

59. Bestandteile von Pflanzenkeimlingen I.
Über neue Verbindungen aus den unverseifbaren Anteilen
des Weizenkeimlingsöls

von P. Karrer und H. Salomon.

(26. III. 37.)

Das Unverseifbare des Weizenkeimlingsöls enthält biologisch aktive Verbindungen, neben Carotinoiden u. a. auch das von *Evans* und *Bishop*¹⁾ sowie *Mattill* und *Conklin*²⁾ durch biologische Versuche nachgewiesene Vitamin E. *Evans*, *Emerson* und *Emerson*³⁾ haben kürzlich aus solchen unverseifbaren Anteilen das Allophanat eines Alkohols abgetrennt, den sie α -Tocopherol nannten und dem sie Vitamin-E-Wirkung zuschreiben. Die Verbindung ist aber nicht deutlich krystallisiert und ihre Einheitlichkeit daher wohl unsicher.

Wir möchten im folgenden zeigen, dass in den rohen Fraktionen des Unverseifbaren, aus denen nach *Evans* und Mitarbeitern „ α -Tocopherol“ durch Einleiten von Cyansäure als Allophanat niedergeschlagen wird, eine ganze Reihe bisher unbekannter, prachtvoll krystallisierter Verbindungen enthalten sind. Ihre Menge beträgt ca. $\frac{4}{10000}$ % der extrahierten Weizenkeimlinge. Die Verbindungen haben z. T. sterinähnliche Eigenschaften, weichen aber in ihrem Verhalten doch sehr wesentlich von den bisher bekannten Sterinen ab. Ihrer Trennung und Reindarstellung stehen ähnliche Schwierigkeiten wie derjenigen gewöhnlicher Sterine entgegen. Wir wissen daher nicht, ob die Substanzen, die wir heute in dieser vorläufigen Mitteilung beschreiben, schon vollkommen einheitlich sind oder ob die weitere Reinigung ihre Konstanten noch verschieben wird. Wir sind mit ihrer weiteren Untersuchung beschäftigt und hoffen, darüber sowie über ihre biologische Auswertung, die noch im Gang ist, später Näheres mitteilen zu können.

Die erste Fraktionierung des Unverseifbaren des Weizenkeimlingsöls erfolgte durch chromatographische Analyse nach dem Vorbild von *Drummond*, *Singer* und *Macwalter*⁴⁾ an Aluminiumoxyd. Wir erhielten dabei analoge Fraktionen wie die genannten Autoren; sie unterschieden sich nur etwas hinsichtlich Menge und Farbe von den von *Drummond* und Mitarbeitern gewonnenen, was wir darauf zurückführen, dass wir die gewöhnlichen Phytosterine (Sitosterine) vor der Adsorption noch vollständiger abtrennten. — Die nach der

¹⁾ Science **56**, 650 (1922). — Am. J. Physiol. **63**, 396 (1922). — J. Am. Med. Assoc. **81**, 889 (1923).

²⁾ J. biol. Chem. **44**, 137 (1920).

³⁾ J. biol. Chem. **113**, 319 (1936).

⁴⁾ Biochem. J. **29**, 457 (1935).

Elution des Chromatogramms gewonnenen Fraktionen bezeichnen wir in gleicher Weise wie *Drummond*, *Singer* und *Macwalter* mit den Buchstaben A bis F; Vitamin E soll sich nach den englischen Forschern hauptsächlich in Schicht C (und etwas in D) vorfinden. Aus Schicht C stammen die in dieser Mitteilung von uns beschriebenen krystallisierten Verbindungen.

Ihre Abscheidung beruht auf der Beobachtung, dass sie aus 95-proz. äthylalkoholischer Lösung durch Digitonin bei längerem Stehen gefällt werden. Diese Fällung ist von derjenigen gewöhnlicher Phytosterin-Digitonide wesentlich verschieden, vor allem viel leichter löslich und anscheinend amorph. Die erheblich grössere Löslichkeit der neuen Digitonide erlaubt, sie von den Sitosterin-Digitoniden fast quantitativ zu trennen. Aus diesem Digitonidgemisch haben wir bisher drei krystallisierte Alkohole gewonnen, von denen zwei als α -Tritisterin und β -Tritisterin (von *Triticum*) bezeichnet werden, während die dritte Verbindung, die wir bisher erst in sehr kleiner Menge in Händen hatten und die bei 162—163° schmolz, bis zur näheren Untersuchung noch ungetauft bleiben soll. Wir möchten nochmals ausdrücklich hervorheben, dass die 3 Verbindungen vielleicht noch nicht einheitlich sind, sondern Mischungen darstellen, wie dies beim Sitosterin und vielen andern Sterinen bekanntlich auch der Fall ist.

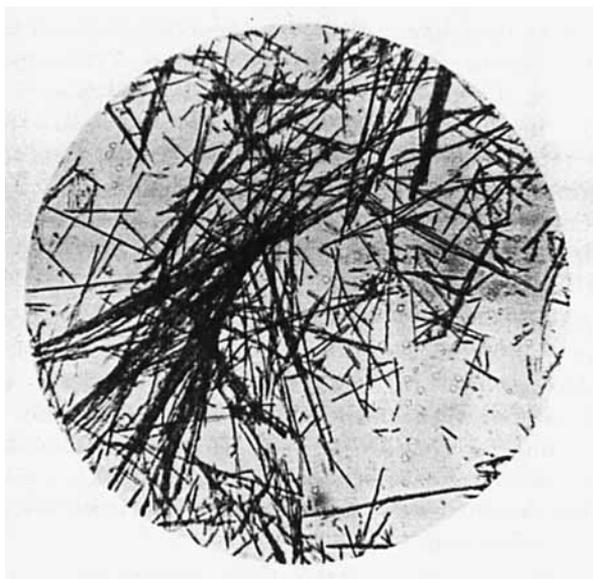
Die Digitonide der Tritisterine unterscheiden sich von denjenigen anderer Sterine auch darin, dass sie schon durch heissen absoluten Äthylalkohol in Digitonin und Tritisterin glatt zerlegt werden. Auf diesem Wege haben wir aus ihnen α - und β -Tritisterin sowie die Verbindung vom Smp. 162—163° frei gemacht. Die Trennung der drei Substanzen erfolgte dann durch fraktionierte Fällungs- und Krystallisationsprozesse, wie dies im experimentellen Teil dieser Abhandlung beschrieben ist.

α - und β -Tritisterin besitzen tiefe Schmelzpunkte, 114—115° bzw. 97°. Eine ihrer charakteristischsten Eigenschaften besteht darin, dass sie sich aus Lösungsmitteln meistens zuerst in Form steifer Gallerten ausscheiden und zwar auch dann, wenn Impfkristalle zugegen sind. Nach einigen Stunden beginnt aber in diesen Gallerten die Krystallisation und nach 12—24 Stunden hat sich die Gallerte fast restlos in eine farblose Krystallmasse glänzender, langer Nadeln verwandelt (vgl. Abbildung S. 426). Dieses eigenartige Verhalten zeigen auch die bisher reinsten Präparate.

Von den meisten bekannten Sterinen unterscheiden sich α - und β -Tritisterin ferner durch ihre starke Rechtsdrehung ($[\alpha]_D = +54,3^\circ$ für α -, und $+49,2^\circ$ für β -Tritisterin in Alkohol) und durch ein völlig anderes Verhalten bei der *Liebermann'schen* und *Salkowsky'schen* Reaktion (vgl. experimentellen Teil).

α -Tritisterin, β -Tritisterin und die Verbindung vom Smp. 160 bis 162° sind einwertige Alkohole mit mindestens einer Doppelbindung. Sie sind entweder isomer oder in ihrer Zusammensetzung nahe verwandt. Die Analysen sowie diejenigen der Acetate und Dibromide sprechen für die Zusammensetzung $C_{30}H_{50}O$ oder eine ähnliche. Wir möchten uns indessen auf keine Formel festlegen, bevor die Substanzen noch weiter untersucht sind. Wenn die vorerwähnte Bruttoformel für die Tritisterine zutrifft, so liegen in diesen Isomere des Amyrins vor, mit welchem die Tritisterine, abgesehen von der Digitonidfällung, auch sonst manche Ähnlichkeiten aufweisen.

Der Jubiläumsspende für die Universität Zürich danken wir für die Gewährung von Mitteln, durch welche diese Arbeit unterstützt wurde.



α -Tritisterin.

Experimenteller Teil.

Die Aufarbeitung des unverseifbaren Anteils des Weizenkeimlingsöls.

Zu allen Versuchen dienten ganz frische Weizenkeimlinge, für deren Überlassung wir Herrn *Heinrich Wehrli* und Herrn Dr. *Heinrich Wehrli*, Mühle Tiefenbrunnen, zu grossem Dank verbunden sind.

Der unverseifbare Anteil des Weizenkeimlingsöls, eine rote, halb feste Masse, wird mit soviel Methanol am Rückflusskühler gekocht, bis alles, abgesehen von Spuren, in Lösung gegangen ist. Für 75—80 g unverseifbaren Rückstand sind 3—3½ Liter Methanol

nötig. Die rot-gelbe Lösung stellt man ohne vorherige Filtration über Nacht in den Kälteraum bei -10 bis -15° , nutschts anderen Tags die schön krystallisierten Phytosterine ab, presst sie aus und wäscht mit Methanol aus, bis der Nutscheninhalt nur noch schwach gelb gefärbt ist. Die Methanollösung wird im Vakuum bis zur beginnenden Trübung konzentriert, noch warm in einen *Erlenmeyer*-Kolben übergeführt und durch Nachspülen mit Methanol das Volumen der Lösung auf ca. $250-300\text{ cm}^3$ gebracht. Diese Lösung wird wiederum über Nacht im Kälteraum aufbewahrt. Am Boden des *Erlenmeyer*-Kolbens scheidet sich eine halb feste, rote Schicht ab, die sich bei Zimmertemperatur wieder verflüssigt; an den Gefässwandungen haben sich noch weitere krystallisierte Phytosterine abgeschieden. Durch Loslösen der krystallisierten Sterine mit einem Glasstab und schnelles Abnutschen der noch kalten Lösung lässt sich eine ziemlich gute Trennung dieser Sterine von dem am Boden haftenden Öl bewerkstelligen. Das Öl wird dann einige Male mit Methanol digeriert, die Methanollösung dekantiert und zum Waschen der abgenutschten Sterine benützt. Man erhält auf diese Weise ca. 75% vom Gewicht des Ausgangsmaterials an krystallisierten Sterinen und ca. 5% rotes Öl. Letzteres ist selbst in heissem Methanol sehr schwer löslich.

Die Methanolmutterlauge wird nun im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Das zurückbleibende dunkle Öl nehmen wir in Petroläther auf, schütteln die Petrolätherlösung zweimal mit wenig Wasser durch und trocknen sie über Natriumsulfat.

Die Petrolätherlösung wird an Aluminiumoxyd (standardisiert nach *Brockmann*) adsorbiert und das Chromatogramm durch ausgiebiges Waschen mit Ligroin Sdp. $60-90^{\circ}$ entwickelt. *Drummond*, *Singer* und *Macwalter*¹⁾ beschreiben die Adsorption des unverseifbaren Anteiles. Wir können ihre Angaben im grossen und ganzen bestätigen, nur zeigte unser Chromatogramm ein etwas anderes Bild, und die Mengenverhältnisse der einzelnen Fraktionen erwiesen sich etwas verschieden. Dies beruht wohl darauf, dass bei unserer Methode der vorbeschriebenen Aufarbeitung die Phytosterine und das in Methanol schwerlösliche Öl noch vollständiger als im Arbeitsgang der englischen Forscher entfernt wurde. Letzteres enthält anscheinend auch sehr viel der carotinoiden Farbstoffe. In Übereinstimmung mit *Drummond* und Mitarbeitern fanden wir, dass durch gründliches Waschen mit Ligroin zuerst eine farblose Fraktion, A genannt, die Adsorptionssäule durchpassiert, gefolgt von einer stark gelb gefärbten Fraktion, die nur sehr schwach adsorbiert war. Wir haben das Auswaschen so lange fortgesetzt, bis die gelbe Schicht durchgespült war und die Waschflüssigkeit wiederum fast farblos

¹⁾ Biochem. J. **29**, 457 (1935).

abfloss. Diese durchgespülte Lösung ergibt Fraktion B. In unseren Versuchen betrug die Menge der Fraktionen A und B zusammen gewöhnlich ca. 40 % des angewandten Öles. Wir benutzten eine Glasröhre von ungefähr 70 cm Höhe und 3,5 cm Durchmesser. Die Säule zeigt nach der Entwicklung des Chromatogramms folgendes Bild:

1. Eine unterste Schicht, und zwar bei weitem die Hauptschicht, 35—40 cm lang, hell sandfarben; sie entspricht der Fraktion C von *Drummond* und Mitarbeitern.

2. Ohne scharfe Grenze eine stärker gefärbte Schicht, unten dunkelgelb, oben in rotbraun übergehend, Höhe 15—18 cm; Schicht D.

3. Darüber folgt eine Schicht, die mehr sandfarben aussieht, etwas dunkler als Schicht C ist und eine Höhe von 10 cm hat.

4. Ganz oben findet sich eine nur 2—3 cm hohe Schicht von grünlich-gelber Farbe.

Die in der vorliegenden Abhandlung beschriebenen Substanzen finden sich ausschliesslich in Schicht C und D, hauptsächlich in C. Die Elution von C und D haben wir ebenso wie *Drummond* und Mitarbeiter mit einer Elutionslösung Methanol-Äther 80:20 vorgenommen. Nach dem Abdestillieren des Lösungsmittels hinterbleibt bei Schicht C ein rotbraunes Öl, dessen Gewicht 25—30 % des Ausgangsmaterials beträgt. Wir haben mehrere solche Fraktionen gesammelt, sie in Mengen von 25 g in Petroläther in einer gleichen Aluminiumoxydsäule erneut adsorbiert und wieder mit Ligroin das Chromatogramm entwickelt. Durch die zweite Adsorption lässt sich nochmals eine geringe Menge der Fraktion A und eine bedeutend grössere der Fraktion B abtrennen; aus 25 g insgesamt ca. 4 g der beiden Fraktionen. Die Aluminiumoxydsäule sieht nach der zweiten Adsorption ziemlich gleichmässig gefärbt aus. Die untersten 50 cm, die wir als Fraktion C' bezeichnen, besitzen sandige Farbe. Sie werden gefolgt von 15 cm einer bräunlich-gelben Zone (Fraktion D') und schliesslich zu oberst von einer ganz schmalen 1—2 cm hohen stark gelben Schicht. Nach der Elution erhält man aus 25 g Ausgangsmaterial 15 g der Fraktion C', 5 g der Fraktion D' und weniger als 1 g der Fraktion E. Mehr als zweimal haben wir Fraktion C nicht adsorbiert. Schon bei der zweiten Adsorption wurde ein Teil unserer neuen, sterinartigen krystallisierten Stoffe in Fraktion D' zurückgehalten.

Nach der zweiten Adsorption enthält die Fraktion C', wenn man sie in bekannter Art mit Digitonin auf Sterine prüft, höchstens Spuren „normaler“ Sterine, und selbst das als Fraktion D' nach der zweiten Adsorption von C gewonnene Öl führt nur sehr wenig sitosterinähnliche Sterine. Fraktion D, die nach einmaliger Adsorption erhalten wird, ist dagegen noch relativ reich an „normalen“ Sterinen;

sie können durch Ausfrieren aus Methanollösung weitgehend entfernt werden, bevor man Fraktion D durch Adsorption erneut weiterzerlegt. Wir beschreiben im nachstehenden aber nur die Aufarbeitung der zweimal adsorbierten Fraktion C'.

Löst man die vom Lösungsmittel befreite Fraktion C' in 96-proz. Alkohol und gibt eine 1-proz. Digitoninlösung in 90-proz. Alkohol hinzu, so bleibt die Lösung auch nach dem Erhitzen gewöhnlich ganz klar, oder es scheiden sich höchstens Spuren krystalliner Digitonide ab. Nach einiger Zeit beginnt sich aber die Lösung zu trüben und man beobachtet an den Wandungen eine körnige, teilweise gallertartige Abscheidung. Die Zeit bis zur Ausscheidung des Niederschlags hängt stark von der Konzentration ab; bei sehr verdünnten Lösungen dauert es einige Stunden, bis die erste Abscheidung beobachtet werden kann, und noch viel länger bis sie beendet ist. Erhitzt man derartige Lösungen, so löst sich der Niederschlag wieder vollkommen auf, um beim längeren Stehen in der Kälte wieder zu erscheinen. Wir beschreiben nachstehend die Aufarbeitung von 9 g Öl der Fraktion C'.

Das Öl wurde in 300 cm³ 96-proz. Alkohol aufgenommen und mit 100 cm³ 1-proz. Digitoninlösung in 90-proz. Alkohol versetzt, die Flüssigkeit zum Sieden erhitzt und eine Stunde stehen gelassen. Es hat sich ein flockiger, teilweise körnig gallertartiger Niederschlag ausgeschieden. Jetzt wird die Lösung auf dem Wasserbad kurz zum Sieden erhitzt, wodurch sich bei weitem der grösste Teil des Niederschlags wieder löst. Die heisse Lösung giesst man rasch durch ein Faltenfilter und setzt nach dem Erkalten so lange portionsweise Digitoninlösung hinzu, bis nach längerem Stehen und Filtrieren einer Probe mit Digitoninlösung keine weitere Fällung mehr entsteht. Zum Schluss des Ausfällungsvorganges lässt man die Flüssigkeit über Nacht stehen, weil sich aus der dann recht verdünnten Lösung die Digitonide erst nach langem Stehen ausscheiden. Wir haben für 9 g Öl Fraktion C' etwas über 600 cm³ 1-proz. Digitoninlösung gebraucht.

Die voluminöse Digitonidfällung wird nun, am besten auf einer nicht zu kleinen Glasfritte abgenutscht, abgepresst und gut mit 96-proz. Alkohol gewaschen, bis der Alkohol farblos abfließt. Die Digitonide sind dann noch ziemlich gelbbraun gefärbt. Man wäscht nun mit kaltem Chloroform und knetet sie auf der Nutsche mit Chloroform gut durch. Das alkoholische Filtrat ist vorher bei Seite gestellt worden, die Chloroformwaschflüssigkeit fängt man gesondert auf. Letztere ist tief braun gefärbt. Man wäscht den Nutscheninhalt unter wiederholtem Kneten mit Chloroform so lange aus, bis das Chloroform farblos abfließt und die Digitonide auf der Nutsche eine farblose Gallerte sind; dann wird mit Äther nachgewaschen, wodurch die Gallerte schnell in eine feste, pulverige Masse übergeht,

die fast rein weiss aussieht. Durch diese Behandlung mit Chloroform geht zwar etwas von den Digitoniden verloren, denn sie sind, wie schon *Schoenheimer*¹⁾ bei anderen „normalen“ Digitoniden beobachtete, in Chloroform nicht ganz unlöslich.

Die alkoholische Mutterlauge, aus der diese Digitonide gewonnen wurden, ist jetzt natürlich sehr verdünnt und wird im Vakuum auf ca. 150 cm³ konzentriert. Dabei scheiden sich noch weitere Mengen Digitonide aus, und die so konz. Lösung muss aufs neue geprüft werden, ob sie mit Digitoninlösung eine Fällung gibt. Die aus der konz. Lösung erhaltenen Digitonide sind stärker verunreinigt und dunkler als die früheren Fraktionen und müssen daher noch viel gründlicher mit Chloroform behandelt werden. Es empfiehlt sich daher auch nicht, die alkoholische Flüssigkeit vor dem Abfiltrieren der ersten ausgefallten Digitonidfraktion zu konzentrieren.

Eigenschaften der Rohdigitonide.

Die Rohdigitonide erhält man in Form eines fast reinweissen Pulvers, das nach dem Trocknen im Vakuum in 96-proz. heissem Alkohol recht schwer löslich geworden ist. Aus der alkoholischen Lösung scheiden sie sich immer wieder in Form von an den Wandungen haftenden, körnigen, etwas gallertartigen Aggregaten ab, die ganz verschieden von den schön krystallisierten Digitoniden „normaler“ Sterine sind. Unter dem Mikroskop erscheinen sie als gleichmässige, runde Körperchen ohne krystalline Struktur. In Methanol lösen sich die Digitonide beim Erwärmen leicht und sogar in kaltem Methanol ziemlich leicht, doch konnten auch aus diesem Lösungsmittel keine krystallisierten Körper erhalten werden. Kochen mit Essigsäure-anhydrid führt zur Bildung von Acetaten, und unsere erste Aufarbeitung der Digitonidfraktion wurde auch durch Zerlegen mit Essigsäure-anhydrid vorgenommen. Da es sich dann aber zeigte, dass das gebildete Acetylderivat nicht einheitlich war und das Gemisch der Acetate sich schwer trennen liess, wurde diese Methode aufgegeben. Ausserdem verliert man natürlich dabei das wertvolle Digitonin. Eine bequeme Methode zur Zerlegung der Digitonide ergab sich durch Behandlung derselben mit absolutem Äthanol.

15 g fein gepulvertes, im Vakuum getrocknetes Digitonid werden mit 150 cm³ absolutem Alkohol am Rückflusskühler gekocht. Nach kurzer Zeit ist eine fast klare Lösung entstanden, die ohne Filtration, einige Stunden bei ca. 0° aufbewahrt wird. Schon bei geringer Abkühlung fängt alsbald die Abscheidung eines weissen, körnigen Niederschlags an. Dieser wird abgenutscht, gut abgepresst und erst mit absolutem Alkohol und zum Schluss mit Äther ge-

¹⁾ Z. physiol. Ch. 215, 61 (1935).

waschen (Äther gesondert auffangen). Die alkoholische Mutterlauge wird im Vakuum auf ca. 60 cm³ konzentriert und auf diese Weise ein zweiter Niederschlag erhalten, den man wie den ersten weiterverarbeitet. Aus 15 g Digitoniden gewinnt man 10—10,5 g dieser Substanz. Sie löst sich glatt in 90-proz. Alkohol und auch fast restlos in Wasser und ist zurückgebildetes Digitonin. Will man es für weitere Fällungen benützen, so kann man es direkt in 90-proz. Alkohol lösen, eventuell von Spuren Ungelöstem abfiltrieren und diese Lösung benützen. Somit ist durch Kochen mit absolutem Alkohol eine Zerlegung der Digitonin-Additionsverbindungen eingetreten, und in der alkoholischen Mutterlauge befinden sich jetzt neben einer geringen Menge noch nicht zerlegter Digitonide zur Hauptsache die freien Sterinkörper. Um die Reste von Digitoniden zu entfernen, wird die konzentrierte alkoholische Lösung, deren Volumen ca. 60 cm³ beträgt, mit so viel Wasser versetzt, dass eine Alkoholkonzentration von ca. 95 % vorliegt, und die Lösung zum Sieden erhitzt. Beim Abkühlen tritt die typische, gallertartige Digitonidabscheidung ein. Nach einigem Stehen wird abgenutscht und mit 95-proz. Alkohol nachgewaschen, zum Schluss mit Äther.

Die verschiedenen für sich aufgefangenen ätherischen Waschlösungen dampft man ein, nimmt den Rückstand in Alkohol auf und vereinigt ihn mit der 95-proz. alkoholischen Lösung, welche die aus den Digitoniden freigesetzten Tritisterine enthält. Aus 15 g Digitoniden wurden durch die Verdünnung auf 95-proz. Alkohol 1,3 g noch unzerlegtes Digitonid zurückgewonnen. Dieses wird zweckmässig zusammen mit einer neuen Portion der Digitonide durch absoluten Alkohol in einem neuen Ansatz zerlegt.

Die 95-proz. alkoholische Lösung, welche die freien Tritisterine enthält, wird nun auf dem Wasserbad erwärmt und mit Wasser auf 82—83 % Alkoholkonzentration gebracht. Dabei entsteht sofort eine weisse, körnige, teilweise flockige Abscheidung. Man bewahrt die Lösung einige Stunden in der Kälte auf, nutscht dann ab, presst den Rückstand aus und wäscht ihn mit 80-proz. Alkohol nach. Diese, aus 82—83-proz. Alkohol abgeschiedene Fraktion, wird im nachstehenden als Fraktion a) bezeichnet. Die wässerig-alkoholische Mutterlauge von a) gibt beim Verdünnen mit etwas mehr Wasser keine weitere Abscheidung; man muss schon auf eine 50—60-proz. Alkoholkonzentration verdünnen, um eine zweite, in diesem Fall aber ölige Abscheidung zu erhalten. Die stark mit Wasser verdünnte Lösung wird mit Petroläther zweimal ausgeschüttelt, wodurch der grösste Teil des Öls in Lösung geht. Die wässerig-alkoholische Schicht bleibt aber noch trübe und enthält eine geringe Menge eines in Petroläther sehr wenig löslichen Körpers, der aber leicht in Äther geht. Die Menge dieser Substanz war für eine weitere Untersuchung zu gering,

doch scheint sie auch sterinartigen Charakter zu haben, denn sie gibt mit Digitonin eine Fällung. Die durch Petroläther aufgenommene Fraktion bezeichnen wir als b).

Fraktion a) aus 15 g Digitoniden.

Die aus der 82—83-proz. alkoholischen Lösung abgeschiedene und abgenutzte Substanz wird direkt auf der Nutsche mit wenig Aceton in Lösung gebracht und die Flüssigkeit durch das Filter gesogen. Etwa noch vorhandene Spuren von Digitoniden bleiben auf diese Weise auf der Nutsche. Die klare, schwach gelbliche Lösung hinterlässt nach dem Verdunsten des Acetons ca. 2 g eines zähen, schwach gelblichen Öls. Wird dieses in 96-proz. Alkohol aufgenommen, so scheidet sich nach einiger Zeit eine sehr geringe Menge eines schwer löslichen Körpers ab, der nach zweimaligem Umkrystallisieren aus Alkohol bei 162—163° schmilzt. Mit Digitonin gibt er die typische, in warmem Alkohol wieder lösliche Fällung. Eine Analyse führte zu den Werten: C 84,30 % H 11,76 %. Die Menge war zu gering, um weitere Untersuchungen damit durchzuführen.

Die alkoholische Mutterlauge, aus der das Sterin vom Smp. 162—163° auskrystallisiert war, wollte anfangs nicht krystallisieren, sondern erstarrte allmählich zu einer steifen Gallerte. Es würde zu weit führen, über die verschiedensten Krystallisationsversuche zu berichten. Es zeigte sich schliesslich, dass man aus Aceton eine weitere, geringe Menge eines Krystallisats erhalten kann, das bei 118—120° schmilzt, aber wahrscheinlich noch eine Mischung war. Wird die Aceton-Mutterlauge, aus der die Fraktion Smp. 118—120° abgetrennt wurde, mit ungefähr dem gleichen Volumen Alkohol versetzt, so tritt nach einiger Zeit Trübung ein, und es scheidet sich eine Gallerte ab, die sich aber, wenn auch mit einiger Mühe, abnutschen lässt und nach dem Abpressen mit etwas Alkohol gewaschen werden kann. Die Gallerte wird hierauf in warmem Äthanol gelöst und die Flüssigkeit mit dem gleichen Volumen Methanol versetzt. Dabei erfolgt wiederum eine gallertige Abscheidung. Diese ist farblos und füllt das ganze Gefäss homogen aus. Nach einiger Zeit kann man an einer oder mehreren Stellen des Gefässes an der Wandung eine allmähliche Umwandlung der Gallerte in strahlige Krystalle beobachten, und nach 24 Stunden ist der ganze Kolben von einer Krystallmasse erfüllt, die nur noch an wenigen Stellen etwas gallertartige Beschaffenheit zeigt. Das Krystallisat wird abgenutzt und noch zweimal aus Äthanol-Methanol-Mischung und schliesslich aus Aceton-Methanol umkrystallisiert. Dabei wiederholt sich meistens das gleiche Schauspiel: zuerst Erstarren der Lösung zu einer Gallerte und nachfolgende allmähliche Umwandlung in den krystallisierten Zustand. Durch Impfen der Lösung mit Krystallen kann die primäre Bildung

der gallertartigen Phase oft nicht vermieden werden, auf deren Entstehen auch der Reinheitsgrad der Substanz anscheinend kaum einen Einfluss hat. Durch das wiederholte Umkrystallisieren stieg der Schmelzpunkt dieser Fraktion, die wir α -Tritisterin nennen, von anfänglich 92° auf schliesslich 114—115°. Vor dem Abnutschen sieht die Substanz wie seidenglänzende, weisse Federn aus, auf der Nutsche erscheint sie als ziemlich weiche, seidenglänzende Nadeln. Aus 2 g der Fraktion 2) gewannen wir bisher ca. 0,4 g α -Tritisterin, also der Fraktion Smp. 114—115°.

$C_{30}H_{50}O$	Ber. C 84,42	H 11,82%
	Gef. ,, 84,22	„ 11,90%

Polarisation in Alkohol:

$$[\alpha]_D = \frac{+ 0,36 \times 7,86}{1 \times 0,79 \times 0,066} = + 54,3^\circ$$

α -Tritisterin-acetat.

Durch 1½-stündiges Kochen mit Essigsäure-anhydrid lässt sich α -Tritisterin leicht acetylieren. Beim Abkühlen der Lösung scheidet sich das Acetat direkt krystallin ab, und durch Zusatz von 50-proz. Alkohol wird die Abscheidung vollendet. In warmem Äthanol löst sich α -Tritisterin-acetat ziemlich leicht auf und krystallisiert daraus in schönen, glänzenden Blättchen. Nach dem Trocknen bei 70° im Hochvakuum lag der Smp. bei 107—108°.

$C_{32}H_{52}O_2$	Ber. C 81,98	H 11,20%
	Gef. ,, 81,76	„ 11,24%

Polarisation in Chloroform:

$$[\alpha]_D = \frac{+ 0,215 \times 9,285}{0,5 \times 1,52 \times 0,037} = + 70,4^\circ$$

Oxydation mit Benzopersäure in Chloroformlösung. Nach 7 Tagen bei 0° im Dunkeln aufbewahrt entsprach die verbrauchte Benzopersäure 1,3 aktiven O-Atomen pro Mol α -Tritisterin.

Die Mutterlaugen, aus denen α -Tritisterin auskrystallisierte, enthalten eine farblose Substanz, die bisher noch nicht krystallin gewonnen wurde; sie besteht wahrscheinlich aus einer Mischung, mit deren Untersuchung wir noch beschäftigt sind. Wir haben vorläufig feststellen können, dass sich daraus über das 2,5-Dinitrobenzoat eine weitere Menge α -Tritisterin abscheiden lässt. Wenn man das Rohprodukt in Pyridinlösung mit 2,4-Dinitrobenzoylchlorid in gewohnter Weise verestert, so entsteht ein Estergemisch, aus dem sich ein krystallisiertes, schwer lösliches Dinitrobenzoat abscheiden lässt. Am besten gelingt diese Krystallisation, wenn der Rohester in Chloroform gelöst und diese Lösung mit Alkohol versetzt wird. Nach zweimaligem Umkrystallisieren aus Essigester schmolz das krystallisierte Dinitrobenzoat bei 182° und ergab folgende Analysenzahl:

$C_{37}H_{52}O_6N_2$	Ber. C 71,57	H 8,45%
$(C_{37}H_{50}O_6N_2)$	Ber. ,, 71,83	„ 8,15%
	Gef. ,, 71,66	„ 8,15%

Nach der Verseifung dieses Dinitrobenzoyl-esters wurde daraus α -Tritisterin vom Smp. 113—115° erhalten. α -Tritisterin krystallisierte auch jetzt, nach dem es über das Dinitrobenzoat gereinigt worden war, aus den Lösungen gewöhnlich nicht direkt aus, sondern wandelte sich meistens erst aus dem gallertigen Zustand allmählich in die seidenglänzenden Nadeln um.

Ausser dem Dinitrobenzoat des α -Tritisterins liess sich aus der vorerwähnten rohen, nicht krystallinen Sterinmischung nach der Dinitrobenzoylierung in kleiner Menge ein weiteres, gut krystallisiertes, aber etwas leichter lösliches Produkt erhalten, welches bei 154—155° schmolz, dessen nähere Untersuchung aber noch aussteht.

Fraktion b)

Die Menge der Fraktion b) beträgt nur ungefähr ein Drittel derjenigen der Fraktion a), dafür scheint sie aber einheitlicher. Wir haben daraus bis jetzt nur eine Substanz isolieren können, von der wir allerdings auch nicht mit Bestimmtheit sagen können, dass sie einheitlich ist. Sie soll vorläufig als β -Tritisterin bezeichnet werden. Nach dem Verdunsten des Petroläthers hinterbleibt auch hier ein zähes Öl, das sich leicht in 95-proz. Alkohol löst. Methanol ist für die weitere Reinigung und Krystallisation ein gutes Lösungsmittel. Aus heissem Methanol scheiden sich auch hier zunächst keine Krystalle, sondern wieder Gallerten ab, die sich aber wie im Fall des α -Tritisterins bei längerem Stehen in eine krystalline Form umwandeln. Der Habitus der Krystalle von α - und β -Tritisterin ist deutlich verschieden. β -Tritisterin bildet feine, glänzende Nadeln, die zu Büscheln vereinigt sind. Nach mehrmaligem Umkrystallisieren aus Methanol und zum Schluss einmal aus konz. Äthanollösung ist der Schmelzpunkt von 70 auf 97° gestiegen. Trocknen im Hochvakuum bei 50°.

$C_{30}H_{50}O$	Ber. C 84,42	H 11,82%
	Gef. „ 84,12	„ 11,68%

Polarisation in absolutem Alkohol:

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{+ 0,25 \times 100}{1 \times 0,79 \times 0,644} = + 49,2^\circ$$

β -Tritisterin-acetat. Erhalten durch Erhitzen mit Essigsäureanhydrid wie bei α -Tritisterin-acetat beschrieben. Beim Abkühlen der Essigsäureanhydridlösung erfolgt im vorliegenden Fall keine Abscheidung, diese tritt erst nach Zusatz von ungefähr dem vierfachen Volumen 50-proz. Alkohol ein. β -Tritisterin-acetat ist in heissem Alkohol leicht löslich; für die Umkrystallisation verwendet man daher zweckmässig eine Mischung gleicher Volumina Äthanol und Methanol. β -Tritisterin-acetat krystallisiert in feinen Nadel-

chen, die nicht den starken Glanz wie die Blättchen des α -Tritisterinacetates zeigen.

$C_{32}H_{52}O_2$	Ber. C 81,98	H 11,20%
	Gef. „ 81,84	„ 11,39%

Polarisation in 0,32-proz. Chloroformlösung:

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{+ 0,135 \times 100}{0,5 \times 1,52 \times 0,5} = + 55,5^{\circ}$$

Oxydation mit Benzopersäure in Chloroformlösung. Nach 7 Tagen bei 0° im Dunkeln aufbewahrt entsprach die verbrauchte Benzopersäure 1,0 aktivem O-Atom pro Mol β -Tritisterin.

Wie eingangs erwähnt, haben wir zuerst eine kleinere Menge unserer Roh-Digitonide mit Essigsäure-anhydrid zerlegt und dabei ein Gemisch von Acetaten erhalten, die sich nicht gut trennen liessen. Wir wollen kurz erwähnen, dass wir versuchten, sie durch Überführung in die Bromide zu reinigen. Als man das rohe Acetat in Äther löste und mit Eisessig-Bromlösung behandelte, liess sich deutlich beobachten, dass die Umsetzung nicht ganz einheitlich verlief. Ausser Bromanlagerung trat auch hier, wie bei anderen Sterinen schon früher beobachtet worden ist, teilweise Substitution ein. Wir konnten schliesslich ein Bromid in anscheinend reinem Zustand isolieren, dessen Smp. bei 160—162° liegt und das sich aus Chloroform nach Alkoholzusatz und aus heissem Aceton gut umkrystallisieren lässt.

Analyse dieses Bromids:

$C_{32}H_{52}O_2Br_2$	Ber. C 61,11	H 8,28	Br 25,49%
	Gef. „ 61,24	„ 8,13	„ 25,24%

Farbreaktionen der Tritisterine.

Liebermann'sche Reaktion. Keine unserer neuen Substanzen gibt die für die Phytosterine im allgemeinen typische *Liebermann'sche* Farbreaktion. α -Tritisterin (vom Smp. 114—115°) zeigt in Chloroformlösung, mit einigen Tropfen Essigsäure-anhydrid und einem Tropfen Schwefelsäure versetzt, eine rasch von Gelb in Blutrot und dann mehr in Bräunlich übergehende Färbung. Der Körper vom Smp. 160—162° gibt unter denselben Bedingungen einen gelben, schnell in olivgelb bis grün umschlagenden Farbton. β -Tritisterin erzeugt mit dem Reagenz eine gelbe Lösung, die nicht rot, sondern nach einiger Zeit schmutzig braun wird.

Salkowsky'sche Reaktion. Auch diese Reaktion fällt mit unseren Verbindungen anders als mit den bekannten Phytosterinen aus. α -, sowie β -Tritisterin und die Verbindung Smp. 160—162° verhalten sich ähnlich. In Chloroformlösung mit Schwefelsäure von 1,76 spez. Gewicht unterschichtet, beobachtet man beim Schütteln zuerst überhaupt kaum eine Verfärbung. Erst nach einiger Zeit fängt die Schwefelsäureschicht an, sich schwach gelb zu färben, die Chloroformschicht gleichfalls, aber schwächer. Nach einigen Stunden ist

die Schwefelsäureschicht stark gelbbraun geworden und die Chloroformschicht undurchsichtig mit einem violetten Schimmer. Bei noch längerem Stehen sieht man an der Grenze zwischen der Chloroform- und Schwefelsäureschicht in der Schwefelsäureschicht einen roten Ring. Schüttelt man nun ab und zu durch, so nimmt die Schwefelsäure eine rubinrote Färbung an. Die rubinrote Färbung der Schwefelsäureschicht und die etwas violettstichige, undurchsichtige Chloroformschicht bleiben dann tagelang in dieser Farbtonung unverändert.

Zürich, Chemisches Institut der Universität.

60. Beiträge zur Kenntnis von Oxymethylen-Verbindungen

von Rudolf Keller.

(20. III. 37.)

A. Kondensationen mit Oxymethylen-phenylacetaldehyd.

Wie aus den bereits veröffentlichten Arbeiten¹⁾ über Oxymethylen-phenylacetaldehyd (Formel I) ersehen werden kann, reagierte in den meisten Fällen zuerst die Oxymethylengruppe, z. B. mit Hydroxylamin, Anilin, Benzoylchlorid, Diazomethan und den drei Nitroanilinen. In einigen anderen Fällen aber wurde die Aldehydgruppe bevorzugt, z. B. durch Ammoniak, Semicarbazid, Hydantoin und Harnstoff. Ringbildungen, d. h. Reaktion an beiden Gruppen, kamen zustande mit Phenylhydrazin, Hydroxylamin und o-Phenylendiamin.

Die bei den oben erwähnten Umsetzungen freigebliebene Aldehydgruppe konnte vielfach entweder durch Bildung eines Semicarbazons oder eines Oxims nachgewiesen werden. Die Oxymethylengruppe lieferte ein Kupfersalz oder liess sich durch Ferrichlorid nachweisen.

Kondensationen mit Anilin.

Wie aus den bereits erwähnten früheren Veröffentlichungen¹⁾ hervorgeht, besteht die Wahrscheinlichkeit, dass eine Molekel Anilin zuerst an der Oxymethylengruppe eingriff (Formel II). Diese Ansicht wurde gestützt durch die Tatsache, dass der entstehende Körper einerseits mit Ferrichlorid keine Färbung mehr gab, und dass er andererseits immer noch ammoniakalische Silbersalzlösung reduzierte.

¹⁾ H. Rupe und Emil Knup, *Helv.* **10**, 299 (1927); H. Rupe und Adolf Huber, *Helv.* **10**, 846 (1927)