

Eine spezifische Farbenreaktion auf Ergosterin und seine Umwandlungsprodukte

von E. P. Häussler und E. Brauchli.

(19. XII. 28.)

Auf der Suche nach einem Verfahren, das gestattet, Ergosterin neben Cholesterin und Phytosterinen mit Sicherheit nachzuweisen, erinnerten wir uns der Reaktion von *M. Tortelli* und *E. Jaffe*¹⁾, mit Hilfe derer man die Anwesenheit von Lebertran neben anderen Ölen und Fetten pflanzlicher und tierischer Herkunft feststellen kann.

Mischt man nach *Tortelli* und *Jaffe* 5 cm³ Öl oder Fett mit 10 cm³ Chloroform und 1 cm³ Eisessig, fügt noch 2,5 cm³ einer Lösung von 10% Brom in Chloroform zu, und schüttelt durch, so tritt nur bei Tranen und aus solchen durch Hydrierung gewonnenen Fetten eine starke Grünfärbung auf²⁾.

Zum Unterschiede von so mancher anderen Farbenreaktion hat sich diese als zuverlässig und brauchbar erwiesen, und ist u. a. in die bekannten Werke von *Holde*³⁾ und *Grün*⁴⁾, wie auch in das Schweizerische Lebensmittelbuch aufgenommen worden.

Da nun der Träger der antirachitischen Wirkung des Lebertranes das aus dem Ergosterin gebildete Vitamin D ist, nahmen wir an, dass auch der positive Ausfall der *Tortelli-Jaffe*-Reaktion beim Lebertran auf der Anwesenheit von noch unverändertem oder bereits umgewandeltem Ergosterin in demselben beruhe, und dass andererseits sowohl das in den tierischen Fetten befindliche Cholesterin und seine Ester, als auch die den vegetabilischen Fetten und Ölen beigeesellten Phytosterine sich bei der genannten Reaktion negativ verhalten würden.

Versuche mit Olivenöl-lösungen von reinem Cholesterin, Phytosterin und Ergosterin erwiesen die Richtigkeit unserer Überlegung und veranlassten uns, die Untersuchungen über die Verwendbarkeit dieser Reaktion etwas weiter auszudehnen.

Hierbei haben wir darauf verzichtet, die Reaktion selbst irgendwie abzuändern (zu verschärfen), sondern führten sie so aus, wie sie seinerzeit von ihren Entdeckern beschrieben, und wie sie auch in die 3. Auflage des Schweizerischen Lebensmittelbuches aufgenommen worden ist⁵⁾.

1) Ch. Z. **39**, 14 (1915). „Eine spezifische Farbenreaktion für Trane von Seetieren und ihre Hydrierungsprodukte.“

2) Nach *Tortelli* und *Jaffe* geben hydrierte Trane eine stärkere Grünfärbung, bei vollständiger Hydrierung hingegen soll nach *Holde* und *Grün* die Reaktion negativ ausfallen.

3) „Kohlenwasserstofföle und Fette.“ 6. Aufl., Berlin, 1924, bei J. Springer.

4) „Analyse der Fette und Wachse.“ Berlin, 1925, bei J. Springer.

5) Bern 1917.

Die Beurteilung der Farbe des fertigen Gemisches erfolgte ungefähr 10 Minuten nach dem Schütteln; wir haben beobachtet, dass einestils schwache Grünfärbungen nach längerem Stehen verschwinden, bzw. durch eine allmählich sich entwickelnde Braunfärbung verdeckt werden können, und zum andern auch meist bald eine Trübung des Gemisches auftritt, wodurch alsdann ein Vergleich der einzelnen Proben erschwert wird.

1. Verhalten der Sterine.

(Mit 5 cm³ reinem Olivenöl und 10 cm³ einer frisch bereiteten Lösung oder Aufschwemmung des betreffenden Sterines in Chloroform.)

a) Cholesterin.

Wiederholt umkrystallisiertes Cholesterin aus

Rinderleber,

Rindermilz,

Rindergalle,

Gallensteinen von Frauen und

Schweineovarien, je 1,0 g: Reaktion negativ.

b) Phytosterine.

Phytosterin aus Sojabohnenöl¹⁾:

1,0 g = Reaktion negativ.

c) Ergosterin.

Mit je 1,0 mg Ergosterin aus Hefe

„ Mutterkorn

„ Baumschwamm²⁾

noch deutliche, mit 0,5 mg undeutliche Grünfärbung und nur erkennbar gegenüber einem Blindversuche.

d) Ergosterin neben Cholesterin und Phytosterin.

Neben 1,3 g Cholesterin liessen sich noch 1,5 mg Ergosterin und neben 1,3 g Phytosterin (aus Sojabohnenöl) noch 1,0 mg Ergosterin mit Sicherheit nachweisen.

e) Ester und Digitonide von Cholesterin und Ergosterin.

Mit 1,0 g Cholesteryl-oleat und mit 0,25 g Cholesterin-digitonid: Reaktion negativ.

Mit Ergosterin-acetat: noch 1 mg deutlich positive Reaktion.

Mit Bernsteinsäure-mono-ergosterylester: noch 1 mg deutlich positive Reaktion.

¹⁾ Smp. = 136–137°; $[\alpha]_D^{20}$ (in Chloroform) = -34,2°.

²⁾ In ungefähr gleicher Ausbeute (ca. 0,5 g aus 1 kg) wie aus Rotbuchenschwamm (*Fomes fomentarius* oder *F. igniarius*) wurde das Ergosterin auch erhalten aus getrocknetem Steinpilz (*Boletus edulis*).

Mit Ergosterin-digitonid: 3,0 mg: Reaktion fraglich.
4,0 mg: Reaktion deutlich positiv.
(mit 0,5 g Digitonin war die Reaktion negativ).

f) Zymosterin.

Dieses Sterin ist vor kurzem von *Ida Smedley-Maclean*¹⁾ aus Brauereihefe isoliert worden, wo es neben Ergosterin und wahrscheinlich noch anderen Sterinen²⁾ in wechselndem Betrage vorkommt. Mit einem Zymosterin, das — wasserfrei — einen Schmelzpunkt von 108—109° und eine optische Aktivität $[\alpha]_D^{20} = +17,0^\circ$ (in Chloroform) aufwies und somit in seinem Reinheitsgrade ungefähr *Smedley-Maclean's* Zymosterin vor wiederholterem Umkrystallisieren entsprach, erhielten wir ebenfalls eine Grünfärbung, dieselbe war jedoch ungefähr 5 mal schwächer, als diejenige mit der gleichen Menge Ergosterin.

Nun hatte bereits *J. Smedley-Maclean* angegeben, dass auch ihr reinstes Zymosterin ($[\alpha]_D = +34,1^\circ$) noch Ergosterin enthalte, allerdings in einem Betrage von weniger als 5%³⁾.

Um festzustellen, ob der positive Ausfall der T. J.-Reaktion beim Zymosterin nur von einer Verunreinigung desselben mit Ergosterin herrühre, haben wir nach 4 verschiedenen Methoden versucht, zu reinem Zymosterin zu gelangen.

a) Durch wiederholtes Krystallisieren aus Äther.

Endprodukt: Smp. 105—107°; $[\alpha]_D^{20}$ (in Chloroform) = +44,0°.

β) Ein ebenso reines Produkt erhält man durch Bestrahlung einer 1-proz. Lösung in reinem Alkohol. Das Zymosterin wird durch die kurzwelligen Strahlen nicht beeinflusst, während beigemengtes Ergosterin bekanntlich eine weitgehende Veränderung erfährt. Beim Abdunsten des Lösungsmittels im Vakuum schied sich ein Zymosterin von $[\alpha]_D$ (in Chloroform) = +44° aus; dieser Wert änderte sich auch bei weiterem Umkrystallisieren aus Alkohol und Äther nicht mehr wesentlich.

γ) Zu einem ergosterin-freien Zymosterin gelangte man auch durch Oxydation mit Kaliumpermanganat in Aceton, entsprechend der Herstellung von ergosterin-freiem Cholesterin nach *S. K. Kon, Farrington* und *Steenbock*⁴⁾. Das Zymosterin ist gegenüber diesem oxydativen Eingriffe widerstandsfähiger, als das Ergosterin. Nach 4-maliger Oxydation erhielt man ein Zymosterin von $[\alpha]_D$ (in Chloroform) = +43,5°, welches bei weiterer Oxydation seine spezifische Drehung nicht mehr änderte.

δ) Eine Zersetzung des dem Zymosterin beigemengten Ergosterins erfolgt auch beim Stehen in Chloroformlösung. Die Lösung färbt sich

¹⁾ Biochem. J. **22**, 22 (1928).

²⁾ *Ch. E. Bills* und *E. M. Honeywell*. J. Biol. Chem. **80**, 15 (1928).

³⁾ loc. cit. und *E. M. Hume, H. H. Smith* und *J. Smedley-Maclean*. Biochem. J. **22**, 980 (1928).

⁴⁾ Am. Soc. **50**, 2573 (1928).

dabei gelb bis gelbbraun, gleichzeitig erfolgt eine Zunahme der Rechtsdrehung. Nach 2 Wochen ist dieselbe maximal. Durch Abdunsten des Chloroforms im Vakuum und Umkrystallisieren des Rückstandes aus Alkohol erhielt man ein farbloses Zymosterin ($[\alpha]_D^{20} = +44^{\circ}$). Die Chloroformlösungen derart gereinigter Zymosterine bleiben beim Stehen farblos und erleiden keine weitere Änderung der optischen Aktivität.

Der Ausfall der Reaktion von *Tortelli* und *Jaffe* mit den so gereinigten Zymosterinpräparaten war stets derselbe, unabhängig von der Methode der Reinigung. Die Farbstärke war ungefähr $1/10$ — $1/20$ derjenigen von Ergosterin.

Trotzdem dies darauf hindeutet, dass die beobachtete *Tortelli*-Reaktion dem Zymosterin selbst zukommt, ist nicht ausgeschlossen, dass die schwache Grünfärbung auch einem Isomeren oder Umwandlungsprodukte des Ergosterins oder des Zymosterins zuzuschreiben ist.

Wir hielten es deshalb für angezeigt, das Iso-ergosterin, sowie das Dehydro-ergosterin auf ihr Verhalten gegenüber der *Tortelli-Jaffe*-Reaktion zu prüfen.

g) Iso-ergosteryl-acetat, gewonnen durch Isomerisierung des Ergosteryl-acetats mit Chlorwasserstoff nach *Reindel*, *Walter* und *Rauch*¹⁾. Smp. = 133—135°, $[\alpha]_D^{20}$ (in Chloroform) = $-62,2^{\circ}$.

Reaktion: Positiv, aber ungefähr nur halb so stark wie mit Ergosterin; 1,0 mg Iso-ergosteryl-acetat liess sich noch nachweisen. Bei einer wiederholten Darstellung dieses Acetats erhielt man einen Körper, der — ebenfalls nach öfterem Umkrystallisieren aus Essigester-Methylalkohol — bei 132—134° schmolz, aber auffallenderweise eine spezifische Drehung von $[\alpha]_D^{20} = -170,9^{\circ}$ (in Chloroform) aufwies. Mischschmelzpunkt der Substanz mit dem zuerst dargestellten Ester = 120—122°. Reaktion: ebenfalls positiv, aber etwa dreimal schwächer, wie Ergosterin. Grenze der Nachweisbarkeit = ca. 1,5 mg. Wir haben die Substanz nicht weiter untersucht.

h) Dehydro-ergosterin.

Dasselbe wurde hergestellt nach den Angaben von *Windaus* und *Lintert*²⁾. Smp. = 144—145°; $[\alpha]_D$ der wasserhaltigen Substanz (in Chloroform) = $+137,5^{\circ 3)}$.

Reagiert auch positiv, aber 2- bis 4-mal stärker, als Ergosterin. Noch 0,1 mg Dehydro-ergosterin sind deutlich nachweisbar.

¹⁾ A. 452, 43 (1927).

²⁾ A. 465, 148 (1928).

³⁾ *Windaus* gibt für sein Präparat eine optische Aktivität von $[\alpha]_D^{20} = +149^{\circ}$ an; die etwas geringere Drehung unseres, über das Acetat vom Smp. 146° dargestellten Präparates erklärt sich vielleicht durch den Umstand, dass dasselbe zur Vermeidung von Zersetzungen nur bei Zimmertemperatur getrocknet wurde.

i) Dehydro-ergosteryl-acetat.

Smp. = 146°; $[\alpha]_D^{20}$ (in Chloroform) = + 192,0°. Reaktion ungefähr gleich stark, wie bei Dehydro-ergosterin.

2. Einfluss der Bestrahlung auf die T. J.-Reaktion des Ergosterins.

a) 0,3% Ergosterin in Olivenöl gelöst.

a) Bestrahlungszeit 6 Minuten.

Keine Abnahme der Intensität der Grünfärbung.

β) Bestrahlungszeit 3½ Stunden.

ca. 50% Abnahme der Intensität der Grünfärbung.

b) 0,3% Ergosterin in Benzol gelöst.

a)

	Anfängliche Drehung -0,37°	Abnahme der Farbtiefe
Bestrahlungszeit 4 Std.	+0,08°	ca. $\frac{1}{3} - \frac{1}{2}$
„ 9 „	+0,04°	$\frac{1}{2} - \frac{2}{3}$
„ 12½ „	+0,06°	$\frac{4}{5}$
„ 16 „	+0,07°	$\frac{9}{10}$

β) Bestrahlt man eine gleich starke Benzollösung unter denselben Bedingungen gerade bis zum Verschwinden der Linksdrehung ($\alpha_D^{20} = -0,01^\circ$) — wozu man ½ Stunde benötigt — so beträgt die Abnahme der Farbtiefe nur ungefähr $\frac{1}{4}$.

Da nach dem Verschwinden der optischen Aktivität das Ergosterin schon vollständig verändert sein musste — es trat auch keine Digitonid-fällung mehr auf — deutet die geringe Abschwächung der Grünfärbung darauf hin, dass die Reaktion nach *Tortelli* auch noch mit den ersten Umwandlungsprodukten positiv ausfällt.

3. Verhalten von pflanzlichen und tierischen Lipoiden.

Wiewohl schon *Tortelli* und *Jaffe* eine grosse Anzahl pflanzlicher und tierischer Fette mit ihrer Methode geprüft und mit keinem eine positive Reaktion erhalten haben, hielten wir es für interessant, verschiedene Öle und auch noch einige von den Entdeckern der Reaktion nicht verwendete Fette und sterinhaltige Stoffe in dieser Richtung zu untersuchen.

a) Vegetabilische Öle.

Wir konnten den negativen Ausfall bei folgenden Ölen¹⁾ bestätigen: Oliven-, Baumwollsamens-, Sesam-, Erdnuss-, Walnuss-, Pfirsichkern-, süsses Mandel-, Sojabohnen-, Ricinus-, Croton-, Hydnocarpus- und Rüböl. Mit Croton-, Hydnocarpus- und Rüböl wurden stark dunkelgelbe bis braunrote Färbungen erhalten.

Hingegen reagierten positiv: Ein Mohnöl (grünbraune Färbung²⁾), zwei Leinöle von verschiedener Bezugsquelle und ein Chaulmoograöl.

¹⁾ Mit je 5 cm³ Öl.

²⁾ Ein zweites Mohnöl reagierte negativ.

Der positive Ausfall der Reaktion bei den Leinölen veranlasste uns, auch reine Linolensäure und das bei der Verseifung des Leinöles erhaltene „Unverseifbare“ zu prüfen. Von ersterer gaben 1 cm³ und von letzterem 0,1 g (entsprechend 10 cm³ Leinöl) noch keine Grünfärbung, ebensowenig erhielt man eine solche mit vier verschiedenen durch Acetonbehandlung des Unverseifbaren gewonnenen Fraktionen. Als wir jedoch — bei beiden Leinölen — die Verseifung unter gleichzeitigem Einleiten von Wasserstoff wiederholten und hierbei auch die Kochdauer von 5 Stunden auf 1½ Stunden abkürzten, fiel die Reaktion mit den in einer Ausbeute von 1,4% isolierten unverseifbaren Bestandteilen positiv aus. Mit je 0,07 g Unverseifbarem, in 10 cm³ Chloroform gelöst und mit 5 cm³ Olivenöl gemischt, traten ungefähr gleich starke Grünfärbungen auf, wie mit 5 cm³ ursprünglichem Öl.

b) Tierische Fette und sterinhaltige Substanzen.

Negativ reagierten 5 cm³ Rinderklauenöl¹⁾; ferner 0,5 g der in einer Ausbeute von ca. 50% aus *Adeps lanae* anhydric. isolierten Rohsterine.

Aus letzterem Befunde darf man schliessen, dass — wie mit dem Cholesterin — auch mit dem Iso-cholesterin die *Tortelli-Jaffe*-Reaktion negativ ausfällt.

Eine deutliche Grünfärbung erhielten wir jedoch mit den Ätherextrakten von *Mekonium*²⁾.

α) aus ca. 50 g Mekonium gewann man durch wiederholtes Auskochen mit Alkohol, Abdunsten desselben und Ausschütteln des Rückstandes mit Äther und verdünnter Sodalösung 0,7 g und

β) Aus 36 g Mekonium nach demselben Verfahren 0,8 g Lipoid. Mit beiden fiel die Reaktion positiv aus.

Ebenfalls eine eindeutige Grünfärbung gab ein unreines Steringemenge aus *Gallensteinen* von Frauen, das gewonnen wurde durch Abkühlen einer heissen Acetonlösung der Steine. Durch oft wiederholtes Umkrystallisieren dieser Rohsterine aus Methylalkohol gelangte man zu einem reinen Cholesterin (Smp. = 148—149°, $[\alpha]_D^{20}$ (in Chloroform) = —37,7°) mit vollkommen negativer *Tortelli-Jaffe*-Reaktion; die aus den gesammelten Mutterlaugen erhaltenen festen Rohsterine gaben hingegen eine starke Grünfärbung. Infolge dieser letzteren Beobachtungen haben wir auch noch einige weitere Gallenbestandteile mit der genannten Reaktion geprüft.

Je 0,1 g reine Cholsäure, Glykocholsäure und Taurocholsäure reagierten negativ, ebenso je 0,3 g der gallensauren Salze aus Rindergalle, Schweine- und Menschengalle (nur das Präparat aus Schweinegalle

¹⁾ Anmerkung bei der Korrektur: Die aus 25 g Lipoid aus Kälberknochenmark durch Verseifung unter Wasserstoff gewonnenen Rohsterine gaben deutlich positive Reaktion. (Ueber antirachitische Wirkung des Knochenmarks vergleiche *G. Fuchs* und *R. Priesel*, *Z. ges. exptl. Med.*, **61**, 533 (1928)).

²⁾ Wir verdanken dasselbe Herrn Dr. *Schultheiss*, Oberarzt am Frauenspital Basel.

färbte etwas grünlich). Unreine, noch stark gallensäurehaltige Farbstoffe aus Rinder-, Schweine- und Menschengalle färbten z. T. schon die Mischung bzw. Suspension mit Olivenöl, Chloroform und Eisessig; bei Zusatz der Bromlösung verschwand aber diese Farbe wieder vollständig. Schliesslich haben wir die Reaktion auch noch mit Digitaligenin¹⁾ (ca. 12 mg) ausgeführt. Resultat: vollkommen negativ.

Aus dem Vorstehenden ergibt sich, dass von den bis jetzt bekannten, in der Natur vorkommenden Sterinen nur Ergosterin und vielleicht Zymosterin, sowie die Umwandlungsprodukte des Ergosterins die Reaktion von *Tortelli* und *Jaffe* zeigen.

Nimmt man an, dass die schwache Reaktion des Zymosterins auf einen geringen Gehalt an Ergosterin zurückzuführen ist, so kann der positive Ausfall der Reaktion bei pflanzlichen und tierischen Lipoiden auf die Anwesenheit von Ergosterin oder seinen Umwandlungsprodukten zurückgeführt werden.

Basel, Chemisches Laboratorium der F. Hoffmann-La Roche & Co.,
Aktiengesellschaft.

Aldehyde aus Acetylen-carbinolen.

IV. 1-Methyl-4-isopropyl-cyclohexyliden-3-acetaldehyd

von H. Rupe und Alois Gassmann.

(27. XII. 28.)

In einer früheren Abhandlung²⁾ über Cyclohexyliden-acetaldehyd wurde in Gemeinschaft mit *W. Messner* und *E. Kambli* die Bildung eines Aldehydes aus einem cyclischen Acetylen-carbinol beschrieben. Wir bringen jetzt ein zweites Beispiel, da es gelang, ausgehend vom Menthon, einen analogen ungesättigten Aldehyd darzustellen.

Zur Verwendung kam d-Menthon, Formel VIII, aus Pulegon durch katalytische Reduktion erhalten. Die Darstellung des Acetylen-carbinols ergab erst dann gute Ausbeuten, als mit Natriumamid in Benzollösung bei höherer Temperatur gearbeitet wurde, in dessen enthält der Körper häufig noch kleine Mengen Menthon, so dass verschiedene Methoden zur Reindarstellung geprüft wurden. Da auch das reine Carbinol, Formel III, innerhalb eines grossen Intervalles destilliert, so nehmen wir an, dass es aus zwei diastereoisomeren Formen

¹⁾ Nach *Windaus* und *Holtz* (Nachr. Ges. Wiss. Göttingen 1927, 217, Z. angew. Ch. 40, 697 (1927)) sollte das Digitaligenin durch Bestrahlung ebenfalls antirachitisch wirksam werden, von *Rosenheim* und *Webster* ist dies widerlegt worden (Biochem. J. 22, 762 (1928)).

²⁾ Helv. 11, 449 (1928.).