

Zur Kenntnis des Oxycholesterins und seiner Ester.

II. Mitteilung.

Von

J. Lifschütz in Hamburg.

(Der Redaktion zugegangen am 3. Februar 1916.)

I.

Angesichts des Interesses, welches das Oxycholesterin ($C_{27}H_{46}O_2$) als erheblicher Bestandteil der tierischen Lipoidstoffe fast aller Organe und Gewebe beansprucht, erschien — nächst der Feststellung seiner elementaren Zusammensetzung —¹⁾ die Ermittlung der Natur des zweiten Sauerstoffatoms als dringend geboten. Dies zweite, durch mild wirkende Oxydationsmittel auch künstlich in das Cholesterinmolekül eingeführte Sauerstoffatom²⁾ betreffend, lag von vorneherein auf Grund gewisser Anhaltspunkte³⁾ die Vermutung nahe, daß es sich auch hier — wie beim Cholesterin — um eine neue OH-Gruppe von alkoholischer Natur handelt, zumal der Körper weder die Reaktionen der Aldehyde noch die der Ketone zeigt. In neuerer Zeit erhielt diese Vermutung einen gewissen Grad von Wahrscheinlichkeit durch die Herstellung zweier isomerer Neutralkörper von gleicher Zusammensetzung mit dem Oxycholesterin, deren zweites Sauerstoffatom aber keine OH-Gruppe im Cholesterinmolekül bildet, sondern in Oxydform angelagert ist. Es sind dies die α - und β -Cholesterinoxyde, die Theodor Westphalen durch Oxydation des Cholesterins mit Benzopersäure erhalten hat,⁴⁾ die aber, wie weiter unten dargetan wird, mit dem Oxycholesterin nicht identisch sein können.

¹⁾ Siehe I. Mitteilung: «Berichte», Bd. 47, S. 1453—1459 (1914).

²⁾ Die Herstellung des Oxycholesterins siehe «Berichte», Bd. 47, S. 1453 (1914) u. a. O.

³⁾ Unter anderen: die Tatsache, daß die Oxycholesterinester des Darmstädterschen Wollwaxes (Lanocerin), wie des Wollfettes und des Blutfettes die Essigschwefelsäurereaktion erst nach ihrer Verseifung, nicht aber als solche zu geben pflegen.

⁴⁾ «Berichte», Bd. 48, S. 1064 (1915).

Das sonst einfachste und gebräuchlichste Verfahren zur Feststellung der alkoholartigen Natur von unverseifbaren neutralen Hydroxylverbindungen durch Esterifizierung derselben und darauffolgende Bestimmung der durch sie gebundenen Säurereste ist, wie ich an anderen Orte dargetan habe, beim Oxycholesterin nicht ohne weiteres anwendbar.¹⁾ Man erhält nämlich dabei stets im Reaktionsprodukt ein Gemenge von Estern der angewendeten und neu entstandener Säuren, das in diesem Zustande keinerlei Rückschlüsse auf die Natur des Alkohols gestattet.

Ein günstiger Umstand ließ indessen die Erreichung des Zieles erhoffen: Es ist dies die Beobachtung, daß das bei der Benzoylierung des Oxycholesterins mit Benzoesäureanhydrid entstandene Reaktionsprodukt wesentlich ärmer ist an Neubildungen als zum Beispiel das Acetylprodukt. Noch günstiger ist für die Isolierung des Benzoats die leichte Löslichkeit des rohen Reaktionsproduktes in absolutem Alkohol, wenn größere Mengen Benzanhydrid zugegen sind, obschon das gesuchte Benzoat darin nur sehr schwer löslich ist; und ferner die sehr schwere Löslichkeit des Produktes in Methylalkohol auch neben dem darin leicht löslichen Benzanhydrid. Daraus ergab sich für die

Herstellung des Oxycholesterin-Benzoats

folgendes Verfahren:

1 g gut vorgereinigten Oxycholesterins,²⁾ das nur noch kleine Beimengungen von unverändertem Cholesterin enthielt, wurde mit 3—4 g Benzoesäureanhydrid im Glasschälchen verschmolzen und auf dem Wasserbade bei 50—60° C. 22 bis 25 Stunden digeriert.³⁾ Während dieser Zeit ist über die Hälfte des Alkohols in das Benzoat übergegangen, wobei erhebliche Mengen Benzoesäure entwichen, die sich an den Wänden der Schale ansetzten und — um sie nicht in die Schmelze gelangen zu lassen — leicht weggeblasen werden konnten. Die ursprüng-

¹⁾ Siehe Biochem. Zeitschr., Bd. 48, S. 398 (1913).

²⁾ Siehe «Berichte», Bd. 47, S. 1453 ff. (1914).

³⁾ Vgl. auch «Berichte» («Zusammensetzung des Wolfettes VI»), Bd. 31, S. 1124 (1898).

lich leicht bewegliche und in der Wärme dünnflüssig ölige, in Methylalkohol leicht lösliche Schmelze wird mit dem Entweichen der Benzoesäure allmählich dickflüssiger und in Methylalkohol unlöslicher. Mit dem Glasstabe von Zeit zu Zeit gezogene Pröbchen werden dann im Reagenzglas von Methylalkohol nicht mehr gelöst, sondern als klebrige Öltröpfchen oder Flocken vom Glasstab abgespült. Von Äthylalkohol werden diese Pröbchen — falls keine namhaften Mengen unveränderten Cholesterins zugegen sind — vollständig gelöst. Auf Zusatz von Methylalkohol trübt sich diese Lösung langsam unter Abscheidung des Esters.

Um die Reaktion nicht zu weit gehen zu lassen und erheblichere Bildung von störenden Nebenprodukten zu vermeiden, wurde die Erwärmung nach etwa 22 Stunden unterbrochen und das Reaktionsgemisch in 20 ccm absoluten Äthylalkohols gelöst. Die Lösung blieb auch in der Kälte klar. Auf Zusatz von nur 1 ccm Methylalkohol entstand eine starke Trübung unter Abscheidung von etwaigem Cholesterinbenzoat und sonstigen Verunreinigungen, die sich nach längerem Stehen in der Kälte an den Gefäßwandungen absetzten und harzartig daran festhafteten. Die völlig klar gewordene Lösung wurde abgossen und mit noch etwas Methylalkohol versetzt. Die nunmehr schwache Trübung wurde durch Filtration beseitigt und die klare Lösung eingedampft. Die zurückgebliebene ölige Masse enthält die Hauptmenge des Oxycholesterin-Benzoats, freies Oxycholesterin, überschüssiges Benzanhydrid und etwas Benzoesäure. Die letzteren drei Körper sind in Methylalkohol leicht löslich, während das Benzoat darin selbst beim Kochen nur sehr schwer löslich ist. Das Gemisch wurde daher einigemal mit Methylalkohol ausgekocht und nach jeder Kochung die Flüssigkeit solange kalt stehen gelassen, bis die sich trübende Lösung völlig klar geworden war und von der am Gefäße harzartig fest haftenden Substanz auch klar abgossen werden konnte. Mit jeder Auskochung wurde das ursprünglich bei gewöhnlicher Temperatur weiche und fettige Reaktionsprodukt immer fester. Nach etwa viermaligem Auskochen war im Produkt freie Benzoesäure nicht mehr nach-

weisbar. Es konnte aber auch die völlige Beseitigung von freiem Oxycholesterin bzw. von Benzanhydrid — bei der leichten Löslichkeit dieser Körper im Methylalkohol und den wiederholten Auskochungen mit diesem Mittel — mit Sicherheit angenommen werden.

Sämtliche Filtrate wurden behufs weiterer Verarbeitung des darin noch restierenden freien Oxycholesterins beiseite gestellt.

Das in obiger Weise gereinigte Reaktionsprodukt wurde nunmehr im Glasschälchen durch wiederholtes Befeuchten mit absolutem Alkohol auf dem Wasserbade bis zum konstanten Gewicht getrocknet. Es stellt dann eine bräunlich gelbe, bei Wasserbadwärme teigartig weiche, zähe und feine Fäden ziehende Masse dar, die an der Luft schnell zu einem festen, spröden, lackartig glänzenden und glasartig durchsichtigen, also völlig amorphen Körper erstarrt. Er ist unlöslich in Wasser, schwer löslich in Äthylalkohol, noch schwerer in Methylalkohol und leicht löslich in Chloroform, Äther, Schwefelkohlenstoff und Kohlenwasserstoffen. Er gibt alle Reaktionen des Oxycholesterins mit ihren schönen und intensiven Farben und Absorptionsspektren, sodaß er — wie seine Muttersubstanz selbst — spektrometrisch auch analysiert werden konnte. Wie das Oxycholesterin besitzt auch dieses sein Derivat keinen scharfen Schmelzpunkt. Seiner äußeren Beschaffenheit nach ist der neue Körper seiner Muttersubstanz sehr ähnlich, zeigt aber nicht ihre elektrischen Eigenschaften und kann daher aus der Schale ohne zu spritzen entfernt werden. Durch Verseifung mit alkoholischem Kali spaltet er sich in Benzoesäure und Oxycholesterin: Er charakterisiert sich somit — wie ja schon seine Löslichkeitsverhältnisse in Äthyl- bzw. Methylalkohol voraussetzen ließen — als ein Oxycholesterinbenzoat.

Wie bereits oben angedeutet, konnte, da die Verbindung weder einen scharfen Schmelzpunkt noch Krystallform zeigte, ihre chemische Individualität nur auf analytischem Wege, d. h. durch die Konstanz der bei den Analysen der von verschiedenen Operationen stammenden Körper gewonnenen Zahlenwerte, hergeleitet werden. Hierbei kommt noch der günstige Umstand

gut zustatten, daß, wie aus nachstehendem hervorgeht, die Verbindung einer verschieden doppelten quantitativen Analyse unterzogen werden konnte, und zwar durch die Spektralanalyse wie durch die Gewichtsanalyse.

Die Spektralanalyse der Cholesterinstoffe ist wiederholt und ausführlich beschrieben worden.¹⁾ Da es sich hier um die Ermittlung des Oxycholesterins in einem neuen Derivat handelt, möge die Analyse desselben hier kurz wiedergegeben werden.

A. Spektrometrie des Oxycholesterin-Benzoats.

Analyse 1.

Die Bestimmung des im unverseiften Benzoat enthaltenen Oxycholesterins geschah in einer Chloroformlösung des Esters durch vergleichende quantitative Messung der Intensität der in der Lösung mit Eisessigschwefelsäure und Eisenchlorid hervorgerufenen Spektralreaktion gegenüber derselben Reaktion in einer gleichartigen Testlösung des reinen Oxycholesterins in folgender Weise:

Grundlösung B mit 0,1180 % des Benzoats in Chloroform,
 „ O „ 0,0590 % „ Oxycholesterin (Testlösung).

In gleich weiten, in $\frac{1}{10}$ ccm graduierten Reagenzgläsern von ca. 13 mm Durchmesser wurden je 1 ccm dieser Lösungen mit je 2 ccm Eisessigschwefelsäure²⁾ vermischt, nach 10 Minuten mit je einem Tropfen 2 % iger Eisenchlorid-Eisessiglösung versetzt und — nach vorsichtigem Durchmischen — die grüne Lösung vor das bekannte, mit Vergleichsprisma und Vergleichsspiegel versehene Spektroskop mit gerader Durchsicht (Dreiprismenkörper) an einer Lichtquelle von ca. 100 HK gespannt. Das bekannte Absorptionsspektrum (im Rot) des Gemisches aus Lösung B zeigte sich dem des anderen Gemisches (O) gegenüber als wesentlich intensiver; es wurde daher nach und nach vorsichtig mit Eisessig so lange verdünnt, bis es die Intensität

¹⁾ Siehe Biochem. Zeitschr., Bd. 48, S. 387 ff. (1913). Dasselbst Bd. 54, S. 218 ff. (1913). Dasselbst Bd. 62, S. 221 ff. (1914) u. a. a. O.

²⁾ 1 Vol. Schwefelsäure und 10 Vol. Eisessig. (Vorrätiges Reagenz.)

des Gemisches aus Lösung O erreichte.¹⁾ Es entstanden so die Gemische:

b : 2,95 ccm mit 0,02987% des Benzoats und
o : 3,00 » » 0,01966% Oxycholesterin.

Da nun nach Ausgleichung beider Absorptionsspektren in gleichen Raumteilen, wie nachgewiesen²⁾, auch gleiche Mengen Oxycholesterins enthalten sein müssen, so verhält sich der prozentuale Oxycholesteringehalt des Benzoates zu hundert wie die entsprechenden Konzentrationen (Festsubstanzgehalt) der beiden Reaktionsgemische zu einander. Das heißt:

$$X : 100 = 1966 : 2987.$$

Mithin enthält das Oxycholesterin-Benzoat **65,81% Oxycholesterin.**

Analyse 2

wurde mit einem Ester einer anderen Operation in gleicher Weise vorgenommen und zwar in folgenden Grundlösungen: Lösung B mit 0,132% des Benzoats in Chloroform und
» O » 0,059% reinen Oxycholesterins in Chloroform.

Nach Ausgleichung beider Spektralabsorptionen der in obiger Weise hervorgerufenen Essigschwefelsäure-Eisenchloridreaktion entstanden die Gemische:

b : 4,40 ccm mit 0,0300% des Benzoats und
o : 3,00 » » 0,01966% des Oxycholesterins.

Mithin: Oxycholesterin im Benzoat: **65,53%.**

Für das Oxycholesterin-Dibenzoat $C_{27}H_{44}O_2:(C_6H_5CO)_2$ berechnen sich: 65,91% Oxycholesterin (als $C_{27}H_{46}O_2$).

Für das Monobenzoat: 79,43% Oxycholesterin.³⁾

Demnach ist der in obiger Weise erhaltene Ester als Dibenzoat, und das ihm zugrunde liegende Oxycholesterin als zweiwertiger Alkohol anzusprechen. Dies bestätigt sich auch durch

¹⁾ Die Einzelheiten für etwaige Nachprüfungen dieser Spektralanalyse: siehe Biochem. Zeitschr., Bd. 48, S. 378—380 ff. (1913) u. a. O.

²⁾ Siehe Biochem. Zeitschr., Bd. 54, S. 226—229.

³⁾ Die Differenz im Oxycholesteringehalt der beiden Benzoate beträgt also rund 14%. Die entsprechenden Acetate dagegen differieren nur um 8% Oxycholesterins. Dies war auch ein Grund mehr, um für diese Untersuchung das Benzoat zu wählen.

B. Gewichtsanalysen des Oxycholesterin-Benzoesates.

Analyse 1.

Die Abspaltung des Oxycholesterins wurde, wie oben angedeutet, durch Kochung des Esters mit $n/2$ alkoholischer Kalilauge in folgender Weise herbeigeführt:

0,3333 g des Benzoesates wurde im mit Uhrglas zugedeckten Tiegelschälchen während 30—40 Minuten mit ca. 5 ccm der alkoholischen Lauge in schwachem Sieden erhalten. Hierauf wurde die Lösung mit etwa dem gleichen Volumen Wasser verdünnt und 5—6 mal mit Äther ausgeschüttelt. Die mit alkoholhaltigem Wasser gut ausgewaschenen vereinigten Ätherextrakte wurden zunächst nach Beseitigung des Lösungsmittels eingetrocknet. Da der Rückstand nie ganz frei von Benzoesäure resp. von deren Kalisalz befunden wurde, so wurde er wieder in Alkohol gelöst, die Lösung schwach alkalisch gemacht, mit Wasser verdünnt, noch einmal erschöpfend ausgeäthert, gut gewaschen und nach dem Abdestillieren des Äthers im gewogenen Glasschälchen bis zum konstanten Gewicht auf dem Wasserbade getrocknet. Das so zurückerhaltene säurefreie Oxycholesterin betrug 0,2143 g, also **64,3%** vom angewandten Oxycholesterin-Benzoesat.

Analyse 2,

genau so ausgeführt wie die erste Analyse. Hierbei ergaben 0,4101 g des einer neuen Herstellung entstammenden Benzoesats: 0,2704 g Oxycholesterin = **65,93%** vom angewendeten Ester. Beide Analysen ergaben also im Mittel: **65,1%** Oxycholesterin gegenüber **65,9%** des theoretischen Oxycholesterin-Dibenzoesats.

Von einer etwaigen Kontrolle dieser Zahlen durch eine Elementaranalyse des Benzoesats wurde Abstand genommen, weil sich das Monobenzoat vom Dibenzoesat nur um ca. 1% Wasserstoffgehalt unterscheidet. Im Kohlenstoffgehalt unterscheiden sie sich überhaupt nicht voneinander.

Die methylalkoholischen Lösungen, die von den Auskochungen des rohen Benzoesats abfielen und die, wie erwähnt, noch erhebliche Mengen von unverändertem Oxycholesterin und überschüssigem Benzoesäureanhydrid enthielten, wurden

abdestilliert und der dünnflüssige, ölige Rückstand in einer Glasschale längere Zeit auf dem Wasserbade bei 50—60° C. weiter digeriert. Auch hier entwichen reichliche Mengen Benzoesäure. Nachdem die Schmelze sichtlich dickflüssiger geworden war, wurde sie mit Methylalkohol, in dem sie nunmehr größtenteils nicht mehr löslich ist, ebenso behandelt, wie oben die erste Fraktion des ursprünglichen Reaktionsproduktes. Ich erhielt auf diese Weise eine weitere größere Menge des Benzoats, das bei der Analyse dieselben Zahlen lieferte, wie die oben wiedergegebenen.

Die Gesamtausbeute an Oxycholesterin-Dibenzoat entsprach 70—75% vom angewandten Oxycholesterin, wobei der Rest — anscheinend unverändert — neben kleinen Mengen des Esters, in den Reinigungsflüssigkeiten verblieben war.

Diese nachträgliche Esterbildung in den Rückständen des ursprünglichen Reaktionsproduktes spricht nicht nur dafür, daß unter gelinden Reaktionsbedingungen die Reaktion ziemlich glatt verläuft, sondern auch dafür, daß wir im Oxycholesterin, trotz seiner harzartigen Natur, die seine chemische Individualität nicht ohne weiteres erkennen läßt, einen einheitlichen Körper vor uns haben.

Was nun die Stellung des zweiten Hydroxyls im Molekül des Oxycholesterins betrifft, so muß ihre Ermittlung späteren Untersuchungen (vielleicht der Spaltungsreste oder Derivate des Körpers) vorbehalten bleiben.

Daß auch das Oxycholesterin, wie seine Muttersubstanz, das Cholesterin, eine ungesättigte Verbindung ist, folgt aus seiner Fähigkeit, bedeutende Mengen Brom oder Jod aufzunehmen.

II.

Oxycholesterin — Cholesterin-Oxyde ($C_{27}H_{46}O_2$).

Schon aus den wiederholt beschriebenen und auch im obigen angedeuteten Eigenschaften des Oxycholesterins geht zur Genüge hervor, daß die von Th. Westphalen durch Einwirkung von Benzopersäure auf Cholesterin erhaltenen und in ihrer chemischen Natur und Eigenschaften ausführlich be-

schriebenen Cholesterinoxyde mit dem Oxycholesterin wohl isomer, nicht aber identisch sein können. Nachstehende parallele Zusammenstellung der Eigenschaften der isomeren Verbindungen möge es bestätigen:

Eigenschaften:	Oxycholesterin ($C_{27}H_{46}O_2$)	α -Cholesterinoxyd ($C_{27}H_{46}O_2$) nach Westphalen
Morphologische Eigenschaften:	hellgelb. Harz, amorph, glasig-durchsichtig	perlmutterglänzende schmale Tafeln.
Schmelzpunkt	unter 100° C. weich, verflüssigt sich langsam zwischen 107 u. 113° C.	schmilzt bei 140 bis 141° C.
Digitoninfällung	fällt nur zu ca. 50% in rhombischen Blättchen	fällt fast quantitativ in feinen Nadelchen.
Schmelzpunkt der Digitoninverbindung	218° C.	zersetzt sich beim Erhitzen oberhalb 230° C.
Esterifizierung	liefert mit Benzoylchlorid ein Dibenzoylacetat	mit Acetanhydrid liefert es ein Monoacetat.
Acetylverbindung	amorph usw. wie Oxycholesterin	Krystallnadeln.
Schmelzpunkt des Acetats	bei $50-60^\circ$ C. dickflüssig	schmilzt bei 98° C.
Jod-Addition	bedeutende Mengen	keine ¹⁾ .
Liebermannsche Acetanhydrid-Schwefelsäurereaktion	rot-blau-grün	kirschrot-violett.
Chloroform-Schwefelsäurereaktion (nach Salkowski)	beide Schichten färben sich intensiv und rasch	färbt nicht die Chloroformschicht, sondern die Schwefelsäure rot.
Essigschwefelsäurereaktion (nach Lifschütz)	intensive Farben rot-blau-grün	keine Färbung.

¹⁾ Der Autor nimmt an, daß hier das neue O-Atom mit seinen beiden Valenzen an die zwei ungesättigten C-Atome zu einem «Oxydring» gebunden ist, sodaß das Molekül, als gesättigt, kein Jod mehr aufnehmen dürfte.

Das β -Cholesterinoxyd, aus den Mutterlaugen des α -Oxyds (von Westphalen) gewonnen, ist diesem ähnlich und schmilzt unscharf bei 100—110° C.

Auch dieser Körper lieferte ein Monoacetat vom Schmelzpunkt 114° C. und kann somit wie das α -Oxyd mit dem Oxycholesterin nicht identisch sein.

Die naheliegende Frage, ob diese neuen Westphalenschen Cholesterinoxyde auch unter den unverseifbaren Oxydationsprodukten des Cholesterins in den Fettgebilden der tierischen Organe vorkommen, mag vorderhand unentschieden bleiben. Für das Unverseifbare des Leberfettes z. B. kann dies jedoch jetzt schon als unwahrscheinlich gelten. Wie ich vor etwa zwei Jahren bereits mitgeteilt hatte, gelingt es, aus dem Unverseifbaren des Leberfettes vom Hund, nach Abscheidung der erheblichen Mengen des Cholesterins mit Digitonin und der Beseitigung der im Filtrat noch enthaltenen geringen Spuren von Cholesterin- und Oxycholesterindigitonid mit Wasser und Äther, in dem klaren ätherischen Auszug einen noch unbekanntem Neutralstoff zu erhalten,¹⁾ der ein Cholesterinderivat sein muß, aber, wie aus jener Mitteilung hervorgeht, mit den genannten Oxyden nicht identisch sein kann. Weitere Anhaltspunkte ergeben sich aus neueren Beobachtungen, deren Schilderung hier ihren Platz finden möge.

Da der so isolierte Stoff keine der bisher bekannten und durch scharfe Farb- und Spektralreaktionen gekennzeichneten Cholesterinstoffe mehr enthalten konnte, so war ich, gelegentlich weiterer Versuche, höchlich überrascht, als ich auf Zusatz von einigen Tropfen Schwefelsäure zur Eisessiglösung jenes neuen Stoffes eine intensive kirschrote Färbung erhielt, die beim Stehen bald in Violett, dann in ein schönes Blau und schließlich in Grün überging. Da Oxycholesterin ausgeschlossen war, so mußte hier ein neues Cholesterinderivat vorliegen. Die Spektralerscheinungen dieser neuen Essigschwefelsäurereaktion

¹⁾ Die ausführlicheren Einzelheiten der Abscheidung dieses Stoffes siehe diese Zeitschrift, Bd. 91, S. 320—322 (1914).

bestätigen es auch. Das Absorptionsspektrum bestand, vorzüglich im mittleren (blauen) Stadium der Reaktion, 1. aus einem schönen, dunklen, gut begrenzten schmalen Band im Orange, dieses ganze Spektralfeld auslöschend, und 2. einem schwächeren Band im Grün (dicht am Gelb) mit verschwommenen Rändern.¹⁾ Ein Zusatz von Eisenchlorid-Eisessiglösung veränderte weder Farbe noch Spektralbild,²⁾ vielmehr verblieben beide zunächst beständig, bis das Gemisch, langsam grün werdend, verblaßte, was nach dem Verlauf von 30—40 Minuten der Fall war.³⁾

Folgt schon aus dieser Farb- und Spektralreaktion, daß hier ein Cholesterinstoff vorliegen muß, so bestätigen es die weiteren Reaktionen vollständig:

Der Körper gab eine nur schwache Liebermannsche Reaktion, wurde aber seine Eisessiglösung mit einem Körnchen von Benzoxylsuperoxyd ein- bis zweimal aufgekocht und schnell abgekühlt, so gab die klare und farblose Lösung auf Zusatz von einigen Tropfen Schwefelsäure eine sehr intensive kirschrote, undurchsichtige Färbung mit starkem Band auf D (im Gelb des Spektrums) und schwacher Linie zwischen C und d (im Rot). Die Farbe ging bald in Blauviolett über. Auf Zusatz von einem Tropfen Eisenchloridlösung schlug die Farbe in ein intensives Grün um und zeigte dann im Spektrum den tief dunklen breiten Streifen zwischen C und d, also eine echte Oxycholesterinreaktion, wie sie auch Cholesterin nach seiner

¹⁾ Diese Absorption gehört den ersten roten und violetten Reaktionsstadien an und schwindet mit diesen Farbentönen, um der blauen Farbe mit dem Band im Orange Platz zu machen.

²⁾ Bei der bekannten Essigschwefelsäurereaktion des Oxycholesterins erscheint Band 1 im Gelb des Spektrums, verschwindet aber sofort auf Zusatz von 1 Tropfen Eisenchloridlösung, wobei die blauviolette Farbe in ein echtes Grün übergeht, die einen scharfen Streifen im Rot zwischen den Sonnenlinien C und d in Erscheinung treten läßt.

³⁾ Diese der eigentlichen Oxycholesterinreaktion hinsichtlich der Farben und Mittel äußerst ähnliche, in ihren Spektralabsorptionen aber total verschiedene Reaktion ist ein beredtes Beispiel dafür, wie irreführend kolorimetrische Identifizierungen von Substanzen durch Farbreaktionen sein können, wenn man nicht gleichzeitig ihre Absorptionsspektren zu Rate zieht. (Vgl. diese Zeitschr., Bd. 91, S. 310 u. 311 [1914] u. a. a. O.).

Abkochung mit Benzoylsuperoxyd in Eisessiglösung und darauf folgendem Zusatz von Schwefelsäure resp. Eisenchlorid zeigt.¹⁾

Um sich zu vergewissern, ob hier nicht etwa Cholsäure vorliegt, die ja nach ihrer Oxydation mit dem genannten Peroxyd in Eisessiglösung gleichfalls diese Reaktion gibt,²⁾ wurde das farbige Reaktionsgemisch mit Chloroform ausgeschüttelt. Nach der Klärung ging die gesamte Farbe, wie bei der entsprechenden Reaktion des Cholesterins, in die obere Schicht über. Bei der gleichen Reaktion der Cholsäure geht die Farbe in die untere Schicht, während die Oberschicht farblos bleibt.³⁾

Daß hier ein Oxydationsprodukt des Cholesterins vorliegt, geht daraus hervor, daß man auch beim Cholesterin nach seiner Oxydation mit milderem Mitteln, wie z. B. Eisenchlorid, diese neue Essigschwefelsäurereaktion hervorrufen kann.

Versetzt man nämlich 3 ccm einer 0,1—0,2%igen Lösung von reinem Cholesterin in Eisessig mit nur 5—8 Tropfen konzentrierter Schwefelsäure und durchschüttelt das Gemisch, so bleibt es zunächst farblos und färbt sich erst beim längeren Stehen schwach bräunlich. Von einem Absorptionsspektrum ist aber hier nichts zu merken. Vermischt man nun diese Lösung mit 2 Tropfen 5%iger Eisenchloridlösung, so färbt sie sich nur schwach grünlich und zeigt auch dann noch keine Absorption im Spektrum. Versetzt man dagegen die ursprüngliche reine Cholesterinlösung mit einem großen Überschuß von konzentrierter Schwefelsäure (etwa 20—30 Tropfen), so färbt sie sich beim Stehen schwach rosa und zeigt im Spektrum nur schwache Ansätze von Absorptionen an beiden Enden des grünen Spektralfeldes. Vermischt man nunmehr dieses Gemisch mit einigen Tropfen Eisenchloridlösung, so färbt sie sich in kurzer Zeit stark kirschrot und zeigt im Spektrum zunächst ein breites Band im Grün dicht am Gelb. Nach längerem Stehen geht die Farbe in Violett, Blauviolett und Blau über,

¹⁾ «Berichte», Bd. 41, S. 252 (1908); vgl. auch diese Zeitschr., Bd. 91, S. 321 (1914).

²⁾ «Berichte», Bd. 47, S. 1459 (1914).

³⁾ Vgl. diese Zeitschr., Bd. 92, S. 396 (1914).

das Band im Grün wird durchsichtiger und schmaler, währenddessen ein schmales Band im Orange auftritt, das sich bald verstärkt und vertieft. Die Lösung wird schließlich grün¹⁾ und verblaßt dann bald gänzlich. Im blauen Mittelstadium der Reaktion, wo sie am sichersten vergleichbar ist, stimmen Farbe und Spektrum mit denen der obigen Lebersubstanz völlig überein.

Wie ersichtlich, sind diese Erscheinungen dieselben, wie ich sie am oben erwähnten Neutralstoff des Leberfettes wahrgenommen hatte. Aus dem ganzen Hergang der am reinen Cholesterin hervorgerufenen neuen Reaktion geht aber hervor, daß man es hier mit einer Oxydation des Cholesterins zu tun hat, die einen neuen Körper²⁾ entstehen läßt, welcher die Farben- und Spektralerscheinungen an den Tag liefert.

Daß also auch dieser neue Cholesterinstoff, wie er aus der Hundeleber isoliert werden kann, mit den oben angeführten Westphalenschen Cholesterinoxyden, wie erwähnt, nicht identisch sein kann, geht außerdem auch daraus hervor, daß der Körper amorph und fettig ist³⁾ und die Liebermannsche Cholesterinreaktion nicht gibt, während die genannten Cholesterinoxyde Krystallkörper sind und mit Acetanhydrid und H_2SO_4 starke Reaktionen geben.

Hamburg im Januar 1916.

¹⁾ In diesem letzten Stadium der Reaktion tritt eine schwache Linie im Rot des Spektrums auf, was auf die Oxydation des Cholesterins bis zum Oxycholesterin hindeuten dürfte.

²⁾ Mit der Isolierung und Untersuchung dieses Körpers bin ich noch beschäftigt und hoffe, in absehbarer Zeit auf diesen Gegenstand zurückzukommen.

³⁾ Vgl. diese Zeitschr., Bd. 91, S. 320 ff. (1914).