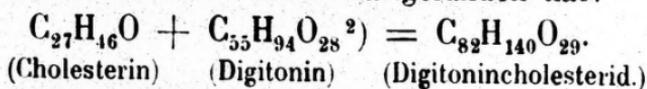


Über die quantitative Bestimmung des Cholesterins und der Cholesterinester in einigen normalen und pathologischen Nieren.

Von
A. Windaus.

(Aus der medizinischen Abteilung des chemischen Universitätslaboratoriums Freiburg i. B.
(Der Redaktion zugegangen am 7. Februar 1910.)

Vor einiger Zeit habe ich bei Untersuchungen über die Entgiftung der Saponine durch Cholesterin¹⁾ beobachtet, daß das Cholesterin in alkoholischer Lösung mittels einer alkoholischen Lösung von Digitonin fast quantitativ als Komplexverbindung ausgefällt wird. Die Analysen des Digitonincholesterids beweisen, daß es aus einem Molekül Cholesterin und einem Molekül Digitonin zusammengesetzt ist und daß diese Vereinigung ohne Austritt von Wasser stattgefunden hat:



Die Additionverbindung ist unlöslich in Wasser, Aceton und Äther, sehr wenig löslich³⁾ in kaltem 95%igen Alkohol, leichter löslich in kochendem absoluten Alkohol, in Methylalkohol, Eisessig und besonders in Pyridin. Sie ist sehr beständig, und es ist mir erst kürzlich gelungen, aus der Komplexverbindung die beiden Komponenten unverändert zurückzugewinnen. Während es nämlich beim Cyclamincholesterid und bei anderen Saponincholesteriden gelingt, durch Extraktion mit Äther das Cholesterin herauszulösen, versagt dieses Verfahren beim Digitonincholesterid. Bei höherer Temperatur wird indessen auch die Dissoziation des Digitonincholesterids so merklich, daß man durch Lösungsmittel, die nur Cholesterin, nicht aber Digitonin auflösen, eine Zerlegung der Komplexverbindung durchführen kann. Am besten eignet sich hierzu siedendes Xylol: 10 g Digitonincholesterid werden in eine Extraktionshülse gebracht und in dem Apparat von Stock⁴⁾ zehn Stunden

¹⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XLII, S. 238 (1909).

²⁾ Über die Formel des Digitonins siehe Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XLII, S. 239, Anmerkung 6 (1909).

³⁾ 100 ccm 95%iger Alkohol lösen bei 18° die 0,004 g Cholesterin entsprechende Menge Digitonincholesterid.

⁴⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXIX, S. 1976 (1906).

mit siedendem Xylol extrahiert; das Cholesterin geht dann vollständig in das Xylol über und läßt sich durch Abdestillieren des Xylols mit Wasserdampf leicht rein erhalten, während das Digitonin in der Extraktionshülse ungelöst zurückbleibt; es wird mit Äther ausgewaschen und kann dann direkt oder nach dem Umkrystallisieren aus 10 Teilen 85%igem Alkohol für eine neue Fällung verwandt werden. Für die praktische Anwendung der Methode ist es sehr wichtig, daß es leicht gelingt, das wertvolle Digitonin¹⁾ vollständig zurückzugewinnen.

Ebenso wie das Cholesterin verhalten sich alle bisher untersuchten, natürlich vorkommenden Sterine gegenüber Digitonin, während noch keine anderen Verbindungen aufgefunden worden sind, die mit dem Digitonin unlösliche Additionsprodukte liefern. Das Digitoninverfahren ist daher ein ausgezeichnetes Mittel, um aus dem Unverseifbaren von Tier- oder Pflanzenmaterial die Sterine in reiner Form zu gewinnen und von gleichzeitig vorhandenen Kohlenwasserstoffen, Paraffinalkoholen usw. zu trennen.

Auch zum qualitativen Nachweis der Cholesterinkörper ist die Reaktion mit Digitonin verwertbar; sie tritt noch in 0,02%igen Cholesterinlösungen deutlich ein, ist allerdings nicht so empfindlich wie die üblichen Farbenreaktionen.

Besonders eignet sich die Methode zur quantitativen Bestimmung des Cholesterins. Das zu untersuchende Material wird in der 50fachen Menge kochenden 95%igen Alkohols gelöst²⁾ und mit einer 1%igen Lösung von Digitonin in heißem 90%igen Alkohol versetzt, so lange noch ein Niederschlag entsteht. Nach mehreren Stunden hat sich der Niederschlag abgesetzt³⁾ und wird auf einen Goochtiiegel filtriert, mit Al-

¹⁾ Leider ist Digitonin für die nächsten Monate nicht mehr käuflich, da die vorhandenen Vorräte erschöpft sind.

²⁾ Sollten die Lipide in 95%igem Alkohol nicht vollständig löslich sein, so kocht man die Masse einige Male mit etwa der zehnfachen Menge Alkohol aus. Das Cholesterin, das in heißem Alkohol leicht löslich ist, geht hierbei vollständig in den Alkohol über.

³⁾ An der klaren überstehenden Lösung prüft man, ob die Fällung vollständig ist, und setzt, wenn nötig, nochmals Digitoninlösung hinzu.

kohol und mit Äther gewaschen, bei 100° getrocknet und gewogen. Aus der Menge A des Additionsprodukts läßt sich die Menge C des Cholesterins berechnen nach der Gleichung

$$A : C = 1589,06 : 386,35,$$

wobei 1589,06 das Molekulargewicht des Digitonincholesterids, 386,35 dasjenige des Cholesterins bezeichnet.

$$\text{Also ist: } C = A \cdot \frac{386,35}{1589,06} = A \cdot 0,2431.$$

Für die meisten Fälle wird es genügen, wenn man an Stelle der Zahl 0,2431 die Zahl 0,25 verwendet und einfach $\frac{1}{4}$ des Digitonincholesterids als Cholesterin in Rechnung setzt.

Beispiel: 0,2246 g wasserfreies Cholesterin in 30 ccm 95%igem Alkohol gaben mit 80 ccm einer 1%igen Digitoninlösung 0,8974 g Additionsprodukt. Dies würde bei Verwendung des Faktors 0,2431 einer Menge von 0,2181 g Cholesterin, bei Verwendung des Faktors 0,25 einer Menge von 0,2245 g Cholesterin entsprechen.

Für die praktische Verwertung der Digitoninmethode ist es von Bedeutung, daß nur das freie Cholesterin, nicht aber die Ester des Cholesterins die Reaktion zeigen. Die lockeren Additionsverbindungen zwischen Cholesterin und Fettsäuren verhalten sich ebenso wie freies Cholesterin. Es bietet sich also hier ein sicheres Mittel, um auf einfache Weise Cholesterin und Cholesterinester zu unterscheiden. Auch eine Trennung von Cholesterin und Cholesterinestern ist auf diesem Wege möglich, wenigstens in denjenigen Fällen, wo nicht gleichzeitig große Mengen Fett vorhanden sind.

Auf Veranlassung von Herrn Professor Aschoff habe ich diese Methode auf die Untersuchung einiger pathologischer Objekte mit doppeltbrechender Substanz angewandt.

Über die Natur der doppeltbrechenden Substanzen, die in pathologisch verfetteten Organen vorkommen, ist in der letzten Zeit von medizinischer und von chemischer Seite gearbeitet worden.¹⁾ Diese doppeltbrechenden Substanzen sollen

¹⁾ S. hierzu Aschoff, Zur Morphologie der lipoiden Substanzen. Beiträge zur pathologischen Anatomie und zur allgemeinen Pathologie. Bd. XLVII.

nach Adami und Aschoff¹⁾ sowie nach Panzer²⁾ und nach Pringsheim³⁾ wenigstens zum Teil aus Cholesterinestern bestehen, während Craven Moore⁴⁾ und White⁵⁾ das Vorkommen echter Cholesterinester bestreiten und behaupten, daß lockere Additionsverbindungen zwischen Cholesterin und Fettsäuren vorliegen; nach Klotz⁶⁾ endlich handelt es sich um Seifen.

In der Hoffnung, einen Beitrag zur Klärung dieser Frage liefern zu können, habe ich den Gehalt an Cholesterin und an Cholesterinestern in einigen normalen und pathologisch verfetteten Nieren bestimmt und habe hierbei sehr augenfällige Verschiedenheiten beobachtet. Die Untersuchung geschah in folgender Weise: Die Nieren wurden zerkleinert und mit der 3fachen Menge wasserfreien Gips versetzt; nach dem Erhärten wurde die Masse staubfein gepulvert und in einem großen Soxhlet-Apparat drei bis fünf Tage mit Äther (oder mit Petroläther) extrahiert. Der Extrakt wurde eingedampft, der Rückstand in der 30fachen Menge 95%igem Alkohol heiß gelöst⁷⁾ und mit einer 1%igen Digitoninlösung in geringem Überschuß versetzt. Nach mehreren Stunden wurde das ausgefällte Digitonincholesterid abfiltriert, mit Alkohol und mit Äther gewaschen, getrocknet und gewogen. Aus dieser Bestimmung ergibt sich der Gehalt der Niere an freiem Cholesterin. Das Filtrat des Digitonincholesterids wurde konzentriert und nach Zusatz von Wasser mit Petroläther (oder auch mit Äther) ausgeschüttelt. Hierbei bleibt das überschüssig zugesetzte Digitonin in der wässrig alkoholischen Lösung, während Cholesterin-

¹⁾ Proceedings Royal Society, Bd. LXXVIII, S. 359 (1906).

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLVIII, S. 519 (1906), u. Bd. LIV, S. 239 (1907).

³⁾ Biochemische Zeitschrift, Bd. XV, S. 52 (1909).

⁴⁾ Medical Chronicle, Dec. 1907.

⁵⁾ Medical Chronicle, March 1908. Proceedings of the Physiological Society, Dec. 19, 1908.

⁶⁾ Medical Research, Bd. XX, S. 1 (1909).

⁷⁾ Sollte der Rückstand in heißem Alkohol nicht vollständig löslich sein, so wird für die Fällung nur der in Alkohol lösliche Teil verwendet. Der unlösliche Anteil, der, wie die Digitoninprobe ergibt, nach mehrfachem Auskochen mit Alkohol kein freies Cholesterin mehr enthält, wird in einem Äther-Alkoholgemisch gelöst und mit dem Filtrat des Digitonincholesterids vereinigt.

ester, Fette und andere Lipoide in den Petroläther übergehen. Der Petrolätherauszug wurde (in den meisten Fällen) in zwei gleiche Teile geteilt, der eine diente zur Isolierung der Cholesterinester, der andere zur quantitativen Bestimmung. Für den letzteren Zweck wurde der Petroläther abdestilliert, der Rückstand mit alkoholischem Natriumäthylat in der Hitze verseift, das hierbei gebildete Cholesterin in der üblichen Weise durch Ausschütteln mit Petroläther isoliert und nach der Digitoninmethode quantitativ bestimmt. Diese zweite Fällung ergibt die Menge des gebundenen Cholesterins, das ursprünglich als Ester vorhanden war.

Die untersuchten Nieren stammen aus dem pathologischen Institut der Universität Freiburg i. B. und sind mir von Herrn Professor Aschoff übergeben worden.

Versuch I.

Normale Nieren von 280 g. Der Ätherextrakt wog 5,76 g; das direkt ausgefällte Digitonincholesterid wog 2,940 g, das nach der Verseifung ausgefällte 0,136 g. Dies entspricht 0,735 g freiem und 0,034 g gebundenem Cholesterin.

Die Nieren enthielten also **0,26%** freies und **0,012%** gebundenes Cholesterin.

Der Wert für das gebundene Cholesterin ist vermutlich ein wenig zu hoch, da die erste Ausfällung, die bei Gegenwart von Fett erfolgt, nicht vollständig sein dürfte; doch sind es sicher nur kleine Mengen Cholesterin, die der Fällung entgehen: denn in der ersten Fällung stecken schon 95,6% des Gesamtcholesteringehalts, und die Menge des in Lösung gebliebenen und des gebundenen Cholesterins beträgt nur 4,4% der Gesamtmenge. Aus diesem Versuch ergibt sich mit Sicherheit, daß die normale Niere höchstens sehr geringe Mengen Cholesterinester enthält.

Versuch II.

Normale, blutreiche Nieren von 238 g. Der Wassergehalt betrug 80,86%. Der Ätherextrakt wog 4,46 g, die Bestimmung ergab 0,52 g freies und 0,071 g gebundenes Cholesterin.

Die Nieren enthielten also **0,22%** freies und **0,030%** gebundenes Cholesterin.

Versuch III.

Amyloidnieren mit wenig doppeltbrechender Substanz, Gewicht 312 g. Der Ätherextrakt wog 4,90 g. Die Bestimmung ergab 0,84 g freies und 0,28 g gebundenes Cholesterin.

Die Nieren enthielten also **0,27%** freies und **0,090%** gebundenes Cholesterin.

Versuch IV.

Amyloidnieren mit viel doppeltbrechender Substanz. Gewicht 237 g. Der Ätherextrakt wog 6,2 g. Die Bestimmung ergab 0,76 g freies und 1,31 g gebundenes Cholesterin.

Die Nieren enthielten also **0,32%** freies und **0,55%** gebundenes Cholesterin.

Die Menge des Cholesterinesters ist in diesem Falle also sehr beträchtlich. 1,31 g gebundenes Cholesterin entsprechen 2,21 g Cholesterinölsäureester. Der gesamte Ätherextrakt besteht also zu etwa **35,6%** aus Cholesterinestern.

Versuch V.

Amyloidnieren mit viel doppeltberechneter Substanz. Gewicht 336 g, Wassergehalt 79,41%. Der Ätherextrakt wog 12,73 g. Die Bestimmung ergab 1,12 g freies und 2,199 g gebundenes Cholesterin.

Die Nieren enthielten also **0,33%** freies und **0,65%** gebundenes Cholesterin.

Auch hier laufen die mikroskopische Beobachtung über den reichlichen Gehalt an doppeltbrechenden Tropfen und die quantitative chemische Bestimmung über den Gehalt an Cholesterinestern parallel.

Die mitgeteilten Versuche zeigen also, daß die normalen und die pathologischen Nieren sich in ihrem Gehalt an freiem Cholesterin nur wenig unterscheiden; dagegen ist der Gehalt an gebundenem Cholesterin außerordentlich verschieden, er beträgt bei den Nieren III mit wenig doppeltbrechender Substanz **56 mal**, bei den Nieren IV und V mit viel doppeltbrechender Substanz **46 mal**, bzw. **54 mal** so viel wie bei den normalen Nieren I. Dieser außerordentlich große Unterschied in dem Gehalt an Cholesterinestern beweist, daß eine Neubildung oder

eine Ansammlung von Cholesterinestern in der verfetteten Niere stattfindet. Die Annahme, daß es sich um eine physikalische Entmischung, um das Sichtbarwerden einer Substanz handelt, die auch unter normalen Bedingungen im gelösten Zustande vorhanden ist (Fettphanerose), muß als unrichtig zurückgewiesen werden.

Die quantitativen Bestimmungen habe ich dadurch zu kontrollieren gesucht, daß ich die Cholesterinester aus den pathologisch verfetteten Nieren in möglichst reinem Zustand isoliert habe. Während, wie oben erwähnt, die eine Hälfte des Petrolätherauszugs zur quantitativen Bestimmung der Cholesterinester diente, wurde die andere Hälfte zur Trockene eingedampft und der Rückstand so oft aus Ätheralkohol fraktioniert kristallisiert, bis die einzelnen Fraktionen ihren Schmelzpunkt nicht mehr veränderten. Hierbei erhielt ich aus den Nieren IV und V zwei Hauptfraktionen, von denen die schwerer lösliche bei $76-79^{\circ}$, die leichter lösliche bei $41-45^{\circ}$ schmolz. Die Menge der letzteren war etwa dreimal größer als die der ersteren.

Die Fraktion vom Schmelzpunkt $76-79^{\circ}$ war frei von Stickstoff oder Phosphor; die Reaktionen auf freies Cholesterin (Digitoninprobe und Golodetz-Probe)¹⁾ waren negativ; die Liebermann-Burchardsche Probe, **die auch von Cholesterinestern gegeben wird**, war positiv. Beim Schütteln mit Sodalösung wurde die Substanz nicht verändert, bei der Verseifung lieferte sie als einziges neutrales Produkt reines Cholesterin; mit synthetischem Cholesterylpalmitat vom Schmelzpunkt 79° vermischt änderte sie ihren Schmelzpunkt nicht. Auf meine Bitte hat Herr Professor Jäger (Groningen) die Freundlichkeit gehabt, sowohl das synthetische Cholesterylpalmitat als auch die Substanz aus den verfetteten Nieren mikroskopisch zu untersuchen und besonders die verschiedenen doppeltbrechenden Phasen, welche die beiden Substanzen in geschmolzenem Zustande zeigen, miteinander zu vergleichen.

Herr Professor Jäger, dem ich für seine Hilfe auch an dieser Stelle vielmals danken möchte, hat hierbei ein vollständig

¹⁾ Chemikerzeitung. Bd. XXXII, S. 160 (1908).

übereinstimmendes Verhalten beobachtet und mir brieflich erklärt, daß die Substanz aus pathologisch verfetteten Nieren zweifellos mit Cholesterylpalmitat identisch sei.

Die Fraktion vom Schmelzpunkt 41–45° verhielt sich gegenüber Reagenzien genau so wie die Fraktion 76–79°. Mit synthetischem Cholesteryloleat gemischt veränderte sie ihren Schmelzpunkt nicht und dürfte also im wesentlichen aus Cholesteryloleat bestehen. Hiermit stimmt das Resultat einer Elementaranalyse genügend überein.

0,1645 g Substanz: 0,4978 g CO₂, 0,1781 g H₂O.

Berechnet für C₄₁H₇₄O₂: C 83,00%, H 12,08%.

Gefunden: C 82,53%, H 12,11%.

Zur Kontrolle habe ich in dem Ester eine quantitative Cholesterinbestimmung vorgenommen:

0,2202 g Ester lieferten 0,5294 g Digitonincholesterid. Dies entspricht 0,1287 g Cholesterin, während sich für die angewandte Menge Ester 0,1308 g Cholesterin berechnen; oder in Prozenten ausgedrückt: der untersuchte Ester ergab 58,44% Cholesterin, während sich für Cholesteryloleat 59,39% Cholesterin berechnen.

Der gefundene Wert stimmt also mit dem theoretischen genügend überein, und es ergibt sich, daß auch hier das Cholesterin das einzige neutrale Produkt der Verseifung darstellt.

Die aus den verfetteten Nieren von mir isolierten Ester habe ich Herrn Professor Aschoff übergeben, und er hat sich überzeugt, daß sich diese Ester bei der Untersuchung im Polarisationsmikroskop und gegenüber Farbstoffen genau ebenso verhalten wie die doppeltbrechenden Tropfen der Nieren. Alle diese Versuche ergeben mit großer Wahrscheinlichkeit, daß die doppeltbrechenden Tropfen der pathologisch verfetteten Nieren aus Gemischen von Cholesterylpalmitat und Cholesteryloleat bestehen; die Annahme von Craven Moore und von White, daß es sich nicht um echte Ester, sondern um lockere Additionsprodukte zwischen Cholesterin und Fettsäuren handle, ist sicher unrichtig.