

Untersuchung des Fetts der Gonaden von *Rhizostoma Cuvieri*.

Von

cand. med. Felix Haurowitz.

(Aus dem med.-chem. Institut der Prager deutschen Universität.)

(Der Redaktion zugegangen am 5. November 1920.)

Das Ausgangsmaterial für diese Untersuchung wurde gelegentlich der Studien R. Zeyneks über Rhizostomen in Triest gesammelt. Die Gonaden, welche von den Organen des Quallenkörpers die höchste Konzentration besitzen ¹⁾, wurden vom Gallertgewebe möglichst befreit und sofort nach dem Einbringen in die Triester zoologische Station mit einer solchen Menge von festem Ammonsulfat verrührt, daß etwas Ammonsulfat ungelöst blieb. Dadurch gaben die Gonaden einen großen Teil ihres Wassers ab, es gelang aber nicht, sie ganz davon zu befreien. Es wurde daher die wäßrige Lösung abgegossen, der Rückstand wurde mit etwa 1¹/₂ Volumen 96^o/₁₀₀igen Weingeistes verrührt, wobei er zusammenschrumpfte. Nach dem Abgießen der Lösung wurde mit Weingeist, hierauf mit Äther extrahiert.

Der erste, stark wasserhaltige Alkoholextrakt wurde in flachen Schalen auf dem Wasserbade abgedampft, da bei Versuchen, den Alkohol zu destillieren, ein starkes Schäumen eintrat, welches sich nicht beseitigen ließ. Die übrigen Extrakte wurden von den Lösungsmitteln durch Destillation befreit, schließlich unter Evakuierung im siedenden Wasserbad. Die nun erhaltenen öligen, braungelben Rückstände wurden mit (über Natrium destilliertem) Äther aufgenommen, die klaren ätherischen Lösungen wurden durch Destillation, schließlich wiederum im Vakuum, vom Äther befreit.

¹⁾ Zeynek, Monatshefte für Chemie Bd. 34, S. 598 (1913).

Es wurden so 98 g Fett erhalten, was etwa 0,4 % des Gewichts vom Ausgangsmaterial entspricht.

Das Fett war braun gefärbt, zeigte eine geringe grüne Fluoreszenz, bei Zimmertemperatur zähflüssig, von eigentümlich tranigem, etwas stechendem, sehr haftendem Geruch. Beim längeren Stehen schied es sich in eine zähe untere und in eine leichter flüssige obere Schichte. Erstere erstarrte bei 7° zu einer teigig festen Masse, doch konnten auch bei tieferen Temperaturen und bei längerem Stehen keine kristallinen Abscheidungen erhalten werden. Die erwähnten beiden Schichten schienen gleich intensiv gefärbt, spektroskopisch zeigten sie eine diffuse Lichtauslöschung im grünen und blauen Spektralteil.

Bei der orientierenden, üblichen Untersuchung des durch Erwärmen und Durchschütteln homogen gemachten Fetts wurden folgende Werte (Mittel aus gut stimmenden Doppelbestimmungen) erhalten:

Spezifisches Gewicht bei 17,5°	0,9606
Säurezahl	52,2
Verseifungszahl ¹⁾	190,7
Hehnersche Zahl	83,7
Jodzahl ²⁾	110,4
Reichert-Meißlsche Zahl ³⁾ für 5 g	2,6
Neutralisationszahl der wasserlöslichen Säuren für 5 g	60,0

¹⁾ Da die Neutralisation der dunkelbraunen Lösung Schwierigkeiten machte, so wurde versucht, die Verseifungszahl nach Henriques (Zeitschr. f. angew. Chemie 1895, S. 721) und nach Mc Illhiney (J. amer. chem. soc. Bd. 16, S. 408 [1894], zit. nach Jahresb. d. Chemie 1894, S. 2598) zu bestimmen. Die erhaltenen Werte differierten so stark — was nach der später gefundenen Zusammensetzung des Fetts übrigens nicht wunderlich erscheint —, daß auf die übliche Methode zurückgegangen wurde. Die Titration wurde in stark verdünnter alkoholischer Lösung gegen Vergleichslösungen durchgeführt.

²⁾ Nach Hübl; nach Wijs (Chem. revue 1899, 1, und Fres. Zeitschr. Bd. 37, S. 277 [1898]) wurde ein übereinstimmender Wert, nämlich 111,0, erhalten.

³⁾ Die obige Zahl wurde erhalten, als in der üblichen Weise die Bestimmung ausgeführt wurde. Bei fortgesetzter Destillation gingen aber weitere Säuremengen über; so wurde nach 5maliger Destillation die Reichert-Meißlsche Zahl 8,7 gefunden. Daher wurde die Neutralisations-

Der Stickstoffgehalt des Fetts betrug 0,542 %, der Phosphorgehalt 0,335 %, der Chlorgehalt 2,87 %. Brom, Jod, Schwefel fehlten; eine kleine Aschenmenge, die nur aus Natronsalzen bestand, wurde nicht quantitativ bestimmt.

Belege: 0,4146 (0,3789) g wurden nach Kjeldahl oxydiert, 40,0 cm³ vorgelegte $\frac{1}{70}$ n-Salzsäure verbrauchten 28,8 (29,7) cm³ $\frac{1}{10}$ n-Kalilauge bis zur Neutralisation bei Methylrot (nach Pregl).

0,7822 (1,5820) g wurden im Silbertiegel mit reinem Ätzkali und Salpeter geschmolzen, nach Woy mit Ammoniummolybdat gefällt, schließlich wurde Mg₂P₂O₇ gewogen; erhalten wurden 0,0093 (0,0197) g Mg₂P₂O₇.

Da die Beilsteinsche Halogenprobe mit Kupferdraht eine intensiv grüne Flammenfärbung gab, wurden 0,1735 (0,1538) g nach Carius aufgeschlossen. Erhalten wurden 0,0204 (0,0179) g Halogensilber; dasselbe erwies sich als reines Chlorsilber.

Zur eingehenderen Untersuchung wurden 21,9 g des Fetts mit alkoholischem Ätzkali am Rückflußkühler verseift, nach dem Abdestillieren des Alkohols wurden die Seifen in Wasser gelöst und 5 mal mit Petroläther (Sp. 41—78°) ausgeschüttelt. Die Petrolätherextrakte wurden mit Wasser, dann nach Hönig und Spitz¹⁾ mit 50 % igem Weingeist gewaschen.

Die Waschflüssigkeiten reagierten gegen Phenolphthalein alkalisch, bei ihrem Abdampfen wurde ein Rückstand von 0,0245 g erhalten.

Die gereinigten Petrolätherextrakte gaben einen Rückstand von 0,472 g = 2,17 % des Gesamtfetts. Da augenscheinlich im Unverseifbaren viel Cholesterin enthalten war, so wurde, da dasselbe doch schwer durch Petroläther extrahiert wird, nochmals die Seifenlösung, und zwar mehrmals mit Äther, ausgeschüttelt. Die wiederholt mit Wasser gewaschenen Ätherauszüge gaben einen Rückstand von 0,144 g (= 0,65 % des Gesamtfetts), der dem Aussehen und der Reaktion nach Cholesterin war.

Demnach beträgt die Gesamtmenge des unverseifbaren Anteils 2,9 % des Fetts.

zahl der wasserlöslichen Säuren nach Bondzynski und Ruffi (Fres. Zeitschr. Bd. 29, S. 1 [1890]) als ein verlässlicherer Wert bestimmt. Daß auch dieser Wert nicht allein auf Fettsäuren zu beziehen ist, ergibt die weitere Untersuchung.

¹⁾ M. Hönig und G. Spitz, Zeitschr. f. angew. Chem. 1891, S. 565.

Zur weiteren Untersuchung des „Unverseifbaren“ habe ich nur die Petrolätherextrakte verwendet. 0,362 g davon wurden mit 2 cm³ Essigsäureanhydrid gekocht. Dabei trat eine vollständige Lösung ein. Nach Lewkowitsch¹⁾ darf daraus auf die Abwesenheit von Kohlenwasserstoffen geschlossen werden.

Nach dem Erkalten der mit Essigsäureanhydrid erhaltenen Lösung fiel ein dichter weißer Niederschlag heraus, welcher sich auf Wasserzusatz noch vermehrte. Der filtrierte, mit heißem Wasser gewaschene Niederschlag löste sich in Äther leicht und vollständig auf. Nach dem Vertreiben des Äthers wurde der Rückstand in heißem Weingeist gelöst, beim Erkalten der Lösung entstand ein kristallinischer Niederschlag, der abfiltriert und aus Äther umkristallisiert wurde. Erhalten wurden Plättchen vom Sm 114—115°, ihr Gewicht betrug 0,205 g. Sie gaben die Cholesterinreaktionen von Salkowski, Neuberg und Liebermann-Burchard sehr intensiv, letztere mit schön smaragdgrüner Färbung, welche erst nach etwa 10 Stunden ins Olivgrüne überging.

Auch in der weingeistigen Lösung befanden sich noch Sterine²⁾, wie die Reaktionen ergaben. Nach dem Abdampfen des Weingeists resultierte ein mit Kristallen durchsetztes Öl. Es wurde im Vakuum fraktioniert. Bei 200° und 15 mm Druck ging eine farblose Flüssigkeit über (0,137 g), die keine Cholesterinreaktionen gab und Brom nicht addierte, bei niedrigerer Temperatur zu kleinen länglichen Prismen erstarrte. Ein weiteres Erhitzen bis auf 280° gab kein Destillat mehr. Der Destillierrückstand (0,028 g) gab die Cholestolreaktionen und dürfte lediglich Sterinacetat gewesen sein.

Um die Vermutung, daß der überdestillierte Anteil Cetylalkohol sei, was nach dem Siedepunkt wahrscheinlich war, zu bekräftigen, wurden 0,2 g des „Unverseifbaren“ bei 15 mm Druck destilliert. Bei 190° ging eine farblose Flüssigkeit über, die bald erstarrte. Bei weiterer Destillation bis 280°

¹⁾ Technologie und Analyse der Öle etc. 1905, S. 410.

²⁾ Leider war es uns damals absolut unmöglich gewesen, etwas Digitonin zur Ausführung der Fällung nach Windaus uns zu verschaffen.

ging nichts mehr über. Das Destillat schmolz bei 50–51°. Es gab die Farbreaktion von Guérin¹⁾ mit konzentrierter Schwefelsäure und Furfurol (tief-rotviolette Färbung) in ausgezeichnetem Maße, addierte kein Brom, gab bei Oxydation mit schmelzendem Ätzkali eine Seife, aus der eine ätherlösliche feste Säure vom Schmelzpunkt 63° gewonnen wurde, also Palmitinsäure.

Untersuchung der Fettsäuren.

Bei der Untersuchung der flüchtigen Fettsäuren ergab sich, daß die eingangs erwähnte Differenz bei der Reichert-Meißlschen Zahl und die hohe Neutralisationszahl der wasserlöslichen Säuren durch die Gegenwart von salzsaurem Trimethylamin verursacht ist. Daher fand sich unter den flüchtigen Fettsäuren Salzsäure; andererseits reagiert Trimethylaminchlorhydrat gegen Phenolphthalein sauer. Nachdem diese Fehlerquelle erkannt worden war, wurde die wäßrige Lösung gegen Phenolphthalein neutralisiert, hierauf mit $\frac{1}{10}$ n-Salzsäure gegen Methylorange titriert²⁾.

2,3929 (1,9874) g Fett verbrauchten zur Neutralisation der wasserlöslichen Säuren gegen Phenolphthalein 28,0 (24,2) cm³ $\frac{1}{10}$ n-Kalilauge. Nach Zusatz von Methylorange waren zur Neutralität 18,3 (16,1) cm³ $\frac{1}{10}$ n-Salzsäure erforderlich.

Demnach wäre die Zahl für wasserlösliche Fettsäuren anstatt 60,0 auf 39,2 anzunehmen.

Von flüchtigen Fettsäuren wurden Ameisensäure und Caprylsäure nachgewiesen, erstere durch Reduktionsproben, letztere nach fraktionierter Salzfällung durch den Siedepunkt (135° bei 15 mm Druck) und durch den Geruch. Andere flüchtige Fettsäuren waren nicht auffindbar.

Die Trennung der gesättigten und der ungesättigten Fettsäuren geschah durch Ätherextraktion ihrer Bleisalze in gewohnter Weise. Verwendet wurden 15 g des Fettsäuregemisches, erhalten wurden 36% gesättigte, 64% ungesättigte Fettsäuren. Die freien, gesättigten Fettsäuren wurden durch

¹⁾ Guérin, Journ. Pharm. Chim., 6. Sér., Bd. 21, S. 14 (1905), zitiert nach Zeitschr. f. anal. Chemie Bd. 44, S. 436 (1905).

²⁾ Zega, Chemikerzeitung Bd. 19, S. 504 (1895).

fraktionierte Vakuumdestillation und durch fraktionierte Fällung der Baryumsalze getrennt. Nachgewiesen wurden Myristinsäure und Palmitinsäure.

Myristinsäure: Sm $53,4^{\circ}$, $53,6^{\circ}$; Silbersalz: gef. 31,95 % Ag, ber. 32,15 %; geringe Flüchtigkeit mit den Wasserdämpfen, das Destillat gab den richtigen Schmelzpunkt der Myristinsäure.

Palmitinsäure: Sm $63,0^{\circ}$, Sp 215° bei 16 mm Druck.

Auffallend ist das Fehlen von Stearinsäure, deren Gegenwart nicht hätte unbemerkt bleiben können.

Die Mengenverhältnisse von Myristinsäure : Palmitinsäure können auf 3 : 2 geschätzt werden.

Das ursprüngliche Gemisch der gesättigten Säuren schmolz bei 47° , was nach Heintz dem Verhältnis von 60 % Myristinsäure und 40 % Palmitinsäure entspricht. 0,241 g des Fettsäuregemisches brauchte zur Neutralisation $10,2 \text{ cm}^3 \frac{1}{10}$ n-Kalilauge, woraus sich die Säurezahl 236 ergibt. Die Säurezahl der Palmitinsäure ist 219, jene der Myristinsäure 246.

Die aus den Bleisalzen freigemachten ungesättigten Fettsäuren gaben die Jodzahl 177.

Die ungesättigten Säuren wurden nach dem Verfahren von Matthes und Boltze¹⁾ bromiert. Die Eisessiglösung war nach der Bromierung stark getrübt („Hexabromidprobe“ nach Lewkowitsch²⁾). Sie wurde durch ein gewogenes Asbestfilter filtriert, das Filter wurde mit Ätheralkohol gewaschen. Auf dem Filter blieben 0,462 g eines zähen, weißen Rückstandes. Nach der Extraktion desselben mit siedendem Benzol blieben noch 0,312 g ungelöst. Dieser ungelöste Teil war ein weißes amorphes Pulver. Erhitzt schwärzte es sich bei 190° , ohne zu schmelzen (Octobromid nach Lewkowitsch³⁾). Eine Halogenbestimmung war nicht durchführbar, da es nicht gelang, den Niederschlag in einwandfreier Weise vom Filter loszubekommen.

Der „Hexabromid“rückstand kristallisierte aus dem Benzol

¹⁾ H. Matthes und W. Boltze, Arch. f. Pharm. Bd. 250, S. 222 (1912).

²⁾ l. c. S. 342.

³⁾ Ebenda S. 399.

aus. Sein Schmelzpunkt betrug 176° , demnach dürfte Linolensäurehexabromid vorhanden gewesen sein.

Die Hauptmenge (5,2 g) bestand aus Tetrabromiden. Sie wurden aus der klar filtrierten Eisessiglösung nach Verdünnen mit Wasser durch Ätherausschüttlung gewonnen. Nach dem Verdunsten des Äthers wurde Petroläther zugefügt, er löste von diesem Rückstand nichts auf, es fehlt also Ölsäure (Dibromid).

Zur weiteren Charakterisierung wurde ein Teil der ungesättigten Fettsäuren in die Baryumverbindungen übergeführt, diese wurden mit heißem Benzol, dem 5 % Weingeist zugesetzt war, gelöst¹⁾. Beim Erkalten trübte sich die Lösung und ließ eine kleine Menge eines feinen, pulvrigen Niederschlags fallen. Die aus ihm in Freiheit gesetzte Säure war fest, bei der Probe von Lifschütz²⁾ mit Eisessig und Chromsäure trat keine Grünfärbung auf. Es dürfte eine kleine Menge von gesättigten Fettsäuren bei der Extraktion der Bleiseifen in das Filtrat gelangt sein.

Die in Benzol löslichen Baryumseifen wurden mit Salzsäure zerlegt und bei 15 mm Druck destilliert. Bei 233° destillierte die Hauptmenge über, das Destillat blieb flüssig, auch längere Zeit auf 0° abgekühlt. Der Destillierrückstand löste sich in Äther nicht auf, er ist jedenfalls ein Oxydations- und Zersetzungsprodukt.

Zur weiteren Sicherstellung, daß hier Linolsäure vorliegt, wurde noch eine Oxydation mit alkalischer Chamäleonlösung nach Hazura³⁾ vorgenommen. Die Hauptausbeute war Sativinsäure. Dioxystearinsäure fehlte vollkommen, Hexoxysäure war nur in derart geringen Mengen vorhanden, daß sie nicht sicher charakterisiert werden konnte.

Oxyfettsäuren waren bei vorsichtigem Arbeiten im Kohlensäurestrom nicht nachweisbar; bei der gewöhnlichen Arbeitsweise, ohne Luftabschluß, traten sie vielfach, störend, auf.

¹⁾ Farnsteiner, Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußmittel Bd. 2, S. 9 (1899) und ebenda Bd. 1, S. 390 (1898), zitiert nach König, Chemie d. menschl. Nahr. usw. Bd. III, S. 391 (1910).

²⁾ Diese Zeitschr. Bd. 56, S. 446 (1908).

³⁾ Monatshefte für Chemie, 1887—1889.

Glycerin konnte qualitativ mit aller Sicherheit in größeren Mengen nachgewiesen werden.

Untersuchung der phosphor- und stickstoffhaltigen Substanzen.

Eine Darstellung der in den Gonaden enthaltenen Phosphatide schien bei der geringen zur Verfügung stehenden Fettmenge kaum ausführbar zu sein, um so weniger, als die Substanz in den üblichen organischen Lösungsmitteln, auch in Aceton, vollkommen löslich war. In einem Gemisch von Äthyl- und Amylalkohol setzten sich zwar einige kleine Tröpfchen ab, jedoch in so geringer Menge, daß sie nicht einmal für eine qualitative Phosphorbestimmung gereinigt und verwendet werden konnten. Ich begnügte mich daher, nach stabileren, leichter isolierbaren stickstoff- und phosphorhaltigen Verbindungen zu suchen, um je nach dem Resultat der Untersuchung einen Schluß auf ursprünglich vorhandene größere Atomkomplexe mit einiger Wahrscheinlichkeit ziehen zu können.

Nachgewiesen wurden: Cholin, Trimethylamin, Phosphorsäure frei und in organischer Bindung.

Zum Nachweis von Cholin wurde nach Verseifung, Abscheidung der Fettsäuren, Abscheidung der Phosphate mit Barytwasser und Entfernung des überschüssigen Baryumhydroxyds mit Kohlensäure, der erhaltene Rückstand mit Weingeist aufgenommen und die Lösung mit Quecksilberchlorid gefällt. Aus der Fällung wurden nach Entfernung des Quecksilbers zerfließliche lange Nadeln erhalten, die mit Phosphorwolframsäure, Kaliumquecksilberjodid, Kaliumwismutjodid, Jodjodkalium, Gerbsäure Fällungen gaben. Mit Platinchlorid entstand in alkoholischer Lösung ein Niederschlag, welcher sich im Wasser leicht löste und zu mikroskopischen, orangeroten Prismen auskristallisierte. Beim Erwärmen mit Lauge entstand Trimethylamin. Die qualitativen Reaktionen auf primäre und sekundäre aliphatische Amine nach Rimini¹⁾ waren negativ.

In reichlicher Menge fand sich Trimethylamin, an

¹⁾ E. Rimini, Chem. Ztbl. Bd. 2, S. 132 (1898).

Salzsäure gebunden, vor. Es konnte aus dem Fett durch wiederholtes Schütteln mit Wasser isoliert werden; besser und rascher wurde es durch Destillation des Fettes nach Zusatz methylalkoholischer Lauge gewonnen. So wurden während einer einstündigen Destillation 0,0205 g Trimethylamin (Hydrochlorid) aus 1,123 g Fett erhalten, jedoch war im Destillierrückstand ein noch immer starker Geruch nach Trimethylamin wahrnehmbar.

Bei der Verseifung des Fetts mit Lauge konnte nach Abscheidung der Fettsäuren in der wäßrigen Lösung Phosphorsäure nachgewiesen werden. 21,9 g Fett gaben nach Woys Verfahren 0,0811 g Magnesiumpyrophosphat, entsprechend 0,103 % Phosphor (gegen 0,335 % Gesamtphosphorgehalt). Glycerinphosphorsäure konnte nicht nachgewiesen werden; es stellte sich schließlich heraus, daß der übrige Phosphor den in Äther gelösten Fettsäuren anhaftete. Leider war bei der Reinigung der Fettsäuren diese Substanz teilweise — als oxydierte oder zersetzte Säure, als Verunreinigung betrachtet — weggeworfen worden. Der noch zur Untersuchung gelangte Rest gab beim Erhitzen Acroleingeruch, war in Weingeist löslich und zeigte unter dem Mikroskop kleine gekrümmte, stäbchenförmige Kristalle. Nach der Soda-Salpeterschmelze wurde eine starke Phosphorsäurereaktion mit Molybdänsäure erhalten. Ein Schmelzpunkt konnte nicht bestimmt werden, da schon vor dem Schmelzen Zersetzung eintrat. Die orientierenden, mit den kleinen Mengen ausgeführten Untersuchungen machen es wahrscheinlich, daß eine zweibasische Säure vorliegt, vielleicht ein Ester einer Glycerinphosphorsäure (wie einen solchen Parnas¹⁾ aus Kephalin isoliert hat).

Nach diesen Erfahrungen ist es wahrscheinlich, daß ein Monoamino-monophosphatid in den Gonaden enthalten sei.

Betreffend den Chlorgehalt des Gonadenfetts vermuteten wir anfangs neben dem als primärer Substanz an sich unerwarteten Hydrochlorid des Trimethylamins gechlorte

¹⁾ Biochem. Zeitschr. Bd. 22, S. 411.

Fettsäuren oder andere organische Verbindungen, in welchen das Chlor fest gebunden wäre. Es ergab sich aber, daß durch etwa 15 maliges Ausschütteln der ätherischen Fettlösung mit Wasser sämtliche Chlorverbindungen vom Wasser aufgenommen wurden, und daß in der wäßrigen Lösung das Chlor nur als Ion vorhanden war. Auf die Störungen, welche die Gegenwart des Trimethylaminchlorids bei der Bestimmung der Säurezahl, der Verseifungszahl usw. hervorbrachte, ist schon hingewiesen.

Was die Untersuchung von Farbstoff und Riechstoff des Gonadenfetts anbelangt, so ist ersterer wohl als ein Lutein-farbstoff anzusehen. Im frischen Zustand sind die Gonaden der *Rhizostoma* hell- bis bräunlichgelb im auffallenden Gegensatz zum übrigen Quallenkörper. In dem mir vorliegenden Untersuchungsmaterial war der ursprüngliche Farbstoff wahrscheinlich durch Oxydation verändert; Luteinreaktionen gelangen nicht. Es sei bemerkt, daß der Farbstoff hartnäckig an den wasserunlöslichen Fettsäuren und deren Seifen haftete.

Der Riechstoff des Fetts zersetzt sich bei der Verseifung, es ergab sich kein Hinweis darauf, welche Substanz den auffallenden Geruch bewirkt.

Bei dieser Untersuchung des Gonadenfetts, die nun durch die Untersuchung der ätherunlöslichen, weingeistlöslichen Fraktion ergänzt werden soll, ergibt sich als besonders auffallend die Gegenwart von salzsaurem Trimethylamin als anscheinend ursprünglichem Bestandteil der Gonaden, ferner das vollkommene Fehlen von Stearinsäure und von Ölsäure, das meines Wissens bei keinem tierischen Fette beobachtet ist.