

Lorsque l'opération est effectuée dans l'acétate d'éthyle comme dissolvant, nous avons constaté la présence de pélargonate d'éthyle et d'acetyl- ω -hydroxy-tridécanoate d'éthyle dans les produits de réaction neutres non combinables à l'hydrogénosulfite. Le poids de l'ozonide brut dépasse sensiblement celui prévu par la théorie, et cette augmentation est accompagnée d'un accroissement anormal des indices de saponification des différents produits de réaction.

Pour expliquer ces anomalies, nous pensons devoir faire l'hypothèse d'une participation de l'acétate d'éthyle à la réaction de scission de l'ozonide.

Cette hypothèse devrait être vérifiée par une série de nouveaux essais systématiques.

Genève, Laboratoires de la Maison *Firmenich & Cie* (Succ. de *Chuit, Naef & Cie*), 28 avril 1944.

109. Quantitative Bestimmung des Gesamtlipoidgehaltes von Naturstoffen

von Rolf Reichert.

(10. V. 44.)

Unter dem Gesamtlipoidgehalt eines Naturstoffes (Tier- und Pflanzenteile, Nahrungs- und Futtermittel) ist die Gesamtheit aller Bestandteile des betreffenden Stoffes zu verstehen, welche in den sogenannten Fettlösungsmitteln (Äther, Petroläther, Benzol, Chloroform usw.) löslich sind¹⁾.

Trotz der Einführung und der anerkannten Definition des Begriffes „Lipoide“ („lipids“) durch ‘The Committee on the Reform of the Nomenclature of Biological Chemistry’ am internationalen Chemikerkongress in Cambridge 1925 herrscht immer noch eine Begriffsverwirrung hinsichtlich der Bezeichnung „Lipoide“. K. Dirr²⁾ hält es für notwendig, „dass jeder, der das Wort „Lipoide“ gebraucht, seine Definition, d.h. was er darunter versteht, wenigstens an einer Stelle klar aussprechen sollte.“ Mitschuldig an der allgemeinen Verwirrung ist der leider immer noch übliche Gebrauch des unklaren Begriffes „Rohfett“. Es ist zu wünschen, dass dieses Wort möglichst bald aus den Lehrbüchern und Veröffentlichungen verschwindet.

Ein mehr oder weniger grosser Teil der Lipoide liegt in Form von Lipoproteiden an Eiweisskörper gebunden vor. Die Fettkomponenten dieser Lipoproteide können mit den üblichen Fettlösungsmitteln nicht extrahiert werden. Bei Gesamtlipoidbestimmungen, in welchen die zu untersuchende Substanz nach dem Trocknen, ohne weitere Vorbehandlung, mit Äther extrahiert und der Abdampfrückstand als

¹⁾ W. R. Bloor, Chem. Reviews 2, 243 (1925); C. E. Sando, Plant Physiol. 3, 155 (1928).

²⁾ K. Dirr und O. v. Soden, Bioch. Z. 312, 263 (1942).

„Rohfett“ bezeichnet wird¹⁾), kann demnach der an Eiweiss gebundene Anteil der Lipoide nicht erfasst werden. In manchen Fällen wird zwar die Eiweiss-Lipoidbindung im siedenden Äther langsam angegriffen, dann aber ist die Ätherextraktion auch nach Wochen nicht zu Ende zu führen. Als besonders resistent erweisen sich die Lipoproteide in Stoffen, die viel hitzekoaguliertes Eiweiss enthalten (z. B. Trockenhefe).

Zur vollständigen Erfassung aller Lipoide ist also eine quantitative Spaltung der Lipoproteide erforderlich. Die üblichen Verfahren zur Bestimmung des „Rohfettes“ gehen deshalb so vor, dass man die zu untersuchende Substanz mit 10-proz. Salzsäure kocht, wobei die Lipoproteide hydrolytisch gespalten werden, und den getrockneten Rückstand mit absolutem Äther extrahiert. Der nach dem Verdampfen des Äthers verbleibende Rückstand wird dann als „Gesamtlipoide“ (oder „Rohfett“) bezeichnet²⁾. Diese Methode liefert indessen Werte, die stets unter dem wahren Lipoidgehalt liegen. Es wird hier nämlich nicht berücksichtigt, dass bei der Hydrolyse mit Salzsäure die Phosphatide (Lecithin, Kephalin) in Verbindungen aufgespalten werden, die zum Teil wasserlöslich sind (Glycerin, Phosphorsäure, Cholin, Amino-äthylalkohol) und sich der Ätherextraktion entziehen. Unter den Spaltprodukten des Lecithins z. B. macht dieser wasserlösliche Anteil 35% aus, und nur 65% (die Fettsäuren) bleiben ätherlöslich. Bei Lipoiden, die zum grossen Teil aus Phosphatiden bestehen, z. B. Hefefett, können Fehler bis zu 30% auftreten.

In den Mängeln der angeführten Methoden ist die Erklärung dafür zu finden, dass z. B. *K. Dirr*³⁾ in der Hefe einen grösseren Prozentgehalt allein an Lecithin fand, als *H. Fink* und *F. Just*⁴⁾ für die gesamten Lipoide. — In eigenen Untersuchungen von Trockenhefen wurde der paradoxe Fall beobachtet, dass in einem ätherlöslichen Hefeextrakt, der — laut Definition — zu 100% aus Lipoiden bestehen muss, bei einer Fettbestimmung nach der üblichen Methode (Vorbehandlung mit 10-proz. Salzsäure) nur 68% als Lipoide erfasst werden konnten. — Eine zweite Fehlermöglichkeit bei dieser Methode besteht darin, dass beim Kochen mit Salzsäure auch Verbindungen, die selbst keine Lipoide darstellen, zu ätherlöslichen Spaltstücken hydrolysiert werden können.

¹⁾ Official and tentative Methods of Analyses of the Association of Official Agricultural Chemists, Washington 1925; *G. Wiegner* und *H. Pallmann*, Anleitung zum agr.-chem. Praktikum, 2. Aufl., Berlin 1938; Methode der Eidg. Landw. Versuchsanstalt Zürich-Oerlikon.

²⁾ *J. C. Berntrop*, Z. angew. Ch. 15, 121 (1902); Methoden van onderzoek aan het Rijkslandbouwproefstation voor veevoeronderzoek te Wageningen 1920; Methode der Eidg. Agrikulturchem. Anstalt Liebefeld-Bern.

³⁾ *K. Dirr* und *O. v. Soden*, Bioch. Z. 312, 263 (1942).

⁴⁾ *H. Fink* und *F. Just*, Bioch. Z. 300, 84 (1939); *F. Just*, Wschr. Brauerei 57, 227 (1940).

Unter den bekannten Methoden liefert die von *W. Koch* und *F. C. Koch*¹⁾ (mehrere, abwechselnde Alkohol- und Ätherextraktionen, Eindampfen der gesamten Extrakte, mehrmaliges Auskochen des Trockenrückstandes mit Äther) die zuverlässigsten Werte, doch ist sie sehr umständlich und zeitraubend und wird deshalb unseres Wissens kaum angewendet.

Bei der Suche nach einer brauchbaren Methode zur Erfassung der gesamten Lipoide konnte in eigenen Versuchen die Beobachtung von *K. Dirl* und *O. v. Soden*²⁾ bestätigt werden, dass es beim Kochen der zu untersuchenden Substanz mit wässrigem Alkohol und anschliessendem Abdampfen des Lösungsmittels gelingt, die Lipoide-Eiweissbindung zu sprengen und die Lipoide einer Extraktion mit Äther zugänglich zu machen. Eine vollständige Extraktion kann auf zwei Wege erreicht werden; entweder man wiederholt den Aufschluss mit Alkohol so oft, bis nichts mehr mit Äther extrahierbar ist, oder aber man extrahiert den Rückstand der Ätherextraktion erschöpfend mit Alkohol und anschliessend den so erhaltenen Extrakt mit Äther. Die Summe der erhaltenen Ätherextrakte ergibt dann den richtigen Lipoidgehalt.

Während man nun bei der Verwendung von Äthylalkohol den Aufschluss mindestens viermal anwenden muss, um die vollständige Freilegung der Lipoide zu erreichen und eine quantitative Extraktion mit Äther zu ermöglichen, konnten wir beobachten, dass man bei der Anwendung von Methanol als Aufschlussmittel erheblich rascher ans Ziel gelangt. Bereits nach zweimaligem Aufschluss und anschliessender Ätherextraktion ist im allgemeinen der allergrösste Teil (98 bis 99 %) der Gesamtlipoide extrahiert, so dass der Rest vernachlässigt werden kann.

Während natives Eiweiss in einer ätherischen Lecithinlösung beträchtlich löslich ist, werden bei dem Aufschluss mit Methanol (wie mit Äthylalkohol) die Eiweisskörper so verändert, dass sie nicht mehr von der ätherischen Lecithinlösung aufgenommen werden. Durch den Aufschluss wird also auch diese Fehlerquelle ausgeschlossen.

Experimenteller Teil.

Als Versuchsmaterial wurde durchwegs Trockenhefe (*Torula utilis* aus der Cellulosefabrik Attisholz A.-G.) angewendet, da hier die Phosphatide einen beträchtlichen Anteil der Gesamtlipoide ausmachen und die Lipoproteide besonders schwer aufzuspalten sind.

1. Ätherextraktion ohne Vorbehandlung.

5,000 g feinst gepulverte Hefe werden bei 95° zur Gewichtskonstanz getrocknet (4,721 g) und mit absolutem Äther im *Soxhlet*-Apparat extrahiert. Der Äther wird nach 6 Stunden, 24 Stunden, 2, 8, 15 und 28 Tagen gewechselt, die Extrakte abgedampft, im Vakuum bei Zimmertemperatur getrocknet und gewogen.

¹⁾ *W. Koch*, Am. Soc. **31**, 1329 (1909); *C. E. Sando*, Plant Physiol. **3**, 155 (1928).

²⁾ *K. Dirl* und *O. v. Soden*, Bioch. Z. **312**, 263 (1942).

1.— 6. Stunde	0,1052 g	(2,23% der Trockensubstanz)
7.—24. „	0,0020 g	(0,04% „ „ „)
2. Tag	0,0052 g	(0,11% „ „ „)
3.— 8. „	0,0241 g	(0,51% „ „ „)
9.—15. „	0,0188 g	(0,40% „ „ „)
16.—28. „	0,0222 g	(0,47% „ „ „)
Insgesamt	0,1775 g	(3,76% der Trockensubstanz)

2. Ätherextraktion nach Vorbehandlung mit 10-proz. Salzsäure.

5,000 g Hefe (4,721 g Trockensubstanz) werden mit 10-proz. Salzsäure eine Stunde lang zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen wird abgesaugt, der Rückstand eine Stunde lang bei 95° getrocknet und anschliessend im *Soxhlet*-Apparat mit absolutem Äther extrahiert. Nach 8 Stunden ist die Extraktion beendet. Der Extrakt wog nach dem Abdampfen und Trocknen im Vakuum 0,2888 g (6,12% der Trockensubstanz).

3. Ätherextraktion nach der modifizierten Methode von W. Koch.

Die von F. C. Koch verbesserte Vorschrift von W. Koch¹⁾ wurde in allen Einzelheiten befolgt. Eine eingehende Beschreibung erübrigt sich daher. An ätherischen Extrakten wurden aus 5,000 g Hefe (4,721 g Trockensubstanz) 0,3499 g erhalten, das sind 7,41% der Trockensubstanz.

4. Ätherextraktion nach Vorbehandlung mit Methanol.

Methode zur Bestimmung der Gesamtlipide.

1,000 g Hefe (0,944 g Trockensubstanz) werden mit 20 cm³ 95-proz. Methanol eine Stunde am Rückfluss gekocht, nach dem Abdampfen des Methanols eine Stunde lang bei 95° getrocknet und in eine Extraktionshülse überführt. Die geringen an der Wand des Kolbens hängenden Anteile spült man noch mit absolutem Äther in die Hülse, welche sich bereits im *Soxhlet*-Apparat befindet. Nach 12-stündiger Extraktion mit absolutem Äther wird der Extraktionsrückstand einem zweiten Aufschluss mit Methanol unterworfen und dann erneut 12 Stunden mit absolutem Äther extrahiert. Die beiden Ätherextrakte werden vereinigt, abgedampft, und der Rückstand nach dem Trocknen im Vakuum gewogen: 0,0740; 0,0736 g (7,84; 7,80% der Trockensubstanz). Es sind dann 98–99% der gesamten Lipide extrahiert.

Nach einem dritten Aufschluss können nur noch 0,0010 g (0,11% der Trockensubstanz) extrahiert werden, nach einem vierten 0,0003 g (0,03% der Trockensubstanz).

— Nach einstündigem Kochen des letzten Extraktionsrückstandes mit 10-proz. Salzsäure sind aus dem Rückstand nach dem Trocknen noch 0,0022 g (0,23% der Trockensubstanz) extrahierbar. Es ist fraglich, ob es sich hierbei um native Lipoide handelt.

5. Bestimmung des Stickstoff- und Phosphorgehaltes in den Gesamtlipoiden.

Um nachzuprüfen, ob der nach dem in Abschnitt 4 beschriebenen Verfahren gewonnene Ätherextrakt Eiweisskörper enthält, werden in einer Probe, nach dem Trocknen im Vakuum zur Konstanz, Stickstoff (nach *Kjeldahl*) und Phosphor bestimmt:

0,4321 g Subst. verbrauchten 4,50 cm³ 0,1-n. HCl
0,3719 g Subst. gaben 0,0399 g Mg₂P₂O₇.
Gef. N 1,46 P 2,99%

¹⁾ W. Koch, Am. Soc. 31, 1329 (1909); C. E. Sando, Plant Physiol. 3, 155 (1928); vgl. A. Winterstein, Handbuch der Pflanzenanalyse, II. Bd., 1. Teil, Wien 1932, S. 583.

Das Atomverhältnis N:P ergibt sich zu 1,08. Der Ätherextrakt enthält also ausser den Phosphatiden (N:P = 1,0) keine ins Gewicht fallenden Anteile anderer stickstoffhaltiger Verbindungen.

6. Zusammenstellung der Ergebnisse.

Die in den Abschnitten 1—4 beschriebenen Versuche wurden an 4 weiteren Hefepräparaten durchgeführt. Die Ergebnisse sind in der folgenden Übersicht zusammengestellt.

Hefe Präp. Nr.	Ätherlöslicher Anteil in % der Trockensubstanz			
	ohne Vorbehandlung	nach Vorbehandlung mit 10-proz. HCl	nach der Methode von Koch-Koch	nach Vorbehandlung mit Methanol: <i>Gesamtlipide</i>
1	3,76*)	6,12	7,41	7,84; 7,80
2	2,89**)	6,09	7,45	7,81; 7,80; 7,84
3	2,63**)	5,98	7,35	7,75; 7,77
4	2,21**)	5,90	7,50; 7,36	7,59; 7,65
5	2,90**)	6,23	7,63	7,97; 8,01; 7,93

*) Extraktionsdauer 28 Tage. **) Extraktionsdauer 3 Tage.

Versuchslaboratorium der Cellulosefabrik Attisholz A.-G.,
vorm. Dr. B. Sieber.

110. Über Gallensäuren und verwandte Stoffe.

30. Mitteilung¹⁾.

Vereinfachte Methode zur Bereitung von $3\alpha, 12\alpha$ -Dioxy-ätiocholansäure
von V. Wenner und T. Reichstein.

(10. V. 44.)

$3\alpha, 12\alpha$ -Dioxy-ätiocholansäure-methylester (IX) ist zuerst durch Abbau von Digoxigenin erhalten²⁾, konstitutionell aber erst später³⁾⁴⁾ als solcher erkannt worden. Durch Hydrierung von $3,12$ -Diketo-ätiocholansäure-methylester liess er sich als Nebenprodukt in sehr bescheidener Ausbeute auch künstlich gewinnen⁴⁾. Wir beschreiben im folgenden eine ergiebige Methode, die auf der Beobachtung⁵⁾⁶⁾ fußt, dass 12 -Ketosteroide bei der Hydrierung mit *Raney-Nickel* in alkalischer Lösung vorzugsweise 12α -Oxy-Derivate liefern.

¹⁾ 29. Mitteilung, A. Lardon, T. Reichstein, Helv. **27**, 713 (1944).

²⁾ M. Steiger, T. Reichstein, Helv. **21**, 828 (1938).

³⁾ H. L. Mason, W. M. Hoehn, Am. Soc. **60**, 2824 (1938).

⁴⁾ H. L. Mason, W. M. Hoehn, Am. Soc. **61**, 1614 (1939).

⁵⁾ B. Koehlin, T. Reichstein, Helv. **25**, 918 (1942).

⁶⁾ M. Sorkin, T. Reichstein, Helv. **26**, 2097 (1943).