

# Der Abbau des Cholesterins in den tierischen Organen. (Studie.)

## VI. Mitteilung.<sup>1)</sup>

(Cholesterin—Gallensäuren.)

Von

J. Lifschütz, in Hamburg.

(Der Redaktion zugegangen am 8. Mai 1914.)

Mit der Auffindung des primären «Verbrennungsproduktes» des Cholesterins, des Oxycholesterins  $C_{27}H_{46}O_2$ , in den tierischen Organen und Geweben war der Weg zur Erkenntnis über das Schicksal des Cholesterins im Organismus und seiner Bedeutung für die Ernährung, wenigstens dem Anfange nach, freigelegt. In den vorhergehenden Mitteilungen dieser Folge ist die wesentlich größere Wandlungs- und Reaktionsfähigkeit des Oxycholesterins gegenüber seiner bedeutend widerstandsfähigeren Muttersubstanz (dem Cholesterin) wiederholt hervorgehoben und dargetan worden. Mit der Aufnahme eines Atoms Sauerstoff hat sich also das Cholesterin gleichsam «aktiviert» und somit für seinen ferneren chemischen Abbau erst seine Reaktionsfähigkeit erworben. Neben den sonstigen wichtigen, in den letzten Jahren am Cholesterin entdeckten Eigenschaften biologischer Natur: wie seine Schutzwirkung auf die Zelle durch seine lipoiden Eigenschaften, sein Entgiftungsvermögen usw. ist der physiologisch chemische Prozeß seines Abbaues sicherlich nicht der unwichtigste. Es mußte demnach als der Mühe wert erscheinen, den aus jener Erkenntnis sich ergebenden Gedanken nachzugehen.

Der erste Schritt auf diesem Wege zur Aufklärung und zur Beantwortung so mancher schwieriger Fragen, ja um

<sup>1)</sup> Die vorangehenden Mitteilungen: Diese Zeitschrift, Bd. 50, S. 437; Bd. 53, S. 140 (1907); Bd. 58, S. 175 (1908); Bd. 63, S. 223 (1909) und Biochem. Zeitschr., Bd. 52, S. 206 (1913).

diese überhaupt erst klar stellen zu können, war: der analytische Ausbau des Gebietes zur sicheren quantitativen Feststellung der in den Organen und Geweben vorkommenden Cholesterinstoffe und deren Abkömmlinge nebeneinander. Die diesbetreffenden umfangreichen und langwierigen Arbeiten analytischer und präparativer Natur brachten auch positive Ergebnisse, die ich bereits in drei eingehenden und möglichst erschöpfenden Abhandlungen niederlegen konnte.<sup>1)</sup> Hierbei gelang es aber nicht nur, ein brauchbares und handliches Instrument zur Ermittlung der Cholesterinstoffe nebeneinander zu schaffen, sondern auch zahlreiche wertvolle Beobachtungen, Erfahrungen und Daten zu sammeln, die eine richtige Fragestellung ermöglichten und die auch sehr wohl geeignet erscheinen, den Weg zur Lösung des Problems zu bahnen.

Zwei untereinander kausal zusammenhängende Tatsachen waren grundlegend für die Erkenntnis des Abbaues des Cholesterins in den Organen:

1. Die Auffindung der Essigschwefelsäurereaktion des Oxycholesterins, einer charakteristischen Farb- und Spektralreaktion,<sup>2)</sup> welche die Ermittlung dieses ersten Oxydationsproduktes in den Organen ermöglichte,<sup>3)</sup> und

2. die durch diese Reaktion mitherbeigeführte Möglichkeit, das Oxycholesterin künstlich durch Oxydation des reinen Cholesterins auch außerhalb des Organismus in reiner Form herzustellen<sup>4)</sup> und so — durch seine optische Identifizierung mit dem natürlichen Körper — den Beweis zu erbringen, daß es wirklich ein Oxydationsprodukt des Cholesterins ist.

Unstreitig sind Farbreaktionen, wie sie sich dem unbewaffneten Auge offenbaren, von nur recht bedingtem Wert und daher bei etwaigen Identifizierungen von Körpern mit gleichen oder ähnlichen Farbreaktionen mit großer Vorsicht

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr., I. Teil, Bd. 48, S. 373—409; II. Teil, Bd. 54, S. 212—235 (1913). Ferner Nachtrag: daselbst, Bd. 62, S. 219—244 (1914).

<sup>2)</sup> Deutsch. med. Wochenschr., 1897, Nr. 27.

<sup>3)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 53, S. 140—145 (1907).

<sup>4)</sup> Biochem. Zeitschr., Bd. 48, S. 400—404 (1913). — «Berichte», Bd. 47, S. 1453 ff. (1914).

zu gebrauchen. Ganz anders sind sie jedoch zu bewerten, wenn sie bestimmt ausgesprochene, wohl charakterisierte und markant charakterisierende Absorptionen ganz bestimmter Lichtgattungen im kontinuierlichen Spektrum hervorzubringen vermögen. Es braucht kaum erst hervorgehoben zu werden, daß es zahlreiche Substanzen gibt, die ihrem Wesen und Ursprunge nach ganz verschieden voneinander sind und dennoch gleiche oder ähnliche Farbreaktionen liefern. Es gibt aber keine Farbreaktionen, die wohl gestaltete und charakteristische Spektralbilder geben, welche nicht auf ganz bestimmte Substanzen, zum mindesten aber auf deren bestimmten Ursprung und ihre dem betreffenden Spektralbilde genau entsprechende Atomgruppierung schließen lassen. Gibt daher ein unbekannter Körper das wohlcharakterisierte Absorptionsspektrum unter denselben Bedingungen und in demselben Medium, wie ein bereits bekannter Körper, so darf mit Sicherheit angenommen werden, daß jener unbekannte Körper entweder mit diesem bekannten identisch, zum mindesten aber mit ihm gemeinsamen Ursprungs ist: mit anderen Worten: daß der unbekannte Körper zum mindesten die das gegebene Absorptionsspektrum bedingende Atomgruppierung gemeinsam mit jenem bekannten Körper besitzen muß.

In ganz besonderem Grade gilt dies für die Farbreaktionen der Cholesterinstoffe in Acetanhydridlösung mit konzentrierter Schwefelsäure, sowie für die ihr analoge, aber mit ihr nicht identische Reaktion des Oxycholesterins mit Essigschwefelsäure. Denn es sind keine Reaktionen mit nur einheitlichen Farb- und Spektralerscheinungen; vielmehr sind es ganze Reihen von Erscheinungen beiderlei Arten, die (in Farben und Spektren) parallel laufend, ihre einzelnen Glieder in bestimmter Reihenfolge einander ablösen und ineinander übergehen lassen. Dementsprechend hat man an diesen Reaktionen auch ganze Reihen von äußerst markanten und daher auch sehr wertvollen Erscheinungsformen, von denen jede einzelne als kennzeichnendes Merkmal ihrer Muttersubstanz dienen kann. Das Wertvollste, namentlich an der spektralen Erscheinungsreihe, ist, daß sie völlig unabhängig von der Sichtbarkeit der

ihr parallel laufenden Reihe der Farbenerscheinungen ist. Die Fälle sind gar nicht selten, wo bei den qualitativen Ermittlungen der Cholesterinstoffe, die ja aus den Organen und Geweben stets in komplizierten Gemischen mit anderen Substanzen erhalten werden, die eine oder die andere charakteristische Farbengattung — durch Nebenreaktionen gedeckt — gänzlich ausbleibt, ja wo mitunter das Reaktionsgemisch bis zur Unkenntlichkeit der ganzen Farbenskala mißfarbig erscheint: ein Blick durch das Spektroskop die unzweifelhafte Anwesenheit der gesuchten Stoffe enthüllt.

Die ausgezeichneten Spektralerscheinungen der Acetanhydrid-Schwefelsäurereaktion des Cholesterins wie der Essigschwefelsäurereaktion des Oxycholesterins sind es auch, auf denen ich, wie oben erwähnt, ein zuverlässiges und handliches Verfahren zur quantitativen Bestimmung der beiden Cholesterinstoffe nebeneinander aufbauen konnte. Und sie allein erscheinen in erster Reihe dazu geeignet, um mit ihrer Hilfe den weiteren Abbau des Cholesterins in den Organen zu verfolgen und aufzudecken.

### Das Cholesterin

als solches war — bei seiner Unverseifbarkeit, als ausgesprochener Alkohol mit seiner leichten Krystallisationsfähigkeit und seiner schönen Krystallform — nicht schwer auch in den kompliziertesten Fettgebilden der Organe und Gewebe noch lange vor der Entdeckung der bekannten Cholestolreaktion durch Carl Liebermann nachzuweisen und es sogar in reiner Form zu isolieren. Und nach der Entdeckung dieser Farbreaktion war sogar die Möglichkeit gegeben, nachzuweisen, daß es überhaupt keine Zelle in der organischen Natur gibt, die kein Cholesterin enthält (Hoppe-Seyler). Ein sehr bedeutender Teil aber, der bei der Isolierung dieses Alkohols aus dem unverseifbaren Anteil der tierischen Fette abfällt, blieb bis auf den heutigen Tag eine terra incognita. Offenbar ist diesem «Abfallstoff» wenig Bedeutung beigelegt worden. Unansehnlich von Farbe und Konsistenz, amorph, leicht löslich in allen Lösungsmitteln (außer

Wasser) und bei deren Verdunstung nicht die geringste Neigung zur Krystallisation zeigend, wurde er als für die chemische Untersuchung ungeeignet beiseite gestellt. Und doch will es mir scheinen, daß gerade dieser Stoff eine vielleicht noch größere Aufmerksamkeit verdient als das Cholesterin selber, dessen bescheidener Begleiter er ist. Und zwar aus dem einfachen Grunde, weil er erstens, wie weiter unten dargetan wird, ein Abbauprodukt des Cholesterins ist und daher unter Umständen berufen wäre, von der Bedeutung des letzteren für die Ernährung Zeugnis abzulegen und zweitens, weil er sehr wahrscheinlich ein brauchbares Baumaterial für weitere für die Ernährung wichtige Stoffe abgibt.

Mit der Auffindung der Essigschwefelsäurereaktion,<sup>1)</sup> die ich zuerst am unverseifbaren Teil des Wollfettes wahrgenommen hatte, die aber dem Cholesterin nicht zukommt, hat sehr bald auch ein erheblicher Teil jener problematischen Begleitsubstanzen des Cholesterins insofern eine Aufklärung gefunden, als ich nachweisen konnte, daß einer dieser Begleitstoffe ein Cholesterinderivat sein muß: da er dieselbe Essigschwefelsäurereaktion gibt, wie reines Cholesterin schon nach 4stündiger energischer Behandlung mit 6%iger alkoholischer Kalilauge.<sup>2)</sup> Seine chemische Natur, seine elementare Zusammensetzung und vollends sein quantitatives Verhältnis zum Cholesterin mußten jedoch noch lange Jahre in Dunkel gehüllt bleiben, da es, wie oben angedeutet, unmöglich war, den auf Essigschwefelsäure reagierenden Körper in individueller Reinheit abzuscheiden oder — bei seiner äußerst hohen Empfindlichkeit gegen chemische Eingriffe — ihn auch nur in Form irgend welcher charakteristischer Derivate herauszuschälen.<sup>3)</sup>

Die endgültige Aufklärung über diesen Teil der Begleitstoffe des Cholesterins brachte die oben angedeutete zweite Tatsache: die künstliche

<sup>1)</sup> Deutsch. medicin. Wochenschr., 1897. Nr. 27.

<sup>2)</sup> «Berichte», Bd. 31, S. 1126 (1898).

<sup>3)</sup> Die Schwierigkeiten, auf welche ich hierbei stieß, habe ich in der Biochem. Zeitschr., Bd. 48, S. 397—399, 1913 eingehender hervorgehoben.

## Herstellung des Oxycholesterins

aus reinem Cholesterin durch direkte Oxydation des letzteren mit Benzoylsuperoxyd. Nachdem es gelungen war, diesen Körper in vollständiger Reinheit aus dem komplizierten Oxydationsprodukt zu isolieren<sup>1)</sup> und seine Einheitlichkeit durch seine schönkrystallisierende Digitonindoppelverbindung scharf zu charakterisieren,<sup>2)</sup> konnte auch seine elementare Zusammensetzung durch zahlreiche Elementaranalysen des Körpers selbst, sowie seines Digitoninderivats als ein Oxycholesterin  $C_{27}H_{46}O_2$  festgestellt werden.<sup>3)</sup> Durch das eingehende Studium der Spektralabsorptionen der farbenreichen Essigschwefelsäurereaktion des reinen Oxycholesterins in allen ihren Entwicklungsphasen, sowie ihrer Empfindlichkeitskapazität<sup>4)</sup> wurde es möglich, durch diese Spektralerscheinungen nicht bloß einen Teil der Begleitstoffe des Cholesterins als Oxycholesterin sicher zu identifizieren, sondern sie auch durch genaue spektrometrische Messungen zur quantitativen Ermittlung des Oxycholesterins im Unverseifbaren der tierischen Fette und Wachsarten zu benutzen und somit auch zu erfahren, wie groß die Menge dieses Körpers unter den übrigen anscheinend nicht cholesterinartigen Begleitstoffen des Cholesterins ist.<sup>5)</sup> Es ergab sich dabei, daß diese «Nichtcholesterine» sehr häufig 40—50% auf Essigschwefelsäure reagierendes Oxycholesterin enthalten.

### Die «Nichtcholesterine».

Noch schwieriger als die Identifizierung des bis dahin gleichfalls zu diesem Teil des Unverseifbaren der tierischen Fette gerechneten Oxycholesterins gestaltet sich die chemische Charakterisierung der zweiten Hälfte der unverseifbaren Begleitsubstanzen des Cholesterins in den Organen. Bei der

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr., Bd. 48, S. 400—404 (1913); «Berichte», Bd. 47, S. 1453ff. (1914).

<sup>2)</sup> Bioch. Zeitschr., Bd. 62, S. 232—237 (1914); «Berichte», Bd. 47, S. 1457 (1914).

<sup>3)</sup> «Berichte» daselbst, S. 1456 u. 1458.

<sup>4)</sup> «Berichte» daselbst, S. 1455.

<sup>5)</sup> Biochem. Zeitschrift. Bd. 48, S. 384. Versuche E bis J (1913).

Untersuchung dieser Stoffe lassen uns die Cholestolreaktion sowie die Essigschwefelsäurereaktion nicht nur im Stiche, sondern wirken sogar in gewissem Sinne störend. Um in das unbekannte Wesen dieses Stoffrestes zu dringen, ist es vor allen Dingen nötig, ihn vom Cholesterin sowie vom Oxycholesterin quantitativ zu trennen. Läßt sich auch das erstere durch Ausfällen mit Digitonin fast gänzlich beseitigen, so fällt dabei das Oxycholesterin nur teilweise (etwa nur zur Hälfte) aus, und die andere Hälfte verbleibt in Lösung,<sup>1)</sup> also bei dem zu untersuchenden unbekanntem Teil des Unverseifbaren. Sucht man hier nun durch einen chemischen Eingriff zu irgend einem bekannten Derivat dieser unbekanntem Stoffe zu gelangen, so ist man im günstigsten Falle nicht sicher, ob das erlangte Resultat nicht vom Oxycholesterin herrührt.

Zum Glück gibt es im tierischen Organismus ein wichtiges ziemlich fettreiches Organ — die Leber —, das neben seinem reichlichen Cholesteringehalt nur sehr geringe Mengen Oxycholesterin enthält.<sup>2)</sup> Fällt man die alkoholische Lösung des Unverseifbaren des Leberfettes mit Digitonin aus, so fällt auch die geringe Menge des Oxycholesterins als Digitonid mit aus und das Filtrat enthält — namentlich bei einem größeren Überschuß von Digitonin — keine Spur Oxycholesterin. Bei dem reichen Gehalt des Rinderleberfettes an Unverseifbarem,<sup>3)</sup> welches letzteres etwa nur zur Hälfte aus Cholesterin besteht,<sup>4)</sup> ist hier eine gute Quelle zur Erlangung jener unbekanntem «Nichtcholesterine» gegeben. Auch die Galle würde sich als solche Quelle gut dafür eignen, da sie keine Spur Oxycholesterin enthält. Da aber selbst die gut eingedickte Rindergalle nur sehr wenig von dem in Frage kommenden Unverseifbaren enthält,<sup>5)</sup> so wurde zunächst von ihrer Benützung zu diesem Zwecke abgesehen.

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschrift, Bd. 52, S. 207; Anmerk.: Bd. 54, S. 215 und 216 (1913); ferner Bd. 62, S. 220—232 (1914).

<sup>2)</sup> Diese Zeitschr., Bd. 63, S. 227 (1909); Biochem. Zeitschr., Bd. 52, S. 209 (1913),

<sup>3)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 63, S. 227 und 228 (1909).

<sup>4)</sup> Biochem. Zeitschr., Bd. 52, S. 209 (1913).

<sup>5)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 63, S. 228 (1909).

Aber auch nach möglichst vollständiger Beseitigung der bekannten Cholesterinstoffe aus dem Unverseifbaren der tierischen Fette bietet der Rest so wenig Angriffspunkte für die Ermittlung seiner chemischen Natur, daß es zweckmäßig erschien, zunächst wie beim Oxycholesterin, so auch hier, die gesuchten Verhältnisse möglichst an Reaktionen von aus den tierischen Organen in zuverlässiger Reinheit isolierten, hier in Frage kommenden Substanzen außerhalb des tierischen Organismus zu studieren. Daß auch diese sogenannten «Nichtcholesterine» analog dem Oxycholesterin, das ja, wie gesagt, bis dahin auch dazu gerechnet war, Abkömmlinge des Cholesterins sein könnten, war zum mindesten sehr wahrscheinlich.<sup>1)</sup> •

Diese Vermutung gewinnt einen noch höheren Grad von Wahrscheinlichkeit, wenn man die Gesamtreaktionsprodukte, die bei der Herstellung des Oxycholesterins durch gelinde Einwirkung von milden Oxydationsmitteln auf reines Cholesterin entstehen, ins Auge faßt. Die Reaktionsprodukte, welche bei der vorsichtigsten Einwirkung von Benzoylsuperoxyd auf reines Cholesterin in Eisessig entstehen, enthalten regelmäßig zwei Gruppen von Substanzen; Gruppe I besteht aus unverseifbaren Neutralstoffen und Gruppe II aus Säuren. Gruppe I enthält: 1. Oxycholesterin (Hauptmenge); 2. kleinere Mengen unveränderten Cholesterins und 3. etwas größere Mengen «Nichtcholesterine». Gruppe II enthält mindestens zwei Säuren, die bis jetzt nur roh getrennt werden konnten.<sup>2)</sup> Die eine dieser Säuren zeigte häufig die Acidität (Säurezahl, Kaliverbrauch) von 105—110, während die andere Fraktion Säurezahlen von 160—165 besitzt.<sup>3)</sup> Konstant ist bei diesem Oxydationsprozeß eigentlich nur das Auftreten des Oxycholesterins in seiner ganz bestimmten Form, wenn auch die Ausbeuten an diesem Körper zwischen 35 und 55% vom angewendeten Cholesterin schwanken. Sehr variabel dagegen sind in qualitativer wie quantitativer Hinsicht die anderen Reaktionsprodukte; nament-

<sup>1)</sup> Vgl. Biochem. Zeitschr., Bd. 52, S. 207, (1913), wo ich diese Stoffe als «Polyoxydate» des Cholesterins bezeichnete.

<sup>2)</sup> Biochem. Zeitschr., Bd. 48, S. 401 ff. (1913).

<sup>3)</sup> Auf 1000 Substanz.

lich aber die der sauren Gruppe II. Die Ausbeuten an dieser Gruppe schwanken sogar zwischen 35 und 65% vom angewendeten Cholesterin. Bei den schier zahllosen Versuchen, die Reaktion durch Innehaltung möglichst derselben Bedingungen zu regeln, war es mir bis jetzt nicht möglich, den Oxydationsprozeß auf konstante Ausbeuten zu bringen bzw. bei der Gruppe II zu konstanten Erscheinungen zu gelangen.

Drei Farbreaktionen mit ihren charakteristischen Absorptionsspektren sind es, die mir zur Prüfung der jeweiligen Produkte der Gruppe II dienten: Die von der neutralen Gruppe I sorgfältig getrennte Gruppe II gibt noch die Cholestolreaktion sowie die Essigschwefelsäurereaktion, wenn auch in wesentlich schwächerem Grade als die Gruppe I. Soweit kennzeichnet sich die Gruppe II als von der alkoholartigen Gruppe I stammende Säuren. Die Gruppe II gibt aber eine dritte Reaktion, welche zwar in Farbe mit derselben Reaktion der Gruppe I übereinzustimmen scheint; weicht aber in ihrem Absorptionsspektrum sehr wesentlich davon ab. Es ist dies die Mylius- v. Udranszkysche Reaktion dieser Substanzen in alkoholischer Lösung mit Furfurol und Schwefelsäure<sup>1)</sup>. Diese Reaktion wurde als modifizierte Pettenkoffersche Reaktion für Galle von Mylius entdeckt, wird aber als solche wenig gebraucht, weil eine Reihe anderer Stoffe z. B. Cholestol, Cholesterin, Oleine usw. dieselbe Reaktion geben. Dies trifft aber, wie bei vielen anderen Reaktionen, nur hinsichtlich der Farbe zu. Die betreffenden Absorptionsspektren sind aber so total voneinander verschieden, daß sie garnicht verwechselt werden können. Vor einiger Zeit habe ich diese Erscheinungen beschrieben<sup>2)</sup> und auf die auffallende Ähnlichkeit derselben mit denen, die bei derselben Reaktion der Cholsäure aufzutreten pflegen, aufmerksam gemacht.

Sehr wahrscheinlich entstehen bei der obigen Oxydation des Cholesterins immer dieselben Säuren; aber aus noch unermittelten Ursachen — bei jeder Operation in verschiedenen Quantitäten. Diese Verschiedenheit mag der Modifikation der

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 45. — Hammarsten, Lehrb. d. physiol. Chem., 7. Aufl., S. 392 (1910).

<sup>2)</sup> Biochem. Zeitschr., Bd. 48, S. 406 (1913).

jeweiligen Spektralerscheinungen zugrunde liegen. In diesem Falle müßte man bei einer zweckentsprechenden Fraktionierung der Gruppe II zu dem einen oder dem andern Körper mit konstanten Spektralerscheinungen auch der Mylius'schen Reaktion gelangen können. Wie weiter unten dargetan wird, ist dies tatsächlich der Fall: Man gelangt dann zu einem Körper, der ein dreibänderiges Absorptionsspektrum liefert, welches in eigentümlich auffallender Weise mit demjenigen übereinstimmt, das unter den gleichen Bedingungen bei der Cholsäure hervorge-rufen werden kann.

Von geradezu entscheidender Bedeutung ist die überraschende Tatsache, daß — um eins der Endprodukte des Abbaues des Cholesterins vorweg hervorzuheben — bei der **Cholsäure** sich die **Essigschwefelsäure-Reaktion** des **Oxycholesterins** in einfacher, scharfer und markanter Weise hervorrufen läßt. Dasselbe ist auch bei der eingedickten Ochsen-galle (Fel tauri) sowie bei den «Nichtcholesterinen» des Leberfettes der Fall, (siehe weiter unten).

Betrachtet man nun die unverseifbaren Neutralkörper der Gruppe I in ihrer Gesamtheit, so hat man hier ein Analogon mit dem in den meisten Fettgebilden der tierischen Gewebe und Organe auftretenden unverseifbaren Teil; namentlich aber mit dem des Blutfettes. Wie dieser, besteht auch jene Gruppe I aus Cholesterin, Oxycholesterin und «Nichtcholesterin». Die Frage liegt nun nahe: ob der in Rede stehende künstliche Oxydationsprozeß des Cholesterins sich nicht auch nach derselben Richtung hin bewegt, wie der entsprechende natürliche Vorgang im Blute. Diese Analogie wird noch vollständiger, wenn man erwägt, daß der größte Teil des Unverseifbaren des Blutfettes, namentlich aber des Oxycholesterins und der «Nichtcholesterine» von der Leber zurückgehalten und verarbeitet wird.<sup>1)</sup> (Wahrscheinlich zu Gallensäuren, siehe weiter unten.) Daß hier die weitere Umwandlung der genannten Stoffe des Blutfettes erst in der Leber ihre Vollendung findet, während dies beim künstlichen Oxydationsprozeß in einer und derselben Operation geschieht, dürfte bei

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr., Bd. 52, S. 210 (1913).

der relativen Intensität der letzteren Reaktion begreiflich erscheinen.

Für die Annahme, daß der erste Oxydationsangriff auf das Cholesterin tatsächlich im Blute vor sich gehen muß, sprechen schon die von mir bereits vor längerer Zeit mitgeteilten Beobachtungen.<sup>1)</sup> Eine Reihe neuerer Daten sollen demnächst in einem diesem Gegenstand gewidmeten Aufsatz erörtert werden.

Spinnt sich aber somit der Faden des Abbauprozesses vom Cholesterin bis zur Gallensäurebildung ab, so geht er sicherlich durch eine Reihe von Zwischengliedern und intermediären Produkten hindurch. Es kann aber kaum zweifelhaft sein, daß diese Zwischenglieder in den in Rede stehenden Begleitsubstanzen des Cholesterins zu suchen sind. Ist nun das Oxycholesterin eins davon, so dürften auch seine Mitbegleiter,

**die «Nichtcholesterine» — Cholesterinderivate,** also gleichfalls Phasengebilde zur Gallenstoffbildung sein. In diesem Falle müßten diese Zwischenglieder noch Bruchstücke der Atomgruppierung ihrer Muttersubstanz, des Cholesterins, besitzen, denen vielleicht noch die Fähigkeit innewohnt, unter gewissen Bedingungen diejenigen Erscheinungsformen des Cholesterins, welchen jene Bruchstücke zugrunde liegen, ans Tageslicht zu fördern.

Daß dies tatsächlich der Fall ist, mögen folgende Versuche dartun:

### Versuch I.

#### Die Nichtcholesterine des Leberfettes

wurden frei von Cholesterin und Oxycholesterin folgendermaßen erhalten:

Die frische lebenswarme Hundeleber wurde nach ihrer gründlichen Entblutung gehörig zerkleinert, in einer Schale mit absolutem Alkohol übergossen, unter wiederholter Er-

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 63, S. 233 (1909); vgl. auch Biochem. Zeitschrift, Bd. 52, S. 206—213: die Differenzen zwischen dem Gehalt an Cholesterinstoffen im Pfortaderblut und dem des Lebervenenblutes.

neuerung des Alkohols bei gelinder Wärme gut eingetrocknet und mit einem Gemisch von 10 Teilen Benzin (spez. Gew. 0,720) und 1 Teil absoluten Alkohols erschöpfend extrahiert. Die nach der Beseitigung des Lösungsmittels erhaltene, leicht schmelzbare, dunkelbraune, fast schmalzartig weiche Fettmasse wurde in üblicher Weise mit halbnormaler alkoholischer Kalilauge verseift und das Saponifikat wiederholt ausgeäthert. Das gut bis zur Neutralität ausgewaschene Ätherextrakt wurde — behufs Beseitigung der von etwaigem Lecithin herrührenden basischen Substanzen — mit schwach salzsaurem Wasser ausgeschüttelt, neutral gewaschen und eingedampft. Das so isolierte Unverseifbare des Leberfettes wurde auf dem Wasserbade durch häufiges Übergießen mit absolutem Alkohol von Wasser befreit und daselbst getrocknet. Es blieb in der flachen Glasschale als hell- bis bräunlichgelbe, strahlenförmig gelagerte Krystallmasse zurück, die auf dem Wasserbade nicht schmilzt. Sie betrug 10% vom angewendeten Fette und enthielt rund 50% Cholesterin. Der geringe Oxycholesteringehalt wurde spektrometrisch zu 0,1—0,2% von diesem Unverseifbaren ermittelt.

Nach Beseitigung des Cholesterins aus diesem Unverseifbaren durch Ausfällen mit dem berechneten Digitonin in alkoholischer Lösung und Abfiltrieren des Digitonin-Cholesterids wurde das Filtrat auf etwa ein Fünftel seines Volumens eingeeengt und mit Wasser verdünnt. Es entstand eine kolloidale Lösung, die das «Nichtcholesterin» neben Digitonin, das ja in Wasser klar löslich ist, enthielt. Ersteres ließ sich indessen nicht ohne weiteres mit Äther ausziehen; vielmehr gelang dies vollständig erst nach Zusatz von etwas verdünnter Salzsäure. Das «Nichtcholesterin» ging klar mit gelber Farbe in die obere ätherische Schicht über, während das Digitonin in der farblosen unteren Schicht verblieb. Die beiden Schichten trennten sich leicht mit scharfer Trennungsfläche. Nach der Trennung der Schichten und dem Auswaschen des Ätherextraktes blieb — nach Beseitigung des Äthers und Trocknen des Rückstandes mit Alkohol — das «Nichtcholesterin» zurück. Es stellte eine bräunlichgelbe, trüb durchsichtige, amorphe, weiche

und stark fettige Masse dar. Diese reagierte in Acetanhydridlösung mit  $H_2SO_4$  nur äußerst schwach und nur spurenweise auf Cholesterin und gab mit Essigschwefelsäure keine Spur von Oxycholesterinreaktion.<sup>1)</sup> Dieses «Nichtcholesterin» wurde nun zu etwa 2% in Eisessig gelöst, in die Lösung etwa das gleiche Gewicht an Benzoylsuperoxyd eingetragen, bei gelinder Wärme darin gelöst, die Lösung dann zweimal kurz zum heftigen Sieden erhitzt und schnell abgekühlt. Eine Probe dieser Lösung färbte sich nunmehr auf Zusatz von einigen Tropfen  $H_2SO_4$  intensiv kirschrot und gab im Spektrum ein starkes Absorptionsband auf D im Gelb, begleitet von einer schwachen Linie zwischen C und d im Rot.<sup>2)</sup> Auf Zusatz von 1 Tropfen Eisenchloridlösung (5%ige in Eisessig) wurde die Lösung sofort rein und intensiv grün, das Band im Gelb des Spektrums verschwand und die Linie im Rot wurde zum breiten, tief dunkelen Streifen.

Diese nunmehrige Essigschwefelsäurereaktion des mit dem Peroxyd oxydierten «Nichtcholesterins» mit allen ihren Farben und Spektren, die ja nur den Oxydationsprodukten des Cholesterins zukommt, hinterläßt keinen Zweifel, daß wir es hier mit einem ausgesprochenen Cholesterinabkömmling zu tun haben.

Die Hauptmenge der obigen mit dem Peroxyd behandelten Eisessiglösung wurde mit Wasser verdünnt und die entstandene «Milch» unter Zusatz von etwas verdünnter Salzsäure ausgeäthert. Nach dem Waschen und Verdunsten des Extraktes wurde der hellgelbe Rückstand solange auf dem Wasserbade erhitzt, bis ein darüber ab und zu gestülptes Uhrglas keinen Benzoessäureanflug mehr zeigte. Der helle bis bräunlichgelbe Rückstand ist nunmehr fest, wachsartig zähe, nicht mehr fettig und wird bei Wasserbadwärme nur weich und fadenziehend, ohne eigentlich zu schmelzen. Er löst sich leicht in

<sup>1)</sup> Dagegen reagierte das ausgefällte Digitonin-Cholesterid deutlich auf Oxycholesterin. Die kleine Menge dieses Körpers, die das Unverseifbare enthielt, ging, wie oben schon angedeutet, als Digitonin-Oxycholesterid mit dem Cholesterid in den Niederschlag.

<sup>2)</sup> Sich selbst überlassen, pflegt diese Lösung durch Autooxydation zunächst blau und dann grün zu werden.

wenig alkoholischer Kalilauge, fällt aber beim starken Verdünnen mit Wasser nicht aus, sondern gibt dann eine häufig völlig klare, mitunter auch opalisierende Lösung. Säuren fällen aus dieser Lösung den Körper in hellgelben Flocken wieder aus. Er ist eine ausgesprochene Säure, die große Ähnlichkeit mit den oben besprochenen Säuren der durch obige Oxydation des reinen Cholesterins neben Oxycholesterin erhaltenen Gruppe II.

Das vermeintliche «Nichtcholesterin» des Leberfettes ist also sicherlich ein neues weiteres, dem Oxycholesterin zum mindesten analoges, vom Cholesterin abgebautes Glied in der Kette der Abbauprodukte des Cholesterins, die letzteres mit den Gallensäuren verbindet. Ob bezw. wieviel die daraus erhaltene obige Säure mit den vermutlich aus demselben Abbauprodukt des Cholesterins auf natürlichem Wege entstehenden Gallensäuren gemein hat, wird hoffentlich ihre laufende Untersuchung lehren. Soviel steht aber jetzt schon fest, daß zum mindesten der allergrößte Teil, ja sehr wahrscheinlich sogar der gesamte unverseifbare Begleitstoff des Cholesterins, genau so wie sein Mitbegleiter, das Oxycholesterin, vom Cholesterin abstammt und daß auch er unter den oben angedeuteten Umständen ein der chemischen Untersuchung sehr wohl zugängliches Material darstellt.

## Versuch II.

### Gallensäuren und Galle als Cholesterinderivate.

1. Die Gallensäuren geben bekanntlich keine Liebermannsche Cholestolreaktion mit Acetanhydrid und Schwefelsäure. Aber auch die eingedickte Ochsen-galle (*Fel tauri*) gibt diese Reaktion weder der bekannten grünen Farbe noch dem markanten Spektrum nach. Die Galle löst sich nur sehr schwer und nicht restlos in Acetanhydrid und gibt auf Zusatz von  $H_2SO_4$  eine mehr oder minder gelbrot gefärbte Lösung. Die Farbe verstärkt sich zwar beim Stehen, verändert sich aber dabei nicht. Diese Lösung zeigt zunächst ein breites Band im Grün des Spektrums (dicht am Blau); etwas später tritt auch eine viel schwächere, sehr verschwommene Absorption im Orange und Gelb auf. Diese Spektralabsorptionen

verändern sich auch nach längerem Stehen nicht. Die kleine Menge des in dieser Galle gefundenen Cholesterins (ca. 0,5%) scheint darin in «verschleiertem», für die Cholestolreaktion unzugänglichem Zustande enthalten zu sein.

2. Besser und vollständiger als in Acetanhydrid löst sich die Galle in Eisessig unter Zurücklassung einer kleinen Menge dunkelflockiger Substanz. Die hiervon abfiltrierte Lösung ist von grünlicher Farbe und zeigt im Spektrum ziemlich schwache, aber bestimmte Absorptionen im Orange und Grün des Spektrums. (Gallenfarbstoffe?) Auf Zusatz von einigen Tropfen  $H_2SO_4$  wird die Lösung bräunlichgelb und die schwachen Spektralabsorptionen ändern etwas ihre Lage und Gestalt, schwächen sich aber in kurzer Zeit noch mehr. Die gelbe Farbe ändert sich auch beim Stehen nicht. Von der sehr charakteristischen Essigschwefelsäurereaktion des Oxycholesterins ist also hier weder in Farbe noch im Spektrum irgend etwas zu merken.

Versetzt man die Lösung der reinen Cholsäure in Eisessig mit einigen Tropfen  $H_2SO_4$ , so bleibt die Lösung ebenso farblos wie vor dem Schwefelsäurezusatz.

3. Versetzt man 2—3 ccm der Eisessiglösung der Galle in einem Reagenzglas bei gelinder Wärme mit etwa dem gleichen bis doppelten Gewichtsteil vom Gallengehalt der Lösung mit Benzoylsuperoxyd, so tritt eine schwache Gasentwicklung ein. Ist das Peroxyd gelöst und die Gasentwicklung vorüber, so wird die Lösung ein- bis zweimal kurz, aber heftig aufgekocht und schnell abgekühlt. Die grünliche Farbe der Lösung sowie ihre oben erwähnten Spektralabsorptionen sind jetzt verschwunden. Läßt man nun in die hellgelb gewordene Lösung 8—10 Tropfen konzentrierte  $H_2SO_4$  fallen, so färbt sich diese am Boden des Gläschens kirsch- bis violettrot, überschichtet von einem blauen oder blaugrünen Ring, während die oberste Schicht sich nach und nach schön grün färbt. Durchschüttelt man das Gemisch, so färbt es sich nach und nach entweder blau mit violetter Durchsicht im Lampenlicht, oder es wird sofort grün: je nachdem eine kleinere oder größere Menge des Peroxyds für die obige Oxydation der Gallenlösung ver-

wendet wurde. Beim Stehen färbt sich die Lösung, auch wenn sie zunächst blau ist, allmählich rein grün. Setzt man zum Reaktionsgemisch 2 Tropfen 5%iger Eisenchloridlösung (in Eisessig), auch wenn es noch blau gefärbt ist, so wird es momentan tief und rein grün. Dem Farbenwechsel entspricht ein bänderreiches, entsprechend wechselndes Absorptionsspektrum.<sup>1)</sup>

Genau dieselbe Reaktion habe ich vor einigen Jahren als «eine Farbreaktion auf Cholesterin durch Oxydation», d. h.: durch Überführung des Cholesterins in Oxycholesterin, veröffentlicht.<sup>2)</sup> Cholesterin für sich, d. h. ohne es vorher zu oxydieren, gibt in Eisessiglösung mit  $H_2SO_4$  diese Reaktion nicht.

Führt man diese Oxydation, anstatt mit Galle, mit der daraus gewonnenen reinen Cholsäure aus, so gibt die oxydierte Lösung auf Zusatz von  $H_2SO_4$  genau dieselben Farben und Spektralerscheinungen,<sup>3)</sup> wie die oxydierte Cholesterinlösung, oder die oxydierte Gallenlösung oder auch die reine Oxycholesterinlösung in reinem Eisessig.

Diese farbenprächtige und farbenreiche Oxycholesterinreaktion mit ihren prägnant-charakteristischen Spektralabsorptionen, die, wie oben gezeigt, in so bestimmter und nie versagender Weise sich auch beim **Cholesterin**, dem «Nichtcholesterin» des Leberfettes, bei der Cholsäure und selbst bei der rohen **Ochsengalle** mit Leichtigkeit hervorrufen läßt, kann über den Abbau des Cholesterins in den tierischen Organen bis zur Cholsäure kaum noch einen Zweifel hinterlassen.

### Versuch III.

Bei der ersten «Ausätherung» des «verseiften» Oxydationsproduktes des reinen Cholesterins geht ein Teil der Kalisalze

<sup>1)</sup> Die ausführliche Schilderung dieser Farben- und Spektralerscheinungen: siehe diese Zeitschrift, Bd. 50, S. 437; Bd. 53, S. 144 und 145 (1907); Biochem. Zeitschr., Bd. 48, S. 376—378; daselbst, Bd. 54, S. 219 bis 221 (1913); «Berichte», Bd. 38, S. 1123 (1898).

<sup>2)</sup> Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. 41, S. 252 ff. (1908).

<sup>3)</sup> Vgl. «Berichte», Bd. 47, S. 1459 (1914).

der oben erwähnten sauren Gruppe II in die Ätherschicht über, die getrennt von den weiteren Ätherextraktionen und von den anderen Salzen der Unterlage für sich behandelt wird. Aus den Salzen dieses Teils wird die betreffende Säure in üblicher Weise isoliert.<sup>1)</sup>

1. Eine etwa 2%ige Weingeistlösung dieser «Cholesterinsäure» wurde mit einer 1/2- bis 1%igen Digitoninlösung in 90%igem Spiritus in der Wärme vermischt, 1 bis 2 Tage sich selbst überlassen und nur ab und zu mit dem Glasstab umgerührt. Es schied sich nach und nach eine größere Menge weißer krystallinischer Substanz aus, die zum größten Teil aus Digitonin besteht, neben einer kleinen Menge eines Körpers, der anscheinend eine Digitoninverbindung jener Säure ist. Der Niederschlag wurde filtriert, mit Alkohol gewaschen, abgesaugt und im Exsikkator getrocknet.

Löst man eine genügende Menge dieser Substanz in absolutem Alkohol, versetzt 1 ccm der Lösung mit 1 Tropfen alkoholischer, 1%iger Furfurollösung und vermischt das Ganze unter Kühlung des Reagenzglases mit 1 ccm konzentrierter  $H_2SO_4$ , so färbt sich das Gemisch zunächst rötlich-gelb und wird beim längeren Stehen mit der Zeit — je nach dem Substanzgehalt — intensiv gelblich- bis schön kirschrot. Das Gemisch zeigt 3 Spektralabsorptionen und zwar: 1. einen schwachen Streifen im Gelb, der verschwimmend bis ins Orange des Spektrums hinübergreift; 2. ein ziemlich breites und dunkles Band in der Mitte des Grüns (ein wenig näher dem Gelb) und 3. ein noch breiteres und noch dunkleres Band zwischen Grün und Blau (etwas mehr ins Grün hinübergreifend). Das ganze Violett bis etwa zur Hälfte des Blaus ist mit fast scharfem Rand ganz ausgelöscht. Farbe wie Spektra halten sich wochenlang und unterscheiden sich sehr wesentlich von denen der freien Säure. [Vgl. Biochem. Zeitschr., Bd. 48, S. 406 (1913).]

Blinde Versuche mit Furfurol resp. mit Digitonin für sich fielen hinsichtlich dieser Reaktion negativ aus.

<sup>1)</sup> Näher geschildert ist dieses Verfahren: Biochem. Zeitschr., Bd. 48, S. 401 ff. (1913).

2. Derselbe Versuch wie unter 1. mit reiner, von E. Merck in Darmstadt wiederholt bezogener «Acid. cholalicum», ergab auch dasselbe Resultat wie die obige «Cholesterinsäure». Auch hier waren Farbe und Spektren grundverschieden von denen der freien Cholsäure und fielen mit denen der genannten «Cholesterinsäure»-Furfurolreaktion vollständig zusammen. Etwaige Neben-Substanzen oder Verunreinigungen der schön krystallisierten Cholsäure dürften wohl hier nicht in Betracht kommen. Außerdem habe ich diese Versuche mit wiederholt und zu verschiedenen Zeiten von der bekannten Firma bezogenen Präparaten ausgeführt und zwar stets mit demselben Erfolg.

Ob die beiden Substanzen dieser zwei Versuche miteinander identisch sind und somit die obige Gruppe II eine aus reinem Cholesterin bei dessen Oxydation wirklich entstandene Cholsäure enthält, wird hoffentlich die weitere Untersuchung dartun. Daß aber hier zum mindesten wesensverwandte Substanzen gemeinsamen Ursprungs vorliegen, kann kaum bezweifelt werden. Ist aber dem so, so legt auch dieser Versuch III beredtes Zeugnis ab von dem Abbau des Cholesterins in den tierischen Organen bis zu den Gallensäuren.

---

Aus dem obigen Versuch II ergibt sich die Frage, ob die dort geschilderte, so charakteristische und mit großer Leichtigkeit und Sicherheit hervorzurufende Reaktion auf Galle und Gallensäuren durch Oxydation derselben mit Benzoyl-superoxyd sich nicht auch als Probe zur Ermittlung von Galle und Gallensäuren in den tierischen Flüssigkeiten eignen dürfte. Auch diese Frage ist in das Bereich dieser Untersuchungen gezogen worden, und ich hoffe, sie demnächst in einem Nachtrag zu dieser Arbeit zu beantworten.

### Schlusssätze:

1. Welches die sonstigen Funktionen des Cholesterins in den tierischen Organen auch sein mögen; sein Schicksal ist — sein Abbau zu Produkten, die bei der Ernährung des Organismus, namentlich beim Fettstoffwechsel und der Fettresorption, ihre Verwertung finden.

2. **Das Cholesterin**,  $C_{27}H_{46}O$ , nimmt zunächst auf seiner Wanderung durch die tierischen Organe und Gewebe — höchstwahrscheinlich in der Blutbahn — 1 Atom Sauerstoff auf und verwandelt sich so in ein wesentlich reaktionsfähigeres, dem weiteren Abbau zugänglicheres Produkt: in das Oxycholesterin. Dieses ist demnach gleichsam ein «aktiviertes Cholesterin».

3. **Das Oxycholesterin**,  $C_{27}H_{46}O_2$ , kennzeichnet sich durch seine spezifische Farb- und Spektralreaktion in Eisessiglösung mit konzentrierter Schwefelsäure, schlechthin die «Essigschwefelsäure-Reaktion» genannt. Durch diese sehr empfindliche Reaktion<sup>1)</sup> läßt sich das Oxycholesterin in fast allen tierischen Organen und Geweben neben dem Cholesterin leicht qualitativ nachweisen und durch genaue Messungen seiner Spektralabsorption mit der des reinen Oxycholesterins auch quantitativ bestimmen.<sup>2)</sup>

4. Die stärksten und farbenschnösten Essigschwefelsäurereaktionen und daher auch die relativ größten Mengen Oxycholesterins findet man im unverseifbaren Anteil des Blutfettes. In den anderen Organen und Geweben nimmt die Reaktion allmählich ab, bis sie beispielsweise in der Leber fast ganz erlischt.<sup>3)</sup> Das Unverseifbare des Leberfettes besteht jedoch noch zur Hälfte aus Cholesterin und zur anderen Hälfte aus bis jetzt noch nicht näher gekennzeichneten Begleitstoffen des Cholesterins, den sogenannten «Nichtcholesterinen», die weder die Liebermannsche Cholestolreaktion auf Cholesterin noch die Oxycholesterinreaktion mit Essigschwefelsäure geben.<sup>4)</sup>

5. Die «Nichtcholesterine» sind jedoch nachweislich Cholesterinabkömmlinge,<sup>5)</sup> da auch bei ihnen sich die Essigschwefelsäurereaktion des Oxycholesterins (durch Oxydation)

<sup>1)</sup> Ihre spektrale Empfindlichkeit ist etwa viermal größer als die der bekannten Cholestolreaktion des Cholesterins («Bericht», Bd. 47, S. 1455 (1914).

<sup>2)</sup> Biochem. Zeitschr., Bd. 48, S. 375 ff. (1913).

<sup>3)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 63, S. 229 und 233 (1909).

<sup>4)</sup> Biochem. Zeitschr., Bd. 52, S. 209 (1913).

<sup>5)</sup> Aller Wahrscheinlichkeit nach weitere Abbauprodukte des Oxycholesterins.

hervorrufen läßt (s. oben Vers. I, S. 321) und dienen sicherlich als Baumaterial für die N-freien Komponenten der Gallensäurepaarlinge. Denn auch

**6. die Gallensäure und die Galle** selbst geben (nach ihrer Oxydation) die Essigschwefelsäurereaktion des Oxycholesterins mit allen ihren charakteristischen Farben und Spektralerscheinungen. Hieraus darf wohl geschlossen werden, daß zum mindesten die Gallensäuren vom Cholesterin abstammen. Die Liebermannsche Cholestolreaktion geben die oxydierten Eisessiglösungen der Cholsäure und der Galle nach ihrem Vermischen mit Acetanhydrid und etwas  $H_2SO_4$  nicht, während dies beim reinen Oxycholesterin — auch nach seinem Aufkochen mit Benzoylsuperoxyd in Eisessig — durchaus der Fall ist. Daraus dürfte vielleicht folgen, daß jene ersteren Substanzen nicht direkt aus dem Cholesterin selbst, sondern erst aus den weiteren Abbauprodukten des Oxycholesterins in der Leber entstehen.

Hamburg im April 1914.

---