme klar ab. Wird dieser mit Oxalsäure zersetzt, und die dabei entstandenen, in Eisessig unlöslichen weißen Salze mit etwas verdünnter Salzsäure zur klaren Lösung gebracht, so erhält man nach dem Verdünnen der Lösung mit dem 2—2 $\frac{1}{2}$ fachen Volumen Wasser die Oxycholesterine in der Form eines käsigen, weißen Niederschlages, der, filtriert und getrocknet, einen hell- bis braungelben amorphen und beim Reiben stark elektrisch werdenden Körper darstellt. Bei den früheren Versuchen fiel mir dabei auf, daß man durch dieses Verfahren nicht zu einer konstanten Essigschwefelsäurereaktion des Produktes gelangt. Die Mengenverhältnisse der entstandenen Oxycholesterine wechselten vielmehr selbst bei genauer Innehaltung der Oxydationsbedingungen außerordentlich. Es mußte daher angenommen werden, daß hier unter Umständen eine nachträgliche weitere Oxydation des Oxycholesterins I eintritt und zwar etwa durch den größeren oder geringeren Überschuß an Salzsäure. Diese Annahme scheint sich zu bestätigen durch die Tatsache, daß man regelmäßig das Produkt der ersten Oxydationsstufe, mindestens in weitaus überwiegender Menge, erhält, wenn man die Zusätze von Oxalsäure und Salzsäure umgeht und die fertige klare Eisessiglösung des Reaktionsproduktes durch einfaches Abfiltrieren vom MnO_2 trennt, eindampft und trocknet. Das so erhaltene braune Produkt läßt sich von Resten der Manganverbindungen mit Äther oder dergleichen unschwer reinigen.

So weit — zur Ergänzung der ersten zwei Mitteilungen über die «Verbrennungsprodukte» des Cholesterins in den tierischen Organen.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. L, S. 437.

In der nächsten Mitteilung sollen die diesbezüglichen Befunde im Hirn, in den Drüsenorganen und deren Sekreten, sowie die immer mehr an Wahrscheinlichkeit gewinnende Mutmaßung der Rolle, welche die in Rede stehenden Cholesterinstoffe einerseits als wasserfesthaltende Agentien¹⁾ in den tierischen Organen und andererseits als Muttersubstanzen zur Gallensäurebildung für die Fettresorption im Darm spielen dürften, erörtert werden.

Bremen, im Oktober 1908. .

¹⁾ Vgl. Unna und Lifschütz, «Zur Kenntnis des Wollfettes», Monatsh. f. prakt. Derm., 1907, Bd. XLV, Heft 5. — Dasselbst, Bd. XLV, S. 455. — Medizin. Klinik, 1907, Heft 42 u. 43.
