

Zur Analyse des Cholesterins.

Von

J. Lifschütz in Hamburg.

(Der Redaktion zugegangen am 6. Oktober 1917.)

Bekanntlich geben die meisten neutralen Cholesterinderivate, namentlich die von alkoholartiger Natur, wie das Cholesterin selber, mit Digitonin in Weingeist mehr oder minder schwer lösliche Doppelverbindungen im Verhältnis von je einem Molekül. Die in kaltem Weingeist nahezu unlösliche Doppelverbindung des eigentlichen Cholesterins, das Digitonin-cholesterid, enthält 24,31% Cholesterin,¹⁾ das demgemäß bei quantitativen Maßnahmen daraus berechnet wird. Naturgemäß wächst bei den Doppelverbindungen des Digitonins mit den anderweitigen Cholesterinderivaten der jeweilige Prozentgehalt der letzteren im betreffenden Komplex mit der Höhe ihres Moleküls. So enthält das Digitonin-oxycholesterid 25,26% Oxycholesterin,²⁾ und die sauerstoffreicheren Cholesterinkörper entsprechend mehr.

Bei den quantitativen Cholesterinbestimmungen vermitteltst Fällung desselben aus alkoholischen Lösungen mit Digitonin ist es daher von Interesse, in denjenigen Fällen, wo man die Abwesenheit anderer mit Digitonin fällbaren Stoffe nicht mit Sicherheit annehmen kann, die Cholesterinkomponente aus dem niedergeschlagenen Komplex abzuscheiden, um den wirklichen Prozentgehalt daran zu ermitteln, sowie sie auf ihre Beschaffenheit näher prüfen zu können. Aber auch bei präparativen Maßnahmen, wo es gilt die Cholesterinstoffe behufs

¹⁾ Nach der Formel: $C_{55}H_{94}O_{28} \cdot C_{27}H_{46}O$.

²⁾ Die elementaranalytische und spektrometrische Feststellung dieser Zahl siehe Berichte, Bd. 47, S. 1457 ff. (1914).

näheren Studiums aus komplizierten Gemischen zunächst als Digitonide herauszuschälen, ist die Möglichkeit der restlosen Freilegung der gesuchten Stoffe für manchen derselben oft von entscheidender Bedeutung.

In dem von A. Windaus, dem Schöpfer des Digitoninverfahrens, kurz angedeuteten Verfahren, wonach es «beim Kochen des Komplexes mit Acetanhydrid gelingt, das gebundene Cholesterin zu acetylieren und nunmehr glatt durch Äther als Cholesterylacetat herauszulösen»,¹⁾ besitzen wir zwar eine willkommene Handhabe für die Spaltung des sehr beständigen Komplexes in seine Komponenten, ohne die elementare Zusammensetzung des Cholesterinmoleküls merklich zu gefährden. Allein es ist mir bislang nicht gelungen, aus dem Acetylierungsprodukt des Komplexes das Cholesterylacetat herauszulösen, und zwar aus dem einfachen Grunde, weil sich beide freigelegten Komponenten: das Cholesterin wie das Digitonin acetylierten und so ein Gemenge beider Acetate lieferten, das sich leicht und völlig restlos in Äther löste.

Die Hoffnung, die einzelnen freien Substanzen aus dem Gemenge der so erhaltenen Acetate durch Verseifung und Trennung des ätherlöslichen Cholesterins vom darin unlöslichen Digitonin-Körper zu gewinnen, hat sich — in der üblichen Form der Verseifung — nicht verwirklichen lassen. Übergießt man nämlich das acetylierte Digitonin-cholesterid mit $\frac{1}{2}$ norm. alkoholischer Kalilauge, so löst es sich bei gelinder Wärme zunächst klar auf. Kocht man aber die Lösung auf dem Wasserbade nur 20 bis 30 Minuten, so trübt sie sich schon nach einigen Minuten und scheidet nach und nach eine reichliche Menge weißer Flocken aus, die in den hier in Betracht kommenden Lösungsmitteln (Wasser, Alkohol und Äther) unlöslich sind. Sie bestehen teilweise aus mutmaßlich zurückgebildetem Digitonin-cholesterid und teilweise aus einem neu gebildeten, äther- und alkoholunlöslichen Umwandlungsprodukt des Digitonins, welches letzteres auch seinerseits erhebliche Mengen von Cholesterin einschließt und hartnäckig zurückhält.

¹⁾ Berichte, Bd. 42, S. 244 (1909).

Ich konnte daher aus dem Saponifikat nur 19,2% vom Digitonid an Cholesterin (anstatt 24,3%) durch Extraktion mit Äther wiedergewinnen.

Unter diesen Umständen erschien es ratsam, zunächst die Eigenschaften der einzelnen Acetate, namentlich aber die des Acetyldigitonins, für sich zu studieren; vor allem aber festzustellen, ob beim Digitonin eine konstante Acetylzahl zu erlangen ist, in welchem Verhältnis diese zur Acetylzahl des Digitonincholesterids steht, bzw. wie die beiden in Rede stehenden Acetate jedes für sich zu Wasser, Alkohol und Äther als Lösungsmitteln vor und nach ihrer Verseifung sich verhalten.

I. Die direkte Acetylzahl des Digitonins¹⁾

wurde in folgender Weise gewonnen:

0,4000g reinen Digitonins²⁾ wurden mit 5 ccm Acetanhydrid am Rückflußrohr 45 Minuten³⁾ in mäßigem Sieden erhalten. Die Lösung wurde dann in ein Bechergläschen mit ca. 50 ccm Wasser gegossen, das Kochkölbchen mit wenig warmem Acetanhydrid möglichst vollständig ausgespült und die Spülflüssigkeit zur Hauptmenge ins Wasser gegossen. Nach etwa 3—4 Stunden erstarrte das Öl zu einer weißen und spröden Masse, die mit einem Glasstab leicht zu einem Pulver zerrieben werden konnte. Es wurde quantitativ auf ein bei 110° C. getrocknetes und im geschlossenen Wägegäschchen gewogenes

¹⁾ Im Gegensatz zur üblichen (indirekten) Acetylzahl, worunter man die zur Verseifung des Acetates verbrauchte Menge KOH versteht. Da hier, wie oben angedeutet, eine Verseifung, der Umwandlung des Digitonins zufolge, kein klares Bild vom Alkaliverbrauch für die Acetylgruppen liefern würde, wurde als «Acetylzahl» die Beziehung vom Digitonin zu der durch seine Acetylierung hervorgerufenen Gewichtszunahme in Betracht gezogen.

²⁾ Das Digitonin ist von E. Merck in Darmstadt unter der Bezeichnung «Digit. kryst.» bezogen. Das Präparat gab mir, bei verschiedenen Lieferungen, stets konstante Zahlen.

³⁾ Die Acetylierung des Digitonins wird zwar bereits nach viel kürzerer Kochung mit Acetanhydrid herbeigeführt. Jedoch wurde auch hier die bei ähnlichen Operationen übliche Kochdauer ungefähr innegehalten.

Filter gebracht, mit Wasser gut ausgewaschen, das Filter auf einer Unterlage von reinem Fließpapier auf einer porösen Tonplatte vom größten Teil des Wassers befreit und der Rest der Feuchtigkeit durch einige Stunden im Vakuumexsikkator beseitigt. Es wurde dann in das Wägegläschen gebracht, bei 80 bis 85° C. bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und wieder gewogen. Das so gewonnene Acetyl-Digitonin betrug dann 0,5546 g. Nach Abzug der Menge des angewendeten Digitonins ergab sich eine Gewichtszunahme von 0,1546 g = 38,65% vom Digitonin.

Nimmt man die wahrscheinlichere neuere Formel des Digitonins zu $C_{54}H_{92}O_{28}$ und seine Acetylierung zu 11 Acetylgruppen an, so würde die theoretische Gewichtszunahme, auf das Digitoninmolekül bezogen, 38,89% betragen; also eine Zahl, die mit der oben gefundenen gut übereinstimmt.

Dieser Versuch wurde bei verschiedenen Gelegenheiten wiederholt und lieferte stets gut übereinstimmende Zahlen. Die für unseren Zweck in Betracht kommenden Eigenschaften der Substanz für sich resp. im Gemenge mit Cholesterylacetat sind folgende:¹⁾

1. Das so acetylierte Digitonin stellt ein weißes krystallinisches, bei 140° C. schmelzendes Pulver dar. Es löst sich leicht in Äther und Alkohol; auch ist es, im Gegensatz zur Muttersubstanz, unlöslich in Wasser. Löst man es in 90%igem Alkohol und verdünnt die warme Lösung mit dem gleichen Volumen Wasser, so bleibt die Lösung auch nach dem Erkalten vollständig klar; erst beim weiteren Verdünnen mit Wasser fällt das weiße Pulver des Acetates wieder aus. Es ist also in 40- bis 45%igem wässerigem Alkohol noch gut und — in nicht zu konzentriertem Zustande — auch bleibend löslich.

2. Löst man eine kleine Menge des Digitoninacetates in 1 ccm 90%igem Alkohol, verdünnt die warme Lösung mit 1 ccm 1%iger wässriger Natronlauge und kocht das Gemisch

¹⁾ Die Eigenschaften des eigentlichen Digitoninacetates sind in den bekannten Kilianischen Arbeiten über diesen Gegenstand (Berichte, Bd. 24 [1891] und Bd. 34 [1901]) nicht erörtert worden.

längere Zeit, so fällt bei ihrer starken Verdünnung mit Wasser jene oben erwähnte wasser- und ätherunlösliche, die beabsichtigte Isolierung des Cholesterins störende, Digitoninsubstanz aus, die sich mit Äther nicht ausziehen läßt und — bei Anwesenheit von Cholesterin — dieses in namhafter Menge hartnäckig zurückhält. Kocht man dagegen diese alkalische Lösung nur kurze Zeit, so bleibt sie selbst bei starker Verdünnung mit Wasser völlig klar. Das Digitoninacetat wurde also unter diesen Bedingungen bereits gespalten, ohne Wasserunlösliches gegeben zu haben.

3. Führt man den Versuch 1 in Gegenwart von beigemengtem Cholesterylacetat aus, so entsteht beim Verdünnen der spirituösen Lösung des Gemenges mit dem gleichen Volumen reinen Wassers eine homogene Milch, aus der verdünnte Mineralsäure das Cholesterylacetat in weißen Flocken ausfällt, während das Digitoninacetat gelöst bleibt.¹⁾ Versetzt man die spirituöse Lösung des Gemenges mit dem gleichen Volumen 1%iger Natronlauge und kocht die entstandene Milch nur 2 bis 3 Minuten, verdünnt sie etwas stärker mit Wasser und schüttelt sie mit etwa dem gleichen Volumen Äther wiederholt und tüchtig durch, so erhält man in kurzer Zeit zwei klare Schichten, von denen die obere ätherische Schicht das Cholesterylacetat enthält, das sich leicht — nach dem Beseitigen des Äthers — als solches zu erkennen gibt.

Es ist einleuchtend, daß in stark wasserhaltigem Alkohol, wo das Digitoninacetat noch löslich, das Cholesterylacetat dagegen unlöslich ist, ersteres schon durch sehr verdünntes (aber ausreichendes) Alkali gespalten, während letzteres (als ungelöst) intakt bleiben wird. Der folgende quantitative Versuch bestätigt diese Annahme.

4. 0,1112 g des Cholesterylacetates wurden zusammen mit 0,30 g Digitoninacetat in 10 ccm 90%igen Alkohols klar gelöst, zur warmen Lösung 10 ccm 1%iger wässriger Natronlauge zugesetzt und das Gemisch drei Minuten lang in schwachem

¹⁾ Inwiefern dieses Verhalten des Gemenges zu neutralem wässrigem Alkohol sich für eine etwaige quantitative Trennung der beiden Acetate eignet, sollen weitere Versuche lehren.

Sieden am Rückflußrohr erhalten. Es wurde rasch abgekühlt, mit Wasser und etwas Alkohol in einen Scheidetrichter hineingespült, mit verdünnter Salzsäure schwach sauer gemacht und mit etwa dem gleichen Volumen Äther tüchtig und anhaltend durchgeschüttelt. In kurzer Zeit trennte sich das Gemisch in zwei fast klare Schichten. Der an der Trennungsfläche noch befindliche schwache Anflug ungelöster Substanz verschwand gänzlich nach dem Ablassen der wässerigen Unterschicht und dem wiederholten Waschen des Ätherextraktes mit alkoholhaltigem Wasser. Die gut ausgewaschene, fast völlig klare und farblose ätherische Lösung wurde durch ein vorher mit Äther vorsichtshalber ausgewaschenes Doppelfilter filtriert und eingedampft, was ohne jede Störung durch Aufschäumen, wie es beim Eindampfen von Cholesterinlösungen in Erscheinung zu treten pflegt, geschah. Der Rückstand erstarrte langsam beim Eintrocknen auf dem Wasserbade zu schönen, sternförmig gelagerten, feinen Nadelchen. Nach dem Trocknen der Substanz bei 85° C. betrug sie $0,1098 = 98,74\%$ vom angewendeten Cholesterylacetat.

Die so zurückerhaltene, aus 90% igem Alkohol schön krystallisierende Substanz konnte leicht als das ursprüngliche Cholesterylacetat erkannt und identifiziert werden.

Die von der ätherischen Lösung des Acetates getrennte wässerige und saure Unterschicht wurde neutralisiert und trocken eingedampft. Der feste Rückstand zeigte keine Spur von den bekannten Cholesterinreaktionen. Die Trennung der beiden Acetate ging also vollständig von statten.

Durch die obigen Feststellungen wurde eine sichere Grundlage geschaffen zur quantitativen Isolierung der Cholesterinstoffe aus ihren Digitoninkomplexen.

II. Die direkte Acetylzahl des Digitonincholesterids möge die totale Acetylierung beider Komponenten dartun.

0,4982 g eines aus dem Lebercholesterin¹⁾ (vom Hund) gewonnenen reinen, bei 110° C. getrockneten Digitoninchole-

¹⁾ Dieses ist darum gewählt worden, weil es bekanntlich frei ist von dem mit Digitonin gleichfalls fällbaren Oxycholesterin.

sterids wurden in genau derselben Weise wie oben (unter I, S. 91) das reine Digitonin mit Acetanhydrid usw. behandelt. Es lieferte 0,6611 g Acetylierungsprodukt. Hier betrug also die Gewichtszunahme 0,1629 g = **32,69%** vom angewendeten Digitonincholesterid.

Unter denselben Voraussetzungen wie oben (unter I) beim reinen Acetyl-Digitonin mit 11 Acetylgruppen müßte das Digitonincholesterid bei seiner Acetylierung — der hinzukommenden Cholesterinkomponente entsprechend — 12 Acetylgruppen aufgenommen haben. Die theoretische Gewichtszunahme, auf das Molekül des Komplexes ($C_{54}H_{92}O_{28} \cdot C_{27}H_{46}O$) bezogen, würde **32,02%** betragen; also auch hier eine mit der experimentell gefundenen gut übereinstimmende Zahl, die gleichzeitig die oben beim reinen Acetyl-Digitonin ermittelte Acetylzahl hinlänglich bestätigt.

Nach diesen vorangegangenen Versuchen, an der Hand der dabei gewonnenen Daten, konnte nunmehr mit Sicherheit an die

III. Quantitative Bestimmung des Cholesterins im Digitonincholesterid

geschritten werden.

Um das Resultat der Trennung am sichersten zu gestalten und gleichzeitig eine Kontrolle zu gewinnen, wurde das oben unter II (S. 94) aus dem Komplex erhaltene Gemenge der Acetate beider Komponenten in zwei Portionen geteilt. In einer der Portionen wurde zunächst das Cholesterylacetat quantitativ getrennt und gewogen, um es nachträglich, behufs Bestimmung des freien Cholesterins der Gesamtmenge des Komplexes, mit dem Acetat der zweiten Portion zu vereinigen.

1. Zur Bestimmung des Cholesterylacetates wurden 0,3439 g des obigen Gemenges der Acetate in 10 ccm 90%igen Alkohols gelöst, mit 10 ccm 1%iger wässriger Natronlauge vermischt und die entstandene Emulsion 2¹/₂ bis 3 Minuten in mäßigem Kochen erhalten. Die weitere Behandlung des Saponifikats geschah genau wie oben unter I, 4 (S. 93)

bei der Verseifung und Trennung des künstlich zusammengestellten Gemenges der beiden Acetate und ergab im Endresultat 0,0740 g des in schönen Kryställchen ausgeschiedenen Cholesterylacetates = 21,52% von der hier angewendeten ersten Portion des Acetatgemenges.

Unter Zugrundelegung der oben angeführten Formel des total acetylierten Digitonincholesterids beträgt der theoretische Gehalt des Gesamtacetylierungsproduktes an Cholesterylacetat 20,60%, was mit der gefundenen Zahl recht gut übereinstimmt.

Eine noch genauere Zahl lieferte die

2. Bestimmung des Cholesteringehalts im Digitonincholesterid.

Zu diesem Ende wurde die 0,2797 g betragende zweite Portion des obigen Acetatgemenges¹⁾ — bis zum gut ausgewaschenen Ätherextrakte des abgetrennten Cholesterylacetates — genau so behandelt, wie die erste Portion des Gemenges. Der klar filtrierte Ätherextrakt wurde nun in derselben geräumigen Glasschale eingedampft, wo sich das Cholesterylacetat der ersten Portion unversehrt befand. Nach dem gänzlichen Verjagen des Äthers und des Wassers wurde die Gesamtsubstanz von den beiden Portionen mit etwa 10 ccm $\frac{1}{2}$ -norm. alkoholischer Kalilauge unter Uhrglasbedeckung 20 bis 30 Minuten auf dem Wasserbade gekocht, mit Wasser, etwas Alkohol und Äther in einen Scheidetrichter gespült und zweimal mit genügender Menge Äther ausgeschüttelt. Der gut ausgewaschene und klar filtrierte Ätherextrakt lieferte nach Beseitigung des Äthers das Gesamtcholesterin der beiden Portionen in schönen großen Täfelchen. Es wurde zunächst auf dem Wasserbade und dann — bis zur Gewichtskonstanz — bei 110° C getrocknet. Es betrug 0,1148 g.

Diese Cholesterinmenge resultierte aus $0,3439 + 0,2797 = 0,6236$ g des Acetatgemenges, dessen Gesamtmenge 0,6611 g betragen hatte. Diese Gesamtmenge der Acetate rührte von 0,4982 g Digitonincholesterids her. Berechnet man die

¹⁾ Der Rest der 0,6611 g betragenden Hauptmenge, soweit er vom Filter leicht ablösbar war.

im Endresultat erhaltenen 0,1148 g Cholesterin auf die Gesamtmenge der beiden Acetate (oder, was dasselbe ist, auf die angewendete Menge des Digitonin-cholesterids), nach der Proportionalgleichung, wo x = der Gesamtmenge des Cholesterins ist,

$$x : 1148 = 6611 : 6236,$$

so ergibt sich der gesamte gesuchte Cholesterinbetrag zu 0,1217 g = 24,42% von den in Arbeit genommenen 0,4982 g Digitonincholesterid, was mit dem theoretischen Betrag von 24,31%¹⁾ fast genau übereinstimmt.

Die nach dem Ausäthern der obigen Acetate aus dem partiell verseiften Gemenge abgelassene wässerig-saure Unterschicht wurde neutralisiert und trocken eingedampft. Der wenig hygroskopische Rückstand ist völlig frei von Cholesterin und enthält neben den anorganischen Salzen nur noch das vom Digitonincholesterid abgespaltene und «verseifte» Digitonin. Dieses ist unlöslich in Äther, leichtlöslich in Alkohol und Wasser. Die wässerige Lösung schäumt, wie das ursprüngliche Digitonin, stark beim Durchschütteln. Die alkoholische Lösung dieses Rückstandes fällt jedoch Cholesterin aus seinen Lösungen nur teilweise, träge und schleimig.

IV. Die praktische Analyse der Digitonin-cholesteride

ist — kurz gefaßt — folgende:

Etwa 0,5 g²⁾ des genau gewogenen wasserfreien Komplexes werden mit 5 ccm Acetanhydrid 20 bis 30 Minuten am Rückflußrohr in mäßigem Sieden erhalten und die heiße Lösung quantitativ in ca. 80 ccm Wasser eingetragen. Nach dem Erstarren des Reaktionsproduktes wird es möglichst vollständig auf ein Filter gebracht, mit Wasser gut ausgewaschen, abgesaugt und an der Luft oder im Vakuum getrocknet. Die Substanz wird dann, soweit es geht, vom Filter abgelöst, in ein Kölbchen gebracht, das Filter einige Male mit kleinen

¹⁾ Nach der Formel: $C_{55}H_{91}O_{25} \cdot C_{27}H_{46}O$. Die Formel: $C_{54}H_{92}O_{25} \cdot C_{27}H_{46}O$ fordert: 24,52% Cholesterin.

²⁾ Bei einer zuverlässigen und empfindlichen Wage läßt sich diese Analyse auch mit viel weniger Substanz ausführen.

Mengen 90%igen Alkohols ausgekocht, die Lösung auf 40 ccm aufgefüllt, in das Kochkölbchen zur Hauptmenge der Acetate gegossen, diese durch Erwärmen gelöst und mit 10 ccm 1%iger wässriger Natronlauge vermischt. Die entstandene Emulsion wird dann $2\frac{1}{2}$ bis 3 Minuten in mäßigem Sieden erhalten, rasch abgekühlt, mit Wasser etwas stärker verdünnt, mit verdünnter Salzsäure schwach angesäuert¹⁾ und mit Äther 2—3mal tüchtig und anhaltend ausgeschüttelt. Die vereinigten Ätherextrakte werden mit alkoholhaltigem Wasser wiederholt und gut ausgewaschen, und der Äther durch Destillation beseitigt. Der Rückstand (Acetat der Cholesterinkomponente) wird im Destillierkölbchen durch Befeuchten mit etwas absolutem Alkohol und Eintrocknen auf dem Wasserbade vom Wasser befreit, durch Kochen mit etwa 10 ccm $\frac{1}{2}$ -norm. alkoholischer Kalilauge in üblicher Weise verseift und ausgeäthert. Die gut gewaschene und klar filtrierte ätherische Lösung wird dann in einer gewogenen Glasschale eingedampft, der Rückstand — nunmehr die isolierte Cholesterin-Komponente — mit Alkohol auf dem Wasserbade vom Wasser befreit und bei 100 bis 105° C. bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Die so gewonnene Substanzmenge, auf 100 Teile des angewandten Komplexes bezogen, gibt dessen Prozentgehalt an dem gesuchten freien Cholesterinkörper an.

Je nach der Dauer der Kochung des Komplexes mit Acetanhydrid sieht das abgespaltene Cholesterin mehr oder minder gelblich gefärbt aus. Das Resultat ist jedoch zahlenmäßig stets durchaus zuverlässig.

Hamburg, Ende September 1917.

¹⁾ Das Ansäuern erleichtert die Trennung der beiden Schichten und verhindert die Aufnahme der in Äther gelösten Substanz durch die wässrige Unterschicht.