

Die Oxydation des Cholesterins durch das Blutgewebe.

VIII. Mitteilung. ¹⁾

Von

J. Lifschütz in Hamburg.

(Der Redaktion zugegangen am 26. Oktober 1914.)

Die Anschauung, daß der erste oxydative Angriff auf das Cholesterin in der Blutbahn vor sich gehen müsse, dürfte sich jedem, der sich mit den Oxydationsprodukten dieses lipoiden Körpers der tierischen Organe und Gewebe beschäftigt, von selbst aufdrängen. Ich habe diese Anschauung seit einer Reihe von Jahren vertreten und wiederholt auf diejenigen Momente aufmerksam gemacht, die mich zu dieser Annahme veranlaßten. Indessen mußte dies bis jetzt eine mehr intuitive als adäquate Erkenntnis bleiben, die nur auf Schätzungen beruhen konnte. Daß die experimentelle Begründung dieser Annahme am sichersten durch das Studium des Verhaltens des reinen Cholesterins zum Blutgewebe gegeben wäre, war von vornherein einleuchtend. Allein ebenso einleuchtend sind die Schwierigkeiten und die geringen Angriffspunkte, welche ein in seinem chemischen und physikalischen Verhalten so außerordentlich labiles Gewebe, wie das Blut es ist, dem Untersucher bietet. Es kommt noch hinzu, daß das Blut stets — neben Cholesterin — bedeutende Mengen von Oxydationsprodukten desselben präformiert enthält, und zwar in so mannigfach wechselnden und schwankenden Verhältnissen, daß die Erzielung sicherer Daten durch den Tierversuch (etwa durch Verfütterung oder durch inter-

¹⁾ Vorangehende Mitteilungen: Diese Zeitschrift, Bd. 50, 53 (1907); Bd. 58 (1908); Bd. 63 (1909); Bd. 91, 92 (1914). Biochem. Zeitschrift, Bd. 52 (1913).

venöse Injektion von reinem Cholesterin) aussichtslos erscheint. Ebenso gering sind die Aussichten auf Erfolg beim Experimentieren mit frisch entnommenem Blute als solchem außerhalb des tierischen Organismus.

Die Tatsache, daß das Cholesterin unter gewissen bereits bekannten Bedingungen¹⁾ sich durch Oxydation auch außerhalb des Organismus künstlich in ein Produkt verwandeln läßt, das mit dem Oxycholesterin ($C_{27}H_{46}O_2$) der tierischen Organe identisch ist, ließ indessen vermuten, daß es sich auch in den Organen und Geweben bei der Oxydation des Cholesterins — wenigstens bis zu dieser Oxydationsstufe — um einen rein chemischen Vorgang handeln müßte. Unter diesem Gesichtspunkte schien es freilich nicht ausgeschlossen, daß auch den vorsichtig eingetrockneten und von den Lipoidstoffen mit indifferenten Mitteln befreiten tierischen Zellen das rein chemische Vermögen noch innewohnen könnte, das Cholesterin im Sinne einer Oxydation zu affizieren. Enthält doch zum Beispiel das Blutgewebe einen Körper, das Oxyhämoglobin, der, hinsichtlich der Leichtigkeit Sauerstoff abzugeben, die künstlichen Peroxyde, mit denen sich das Cholesterin am leichtesten im Oxycholesterin überführen läßt, weit übertrifft. Dieser naheliegende Gedanke bestätigte sich auch in unzweideutiger Weise schon bei den ersten qualitativen Versuchen mit eingetrocknetem, lipoidfreien menschlichen Blut und verdünnten Lösungen von reinem Cholesterin in Eisessig.

Nach dieser Beobachtung verlohnte es sich daher, die Erscheinung auch quantitativ weiter zu verfolgen.

Durch eine noch nicht abgeschlossene Versuchsreihe über den Oxycholesteringehalt des menschlichen Blutes gelangte ich in den Besitz einer größeren Menge des lipoidfreien Trockenblutes, das mir zu den nachstehenden Versuchen diente.

Das durch Venenpunktion einem Manne entnommene Blut wurde frisch in feinem Strahl in das vielfache Volumen absoluten Alkohols unter Umrühren eingetragen. Das dabei entstandene, fein granuliert Coagulum mit samt dem Alkohol wurde

¹⁾ Biochem. Zeitschr., Bd. 48, S. 400 (1913) ff. und «Berichte», Bd. 47, S. 1453 (1914).

quantitativ in eine geräumige Porzellanschale gespült und auf dem Wasserbade bei 50 bis 60° C. eingetrocknet, was bei kleineren Blutmengen in recht kurzer Zeit geschieht. Das hierauf staubfein gemahlene Trockenblut wurde mit Benzin-Alkohol (9 : 1) erschöpfend extrahiert und das Extrakt zur Untersuchung des Blutfettes, seiner Bestandteile usw. verwendet. Durch Nachextraktionen konnte ich mich von der Cholesterinfreiheit des zurückgebliebenen Trockenblutes leicht überzeugen. Letzteres hat sich — außer dem Lipoidverlust — durch die indifferente Extraktion in keiner Weise verändert: Es hatte seine schöne rotbraune Farbe beibehalten und gab die Blutfarbstoff-Reaktionen wie vor seiner Entfettung.

Das für diese Versuche verwendete reine Cholesterin — von der bekannten Firma C. A. F. Kahlbaum bezogen — war völlig frei von Oxycholesterin.

I.

Einwirkung von Blut auf Cholesterin.

0,8 g des lipoidfreien Trockenblutes wurde im geräumigen Erlemeyerkölbchen mit 20 ccm einer 1 %igen Cholesterinlösung in Eisessig übergossen und — unter losem Glasverschluß — auf dem Wasserbade bei 60 bis 65° C. einige Tage digeriert. Die Höhe des Kölbchens war so gewählt, daß während des Erwärmens die oberen Partien desselben völlig kalt blieben, so daß nennenswerte Verluste an Lösungsmittel nicht entstehen konnten. Von Tag zu Tag wurde dem Gemische unter Umrühren kleine Proben entnommen und folgendermaßen auf Cholesterin quantitativ untersucht.¹⁾

Die jeweilige 0,5 bis 0,8 ccm betragende Probe wurde unter Zusatz von einigen Tropfen absoluten Alkohols mit 10 bis 12 ccm Äther durchgeschüttelt, durch ein Doppelfilter filtriert und die Festsubstanz auf dem Filter mit Äther gut ausgewaschen. Das klare ätherische Filtrat ist von Blutfarb-

¹⁾ Bei Entnahme der Proben wurde darauf geachtet, daß das Verhältnis der festen Stoffe zu den im Eisessig gelösten, dem Verhältnis dieser Stoffe in der Hauptmenge des Gemisches möglichst nahe kam.

stoffen mehr oder minder schwach rosa gefärbt und zeigt auch deutlich das bekannte Absorptionsspektrum des Hämatins.¹⁾ Da namentlich letzteres bei der Beobachtung des Oxycholesterinspektrums störend wirkt, so wurden die Farbstoffe von den Cholesterinstoffen folgendermaßen getrennt: Die ätherische Lösung wurde unter Zusatz von Phenolphthaleinlösung mit verdünnter wässriger Kalilauge bis zur Rotfärbung versetzt und tüchtig durchgeschüttelt. Die Farbstoffe und ihre Oxydationsprodukte gehen dabei in die alkalisch-wässrige Unterschicht, während die farblose ätherische Oberschicht die Cholesterinstoffe enthält. Sie wurde mit Wasser unter Zusatz von kleinen Mengen Alkohol gut ausgewaschen, im Glasschälchen eingedampft und der Rückstand von Wasserresten durch wiederholtes Befeuchten mit absolutem Alkohol und Eintrocknen auf dem Wasserbade befreit.

Da dieser Ätherrückstand nur wenige Milligramme betrug, so konnte er leicht mit sehr kleinen Mengen Chloroform, die zusammen etwa 1 ccm betragen, aufgenommen resp. nach und nach aus dem Schälchen in ein in 0,1 ccm graduiertes Reagenzglas gespült werden. Überstieg dann diese Lösung 1 ccm, so wurde der Überschuß weggekocht und der Rest — nötigenfalls — auf 1 ccm mit Chloroform aufgefüllt. Wurden nun hierzu 2 ccm Essigschwefelsäure²⁾ zugesetzt und das Gemisch vorsichtig durchgeschüttelt, so entstand nach und nach — je nach dem Oxycholesteringehalt des klaren und homogenen Gemisches — eine mehr oder minder intensiv blau bis blaugrün gefärbte Lösung, die nach 10 Minuten mit 1 Tropfen 2%iger Eisenchloridlösung (in eisessig) versetzt wurde. Das Gemisch wurde dann echt grün und zeigte das charakteristische

¹⁾ Das Spektrum besteht der Hauptsache nach aus einem fast scharf begrenzten tief dunklen Streifen im Rot (etwa auf der Sonnenlinie d) und zwei Bändern mit verschwommenen Rändern im Grün. Mit dem Fortschreiten der Oxydation verliert die Lösung Farbe und Spektrum und wird gelb, während die festen Stoffe grau werden: offenbar Merkmale der allmählichen Zerstörung der Blutfarbstoffe.

²⁾ Dieses **Reagens** besteht aus einem Gemisch von 1 Vol. konz. Schwefelsäure und 10 Vol. Eisessig.

Absorptionsspektrum des Oxycholesterins¹⁾, das in wiederholt beschriebener Weise gegen ein gleiches Reaktionsgemisch mit bekanntem Gehalt an reinem Oxycholesterin²⁾ quantitativ spektrometrisch gemessen werden konnte³⁾. Da der Cholesteringehalt des Blut-Cholesteringemisches, wie oben angegeben, in den in bestimmten Mengen entnommenen Proben gleichfalls bekannt war, so konnte durch diese Spektralanalyse das aus dem Cholesterin neu entstandene und in dem genannten Ätherextrakt neben seiner Muttersubstanz befindliche Oxycholesterin leicht ermittelt werden.

Das Blut-Cholesterin-Gemisch wurde im ganzen acht Tage auf dem Wasserbade bei 60 bis 65° C. digeriert. Eine nach zwei Tagen entnommene Probe deutete bereits auf einen erheblichen Oxycholesteringehalt hin. Die quantitativ bearbeiteten Proben ergaben folgende eigentümliche Zahlenreihe der durch das Trockenblut herbeigeführten Oxydation des Cholesterins:

Die Cholesterinstoffe der Probe 1	enthielten	16,4%	Oxycholesterin
»	»	2	» 18,7%
»	»	3	» 49,7%
»	»	4	» 34,1%
»	»	5	» 28,5%

¹⁾ Ein in passender Verdünnung fast scharf begrenzter Streifen im Rot zwischen den Sonnenlinien C und d.

²⁾ Die Herstellung und Reinigung dieses Körpers siehe «Berichte», Bd. 47, S. 1453 (1914) und Biochem. Zeitschrift, Bd. 48, S. 400 (1913).

³⁾ Die technische Ausführung dieser Spektralanalyse ist in der Biochem. Zeitschrift, Bd. 48, S. 375—382 (1913); Bd. 54, S. 231 (1913); Bd. 62, S. 223 u. 234 (1914); ferner «Berichte», Bd. 47, S. 1458 (1914) ausführlich beschrieben worden. Der Kürze wegen sei hier auf diese Arbeiten verwiesen. (Siehe auch weiter unten S. 221.)

⁴⁾ Der von der Probe 3 an fallende Oxycholesteringehalt deutete von vornherein auf eine weitere Oxydation desselben hin, deren Produkte die farbige Essigschwefelsäurereaktion nicht mehr geben und infolgedessen bei den betreffenden Spektralanalysen nicht zum Ausdruck gelangen konnten. Ein erheblicher Teil dieser Produkte ist, wie ein Parallelversuch mit einer Lösung von reinem Oxycholesterin in Eisessig bei 60° C. lehrte, der Einwirkung der Essigsäure auf das Oxycholesterin zuzuschreiben. (Vgl. Biochem. Zeitschr., Bd. 62, S. 239 u. 240 (1914).)

Die letztere Zahl dieser Reihe ist das Endresultat der Untersuchung der Gesamtcholesterinstoffe nach der Unterbrechung der Operation. Die Cholesterinstoffe wurden aus dem Reaktionsgemisch in folgender Weise abgeschieden:

Das Gemisch wurde mit etwas absolutem Alkohol versetzt, mit dem sechs- bis achtfachen Volumen Äther gefällt, durch ein Doppelfilter klar filtriert und die Festschubstanz auf dem Filter mit Äther gut ausgewaschen. Die rötlich dunkelbraune Lösung wurde eingedampft und der schwarzbraune Rückstand durch wiederholtes Lösen in absolutem Alkohol und Eintrocknen auf dem Wasserbade von Wasser, namentlich aber von Essigsäure, völlig befreit. Der trockne Rückstand wurde dann mit Äther ausgezogen, der nunmehr (in Abwesenheit von Eisessig) nur einen kleineren Teil der Substanz aufnimmt und den größeren Teil als dunkelbraune, harzige und hygroskopische Masse ungelöst zurückläßt. Der trübe Ätherauszug wurde durch ein Doppelfilter filtriert und das Filter gut ausgewaschen. Das nunmehr nur wenig gefärbte, klare Filtrat wurde in einem Scheidetrichter mit verdünnter wässriger Kalilauge schwach alkalisch gemacht (um etwaige Cholesterinsäuren zu entfernen), durchgeschüttelt und nach der Klärung und Trennung von der Unterlage mit alkoholhaltigem Wasser gut ausgewaschen. Die klare, schwach gelbliche ätherische Lösung — in einer gewogenen Glasschale vom Äther befreit und mit Alkohol auf dem Wasserbade gut getrocknet — hinterließ als Rückstand die neutralen Cholesterinstoffe in nur wenig gelblich gefärbten, feinen, langen, häufig in großen Sternen gelagerten und auf dem heißen Wasserbade unschmelzbaren Nadeln.

Der Rückstand betrug 0,1755 g (aus 0,2 g reinen Cholesterins) und ergab — in Chloroformessigschwefelsäurelösung spektrometrisch gemessen¹⁾ — wie oben angegeben: 28,5% Oxycholesterin.

Die ausgeätherte, alkalisch-wässrige Unterlage wurde bis zur Trocknis eingedampft und mit Wasser aufgenommen. Die Lösung war völlig klar; trübte sich aber auf Zusatz von

¹⁾ Die Ausführung der Spektralanalyse, siehe weiter unten S. 221.

Salzsäure: sie enthielt also tatsächlich eine kleine Menge einer Säure. Letztere wurde mit Äther ausgezogen und betrug 0,0023 g = 1,15% vom angewendeten Cholesterin. In alkoholischer Lösung gab diese Säure eine starke Furfurolschwefelsäurereaktion, die mit derselben Reaktion der bei der Oxydation des Cholesterins mit Benzoylsuperoxyd entstehenden «Cholesterinsäuren» in Farbe und Absorptionsspektrum identifiziert werden konnte.¹⁾

Daß die so isolierten Cholesterinstoffe nicht etwa noch fremde Extraktivstoffe aus dem Blute enthalten, dürfte — abgesehen von ihrer N-Freiheit — wohl auch aus folgender Zusammenstellung der Ausbeute an wiedergewonnenen Substanzen folgen:

Für Proben wurden verwendet	0,0245 g,	
Isolirt neutrale Cholesterinstoffe	0,1755 »	
«Cholesterinsäuren»	0,0023 »	
zusammen	0,2023 g	
In Arbeit wurden genommen	0,2000 »	Cholesterin
Überschuß	0,0023 g.	

Der Überschuß dürfte — insofern er nicht auf analytische Fehlerquellen zurückzuführen wäre — von der Sauerstoffaufnahme bei der Oxydation des Cholesterins herrühren.

Das Sinken des Oxycholesteringehaltes

des Blutcholesteringemisches in der zweiten Hälfte der Operation ist, wie oben angedeutet, aufzufassen als eine Folge der fortschreitenden Oxydation des Cholesterins (über das Oxycholesterin hinaus) zu Produkten, welche die Farbreaktionen des Oxycholesterins mit Essigchwefelsäure usw. nicht mehr geben und daher in den obigen spektralanalytischen Zahlen nicht zum Ausdruck gelangen können. Dem etwaigen Einwand: es könnte sich hier um eine rücklaufende Reaktion handeln, wo das Oxycholesterin sich wieder zu Cholesterin reduzierte, läßt sich leicht durch die quantitative Bestimmung

¹⁾ Vergl. Biochem. Zeitschr., Bd. 48, S. 406 (1913) und Diese Zeitschr. Bd. 91, S. 317 (1914).

des Cholesteringehaltes des Endproduktes begegnen. Denn: wäre ein so bedeutender Teil des Oxycholesteringehaltes der Probe 3 gegenüber dem des Endproduktes ($49,7 - 28,5 = 21,2\%$) wirklich zu Cholesterin reduziert worden, so müßte das nach der Unterbrechung der Operation isolierte Endprodukt — abzüglich seines Oxycholesteringehaltes ($28,5\%$) — mindestens $71,5\%$ reinen Cholesterins enthalten. Daß aber dies nicht der Fall ist, mögen die nachstehenden Cholesterinbestimmungen dartun.

Da es sich hier um Bestimmungen zweier Cholesterinstoffe nebeneinander handelt, so mögen wohl hier einige erläuternde Vorbemerkungen zur Durchführung der betreffenden Verfahrensweisen am Platze sein:

Wie wiederholt an der Hand von zahlreichen Versuchen und Beispielen dargetan wurde, läßt sich das Cholesterin als solches in Gegenwart von Oxycholesterin gewichtsanalytisch durch Fällung mit Digitonin aus alkoholischer Lösung nicht bestimmen: weil hierbei ein großer Teil des Oxycholesterins, das gleichfalls ein in Alkohol schwer lösliches Digitonid gibt, mit ausfällt. Es bleibt also in solchen Fällen nichts übrig, als zum spektrometrischen Verfahren zu greifen.¹⁾

Die quantitative Bestimmung dieser Cholesterinstoffe geschieht zunächst durch vergleichende Messungen der Spektralintensität der in einer Chloroformlösung des zu untersuchenden Körpers hervorgerufenen grünen Liebermannschen Acetanhydridschwefelsäurereaktion (Cholestolreaktion) einerseits — mit dem Absorptionsspektrum der gleichen Reaktion in einer Testlösung aus reinem Cholesterin andererseits. Nun gibt bekanntlich auch das Oxycholesterin diese Reaktion, und zwar mit derselben Intensität und in demselben Umfang wie das Cholesterin. Demnach gibt die Spektrometrie der Cholestolreaktion in einem Gemisch von Cholesterin und Oxycholesterin die Summe beider Cholesterinstoffe an. Bestimmt man nun in einer anderen Portion des fraglichen Stoffes das Oxycholesterin (wie weiter unten

¹⁾ Siehe die diesbetreffenden eingehenden Erörterungen «Quantitative Bestimm. d. Cholesterinstoffe nebeneinander, II», Biochem. Zeitschr., Bd. 54, S. 213—218 ff. (1913) und daselbst, Bd. 62, S. 221—224 (1914).

S. 221 angegeben) für sich und zieht den gefundenen Wert von jener Summe der Gesamtcholesterinstoffe ab, so ergibt die Differenz den gesuchten Gehalt an reinem Cholesterin.¹⁾

Die Bestimmung der Summe der beiden Cholesterinstoffe in obigem Endprodukt ist in dessen Chloroformlösung wie folgt ausgeführt worden:

Analyse 1.

Lösung E mit 0,1755% des Endproduktes in Chloroform,

» C » 0,1570% reinen Cholesterins (Testlösung).

In gleich weiten, in 0,1 ccm graduierten Reagensgläsern von 12 mm Durchmesser wurden je 1 ccm dieser Lösungen mit je 2 ccm Acetanhydrid und je 0,25 ccm Essigschwefelsäure²⁾ (= 1 Tropfen H_2SO_4) vermischt. Die Gläser wurden geschlossen und in ein mit Wasser von 35° C gefülltes Becherglas gestellt, wo sie 15 Minuten bei dieser Temperatur verweilten. Hierauf wurden die Gläser mit den grün gewordenen Reaktionsgemischen in Wasser von Zimmertemperatur gestellt, um sie abzukühlen. 20 bis 30 Minuten nach der beendeten Erwärmung wurden beide Gläser vor das bekannte, mit Vergleichsprisma und Vergleichsspiegel versehene Spektroskop (mit gerader Durchsicht: Dreiprismenkörper) an einer Lichtquelle von 100 HK gespannt. Es stellte sich dabei heraus, daß die Absorptionsspektren (tief dunkeler Streifen zwischen B und C in Rot) in beiden Gläsern viel zu intensiv waren, um den Unterschied der Intensitäten feststellen zu können. Beide Gemische wurden daher mit je 1 ccm Eisessig verdünnt, wobei sich das Absorptionsspektrum des Testgemisches (aus der Lösung C) dem anderen Gemische gegenüber als wesentlich intensiver zeigte. Das Testgemisch wurde daher nach und nach vorsichtig solange mit Eisessig verdünnt, bis es die Spektralintensität des zu untersuchenden Gemisches (aus der Lösung E) erreichte. Es entstanden so die Gemische:

e : 4,25 ccm mit 0,04129% des Endproduktes und

c : 4,65 ccm » 0,03376% Cholesterins.

¹⁾ Siehe Biochem. Zeitschr., Bd. 62, S. 221—224 (1914).

²⁾ 1 Vol. H_2SO_4 + 10 Vol. Eisessig.

Da nun nach der Ausgleichung beider Spektralintensitäten, wie nachgewiesen,¹⁾ in gleichen Raumteilen gleiche Mengen Cholesterins enthalten sein müssen, so verhält sich der prozentuale Cholesteringehalt des obigen Endproduktes zu hundert, wie die entsprechenden Konzentrationen der beiden Reaktionsgemische zu einander. Bezeichnet man den gesuchten Gehalt an Cholesterin + Oxycholesterin mit x , so entsteht die Proportionalgleichung:

$$4129 : 3376 = 100 : x.$$

Die Auflösung der Gleichung nach x ergibt für das obige Endprodukt einen Gehalt an Cholesterin + Oxycholesterin von 81,76%.

Analyse 2

wurde als Kontrollanalyse und — um gleichzeitig die Manipulation zu vereinfachen — mit einer verdünnteren Chloroformlösung des Endproduktes, sonst aber genau so wie die erste Analyse ausgeführt:

Lösung E mit 0,1170% des Endproduktes in Chloroform,

› C › 0,1570% des Cholesterins › › (Testlösung).

Naturgemäß war nunmehr das Gemisch (mit Acetanhydrid und Essigschwefelsäure) aus der Lösung E wesentlich schwächer gefärbt als das der ersten Analyse, so daß sein Absorptionsspektrum ohne weiteres mit dem Spektrum des Testgemisches gut verglichen und genau gemessen werden konnte. Das Absorptionsspektrum des Testgemisches wurde nun, wie angegeben, durch Verdünnung mit Eisessig mit dem Spektrum des zu untersuchenden Gemisches ausgeglichen, wobei folgende Gemische entstanden:

Gemisch e : 3,25 ccm mit 0,03600% des Produktes und

› c : 5,30 › › 0,02962% des Cholesterins.

Die Proportionalgleichung: $3600 : 2962 = 100 : x$ ergibt hier 82,27% Cholesterin + Oxycholesterin.²⁾

¹⁾ Siehe Biochem. Zeitschr., Bd. 54, S. 218—228 (1913): Zwei spektralanalytische Sätze und ihre experimentelle Begründung.

²⁾ Trotz der wesentlich verschiedenen Konzentrationen der Lösungen in beiden Analysen, stimmen beide Resultate gut überein, was die Zuverlässigkeit des Verfahrens dartun dürfte.

Das Mittel aus beiden Analysen beträgt demnach:

Cholesterin + Oxycholesterin	82,01 %,
hiervon abgezogen: Oxycholesterin mit	28,49 %,
bleiben für reines Cholesterin	53,52 %.

Das Maximum der Oxycholesterinbildung bei der in Rede stehenden Operation trat in Probe 3 mit 49,7% ein. Das Gemisch konnte demnach nur 50,3% vom angewandten Cholesterin als Rest enthalten; also annähernd soviel, wie die obigen Cholesterinbestimmungen in den aus dem Gemisch isolierten Cholesterinstoffen ergeben haben. Das Sinken des Oxycholesteringehaltes in den Proben 4 und 5 von 49,7 auf 38,5% kann also keine Reduktion dieses Körpers zu Cholesterin bedeuten, in welchem Falle die obigen Cholesterinanalysen ja einen viel höheren Cholesteringehalt hätten ergeben müssen. Vielmehr deutet dieser Rückgang auf eine weitere Oxydation zu Substanzen hin, die weder auf Cholesterin noch auf Oxycholesterin reagieren. Das heißt zu einem sogenannten «Nichtcholesterin», wie es etwa als Begleitsubstanz des Cholesterins im Unverseifbaren aller Fette aufzutreten pflegt.

Wie oben bereits hervorgehoben, war das zu diesen Versuchen dienende Trockenblut frei von Cholesterinflüssen. Immerhin wurden neben der obigen Operation

zwei blinde Versuche

angesetzt. Und zwar: 1. 0,8 g des Trockenblutes, übergossen mit 20 ccm Eisessig, und 2. 0,2 g Cholesterin in 20 ccm Eisessig gelöst. Beide Gemische wurden in gleichen Gefäßen und bei gleicher Temperatur wie das obige Cholesterinblutgemisch digeriert. Weder die diesen beiden blinden Versuchsgemischen während des Erwärmens entnommenen kleinen Proben noch die entsprechenden Endprodukte zeigten irgendwelche Spuren von Oxycholesterinbildung.¹⁾ Es kann daher gar keinem Zweifel unterliegen, daß in der oben geschilderten Operation: das Cholesterin in

¹⁾ Im blinden Versuch 1 waren nicht einmal Spuren von Cholesterin aufzufinden. Nebenbei ein fernerer Beweis, daß das Trockenblut vollständig cholesterinfrei war.

bedeutenden Mengen nicht allein in Oxycholesterin verwandelt: sondern daß auch dieses durch die Blutzellen weiter oxydiert wurde.

Die dabei entstandene Säure, so gering auch ihre Menge war, konnte doch, wie bereits angedeutet, spektroskopisch mit denjenigen Säuren identifiziert werden, die bei der Oxydation des Cholesterins mit Benzoylsuperoxyd in weit größeren Mengen entstehen. Erwägt man dabei den Umstand, daß diese Säure — wenigstens hinsichtlich ihres optischen Verhaltens — nur bei Verwendung des genannten Peroxyds, nicht aber mit anderen Oxydationsmitteln aus dem Cholesterin zu entstehen pflegt, so bestätigt sich die eingangs dieser Arbeit ausgesprochene Vermutung einer Analogie zwischen der Oxydation des Cholesterins mit dem Peroxyd einerseits und derjenigen Oxydation vermittels des Blutgewebes andererseits. Dieser Umstand dürfte vielleicht zur Anschauung berechtigen, daß es sich hier auch beim oxydativen Angriff auf das Cholesterin in der lebenden Blutbahn tatsächlich gleichfalls um einen rein chemischen Vorgang handeln dürfte.

Die sehr geringen Mengen, in denen die genannte «Cholesterinsäure» hier entsteht¹⁾ dürften dafür sprechen, daß das Blutgewebe das Cholesterin nur zu neutralen, aber für seinen weiteren Abbau geeigneteren (alkoholartigen) Oxydaten verarbeiten kann, um die weitere Verarbeitung den anderen Organen²⁾ zu überlassen.

II.

Einwirkung des Blutes auf Cholesterin bei niedrigeren Temperaturen.

1. Das unregelmäßige Steigen und Sinken des Oxycholesteringehaltes während der Dauer der obigen Versuche ließ vermuten, daß die Oxydation des Cholesterins durch das Blut in erster Linie von Temperaturschwankungen beeinflußt wird. Es war daher von Interesse, quantitativ zu prüfen, wie diese Reaktion bei niedrigeren Temperaturen vor sich geht. Es zeigte

¹⁾ Im Blute selbst habe ich diese Säure noch nie beobachtet.

²⁾ z. B. der Leber für die Gallensäurebereitung.

sich in der Tat bei diesen Versuchen, daß bei Temperaturen zwischen 30 und 40° C. das Cholesterin in wesentlich geringerem Grade vom Blut affiziert wird als zwischen 60 und 70° C. Interessant ist, daß bei 30 bis 40° C. das Oxycholesterin in einem Verhältnis zum Cholesterin zu entstehen pflegt, wie ich es häufig im lebenden Menschenblut feststellen konnte.

Diese zweite Versuchsreihe ist in denselben Mischungsverhältnissen zwischen der Cholesterinlösung und dem Trockenblut ausgeführt worden, wie die erste Versuchsreihe. Die Gemische wurden bei 30 bis 40° C. digeriert. Das Maximum des Oxycholesteringehaltes lag in einem quantitativ durchgeführten Versuch bei 19,7% des auf Essigschwefelsäure reagierenden Oxycholesterins und ging dann bis auf 7,7% (im Endprodukt) zurück.

Nach der Unterbrechung der Operation wurde das Endprodukt in der oben angegebenen Weise abgeschieden. Cholesterin und Oxycholesterin wurden auch hier spektrometrisch ermittelt.

Die Ausführung der Spektralanalyse

geschieht beim Oxycholesterin vermittelt der farbigen Essigschwefelsäurereaktion nach denselben Grundsätzen und in derselben Weise, aber bei gewöhnlicher Zimmertemperatur, wie bei den oben angeführten Spektralanalysen des Cholesterins mittels der gleichfarbigen Acetanhydridschwefelsäurereaktion (bei 35° C.); und zwar in folgenden Lösungen:

Lösung E mit 0,7982% des Endproduktes in Chloroform.

Lösung O mit 0,0790% reinen Oxycholesterins in Chloroform (Testlösung).

In den gleich weiten, graduierten Reagenzgläsern wurden je 1 ccm dieser Lösungen mit je 2 ccm Essigschwefelsäure vermischt, nach 10 Minuten mit je 1 Tropfen Eisenchloridlösung (2% ig in Eisessig) versetzt und — nach dem vorsichtigen Vermischen — vor das Vergleichsspektroskop in oben (beim Cholesterin) angegebener Weise gespannt. Das Absorptionsspektrum¹⁾ des Testgemisches aus der Lösung O war wesentlich

¹⁾ Ein dem obigen Cholesterinspektrum ähnlicher, tiefdunkler Streifen zwischen C und d im Rot.

intensiver als das des zu untersuchenden Gemisches des Endproduktes; es wurde daher nach und nach mit Eisessig solange verdünnt, bis es die Spektralintensität des fraglichen Gemisches erreichte. Es entstanden so die Gemische:

e.: 3,0 ccm mit 0,26610% des Endproduktes und

o.: 3,9 „ „ 0,02026% reinen Oxycholesterins.

Wie oben beim Cholesterin, berechnet sich auch hier (nach der Gleichung $26610 : 2026 = 100 : X$) für das Endprodukt: 7,6% Oxycholesterin.

Eine zweite Analyse ergab übereinstimmend 7,7%.

Betrag nun, wie erwähnt, der maximale Oxycholesterin-gehalt in dieser Operation 19,7%, so konnte in dieser Reaktionsphase der Cholesteringehalt des Gemisches 80,3% von angewendeten Cholesterin nicht übersteigen. Annähernd dieselbe Zahl ergab sich auch tatsächlich bei der Cholesterinbestimmung des in Rede stehenden Endproduktes dieser Operation: zwei in der unter I angegebenen Verfahrungsweise ausgeführte übereinstimmende Spektralanalysen ergaben hier:

Cholesterin + Oxycholesterin 90,4%

Hiervon abgezogen: Oxycholesterin mit 7,7%

verbleiben für reines Cholesterin 82,7%.

Von den obigen 19,7% Oxycholesterin ist also zirka die Hälfte weiter oxydiert worden zu Produkten, die weder die Liebermannsche Cholestolreaktion des Cholesterins, noch die Essigschwefelsäurereaktion des Oxycholesterins geben.

2. Von der Anschauung ausgehend, daß die Oxydation des Cholesterins durch das Blut ein rein chemischer Vorgang sein müßte, erschien es von Interesse, den Verlauf der Oxydation in Gegenwart von chemisch leichter angreifbaren Substanzen als das Cholesterin es ist, namentlich von niederen Alkoholen der Fettreihe, zu verfolgen. Zu diesem Ende wurde neben dem vorhergehenden Versuchsgemisch ein zweites gleich zusammengesetztes Gemisch angesetzt, dem 1,5 Volumprozent absolute Alkohols zugesetzt war. Beide Gemische wurden gleichzeitig und bei der gleichen Temperatur (30—40° C.) nebeneinander digeriert. Das alkoholhaltige

Gemisch zeigte nach 5 Tagen eine Maximaloxydation des Cholesterins von nur 2,2%, die aber in weiteren 3 Tagen bis auf 0 zurückgingen, während im alkoholfreien Gemisch, wie oben angegeben, das Maximum des Oxycholesteringehaltes unter denselben Bedingungen 19,7% vom angewandten Cholesterin betrug. Der Versuch mit dem alkoholhaltigen Gemisch wurde am achten Tage unterbrochen und die Cholesterinstoffe, wie oben unter I angegeben, abgeschieden. Sie stellten fast unverändertes Cholesterin dar. Die Cholesterinbestimmung ergab auch 97,9% Cholesterin. Da dieses Endprodukt keine Oxycholesterinreaktion mit Essigschwefelsäure zeigte, so sind jene 2,2% Oxycholesterin, wie in Operation I, auch hier weiter oxydiert wurden. Das Endprodukt dieser Operation enthielt also: 97,9% Cholesterin + 2,2% «Nichtcholesterin».

In einem zweiten Versuch wurde das alkoholhaltige Gemisch, das gleichfalls einen Maximalgehalt von nur 2,0% Oxycholesterin erreichte und dann auf 0 zurückging, am achten Tage auf 60—65° C. erwärmt. Der Oxycholesteringehalt stieg dann während weiterer 10 Tage langsam an,¹⁾ bis es nach der Unterbrechung der Operation in den nach dem oben unter I angegebenen Verfahren freigelegten Cholesterinstoffen 10,0% erreichte. Der Cholesteringehalt dieses Endproduktes betrug 90,6%.

Die Untersuchungen nach dieser Richtung hin sind noch nicht abgeschlossen. Soviel geht jedoch aus diesen Versuchen hervor, daß leichter oxydable Substanzen, wie z. B. niedere Alkohole, den Sauerstoff des Blutes eher beanspruchen, bevor er an das widerstandsfähigere Cholesterin herangehen kann.

III.

Einwirkung des Blutes auf Phytosterin.

Bekanntlich teilt das pflanzliche Phytosterin fast alle Eigenschaften mit dem ihm isomeren tierischen Cholesterin. Sein primäres Oxydationsprodukt ist im Pflanzenreich jedoch nicht so verbreitet, wie das entsprechende Oxycholesterin im Tierreich; es läßt sich aber in Eisessiglösung mit Benzoyl-

¹⁾ Wahrscheinlich infolge des langsamen Verdunstens des Alkohols.

superoxyd ebenso leicht in Oxyphytosterin überführen, wie das Cholesterin in sein ihm entsprechendes Oxydat.

Das Blutgewebe scheint indessen auf das Phytosterin viel schwieriger einzuwirken, als auf das Cholesterin, wie aus folgendem Versuch hervorgehen dürfte:

1 g menschlichen, entfetteten, also cholesterinfreien Trockenblutes wurde mit 10 ccm einer 1%igen Eisessiglösung von reinem Phytosterin übergossen und bei 60–65° C. digeriert. In den ersten 8 Tagen konnte in einigen entnommenen Proben Oxyphytosterin nicht nachgewiesen werden, während das Cholesterin, wie oben unter I angegeben, schon nach 3 bis 4 Tagen bis zur Hälfte von demselben Blutkörper in Oxycholesterin übergeführt werden konnte. Erst nach weiterem Erwärmen konnte eine merkliche Reaktion auch beim Phytosterin-gemisch wahrgenommen werden. Nach 14tägigem Erwärmen wurden die Phytosterinstoffe in derselben Weise freigelegt, wie oben die Cholesterinstoffe des entsprechenden Endproduktes. Durch die Spektralanalyse konnte darin nur 9,6% Oxyphytosterins vom angewendeten Phytosterin ermittelt werden.

Etwaige dabei entstandene weitere Oxydationsprodukte konnten im Endprodukt (etwa wie beim Cholesterin) aus der Differenz zwischen der Summe des Phytosterins + Oxyphytosterin und dem gefundenen Oxyphytosterin bislang nicht ermittelt werden, weil durch die quantitativen Verfahren zur Bestimmung des eigentlichen Cholesterins beim Phytosterin zuverlässige Werte bis jetzt nicht erhalten werden konnten: So fällt Digitonin das Phytosterin aus alkoholischen Lösungen nicht so vollständig aus wie das Cholesterin. Was ferner das spektrometrische Verfahren mittels der grünen Cholestolreaktion mit Acetanhydrid und Schwefelsäure betrifft, so weicht das hier in Betracht kommende Absorptionsspektrum des letzten (grünen) Reaktionsstadiums des Phytosterins von dem des Cholesterins derartig ab, daß es unter denselben Bedingungen wie beim Cholesterin spektrometrisch nicht gemessen werden kann.

Mit Rücksicht darauf, daß die Unterschiede zwischen den Spektren des Cholesterins und des Phytosterins für die Kenntnis des Cholesterinstoffwechsels in den tierischen Organen von

Bedeutung sein dürften, mögen einige diesbetreffende Beobachtungen hier ihren Platz finden:

Bekanntlich besteht die Liebermannsche Farbreaktion (Cholestolreaktion) auf Cholesterinstoffe in Acetanhydridlösung mit konzentrierter Schwefelsäure aus drei aufeinanderfolgenden Farbenphasen: rot—blau—grün. Diesen drei Phasen entsprechen drei Spektralabsorptionen im Grün, Orange und Rot des Spektrums. Von diesen drei Reaktionsphasen ist die letzte — der Farbe nach — die einheitlichste und intensivste und ihrer spektralen Absorption nach — die charakteristischste und daher für die Spektralanalyse auch die geeignetste. Beim eigentlichen (tierischen) Cholesterin und seinen Derivaten, die diese Reaktion geben, hält die echte und tief grüne Farbe des Reaktionsgemisches viele Stunden, ja ganze Tage an und zeigt im roten Felde des Spektrums nur einen, fast scharf begrenzten tief dunklen und breiten Absorptionsstreifen zwischen den Fraunhoferschen Linien B u. C. Wie wiederholt nachgewiesen, ist die Intensität dieser Spektralabsorption direkt proportional dem jeweiligen Gehalt des Reaktionsgemisches an Cholesterinstoffen.¹⁾ Letztere können daher durch vergleichende Messungen der spektralen Absorptionsintensität gegen ein Reaktionsgemisch von bekanntem Cholesteringehalt quantitativ ermittelt werden.²⁾

In der Farbenskala stimmt diese Reaktion beim Phytosterin anscheinend mit der des eigentlichen Cholesterins überein. Die grüne Farbe der letzten Reaktionsphase zeigt jedoch beim Phytosterin schon dem unbewaffneten Auge erhebliche Abweichungen von der entsprechenden Farbe des Cholesterins: Sie ist nicht so echt, besitzt (in verdünnteren Gemischen) eine erheblich gelbe Nüance und ist von viel geringerer Dauer. Am prägnantesten kommen diese Unterschiede im entsprechenden Absorptionsspektrum zum Ausdruck: Während die Spektralabsorptionen der ersten zwei Reaktionsphasen des Phytosterins im Grün bzw. im Orange des Spektrums allem Anscheine nach mit den entsprechenden Spektralab-

¹⁾ Biochem. Zeitschr., Bd. 62, S. 219 (1914).

²⁾ Dasselbst S. 221—237.

sorptionen des Cholesterins übereinstimmen, fehlen der wichtigsten Spektralabsorption der dritten Reaktionsphase des Phytosterins alle charakteristischen Merkmale gänzlich: Diese Absorption geht vom Ultrarot aus — fast kontinuierlich — bis an die Sonnenlinie B und mit einem verschwommenen Schattenhof — noch über diese Linie hinaus, so daß von dem scharfen Streifen, der beim Cholesteringemisch in schöner und ausgeprägter Zeichnung vom roten Hintergrund des Spektrums zwischen den Linien B u. C sich abhebt, hier (beim Phytosterin) nichts zu merken ist.

Diese Beobachtung veranlaßte mich, die Cholesterinstoffe des Blutes und der Drüsenorgane daraufhin zu prüfen: Bekanntlich vertreten manche Autoren die Anschauung, daß das Cholesterin der tierischen Organe und Gewebe vom Cholesterin der Nahrung herrühre. Freilich muß man dabei — namentlich für das Cholesterin der Organe pflanzenfressender Tiere — zu einer zweiten, weniger wahrscheinlichen Annahme greifen, und zwar: daß das Phytosterin der Pflanzennahrung von den tierischen Organen (etwa durch eine molekulare Umlagerung) zu Cholesterin umgearbeitet wird. Da aber diese Umwandlung in allen Organen und Geweben schwerlich eine quantitativ restlose sein dürfte, so besteht die Hoffnung, an irgendeiner Stelle des Organismus Reste von Phytosterin aufzufinden. Ich bin gegenwärtig bemüht, diesem Gedanken experimentell nachzugehen und hoffe, in einer der weiteren Mitteilungen ausführlich darauf zurückzukommen.

Schlußbemerkungen.

So grundverschieden die Reaktionsbedingungen und die sonstigen Umstände, unter denen die obengeschilderte Oxydation des Cholesterins durch das Trockenblut vor sich geht, von denen des Oxydationsvorganges im lebenden Blutgewebe auch sind, so gewinnt doch die Anschauung vom ersten Oxydationsangriff des Cholesterins in der Blutbahn durch die obigen Feststellungen mindestens eine an Gewißheit grenzende Wahrscheinlichkeit. Es gibt ja auch kaum eine andere Stelle im tierischen Organismus, die für diesen Vorgang geeigneter wäre: Die Drüsen-

organe pflegen bei reichlichem Cholesteringehalt entweder nur geringe Mengen, oder — z. B. die Leber — gar kein Oxycholesterin zu enthalten. Dasselbe gilt auch von den anderen tierischen Organen und Geweben. Außerdem tragen die sich dort noch vorfindenden kleinen Mengen Oxycholesterins stets den Stempel von Überresten vom weiteren Abbau dieses Körpers an sich. Man kann sich leicht davon an den schwachen, mißfarbigen und rasch schwindenden Essigschwefelsäure-Reaktionen, sowie an den verschwommenen Absorptionsspektren dieser Oxycholesterinreste überzeugen, wenn man sie mit den gleichen Reaktionen des Unverseifbaren des Blutfettes vergleicht, deren lebhaft echte Farben und intensive und scharf gezeichnete Spektralabsorptionen 48 Stunden und mehr anhalten. Vergleicht man dagegen diese letzteren Reaktionen mit denen des reinen (künstlichen) Oxycholesterins, so kann man sich, schon bei diesem qualitativen Vergleich, des Eindruckes nicht erwehren, daß es sich auch bei dem Oxycholesterin des Blutfettes um ein frisches und primäres Oxydationsprodukt des Cholesterins handeln muß.

Der Zusammenhang dieser Erscheinung mit einer Reihe verwandter Tatsachen: wie das Verhältnis der Cholesterin-oxydate des Pfortaderblutes zu denen des Lebervenenblutes,¹⁾ das Fehlen des Oxycholesterins in der Leber²⁾ als Folge seiner Verarbeitung zu Gallensäuren,³⁾ sowie die Bedeutung seiner kolloidalen und hydrophilen Eigenschaften usw., soll in einem der folgenden Aufsätze erörtert werden.

¹⁾ Biochem. Zeitschr., Bd. 52, S. 208 (1913).

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 63, S. 227 (1909).

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 91, S. 309 ff. und Bd. 92, S. 383 ff. (1914).

Hamburg, im Oktober 1914.