

## 212. J. Lifschütz und Theodor Grethe: Zur Kenntnis des Oxy-cholesterins und seiner Digtonin-Verbindung.

[Mitteilung aus dem Hamburgischen Chemischen Staatslaboratorium.]

(Eingegangen am 21. April 1914.)

Das Oxy-cholesterin, welches in der organischen Natur, namentlich im Tierreiche, als fast steter Begleiter des Cholesterins vorkommt, ist von dem einen von uns<sup>1)</sup> auch künstlich durch Oxydation des Cholesterins hergestellt worden. Die Herstellung und Reinigung dieses Cholesterin-Derivates ist bereits an anderer Stelle<sup>2)</sup> eingehend beschrieben worden. Das Verfahren ist kurz Folgendes:

2 g reines Cholesterin werden im geräumigen Kolben in 100 ccm Eisessig gelöst und die Lösung bei etwa 90° mit 2 g Benzoylsuperoxyd versetzt. Ist auch dieses gelöst, so wird das Gemisch schnell zum heftigen Sieden gebracht und die Flamme hinweggezogen, bis die Lösung sich vollständig beruhigt hat. Das Aufkochen wird in derselben Weise noch ein bis zweimal wiederholt und die nunmehr bräunlichgelbe Lösung schnell abgekühlt, in 200 ccm Wasser unter Umrühren eingetragen und das sich dabei ausscheidende Oxydationsprodukt durch rasches Hin- und Herschwingen des Glasstabes gut ausgeschleudert. Das auf der Oberfläche schwimmende Produkt wird mit dem Glasstab gesammelt, an der Wand des Gefäßes zusammengeknetet, herausgehoben und unter Wasser wiederholt geknetet, bis dieses nicht mehr sauer reagiert. Die nunmehr fester gewordene, hellgelbe, teigige Masse wird vorsichtig zwischen Fließpapier abgepreßt und im Kölbchen am Rückflußrohr mit 50 ccm halbnormaler, alkoholischer Kalilauge 40 Minuten lang gekocht. Das braune »Saponifikat« wird mit etwa dem gleichen Volumen Wasser verdünnt und 3—4 Mal tüchtig ausgeäthert, um das Oxy-cholesterin von dem sauren Teil des Reaktionsproduktes zu trennen. Nach wiederholtem Waschen der gesammelten Äther-Extrakte und Beseitigung des Äthers erhält man als Rückstand ein rohes Oxy-cholesterin, das 40—50 % vom angewendeten Cholesterin beträgt. Es wird in wenig Methylalkohol gelöst und nach einigen Stunden filtriert. Ist das Filtrat trübe, so wird es wieder eingedampft und der Rückstand in derselben Weise mit Methylalkohol behandelt. Diese Behandlung wird nötigenfalls wiederholt, bis man aus dem methylalkoholischen Filtrat nach dem Verdampfen einen Rückstand erhält, der sich in diesem Lösungsmittel klar löst, ohne etwas beim Stehen abzuscheiden.

### I. Oxy-cholesterin, $C_{27}H_{46}O_2$ oder $C_{26}H_{44}O_2$ .

Dieses in der oben angedeuteten Weise hergestellte und gereinigte Cholesterin-Derivat stellt einen hellgelben, bernsteinartig durchsichtigen, sehr spröden und amorphen Körper dar, der beim Reiben stark elek-

<sup>1)</sup> Lifschütz, Bio. Z. 48, 400 ff. [1913]; B. 41, 253 ff. [1908].

<sup>2)</sup> Bio. Z. 48, 400—404 [1913].

trisch wird und beim Zerreiben zwischen den Fingern sich kolophoniumartig klebrig anfühlt. Seiner harzartigen Natur zufolge besitzt er auch keinen charakteristisch scharfen Schmelzpunkt. Zum feinen Pulver zerrieben, wird er unter 100° weich, zwischen 100 und 105° durchsichtig und verflüssigt sich zwischen 107 und 113°. Er löst sich leicht in allen Lösungsmitteln außer Wasser, gibt aber beim Kochen mit Wasser eine kolloidale Lösung, die auf Zusatz von Säuren den Körper wieder abscheidet. Besser erhält man diese Lösung, wenn man ihn in wenig Alkohol löst, mit Wasser verdünnt und den Alkohol durch Kochen verjagt. Er zeigt keinerlei Neigung zur Krystallisation. Er gibt alle Reaktionen seiner Muttersubstanz, des Cholesterins, darunter auch in Acetanhydrid-Lösung mit konzentrierter Schwefelsäure die bekannte, für das letztere so charakteristische Liebermannsche Cholestol-Reaktion.

Löst man wenige Körnchen des Oxy-cholesterins in Eisessig und versetzt die kalte Lösung mit einigen Tropfen konzentrierter Schwefelsäure, so erhält man eine intensive, rot- bis blauviolette Farbreaktion, die der oben genannten Cholestol-Reaktion des Cholesterins in Farbe und Absorptionsspektrum zwar ähnlich ist, diese aber an Farbenschönheit und Umfang ihrer Empfindlichkeit weit übertrifft. Versetzt man diese blauviolette Reaktionslösung des Oxy-cholesterins mit einem Tropfen Eisenchlorid-Lösung, so wird sie sofort rein grün unter entsprechender Veränderung des sehr charakteristischen Absorptionsspektrums. Auf Zusatz von 1—2 Tropfen Chromsäure verschwindet momentan auch die grüne Farbe; die Lösung wird dadurch vollständig entfärbt<sup>1)</sup>.

Diese Essig-Schwefelsäure-Reaktion des Oxy-cholesterins ist die einzige Farbreaktion, die das Cholesterin nicht gibt, wodurch letzteres sich von seinem ersteren Derivat scharf unterscheidet. Dieser Umstand, namentlich aber die ausgezeichneten Absorptionsspektren dieser Reaktion führten auch zur Auffindung des Oxy-cholesterins in den tierischen Organen und Geweben<sup>2)</sup> sowie zur quantitativen Bestimmung dieses Körpers in den Organen durch spektrometrische Messungen<sup>3)</sup>. Da diese Verbindung weder einen scharfen Schmelzpunkt, noch Krystallform oder Krystallisationsfähigkeit überhaupt besitzt, so mußten die scharfen und bestimmt auftretenden optischen Erscheinungsformen ihrer Essig-schwefelsäure-Reaktion — namentlich der Umfang ihrer Spektralempfindlichkeit — als kennzeichnendes

<sup>1)</sup> H. 58, 182 [1908].      <sup>2)</sup> H. 53, 140—147 [1907].

<sup>3)</sup> Bio. Z. 48, 380 ff. [1913].

Merkmal der Reinheit der für die Elementaranalyse herzustellenden Substanz gelten.

Die Prüfung des Oxy-cholesterins auf seine Reinheit geschah in folgender Weise:

1. Um die eben erwähnte Grenze seiner spektralen Empfindlichkeit festzustellen, wurde 1 ccm der Chloroformlösung des nach obigem Verfahren hergestellten Oxy-cholesterins von 0.0506 % Substanzgehalt mit 2 ccm eines Gemisches von 1 Volum Schwefelsäure und 10 Volumen Eisessig<sup>1)</sup> vermischt. Nach 10 Minuten wurde die stark blauviolett gewordene Lösung mit 2 Tropfen 5-prozentiger Eisenchlorid-Eisessig-Lösung versetzt und durchgemischt. Das 3.05 ccm betragende, nunmehr rein grün gefärbte Reaktionsgemisch hatte also jetzt einen Oxy-cholesterin-Gehalt von 0.01659 %. 1 ccm dieser Lösung wurde in ein Reagensglas von 18 mm Durchmesser gebracht, vor das Spektroskop gespannt, und zwar vor einer Glühlichtquelle von 100 HK, und nach und nach mit Eisessig verdünnt, bis das bekannte Absorptionsspektrum (tief dunkler, scharfer Streifen in Rot) bei engstem Spalt zu einer eben noch merklichen, schwachen Linie zusammenschrankte, die bei der nächsten geringfügigen weiteren Verdünnung aus dem roten Spektralfelde gänzlich verschwand. Die so stark verdünnte, aber immer noch grüne Lösung betrug beim minimalsten Absorptionsspektrum : 7.1 ccm; hatte also einen Substanzgehalt von 0.002335 %.

Demnach betrug die spektrale Empfindlichkeit des Präparates  
1 : 42820.

Um zu erfahren, ob dieser Empfindlichkeitsumfang der Spektralabsorption konstant bleibt, wurde das so geprüfte Präparat in größerer Menge in wenig warmem Methylalkohol gelöst und einige Stunden am kühlen Orte stehen gelassen. Da die Lösung sich dabei erheblich trübte, so wurde sie filtriert, das Filtrat eingedampft, auf dem Wasserbade gut getrocknet und der Rückstand in obiger Weise auf den Umfang seiner spektralen Empfindlichkeit geprüft. Die spektrale Minimalabsorption lag jetzt bei 0.0021 % Oxy-cholesterin und betrug demnach

1 : 47620.

Diese Behandlung der Substanz mit Methylalkohol wurde noch einmal wiederholt, wobei sich die Reaktionsempfindlichkeit auf

1 : 49430

erhöhte. Da die weitere Reinigung eine höhere Zahl nicht mehr ergab, so wurde die Substanz als analysenrein betrachtet.

2. Versetzt man eine etwa 2-prozentige, alkoholische Oxy-cholesterin-Lösung mit einer etwa 1-prozentigen Digitonin-Lösung in 90-prozentigem Weingeist, so fällt ein großer Teil der Substanz als Digitonin-Oxy-cholesterid in glänzenden Flocken aus, die unter dem Mikroskop aus rhombischen Blättchen bestehen. Weder das Cholesterin, noch die bei seiner obigen Oxydation entstandenen, neutralen

<sup>1)</sup> Daselbst 54, 223 ff. [1913].

oder sauren Produkte geben eine so aussehende Verbindung mit Digitonin. Erscheint also das genannte mikroskopische Bild einer kleinen Probefällung in einheitlichen, rhombischen Blättchen, so ist das betreffende Oxy-cholesterin sicherlich frei von unverändertem Cholesterin.

3. Versetzt man die blauviolette Lösung der oben erwähnten Essig-schwefelsäure-Reaktion des Oxy-cholesterins, nachdem sie etwa 30 Minuten gestanden hat, mit dem gleichen Volum Acetanhydrid (»kombinierte Cholestol-Reaktion«<sup>1)</sup>), so färbt sich die Lösung unter schwacher Selbsterwärmung — wie oben durch Eisenchlorid — rein grün. Ist kein Cholesterin zugegen, so sieht man im Spektrum das Auftreten des oben erwähnten Absorptionsstreifens (in Rot), der — je nach seiner Intensität — mit der Zeit immer schwächer wird, bis er ganz verschwindet, ohne sich vorher irgendwie kompliziert zu haben. Ist aber Cholesterin bei der obigen Essigschwefelsäure-Reaktion zugegen gewesen, so sieht man bei der so »kombinierten Cholestol-Reaktion« im Spektrum, wie sich nach und nach aus jenem Oxy-cholesterin-Streifen das Absorptionsspektrum des Cholesterins entwickelt<sup>2)</sup>.

Die Probe 1 zeigt also die Abwesenheit von Fremdkörpern überhaupt im Oxy-cholesterin an, während die letzten zwei Proben darin die Abwesenheit von unverändertem Cholesterin dokumentieren.

Die nachstehenden Elementaranalysen sind mit Präparaten verschiedener Darstellungsoperationen vorgenommen, nachdem sie die obigen Proben bestanden hatten. Sie wurden im Vakuum bis zum konstanten Gewicht getrocknet und lieferten bei den mit Bleichromat vorgenommenen Verbrennungen Zahlen, die zur Formel  $C_{26}H_{44}O_2$  gut, besser freilich zur neueren Formel  $C_{27}H_{46}O_2$  stimmen.

I. 0.17095 g Sbst.: 0.5051 g  $CO_2$ , 0.1761 g  $H_2O$ . — II. 0.1576 g Sbst.: 0.4660 g  $CO_2$ , 0.1623 g  $H_2O$ . — III. 0.1018 g Sbst.: 0.3015 g  $CO_2$ , 0.1083 g  $H_2O$ . — IV. 0.0881 g Sbst.: 0.2608 g  $CO_2$ , 0.0938 g  $H_2O$ . — V. 0.1332 g Sbst.: 0.3944 g  $CO_2$ , 0.1370 g  $H_2O$ . — VI. 0.21005 g Sbst.: 0.6222 g  $CO_2$ , 0.2181 g  $H_2O$ .

$C_{27}H_{46}O_2$ . Ber. I. C 80.53, H 11.52.

$C_{26}H_{44}O_2$ . » II. » 80.34, » 11.41.

I. II. III. IV. V. VI.

Gef. C 80.60, 80.64, 80.77, 80.75, 80.75, 80.78.

» H 11.53, 11.52, 11.92, 11.91, 11.51, 11.61.

Welcher von diesen beiden Formeln eine größere Berechtigung zukommt, soll hierdurch nicht entschieden werden, obschon die obigen

<sup>1)</sup> B. 31, 1125 [1898]; 41, 258 [1908].

<sup>2)</sup> Die genaue und eingehende Schilderung der Absorptionsspektren der Cholesterinstoffe: s. Bio. Z. 20, 480—483 (farbige Spektraltafel) [1909] und daselbst 54, 219—221 [1913]; vergl. auch B. 41, 254 [1908].

Analysenwerte der Formel I wesentlich näher kommen. Soviel steht indessen nunmehr fest, daß es sich hier um ein Cholesterin handelt, das ein Atom Sauerstoff aufgenommen hat. Da an diesem Körper bisher weder die Reaktionen der Aldehyde, noch die der Ketone wahrgenommen werden konnten, so ist wohl seine Bezeichnung als »Oxycholesterin« als gerechtfertigt anzusehen.

## II. Digitonin-Oxy-cholesterid, $C_{54}H_{92}O_{28}$ , $C_{27}H_{46}O_2$ .

Bei den oben angedeuteten und an anderer Stelle<sup>1)</sup> eingehend geschilderten Schwierigkeiten, sich Gewißheit über die chemische Individualität des Oxy-cholesterins zu verschaffen, kam seine Eigenschaft, mit Digitonin eine in Weingeist schwer lösliche und in ihrer schönen und einheitlichen Krystallform wohlcharakterisierte Verbindung zu geben, sehr gut zustatten.

Mischt man nämlich bei Wasserbad-Temperatur eine 2-prozentige Lösung von Oxy-cholesterin in 95-prozentigem Spiritus mit einer 1-prozentigen Digitoninlösung in 90-prozentigem Spiritus, so daß die beiden Substanzen zu gleichen Molekülen zusammenkommen, so fängt nach kurzer Zeit die Ausscheidung von flimmernden Kryställchen an, die sich zusehends vermehren, bis sie die ganze Flüssigkeit durchsetzen. Man läßt den weißen Krystallbrei etwa 20 Minuten in der Wärme und dann 5–6 Stunden an einem kühlen Orte stehen. Der abfiltrierte mit 95-prozentigem Spiritus ausgewaschene Niederschlag trocknet zu einer weißen, spröden Kruste von hohem Silberglanz ein.

Das so erhaltene Digitonin-Oxy-cholesterid besteht — bei mäßiger mikroskopischer Vergrößerung gesehen — aus kleinen, durchsichtigen, rhombischen Blättchen, die zwischen  $215^{\circ}$  und  $218^{\circ}$  zu einer durchsichtigen, rotbraunen und dickflüssigen Masse zusammenschmelzen. Die Doppelverbindung ist unlöslich in Wasser; gibt aber nach längerem Kochen eine kolloidale wäßrige Lösung. Sie ist schwer löslich in absolutem Alkohol, leichter in wasserhaltigem, und noch leichter in Methylalkohol, sehr schwer löslich in Chloroform und fast unlöslich in Äther und Kohlenwasserstoffen. Die Ausbeute an der Doppelverbindung beträgt 180–200% vom angewendeten Oxy-cholesterin und enthält etwas über 25% des letzteren Körpers.

Zu den nachstehenden Elementaranalysen des Oxy-cholesterids gelangten Präparate verschiedener Darstellungen und zwar aus dem vielfach gereinigten und oben analysierten Oxy-cholesterin und waren bei  $110^{\circ}$  bis zum konstanten Gewicht getrocknet<sup>2)</sup>.

<sup>1)</sup> Bio. Z. 48, 397–399 [1913].

<sup>2)</sup> Auch diese Verbrennungen wurden mit Bleichromat bewerkstelligt. Da die Substanz hygroskopisch ist, so sind die H-Zahlen in einigen der Analysen etwas zu hoch ausgefallen.

I. 0.0762 g. Sbst.: 0.1726 g CO<sub>2</sub>, 0.0653 g H<sub>2</sub>O. — II. 0.1059 g Sbst.: 0.2368 g CO<sub>2</sub>, 0.0900 g H<sub>2</sub>O. — III. 0.0986 g Sbst.: 0.2202 g CO<sub>2</sub>, 0.0828 g H<sub>2</sub>O. — IV. 0.20165 g Sbst.: 0.4512 g CO<sub>2</sub>, 0.1694 g H<sub>2</sub>O. — V. 0.1931 g Sbst.: 0.4309 g CO<sub>2</sub>, 0.1594 g H<sub>2</sub>O. — VI. 0.1588 g Sbst.: 0.3563 g CO<sub>2</sub>, 0.1263 g H<sub>2</sub>O. — VII. 0.1289 g Sbst.: 0.2885 g CO<sub>2</sub>, 0.1030 g H<sub>2</sub>O.

C<sub>54</sub>H<sub>92</sub>O<sub>28</sub>, C<sub>27</sub>H<sub>46</sub>O<sub>2</sub>. Ber. C 61.09, H 8.74.

	I.	II.	III.	IV.	V.	VI.	VII.
Gef. C	61.77,	60.98,	60.91,	61.02,	60.86,	61.19,	61.04.
H	9.59,	9.51,	9.39,	9.39,	9.23,	8.89,	8.94.

Kann schon aus diesen Elementaranalysen mit Sicherheit auf die molekulare Zusammensetzung des Digitonin-Oxy-cholesterids geschlossen werden, so bringt die folgende

### Spektrometrische Oxy-cholesterin-Bestimmung

in dieser Doppelverbindung die volle Bestätigung.

Diese Bestimmung geschah durch vergleichende quantitative Messung der Spektralintensität des oben erwähnten Absorptionsspektrums der Essig-schwefelsäure-Eisenchlorid-Reaktion der Doppelverbindung mit dem Absorptionsspektrum derselben Reaktion des reinen Oxy-cholesterins in folgender Weise:

Lösung D mit 0.504% der Doppelverbindung in Eisessig,  
 • O • 0.067 • Oxy-cholesterin (Testlsg.) in Eisessig.

In gleich weiten Reagensgläsern wurden je 1 ccm dieser Lösungen mit je 2 ccm Essigschwefelsäure<sup>1)</sup> vermischt, nach 10 Minuten mit je 2 Tropfen Eisenchloridlösung (5-prozentig in Eisessig) versetzt und nach dem Durchmischen vor das Vergleichsspektroskop (mit gerader Durchsicht) und zwar an einer Glühlichtquelle von 100 HK gespannt. Das Absorptionsspektrum (in Rot) des Gemisches aus der Lösung D zeigte sich dem des anderen Gemisches gegenüber als wesentlich intensiver; es wurde daher nach und nach mit Eisessig so lange verdünnt, bis es die Spektralintensität des Gemisches aus Lösung O erreichte. Es entstanden so die Gemische:

d: 5.80 ccm mit 0.08689% Digitonin-Oxy-cholesterids und  
 o: 3.05 • » 0.02196 • reinen Oxy-cholesterins.

Da nun nach Ausgleichung beider Spektralintensitäten, wie nachgewiesen<sup>2)</sup> in gleichen Raumteilen gleiche Mengen Oxy-cholesterin enthalten sein müssen, so verhält sich der prozentuale Oxy-cholesterin-Gehalt der Doppelverbindung zu hundert, wie die entsprechenden Konzentrationen der beiden Reaktionsgemische zu einander. Das heißt:

$$x : 100 = 2196 : 8689.$$

<sup>1)</sup> 1 Vol. konz. Schwefelsäure + 10 Vol. Eisessig.

<sup>2)</sup> Bio. Z. 48, 380 u. 381 ff. [1913].

Mithin enthält das Digitonin-Oxy-cholesterid

25.27% Oxy-cholesterin.

Eine zweite Analyse ergab: 25.23%.

Die Formel:  $C_{54}H_{92}O_{28}$ ,  $C_{27}H_{46}O_2$  fordert: 25.26% Oxy-cholesterin.

Hamburg, im April 1914.

### 213. J. Lifschütz: Zur Kenntnis der Cholsäure und deren Ursprungs.

[Vorbericht.]

[Eingegangen am 21. April 1914.]

Vor einigen Jahren veröffentlichte ich in den »Berichten«<sup>1)</sup> eine Arbeit über »eine Farbreaktion auf Cholesterin durch Oxydation«; d. h. durch Überführung des Cholesterins in das Oxy-cholesterin,  $C_{27}H_{46}O_2$ . Die vollkommen identische Farbreaktion läßt sich mit Leichtigkeit auch bei der Cholsäure oder Galle hervorrufen.

Die einfachste Ausführungsform dieser Reaktion ist folgende:

Etwa 10 mg Cholsäure<sup>2)</sup> werden in 2 ccm Eisessig gelöst. Bei etwa 90° werden 15—20 mg Benzoylsuperoxyd hinzugefügt, das Ganze 2—3-mal kurz aber heftig aufgeköcht und das Gemisch schnell abgekühlt. Läßt man nun in dieses Gemisch 6—8 Tropfen Schwefelsäure fallen, so färbt sich diese am Boden des Reagensglases sofort kirsch- bis violettrot, überschichtet von einem intensiv blauen oder blauvioletten Ring. Die darübergelagerte obere Schicht nimmt allmählich eine schön grüne Farbe an. Durchschüttelt man nunmehr das Gemisch, so färbt es sich entweder schön blau mit violetter Durchsicht im Lampenlicht oder auch rein grün: je nachdem eine unzulängliche oder überschüssige Menge von Benzoylsuperoxyd sich an der Reaktion beteiligt hat. Nach längerem Stehen färbt sich das Reaktionsgemisch, auch wenn es ursprünglich intensiv blau gefärbt ist, allmählich rein und tief grün.

Diese farbenreiche Reaktion zeigt auch — dem Farbenwechsel entsprechend — ein bänderreiches und wechselndes Absorptionsspektrum, welches ich wiederholt genau geschildert habe<sup>3)</sup>. Setzt man zum Reaktionsgemisch, auch wenn es intensiv blau gefärbt ist, einen Tropfen Eisenchloridlösung hinzu, so färbt es sich sofort rein und tief

<sup>1)</sup> B. 41, 252 ff. [1908].

<sup>2)</sup> Von E. Merck, Darmstadt, unter der Bezeichnung »Acid. cholalicum cryst.« wiederholt bezogen.

<sup>3)</sup> H. 50, 437; 53, 144 und 145 [1907]; Bio. Z. 48, 376—378 [1913]; B. 38, 1123 [1898].