Untersuchungen über den Acetonextrakt aus Schweineleber

VON DER

EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE IN ZÜRICH

ZUR ERLANGUNG

DER WÜRDE EINES DOKTORS DER TECHNISCHEN WISSENSCHAFTEN

GENEHMIGTE

PROMOTIONSARBEIT

VORGELEGT VON

DEAN R. REXFORD, B. S. in chem.
aus New York, N. Y. (U. S. A.)

Referent: Herr Prof. Dr. L. Ruzicka
Korreferent: Herr Prof. Dr. H. E. Fierz

Zürich 1944
Dissertationsdruckerei AG. Gebr. Leemann & Co.
Stockerstr. 64

Leer - Vide - Empty

Inhaltsangabe

Seite

Einleitung 5

Theoretischer Teil 6

Über die chemische Zusammensetzung der Leber und der Leberextrakte 6

Über die Bearbeitung der Lipoidanteile von Organextrakten . 15

Eigene Versuche 20

Experimenteller Teil 22

Übersicht I 25

Untersuchung der Neutralstoffe 26

Untersuchung der Fraktion U_2 28

Übersicht II 36

Untersuchung der Fraktion U_3 40

Untersuchung der Fraktion U_4 40

Zusammenfassung 43

Leer - Vide - Empty

EINLEITUNG

Die Leber ist wegen ihrer wichtigen und mannigfaltigen, zum grossen Teil noch unaufgeklärten Funktionen eines der interessantesten Organe sowohl des menschlichen, wie des tierischen Körpers. Zur grossen Zahl der Leistungen steht die Einfachheit des Baues in auffallendem Gegensatz. Zur Aufklärung der Funktionen der Leber konnten deswegen die anatomischen Untersuchungsmethoden nicht so viel beitragen, wie zur Erforschung anderer Organe (wie z. B. der Nebenniere, der Bauchspeicheldrüse oder der Hypophyse). Umsomehr wurden physiologische, biochemische und rein chemische Methoden angewandt.

Auch diese Arbeit ist ein Versuch, durch rein chemische Methoden etwas über die bisher wenig bekannten, acetonlöslichen Stoffe zu erfahren, die sich in der Leber neben den schon bekannten Lipiden befinden.

Die Leber wurde wegen ihrer vielen chemischen Funktionen mit Recht „das chemische Zentrallaboratorium des Stoffwechsels" genannt. Ein Ausdruck der ungeheuren Aktivität ist die Tatsache, dass sie ungefähr 12 % des gesamten Energieumsatzes benötigt. Es war deswegen zu erwarten, dass sich in einem solchen Organ und in seinem acetonlöslichen Anteil eine Anzahl von bisher unbekannten Verbindungen befindet, deren chemische Aufklärung ein Beitrag zur Lösung vieler Fragen liefern könnte, die sich bei der Erforschung der Leber aufzwingen.

Bevor die eigenen Untersuchungen besprochen werden, soll eine kurze Übersicht der bisher aus Leber und Leberextrakten isolierten Verbindungen und über die Bearbeitungsmethoden der Lipoidanteile der Organextrakte überhaupt gegeben werden.

THEORETISCHER TEIL

Über die chemische Zusammensetzung der Leber und der Leberextrakte

Die Gesichtspunkte und die Arbeitsmethoden der zahlreichen chemischen Untersuchungen der Leber und der Leberextrakte sind so verschieden, dass es kaum möglich ist, ein einheitliches Bild über deren chemische Bestandteile zu geben. Dazu kommt noch die verschiedenartige Zusammensetzung der Leber bei verschiedenen Tierarten und die oft mangelhafte chemische Charakterisierung biologisch nachgewiesener Bestandteile.

Die folgende kurze Übersicht der aus Leber und aus Leberextrakten isolierten Bestandteile beschränkt sich deswegen auf die Erwähnung solcher Verbindungen, welche aus der Leber der Säugetiere isoliert wurden und deren chemische Charakterisierung wenigstens teilweise gelungen ist. Eingehender werden solche Bestandteile behandelt, die im unverseifbaren neutralen Anteil des Leberfettes gefunden worden sind.

Am besten untersucht wurde die menschliche Leber, weiter die Leber der Schlachttiere: des Rindes, des Schweines und des Pferdes. Da die Zusammensetzung bei den verschiedenen untersuchten Säugetieren oft qualitativ übereinstimmt, wurden die in der Literatur aufgefundenen Angaben über die Inhaltsstoffe der Leber verschiedener Säugetierarten zur allgemeinen Orientierung herangezogen.

Das Gewicht der Leber beträgt bei Säugetieren 1,4 bis 6,2 % des Lebendgewichtes; für das Gewicht der Schweineleber wird in der Literatur etwa 1,6 % des Lebendgewichtes angegeben. Die Leber stellt demnach das gewichtsmässig grösste Organ des Körpers dar[1]).

---

[1]) *C. Oppenheimer,* Handbuch der Biochemie, 2. Aufl., Bd. 4, S. 595. (1924) und Ergänzungsband 2, S. 332 (1934), weiter als *Oppenheimer* zitiert.

Der Wassergehalt der Leber beträgt etwa 70—80 % des Gewichtes. Die Acidität ist höher als im Blut, der pH-Wert schwankt zwischen 6,0 bis 6,5[1]).

An anorganischen Bestandteilen findet man in der Leber, wie auch in andern Organen und Körperflüssigkeiten, Natrium, Kalium[2]), Ammonium, Magnesium, Calcium, Eisen, Kupfer, Aluminium[3]), weiter Halogene, Schwefel und Phosphor[1]). Schwefel- und Phosphorsäure kommen als Sulfat- und Phosphation, wie auch organisch gebunden vor. Von den anorganischen Bestandteilen ist besonders der hohe Gehalt der Leber an Eisen[1]) und Kupfer[4]) hervorzuheben. Man nimmt an, dass das reichliche Vorkommen dieser Metalle mit den lebhaften fermentativen Leistungen im Zusammenhang steht[5]). Beide Elemente sind teilweise in Proteid-Komplexen enthalten, von welchen insbesondere das eisenreiche Ferritin kristallisiert erhalten und eingehender untersucht wurde[6]). Ein Kupferproteid, Hepatocuprein, wurde aus der Leber von *T. Mann* und *D. Keilin*[7]) erhalten. Von den sog. Spurenelementen wurden Mangan, Arsen, Zinn, Zink und Uran in der Säugetierleber nachgewiesen[8]).

Der Gehalt der Leber an organischen Stoffen ist z. T. grossen Schwankungen unterworfen, besonders dort, wo es sich wie z. B. bei Glycogen um Reservestoffe handelt. Es wurde deswegen meistens auf quantitative Angaben verzichtet, da diese oft stark voneinander abweichen.

An Kohlehydraten wurden von bekannten Verbindungen Glycogen, d-Glucose, l-Xylose und d-Glucuronsäure aufgefunden[9]). Das wichtigste Kohlehydrat der Leber ist

---

[2]) Kalium ist als primäres Kaliumphosphat verantwortlich für die blutdrucksenkende Wirkung der Leberextrakte, vgl. C. 1930, I, 532.

[3]) *Underhill* und *Mitarb.*, Amer. J. Physiol. **90**, 1 (1929).

[4]) *D. B. Morisson* und *Mitarb.*, J. Biol. Chem. **88**, 479 (1930).

[5]) So ist z. B. die Katalase der Pferdeleber ein Eisenproteid, vgl. *K. Agner*, Biochem. J. **32**, 1702 (1938): Naturwissenschaften **27**, 418 (1939).

[6]) *V. Laufberger*, Bl. Soc. chim. biol. **19**, 1575 (1937): *R. Kuhn, N. A. Sörensen* und *L. Birkofer*, Ber. **73**, 823 (1940).

[7]) Proc. Roy. Soc. London, Ser. B. **126**, 303 (1938).

[8]) *J. Hoffmann*, H. **273**, 115 (1942).

[9]) *Oppenheimer*, l. c.

Glycogen. l-Xylose ist in den Nucleoproteiden enthalten; ihre Menge beträgt etwa 0,1 % [10]). d-Glucuronsäure spielt eine wichtige Rolle bei den Entgiftungsreaktionen, welche sich in der Leber abspielen, und kann nicht in jeder Leber nachgewiesen werden. Es wurde weiter in pathologischen Fällen auch eine Polysaccharid-Schwefelsäure (Chondroitin-Schwefelsäure?) gefunden [9]), welche in der normalen Leber nicht vorkommt.

Über die unlöslichen Eiweisstoffe der Leber ist wenig bekannt. Von den löslichen Eiweisstoffen findet man Globuline, Nucleoproteide, Heparin, Ferritin, Hepatocuprein und Fibrinogen, dessen Synthese in der Leber stattfindet [11]). Auch Insulin lässt sich in der Leber nachweisen.

Die wichtige Rolle, welche die Leber beim Abbau der Eiweisstoffe und Umbau ihrer Spaltungsprodukte spielt, findet ihren Ausdruck im Gehalt an Abbau- und Umbauprodukten der Eiweisstoffe. Von den Polypeptiden soll besonders Glutathion erwähnt werden. Die normale Hundeleber enthält z. B. etwa 0,24 % an Glutathion [12]). Der Gehalt der Leber an proteolytischen Enzymen, welcher sich durch starke Autolyse der Leber nach dem Tode manifestiert, erlaubt keinen sicheren Schluss, ob die aus der Leber isolierten Eiweisspaltstücke, wie Aminosäuren (z. B. Cystin, Leucin, Arginin und Lysin), in der Leber frei vorkommen, oder ob sie sich erst durch autolytische Vorgänge aus den Eiweisstoffen nachträglich bilden. Von den weitern Abbauprodukten der Eiweisstoffe wurden Harnstoff und die Purinbasen Guanin, Hypoxanthin, Xanthin, Adenin, sowie Harnsäure isoliert [13]). So wurden aus 14 kg Rinderleber 5,0 g Harnsäure, 0,7 g Guanin, 1,5 g Adenin (Pikrat), 0,45 g Xanthin und 0,6 g Hypoxanthin (Pikrat) isoliert. Xanthin soll die Verbindung sein, welche die Leber gegen die Schädigungen

[10]) *J. Wohlgemuth,* H. **37**, 475 (1902), vgl. auch *G. Grund,* H. **35**, 111 (1902).

[11]) Sonst werden die organspezifischen Eiweisstoffe von der Leber nicht synthetisiert.

[12]) *L. Binet* und *Mitarb.,* Journ. Soc. biol. **108**, 1117 (1931).

[13]) *J. Hiwatari,* Journ. Biochemistry **7**, 161 (1927); C. 1927, II, 271.

durch Chloroform und Tetrachlorkohlenstoff schützt, und wurde auch aus Schweineleber isoliert[14]). *D. W. Wooley* konnte aus der Leber leicht Uracil erhalten, doch ist es möglich, dass dieses erst während der Verarbeitung aus Cytosin entstanden ist[15]). *D. Ackermann* und *M. Mohr*[16]) haben weiter aus Rinderleber Histamin isoliert, und *W. Schrafford Koops, E. Dingemanse* und *D. Luwisch* betrachten Tyramin als blutdruckerhöhende Verbindung aus Leber[17]). *D. Ackermann* und *H. G. Fuchs* isolierten aus 6,5 kg Schweineleber, neben dem später zu besprechenden Cholin, 5 mg Histamindipikrat, 0,95 g Argininflavianat, 40 mg Lysinpikrat und 60 mg Betainchlorid. Aus 15 kg Rinderleber isolierten dieselben Autoren 230 mg Betainchlorid. Weitere basische Bestandteile der Leber sollen im Zusammenhang mit den Phosphatiden und Vitaminen besprochen werden.

Für die vorliegende Untersuchung sind insbesondere die bekannten Tatsachen über die Fettstoffe (Lipide) der Leber, welche den grössten Teil des Acetonextraktes ausmachen, wichtig. Das Fett der Leber enthält grössere Mengen an freien und ungesättigten Fettsäuren, was mit dem intensiven Fettstoffwechsel, welcher sich in der Leber abspielt, im Zusammenhang steht[18]). Auch das Vorkommen der sogenannten Acetonkörper (Aceton und β-Oxy-buttersäure), welche bei gesunden Individuen nur in Spuren vorkommen, steht im Zusammenhang mit dem Fettstoffwechsel. Ein grosser Teil des Leberfettes besteht aus Phosphatiden, insbesondere Lecithinen und Sphingomyelinen. Diese geben bei der Verseifung die charakteristischen basischen Spaltstücke, von welchen Cholin auch frei in der Leber vorkommt. Nachdem *A. Strecker* das Cholin im Jahre 1862 zuerst isoliert hatte, wurde diese Verbindung von verschiedenen Forschern aus Leber und Leberextrakten erhalten. *D. Ackermann* und *H. G. Fuchs* isolierten z. B. aus 6,5 kg Schweine-

[14]) *R. C. Neale* und *H. C. Winter*, J. Pharmacol. Exp. Therapeut. **62**, 127 (1938); C. 1939, II, 878.

[15]) Science **88**, 239 (1938).

[16]) H. **255**, 75 (1938).

[17]) Acta Brevia Neerlandica **5**, 70 (1935); C. 1936, I, 1904.

[18]) Vgl. z. B. *H. C. Hodge* und *Mitarb.*, J. Biol. chem. **139**, 897 (1941).

leber 1,2 g Cholinpikrat[19]). Auch der Phosphorsäureester des Cholins wurde z. B. aus Ochsenleber erhalten[20]). Den nicht methylierten β-Amino-äthyl-phosphorsäureester hat *E. L. Outhouse* in normaler Leber in kleinen Mengen nachgewiesen[21]). Es ist schwer zu entscheiden, ob diese Phosphorsäureester wirklich frei in der Leber vorkommen, oder ob sie erst nachträglich durch autolytische Prozesse aus den Phosphatiden entstanden sind. Mit den Sphingomyelinen der Leber haben sich besonders *S. J. Thannhäuser* und *E. Fränkel* befasst[22]). Besonders leicht lässt sich aus dem „Unverseifbaren" bei der alkalischen Hydrolyse das Lignocerylsphingosin als Spaltstück der in der Leber vorkommenden Sphingomyeline isolieren[23]). Über das von *E. Drechsel* aus der Leber des Pferdes isolierte Jecorin[24]), welches Schwefel, Phosphor und Glucose enthält, liegen keine neueren chemischen Untersuchungen vor.

Neben den verseifbaren Fettstoffen der Leber wurde besonders oft der unverseifbare neutrale Anteil des Leberfettes untersucht. Das Unverseifbare der Leber von erwachsenen Schweinen beträgt nach *A. Dimter*[25]) etwa 0,67 % des Totalgewichtes, wovon etwa 49 % Cholesterin sind. Neben dem Cholesterin, welches den Hauptanteil des Unverseifbaren bildet, findet man immer eine kleine Menge der Dihydrocholesterine[26]). Ergosterin wurde nur durch sein Absorptionsspektrum nachgewiesen[27]). Über das Vorkommen weiterer Steroide (abgesehen von Gallensäuren,

[19]) H. **257**, 151 (1939).

[20]) *F. Inukai* und *W. Nakahara,* C. 1935, II, 260.

[21]) Biochem. J. **31**, 1459 (1937).

[22]) *S. J. Thannhäuser* und *F. Fromm,* H. **187**, 173 (1930); *S. J. Thannhäuser* und *E. Fränkel,* H. **203**, 183 (1931); *E. Fränkel, F. Bielschowsky* und *S. J. Thannhäuser,* H. **218**, 1 (1933); *E. Fränkel* und *A. Pollanz,* H. **218**, 153 (1933); *E. Fränkel* und *G. Löhr,* H. **218**, 218 (1933).

[23]) Vgl. auch *F. C. Freitag* und *H. G. Smith,* J. Biol, Chem. **100**, 309 (1933).

[24]) J. pr. (2) **33**, 425 (1886), vgl. Oppenheimer, Handbuch der Biochemie, 2. Aufl., Bd. 1, S. 235 (1924).

[25]) H. **271**, 293 (1941).

[26]) Vgl. *R. Schönheimer* und *Mitarb.,* H. **192**, 89 (1930).

[27]) Vgl. auch *F. C. Freitag* und *H. G. Smith,* J. Biol. Chem. **100**, 309 (1933).

welche später besprochen werden) weiss man recht wenig Sicheres. *G. A. D. Haslewood* [28]) isolierte aus dem Rinderleberextrakt 7 β-Oxy-cholesterin. Bald nach dieser Veröffentlichung konnten *S. Bergström* und *O. Wintersteiner* [29]) zeigen, dass kolloidale, wässerige Cholesterin-Suspensionen durch Luftsauerstoff aussergewöhnlich leicht oxydiert werden, wobei die beiden epimeren 7-Oxy-cholesterine, das 7-Keto-cholesterin und sein Wasserabspaltungsprodukt, das 7-Keto-cholestadien-(3,5), entstehen. Es ist also fraglich, ob diese Produkte, wenn man sie aus Organextrakten isolieren kann, tatsächlich in den Organen vorkommen, oder ob sie sich erst während der Isolierung bilden. Jedenfalls schliesst die leichte Entstehung durch Autoxydation das natürliche Vorkommen nicht aus. *Haslewood* versuchte später [30]) den Beweis für das natürliche Vorkommen von 7 β-Oxy-cholesterin in der Leber durch Modellverseifungsversuche mit reinen Verbindungen zu stützen. Seine Modellversuche sind aber deswegen nicht beweiskräftig, weil *S. Bergström* [31]) zeigen konnte, dass die Autoxydation des Cholesterins durch geringe Mengen von Kupfer katalytisch spezifisch beeinflusst wird. Da Kupfer in der Leber vorkommt, verlieren Modellversuche mit synthetischen Gemischen, welche Kupfer nicht enthalten, an Beweiskraft. Gleichzeitig mit dem 7 β-Oxy-cholesterin isolierte *Haslewood* zwei weitere Verbindungen aus der Steroidreihe, die er Hepatole A und B nannte. *H. B. McPhilamy* [32]) konnte indessen zeigen, dass es sich um das Digitogenin handelt, das aus dem Digitonin, das für die Isolierung benützt wurde, entstanden ist. *Haslewood* [33]) isolierte weiter aus Leberextrakten das Cholestan-3 β, 5, 6-trans-triol und 7 α-Oxy-cholesterin. Es lässt sich schwer entscheiden, ob auch die erste von den genannten Verbindungen nicht durch einen Autoxydationsprozess während der Bearbeitung aus dem Cholesterin entstanden ist.

---

[28]) Biochem. J. **33**, 709 (1939).

[29]) J. Biol. Chem. **141**, 596 (1941).

[30]) Biochem. J. **36**, 389 (1942).

[31]) Naturwissenschaften **30**, 684 (1942); Arkiv Kemi Mineral. Geol. 16 A, Heft 10 (1942).

[32]) Am. Soc. **62**, 3518 (1940).

[33]) Biochem. J. **35**, 708 (1941).

Durch die erwähnten Arbeiten ist das Problem der rätselhaften „Oxy-cholesterine", welche von ältern Autoren aus verschiedensten Organextrakten isoliert wurden, in ein neues Licht gerückt worden.

Im Zusammenhang mit den Sterinderivaten aus der Leber soll noch ein nicht näher charakterisiertes Steroid erwähnt werden, welches von *W. Trappe* [34]) in einer vorläufigen Mitteilung erwähnt wurde. Bisher sind über dieses Steroid keine Einzelheiten bekannt geworden.

Neben den Steroiden wurden aus den unverseifbaren neutralen Anteilen des Leberfettes beträchtliche Mengen Kohlenwasserstoffe isoliert. Im Zusammenhang mit den Untersuchungen über das Fischleberöl, wobei der interessante ungesättigte Kohlenwasserstoff Squalen isoliert wurde, prüfte man auch das Leberfett der Säugetiere auf das Vorkommen dieses Kohlenwasserstoffs. Squalen konnte zwar in der Leber der Säugetiere nicht nachgewiesen werden, es gelang aber zuerst *H. J. Channon* und *G. F. Marrian* [35]), aus der Säugetierleber einen andern stark ungesättigten Kohlenwasserstoff (Hydrocarbon A) zu isolieren. Dieser wurde von *A. Dimter* Hepen genannt [36]) und von mehreren Forschern aus der Leber des Menschen und verschiedener anderer Säugetiere isoliert [37]). Besonders eingehend haben sich mit der Isolierung und Reindarstellung des Hepens *H. J. Channon, J. Devine* und *J. V. Loach* [38]) befasst. Hepen lässt sich auch im höchsten Vakuum (10^{-5} mm) nicht destillieren, es gibt ein kristallines Bromid und Hydrochlorid, aus welchen es nicht regeneriert werden kann. Der Analyse nach entspricht es den Formeln $C_{45}H_{76}$ oder $C_{50}H_{84}$. Die Konstitution der interessanten Verbindung konnte bisher nicht ermittelt werden. *Channon* und *Marrian* sind der Ansicht, dass es sich um eine terpenoide Verbindung handelt. Neben dem Hepen, das in ziemlich grossen Mengen

---

[34]) Biochem. Z. **307**, 97 (1940).

[35]) Biochem. J. **20**, 409 (1926).

[36]) H. **271**, 293 (1941).

[37]) *M. Bürger* und *K. Plöttner*, C. 1940, II, 2320; *J. C. Drummond* und *L. Ch. Baker*, Biochem. J. **23**, 274 (1929).

[38]) Biochem. J. **28**, 2012 (1934).

in der Leber vorkommt (aus 1 kg Rinderleber wurden 290 mg erhalten), wurden von *Channon, Devine* und *Loach* zwei weitere Kohlenwasserstoffe in der Schweineleber gefunden. Einer von ihnen (Hydrocarbon B) ist gesättigt und konnte nicht sauerstoffrei erhalten werden, der andere (Hydrocarbon C) enthält wahrscheinlich eine Doppelbindung. Ich erwähne die beiden nicht genügend charakterisierten Kohlenwasserstoffe deshalb, weil ich ähnliche Körper im Laufe meiner eigenen Arbeit isolieren konnte.

Eine grosse experimentelle Schwierigkeit bei der Isolierung der Kohlenwasserstoffe aus den technischen Organextrakten besteht in ihrer leichten Verunreinigung durch Schmieröle und Dichtungsöle der technischen Apparaturen [39]). Wie vorsichtig man die erhaltenen Resultate beim Arbeiten mit technisch hergestellten Extrakten bewerten muss, lehren die Versuche von *O. Wintersteiner* und *J. R. Ritzmann* über das Unverseifbare des Serums [40]).

Neben den besprochenen Verbindungen isolierte *Haslewood* [41]) aus den unverseifbaren Neutralstoffen der Leber einen Alkohol $C_{24}H_{46}O_3$ vom Smp. 93—95°, dessen Konstitution unbekannt ist.

Ein besonders wichtiges Produkt der Leber ist die Galle. Von den beiden wichtigsten Bestandteilen der Galle, den Gallensäuren und den Gallenfarbstoffen, werden die erstern vollständig in der Leber gebildet, während die Gallenfarbstoffe wenigstens teilweise in der Leber entstehen. Das von physiologischer und biochemischer Seite komplizierte Problem der Gallenbildung soll hier, da es mit der eigenen Arbeit nicht im Zusammenhang steht, nur erwähnt werden. Ebenso kann die ungelöste Frage nach den biochemischen Zusammenhängen zwischen Gallensäuren und andern Steroiden hier nicht erörtert werden.

Ihren grossen Aufgaben gemäss ist die Leber besonders reich an verschiedenen Biokatalysatoren. So wurden in der Leber der Säugetiere Vitamine aller Gruppen, sehr oft in beträchtlichen Mengen, gefunden. Aus dem grossen Schrifttum über diese

---

[39]) Vgl. *E. Fränkel* und *A. Pollanz,* H. **218**, 153 (1933).
[40]) J. Biol. Chem. **136**, 697 (1940).
[41]) Biochem. J. **35**, 708 (1941).

Frage sollen nur einige neuere Arbeiten erwähnt werden. So wurde die Leber verschiedener Säugetiere auf Vitamin A- und Carotinoid-Gehalt besonders von *H. B. Jensen* und *T. K. With*[42]) untersucht. Die Frage des Vorkommens der Carotinoide in der Leber ist nicht ganz geklärt. *L. S. Palmer*[43]) verneint z. B. das Vorkommen der Carotinoide in der Schweineleber[44]). Die Vitamine B, C, D wurden in der Leber durch Nährversuche nachgewiesen. Für einzelne Verbindungen aus der Vitamin B-Gruppe bildeten die Leberextrakte ein wichtiges Ausgangsmaterial. So wurden z. B. die Vitamine der sogenannten P. P. (pellagra preventing)-Faktor-Gruppe aus Leberextrakten isoliert. *C. A. Elvenhjen, R. J. Madden, F. M. Strong* und *D. W. Wooley*[45]) isolierten Nikotinsäureamid, und *Y. Subbarow, W. J. Dam* und *E. Meilmann*[46]) erhielten β-Amino-pyridin aus den Leberextrakten. Auch Vitamin H[47]) und Panthotensäure[48]) sind aus den Leberextrakten isoliert worden. Seitdem *G. R. Minot* und *W. P. Murphy*[49]) gezeigt haben, dass die Anaemia perniciosa bei Menschen durch Leber und Leberextrakte geheilt werden kann, wurde dem in der Leber vorkommenden sog. A. P.- (anaemia preventing) Faktor grosse Aufmerksamkeit geschenkt. Über die chemische Natur dieses wahrscheinlich hochmolekularen Faktors oder mehrerer Faktoren wissen wir bis heute noch recht wenig[50]).

Über das Vorkommen von Vitamin E im Leberfett berichten *F. C. Freitag* und *H. G. Smith*[51]), über Vitamin K *K. H.*

---

[42]) Biochem. J. **33**, 1771 (1939), siehe auch *F. C. Freitag* und *H. G. Smith*, J. Biol. Chem. **100**, 319 (1933).

[43]) Amer. J. Physiol. **87**, 553 (1929).

[44]) Über Carotinoide der menschlichen Leber vgl. H. **240**, 10 (1936).

[45]) J. Biol. Chem. **123**, 137 (1939); Am. Soc. **59**, 1767 (1937).

[46]) Am. Soc. **60**, 1510 (1938).

[47]) *P. György, R. Kuhn* und *E. Lederer*, J. Biol. Chem. **131**, 745 (1939).

[48]) *R. J. Williams* und *Mitarb.*, Am. Soc. **60**, 2719 (1938).

[49]) J. Amer. Med. Assoc. **87**, 470 (1926).

[50]) Vgl. die zusammenfassenden Darstellungen von *H. Friedrich*, Medizin und Chemie **3**, 250 (1936), und besonders *Y. Subbarow, A. B. Hastings* und *M. Elkin*, Erg. d. Vit. u. Hormonforsch., Bd. **3**, 57 (1939), auch *S. K. Mitra*, J. Indian Chem. Soc. **17**, 1355 (1940).

[51]) J. Biol. Chem. **100**, 319 (1933).

Dam und *F. Schönheyder*[52]). Neben dem Vitamin K sollen in der Leber weitere antihämorrhagische, resp. menorrhagische Faktoren enthalten sein. Einer davon soll in der Steroidfraktion vorkommen[53]).

Auch für die Lactoflavin-phosphorsäure, eine Verbindung die der Vitamin B-Gruppe und der andern wichtigen Biokatalysatorengruppe der Fermentengruppe angehört, sind die Leberextrakte ein geeignetes Ausgangsmaterial[54]).

Ihre grosse Aktivität verdankt die Leber ihrem Gehalt an Fermenten unbekannter Konstitution. Man findet in der Leber neben den Fermenten allgemeiner Natur (den Fermenten des Kohlenhydrat-, des Eiweiss-, des Nucleinsäure- und Fett-Stoffwechsels und den Fermenten des oxydativen Abbaus) auch Fermente mit spezifischen Leistungen, wie z. B. die Arginase[55]).

Nach den bisherigen Untersuchungen ist die Leber eine wahre Schatzkammer, in der Verbindungen verschiedenster Stoffklassen mit mannigfaltigen Funktionen enthalten sind. Neue Untersuchungen über die noch unbekannten oder nicht genauer untersuchten Bestandteile der Leber sind deswegen vollkommen gerechtfertigt.

Über die Bearbeitung der Lipoidanteile von Organextrakten

Obwohl die chemischen Untersuchungen der lipoidlöslichen Organextrakte sehr oft durchgeführt wurden, ist die Arbeitsmethodik auf diesem Gebiete recht unvollkommen.

Die Hauptschwierigkeit bei der Aufarbeitung bilden die „verseifbaren" Anteile der Extrakte, welche fast immer den Hauptanteil bilden und aus Gemischen von Fettsäureestern (Glyceriden,

---

[52]) Biochem. J. **30**, 897 (1936).

[53]) *A. L. Lichtmann* und *W. H. Chambers,* Science **88**, 358 (1938); *H. O. Wiles* und *S. Maurer,* Science **89**, 293 (1939).

[54]) *P. Karrer, P. Frei* und *H. Meerwein,* Helv. **20**, 79 (1937); *H. Theorell, P. Karrer, H. Schöpp* und *P. Frei,* Helv. **18**, 1022 (1935).

[55]) *Oppenheimer,* l. c.

Phosphatiden und Steroidestern) bestehen. Sie erschweren wegen ihres Gemischcharakters die Isolierung individueller Verbindungen, besonders die Isolierung geringer Mengen der „unverseifbaren" Neutralstoffe. Das erklärt auch unsere unvollkommenen Kenntnisse dieser „unverseifbaren" Neutralstoffe der meisten Organe. Nur in vereinzelten Fällen gelang es, eine grössere Anzahl reiner Verbindungen zu isolieren, so aus der Nebennierenrinde, die ausserordentlich reich an hydrophilen Steroiden ist. Über die „unverseifbaren" Neutralstoffe der meisten andern Organe, wie z. B. über diejenige der Leber, sind unsere Kenntnisse, wie in dem vorhergehenden Abschnitt dargelegt wurde, recht unsicher.

Für die Trennung der „unverseifbaren" Neutralstoffe von den schwer bearbeitbaren verseifbaren Stoffgemischen stehen folgende Methoden zur Verfügung:

1. Ausfrieren aus einem geeigneten Lösungsmittel, wie Petroläther, Aceton, Methanol usw.
2. Verteilen zwischen zwei Lösungsmitteln.
3. Trennung durch Molekulardestillation.
4. Verseifung.
5. Chemische Verfahren zur Isolierung einzelner Verbindungsgruppen, wie Ketonen usw.
6. Chromatographieren.

Man verlangt von einem guten Verfahren, dass es erlaubt, unter so schonenden Bedingungen zu arbeiten, dass die Veränderung der oft empfindlichen Naturstoffe vermieden wird. Im weiteren soll das Verfahren eine möglichst grosse Trennungsschärfe besitzen. Es ist bisher nicht gelungen, eine Methodik auszuarbeiten, welche den beiden erwähnten Ansprüchen genügt.

Die beiden ersten Methoden erlauben zwar eine schonende Bearbeitung, ihre Trennungsschärfe ist aber gering. Das Ausfrieren kann zur Entfernung des Hauptanteils der Fettsäureester sowie des Cholesterins verwendet werden; leider lässt sich die Menge der mitgerissenen andern Stoffe kaum abschätzen. Um das Mitreissen zu vermeiden, müssen möglichst verdünnte Lösungen ausgefroren werden und die Operation muss mehrere Male wiederholt werden. Das Verteilen zwischen Lösungsmitteln (gewöhnlich

werden Petroläther und wässerige Alkohole verwendet) ist ein Verfahren, welches inbezug auf die Trennungsschärfe noch ausbaufähig ist. Bisher konnten durch Anwendung des Verteilungsverfahrens besonders die verhältnismässig hydrophilen empfindlichen Steroide aus Nebennierenrinde mit Erfolg von den Fettstoffen getrennt werden [56]). Die Trennung der lipophilen Steroide gelingt, wie die Erfahrungen in unserem Laboratorium lehren, nicht so gut.

Über die Molekulardestillation liegen bisher wenig Erfahrungen vor. Die Molekulardestillation erlaubt die Isolierung der hitzeempfindlichen Verbindungen nicht, auch ist die Trennungsschärfe nicht sehr gross. Für die Isolierung der Verbindungen vom Steroidcharakter ist die Anwendung von Temperaturen bis 150^0 bei den praktisch zu erreichenden Drucken von 10^{-2} bis 10^{-3} mm nicht zu umgehen. Störend wirkt auch der Gehalt der Extrakte an Mono- und Diglyceriden sowie an freien Fettsäuren, welche unter 150^0 übergehen und die weitere Verarbeitung erschweren. Die Trennung von Triglyceriden, Phosphatiden usw. gelingt weitgehend [57]).

Die ungenügende Trennungsschärfe der bisher angeführten physikalischen Verfahren zwingt zur Anwendung chemischer Trennungsverfahren, von welchen für die Entfernung der Fettsäureester das Verseifen das wichtigste ist. Obwohl mit grossen Nachteilen verbunden, lässt es sich meistens kaum umgehen. Wegen des quantitativen Verlaufs wird gewöhnlich die alkalische Verseifung angewandt. Da sich jedoch die Cholesterinfettsäureester und einzelne Phosphatidbestandteile (z. B. Lignocerylsphingosin) nur sehr schwer verseifen lassen, so müssen die Bedingungen der Verseifung, d. i. Alkalikonzentration, Temperatur und Dauer, gewöhnlich so gewählt werden, dass mit einer vollkommenen oder weitgehenden Zerstörung aller alkaliempfindlichen Stoffe zu rechnen ist. Dadurch wird z. B. die Isolierung der Aldehyde, der α,β-ungesättigten Ketone, der α-Oxy-ketone verun-

[56]) *J. J. Pfiffner, H. M. Vars* und *A. R. Taylor,* J. Biol. Chem. **106**, 625, 645 (1934) und *T. Reichstein* in Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, Abt. V, Teil 3 B, S. 1367—1439 (1938).

[57]) *K. C. D. Hickman,* J. Ind. Eng. Chem. Anal., Ed. **32**, 1451 (1940).

möglicht, um nur einige alkaliempfindliche Gruppen zu nennen, welche in den Naturstoffen oft vorkommen. Eine weitere schwierige und bisher nicht befriedigend gelöste Aufgabe, die sich bei der Bearbeitung der Organextrakte durch Verseifung stellt, ist die Trennung der Neutralstoffe von den entstandenen Seifen. Die grosse Verdünnung der Seifenlösungen, die für die Extraktion mit Lösungsmitteln notwendig wäre, ist beim Arbeiten mit grösseren Mengen im Laboratorium unmöglich. Man umgeht diese Schwierigkeit, indem man den Hauptanteil der Säuren in Form schwer löslicher Erdalkalisalze fällt, doch bildet ihre Trennung von den mitgefällten Neutralstoffen ein weiteres schwieriges Problem. Über Versuche, die Fettsäuren nach der Verseifung durch Adsorption aus ätherischen Lösungen an Calciumhydroxyd zu binden [58]), wird im experimentellen Teil berichtet.

Weitere chemische Verfahren, welche Verbindungen mit gewissen charakteristischen Gruppen aus den Organextrakten zu isolieren erlauben, wurden in den letzten zwei Jahrzehnten, insbesondere im Zusammenhang mit der Chemie der Hormone, entwickelt. Um nur einige wichtige Beispiele zu nennen: Die Trennung der hydroxylhaltigen Verbindungen mit Hilfe von Bernsteinsäureanhydrid und seiner Analoga [59]), mit Chlorsulfonsäure [60]), mit Pyridin-Schwefeltrioxyd [61]), die Isolierung der Ketone mit Hilfe von Girard-Reagenzien [62]), der Hydroxylamin-O-essigsäure [63]) und des p-Carboxy-phenylhydrazins [64]) oder die Fällung gewisser Steroide mit Digitonin. Aus den Gesamt-Organextrakten gelingt Isolierung einzelner Verbindungsgruppen nicht; diese Arbeitsweise wurde aber, mit grossem Erfolg, auf die vorgereinigten Extrakte angewandt. Dasselbe ist über die Anwendung der ältern Methoden, wie Verestern oder die Darstellung von Semicarbazonen

[58]) *Schering A.-G.*, D. R. P. Anmeldung 105 323 — 12 p (17/10).

[59]) *R. Schönheimer* und *F. Breusch,* H. **211**, 19 (1932).

[60]) *S. Natelson* und *A. E. Sobel,* J. Biol. Chem. **109**, 687 (1935), vgl. auch B. **69**, 443 (1936).

[61]) *A. E. Sobel* und *P. E. Spoerri,* Am. Soc. **64**, 361 (1942).

[62]) *A. Girard* und *G. Sandulesco,* Helv. **19**, 1095 (1936).

[63]) *M. Anchel* und *R. Schönheimer,* J. Biol. Chem. **114**, 539 (1936); **124**, 610 (1938).

[64]) J. Biol. Chem. **114**, 539 (1936).

usw., zu sagen. Es ist zu bemerken, dass auch die Anwendung einer scheinbar so milden Methode, wie die Isolierung der Ketone mit Girard-Reagens T, unter gewissen Umständen zu weitgehenden Veränderungen der nativen Bestandteile der Organextrakte führen kann. Als Beispiel soll die Umlagerung des 7-β-Oxy-cholesterins in 3,5-Dioxy-cholesten-(6) [65]) angeführt werden, welche schon bei den Bedingungen der Keton-Isolierung nach *Girard* vorkommt. Wie sogar die Anwendung von Molekülverbindungen, wie Digitonin, zu Irrtümern führen kann, zeigen die Erfahrungen mit den Hepatolen von *Haslewood*.

Zuletzt soll noch eine kurze Bemerkung über die chromatographische Trennung gemacht werden. Für die Trennung grosser Mengen Fettstoffe von kleinen Mengen Neutralkörper eignet sich die Methode, auch in ihrer vollkommensten Form, weniger als zur Trennung anderer Stoffgemische, hauptsächlich deswegen, weil in Fettstoffen Gemische von Triglyceriden, Diglyceriden und Monoglyceriden von verschiedenem Molekulargewicht und Gehalt an adsorptionsaktiven Gruppen vorkommen, welche sich über das ganze Chromatogramm verteilen. Übrigens verlangt die Verarbeitung etwas grösserer Menge Ausgangsmaterial durch Chromatographierung sehr grosse Mengen an Adsorptions- und Lösungsmitteln, so dass die Methode auch sehr kostspielig wird. Über die Erfahrungen, welche mit der chromatographischen Behandlung von Leberextrakten gewonnen wurden, berichtet *W. Trappe* [66]).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Analyse eines Organextraktes durch sinngemässe Anwendung und Kombination der verschiedenen zur Verfügung stehenden Methoden eine Aufgabe ist, die bisher nur teilweise gelöst werden konnte. Es ist nicht möglich, die vielen verschiedenartigen Verbindungen, die in Organextrakten enthalten sind, nach einem einzigen Verfahren zu isolieren. Man muss vielmehr die Isolierung nach verschiedenen, oft zeitraubenden Verfahren durchführen. Einen solchen Versuch bildet auch die vorliegende Arbeit.

---

[65]) *S. Bergström* und *O. Wintersteiner*, J. Biol. Chem. **141**, 596 (1941).
[66]) Biochem. Z. **307**, 97 (1940).

Eigene Versuche

Bei den eigenen Versuchen zur Bearbeitung des Acetonextraktes aus Schweineleber wurde folgender Arbeitsgang gewählt:

Zuerst wurde der Extrakt aus Methanol ausgefroren. Der grösste Teil der Fettsäureester und wahrscheinlich auch des Cholesterins wurde dadurch entfernt, und die Menge des Extraktes so auf etwa $^1/_3$ des Gewichtes reduziert. Die weitere Operation, das Verteilen zwischen Petroläther und 70proz. Alkohol, führte zur weiteren Entfernung von Fettstoffen, wobei nur etwa $^1/_{100}$ des Ausgangsmaterials in den 70proz. Alkohol überging. Aus der alkohollöslichen Fraktion wurden durch nochmaliges Verteilen zwischen Petroläther und 50proz. Methanol und Waschen mit Säuren und Basen etwa 10 g Neutralstoffe erhalten (s. Übersicht I im experimentellen Teil S. 25). Die so erhaltenen Neutralstoffe wurden mit Girard-Reagens T in Ketone und Nichtketone getrennt. Es gelang weder aus den ketonischen, noch aus den nichtketonischen Anteilen durch Chromatographieren kristallisierte Verbindungen in nennenswerter Menge abzuscheiden. Eine kleine Menge eines bei 116° schmelzenden Ketons scheint mit dem 7-Keto-cholestadien-(3,5) identisch zu sein, das auch in andern Organextrakten in unserem Laboratorium gefunden wurde.

Nach dem misslungenen Versuch, durch Verteilung mit Lösungsmitteln auf schonendem Wege zu individuellen Verbindungen zu gelangen, wurde ein Teil der methanollöslichen Fraktion nach dem Ausfrieren (U_2, s. Übersicht I) erschöpfend alkalisch verseift und die nicht verseifbaren neutralen Verbindungen, die in dieser Fraktion vorkommen, untersucht. Die quantitative Verseifung und Isolierung der unverseifbaren Neutralstoffe war mit bedeutenden experimentellen Schwierigkeiten verbunden. Sie gelang erst nach mehrmaligem Behandeln mit 0,5-n. methanolischer Kalilauge. Wie aus dem reichlichen Vorkommen des Cholins und solcher Säuren, welche ätherlösliche Calciumsalze bilden, nach der Hydrolyse zu schliessen ist, bestand die untersuchte Fraktion hauptsächlich aus Phosphatiden. Zuletzt wurden aus 1,5 kg der Fraktion U_2 etwa 13,4 g unverseifbare Neutralstoffe erhalten.

Nach der Abtrennung des Cholesterins durch Auskristallisieren (es wurden 4,4 g schmelzpunktreines Cholesterin isoliert) blieben 4,3 g cholesterinarme, unverseifbare Neutralkörper, die einer systematischen, chromatographischen Analyse unterworfen wurden.

Aus diesem Anteil wurde zuerst ein ungesättigter Kohlenwasserstoff isoliert, dessen Analyse auf die Identität mit dem Hydrocarbon C von *H. J. Channon, J. Devine* und *J. V. Loach* hindeutet. Weiter wurden kleine Mengen eines stickstoffhaltigen Körpers mit dem Schmelzpunkt 248—248,5° isoliert, von dem, wegen Materialmangel, nur eine C—H-Bestimmung ausgeführt werden konnte. Eine Identifizierung mit einer bekannten Verbindung konnte nicht durchgeführt werden. Neben diesen beiden Körpern wurden durch chromatographische Analyse noch beträchtliche Mengen Cholesterin isoliert, und eine kleine Menge eines Körpers vom Smp. 116° erhalten, der sehr wahrscheinlich mit 7-Keto-cholestadien-(3,5) identisch ist, dessen Vorkommen in einer andern Fraktion schon erwähnt wurde. Diese Verbindung ist wahrscheinlich erst während des Isolierungsprozesses entstanden.

Von den weitern Anteilen des Gesamtextraktes wurden noch die Fraktionen U_3 und U_4 (s. Übersicht I) auf das Vorkommen bestimmter Verbindungen hin untersucht. Die Isolierung des Dimethylsulfons aus Rinderblutextrakt in unserm Laboratorium [67]) und aus Nebennierenrinde durch *J. J. Pfiffner* und *H. B. North* [68]) bewog uns, auch die entsprechende Fraktion aus Leberextrakt auf diese interessante Verbindung zu untersuchen. Es ist aber nicht gelungen, das Dimethylsulfon in der Fraktion U_3 nachzuweisen, wo es nach den bisherigen Erfahrungen vorkommen sollte.

Weiter wurde versucht, die 7-Oxy-cholesterine in der Fraktion U_1, wo sie nach den Erfahrungen *Haslewoods* zu erwarten waren, nachzuweisen. Es konnte aus dieser Fraktion neben dem Cholesterin nur ein gesättigter Kohlenwasserstoff erhalten werden. Der gesättigte Kohlenwasserstoff ist möglicherweise identisch mit dem Hydrocarbon B von *Channon, Devine* und *Loach*.

---

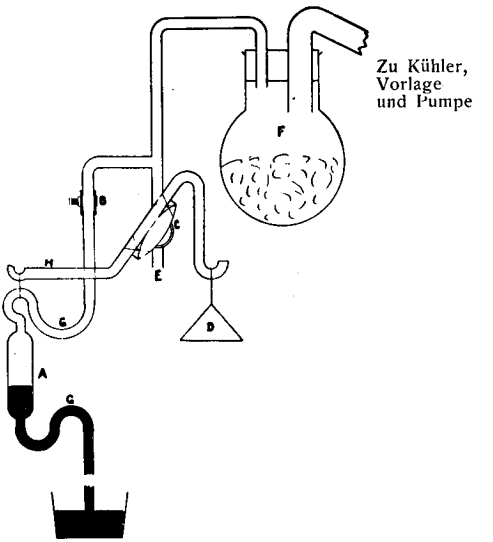
[67]) *L. Ruzicka, M. W. Goldberg* und *H. Meister*, Helv. **23**, 559 (1940).
[68]) J. Biol. Chem. **134**, 781 (1940).

EXPERIMENTELLER TEIL

Als Ausgangsmaterial für meine Untersuchung dienten 24,445 kg eines trockenen Acetonextraktes aus 1000 kg Schweinsleber, welcher in den „Wilson's Laboratories", Chicago Ill., U. S. A., hergestellt wurde. Der Extrakt wurde durch Ausziehen der frischen Leber mit immer neuen Mengen trockenem Aceton in der Kälte erhalten. Die Extrakte wurden vorsichtig im Vakuum eingedampft und mit trockenem Aceton reextrahiert, um die acetonunlöslichen Anteile zu entfernen.

Um eine gute Methode für die Bearbeitung des Hauptanteils zu finden, wurde eine Voruntersuchung mit 2,5 kg des Extraktes durchgeführt. Fünf Portionen von je 500 g Schweineleberextrakt wurden mit je 2 Liter dest. Methanol eine halbe Stunde am Rückfluss gekocht. Die Mischung wurde dann über Nacht bei -10^0 stehen gelassen, wobei sich grössere Mengen eines Niederschlages ausschieden. Der Niederschlag wurde in einer gekühlten Apparatur abfiltriert, und der oben erwähnte Prozess mit weitern 2 Liter Methanol wiederholt. Es blieben 1,72 kg einer in Methanol schwer löslichen Fraktion (U_1) zurück. Die Methanollösungen wurden zusammen auf dem Wasserbad eingedampft und im Vakuum getrocknet (L_1). 1 kg auf diese Weise gewonnenes Material wurde in 5 Liter Petroläther (Sdp. 40—70 ^{0}) gelöst und 5 mal mit je 500 cm^3 verdünntem Aethanol (D = 0,824) ausgeschüttelt. Bei zwei weiteren Extraktionen gingen nur Spuren in die Alkohollösung über, die Extraktion wurde deswegen als erschöpfend betrachtet. Die Petrolätherlösungen wurden eingedampft und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand (U_2) wog 925 g. Die alkoholisch-wässerigen Anteile wurden im Wasserstrahlvakuum in einer Kohlendioxyd-Atmosphäre eingedampft, bis der Alkohol fast entfernt war. Der Kolbenrückstand bildete dann eine wässerige Suspension. Eine vollständige Entfernung des Alkohols gelang, auch nachdem die Lösung bis auf 300 cm^3 Volumen eingeengt wurde, nicht. Das Destillat gab noch immer eine posi-

tive Jodoform-Reaktion. Die Destillation der wässerig-alkoholischen Lösungen im Vakuum bereitete wegen des starken Schäumens grosse Schwierigkeiten. Ein besonderer Apparat wurde konstruiert, um automatisch schwankendes Vakuum zu erzeugen, wodurch die Destillation ermöglicht wurde [1]).



Der Apparat ist in der obigen Zeichnung schematisch dargestellt. Er arbeitet dadurch, dass die Blasenbildung durch periodische kleine Senkungen des Vakuums unterbrochen wird und der gebildete Schaum zusammenfällt.

Die Höhe des Gefässes A über dem Quecksilberreservoir wird so gewählt, dass bei einem Vakuum, bei dem die Blasenbildung beginnt, Quecksilber in A eingesogen wird. Das Gegengewicht D ist so schwer, dass bei nahezu vollem A der Hebel durch das Gewicht des Quecksilbers heruntergezogen und Hahn C geöffnet wird, wodurch etwas Luft durch E in die Apparatur hineinströmt. Das Vakuum wird dadurch kleiner, das Quecksilber fliesst aus A in das Quecksilberreservoir. Das Gegengewicht D schliesst den Hahn C wieder, das Quecksilber im Gefäss A steigt und der Prozess wiederholt sich.

[1]) *D. R. Rexford,* Ind. Eng. Chem. Anal., Ed. **13**, 95 (1941).

Durch den Quetschhahn B kann das Gefäss A vom Destillationskolben F teilweise abgeschlossen werden, wodurch die Frequenz der Luftstösse, die in die Apparatur gelangen, reguliert werden kann. Die Drosselung bei B hat zur Folge, dass ein Sinken des Vakuums in F auf A langsamer übertragen wird, und das Öffnen des Hahnes C in grösseren Intervallen erfolgt.

Die optimale Länge des Hebels von der Achse C bis zur Aufhängestelle für A beträgt etwa 14 cm und muss für jede Apparatur bestimmt werden. Wenn der Hebel zu kurz ist, kommt es oft zu einem Gleichgewicht, wobei Hahn C teilweise geöffnet bleibt. Bei einem zu langen Hebelarm sind die Vakuumschwankungen zu gross.

Mit der beschriebenen Apparatur, die durch eine Wasserstrahlluftpumpe auf 12 mm evakuiert wurde, konnte man Vakuumschwankungen von 5 mm bis zu einigen Zentimetern der Quecksilbersäule erreichen. Die Frequenz der Luftstösse konnte zwischen 8—20/Min. variiert werden.

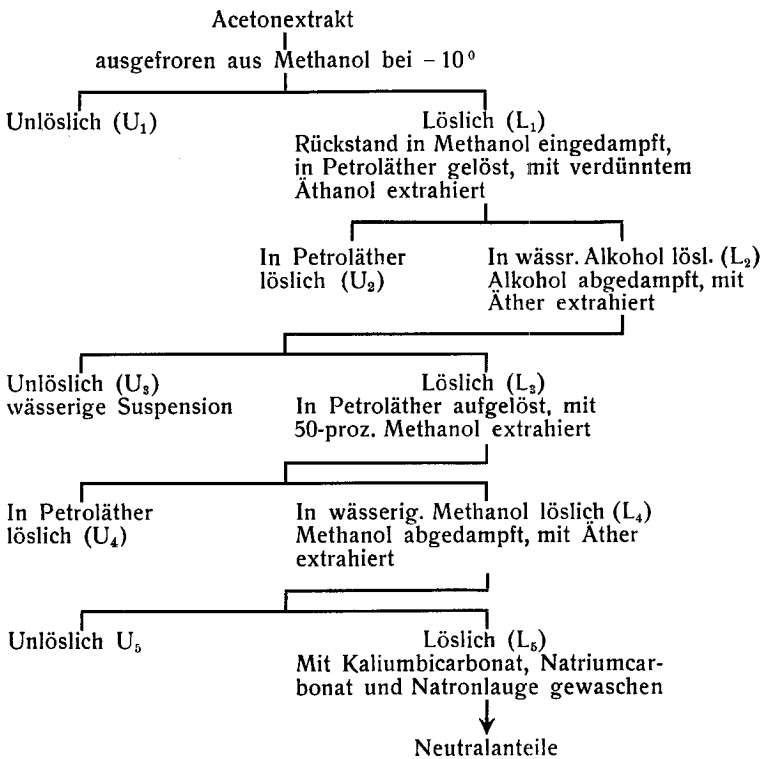
Durch die Verbindung von E mit einem Gasreservoir oder mit einer Bombe kann man die Destillation in einer inerten Atmosphäre (z. B. im Stickstoffstrom) durchführen. Die Verwendung einer Kapillare im Kolben F ist bei stark schäumenden Lösungen nicht empfehlenswert, weil der Schaum durch die erzeugten Blasen leicht in die Vorlage getrieben wird.

Die wässerige Suspension wurde nach dem Entfernen des grössten Teiles des Aethanols dreimal mit frisch destilliertem Äther ausgeschüttelt und dann drei Tage in einem Extraktionsapparat für kontinuierliche Extraktion extrahiert. Die Ätherauszüge wurden über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und eingedampft, wobei 14,3 g eines ätherlöslichen Rückstandes (L_3) zurückblieben. Dieser ätherlösliche Anteil wurde dann weiter zwischen Petroläther und 50proz. Methanol verteilt. Er wurde in Petroläther aufgelöst und fünfmal mit je 100 cm^3 50proz. Methanol ausgezogen. Die petrolätherlösliche Fraktion (U_1) wurde besonders auf 7-Oxy-cholesterin untersucht. Die Methanolauszüge wurden ebenso wie die Aethanolauszüge im Vakuum eingedampft und das Methanol grösstenteils entfernt. Die zurückgebliebene wässerige Suspension wurde wieder mit Äther erschöpfend ex-

trahiert. Die Ätherauszüge wurden nacheinander mit 10proz. Kaliumbicarbonatlösung, 10proz. Natriumcarbonatlösung und 4proz. Natronlauge gründlich gewaschen. Die Auszüge mit Natronlauge wurden mit Kohlendioxyd gesättigt und nochmals mit Äther extrahiert. Die auf diese Weise erhaltenen Ätherauszüge wurden der Kaliumbicarbonatfraktion zugegeben. Alle drei alkalischen Fraktionen wurden dann getrennt, mit verdünnter Salzsäure angesäuert und mit Äther erschöpfend extrahiert. Aus dem Kaliumbicarbonatauszug wurden nur Spuren, aus dem Natriumcarbonatauszug 86 mg, aus der Natronlauge 2,106 g sauer reagierender Stoffe erhalten. Im Äther blieben 600 mg Neutralstoffe zurück.

Ein Bild über die ausgeführten Operationen gibt folgende

Übersicht I



Der Hauptteil des Acetonextraktes wurde auf gleiche Weise aufgearbeitet, aber mit verhältnismässig grösseren Lösungsmittelmengen. Aus 21,945 kg Ausgangsmaterial wurden dabei 7,8 kg [2]) Fraktion L_1, 7,5 kg Fraktion U_2, 255 g Fraktion L_3, 74,9 g Fraktion U_4 und 10,172 g Neutralstoffe erhalten.

Untersuchung der Neutralstoffe

Die Neutralfraktion, 10,172 g, wurde mit Girard-Reagens T in ketonische und nichtketonische Anteile getrennt. Die Neutralstoffe wurden in 50 cm^3 Methanol aufgelöst, dazu wurden 5 g Eisessig und 10 g Girard-Reagens T in 50 cm^3 Methanol gegeben und die Lösung am Rückfluss eine halbe Stunde gekocht.

Das Gemisch wurde dann mit Eis auf 0^0 abgekühlt und mit 10proz. Natriumcarbonatlösung (in Wasser) auf pH 6,5 gebracht. Nach Zufügen von 500 cm^3 Wasser und Nachprüfen des pH-Wertes wurde mit Äther, Chloroform und Essigester extrahiert. Während der Extraktion schieden sich unlösliche Anteile aus. Diese wurden abfiltriert, die wässerige Lösung mit Eisessig auf pH 3 gebracht und über Nacht bei 0^0 stehen gelassen. Am nächsten Tage wurde sie in einem Apparat für kontinuierliche Extraktion erschöpfend mit Äther extrahiert.

Von den nichtketonischen Anteilen gingen 6,791 g in Äther, 1,231 g in Chloroform und 0,132 g in Essigester. 1,132 g waren unlöslich. Insgesamt wurden 8,29 g Nicht-Ketone erhalten. Nach der Hydrolyse in saurer Lösung und Extraktion mit Äther wurden 0,675 g Ketone isoliert.

Die Ketone wurden in Petroläther gelöst und über 30 g Aluminiumoxyd (aktiviert nach *Brockmann*) chromatographiert. Es wurden folgende Fraktionen erhalten:

I	Petroläther	4 mg
II	Petroläther-Benzol 2:1	6 mg
III	Petroläther-Benzol 1:2	35 mg
IV	Benzol	2 mg
V	Benzol-Äther 2:1	1 mg

[2]) Durch Kolbenbruch ging eine Menge Methanollösliches (L_1) entsprechend 500 g Acetonextrakt verloren.

VI	Äther	Spuren	
VII	Äther-Aceton 2:1	1 mg	
VIII	Äther-Aceton 1:2	186 mg	ölig
IX	Aceton	Spuren	
X	Methanol	1 mg	
XI	Methanol-1% Eisessig	46 mg	
XII	Methanol-5% Eisessig	490 mg	Al-haltig

Die Fraktion VIII (186 mg) wurde in Äther aufgenommen. 157 mg lösten sich in Äther, 29 mg eines zähflüssigen Öls blieben ungelöst.

Der ätherunlösliche Anteil konnte in Essigester, Essigester-Äther, Benzol, Benzol-Äther, Essigester-Benzol und Methanol-Wasser nicht zur Kristallisation gebracht werden. Es wurde auch versucht, mit Semicarbazid-acetat ein kristallines Semicarbazon herzustellen. Aus dem Reaktionsgemisch wurde ein Öl gewonnen, welches ebenfalls nicht kristallisiert werden konnte.

Die ätherlösliche Fraktion wurde im Hochvakuum (0,1 mm) destilliert.

I	bis 65°	3 mg
II	65— 85°	Spuren
III	85—120°	64 mg Öl mit wenig Kristallen vom Smp. ca. 49—51°
IV	120—150°	—
V	Rückstand	72 mg

Alle ketonischen Fraktionen von der ersten Trennung mit Girard-Reagens T wurden wieder vereinigt, in Äther aufgenommen und mit verd. Kalilauge, verd. Salzsäure und Wasser gründlich gewaschen, wobei diesmal nur 198 mg neutrale Ketone zurückblieben. Diese wurden in 1 cm^3 Methanol nochmals mit 0,12 g Girard-Reagens T und 0,07 g Eisessig behandelt. Das Gemisch wurde 1 Stunde am Rückfluss gekocht, auf 0° abgekühlt, mit 0,06 g Natriumcarbonat in 0,6 cm^3 Eiswasser versetzt und in einer gekühlten Apparatur 10mal mit je 30 cm^3 Äther ausgeschüttelt. Im Äther blieben 55 mg eines braunen Öls zurück.

Zu der wässerigen Schicht wurden 2 cm^3 10proz. Schwefelsäure zugegeben (Kongopapier: blau) und das Gemisch bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Am nächsten Tage wurde fünfmal

mit je 30 cm^3 Äther ausgeschüttelt. Nach dem Abdestillieren des Äthers blieben 40 mg eines ketonischen Rückstandes zurück.

In einem Vorversuch wurde danach getrachtet, die Ketone durch Sublimation im Hochvakuum zu reinigen; es wurden aber nur Spuren eines flüchtigen Produktes erhalten. Das Keton-Gemisch wurde daher über 1,2 g Aluminiumoxyd nach *Brockmann* chromatographiert.

I	Petroläther	Spur	Öl
II	Benzol	15 mg	Öl
III	Äther	15 mg	Öl
IV	Methanol	25 mg	Öl

Die Fraktionen II, III und IV wurden vereinigt und nochmals über 1,5 g Aluminiumoxyd nach *Brockmann* chromatographiert.

I	Benzol	5 mg	Nadeln aus Äther
II	Äther	15 mg	Öl
III	Äther-Methanol 3:1	13 mg	Öl

Fraktion I zeigte bei der Mikroschmelzpunktbestimmung einen scharfen Schmelzpunkt von 116°. Es handelt sich sehr wahrscheinlich um das 7-Keto-cholestadien-(3,5), das auch in anderen Organextrakten gefunden wurde.

Zu den Fraktionen II und III in wenig Methanol wurde eine methanolische Lösung von Semicarbazid-acetat, die aus 55 mg Semicarbazidhydrochlorid und 68 mg Natriumacetat erhalten worden war, zugegeben. Auch nach zwei Wochen schied sich kein schwerlösliches Semicarbazon aus.

Untersuchung der Fraktion U_2

99 g der Fraktion U_2 wurden mit 0,5-n. Bariumhydroxyd in Methanol eine halbe Stunde unter Rückfluss gekocht. Die unlöslichen Bariumseifen, die sich während des Kochens abgeschieden hatten, wurden abfiltriert, das Filtrat mit Kohlendioxyd gesättigt und das Bariumcarbonat abfiltriert. Die Bariumseifen und das Bariumcarbonat wurden dreimal mit Methanol am Rückfluss ausgekocht. Alle Methanollösungen wurden eingedampft und der Rückstand mit Äther ausgezogen. In Äther lösten sich 5,5 g eines braunen Öls. Der ätherunlösliche Rückstand wog 11,4 g.

Aus dem ätherlöslichen Öl fielen nach einigem Stehen Kristalle aus, die mehrmals aus Methanol umkristallisiert und fünf Stunden im Hochvakuum bei 100° getrocknet wurden. Die Analyse zeigt, dass es sich um reines Cholesterin handelt. Smp. 146,5—147°.

3,353 mg Subst. gaben 10,301 mg CO_2 und 3,580 mg H_2O.

$C_{27}H_{46}O$	Ber.	C 83,87	H 12,00%
	Gef.	C 83,86	H 11,95%

Die Mutterlaugen von der Umkristallisierung des Cholesterins wurden eingedampft. Der Rückstand wog 2,99 g; er wurde in Äther aufgenommen und mit verd. Natronlauge, verd. Salzsäure und Wasser gewaschen. Die Ätherlösung der Neutralstoffe wurde eingedampft und über Aluminiumoxyd nach *Brockmann* chromatographiert.

I	Hexan-Benzol 1:1	1,55 g	ölig
II	Aceton	Spuren	
III	Methanol	26 mg	

Die ätherunlösliche Fraktion aus dem Verseifungsgemisch wurde im Vakuum getrocknet und über 350 g Aluminiumoxyd nach *Brockmann* chromatographiert.

I	Hexan-Benzol 2:1	—	
II	Hexan-Benzol 1:2	—	
III	Benzol	3 mg	
IV	Benzol-Äther 2:1	—	
V	Äther	25 mg	
VI	Äther-Aceton 2:1	4 mg	
VII	Aceton	—	
VIII	Methanol	8,45 g	braunes Öl
IX	Methanol-Eisessig 5%	5,22 g	Öl, Al-haltig

Beim Stehen kristallisierten aus der Methanolfraktion lange, äusserst hygroskopische Kristalle aus. Sie waren wasserlöslich; die Fraktion wurde deshalb mit Wasser ausgezogen. Die wässerige Lösung wurde mit wenig Tierkohle behandelt und im Vakuum eingedampft. Beim Stehen kristallisierten aus dem Rückstand farblose Kristalle (110 mg) aus, die sich aber nicht aus üblichen Lösungsmitteln umkristallisieren liessen. Sie waren stark löslich in Alkoholen und Wasser, wenig löslich in andern Lösungsmitteln.

Es wurde beobachtet, dass die Substanz mit Salzsäure ein Salz bildet, und dass sie Stickstoff enthält.

Zuerst wurde angenommen, dass es sich um eine Aminosäure handle. Es wurde darum versucht, die Verbindung über das Quecksilbersalz zu reinigen. Der wässerigen Lösung wurde Quecksilber-(II)-acetat zugegeben, bis kein weisser Niederschlag mehr ausfiel. Das Reaktionsgemisch wurde während der Fällung mit Natriumcarbonat alkalisch gehalten. Schliesslich wurde es mit verd. Salzsäure schwach angesäuert und filtriert. Der Niederschlag wurde in Wasser suspendiert und die Mischung mit Schwefelwasserstoff gesättigt. Ausgefälltes Quecksilbersulfid wurde abfiltriert. Im Filtrat konnten nur Spuren der ursprünglichen Substanz gefunden werden; sie wurde also mit Quecksilber(II)-acetat nicht gefällt.

Später wurde gefunden, dass die Verbindung ein schwer lösliches Pikrat bildet, das sich für die Isolierung gut eignet. Um eine grössere Menge Untersuchungsmaterial zu gewinnen, wurden, wie bereits beschrieben, 1,55 kg Fraktion U_2 (vgl. S. 25) mit Bariumhydroxyd verseift. Die Methanollösungen wurden eingeengt, mit Wasser ausgezogen und die wässerigen Auszüge mit Pikrinsäure gefällt. Es wurden so 63 g eines Rohpikrates vom Smp. 237—240° erhalten, aus dem nach fünfmaligem Umkristallisieren aus Wasser 50 g eines analysenreinen Präparates erhalten werden konnten.

Aus dem reinen Pikrat wurde das Carbonat der Base auf folgendem Wege erhalten. 45 g des Pikrats vom Smp. 240—241° wurden bei 0° mit 0,1-n. Schwefelsäure angesäuert. Zur Entfernung der freien Pikrinsäure wurde die wässerige Schicht 15mal mit Äther ausgezogen. Der Äther wurde eingedampft, wobei 29,38 g Pikrinsäure vom Smp. 118—120° zurückblieben. Die wässerige Schicht wurde genau auf 1 Liter verdünnt und 300 cm^3 der Lösung mit 21 g Bariumhydroxyd gefällt. Ausgefallenes Bariumsulfat wurde abfiltriert und das Filtrat mit Kohlendioxyd gefällt. Das Bariumcarbonat wurde abfiltriert und das Filtrat im Vakuum in einer Kohlendioxydatmosphäre vorsichtig eingedampft. Der Rückstand, 6,58 g Öl, kristallisierte nach einigem Stehen. Durch Erhitzen auf 130° spaltet das Carbonat Trimethylamin ab.

Dieses wurde in verd. Salzsäure aufgefangen und in das Pikrat und Perjodid übergeführt.

Das Pikrat des Trimethylamins wurde dreimal aus n-Butylalkohol umkristallisiert und 56 Stunden im Hochvakuum über Phosphorpentoxyd getrocknet, Smp. 214–215°. Für das Trimethylaminpikrat wird Smp. 216° angegeben [3]).

3,740 mg Subst. gaben 5,145 mg CO_2 und 1,417 mg H_2O.
2,970 mg Subst. gaben 0,529 cm³ N_2 (18°, 715 mm).

$C_9H_{12}O_7N_4$	Ber.	C 37,50	H 4,20	N 19,44%
	Gef.	C 37,54	H 4,24	N 19,66%

Das Perjodid schmolz bei 65—67°. Für das Trimethylaminperjodid wird Smp. 65° angegeben [4]). Mit synthetisch dargestellten Vergleichspräparaten zeigten das Pikrat und das Perjodid keine Schmelzpunktserniedrigungen.

Aus dem Carbonat der Base wurden weiter verschiedene Salze und ein Acetylderivat hergestellt.

Das Pikrat wurde mehrmals aus Alkohol umkristallisiert, Smp. 240—241° [5]). Für die Analyse wurde fünf Stunden im Hochvakuum über P_2O_5 bei 90° getrocknet.

3,712 mg Subst. gaben 5,429 mg CO_2 und 1,630 mg H_2O.
2,685 mg Subst. gaben 0,405 cm³ N_2 (17°, 713 mm).

$C_{11}H_{16}O_8N_4$	Ber.	C 39,76	H 4,85	N 16,86%
	Gef.	C 39,91	H 4,91	N 16,66%

Das Styphnat wurde ebenfalls aus Alkohol umkristallisiert und für die Analyse 36 Stunden über P_2O_5 im Hochvakuum getrocknet, Smp. 200—201°.

1,192 mg Subst. gaben 0,175 cm³ N_2 (22°, 726 mm).

$C_{11}H_{16}O_9N_4$	Ber.	N 16,09	Gef.	N 16,22%

Das Pikrolonat schmolz nach mehrmaligem Umlösen aus Alkohol bei 188—188,5° [6]) und wurde für die Analyse 24 Stunden im Hochvakuum getrocknet.

---

[3]) *M. Delépine,* A. ch. (7) 8, 852 (1896).

[4]) *M. Delépine,* A. ch. (7) 8, 854 (1896).

[5]) *U. Suzuki, T. Shinamura* und *S. Odake,* Biochem. Z. 43, 100 (1910), geben Smp. 240° an.

[6]) *W. D. Langley* und *A. J. Albrecht,* J. Biol. Chem. 108, 729 (1935) geben Smp. 158° an.

3,732 mg Subst. gaben 6,704 mg CO_2 und 1,925 mg H_2O.
1,169 mg Subst. gaben 0,195 cm³ N_2 (16°, 721 mm).

$C_{15}H_{21}O_6N_5$	Ber.	C	49,08	H	5,77	N	19,08%
	Gef.	C	49,02	H	5,77	N	18,70%

Das Hexachloroplatinat wurde aus Wasser umkristallisiert und 24 Stunden im Hochvakuum über P_2O_5 getrocknet. Die Substanz schmolz bei 221,5° unter Zersetzung.

4,941 mg Subst. gaben 3,542 mg CO_2 und 2,115 mg H_2O.
5,642 mg Subst. gaben 0,223 cm³ N_2 (16°, 724 mm).
9,948 mg Subst. gaben 13,645 mg AgCl.
6,054 mg Subst. gaben 1,905 mg Pt.

$C_{10}H_{28}O_2N_2Cl_6Pt$	Ber.	C	19,49	H	4,58	N	4,55	Cl	34,52	Pt 31,68%
	Gef.	C	19,56	H	4,78	N	4,45	Cl	33,93	Pt 31,47%

Das Acetylderivat der Base wurde durch Erhitzen einer Lösung des Carbonats in abs. Pyridin mit Acetanhydrid erhalten. Durch Fällen des Reaktionsproduktes mit Pikrinsäure und Styphninsäure wurden die gut kristallisierenden Salze des Acetylderivats hergestellt. Das Pikrat des Acetylderivates wurde aus Alkohol umkristallisiert und schmolz bei 108—109°.

3,887 mg Subst. gaben 5,942 mg CO_2 und 1,644 mg H_2O
1,968 mg Subst. gaben 0,266 cm³ N_2 (17°, 726 mm).

$C_{13}H_{18}O_9N_4$	Ber.	C	41,71	H	4,85	N	14,97%
	Gef.	C	41,72	H	4,73	N	15,19%

Das Styphnat des Acetylderivates schmolz, aus Alkohol umkristallisiert, bei 125—125,5°.

3,670 mg Subst. gaben 5,373 mg CO_2 und 1,543 mg H_2O.
1,713 mg Subst. gaben 0,220 cm³ N_2 (21°, 723 mm).

$C_{13}H_{18}O_{10}N_4$	Ber.	C	40,00	H	4,65	N	14,36%
	Gef.	C	39,95	H	4,70	N	14,19%

Aus den Analysen der Derivate und aus der oben erwähnten Spaltung durch Erhitzen geht hervor, dass die isolierte Verbindung Cholin ist. Das synthetische Cholinpikrat (Smp. 240—241°) gab mit dem aus Leber dargestellten Pikrat keine Schmelzpunktsdepression.

Nach der Abtrennung und Identifizierung des Cholins wurden die neutralen, unverseifbaren Stoffe der Fraktion U_2 untersucht. Zu diesem Zwecke war es notwendig, die mitgefällten und ad-

sorbierten Anteile dieser Stoffe zuerst von den methanol-unlöslichen Bariumseifen zu trennen. Es wurden Vorversuche gemacht, die Bariumseifen im Extraktionsapparat nach *Soxhlet* mit Tetrachlorkohlenstoff, Chloroform, Petroläther, Benzin, Ligroin, Äther, Anisol, Essigester, Methanol, Aethanol, n-Butanol und Pyridin zu extrahieren. Die Seifen verwandelten sich aber dabei immer in eine klebrige Masse, sodass mit einer vollständigen Extraktion nicht zu rechnen war.

Die Bariumseifen wurden daher mit Salzsäure zersetzt, das Gemisch der Fettsäuren und Neutralkörper wurde in Äther aufgenommen und die Fettsäuren in Ätherlösung an Calciumhydroxyd adsorbiert.

Vor dem Hauptversuch wurden in mehreren Vorversuchen die günstigsten Bedingungen für die Trennung der Neutralkörper von den Fettsäuren bestimmt. 1 g Cholesterin und 10 g Palmitinsäure wurden mit verschiedenen Mengen von Calciumhydroxyd und Äther geschüttelt und filtriert. Der Äther wurde abdestilliert, der Rückstand gewogen und mit alkoholischer Lauge auf Säuregehalt geprüft. Ein befriedigendes Resultat wurde mit 70 g Calciumhydroxyd und 250 cm^3 Äther erhalten. Der Rückstand wog 1,005 g und enthielt ca. 0,33 % Palmitinsäure.

Bevor eine grössere Menge Bariumseifen verarbeitet wurde, bestimmten wir den Bariumgehalt. 0,9980 g Subst. gaben 0,4250 g $BaSO_4$, was 23,9 % Ba entspricht.

Die Hauptmenge der Bariumseifen, 1,5 kg, wurde mit 570 cm^3 konz. HCl in 1,5 l Wasser zerlegt und fünfmal mit Äther ausgezogen. Die wässerige Schicht enthielt 0,4-n. Säure als Überschuss, wie durch eine Kontrolltitration gefunden wurde. Ätherlöslich waren 413 g.

Die wässerige Schicht wurde mit Natronlauge auf pH 3 abgestumpft und im Vakuum in einer Kohlendioxydatmosphäre eingedampft. Durch mehrmalige Extraktion des Rückstandes mit Äther wurden noch 1,09 g eines ätherlöslichen Produktes erhalten.

Die Säuren aus dem ätherlöslichen Anteil wurden unter ähnlichen Bedingungen wie im Vorversuch an Calciumhydroxyd adsorbiert. Die ätherlöslichen Anteile wurden mit 6,16 kg Calciumhydroxyd in 22 l Äther über Nacht geschüttelt. Der Niederschlag

wurde dann filtriert und in einem grossen Extraktionsapparat mit Äther extrahiert. Die Ätherauszüge wurden vereinigt und eingedampft, wobei 422 g zurückblieben.

Der Niederschlag, welcher grösstenteils aus Calciumhydroxyd bestand, wurde mit 13 l konz. Salzsäure unter Kühlung zerlegt. Das Gemisch wurde dann im Extraktionsapparat für kontinuierliche Extraktion erschöpfend extrahiert, wodurch die an Calciumhydroxyd gebundenen Säuren regeneriert wurden.

Die an Calciumhydroxyd nicht absorbierten ätherlöslichen Anteile enthielten viel Asche; scheinbar haben sich stark ätherlösliche Calciumseifen gebildet. Sie wurden deshalb wieder in Äther gelöst und mit 145 cm^3 konz. HCl in 870 cm^3 Wasser geschüttelt. Die Ätherlösung wurde zweimal mit Wasser, dann mit 400 cm^3 2-n. Kalilauge und noch dreimal mit Wasser geschüttelt. Die ätherlöslichen neutralen Anteile wurden zusammen mit dem Hauptanteil der in Methanol löslichen neutralen Stoffe weiter verarbeitet. Die vereinigten alkalischen wässerigen Lösungen wurden mit Salzsäure angesäuert und in einem Apparat für kontinuierliche Extraktion mit Äther extrahiert. Aus den Ätherauszügen wurden 223 g Säuren, die ätherlösliche Calciumsalze bilden, erhalten.

Die in Methanol nach der Verseifung gelösten Anteile wurden, nachdem Cholin daraus mit Wasser entfernt worden war, in Äther aufgenommen und mit Kalilauge, verd. Salzsäure und Wasser neutral gewaschen. Im Äther blieben 155 g zurück. Die neutralen Anteile aus den Bariumseifen wurden zugegeben und das Gemisch in 1 l Methanol mit 50 g Kaliumhydroxyd über Nacht gekocht. Die alkalische Lösung wurde dann mit etwa 8 l Wasser verdünnt und in einem Apparat für kontinuierliche Extraktion 10 Tage mit Äther extrahiert. Während der Extraktion schied sich aus der wässerigen Schicht ein Niederschlag aus, der wahrscheinlich aus schwerlöslichen Kaliumsalzen bestand. Er wurde abdekantiert und in etwa 5 l destilliertem Wasser fast vollständig gelöst. Die Lösung wurde 10 Tage kontinuierlich mit Chloroform extrahiert. Die vereinigten Chloroform- und Ätherauszüge wurden zur Trockene verdampft und der Rückstand zum dritten Mal mit 0,5-n.

Kalilauge in Methanol zwei Tage lang verseift. Das Verseifungsgemisch wurde mit 12 l Wasser verdünnt und im Apparat für kontinuierliche Extraktion mit Äther extrahiert. Die Ätherlösung wurde neutral gewaschen, getrocknet und eingedampft. Es blieben 13,4 g neutraler unverseifbarer Stoffe zurück. Die Hauptmenge des in dieser Fraktion enthaltenen Cholesterins wurde durch zweimaliges Umlösen aus Alkohol abgetrennt, wobei ein Produkt vom Smp. 140—144° erhalten wurde. Dieses wurde nachträglich fünfmal aus Aceton umkristallisiert. Bei der Umkristallisierung aus Aceton wurden 40 mg eines in Aceton schwer löslichen Produktes vom Smp. ca. 60° abgetrennt. Ferner wurden 4,4 g Cholesterin vom Smp. 146—147° erhalten. Die Mutterlaugen von Cholesterin wurden eingedampft und mit titrierter Kalilauge nochmals verseift. Durch Zurücktitrierung überzeugten wir uns, dass das Produkt praktisch unverseifbar war. Das Verseifungsprodukt wurde, wie früher beschrieben, mit Wasser verdünnt, mit Äther extrahiert und neutral gewaschen. Im Äther blieben 4,3 g Rückstand. Zusammen mit dem bei 60° schmelzenden Produkt wurde dieser neutrale, unverseifbare, cholesterinarme Anteil über Aluminiumoxyd (aktiviert nach *Brockmann*) chromatographiert. Der Weg zu den unverseifbaren cholesterinarmen Neutralstoffen aus der Fraktion U_2 ist schematisch in der Übersicht II (siehe Seite 36) dargestellt.

4,3 g der Neutralstoffe wurden über 130 g Aluminiumoxyd nach *Brockmann* chromatographiert.

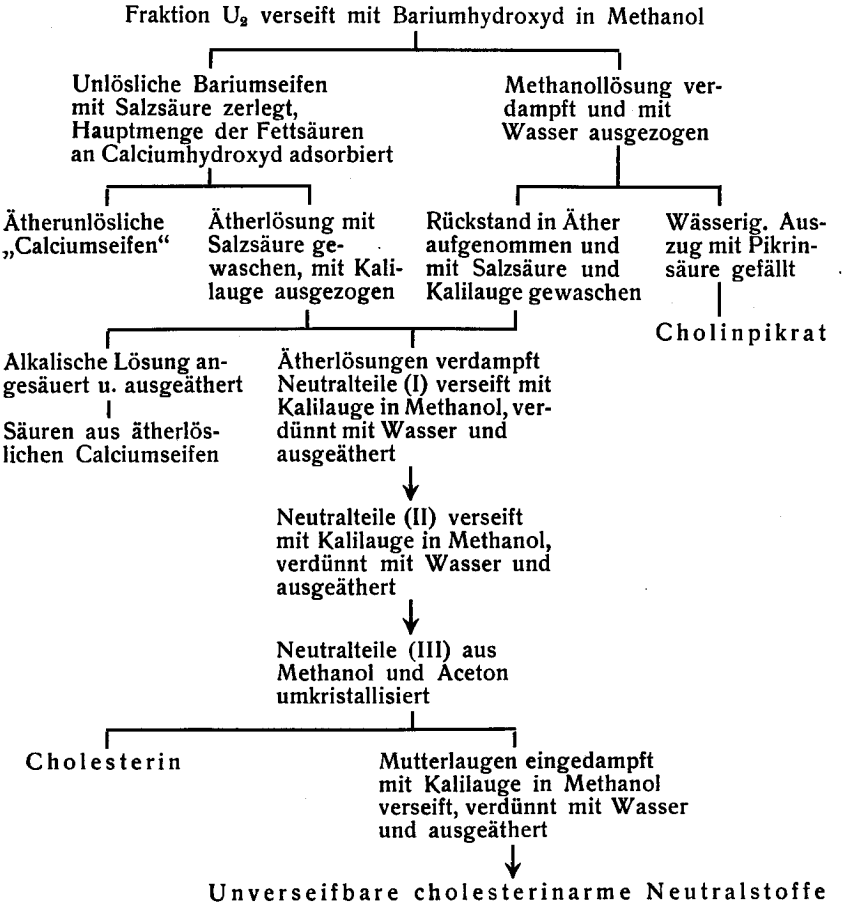
Chromatogramm A.

I	Petroläther	640 mg	ölig
II	Benzol	340 mg	ölig, teilwelse kristallisiert
III	Äther	3 mg	Cholesterin
IV	Äther-Alkohol	300 mg	ölig

Fraktion I. 80 mg der Fraktion wurden im Molekularkolben im Hochvakuum bei 0,01 mm Druck destilliert.

I	bis 70°	12 mg	ölig
II	70—100°	52 mg	fest
III	100—120°	Spuren	
IV	Rückstand		fest, farblos

Übersicht II



Die Fraktion vom Sdp. 0,01 mm, 70—100°, wurde zweimal aus Essigester-Methanol umkristallisiert, wodurch 20 mg einer weissen, paraffinähnlichen Verbindung erhalten wurden. Durch nochmalige Destillation dieses Produktes wurden 15 mg einer Substanz vom Sdp. 0,01 mm, 70° erhalten, deren Analyse auf das Vorhandensein eines ungesättigten Kohlenwasserstoffs hindeutete. Mit Tetranitromethan gab die Verbindung eine deutliche Gelbfärbung.

3,864 mg Subst. gaben 12,152 mg CO_2 und 4,890 mg H_2O.
1,522 mg in 12,591 mg Campher mit einer molaren Depression von 45,30° gaben $\Delta = 16{,}1°$.
0,789 mg in 11,279 mg Campher mit der molaren Depression von 50,47 gaben $\Delta = 10{,}2°$.

$C_{24}H_{48}$	Ber.	C 85,62	H 14,38%	M.G.	336
$C_{28}H_{56}$	Ber.	C 85,63	H 14,37%	M.G.	392
	Gef.	C 85,83	H 14,16%	M.G.	340, 346

Fraktion II des Chromatogramms A wurde über 12 g Aluminiumoxyd nach *Brockmann* chromatographiert.

Chromatogramm B.

I	Petroläther	94 mg	ölig, farblos
II	Petroläther-Benzol 3:1	120 mg	ölig, teilweise kristallisiert
III	Petroläther-Benzol 1:1	5 mg	ölig
IV	Petroläther-Benzol 1:3	25 mg	ölig
V	Benzol	10 mg	

Fraktion II des Chromatogramms B wurde in wenig Pentan gelöst und über Nacht bei 0° stehen gelassen. Ausgeschiedene Kristalle wurden abfiltriert und sechsmal aus Essigester-Methanol umkristallisiert. Es wurden 2,5 mg einer farblosen Verbindung mit dem Smp. 248—248,5° erhalten. Die Verbindung war neutral und gab bei der qualitativen Prüfung eine positive Stickstoffreaktion.

1,129 mg Subst. gaben 3,361 mg CO_2 und 1,225 mg H_2O.
Gef. C 81,24 H 12,14%

Fraktion III des Chromatogramms A, die aus unreinem Cholesterin bestand, wurde mit Pyridin und Acetanhydrid 2 Stunden unter Rückfluss gekocht. Nach dem Verdampfen des Pyridins und des Acetanhydrids im Vakuum wurde der Rückstand in Äther aufgenommen, neutral gewaschen und über 200 g Aluminiumoxyd nach *Brockmann* chromatographiert.

Chromatogramm C.

I	Petroläther	84 mg	ölig
II	Petroläther-Benzol 1:1	5,37 g	Cholesterin-acetat
III	Benzol	45 mg	ölig
IV	Benzol-Äther 1:1	88 mg	
V	Äther	121 mg	ölig
VI	Methanol	309 mg	

Fraktion II des Chromatogramms C wurde nochmals chromatographiert und in 23 Fraktionen aufgeteilt, die mittleren, welche aus reinem Cholesterinacetat bestanden, schmolzen bei 112—113°.

Fraktion V des Chromatogramms C gab nach der Verseifung mit methanolischer Kalilauge und Veresterung mit p-Nitrobenzoylchlorid einen p-Nitrobenzoesäureester, welcher nach chromatographischer Reinigung bei 175—180° schmolz und mit Cholesterin-p-nitrobenzoat identisch war.

Fraktion VI des Chromatogramms C wurde erneut über 3 g Aluminiumoxyd nach *Brockmann* chromatographiert.

Chromatogramm D.

I	Petroläther	—	
II	Benzol	45 mg	ölig
III	Äther	102 mg	Krist. Smp. 122—124°
IV	Methanol	53 mg	ölig

Fraktion IV des Chromatogramms A (300 mg) wurde über 15 g Silikagel chromatographiert.

Chromatogramm E.

I	Petroläther	Spuren	
II	Benzol	5 mg	ölig
III		35 mg	ölig
IV	Äther	240 mg	
V	Äther-Aceton	214 mg	ölig

Die Benzolfraktion III des Chromatogramms E (35 mg) wurde über 1,75 g Silikagel chromatographiert.

Chromatogramm F.

I	Petroläther	7 mg	ölig, teilweise kristallisiert
II	Petroläther-Benzol 4:1	5 mg	ölig
III		15 mg	Kristalle
IV	Benzol	7 mg	
V	Aceton	4 mg	

Fraktion IV des Chromatogramms E (240 mg) wurde durch Kochen mit Acetanhydrid und Pyridin acetyliert, das Acetylderivat wie üblich isoliert und über 15 g Aluminiumoxyd nach *Brockmann* chromatographiert.

Chromatogramm G.

I	Petroläther	Spuren	
II	Benzol	100 mg	helles Öl
III	Äther	70 mg	helles Öl
IV	Aceton	29 mg	ölig

Fraktion II des Chromatogramms G (100 mg) wurde mit 0,5-n. methanolischer Kalilauge 2 Stunden am Rückfluss verseift, die Neutralteile ausgeäthert und über 2,5 g Silikagel chromatographiert.

Chromatogramm H.

I	Petroläther	Spuren	
II	Benzol-Petroläther 1:3	30 mg	farblose Kristalle
III	Benzol-Petroläther 3:1	12 mg	ölig
IV	Benzol	7 mg	ölig
V	Äther	10 mg	ölig

Fraktion III des Chromatogramms G (70 mg) wurde ebenfalls mit 0,5-n. methanolischer Kalilauge 2 Stunden am Rückfluss verseift und die Neutralanteile über 4,2 g Silikagel chromatographiert.

Chromatogramm J.

I	Petroläther	17 mg	ölig
II	Benzol	5 mg	ölig
III	Benzol-Äther 3:1	25 mg	ölig
IV	Benzol-Äther 1:3	40 mg	ölig

Aus den Chromatogrammen F und H wurden diejenigen Fraktionen, welche mit Petroläther und Benzol eluiert worden waren und welche teilweise kristallisierten, über die 100fache Menge Silikagel chromatographiert. Aus den Petrolätherеluaten wurden 20 mg mit Öl vermischte Kristalle erhalten. Sie wurden aus Essigester zweimal umkristallisiert und schmolzen scharf bei 116° (Kofler-Block). Es handelt sich sehr wahrscheinlich um das 7-Keto-cholestadien-(3,5), welches auch in anderen Extrakten gefunden worden ist. Es entsteht leicht aus dem 7-Keto-cholesterin, besonders während der Verseifung der 7-Keto-cholesterin-ester, und ist wahrscheinlich sekundär aus dem 7-Keto-cholesterin, das in Fraktion IV des Chromatogramms A enthalten war, durch Isolierungsoperationen entstanden.

Untersuchung der Fraktion U_3

In dieser Zeit wurde in unserem Laboratorium aus Rinderblutextrakt und von *Pfiffner* und *North* aus Nebennierenrinde das Dimethylsulfon isoliert. Wir versuchten, diese interessante Verbindung auch im Leberextrakt aufzufinden und wählten für unsere Untersuchung die Fraktion U_3, welche derjenigen Fraktion aus Rinderblutextrakt entsprach, in der das Dimethylsulfon gefunden worden war.

Wir dampften einen Drittel der Fraktion U_3 zur Trockene ein. Aus dem zurückgebliebenen Öl sublimierte kein Dimethylsulfon, wie es bei Extrakt aus Rinderblut der Fall gewesen war. Es wurde weiter versucht, das Dimethylsulfon mit heissem Essigester aus dem Rückstand zu extrahieren. Die Essigesterschicht wurde vom Öl abdekantiert und eingeengt. Nach einigem Stehen fielen aus der eingeengten Lösung 179 mg eines unreinen stickstoffhaltigen Materials aus. Dieses wurde abfiltriert und 8mal aus Alkohol umkristallisiert. Es schmolz dann bei 287 °, im Hochvakuum bei 295 ° unter Zersetzung. Die Substanz war löslich in Wasser, in Methyl- und Äthylalkohol und unlöslich in Äther und Benzol. Sie enthielt Stickstoff und war halogen- und schwefelfrei.

Untersuchung der Fraktion U_4

Nach längerem Stehen fielen aus der Fraktion U_4 1,34 g eines kristallinen Materials aus, das abgesaugt und sechsmal aus Methanol-Äther umkristallisiert wurde. Die Verbindung schmolz bei 59—61 ° und war in Wasser, verd. Salzsäure und verd. Natronlauge unlöslich; durch konz. Schwefelsäure wurde sie nicht verändert. Sie war äusserst schwer löslich in Alkoholen, gut löslich in Hexan, in Chloroform nahm sie kein Brom auf, und mit Tetranitromethan gab sie keine Gelbfärbung. Zur Analyse wurde im Hochvakuum über Phosphorpentoxyd getrocknet.

3,622 mg Subst. gaben 11,148 mg CO_2 und 4,624 mg H_2O.

Gef. C 83,99 H 14,29%

Es handelt sich demnach um einen gesättigten Kohlenwasserstoff, der allerdings noch etwas sauerstoffhaltige Verunreinigungen enthält.

Die Mutterlaugen von der Umkristallisierung des Kohlenwasserstoffs wurden abgedampft (94 mg) und chromatographiert. Es wurde aber nur laugelösliches Material, welches mit Methanol-Eisessig eluiert wurde, erhalten.

Der Rest der Fraktion U_4, 73 g, wurde verseift. 550 cm^3 0,5-n. Bariumhydroxyd in Methanol wurden mit einer konzentrierten Methanollösung der Fraktion U_4 eine halbe Stunde am Rückfluss gekocht. Die unlöslichen Bariumseifen wurden abfiltriert und zweimal eine Stunde mit kochendem Methanol ausgezogen. Die Auszüge wurden mit dem Methanolfiltrat vereinigt, die methanolische Lösung mit Kohlendioxyd gesättigt und vom Bariumcarbonat abfiltriert. Das Bariumcarbonat wurde zweimal mit Methanol ausgekocht. Die vereinigten Methanollösungen wurden eingedampft und der Rückstand viermal mit Äther ausgezogen. Die Ätherlösung wurde mit verd. Natronlauge und verd. Salzsäure gewaschen und eingedampft, wobei 5,88 g Rückstand zurückblieben. Nach den Untersuchungen von *Haslewood* konnte man erwarten, dass in dieser Fraktion das 7-Oxy-cholesterin enthalten sein könnte. Es wurde deswegen besonders diese Verbindung gesucht. Aus den 5,88 g unverseifbarem Rückstand erhielten wir nach zweimaligem Umkristallisieren aus Methanol 1,42 g eines kristallisierten Materials. Diese wurden in Methanol gelöst und mit einer methanolischen Lösung von 4,25 g Digitonin versetzt. Das Gemisch wurde zur Trockene eingedampft und dreimal mit je 100 cm^3 Äther ausgezogen, wobei kein in Äther lösliches Material erhalten wurde. Die kristalline Verbindung wurde demnach vollständig von Digitonin gefällt.

Das Digitonid wurde in 100 cm^3 heissem Pyridin aufgelöst und über Nacht stehen gelassen. Der Lösung wurde dann 1 Liter Äther beigegeben und der entstandene Niederschlag abfiltriert. Das Filtrat wurde zur Trockene eingedampft, wobei 357 mg Rückstand zurückblieben. Dieser wurde wieder in heissem Pyridin aufgelöst und zwei Stunden am Wasserbad erhitzt. Wie

vorher, wurde dann 1 Liter Äther beigegeben und der Niederschlag abfiltriert. Aus der Lösung wurden 230 mg Steroid erhalten. Der in Äther unlösliche Niederschlag wurde dann mit Xylol zwei Stunden am Rückfluss gekocht. Nach Zugabe von Äther wurde der Niederschlag wieder filtriert und die Ätherlösung eingedampft. Es blieben nur 10 mg eines Rückstandes zurück.

Alle Steroidfraktionen, welche durch Digitonidspaltung erhalten wurden, schmolzen bei etwa 145° und gaben die *Liebermann-Burckhard*'sche Reaktion auf Cholesterin. 7-Oxy-cholesterine wurden nicht aufgefunden.

Die Analysen wurden in der mikroanalytischen Abteilung von den Herren Dr. *H. Gubser* und *W. Manser* ausgeführt.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden verschiedene Methoden der modernen Isolierungstechnik auf Acetonextrakt aus Schweineleber angewandt, in der Hoffnung, weitere Vertreter der Steroidreihe in diesem Organextrakt aufzufinden. Vor allem wurde derjenige Anteil des Extraktes untersucht, welcher beim Ausfrieren aus Methanol in diesem Lösungsmittel gelöst bleibt. Aus den durchgeführten Versuchen kann man schliessen, dass dieser Anteil hauptsächlich aus verseifbaren Körpern besteht. Die Isolierung verhältnismässig grosser Mengen Cholin deutet auf das Vorkommen von Phosphatiden hin. Die kleinen Mengen an unverseifbaren Neutralkörpern bestehen grösstenteils aus Cholesterin. Neben Cholesterin wurden geringe Mengen Kohlenwasserstoffe isoliert, welche wahrscheinlich mit den Kohlenwasserstoffen B und C von *H. J. Channon, J. Devine* und *V. Loach*[1]) identisch sind. Weiter wurde ein stickstoffhaltiger Körper vom Smp. 248—248,5° und ein stickstoffreier Körper vom Smp. 116° isoliert, die wegen Materialmangel nicht identifiziert werden konnten. Dimethylsulfon und 7-Oxy-cholesterin konnten im Acetonextrakt aus Schweineleber nicht gefunden werden.

Die Fraktion des Acetonextraktes aus Schweineleber, welche beim Ausfrieren aus Methanol in diesem Lösungsmittel gelöst bleibt, enthält demnach überhaupt sehr wenig unverseifbare Neutralkörper und neben Cholesterin sehr wahrscheinlich keine weiteren Steroide in grösserer Menge.

[1]) Biochem. J. 28, 2012 (1934).

Curriculum vitae

Als Sohn des Raymond Henry Rexford von New York, N.Y., U. S. A., und der Zillah, geborene Trippe, wurde ich am 1. Oktober 1915 in Orleans, Vermont, geboren. Nach dem Besuch verschiedener Primarschulen im Staate Vermont begann ich 1929 das Studium an der Johnson High School in Johnson, Vermont, und übersiedelte nach drei Jahren an das Montpelier Seminary in Montpelier, Vermont, wo ich im Juni 1933 das Diplom erhielt. Das darauffolgende vierjährige Studium an der Norwich University in Northfield, Vermont, das ich während dreier Monate als Analytiker bei der Eastern Magnesia Talc Mining Company unterbrach, schloss ich ab mit dem Diplom als Bachelor of Science in Chemistry. Darauf trat ich eine Stelle an als Chemiker bei der Ciba Company in New York, die ich im Juni 1939 aufgab, um meine Ausbildung an der Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich fortzusetzen. Seit November 1939 arbeitete ich am Organisch-chemischen Institut unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. L. Ruzicka an der vorliegenden Promotionsarbeit.

Zürich, Mai 1943.

Dean Raymond Rexford.