

## 202. Untersuchungen über Organextrakte.

(3. Mitteilung<sup>1)</sup>).

### Zur Kenntnis der unverseifbaren Lipide aus arteriosklerotischen Aorten

von E. Hardegger, L. Ruzicka und E. Tagmann.

(29. X. 43.)

Die hochgradig arteriosklerotische<sup>2)</sup> Aorta zeigt eine degenerativ entartete Innenhaut (Intima) mit reichlicher Lipoidinfiltration, oft auch mit Verkalkung und Geschwürbildung. Die angehäuften Lipide bestehen vorwiegend aus Cholesterin und dessen Fettsäure-estern<sup>3)</sup>. Ihre Menge übersteigt den normalen Lipoidgehalt der Intima um ein Vielfaches. Schon vor längerer Zeit vertrat erstmals *L. Aschoff*<sup>4)</sup> die Ansicht, dass die fortschreitende arteriosklerotische Veränderung der grossen Arterien mit dem Steringehalt der infiltrierten Lipide in enger Beziehung stehe.

Nach *Schönheimer* und Mitarbeitern<sup>5)</sup> enthält das aus arteriosklerotischen Aorten isolierte Rohcholesterin etwa 5—6% und nach *Mc Arthur*<sup>6)</sup> sogar 12—13% Cholestanol. Demgegenüber sind im Rohcholesterin, welches aus Blut und zahlreichen Organen isoliert wurde, höchstens 3% Cholestanol vorhanden<sup>7)</sup>. *Schönheimer* glaubte, den hohen Gehalt an Cholestanol durch sekundäre Umwandlungen des längere Zeit in der Aorta deponierten Cholesterins und der Cholesterinester erklären zu können.

In gewissen Fällen lassen sich auch Zusammenhänge der Arteriosklerose mit einem gestörten allgemeinen Sterin- oder Lipoidmetabolismus klar erkennen. Die Veränderung des Stoffwechsels kann dabei sowohl durch eine Erkrankung, wie durch künstliche Eingriffe hervorgerufen werden<sup>8)</sup>. Es war daher von Interesse, die Lipide und besonders die Steroide der arteriosklerotischen

<sup>1)</sup> 1. Mitt. Helv. **23**, 559 (1940); 2. Mitt. Helv. **26**, 975 (1943).

<sup>2)</sup> Arteriosklerose ist gleichbedeutend mit Atherosklerose und mit Atheromatose.

<sup>3)</sup> *A. Windaus*, Z. physiol. Ch. **67**, 174 (1910); *R. Schönheimer*, Z. physiol. Ch. **160**, 61 (1926), **177**, 143 (1928); *S. Weinhouse* und *E. F. Hirsch*, Arch. Pathol. Lab. Med. **29**, 31 (1940); *D. R. Meeker* und *J. W. Jobling*, Arch. Pathol. Lab. Med. **18**, 252 (1934); *P. M. Zeek*, Amer. J. Pathol. **12**, 115 (1936); *C. S. McArthur*, Biochem. J. **36**, 559 (1942).

<sup>4)</sup> Verhandl. Dtsch. pathol. Ges. **X**, 166 (1906).

<sup>5)</sup> *R. Schönheimer*, *H. v. Behring* und *R. Hummel*, Z. physiol. Ch. **192**, 93 (1930).

<sup>6)</sup> *C. S. McArthur*, Biochem. J. **36**, 559 (1942).

<sup>7)</sup> Nur Cholesterin aus Niere und Nebenniere enthält etwa 4% Cholestanol (siehe Anm. 5).

<sup>8)</sup> Vgl. dazu die zusammenfassende Darstellung über das Wesen der Arteriosklerose von *A. v. Albertini*, „Praxis“, Schweiz. Rdsch. Med. Nr. 14, April 1941, sowie die Diss. *E. Tagmann*, E.T.H. Zürich 1943.

Aorta einer erneuten Bearbeitung zu unterziehen<sup>1)</sup>. Eine solche schien auch gerechtfertigt zu sein auf Grund der in den letzten Jahren gesammelten Erfahrungen bei der Isolierung kleiner Mengen Steroide aus Organextrakten.

Zur Isolierung der Lipoide extrahierten wir die zerkleinerten Aorten erschöpfend mit Aceton. Aus dem Extrakt wurden die sauren und die leicht in Wasser löslichen Verbindungen entfernt und dadurch die lipoiden Neutralkörper<sup>2)</sup> erhalten. Da wir nicht nur wie *Schönheimer* die abgetrennte Intima, sondern die ganzen Aorten verwenden, so bestanden diese Anteile vorwiegend aus Fetten. Das Fehlen geeigneter Methoden zur Abtrennung der Steroide und der Steroidester von grossen Mengen ähnlich löslicher Lipoide veranlasste uns, die Neutralkörper einer Verseifung mit Bariumhydroxyd und nachher mit Kalilauge zu unterwerfen<sup>3)</sup>. Dabei sind allerdings Veränderungen in der Struktur nativer Verbindungen nicht auszuschliessen. Da zudem die bei der Verseifung als Bariumsalze anfallenden Fettsäuren sowohl unverseifte, wie unverseifbare Anteile hartnäckig zurückhalten, waren zeitraubende Operationen zur möglichst quantitativen Erfassung des Unverseifbaren notwendig.

Die weitere Verarbeitung des Unverseifbaren erfolgte, unter Verzicht auf chemische Trennungsvorverfahren, ausschliesslich durch Umkrystallisieren und chromatographische Adsorption an Aluminiumoxyd.

Wir haben aus 370 arteriosklerotischen menschlichen Aorten<sup>4)</sup> 127 g unverseifbare Bestandteile gewonnen. Daraus liessen sich etwa 90 g Cholesterin abtrennen, welches auf Grund der spezifischen Drehung noch 5—6% Dihydrocholesterin enthalten dürfte. Eine arteriosklerotische Aorta enthielt also durchschnittlich etwa 240 mg Gesamtcholesterin, gegenüber einem Cholesteringehalt der normalen Aorta von etwa 5—50 mg<sup>5)</sup>. An cholesterinarmem Unverseifbarem, im folgenden als Restunverseifbares, R.U., bezeichnet, blieben etwa 38 g eines dunklen zähflüssigen Öls.

Die Menge des R.U. beträgt etwa ein Drittel des Gesamtunverseifbaren. Sie ist bedeutend grösser als nach den Angaben *Schönheimers*<sup>6)</sup> zu erwarten war. Dabei ist jedoch

1) Eine zusammenfassende Darstellung der Inhaltsstoffe der arteriosklerotischen Aorta findet sich in der Diss. *E. Tagmann*.

2) Die Bezeichnung ist nur so weit gerechtfertigt, als bei der weiteren Verarbeitung keine basischen Bestandteile gefunden wurden.

3) Wir entschlossen uns zu dieser Methode umso leichter, als das Verhältnis von verestertem zu freiem Cholesterin durch Untersuchungen von anderer Seite genügend abgeklärt worden ist. Vgl. Anm. 3, S. 2205.

4) Das Material wurde uns in liebenswürdiger Weise von den Herren Prof. *v. Meyenburg*, Zürich, Prof. *Werthemann*, Basel, und Prof. *Bluntschli*, Bern, zur Untersuchung überlassen, wofür wir hier unseren besten Dank aussprechen.

5) *R. Schönheimer*, Z. physiol. Ch. **160**, 61 (1926); **177**, 143 (1928). *Schönheimer* hat in einzelnen Fällen von schwerster Arteriosklerose 500—1000 mg Gesamtcholesterin pro Aorta gefunden.

6) Z. physiol. Ch. **177**, 143 (1928).

einerseits zu berücksichtigen, dass *Schönheimer* nur die Intima der erkrankten Aorten verarbeitete, während sich die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auf die ganzen Gefäße beziehen. Andererseits ist die Menge des R.U. stets mit Vorsicht zu bewerten, da sich darin die von der Verarbeitung herrührenden Verunreinigungen anreichern<sup>1)</sup>.

In der Tabelle 1 sind die von uns aus dem R.U. bisher isolierten 11 Verbindungen aufgeführt. Verschiedene dieser Substanzen wurden schon früher im Unverseifbaren anderer Teile des menschlichen und des tierischen Körpers aufgefunden.

Die vier in der Tabelle 1 erwähnten Steroide sind insgesamt auch aus anderen Organextrakten isoliert worden: Verbindung I aus dem Extrakt von Schweinetestes<sup>2)</sup> und von Schweinemilz<sup>3)</sup>, Verbindung II aus Schweinemilz-Extrakt<sup>3)</sup>, Verbindung III aus Extrakten von Rinderleber<sup>4)</sup> und Schweinetestes<sup>2)</sup>, Verbindung IV aus dem Serum trächtiger Stuten<sup>5)</sup> und aus Schweineleberextrakt<sup>6)</sup>.

Tabelle 1.

Substanz	Isolierte reine Substanz <sup>7)</sup>		
	mg	% des Unverseifbaren	% des R. U.
Steroide			
$\Delta^{3,5}$ -Cholestadien-on-(7) (I) . . . . .	1485	1,2	4,10
$\Delta^{4,6}$ -Cholestadien-on-(3) (II) . . . . .	22	0,02	0,06
Cholestantriol-(3 $\beta$ ,5,6 trans) (III) . . . . .	19	0,015	0,05
7 $\beta$ -Oxy-cholesterin (IV) . . . . .	82	0,065	0,23
Verschiedene Verbindungen			
Batylalkohol . . . . .	285	0,225	0,79
Friedelin (aus den Korkstopfen) . . . . .	30	0,024	0,08
Nicht identifizierte Präparate			
„Substanz A“: Smp. 301—303 <sup>0</sup> . . . . .	1,4	0,001	0,004
„Substanz B“: Smp. 300—301,5 <sup>0</sup> . . . . .	5,2	0,004	0,014
„Substanz C“: Smp. 79,5—80 <sup>0</sup> . . . . .	25	0,020	0,07
„Substanz D“: Smp. 219—221 <sup>0</sup> . . . . .	5,0	0,004	0,014
„Substanz E“: Smp. 68—69 <sup>0</sup> . . . . .	5,2	0,004	0,014

Da diese vier Steroide ihrer Konstitution nach als Cholesterinumwandlungsprodukte aufgefasst werden können<sup>8)</sup>, so

<sup>1)</sup> Vgl. z. B.: *J. A. Gardner* und *H. Gainsborough*, *Biochem. J.* **28**, 1631 (1934).

<sup>2)</sup> *L. Ruzicka* und *V. Prelog*, *Helv.* **26**, 975 (1943).

<sup>3)</sup> *V. Prelog*, *L. Ruzicka* und *P. Stein*, *Helv.* **26**, 2222 (1943).

<sup>4)</sup> *G. A. D. Haslewood*, *Biochem. J.* **35**, 708 (1941).

<sup>5)</sup> *O. Wintersteiner* und *J. R. Ritzmann*, *J. Biol. Chem.* **136**, 697 (1940).

<sup>6)</sup> *H. B. Mc Phillamy*, *Am. Soc.* **62**, 3518 (1940).

<sup>7)</sup> Die angegebenen Mengenverhältnisse sind durch die Arbeitstechnik mitbedingt und geben daher kein genaues Bild über die wirkliche Zusammensetzung des Extraktes.

<sup>8)</sup> Wir möchten als Cholesterinumwandlungsprodukte nur Verbindungen mit unverändertem Kohlenstoffgerüst verstehen, die beispielsweise durch Oxydation, Reduktion, Wasserabspaltung oder -anlagerung entstanden sind.

stellt sich die Frage, ob sie wirklich schon in der Aorta anwesend waren, oder aber ob sie nicht erst während der Aufarbeitung aus Cholesterin gebildet wurden. Da wir in einer zeitlich später begonnenen Untersuchung über den Extrakt aus Schweinemilz der gleichen Problemstellung begegneten und diese vom gleichen Standpunkt aus diskutieren müssen, so verweisen wir auf die folgende Abhandlung, wo auch die Resultate der vorliegenden Untersuchung mitberücksichtigt worden sind. Dabei sind wir zur Schlussfolgerung gekommen, wonach es sich vorläufig tatsächlich nicht ausschliessen lässt, dass die diskutierten Verbindungen der Steroidreihe (vielleicht mit Ausnahme des  $\Delta^{3,5}$ -Cholestadien-on-(7) aus arteriosklerotischen Aorten<sup>1)</sup>) erst während der Verarbeitung aus Cholesterin entstanden sein könnten.

Als bemerkenswert sei die Abwesenheit der  $C_{18}$ -,  $C_{19}$ - und  $C_{21}$ -Steroide in denjenigen der bisher untersuchten Organextrakte hervorgehoben, die nicht den typischen Steroidhormondrüsen (Nebennieren und Sexualtrakt) bzw. Harnen entstammen. Dieser Unterschied zwischen den Harnen und Steroidhormondrüsen einerseits und anderen Organen andererseits muss nicht ein prinzipieller sein, sondern könnte durch das Mengenverhältnis zwischen den  $C_{18}$ — $C_{21}$ -Steroiden und jenen der  $C_{27}$ -Reihe bedingt sein. In diesem Zusammenhange weisen wir darauf hin, dass die Auswahl und das Mengenverhältnis der aus einem Extrakt zuerst isolierten Steroide wesentlich durch den befolgten Arbeitsgang bedingt ist, wobei sachliche (z. B. Verschiedenheit der Begleitstoffe und ihres Mengenverhältnisses) oder mehr persönliche Momente (wie willkürliche Wahl von Arbeitsvarianten, Bevorzugung gewisser Fraktionen bei der Bearbeitung) eine Rolle spielen.

Zum Schluss seien noch kurz die anderen aus dem Extrakt arteriosklerotischer Aorten isolierten Verbindungen bzw. Präparate (vgl. Tabelle 1) besprochen.

<sup>1)</sup> Es besteht die Möglichkeit, dass das  $\Delta^{3,5}$ -Cholestadien-on-(7) (I), welches als einzige der Verbindungen I—IV in etwas grösserer Menge im R.U. vorkommt, ein Umwandlungsprodukt des in der arteriosklerotischen Aorta vielleicht enthaltenen 7-Keto-cholesterins vorstellt. Es war schon deswegen naheliegend, an das 7-Keto-cholesterin oder einen seiner Ester zu denken, da *J. H. Page* und *W. Menschik*, *Naturwiss.* **18**, 585 (1930), in einer nicht näher charakterisierten Cholesterin-Fraktion aus arteriosklerotischen Aorten spektroskopisch die Anwesenheit einer bei 238  $m\mu$  selektiv absorbierenden Substanz festgestellt hatten. Nach den Angaben von *R. Schönheimer*, *Z. physiol. Ch.* **211**, 65 (1932), konnte diese Substanz in den digitoninfällbaren Anteilen des Unverseifbaren spektroskopisch nachgewiesen werden, auch wenn die alkalische Verseifung der Lipoide in Wasserstoffatmosphäre durchgeführt wurde. Da 7-Keto-cholesterin mit Digitonin fällbar ist und als  $\alpha, \beta$ -ungesättigtes Keton die angegebene Absorptionsbande ( $\log \epsilon = 4,1$ ) aufweist, so könnte es als genuiner Inhaltsstoff der arteriosklerotischen Aorta in Betracht kommen. Schon *Page* und *Menschik* berechneten, dass die dem Spektrum zu Grunde liegende Verbindung in etwa 1-proz. Konzentration im Unverseifbaren des Aortenlipoids enthalten sein kann. Damit steht die von uns isolierte Menge des vielleicht durch Wasserabspaltung aus 7-Keto-cholesterin entstandenen  $\Delta^{3,5}$ -Cholestadien-ons-(7) in bester Übereinstimmung.

Der Batylalkohol wurde von *H. N. Holmes* und Mitarbeitern<sup>1)</sup> aus gelbem Knochenmark von Rindern aufgefunden, womit zum erstenmal sein Vorkommen in Organen von Säugetieren sichergestellt war. Früher war Batylalkohol nur aus dem Unverseifbaren von Fischleberölen isoliert worden<sup>2)</sup>.

Das Friedelin, ein im Kork vorkommendes Keton  $C_{30}H_{50}O$  ist sicher durch die Benützung von Korkstopfen bei den wiederholten Extraktionen in das Unverseifbare gelangt und wurde in unserem Laboratorium auch bei der Aufarbeitung anderer Organextrakte<sup>3)</sup> aufgefunden.

Über die restlichen, in sehr geringer Menge isolierten Substanzen A-E (vgl. Tabelle 1), deren Einheitlichkeit noch nicht feststeht, lassen sich nur wenige Angaben machen, die im experimentellen Teil dieser Arbeit im Anschluss an die Beschreibung der Eigenschaften enthalten sind.

Wir danken der *Rockefeller Foundation* in New York und der *Gesellschaft für Chemische Industrie* in Basel für die Unterstützung dieser Arbeit.

## Experimenteller Teil.

### Herstellung des cholesterinarmen Unverseifbaren (R. U.).

#### Herstellung des Aceton-Extraktes.

Für die Bearbeitung standen uns 370 stark arteriosklerotische Aorten mit reichlich adventitiellem Gewebe zur Verfügung. Sie wurden im Laufe von zwei Jahren gesammelt und bis zur Verarbeitung unter destilliertem Alkohol bei  $-10^{\circ}$  im Dunkeln aufbewahrt. Für die gesamte Bearbeitung wurden stets frisch destillierte peroxydfreie Lösungsmittel verwendet.

Zur Aufarbeitung wurde das gesamte Material auf der Nutsche filtriert, mit frischem Alkohol gut gewaschen und scharf abgesaugt. Die noch alkoholfeuchten Aorten wogen 13,5 kg. Sie wurden in der Fleischhackmaschine zerkleinert, sodann 14 mal mit je 15 Liter reinem Aceton am Wasserbad 8 Stunden gekocht und noch heiss durch ein Filtertuch abgepresst. Die ausgekochten Rückstände enthielten nur noch 0,2—0,3 % acetonlösliche Bestandteile. Die stark getrübbten gelblichen Aceton-Auszüge vereinigte man mit dem öligen Rückstand, der aus dem oben erwähnten alkoholischen Filtrat durch Abdampfen des Lösungsmittels im Vakuum unter Stickstoff anfiel. Nun wurde das Aceton bei  $45-50^{\circ}$  in zunehmendem Vakuum weitgehend entfernt. Das Volumen des gelben zähflüssigen Aceton-Extraktes betrug nach beendigem Eindampfen ca. 4 Liter.

<sup>1)</sup> *H. N. Holmes, R. E. Corbet, W. B. Geiger, N. Kornblum und W. Alexander*, Am. Soc. **63**, 2607 (1941).

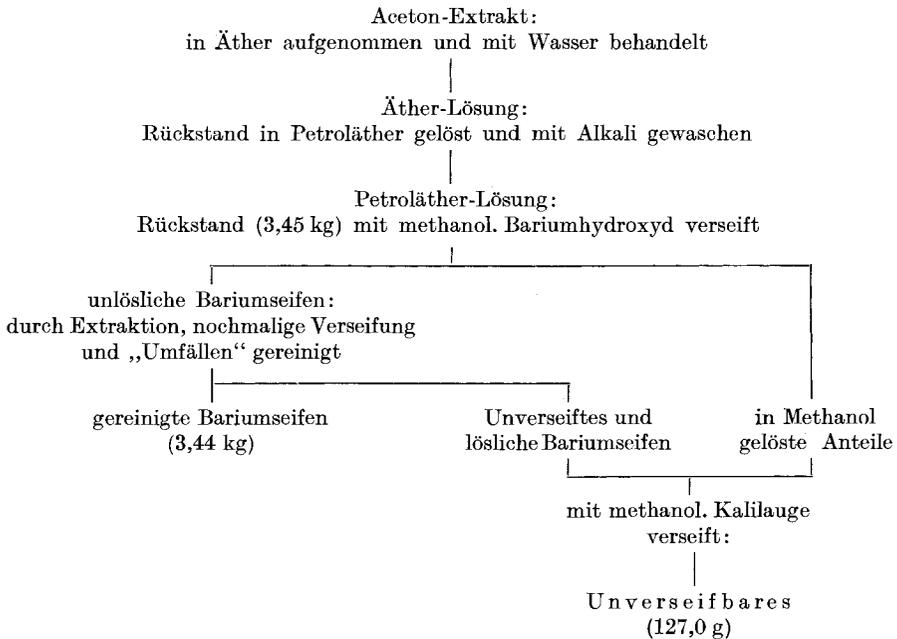
<sup>2)</sup> Vgl. z. B. *M. Tsujimoto*, J. Soc. chem. Ind. Japan (Suppl.) **39**, 82B—83B (1936).

<sup>3)</sup> *Helv.* **26**, 975, 2222 (1943).

Isolierung der Neutralkörper aus dem in Äther löslichen Anteil des Aceton-Extraktes<sup>1)</sup>.

Um die in Wasser leicht löslichen Anteile von den Lipoiden abzutrennen, versetzten wir den Aceton-Extrakt mit 15 Liter destilliertem Wasser und 7 Liter Äther. Nach kräftigem Durchschütteln wurde die wässrige Schicht im Rührextraktor erschöpfend mit Äther ausgezogen. Aus der mit Natriumsulfat getrockneten und darnach eingeeigneten Äther-Lösung entfernte man die letzten Anteile des Lösungsmittels unter Durchperlen von Stickstoff bei 45—50° im Vakuum. Der ölige Rückstand, der beim Stehen teilweise krystallisierte, wog 3700 g. Diesen löste man in 12 Liter tiefsiedendem Petroläther<sup>2)</sup> und entzog die sauren Anteile durch 40-maliges Ausschütteln mit je 700 cm<sup>3</sup> 0,5-n. Natronlauge. Dann wurde mit Wasser so oft nachgewaschen, bis das Waschwasser auf Lackmus neutral reagierte. Das Volumen des Natronlauge-Auszuges und der Waschwässer betrug zusammen 30 Liter. Bei der Behandlung mit Äther im Rührextraktor konnten daraus 20 g neutrale Anteile zurückerhalten werden. Die die Neutralkörper enthaltende Petroläther-Lösung dampfte man ein (zum Schluss im Vakuum). Das erhaltene dunkle Öl wog 3450 g und krystallisierte beim Stehen teilweise.

Tabelle 2<sup>1)</sup>.



Verseifung der Neutralkörper mit Bariumhydroxyd.

In einem 10 Liter-Kolben wurde die gesamte Menge der Neutralkörper (3450 g) mit 6,5 Liter Methanol in Stickstoffatmosphäre zum Sieden erhitzt und im Verlaufe von 10 Stunden 1320 g krystallisiertes Bariumhydroxyd allmählich zugefügt, indem man das im Rückflusskühler kondensierte Methanol durch ein zwischen Kolben und Kühler ge-

<sup>1)</sup> Tabelle 2 stellt eine kurze Zusammenfassung vor der hier folgenden vier kleingedruckten Abschnitte.

<sup>2)</sup> Äther erwies sich bei der Behandlung mit wässrigem Alkali als nicht geeignet, da sich dabei schwer trennbare Emulsionen bildeten.

schaltetes Gefäss fliessen liess, worin sich das Bariumhydroxyd befand und nach und nach in Lösung ging. Die Geschwindigkeit der Auflösung des Bariumhydroxyds konnte bequem durch mehr oder weniger starkes Kochen reguliert werden; grössere örtliche Konzentrationen an Alkali wurden dadurch vermieden und die Methanolmenge liess sich in niedrigen Grenzen halten.

Nach beendigter Zugabe des Bariumhydroxyds wurde das Reaktionsgemisch noch während 1½ Stunden im Sieden gehalten und durch Einstellen in kaltes Wasser rasch auf 40—50° abgekühlt<sup>1)</sup>. Die methanolische Lösung wurde von den festen, vorwiegend an der Kolbenwand haftenden Bariumseifen abdekantiert und durch Einleiten von Kohlendioxyd von überschüssigem Bariumhydroxyd befreit. Es schied sich ungefähr 5 g Bariumcarbonat aus, die mit den Bariumseifen vereinigt wurden.

Die von der methanolischen Mutterlauge abgetrennten Bariumseifen wurden zerkleinert und im *Soxhlet* zuerst mit Petroläther und nachher mit Äther extrahiert<sup>2)</sup>. Mit den beiden Lösungsmitteln liessen sich 1035 g eines braunen, zähflüssigen Öls, bestehend aus ätherlöslichen Bariumseifen, Unverseifbarem und Unverseiftem herauslösen. Die zurückbleibenden extrahierten Bariumseifen wogen 2450 g. Sie waren fast weiss, fühlten sich nicht mehr fettig an und liessen sich ohne weiteres fein pulverisieren.

Zur Verseifung der mit Petroläther und Äther extrahierten Anteile (1035 g) wurden diese in 6 Liter Methanol zum Sieden erhitzt und im Verlaufe von 16 Stunden mit 660 g Bariumhydroxyd<sup>3)</sup>, wie oben beschrieben, versetzt. Die mit Kohlendioxyd behandelte methanolische Lösung wurde nach dem Filtrieren mit der entsprechenden Lösung von der ersten Verseifung vereinigt. Die erhaltenen Bariumseifen im Gewichte von 1200 g pulverisierte man in der Kugelmühle und extrahierte sie erschöpfend mit reinem Äther. Es liessen sich nur noch 14,5 g Extrakt zurückgewinnen, der beim Stehen z. T. krystallin erstarrte. Dieser Anteil wurde ebenfalls zur methanolischen Mutterlauge, welche das Unverseifbare enthielt, zugegeben. Die extrahierten Bariumseifen verarbeiteten wir nicht mehr weiter.

#### „Umfällen“ der Bariumseifen.

Die 2450 g extrahierten Bariumseifen von der ersten Verseifung wurden in 1,5 Liter Wasser suspendiert, mit 5 Liter Äther überschichtet und im Verlaufe von 6 Stunden unter energischem Rühren 3,4 Liter 2-n. Salzsäure zugegeben. Die ätherische Lösung wurde abgetrennt, mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und verdampft. Der Rückstand, ein gelbes Öl, erstarrte beim Stehen zu einer weissen Masse. Er wog 2070 g. Wir lösten ihn in 8,5 Liter heissem Methanol und setzten der kochenden Lösung in der zur Verseifung verwendeten Apparatur im Verlaufe von 10 Stunden 1,4 kg Bariumhydroxyd zu. Nach beendeter Zugabe wurde noch 4 Stunden gekocht und darauf das Reaktionsgemisch wie oben (im Abschnitt „Verseifung der Neutralkörper“) beschrieben, aufgearbeitet<sup>4)</sup>. Das Gewicht der durch Extraktion gereinigten Bariumseifen betrug noch 2240 g.

#### Verseifung mit Kalilauge.

Die vereinigten methanolischen Fraktionen, sowie die mit Petroläther und Äther gewonnenen Extrakte aus den drei vorhergehenden Abschnitten enthalten das gesamte Unverseifbare, daneben aber noch methanol- und ätherlösliche Bariumseifen und schwer verseifbare Anteile. Sie wurden auf 10 Liter eingedampft. Zu der siedenden klaren Lösung fügte man nun tropfenweise im Verlaufe von 3 Stunden 500 g Kaliumhydroxyd gelöst in 600 cm<sup>3</sup> Wasser<sup>5)</sup>. Man kochte noch 2 Stunden am Rückfluss und destillierte hierauf

<sup>1)</sup> Bei langsamem Abkühlen fielen die Bariumseifen oft in schmierigen Klumpen aus.

<sup>2)</sup> Benzol und Methanol eignen sich nicht zur Extraktion der Bariumseifen.

<sup>3)</sup> 10% Überschuss gegenüber der in einer Probeverseifung verbrauchten Menge.

<sup>4)</sup> Die aus den löslichen Bariumseifen extrahierten Anteile wogen 33 g und bestanden zur Hauptsache wieder aus äther- und methanollöslichen Bariumseifen.

<sup>5)</sup> Die Verseifung wurde also mit ungefähr 1-n. Alkali ausgeführt.

6 Liter Methanol im Vakuum ab. Das wässrig-methanolische, alkalische Konzentrat wurde hierauf mit 5 Liter Wasser versetzt, mit Kochsalz gesättigt und im Röhrextraktor mit Äther erschöpfend ausgezogen. Die mit Wasser neutral gewaschene ätherische Lösung trocknete man mit Natriumsulfat und dampfte sie ein. Der kristallisierte hellgelbe Rückstand wog 127 g.

Um sicherzustellen, dass in den 127 g Unverseifbarem wirklich keine verseifbaren Anteile mehr vorhanden waren, führten wir mit 5-n. methanolischer Kalilauge eine Kontrollverseifung durch. Nach 5-stündigem Kochen konnte kein Verbrauch an Alkali festgestellt werden.

### Abtrennung von Cholesterin aus dem Unverseifbaren.

Das Unverseifbare (127 g) wurde mit 1,7 Liter Methanol 1 Stunde am Rückfluss gekocht und noch heiss vorsichtig von dem ungelösten zähflüssigen dunklen Öl abdekantiert. Aus der methanolischen Lösung schied sich über Nacht das Cholesterin in Blättchen ab. Durch Einengen der Mutterlauge liessen sich noch weitere cholesterinreiche, krystalline Fraktionen erhalten. Als Rückstand verblieb schliesslich ein gelbes Öl, welches in Hexan gelöst, nach 10-tägigem Aufbewahren bei  $-10^{\circ}$  ein letztes cholesterinhaltiges Krystallisat abschied. Die Cholesterin-Fraktionen wurden sehr oft aus Aceton umkrystallisiert, bis endlich 83,3 g Cholesterin vom Smp.  $146,5-147,5^{\circ}$  vorlagen, welche mit Antimontrichlorid in Chloroform keine Spur einer Blaufärbung gaben. Daneben wurden noch 1,6 g weniger reines Cholesterin vom Smp.  $136-137^{\circ}$  gewonnen, doch zeigte auch dieses Präparat nur eine schwache Oxy-cholesterin-Reaktion<sup>1)</sup>.

Die gesammelten öligen Anteile des Unverseifbaren, aus denen sich ohne Anwendung der chromatographischen Methode kein Cholesterin mehr abscheiden liess, bezeichnen wir im folgenden als das cholesterinarme Unverseifbare oder als das Restunverseifbare (R. U.)<sup>2)</sup>. Es wog nach dem Trocknen im Vakuum bei  $100^{\circ}$  bis zur Gewichtskonstanz 42,1 g. Bei der Abtrennung des Cholesterins sind somit keine Verluste eingetreten.

### Chromatographische Trennung des cholesterinarmen Unverseifbaren (R. U.).

#### Vorbehandlung des Aluminiumoxyds<sup>3)</sup>.

Einer Probetitration entsprechend suspendierte man 3 kg eines Handelspräparates in 12 Liter heissem Wasser und versetzte unter kräftigem Rühren mit 1,8 Liter 0,1-n. Salzsäure. Unter ständigem Rühren wurde noch 1 Stunde auf dem Dampfbad erhitzt, sodann von der überstehenden heissen Lösung dekantiert und das Aluminiumoxyd auf einer Nutsche mit 20 Liter reinem heissem Wasser nachgewaschen, d. h. bis im Filtrat weder Alkali, noch Chlorionen nachgewiesen werden konnten. Hierauf wurde das Aluminiumoxyd im Luftbad getrocknet und dann während 2 Stunden bei  $145-160^{\circ}$  gehalten. Das

<sup>1)</sup> Die beiden Cholesterin-Präparate dürften auf Grund ihrer spez. Drehungen von  $-37^{\circ}$  und  $-35,5^{\circ}$  etwa 5—6% Cholestanol enthalten.

<sup>2)</sup> Diese Bezeichnung übernahmen wir von *U. Graff*, *Bioch. Z.* **298**, 179 (1938).

<sup>3)</sup> Nach verschiedenen inzwischen ausgearbeiteten Verfahren kann das käufliche Aluminiumoxyd auch auf andere Weise von freiem Alkali befreit werden.

Produkt entsprach nach *Brockmann und Schodder*<sup>1)</sup> der Aktivität II—III. Durch Desaktivierung bzw. durch stärkeres Erhitzen erhielten wir daraus zwei weitere Präparate mit der Aktivität III—IV bzw. I—II.

Durchführung der chromatographischen Auftrennung.  
(Zusammengefasst in Tabelle 3.)

Im folgenden verwendeten wir zur chromatographischen Bearbeitung des R.U. vorwiegend das Aluminiumoxyd mittlerer Aktivität in der 20- bis 30-fachen Menge der jeweils zu adsorbierenden Fraktion<sup>2)</sup>. Wir arbeiteten stets nach dem Durchlaufverfahren. Das im Rohr eingefüllte Adsorptionsmittel wies durchschnittlich ein Verhältnis von Durchmesser zu Höhe wie 1 : 8 auf.

Die nachstehende Tabelle gibt die Übersicht, in welcher Weise die Fraktionierung des R.U. durch mehrfache Anwendung der chromatographischen Trennungsmethode durchgeführt wurde.

Aus der Tabelle ersieht man, dass das gesamte R.U. im Gewicht von 42,1 g zunächst im I. Chromatogramm mit Petroläther, Benzol, Äther, Methanol und Methanol-Eisessig in je eine Fraktion aufgeteilt wurde. Im II. Chromatogramm erfolgte eine weitere Aufteilung der mit Methanol und Eisessig erhaltenen Fraktion. Diese wurde, in Äther gelöst, an Aluminiumoxyd adsorbiert und dann mit Äther, Methanol und Methanol-Eisessig wieder eluiert. Dabei liessen sich 1,33 g mit Äther und 0,18 g mit Methanol eluierbare Anteile ablösen. Im III. Chromatogramm wurden die nun vorliegenden beiden Methanolfraktionen von 7,11 g aus dem I. und von 0,18 g aus dem II. Chromatogramm zusammengenommen, in Benzol gelöst, erneut an Aluminiumoxyd adsorbiert und in analoger Weise weiterverarbeitet<sup>3)</sup>. Die in der Tabelle fett gedruckten Zahlen bezeichnen die Endprodukte der Fraktionierung. Entsprechend der angewandten Methode wurden diese zum Teil gesamthaft, in einigen Fällen aber auch in mehreren kleinen Anteilen aufgefangen. Aus einigen dieser Eluate liessen sich durch Krystallisation einheitliche Verbindungen isolieren. Oft war jedoch eine erneute (weiter unten jeweils beschriebene) chromatographische Reinigung notwendig, um zu krystallinen Produkten zu gelangen.

Aufarbeitung der Fraktion V<sub>2</sub>.

Friedelin. Das Benzoleluat V<sub>2</sub> wurde in 4 Anteilen aufgefangen. Der 2. Anteil bestand aus einem gelblichen, teilweise krystallinen Öl von 0,29 g. Nach Abtrennung der Öle liessen sich daraus durch mehrfache Krystallisation aus Essigester 18 mg lange, farblose Nadeln vom Smp. 267—268° isolieren. Die Substanz gab mit Tetranitromethan keine Gelbfärbung. Mit konz. Schwefelsäure war in der Kälte und beim Erwärmen keine Veränderung festzustellen.

Zur Analyse wurde im Hochvakuum bei 160—170° sublimiert.

3,645; 3,642 mg Subst. gaben 11,281; 11,257 mg CO<sub>2</sub> und 3,835; 3,899 mg H<sub>2</sub>O

C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> O	Ber. C	84,44	H	11,81%
	Gef. „	84,46; 84,35	„	11,77; 11,98%

Molekulargewicht nach *Rast* in Campher: Gef. 469; 446 (Ber. 427).

$[\alpha]_D = -23^\circ (\pm 2^\circ)$  (c = 0,817 in Chloroform)

Nach der Stellung im Chromatogramm schien ein Keton vorzuliegen. Bei der Mischprobe mit einem aus Kork hergestellten Vergleichspräparat, sowie durch Herstellung des Enolbenzoats (Schmelz-

<sup>1)</sup> B. 74, 73 (1941).

<sup>2)</sup> Die im VI. Chromatogramm verwendete 100-fache Menge an Adsorptionsmittel zeigte keine wesentlichen Vorteile.

<sup>3)</sup> Detaillierte Angaben finden sich in der Diss. *E. Tagmann*, E. T. H. Zürich, 1943.

**Tabelle 3.**  
Chromatographische Fraktionierung des Restunverseifbaren.

Chromatogramme	I	II	III	IV <sup>3)</sup>	V	VI <sup>6)</sup>	VII <sup>8)</sup>
Verwendete Fraktionen	R. U.	I <sub>5</sub>	I <sub>4</sub> + II <sub>4</sub>	I <sub>3</sub> + II <sub>3</sub> + III <sub>3</sub> I <sub>2</sub> + III <sub>2</sub> + IV <sub>2</sub>	I <sub>1</sub> + IV <sub>1</sub> + V <sub>1</sub>		IV <sub>4</sub>
Eluiert mit:							
Petroläther . . . . .	I <sub>1</sub> 4,57 <sup>1)</sup>			IV <sub>1</sub> 0,51	V <sub>1</sub> 0,16	VI <sub>1</sub> 5,07 <sup>7)</sup>	
Benzol . . . . .	I <sub>2</sub> 12,75		III <sub>2</sub> 0,28	IV <sub>2</sub> 0,94	V <sub>2</sub> 9,24	VI <sub>2</sub> 0,08	VII <sub>2</sub> 0,66
Äther . . . . .	I <sub>3</sub> 13,01	II <sub>3</sub> 1,33	III <sub>3</sub> 0,12	IV <sub>3</sub> 4,14	V <sub>3</sub> 2,00		VII <sub>3</sub> 1,06
Methanol . . . . .	I <sub>4</sub> 7,11 <sup>2)</sup>	II <sub>4</sub> 0,18	III <sub>4</sub> 6,85 <sup>2)</sup>	IV <sub>4</sub> 3,60 <sup>2)4)</sup>	V <sub>4</sub> 0,95	VI <sub>4</sub> 0,04 <sup>2)</sup>	VII <sub>4</sub> 1,83 <sup>2)</sup>
Methanol — Eisessig (9:1) . . . . .	I <sub>5</sub> 4,67 <sup>2)</sup>	II <sub>5</sub> 3,16 <sup>2)</sup>			V <sub>5</sub> 1,20 <sup>5)</sup>		

1) Alle Zahlen mit arabischen Ziffern geben die Gewichte der betr. Fraktion in g an.  
 2) Zum Teil heiss extrahiert im *Soxhlet*.  
 3) Aus den Fraktionen I<sub>3</sub> + II<sub>3</sub> + III<sub>3</sub> wurden vor dem Chromatographieren durch Krystallisation 5,22 g Cholesterin abgetrennt.  
 4) Zum Teil schon mit heissem Äther extrahiert.  
 5) Zum Teil schon mit heissem Methanol extrahiert.  
 6) Aluminiumoxyd der Aktivität I—II.  
 7) Mit Pentan eluiert.  
 8) Aluminiumoxyd der Aktivität III—IV.

punkt und Mischprobe 265—266<sup>o</sup>) liess sich die Verbindung als Friedelin identifizieren<sup>1)</sup>.

$\Delta^{3,5}$ -Cholestadien-on-(7). Der 3. Anteil des Benzoleluats V<sub>2</sub> wog 5,53 g. Durch Behandeln mit Aceton konnte die Hauptmenge der übrigen Anteile daraus entfernt werden. Der krystalline Rückstand wurde hierauf im Hochvakuum bei 115—125<sup>o</sup> sublimiert und das Sublimat erneut aus Aceton krystallisiert. Es wurden 1,24 g Substanz in weissen Blättchen vom Smp. 114—114,5<sup>o</sup> erhalten.

Zur Analyse wurde 48 Stunden im Hochvakuum bei 60<sup>o</sup> getrocknet.

3,750 mg Subst. gaben 11,628 mg CO<sub>2</sub> und 3,672 mg H<sub>2</sub>O

C <sub>27</sub> H <sub>42</sub> O	Ber. C 84,75	H 11,07%
	Gef. „ 84,62	„ 10,96%

$[\alpha]_D = -299^o (\pm 5^o)$  (c = 1,114 in Chloroform)

Bei der Mischprobe mit  $\Delta^{3,5}$ -Cholestadien-on-(7)<sup>2)</sup> erfolgte keine Schmelzpunktserniedrigung.

In Übereinstimmung mit dem Vergleichspräparat zeigte die Substanz in alkoholischer Lösung im U.V. ein Absorptionsmaximum bei 280 m $\mu$  (log  $\epsilon = 4,4$ ).

Oxim. Durch 5-stündiges Kochen des Ketons mit Hydroxylaminacetat in methanolischer Lösung wurde das Oxim erhalten, das aus Methanol umkrystallisiert, einen Schmelzpunkt von 176—178<sup>o</sup> zeigte. Zur Analyse wurde das Präparat im Hochvakuum 48 Stunden bei 85—90<sup>o</sup> getrocknet.

3,810 mg Subst. gaben 11,396 mg CO<sub>2</sub> und 3,750 mg H<sub>2</sub>O

5,004 mg Subst. gaben 0,171 cm<sup>3</sup> N<sub>2</sub> (24<sup>o</sup>, 728 mm)

C <sub>27</sub> H <sub>43</sub> ON	Ber. C 81,55	H 10,90	N 3,52%
	Gef. „ 81,64	„ 11,01	„ 3,76%

Semicarbazon. Eine Probe des Ketons kochte man 7 Stunden mit methanolischer Semicarbazidacetat-Lösung und arbeitete wie üblich auf. Die gelbbraunen Krystalle wurden mit Petroläther und heissem Wasser gewaschen, wodurch sich die Hauptmenge der gefärbten Verunreinigungen entfernen liess. Nach dreimaligem Umkrystallisieren aus Methanol zeigten die langen seidenglänzenden Nadeln einen konstanten Schmelzpunkt von 206,5—207,5<sup>o</sup>.

Zur Analyse wurde im Hochvakuum 48 Stunden bei 100<sup>o</sup> getrocknet.

3,598 mg Subst. gaben 10,10 mg CO<sub>2</sub> und 3,27 mg H<sub>2</sub>O

5,446 mg Subst. gaben 0,461 cm<sup>3</sup> N<sub>2</sub> (17<sup>o</sup>, 725 mm)

C <sub>28</sub> H <sub>45</sub> ON <sub>3</sub>	Ber. C 76,49	H 10,32	N 9,56%
	Gef. „ 76,60	„ 10,17	„ 9,51%

Die Mutterlaugen von der Isolierung des Friedelins und des  $\Delta^{3,5}$ -Cholestadien-ons-(7) waren ebensowenig zur Krystallisation zu bringen wie der letzte Anteil der Fraktion V<sub>2</sub>. Wir bearbeiteten sie daher zusammen mit der Fraktion VII<sub>2</sub> (vgl. nächstes Kapitel).

### Aufarbeitung der Fraktion VII<sub>2</sub>.

Aus derselben konnten keine krystallinen Anteile abgetrennt werden. Die Fraktion VII<sub>2</sub> und die Substanz aus den Mutterlaugen von

<sup>1)</sup> Detaillierte Angaben finden sich in der Diss. E. Tagmann, E.T.H. Zürich, 1943.

<sup>2)</sup> A. Windaus und C. Resau, B. 48, 851 (1915).

V<sub>2</sub> wogen zusammen 6,03 g und wurden aus Petroläther an 200 g Aluminiumoxyd der Aktivität II—III chromatographiert (Tabelle 4).

Tabelle 4.

Fraktionen	Lösungsmittel, 250 cm <sup>3</sup> pro Fraktion	Eluat g	
1—5	Petroläther	2,860	farbloses Öl, in der Kälte erstarrend
6—7	Petroläther-Benzol 99:1	0,185	gelbliche Öle, zum Teil kristallisiert (Friedelin)
8	„ „ 19:1	0,083	
9—10	„ „ 9:1	0,028	
11—13	Petroläther-Benzol 9:1	0,024	teilweise kryst.
14—16	Petroläther-Benzol 9:1	0,485	teilweise kryst.: Δ <sup>3,5</sup> -Cholestadien-on-(7)
17—19	„ „ 4:1	0,643	
20	Petroläther-Benzol 4:1	0,186	gelbes Öl, zum Teil kryst.
21	Petroläther-Benzol 1:1	0,000	—
22	Petroläther-Benzol 1:1	0,002	teilweise krystallin (Subst. A)
23—27	Benzol	0,012	
28—41	„	0,004	gelbe Öle
42—44	Benzol-Äther 99:1	0,410	
45	„ „ 19:1	0,018	
46	„ „ 9:1	0,024	
47—53	Äther	0,200	
54	Methanol	0,280	gelbe Harze
55—56	Extraktion der Säule mit heissem Methanol	0,540	

Aus den Fraktionen 6—10 (Tabelle 4) konnten noch 12 mg Friedelin und aus den Fraktionen 14—19 210 mg Δ<sup>3,5</sup>-Cholestadien-on-(7) isoliert werden.

„Substanz A“. Die Fraktionen 22—27 wurden in Chloroform gelöst und tropfenweise mit heissem Essigester bis zur beginnenden Trübung versetzt. Die langsam sich bildenden Krystalle waren frei von öligen Mutterlaugen. Sie zeigten einen Schmelzpunkt von 301—303°.

$$[\alpha]_D = -61^\circ (\pm 17^\circ) (c = 0,115 \text{ in Chloroform})$$

Da von der Substanz nur 1,4 mg isoliert werden konnten, musste auf eine weitere Untersuchung vorläufig verzichtet werden.

Durch Umkrystallisieren der Fraktionen 11—13 und 20 (Tabelle 4) aus Aceton und Essigester erhielten wir unscharf zwischen 80—98° schmelzende Krystallisate. Die gesamte Menge (210 mg) wurde daher erneut an 10 g Aluminiumoxyd der Aktivität II—III chromatographiert (Tabelle 5).

Tabelle 5.

Fraktionen	Lösungsmittel, 100 cm <sup>3</sup> pro Fraktion	mg	
1—2	Petroläther	—	
3—5	Petroläther-Benzol 99:1	28	farbloses Öl: $\Delta^{4,6}$ -Cholestadien-on-(3)
6—7	Petroläther-Benzol 49:1	25	teilweise kristallin:
8—9	„ „ 19:1	25	$\Delta^{3,5}$ -Cholestadien-on-(7)
10—14	Benzol	82	gelbes Öl
15	Methanol	35	gelbes Harz

$\Delta^{4,6}$ -Cholestadien-on-(3). Aus den Fraktionen 3—5 kristallisierte nach mehrtägigem Stehen bei  $-10^{\circ}$  eine Substanz, die aus Methanol in feinen seidenglänzenden Nadeln vom Smp.  $79,5-81^{\circ}$  erhalten wurde. Das Präparat (22 mg) wurde zur Analyse 48 Stunden im Hochvakuum bei  $40-45^{\circ}$  getrocknet.

3,710 mg Subst. gaben 11,519 mg CO<sub>2</sub> und 3,688 mg H<sub>2</sub>O

C<sub>27</sub>H<sub>42</sub>O Ber. C 84,75 H 11,07%  
Gef. „ 84,73 „ 11,12%

$[\alpha]_D = +35^{\circ}$  ( $\pm 2^{\circ}$ ) ( $c = 1,534$  in Chloroform)

Bei der Mischprobe mit  $\Delta^{4,6}$ -Cholestadien-on-(3)<sup>1)</sup> ergab sich keine Erniedrigung des Schmelzpunktes.

In Übereinstimmung mit dem Vergleichspräparat zeigte das von uns isolierte  $\Delta^{4,6}$ -Cholestadien-on-(3) im U.V. Absorptionsspektrum in Alkohol-Lösung ein Maximum bei  $285 \mu$  ( $\log \epsilon = 4,4$ ).

Oxim<sup>1)</sup>. Durch zweistündiges Kochen der methanolischen Lösung des Ketons mit Hydroxylaminacetat am Rückfluss liess sich ein in feinen, rosettenförmig angeordneten Nadeln kristallisierendes Oxim erhalten. Nach zweimaligem Umkristallisieren aus Methanol schmolz das Präparat bei  $176-177^{\circ}$ . Zur Analyse wurde das Präparat im Hochvakuum 48 Stunden bei  $85^{\circ}$  getrocknet.

3,758 mg Subst. gaben 11,213 mg CO<sub>2</sub> und 3,701 mg H<sub>2</sub>O

4,418 mg Subst. gaben 0,145 cm<sup>3</sup> N<sub>2</sub> ( $16^{\circ}$ , 727 mm)

C<sub>27</sub>H<sub>43</sub>ON Ber. C 81,55 H 10,90 N 3,52%  
Gef. „ 81,43 „ 11,02 „ 3,71%

Im U.V.-Absorptionsspektrum besitzt das Oxim ein Maximum bei  $285 \mu$  ( $\log \epsilon = 4,55$ ).

Aus den Fraktionen 6—9 wurden durch Umkristallisieren aus Aceton noch 35 mg  $\Delta^{3,5}$ -Cholestadien-on-(7) isoliert.

#### Aufarbeitung der Fraktion VI<sub>2</sub>.

„Substanz E“: Beim Behandeln mit Aceton konnten aus der Fraktion VI<sub>2</sub> geringe Mengen fester Anteile abgetrennt werden. Nach 4 Krystallisationen aus Aceton schmolz die Substanz, von der insgesamt 5,2 mg isoliert wurden, bei  $68-69^{\circ}$ . Sie gab mit Tetra-

<sup>1)</sup> E. Dane, Yu Wang und W. Schulte, Z. physiol. Ch. **245**, 80 (1937).

nitromethan eine sehr starke gelb-braune Farbreaktion. Zur Analyse wurde bei 45° 48 Stunden im Hochvakuum getrocknet.

3,588 mg Subst. gaben 10,732 mg CO<sub>2</sub> und 4,164 mg H<sub>2</sub>O

C <sub>20</sub> H <sub>38</sub> O (?)	Ber. C 81,54	H 13,01%
	Gef. „, 81,63	„, 12,99%

[α]<sub>D</sub> = +17° (± 4°) (c = 0,468 in Chloroform)

Auf Grund der Verbrennungswerte kann der Substanz E keine eindeutige Bruttoformel zuerteilt werden. Nach der Stellung im Chromatogramm könnte es sich um einen doppelt ungesättigten Äther oder um ein einfach ungesättigtes Keton der aliphatischen Reihe handeln.

#### Aufarbeitung der Fraktion IV<sub>3</sub>.

„Substanz B“: Aus dem 1. Anteil der Fraktion IV<sub>3</sub> liess sich nach Abtrennen von 645 mg Cholesterin und öligen Anteilen durch mehrmaliges Umlösen aus Essigester eine in Essigester schwerlösliche Substanz abtrennen.

Das Produkt, das in den meisten gebräuchlichen organischen Lösungsmitteln ausser in Chloroform schwer löslich ist, und anfänglich nur in gallertiger Form isoliert werden konnte, liess sich aus Chloroform-Butylalkohol umkrystallisieren. Es konnte daraus nach mehrtägigem Stehen in feinen, rosettenförmig angeordneten weissen Nadelchen erhalten werden. Nach fünfmaligem Umkrystallisieren aus Chloroform-Butylalkohol lag der Schmelzpunkt konstant bei 301—301,5°. Zur Analyse wurde die Substanz bei 80° im Hochvakuum 48 Stunden getrocknet.

3,139 mg Subst. gaben 9,523 mg CO<sub>2</sub> und 3,309 mg H<sub>2</sub>O

C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O (?)	Ber. C 82,69	H 11,80%
C <sub>54</sub> H <sub>90</sub> O <sub>3</sub> (?)	„ „ 82,38	„ 11,52%
	Gef. „, 82,79	„ 11,80%

[α]<sub>D</sub> = +25,5° (± 3°) (c = 0,354 in Chloroform)

Auf eine weitergehende Untersuchung dieser Substanz musste wegen Materialmangel — es wurden insgesamt 5,2 mg Substanz isoliert — verzichtet werden. Von Interesse ist noch, dass das Präparat mit der „Substanz A“ bei der Mischprobe eine Schmelzpunktsenkung von 8° zeigte.

#### Aufarbeitung der Fraktionen V<sub>3</sub> und VII<sub>3</sub>.

Die Fraktionen V<sub>3</sub> und VII<sub>3</sub> wurden mit dem 2. Anteil der Fraktion IV<sub>3</sub> vereinigt. Sie wogen zusammen 565 mg. Man chromatographierte sie an 20 g Aluminiumoxyd der Aktivität II—III (Tabelle 6).

„Substanz C“: Aus den Chromatogrammfractionen 3—9 liessen sich durch Behandeln mit Essigester 25 mg einer Substanz isolieren, die nach viermaligem Umkrystallisieren einen konstanten Schmelzpunkt von 79,5—80° zeigte. Sie wurde in sehr feinen Nadeln erhalten. Gegen Tetranitromethan war die Verbindung gesättigt. Sie enthält keinen Stickstoff. Zur Analyse wurde die Substanz im Hochvakuum während 48 Stunden bei 50° getrocknet.

3,800 mg Subst. gaben 11,434 mg CO<sub>2</sub> und 4,864 mg H<sub>2</sub>O

C <sub>30</sub> H <sub>62</sub> O (?)	Ber. C 82,11	H 14,24%
	Gef. „, 82,11	„ 14,32%

[α]<sub>D</sub> = 0,0° (± 1°) (c = 0,851 in Chloroform)

Aus der Stellung im Chromatogramm und aus den Verbrennungswerten lässt sich vermuten, dass es sich um einen gesättigten aliphatischen Alkohol handeln könnte.

Cholestantriol-(3β, 5, 6 trans). Durch Umkrystallisieren der Fraktionen 32 und 33 (Tabelle 6) aus Benzin (Sdp. 100—110°) gelang

es, 19 mg einer in feinen Nadeln krystallisierenden Verbindung vom Smp. 244—245° (Sintern ab 227°) zu isolieren.

Tabelle 6.

Fraktionen	Lösungsmittel, 150 cm <sup>3</sup> pro Fraktion	mg	Smp.	
1—2	Petroläther	—	—	
3	Petroläther-Benzol 19:1	3	70,5—72°	teilweise krystall.
4—6	„ „ 19:1	24	75—76°	
7—9	„ „ 19:1	4	71,5—73,5°	
10	Petroläther-Benzol 19:1	—	—	—
11—12	Petroläther-Benzol 1:1	40	—	gelbe Harze
13—20	Benzol	215	—	
21—22	Benzol-Äther 19:1	12	—	
23—24	„ „ 1:1	18	—	
25—31	Äther	58	—	
32	Äther-Methanol 19:1	17	207—215°	teilweise kryst.
33	„ „ 19:1	25	205—210°	
33	„ „ 19:1	14	208—215°	
35	Äther-Methanol 1:1	3	—	gelbe Harze
36—41	Methanol	68	—	braune Harze
42	Extraktion der Säule mit heissem Methanol	52	—	

Die Verbindung gab weder mit Tetranitromethan, noch mit Antimontrichlorid, noch mit Trichloressigsäure eine Farbreaktion. Zur Analyse wurde im Hochvakuum 48 Stunden bei 80° getrocknet.

2,572 mg Subst. gaben 7,270 mg CO<sub>2</sub> und 2,749 mg H<sub>2</sub>O

C<sub>27</sub>H<sub>48</sub>O<sub>3</sub> Ber. C 77,09 H 11,50%  
Gef. „ 77,14 „ 11,96%

Diacetat. 10 mg Substanz wurden mit 0,4 cm<sup>3</sup> Acetanhydrid und 0,5 cm<sup>3</sup> Pyridin versetzt und über Nacht bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Das überschüssige Acetanhydrid und Pyridin wurde im Vakuum auf dem Wasserbade entfernt und der krystallin erstarrende Rückstand bis zum konstanten Schmelzpunkt von 165—167° aus Methanol umkrystallisiert.

Zur Analyse wurde 36 Stunden bei 80° im Hochvakuum getrocknet.

3,483 mg Subst. gaben 9,397 mg CO<sub>2</sub> und 3,245 mg H<sub>2</sub>O

C<sub>31</sub>H<sub>52</sub>O<sub>5</sub> Ber. C 73,76 H 10,39%  
Gef. „ 73,63 „ 10,42%

Die Mischprobe mit Cholestantriol-(3β,5,6 trans)-diacetat<sup>1)</sup> gab keine Schmelzpunktserniedrigung.

„ Substanz D'': Aus der Chromatogrammfraction 34 (Tabelle 6) liessen sich durch Umkrystallisieren aus Methanol 5 mg einer Verbindung isolieren, deren Schmelzpunkt nach dreimaligem Umlösen konstant bei 219—221° lag. Die Substanz krystallisierte in

<sup>1)</sup> R. H. Pickard und J. Yates, Soc. **93**, 1678 (1908).

feinen, farblosen Nadeln. Mit Antimontrichlorid in Chloroform gab sie eine rote, mit Trichloressigsäure in Chloroform eine blaue Färbung. Gegen Tetranitromethan war sie gesättigt. Zur Analyse wurde 48 Stunden im Hochvakuum bei 90° getrocknet.

1,546 mg Subst. gaben 4,446 mg CO<sub>2</sub> und 1,538 mg H<sub>2</sub>O

C<sub>20</sub>H<sub>34</sub>O<sub>2</sub> (?) Ber. C 78,38 H 11,18%  
Gef. „ 78,48 „ 11,13%

[α]<sub>D</sub> = -66° (± 3°) (c = 0,379 in Chloroform)

#### Aufarbeitung der Fraktion III<sub>4</sub>.

7β-Oxy-cholesterin. Durch Behandlung des 1. Anteils der Fraktion III<sub>4</sub> mit Essigester gelang es, eine in Drusen krystallisierende Substanz von der dunkel gefärbten öligen Mutterlauge abzutrennen.

Aus dem Krystallinat liess sich eine in Methanol schwer lösliche Fraktion abtrennen, die durch Umkrystallisieren aus Methanol oder Aceton in langen seidig glänzenden Nadeln vom Smp. 188—188,5° erhalten wurde. Die Substanz ist gegen Tetranitromethan gesättigt. Mit Antimontrichlorid in Chloroform gibt sie eine intensive Blaufärbung.

Zur Analyse wurde 48 Stunden im Hochvakuum bei 80° getrocknet.

3,890 mg Subst. gaben 11,522 mg CO<sub>2</sub> und 4,043 mg H<sub>2</sub>O

C<sub>27</sub>H<sub>46</sub>O<sub>2</sub> Ber. C 80,54 H 11,52%  
Gef. „ 80,83 „ 11,63%

[α]<sub>D</sub> = -93° (± 2°) (c = 0,904 in Chloroform)

Bei der vorliegenden Substanz handelt es sich um 7β-Oxy-cholesterin, von dem insgesamt 70 mg isoliert wurden.

Dibenzoat. 20 mg 7β-Oxy-cholesterin, gelöst in wenig Pyridin, wurden mit fünf Tropfen Benzoylchlorid versetzt und das Reaktionsgemisch während 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Das überschüssige Benzoylchlorid und das Pyridin wurden im Vakuum entfernt und der ölige Rückstand an Aluminiumoxyd der Aktivität II chromatographiert. Mit einer Mischung von Petroläther-Benzol (1 : 1) wurde ein farbloses Öl eluiert, das unter Petroläther aufbewahrt, beim Stehen im Kühlschrank in farblosen Nadeln krystallisierte.

Nach viermaligem Umkrystallisieren aus Methanol zeigte das Präparat einen konstanten Schmelzpunkt von 151,5—152,5°. Zur Analyse wurde die Substanz im Hochvakuum bei 80° getrocknet.

3,850 mg Subst. gaben 11,412 mg CO<sub>2</sub> und 3,164 mg H<sub>2</sub>O

C<sub>41</sub>H<sub>54</sub>O<sub>4</sub> Ber. C 80,61 H 8,91%  
Gef. „ 80,89 „ 9,20%

Aus dem 2. Anteil der Fraktion III<sub>4</sub>, aus dem durch Krystallisation keine einheitlichen krystallinen Produkte erhalten werden konnten, wurde die Hauptmenge der öligen Mutterlauge durch mehrmaliges Waschen der festen Anteile mit Essigester entfernt. Die festen Anteile im Gesamtgewichte von 2,09 g wurden einer erneuten chromatographischen Trennung an 60 g Aluminiumoxyd der Aktivität III—IV unterworfen (Tabelle 7).

Batylalkohol. Aus den Benzolfractionen 3—8 (Tabelle 7) liessen sich durch Umkrystallisieren aus Methylalkohol weitere 12 mg 7β-Oxy-cholesterin isolieren.

Aus den Mutterlaugen gelang es, durch fraktionierte Krystallisation Batylalkohol abzutrennen, der sich durch seine erheblich grössere

Löslichkeit in Methanol und Essigester vom 7  $\beta$ -Oxy-cholesterin unterscheidet.

Tabelle 7.

Fraktionen	Lösungsmittel, 150 cm <sup>3</sup> pro Fraktion	Gewicht g	
1—2	Petroläther-Benzol 1:1	—	—
3—8	Benzol	1,24	teilweise kristallin
9—10	Benzol-Äther 99:1	0,026	
11—12	„ „ 49:1	0,013	
13—14	Benzol-Äther 19:1	0,014	gelbliches Öl
15—19	Äther	0,12	gelbes Öl
20—21	Methanol	0,16	gelbes Harz
22	Extraktion der Säule mit heissem Methanol	0,42	

Nach sechsmaligem Umkrystallisieren aus Essigester wurde ein Präparat erhalten, das keine Antimontrichlorid-Reaktion mehr zeigte. Es wies einen konstanten Schmelzpunkt von 66,5—67,5° auf. Das Präparat zeigte mit synthetischem, allerdings racemischem Batylalkohol bei der Mischprobe keine Schmelzpunktserniedrigung. Aus den Fraktionen 3—12 wurden insgesamt 285 mg Batylalkohol isoliert.

Zur Analyse wurde das Produkt bei 35—40° am Hochvakuum getrocknet.

3,496 mg Subst. gaben 9,428 mg CO<sub>2</sub> und 3,922 mg H<sub>2</sub>O

C<sub>21</sub>H<sub>44</sub>O<sub>3</sub> Ber. C 73,20 H 12,87%

Gef. „ 73,60 „ 12,55%

$[\alpha]_D = +6,0^\circ (\pm 2^\circ)$  (c = 1,005 in Chloroform)

Bis-phenylurethan. 30 mg Batylalkohol wurden mit 10 Tropfen Phenylisocyanat versetzt und während 2½ Stunden unter Feuchtigkeitsausschluss auf 80° erwärmt. Das überschüssige Phenylisocyanat wurde auf dem Wasserbad im Vakuum entfernt und der Rückstand aus Benzol (Sdp. 70—80°) umkrystallisiert. Nach viermaligem Umkrystallisieren zeigte das Präparat einen konstanten Schmelzpunkt von 97—98,5° und ergab mit einem aus synthetischem racemischem Batylalkohol hergestellten Vergleichspräparat keine Erniedrigung des Schmelzpunktes. Zur Analyse wurde bei 60° am Hochvakuum getrocknet.

3,599 mg Subst. gaben 9,508 mg CO<sub>2</sub> und 2,992 mg H<sub>2</sub>O

4,080 mg Subst. gaben 0,176 cm<sup>3</sup> N<sub>2</sub> (17°, 727 mm)

C<sub>35</sub>H<sub>54</sub>O<sub>5</sub>N<sub>2</sub> Ber. C 72,13 H 9,34 N 4,81%

Gef. „ 72,10 „ 9,30 „ 4,86%

Die Analysen wurden in unserer mikroanalytischen Abteilung von Herrn W. Manser ausgeführt.

Organisch-chemisches Laboratorium  
der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich.