

Das Vorkommen von Squalen  
in pflanzlichen und tierischen Fetten

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der  
Ludwig-Maximilians-Universität  
zu München  
  
vorgelegt  
im November 1937  
von  
Margarita Widmann  
aus München

---

Berichterstatter: Professor Dr. B. B l e y e r  
Tag der mündlichen Prüfung: 22.Dezember 1937

ISBN 978-3-662-31447-0      ISBN 978-3-662-31654-2 (eBook)  
DOI 10.1007/978-3-662-31654-2

# Vorkommen und Bestimmung von Squalen in pflanzlichen und tierischen Fetten.

Von

K. Täufel, H. Thaler und G. Widmann.

(Universitätsinstitut und Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie München und Institut für Lebensmittelchemie der Technischen Hochschule Karlsruhe.)

(Eingegangen am 16. Februar 1939.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Neben Sterinen, Karotinoiden und Vitaminen, die als Träger bestimmter physiologischer Wirkungen von größter Bedeutung sind, finden sich im unverseifbaren Anteil der natürlichen Fette noch andere Stoffe, die zum einen Teil als gelegentliche Begleitstoffe, bedingt durch die Art der Herstellung, hineingelangt, zum anderen Teil aber auch als ursprüngliche, regelmäßig wiederkehrende Bestandteile anzusehen sind. Bei letzteren kann es sich einmal um Verbindungen handeln, die Zwischenprodukte bei dem im Organismus stattfindenden Auf- und Abbau der Fettsäuren darstellen, zum andern aber auch um solche, bei denen man nicht ohne weiteres auf ihre Entstehung und ihre Rolle im Stoffwechselgeschehen schließen kann. Gelegentlich kann man beobachten, daß derartige Begleitstoffe, ebenso wie manche Fettsäuren, nur im Fett gewisser Gruppen von Lebewesen vorkommen und damit für dieselben charakteristisch sind. Es läßt dies dann auf das Vorliegen besonderer physiologischer Eigenheiten schließen, ohne daß indes die Zusammenhänge in ihren Ursachen oder in ihrem Ablauf zur Zeit schon zu überblicken wären. Zu diesen letzteren Stoffen gehört das *Squalen*, ein aus 6 Isoprenresten symmetrisch aufgebauter, sechsfach ungesättigter Kohlenwasserstoff von der Bruttoformel  $C_{30}H_{50}$ .

Von *M. Tsujimoto*<sup>1</sup> im Unverseifbaren von Haifisch-Leberölen entdeckt und kurz darauf von *A. Ch. Chapman*<sup>2</sup> auch in anderen Fischleberölen unter dem Namen „*Spinacen*“ nachgewiesen, wurde das Squalen von diesen Autoren und von *I. M. Heilbron*<sup>3</sup> näher beschrieben und schließlich von *P. Karrer*<sup>4</sup> u. Mitarb. synthetisiert; damit war auch die Konstitution bewiesen.

Über die physiologische Bedeutung dieser Verbindung liegen bis jetzt nur allgemeinere Vorstellungen vor. *I. A. Lovern*<sup>5</sup> will, gestützt

<sup>1</sup> J. of Ind. and Engin. Chem. 8, 889, 1916. — <sup>2</sup> J. chem. Soc. London 111, 56, 1917. — <sup>3</sup> Ebenda 1926, 1630; 1926, 3131; 1929, 883; 1930, 2546. —

<sup>4</sup> Helv. Chim. Acta 13, 1084, 1930; 14, 78, 1931. — <sup>5</sup> *I. A. Lovern*, Biochem. J. 24, 866, 1930.

auf einige Beobachtungen, einen genetischen Zusammenhang zwischen diesem Kohlenwasserstoff und den ungesättigten Fettsäuren erblicken. Dem steht jedoch die Tatsache entgegen, daß das Squalen 6 Methylgruppen als Seitenketten trägt, daß aber in der Fettechemie Fettsäuren mit verzweigter Kohlenstoffkette mit Ausnahme der Isovaleriansäure des Delphinkiefernöles<sup>1</sup> — vielleicht dem Protein (Valin) entstammend — und einiger Säuren des Tuberkelbazillen-Wachses<sup>2</sup> (Tuberkulostearinsäure, Phthionsäure) nach den bisherigen Erfahrungen eine Rolle nicht spielen.

*E. André* und *H. Canal*<sup>3</sup> nehmen an, daß Fettsäuren über die Zwischenstufen der ungesättigten Fettsäure, des Cholesterins und dessen stärker ungesättigte Derivate in umkehrbarer Reaktion in Squalen übergehen können und daß vor allem zwischen dem Gehalt an Cholesterin und an Squalen ein gewisses reziprokes Verhältnis besteht. Das Öl eines jungen Haifisches (*Cetorhinus maximus*) enthielt nämlich 58,5% Fettsäuren, 18% Squalen und 22,5% Cholesterin einschließlich stärker ungesättigter Derivate desselben; dasjenige eines erwachsenen Tieres dagegen bestand zu 47% aus Fettsäuren, 48% aus Squalen und nur 2% aus Cholesterin. Damit erscheint vorstehender Schluß gerechtfertigt: Mit fortschreitendem Alter könnten Cholesterin oder dessen Derivate in Squalen übergeführt werden bzw. letzteres bevorzugt oder ersteres verlangsamt gebildet werden. Der mögliche Zusammenhang von Cholesterin bzw. Sterinen einerseits und Squalen andererseits — was auch *P. Karrer* und *A. Helfenstein* in den Bereich des Möglichen rücken — müßte allerdings erst experimentell sichergestellt werden, ehe man sich zu den erwähnten Vermutungen positiv einstellen kann.

Die vorstehend erörterten Fragen waren von untergeordneter Bedeutung, solange man das Squalen nur als einen Bestandteil einiger weniger Fischleberöle kannte. Es zeigte sich aber, daß dieser Kohlenwasserstoff anscheinend häufiger vorkommt als man zunächst annahm. *D. Holde* und *A. Gorgas*<sup>4</sup> fanden 3% Squalen im Baumwollsaatöl und 0,5% im Leinöl, *W. M. Cox, jr.* und *E. E. Reid*<sup>5</sup> berichten über einen Gehalt des Öles von *Ruvettus pretiosus* an Squalen und *A. Dimter*<sup>6</sup>

<sup>1</sup> *A. Klein* u. *M. Stigol*, Pharmaz. Zentralhalle 71, 497, 1930; *A. H. Gill* u. *C. M. Tucker*, Oil Fat Ind. 7, 101, 1930; *G. Weiss*, diese Zeitschr. 243, 269, 1931; *I. A. Lovern*, Biochem. J. 28, 394, 1934. — <sup>2</sup> *R. J. Anderson* u. *E. Chargaff*, Zeitschr. f. physiol. Chem. 191, 166, 1930; dieselben, J. of biol. Chem. 85, 77, 1929; *L. M. Burt* u. *R. J. Anderson*, ebenda 97, 617, 1934; *R. J. Anderson* u. *Nao Uyei*, ebenda 94, 451, 1931; *E. Chargaff*, Zeitschr. f. physiol. Chem. 217, 115, 1933. — <sup>3</sup> Bul. Soc. Chim. France 45, 498, 1929. — <sup>4</sup> Chem. Umschau Fette, Öle, Wachse, Harze 32, 314, 1925. — <sup>5</sup> J. Amer. chem. Soc. 54, 220, 1932. — <sup>6</sup> Zeitschr. f. physiol. Chem. 208, 55, 1932.

stellte Squalen im Fett von Dermoidcysten fest. *T. Thorbjarnarsson* und *I. C. Drummond*<sup>1</sup> wiesen diesen Kohlenwasserstoff im Olivenöl und im Weizenkeimlingsöl nach. Endlich stellten *K. Täufel*, *H. Thaler* und *H. Schreyegg*<sup>2</sup> im Hefefett größere Mengen fest. Damit erhebt sich die Frage, ob das Squalen — wenn auch vielleicht nur in kleinen Mengen — allgemein verbreitet oder ob es nur als gelegentlicher Bestandteil in einzelnen Fetten enthalten ist. Ein Vorkommen von Squalen in vielen bzw. allen oder wenigstens in physiologisch gleichartigen Fetten würde ohne Zweifel auf eine allgemeinere biologische Bedeutung schließen lassen. Dabei könnte die Art der Verbreitung vielleicht sogar einen gewissen Hinweis auf eben diese biologische Rolle — ob lebenswichtiges oder nebensächliches bzw. wertloses Stoffwechselprodukt — geben. Die Beantwortung der Frage der Verbreitung des Squalens bedeutet demnach eine Vorarbeit für weitere biologische Untersuchungen auf diesem Gebiet.

Zur Lösung dieser Aufgabe ist eine Bestimmungsmethode ausreichender Empfindlichkeit für Squalen erforderlich. Da eine solche im Schrifttum nicht angegeben ist, wurde versucht, ein geeignetes Verfahren auszuarbeiten.

## A. Versuche zur quantitativen Bestimmung des Squalens.

### 1. Jodzahl.

Die Jodzahl des Unverseifbaren der üblichen Fette ist in der Hauptsache von Art und Menge der darin enthaltenen Sterine bestimmt, von denen diejenige des Ergosterins (berechnet 192,3) die höchste ist. Die Ermittlung der Jodzahl ist aber, wie aus dem Schrifttum bekannt ist, bei Sterinen mit ziemlichen Schwierigkeiten verknüpft, da hierbei, im Gegensatz zu den ungesättigten Fettsäuren, nicht nur eine Addition des Halogens an die Doppelbindungen erfolgt, sondern unter den üblichen Versuchsbedingungen auch die Substitution in wechselndem Ausmaß voranschreitet. Letztere muß durch quantitative Ermittlung des gebildeten Halogenwasserstoffes berücksichtigt werden.

Zu den unverseifbaren Bestandteilen der Fette gehören, wie schon erwähnt, noch andere Stoffe, die die Jodzahl erhöhen oder erniedrigen können, z. B. gesättigte und schwach ungesättigte Kohlenwasserstoffe, gesättigte und ungesättigte Alkohole usw. Wenn deren Einfluß gering ist, dann könnte man bei einem besonders hohen Wert der Jodzahl im Unverseifbaren auf die Anwesenheit von Squalen — Jodzahl = 371,1 — schließen.

Es handelt sich daher zuerst um die Feststellung, ob die Jodzahlen von Ergosterin (bzw. Cholesterin) und Squalen unter den Bedingungen

<sup>1</sup> *Analyst.* 60, 23, 1936. — <sup>2</sup> *Fettchem. Umschau* 43, 26, 1936.

des Verfahrens nach *J. Hanus* zuverlässig und ausreichend reproduzierbar sind.

a) *Die Jodzahl des Squalens*. Die Einwaage, die — entsprechend der Vorschrift — einen ausreichenden Halogenüberschuß sicherstellt, beträgt für Squalen 0,0684 g. Um alle Wägefehler tunlichst auszuschalten, wurden 0,3830 g Squalen in 50 ccm Chloroform gelöst und zu den Versuchen genau abgemessene Teile dieser Stammlösung verwendet. Es stellte sich dabei heraus, daß auch ein sehr großer Überschuß an Jodmonobromidlösung praktisch keinen Einfluß auf die jeweils gefundene Jodzahl ausübt, daß also Squalen unter den gegebenen Bedingungen nur wenig substituiert wird. Ein zu geringer Überschuß an Reaktionslösung dagegen bewirkte eine sehr unvollständige Addition und damit ein rasches Absinken der Jodzahl.

b) *Die Jodzahl des Ergosterins*. Die theoretische Jodzahl des Ergosterins beträgt 192,3, die vorschriftsmäßige Einwaage ist auf 0,132 g zu bemessen. Diese Menge Ergosterin löst sich jedoch nur in einer verhältnismäßig sehr großen Chloroformmenge. Die Untersuchungssubstanz wurde deshalb zu den folgenden Bestimmungen in 50 ccm Tetrachlorkohlenstoff gelöst.

0,1255 g Ergosterin wurden gelöst in 50 ccm Tetrachlorkohlenstoff. Beim Titrieren wurden 29,45 ccm n/10 Jodlösung verbraucht, Jodzahl = 306,0.

0,0643 g Ergosterin, gelöst in 50 ccm Tetrachlorkohlenstoff, verbrauchten 20,13 ccm n/10 Jodlösung, Jodzahl = 397,3.

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß Ergosterin, wie auch *F. Reindel* und *E. Walter*<sup>1</sup> gezeigt haben, durch Jod stark substituiert wird. Bei einer Einwaage, die der theoretischen Einwaage von Squalen etwa entsprechen würde, erhält man bei Ergosterin eine höhere Jodzahl als bei Squalen selbst. Man kann also auf diese Weise Squalen neben Ergosterin nicht erkennen. Ähnlich verhalten sich auch andere Sterine.

*K. Lauer* und *R. Oda*<sup>2</sup> untersuchten den Einfluß des Lösungsmittels auf die Bromierung verschiedener Kohlenwasserstoffe. Sie stellten fest, daß in dipolfreien Lösungsmitteln zwar die Aktivierungswärmen, aber auch die Aktionskonstanten kleiner sind als in Lösungsmitteln mit Dipolen, daß also darin die Reaktion erheblich langsamer verläuft. Wenn diese Verzögerung für die Substitution größer wäre als für die Addition, so ließen sich vielleicht in einem dipolfreien Lösungsmittel brauchbare Jodzahlen von Ergosterin erhalten. Es wurden deshalb Versuche mit einer Lösung von Jodmonobromid und Tetrachlorkohlen-

<sup>1</sup> Liebigs Ann. 460, 212, 1928. — <sup>2</sup> Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 69, 141, 978, 1936.

stoff angestellt, obwohl nach *D. Holde*<sup>1</sup> die Substitution bei der Benutzung dieses Lösungsmittels stark von der Belichtung abhängt.

Vorversuche mit reiner Ölsäure und mit Mohnöl ergaben, daß zur Erzielung richtiger Jodzählwerte ein mindestens 5- bis 6facher Überschuß an Halogen und eine Reaktionsdauer von 2 Stunden nötig sind; es zeigte sich ferner, daß die Werte bei Verwendung von Tetrachlorkohlenstoff als dipolfreiem Lösungsmittel so außerordentlich stark von der Einwaage abhängen, daß die Methode unbrauchbar wird.

Hier sei kurz erwähnt, daß in unterrichtenden Vorversuchen auch das Verfahren der sogenannten Brombindungszahl nach *K. Meinel*<sup>2</sup> für den beabsichtigten analytischen Zweck herangezogen wurde, ohne daß bisher brauchbare Ergebnisse erzielt worden sind.

## 2. Destillation.

Von *M. Tsujimoto*<sup>3</sup> wird folgendes Verfahren zur quantitativen Ermittlung von Squalen auf dem Wege der fraktionierten Destillation angegeben: „Das betreffende Öl wird im Vakuum bei 10 mm Quecksilber im Kohlendioxidstrom bei 310° destilliert. Dabei geht der Kohlenwasserstoff über. Man bestimmt die Säurezahl des Destillates, rechnet diese auf Ölsäure um und zieht diese vom Gewicht des Destillates ab.“

Es wurde zunächst versucht, reines Squalen unter diesen Bedingungen zu destillieren. Dabei ergab sich, daß bei Mengen von 0,5 bis 1 g Squalen ein Drittel bis zur Hälfte der Einwaage verharzten und sich damit dem Nachweis entzogen. Dies trat auch dann noch ein, wenn die Destillation bei 4 mm Druck Quecksilber und einer Siedetemperatur von etwa 210° vorgenommen wurde.

Bei der Destillation einer Mischung von 1 Teil Squalen mit 10 Teilen Ergosterin, die im günstigsten Falle der Zusammensetzung des Unverseifbaren entsprechen könnte, trat ebenfalls Verharzung ein. Zudem konnte im Destillat mit Schwefelsäure und Essigsäureanhydrid nach *A. Salkowski*<sup>4</sup> Sterin, d. h. Ergosterin, nachgewiesen werden.

Es war zu prüfen, ob vielleicht unter den bei der Untersuchung des Haifischleberöles gegebenen Bedingungen — also bei einem Gehalt von etwa 50% Glyceriden — die Verharzung des Squalens so langsam erfolgt, daß eine näherungsweise quantitative Destillation möglich ist. Bei einem Gehalt von 0,5 bis 5% an Unverseifbarem, d. h. günstigenfalls von 0,2 bis 1% Squalen, versprach eine direkte Destillation des

---

<sup>1</sup> *D. Holde* u. *W. Bleyberg*, Kohlenwasserstofföle und Fette, S. 766ff, *J. Springer*, Berlin 1933; vgl. auch *H. I. Hofmann*, *Angew. Chem.* **52**, 99, 1939. — <sup>2</sup> *Liebigs Ann.* **510**, 129, 1934; **516**, 231, 1935; *Fette und Seifen* **43**, 250, 1936; **44**, 9, 1937. — <sup>3</sup> *J. Ind. and Engin. Chem.* **12**, 63, 1920. — <sup>4</sup> *Zeitschr. f. anal. Chem.* **11**, 44, 1872; **26**, 568, 1887; *Zeitschr. f. physiol. Chem.* **47**, 335, 1906.

Öles (ohne vorherige Anreicherung des Squalens) keinen Erfolg. Es wurde deshalb das Squalen in etwa der gleichen Menge eines Trägeröles (Weizenkeimlingsöl mit einem Gehalt an Unverseifbarem von 5,66%) gelöst. Bei der Destillation im Vakuum gingen kleine Mengen von Säure über, die, titriert und als Ölsäure berechnet, vom Gewicht des Destillats abgezogen wurden. Die Menge dieser Säuren war in allen Versuchen die gleiche und entsprach derjenigen, die bei der Destillation desselben Öles ohne Zusatz von Squalen erhalten worden war. In einem Fall wurde dem Öl das oben erwähnte Gemisch von Squalen und Ergosterin zugesetzt. Es ließen sich im Destillat mittels der Sterinreaktion Spuren von Ergosterin nachweisen. Alle Destillationen wurden bei 4 mm Druck Quecksilber und 210 bis 215° ausgeführt (vgl. Tabelle I).

Tabelle I. Die Ermittlung kleiner Mengen von Squalen durch Destillation unter Verwendung eines Trägeröles.

Nr.	Einwaage	Destillat g	Ölsäure	Squalen	Ausbeute an Squalen %
			im Destillat		
			g	g	
1	1 g Öl .....	0,0167	0,0165	—	—
2	0,9192 g Squalen + 1 g Öl	0,7614	0,0163	0,7451	81
3	0,7827 g „ + 1 g „	0,6111	0,0164	0,5947	76
4	0,5525 g „ + 1 g „	0,3700	0,0165	0,3535	64
5	0,1125 g „ + 1 g „ + 1 g Ergosterin .....	0,0678	0,0164	0,0514	46,5

Nach der Tabelle I sind die Ausbeuten durchwegs besser als bei der Destillation von Squalen allein, wobei maximal nur 64,5% der Einwaage wiedergefunden wurden. Die übergelassenen Anteile sind aber für eine quantitative Bestimmung zu klein und vor allem zu stark abhängig von dem Mengenverhältnis des Squalens zum Trägeröl. Das Verfahren ist also zum Nachweis geringer Mengen Squalen neben anderen Bestandteilen des Unverseifbaren ungeeignet.

### 3. Chromatographische Adsorptionsanalyse.

Die chromatographische Adsorptionsanalyse ist für solche Fälle als Trennungsmethode besonders angezeigt, bei denen Stoffe von verschiedener chemischer Konstitution sich durch Kristallisation oder Destillation nicht trennen lassen; das Verfahren ermöglicht die Erfassung auch sehr kleiner Substanzmengen neben großen Mengen anderer Stoffe. Solche Voraussetzungen sind bei der Aufgabe der Bestimmung von Squalen in dem unverseifbaren Bestandteil der Fette gegeben.

*T. Thorbjarnarson* und *I. C. Drummond*<sup>1</sup> wandten das Verfahren zum ersten Male auf dieses Gebiet an. Sie zerlegten das Unverseifbare des

<sup>1</sup> Analyst. 60, 23, 1935.

Olivenöls zunächst mit Methylalkohol in vier verschieden schwer lösliche Fraktionen. Der am leichtesten lösliche Anteil wurde in einer geringen Menge einer Mischung aus 90 % Petroläther (Siedepunkt 40 bis 60°) und 10 % Benzol aufgenommen und durch Aluminiumoxyd filtriert; es wurde mit dem Lösungsmittelgemisch ausgewaschen, bis das Adsorbat der untersten Zone das untere Ende der Adsorptionsröhre erreicht hatte. Sie erhielten auf diese Weise vier Zonen, die sie mit einer Mischung aus 75 % Petroläther und 25 % Methanol eluierten. Zur Charakterisierung wurden die Jodzahlen der einzelnen Zonen bestimmt.

Das Filtrat hinterließ nach dem Abdampfen des Lösungsmittels ein farbloses, geruchloses, bewegliches Öl, nämlich *Squalen*, vermischt mit wenig sauerstoffhaltigen Verunreinigungen und mit etwas gesättigtem Kohlenwasserstoff.

Mit dem gleichen Ergebnis untersuchten die beiden Forscher nach dieser Methode auch das Unverseifbare von Weizenkeimlingsöl. Später wandten *J. C. Drummond*, *A. Santos Ruiz* und *T. Thorbjarnarson*<sup>1</sup> das Verfahren auf die Untersuchung des unverseifbaren Rückstandes verschiedener Fischöle an.

Nach den angestellten Versuchen gehen bei Verwendung von Aluminiumoxyd als Adsorbens und Petroläther als Lösungsmittel gesättigte Kohlenwasserstoffe, schwach ungesättigte Kohlenwasserstoffe und ein Teil der Kohlenwasserstoffe von der Art des Squalens schnell ins Filtrat. Ungesättigte Alkohole suchen die untersten Schichten der Säule auf. Sterine finden sich meist in einem gut ausgeprägten Ring in  $\frac{1}{3}$  der Säulenlänge, von der Spitze ab gemessen. Mit den Sterinen zusammen oder in ihrer Nähe werden die Lipochrome vom Xanthophylltypus adsorbiert; gesättigte Alkohole sammeln sich am oberen Ende der Röhre an. Das Verhalten der einzelnen Bestandteile hängt jedoch stark von der chemischen Art der gleichzeitig anwesenden Substanzen ab.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zunächst mit dem Unverseifbaren des Hefefettes, das mit Methylalkohol von der Hauptmenge der Sterine befreit worden war, einige Versuche zur Ermittlung der günstigsten Arbeitsbedingungen durchgeführt.

Ein Adsorptionsrohr nach *G. Hesse*<sup>2</sup> von 25 cm Länge und 1,3 cm lichter Weite wurde etwa 20 cm hoch mit dem Adsorbens gefüllt und mit dem Lösungsmittel durchtränkt. Dann wurden 5 g des Unverseifbaren in 10 ccm Lösungsmittel aufgenommen, durch einen Tropftrichter zugegeben, unter dem Druck eines Kohlendioxyd-Kippapparats durch die Säule filtriert und diese dreimal mit je 10 ccm Lösungsmittel nachgewaschen. Die Filtrate wurden getrennt in einer mit Kohlendioxyd gefüllten und nach außen durch ein Bunsenventil abgeschlossenen Saugflasche aufgefangen. Nach dem Verjagen des Lösungsmittels wurde der Rückstand nach *A. Salkowski* auf Ergosterin und — gelöst in Äther — durch Einleiten von Chlorwasserstoff auf Squalen geprüft.

Die Möglichkeiten zur Abwandlung dieses Verfahrens liegen in der Anwendung verschiedener Arten und Mengen von Lösungsmitteln, Waschflüssigkeiten und Adsorbentien.

<sup>1</sup> An. Soc. Espan. Fisica Quim. 33, 680, 1935. — <sup>2</sup> Angew. Chem. 49, 315, 1936.

a) *Lösungsmittel.* Die Ergebnisse der Versuche mit den Lösungsmitteln Benzol, Hexan und Äther — alle über Natrium destilliert — sind in der Tabelle II zusammengefaßt.

Tabelle II. Die Trennung von Squalen und Ergosterin durch chromatographische Adsorption bei Anwendung verschiedener Lösungsmittel.

Art des Lösungsmittels	Rückstand des Filtrats g	Farbe des Filtrats	Prüfung auf	
			Squalen	Sterin
Benzol .....	0,9229	gelb	+	—
	1,2078	hellbraun	+	—
	1,0012	dunkelbraun	+	schwach +
Hexan .....	0,8997	hellgelb	+	—
	1,2205	dunkelgelb	+	—
	1,1630	dunkelbraun	+	schwach +
Äther .....	1,2913	gelb	+	—
	1,3892	hellbraun	+	schwach +
	1,2454	dunkelbraun	+	+
Äther + Benzol 1:1	1,0157	hellgelb	+	—
	1,3013	hellbraun	+	zweifelhaft
	1,1922	dunkelbraun	+	+

Aus Tabelle II läßt sich entnehmen, daß Hexan und Benzol etwa gleichwertig sind. Aus Äther werden die Sterine weniger gut adsorbiert. Er ist deshalb als Lösungsmittel zur chromatographischen Trennung von Ergosterin und Squalen ungeeignet.

Ein weiterer Versuch wurde durchgeführt mit 1 g Ergosterin und 1 g Squalen, gelöst in 5 ccm Hexan, in einer 8 ccm hohen Säule von Aluminiumoxyd unter dreimaligem Waschen mit je 5 ccm Hexan. Der Rückstand des Filtrats betrug 0,9756 g. Er war schwach gelb gefärbt und frei von Ergosterin.

Eine Trennung von Squalen und Sterinen ist also durch Adsorption des Sterins aus einer Lösung in Hexan oder Benzol an Aluminiumoxyd angenähert quantitativ durchführbar, wenn beide Substanzen rein vorliegen. Die sonstigen Begleitstoffe, die im Unverseifbaren enthalten sind, wirken sich insofern sehr nachteilig aus, als zwar das Sterin in der Säule und das Squalen im Filtrat angereichert werden, daß aber ein Teil des ersteren auch beim Kohlenwasserstoff zu finden ist. Eine quantitative Trennung dieser beiden Stoffe voneinander ist im Unverseifbaren nicht möglich.

b) *Adsorbens.* Es blieb noch die Möglichkeit offen, daß sich die eben beschriebenen Verhältnisse bei Verwendung eines anderen Adsorptionsmittels ändern würden. Es wurden deshalb an Stelle von Aluminiumoxyd Tierkohle (*Kahlbaum*) und Carbo medicinalis (*Merck*) auf ihre

Verwendungsmöglichkeit hin geprüft. Die Adsorptionssäulen waren im allgemeinen so dicht, daß man mit voller Kraft der Wasserstrahlpumpe saugen mußte. Die Filtrate waren viel schwächer gefärbt, enthielten aber noch fast das gesamte verwendete Ergosterin, während ein Teil des Squalens ziemlich lange in der Säule festgehalten wurde.

Eine Adsorptionssäule, die in der oberen Hälfte aus Kohle und in der unteren aus Aluminiumoxyd bestand, erwies sich als ungeeignet. Das Lösungsmittel floß durch die Aluminiumoxydsäule viel schneller als durch die Kohlenstoffsäule, so daß bei dem starken Unterdruck, der zur Filtration durch Kohle nötig war, das Aluminiumoxyd trocken- gesaugt wurde.

Weiterhin wurde eine Bleicherde, nämlich Standard-Clarit der chem. Fabrik Heufeld-Obbay., untersucht. Es zeigte sich, daß, ebenso wie bei der Kohle, zwar die gelben Farbstoffe verhältnismäßig gut, die Sterine dagegen fast gar nicht adsorbiert wurden. Da aber die Korngröße des Clarits derjenigen des Aluminiumoxyds ziemlich ähnlich ist, versprach die Adsorption an einer Säule aus beiden Adsorbentien Erfolg.

Es wurde ein Adsorptionsrohr nach *G. Hesse*<sup>1</sup> von 1,3 cm lichter Weite und 35 cm Länge 18 cm hoch mit Aluminiumoxyd und darüber 9 cm hoch mit Clarit gefüllt und unter schwachem Saugen mit 20 ccm Benzol getränkt.

5 g des von der Hauptmenge der Sterine befreiten Unverseifbaren des Hefefettes wurden in 20 ccm Benzol gelöst, durch die Säule filtriert und diese zweimal mit je 5 ccm Benzol nachgewaschen. Nach Zugabe von weiteren 5 ccm Benzol war der unterste braune Ring am unteren Ende der Säule angelangt. Nun wurde die Vorlage gewechselt und die Röhre mit weiteren 15 ccm Benzol nachgewaschen. Nach nochmaligem Wechseln der Vorlage wurden weitere 25 ccm Benzol aufgegossen und

1. Filtrat .....	1,5611 g,	hellgelbes Öl, hauptsächlich Squalen.
2. Filtrat .....	1,5114 g,	tiefbraunes Öl, viel Squalen, Sterin fraglich.
3. Filtrat .....	0,2162 g,	tiefbraunes Wachs, Sterine und etwas Squalen.
1. Säulenabschnitt ....	0,2216 g,	braune zähe, salbenartige Masse, Sterine, Squalen zweifelhaft.
2. Säulenabschnitt ....	0,2567 g,	dunkelbraune, salbenartige Masse.
3. Säulenabschnitt ....	0,2924 g,	gelb, fest, Sterine.
4. Säulenabschnitt ....	0,4190 g,	gelb, fest.
Claritsäule .....	0,5015 g,	gelbe, salbenartige Masse.
	<u>4,9799 g.</u>	

<sup>1</sup> Angew. Chem. 49, 315, 1936.

die Säule trocken gesaugt. Das Aluminiumoxyd wurde nun von unten nach oben in 3 Teile von je 4 cm und einen vierten von 6 cm Länge geteilt. Die ersten drei Abschnitte wurden zweimal mit je 100 ccm Methanol eluiert. Der vierte Abschnitt wurde zweimal mit 100 ccm und einmal mit 50 ccm Methanol eluiert und mit 50 ccm Äther nachgewaschen. Die Claritsäule wurde im ganzen mit Benzol-Methanol (1 : 1) extrahiert. Man erhielt auf diese Weise vorstehende Fraktionen.

Aus dem Versuch ergibt sich, daß auch auf diese Weise eine angenäherte quantitative Trennung des Squalens von den übrigen Bestandteilen des Unverseifbaren, in der Hauptsache von den Sterinen, nicht möglich ist. Doch findet sich bei genügendem Auswaschen das Squalen vollständig und stark angereichert im Filtrat wieder.

Durch quantitative Abtrennung von den anderen Bestandteilen des Unverseifbaren und Wägung ist Squalen also nicht zu bestimmen. Damit wird an eine Methode zur quantitativen Bestimmung von Squalen eine neue Anforderung gestellt. Sie darf durch die Gegenwart von Stoffen, die allgemein im Unverseifbaren vorkommen, nicht gestört werden.

#### 4. Hexahydrochlorid.

*M. Tsujimoto*<sup>1</sup>, *A. Ch. Chapman*<sup>2</sup> und *J. M. Heilbron*<sup>3</sup> erhielten durch Einleiten von trockenem Chlorwasserstoff in die Äther- oder Acetonlösung von Squalen kristallisierte Niederschläge von Squalenhexahydrochlorid (Schmelzp. 112 bis 125<sup>0</sup> unscharf). Diese Reaktion eignet sich sehr gut zur Charakterisierung von Squalen. Es wurde deshalb versucht, sie zu einer quantitativen Bestimmungsmethode auszubauen.

Aus Ätherlösung erhält man nach *J. M. Heilbron* schon bei sehr geringfügigen Änderungen der Versuchsbedingungen verschiedene Produkte. Die folgenden Versuche wurden deshalb in trockenem Aceton durchgeführt.

Die Substanz wurde in einem etwa 50 ccm fassenden birnenförmigen Schliffkolben eingewogen, mit der dreifachen Menge eines bei — 5<sup>0</sup> C mit Chlorwasserstoff gesättigten Acetons versetzt und in einer Kältemischung stark abgekühlt. Dann leitete man durch ein eingeschliffenes Gaseinleitungsrohr, das bis zum Boden des Kolbens reichte, 3 Stunden lang trockenes Chlorwasserstoffgas ein. Der Niederschlag von Squalenhexahydrochlorid wurde dreimal mit bei — 5<sup>0</sup> mit Chlorwasserstoff gesättigtem Aceton dekantiert, quantitativ auf ein Glasfilter gebracht und mit kaltem Äther ausgewaschen. Weiteres Einleiten von Chlorwasserstoff in die Mutterlauge lieferte im allgemeinen nur noch geringfügige Niederschläge. Die

<sup>1</sup> J. Ind. and Engin. Chem. 8, 889, 1916. — <sup>2</sup> J. Chem. Soc. London 111, 56, 1917. — <sup>3</sup> Ebenda 1926, 1630.

Versuche mit reinem Squalen ergaben die in der Tabelle III auswahlweise zusammengestellten Werte.

Nach Tabelle III erfaßt dieses Verfahren somit rund 80% des vorhandenen Squalens. Ergosterin und Cholesterin geben unter den gleichen Bedingungen stark braun gefärbte harzige Massen, aber keine kristallisierten Produkte.

Tabelle III Die Ermittlung von Squalen als Hexahydrochlorid.

Nr.	Einwaage g	Squalenhexahydrochlorid		Ausbeute %
		berechnet g	gefunden g	
1	1,0157	1,5572	1,2249	80,95
2	0,5214	0,8012	0,6572	82,02
3	0,3417	0,4443	0,3417	76,90

Im Unverseifbaren sind neben dem Squalen immer große Mengen anderer Substanzen vorhanden, die für Squalen gewissermaßen als ein Verdünnungsmittel wirken. Man würde also immer mit einem sehr viel größeren Überschuß an Lösungsmitteln arbeiten, als vorstehend zur Anwendung kam. Deshalb war es wichtig, die Erfassungsgrenze des Verfahrens festzustellen. Zu diesem Zweck wurden von einer Lösung von 0,1 g Squalen in 50 ccm Aceton aliquote kleine Mengen in den Schliffkolben abpipettiert; das Lösungsmittel wurde im Kohlendioxydstrom abgedampft und nach Zugabe von 3 g mit Chlorwasserstoff gesättigtem Aceton 3 Stunden in der Kälte mit trockenem Chlorwasserstoff behandelt. Es ergaben sich folgende Resultate:

0,002 g	Squalen	=	Rotfärbung,
0,004 g	„	=	Dunkelrotfärbung,
0,01 g	„	=	Schwarzfärbung,
0,02 g	„	=	Trübung,
0,03 g	„	=	Starke Trübung.

Beim letzten Versuch setzte sich der Niederschlag beim Zentrifugieren ab und konnte unter dem Mikroskop und durch seinen Mikroschmelzpunkt von 119° als Squalenhexahydrochlorid erkannt werden.

Nach dieser Methode ließ sich also noch eine Menge von 0,03 g Squalen in einem nicht mitreagierenden Verdünnungsmittel (Verdünnung 1 : 100) identifizieren. Bei der Untersuchung von Unverseifbarem, das im Fett zu etwa 0,5 bis 5% enthalten ist, entspräche dies einer Erfahrungsgrenze von 0,15 bis 0,015 g Squalen je 100 g ursprüngliches Fett. Eine deutliche Rotfärbung tritt noch bei Anwesenheit von 0,001 g Squalen im indifferenten Lösungsmittel auf. Diese Grenzen

werden sich natürlich etwas verschieben, wenn aus den Begleitstoffen Harze entstehen.

Die Reaktion mit Squalenhexahydrochlorid ist also sehr empfindlich. Sie kann durch vorangehende Anreicherung von Squalen noch empfindlicher gestaltet werden.

### 5. Squalendodekabromid.

Ein weiteres Halogenderivat des Squalens, das sich zu dessen Identifizierung eignet, ist das Dodekabromid.

Nach der Vorschrift von *J. M. Heilbron, W. M. Owens* und *J. A. Simpson*<sup>1</sup> versetzt man 20 g Squalen in 150 g absolutem Äther bei  $-25^{\circ}$  mit einer Lösung von 90 g Brom in 200 ccm absolutem Äther. Nach 30 Minuten scheiden sich farblose Kristalle ab, die bei  $160^{\circ}$  dunkel werden und bei  $185^{\circ}$  schmelzen. Durch Eindampfen der Mutterlauge unter vermindertem Druck und Verreiben der zähgelben Substanz mit Essigester erhält man eine zweite Kristallfraktion.

Die Ausbeuten bei dieser Methode betragen bei genauem Einhalten der Vorschrift wie bei der Herstellung des Hexahydrochlorids etwa 80 % der Theorie. Die Kristalle sind außerordentlich empfindlich gegen Feuchtigkeit, und das Arbeiten bei  $-25^{\circ}$  C macht die Methode ziemlich umständlich. Sie bedeutet also keinen Fortschritt gegenüber der Bestimmung des Squalens als Hexahydrochlorid und wurde deshalb nicht weiter verfolgt.

### 6. Ergebnis.

Nach den vorausgehenden Versuchen kommt als einfachste Methode zur Bestimmung von Squalen die Fällung als Hexahydrochlorid in stark abgekühltem Aceton in Frage. Bei negativem Ergebnis der direkten Fällung muß der Bestimmung eine chromatographische Anreicherung vorangehen. Entsteht auch dann kein Niederschlag, so ist mit großer Wahrscheinlichkeit anzunehmen, daß die untersuchte Substanz keine in Betracht kommenden Mengen von Squalen enthält.

Nach diesen Gesichtspunkten wurden die im folgenden beschriebenen Untersuchungen an verschiedenen Fetten durchgeführt.

Hier sei noch ergänzend bemerkt, daß weiterhin eingehende Versuche<sup>2</sup> durchgeführt worden sind, um eine quantitative Bestimmung des Squalens auf dem Wege über die Ozonisierung, auf dem Wege der Oxydation mit Hydroperoxyd in Eisessiglösung sowie unter Heranziehung einiger Farbreaktionen (Antimonpentachlorid, Zinntetrachlorid, Nitrosylchlorid, Amylnitrit, Tetranitromethan) zu verwirklichen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen waren bisher unbefriedigend und vermittelten keine ausnutzbaren Anhaltspunkte.

<sup>1</sup> J. Chem. Soc. London 1929, S. 873. — <sup>2</sup> Vgl. *M. Widmann*, Das Vorkommen von Squalen in pflanzlichen und tierischen Fetten. Dissertation München 1937, Universität.

## B. Untersuchung einiger pflanzlicher und tierischer Fette auf Squalen.

Die zur Untersuchung herangezogenen fetthaltigen Ausgangsmaterialien wurden — in zerkleinertem Zustand und zum Teil nach längerem Trocknen bei 60° — in der Kälte und unter möglichstem Luftabschluß mit peroxydfreiem Äther oder niedrig siedendem Petroläther erschöpfend extrahiert. Die erhaltenen Auszüge wurden mit geglühtem Natriumsulfat getrocknet und auf dem Wasserbad vom Lösungsmittel befreit. Der letzte Rest vom Lösungsmittel ließ sich durch zweistündiges Erhitzen bei 40° und einstündiges Erhitzen bei 100° im Vakuum der Wasserstrahlpumpe entfernen. Es wurden folgende Fette untersucht:

Tabelle IV. Auf Squalen geprüfte Fette.

Nr.	Art des Fettes	Lösungsmittel	Verseifungszahl des Fettes	Jodzahl des Fettes	Gehalt des Fettes an Unverseifbarem %
1	Schimmelpilzfett ..	Petroläther (techn.)	170,0	125,8	9,95, davon 8,72 Mineralöl
2	Mutterkornfett ....	Petroläther	194,2	77,5	1,34
3	Pinienkernfett ....	Äther	188,0	117,0	0,84
4	Haselnußfett .....	„	192,8	86,9	0,33
5	Kakaobutter .....	„	193,0	35,9	0,56
6	Mandarinenkernfett	„	195,4	107,0	0,62
7	Weizenkeimlingsfett	Alkohol-Benzol	187,4	116,7	5,66
8	Mehlwurmfett ....	Äther	194,2	77,5	3,76
9	Entenbauchfett ...	„	193,9	68,8	0,24

Bei der Wahl der Pflanzenfette wurde besonderer Wert darauf gelegt, daß Vertreter botanisch verschiedener Pflanzengruppen erfaßt wurden. Auf die Untersuchung von weiteren tierischen Fetten, die ursprünglich vorgesehen war, wurde nach den negativen Ergebnissen bei Pflanzenfetten verzichtet; dazu war um so mehr Veranlassung gegeben, als *H. S. Channon* und *S. F. Marrian*<sup>1</sup> bei der Untersuchung von Leberfetten zahlreicher Säugetiere Squalen nicht feststellen konnten.

Die quantitative Bestimmung des Unverseifbaren erfolgte nach der Vorschrift der „Einheitlichen Untersuchungsmethoden für die Fett- und Wachsindustrie“, herausgegeben von der Wissenschaftlichen Zentralstelle für Öl- und Fettforschung (Wizöf.), Berlin, 2. Aufl., Stuttgart 1930.

<sup>1</sup> Biochem. J. 20, 409, 1926.

### 1. Isolierung des Unverseifbaren.

Zur Isolierung der unverseifbaren Bestandteile wurden 100 g Fett mit 35 g Kaliumhydroxyd in 150 cem Methylalkohol 1 Stunde lang am Rückflußkühler verseift. Dann wurde die Hauptmenge des Methanols abdestilliert, der Rückstand mit etwa 1 Liter heißem Wasser aufgenommen und nach dem Erkalten vier- bis fünfmal mit je 1 Liter peroxydfreiem Äther ausgeschüttelt. Es erwies sich als ungünstig, so lange auszuschütteln, bis eine Probe der Ätherschicht keinen Abdampfrückstand mehr gab, weil dabei zuletzt nur noch Seifen in Lösung gingen. Die vereinigten Ätherlösungen wurden viermal mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und auf dem Wasserbad vom Äther befreit. Der Rückstand löste sich klar in warmem Hexan. Trotzdem enthielt er, wie das Chromatogramm zeigte, noch kleine Mengen von Seife. Diese konnten aber im vorliegenden Falle vernachlässigt werden; das Unverseifbare wurde ohne weitere Behandlung zur Prüfung auf Squalen verwendet.

### 2. Prüfung auf Squalen.

Zur Prüfung auf Squalen wurden etwa 2 g des Unverseifbaren mit 6 g bei  $-5^{\circ}$  mit Chlorwasserstoff gesättigtem Aceton übergossen. Hierauf wurde unter Kühlung in Kältemischung 3 Stunden lang trockener Chlorwasserstoff eingeleitet, wobei die Lösung sich über Braun oder Grün bis Schwarz färbte. Rotfärbung konnte in keinem Falle beobachtet werden. Man erhielt in allen Fällen kleine Mengen eines kristallisierten Niederschlages, der aber in allen gebräuchlichen Lösungsmitteln leicht löslich war und sich auch kristallographisch von Squalenhexahydrochlorid deutlich unterschied. Diese Verhältnisse änderten sich auch nicht nach einer chromatographischen Anreicherung der schwer adsorbierbaren Bestandteile des Unverseifbaren auf das Dreifache. Demnach enthält das in der vorbeschriebenen Weise hergestellte Unverseifbare der untersuchten Fette weniger als 1 $^{\circ}$ , wahrscheinlich aber gar kein Squalen.

Beim *Weizenkeimlingsfett* und beim *Mehlwurm fett* wurde die kristalline Fällung näher untersucht.

## C. Untersuchung der durch Chlorwasserstoff aus der Acetonlösung des Unverseifbaren erhaltenen kristallisierten Fällung.

### 1. *Mehlwurm fett*.

Zur Gewinnung des untersuchten Fettes wurden Mehlwürmer mit Äther getötet, etwa 2 Tage lang bei  $60^{\circ}$  getrocknet, zerkleinert, im *Soxhlet*-Apparat mit Äther extrahiert und der Äther durch Erhitzen im Vakuum auf dem Wasserbad entfernt. Dabei erhielt man ein dunkelbraunes Öl von eigentümlichem Geruch. Nach einigem Stehen schieden sich daraus weiße Drusen von Cholesterin ab. Das Fett hatte eine Verseifungszahl von 194,2, eine Jodzahl von 77,5 und enthielt 3,76% Unverseifbares.

6,1450 g des Unverseifbaren wurden in 5 ccm warmem Hexan gelöst und unter dem Druck eines Kohlendioxyd-Kippapparates durch eine 18 cm hohe, mit Hexan getränkte Säule von Aluminiumoxyd filtriert. Dabei schied sich die noch vorhandene Seife bereits über der Säule in Form eines lockeren, schwach bräunlichen Kuchens ab. Nach dem Nachwaschen mit 5 ccm Hexan wurde die Vorlage gewechselt. Das *Filtrat 1* hinterließ beim Abdampfen des Lösungsmittels 1,9043 g einer geruchlosen, braunen, hochviskosen Flüssigkeit.

Nach Auswaschen mit weiteren 10 ccm Hexan erhielt man ein *Filtrat 2*, aus dem beim Abdampfen 2,0895 g einer goldgelben, beweglichen Flüssigkeit mit einem geringen Gehalt an festen weißen Bestandteilen zurückblieben.

*Filtrat 3*, nach dem Auswaschen mit weiteren 10 ccm Hexan erhalten, gab beim Eindampfen 0,1740 g einer gelblichen, wachsartigen Masse.

Aus dem *Filtrat 4*, das sich nach Zugabe von weiteren 20 ccm Hexan und nach dem Trockensaugen der Säule in der Vorlage sammelte, erhielt man 0,0465 g eines festen, gelblichen Rückstandes.

Die Rückstände von Filtrat 3 und 4 wurden gemeinsam in azetoniger Lösung mit Chlorwasserstoff behandelt. Sie färbten sich schwarzgrün und ergaben nur sehr kleine Mengen eines weißen Niederschlags, leicht löslich in Äther und Aceton, der nicht näher untersucht wurde.

Aus dem Rückstand von Filtrat 1 entstand beim Einleiten von Chlorwasserstoff in die acetone Lösung ein weißer, paraffinähnlicher Niederschlag, der nur wenige kleine, dünne Nadeln enthielt. Kristallisierte Produkte konnten daraus nicht isoliert werden.

Der Rückstand von Filtrat 2 ergab, ebenfalls unter Schwarzfärbung, wenige, mit harzigen Stoffen verunreinigte, kleine, weiße Nadeln. Aus Hexan kristallisierte die Substanz schlecht in kleinen Körnchen aus. Durch wiederholtes Umkristallisieren aus heißem Aceton konnten die Verunreinigungen entfernt werden. Die Nadeln zeigten bei der Mikro-Schmelzpunktbestimmung nach *L. Kofler*<sup>1</sup> einen Schmelzpunkt von 52,0°. Der Stoff war bestimmt nicht rein, doch reichte die vorhandene Menge zu einer weiteren Reinigung und Prüfung nicht aus.

## 2. Weizenkeimlingsfett.

Zur Herstellung des untersuchten Fettes wurden Weizenkeimlinge gemahlen und kalt mit Alkohol-Benzol (1:1) ausgezogen. Nach dem Verdampfen des Lösungsmittels auf dem Wasserbad erhielt man ein dunkelbraunes Öl mit der Verseifungszahl 187,4, der Jodzahl 116,7 und einem Gehalt an Unverseifbarem von 5,66 %.

6,45 g dieses Unverseifbaren wurden in 10 ccm eines Gemisches aus gleichen Teilen Hexan und Benzol in der Wärme gelöst und unter Kohlendioxyd durch eine 18 cm hohe, hexangetränkte Säule von Aluminiumoxyd filtriert. Nach dem Auswaschen mit 5 ccm Hexan wurde das *Filtrat 1* abgetrennt, das beim Eindampfen 2,1250 g einer schwach rotbraunen, wachsartigen Masse hinterließ.

<sup>1</sup> Arch. d. Pharmaz. 270, 293, 1923.

Das *Filtrat 2*, erhalten nach dem Auswaschen mit 10 ccm Benzol, ergab 2,001 g einer dunkelbraunen, hochviskosen Flüssigkeit mit einigen weißen Flocken.

*Filtrat 3*, nach dem Auswaschen mit 20 ccm Hexan, ergab 0,1850 g eines festen, schwach bräunlichen Rückstandes.

Nach dem Auswaschen mit weiteren 20 ccm Hexan und dem Trockensaugen der Säule erhielt man beim Abdampfen 0,0105 g einer festen, schwach bräunlichen Substanz von stechendem Geruch. Dieses *Filtrat 4* gab beim Behandeln mit Chlorwasserstoff in acetoniger Lösung nur eine schwache Braunfärbung der Lösung und keinen Niederschlag.

Der Rückstand von *Filtrat 3* färbte sich beim Behandeln mit Chlorwasserstoff in Aceton tief schwarzbraun. Dabei entstanden kleine Mengen eines weißen Niederschlags, der neben viel harzigen Stoffen kleine, dünne Nadeln vom Schmelzpunkt 133,5° enthielt.

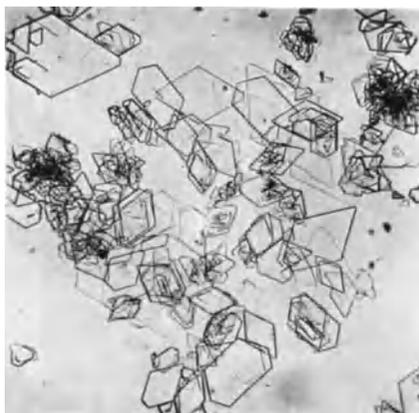


Abb. 1. Hexahydrochlorid des Squalens (Vergrößerung 150fach).

Aus *Filtrat 2* erhielt man durch Einleiten von Chlorwasserstoff in die Acetonlösung — ebenfalls unter Schwarzbraunfärbung — größere Mengen eines mit harzigen Stoffen verunreinigten kristallisierten Niederschlags. Dieser bestand aus kleinen, sechseckigen Blättchen und sehr kleinen, igelartigen Kristalldrüsen. Durch fraktionierte Kristallisation aus heißem Aceton konnten die leichter löslichen Blättchen rein erhalten werden. Sie zeigten bei der Mikro-Schmelzpunktsbestimmung nach *L. Kofler* einen scharfen Schmelzpunkt bei 131,5°. Bei flüchtiger mikroskopischer Untersuchung könnten sie vielleicht als Squalenhexahydrochlorid angesehen werden, doch zeigt eine Gegenüberstellung der beiden Substanzen, daß es sich wohl um verschiedene Kristallformen handelt (Abb. 1 und 2). Beide Substanzen unterscheiden sich auch stark in ihren Löslichkeitsverhältnissen. Infolge Materialmangels konnten weitere Identifizierungsversuche nicht durchgeführt werden; sie sind aber im Gange.

Aus dem Rückstand von *Filtrat 1* wurden durch Chlorwasserstoff in Aceton größere Mengen eines durch harzige Stoffe verunreinigten kristallinen

Niederschlags gefällt. Dieser bestand, wie die mikroskopische Untersuchung ergab, hauptsächlich aus igelartigen Kristalldrüsen, ganz wenigen Plättchen und wenig mittelgroßen, breiten Kristallnadeln. Durch fraktionierte Kristallisation aus heißem Aceton wurden daraus die Kristalldrüsen und lange, breite, seidenartige Nadeln isoliert. Die Nadeln schmolzen scharf bei 133,5°. Die Kristalldrüsen sublimierten bei 200° unter starker Braunfärbung des Rückstandes. Durch Mikrobestimmung nach *L. Kofler* konnte der Schmelzpunkt der stark dunkelbraun gefärbten Substanz zu 250° ermittelt werden. Weitere Prüfungen konnten, da das Untersuchungsmaterial nicht ausreichte, nicht ausgeführt werden.

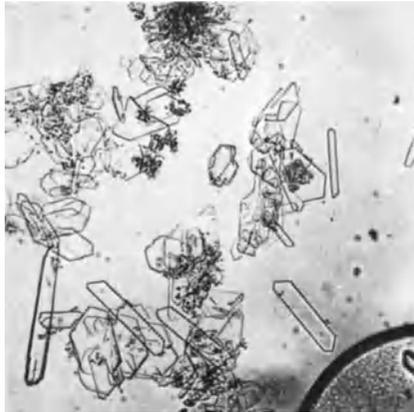


Abb. 2. Kristalle aus dem Unverseifbaren des Weizenkeimlingsöles (Vergrößerung 150fach).

### Ergebnisse.

Aus den Untersuchungen läßt sich folgern, daß Squalen im allgemeinen in Fetten nicht enthalten ist bzw. nur in sehr kleinen Mengen vorhanden sein kann. Sein Vorkommen beschränkt sich anscheinend auf das Fett einiger weniger Pflanzen- und Tierarten. Eigenartigerweise leben die beiden Organismen, bei denen Squalen bisher in größeren Mengen festgestellt worden ist, nämlich die Haifische<sup>1</sup> und die Hefe<sup>2</sup>, unter grundsätzlich verschiedenen Bedingungen und haben auch sonst keinerlei biologische Beziehungen zueinander.

Beim Haifisch, in dessen Leberöl es bis zu 90% enthalten sein kann, findet sich das Squalen nicht bei jedem Tier. *M. Tsujimoto* und *M. Tojama*<sup>3</sup> stellten fest, daß die Leberöle von Haifischen in ihrer Zusammensetzung sehr stark schwanken und daß Öle mit einer Dichte

<sup>1</sup> *M. Tsujimoto* u. *M. Majima*, J. Ind. and Engin. Chem. 8, 889, 1916; *A. Chapman*, J. Chem. Soc. London 111, 56, 1917. — <sup>2</sup> *K. Täufel*, *H. Thaler* u. *H. Schreyegg*, Fettchem. Umschau 43, 26, 1936. — <sup>3</sup> J. Ind. and Engin. Chem. 12, 63, 1920.

von über 0,9 meist kein Squalen enthalten. Diese Befunde werden durch *H. J. Channon*<sup>1</sup> bestätigt.

Im Unverseifbaren des Hefefetts wurden von früheren Untersuchern, zuletzt von *H. Wieland* und *W. N. Stanley*<sup>2</sup>, größere Mengen eines leicht beweglichen, hellgelben Öles aufgefunden, das *K. Täufel*, *H. Thaler* und *H. Schreyegg* als Squalen identifizierten. Es handelte sich hierbei um das Fett von Brauereihefe. Bei den von *K. Täufel* und Mitarbeitern untersuchten Produkten schwankte der Gehalt an Unverseifbarem zwischen 10 und 20% und derjenige an Squalen zwischen 5 und 15%. Daraus kann man schließen, daß sich das Squalen, ähnlich wie bei den Leberölen des Haifisches, auch in der Hefe in wechselnden Mengen findet, wobei die obwaltenden Bedingungen der Bildung vielleicht von ausschlaggebender Bedeutung sind. Es erscheint wünschenswert, durch Züchtungsversuche mit verschiedenen Heferasen unter verschiedenen Wachstumsgegebenheiten Aufschluß in dieser Richtung zu schaffen. Die Vermutung dürfte nicht abwegig sein, daß bei solchen Versuchen sich gleichzeitig Anhaltspunkte für die biologische Bedeutung dieses interessanten Stoffes werden gewinnen lassen.

Bei den sonst im Schrifttum vorhandenen Angaben über das Vorkommen von Squalen<sup>3</sup> handelt es sich immer um den Nachweis nur sehr kleiner Mengen. Eine Nachprüfung dieser Befunde erscheint auf Grund der neu vorliegenden Untersuchungsergebnisse zur Sicherstellung der Anschauungen als wünschenswert.

Da Squalen nach den Befunden dieser Arbeit nur bei wenigen Lebewesen und auch da nicht in allen Fällen vorzukommen scheint, hat die Annahme sehr wenig für sich, daß es eine regelmäßig auftretende Zwischenstufe bei der physiologisch so außerordentlich bedeutsamen Sterinsynthese ist. Will man aber irgendwelche theoretische Betrachtungen anstellen, von der Vermutung ausgehend, daß ein in der Natur gebildeter Stoff biologisch auch eine Bedeutung haben muß, so sind vielleicht folgende Überlegungen angebracht.

a) Squalen kann bei manchen Tieren früherer Erdzeitalter eine Rolle gespielt haben; es ist vielleicht im Laufe der Weiterentwicklung überflüssig geworden. Unter solcher Betrachtungsweise wäre es dann als Überrest einer vergangenen Lebensperiode anzusprechen. Dafür spricht das Auftreten in niederorganisierten Lebewesen. Auch der Gehalt von Erdölen an stark ungesättigten, aliphatischen Kohlen-

---

<sup>1</sup> *Biochem. J.* **22**, 51, 1928. — <sup>2</sup> *Liebigs Ann.* **489**, 31, 1931. — <sup>3</sup> *D. Holde* u. *A. Gorgas*, *Fettchem. Umschau* **32**, 314, 1925; *W. M. Cox jun.* u. *E. E. Reid*, *J. Amer. Chem. Soc.* **54**, 220, 1932; *A. Dimter*, *Zeitschr. f. physiol. Chem.* **208**, 55, 1932.

wasserstofften ist vielleicht in diesem Zusammenhang bemerkenswert<sup>1</sup>.

b) Squalen kann das Ergebnis eines pathologischen<sup>2</sup> Geschehens sein. Damit wäre verständlich, daß es bei Haifischen in sehr unterschiedlichen Beträgen auftritt bzw. überhaupt fehlt<sup>3</sup>. Diese Frage könnte durch Züchtungsversuche mit Hefe näher studiert werden. Dabei ließen sich vielleicht auch Anhaltspunkte dafür gewinnen, ob Squalen als Energiespeicher betrachtet werden könnte.

c) Rein äußerlich nach der chemischen Konstitution gesehen, könnte man einen Zusammenhang zwischen Squalen und Karotinoiden oder im besonderen Phytol vermuten; doch fehlen für diese Annahme zunächst die experimentellen Grundlagen.

---

<sup>1</sup> *H. Mastbaum*, Chem. Ztg. **39**, 889, 1915. — <sup>2</sup> *A. Dimter*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **208**, 55, 1932. — <sup>3</sup> *M. Tsujimoto* u. *M. Tojama*, J. Ind. and Engin. Chem. **8**, 889, 1916.

---

## Lebenslauf.

Am 28. Dezember 1910 wurde ich als Tochter des am 15. Mai 1929 verstorbenen Architekten Karl Maria Widmann und seiner Ehefrau Ida, geb. Zürchner, in Aarau (Schweiz) geboren. Dort besuchte ich vom Mai 1918 bis zu meiner Übersiedlung nach München Juni 1919 die Volksschule und trat dann im September 1919 in die Volksschule in München über. Ab Mai 1922 besuchte ich das Mädchenlyceum im Angerkloster in München. Im Mai 1928 trat ich von dort mit dem Zeugnis der mittleren Reife in die Mädchen-Oberrealschule St. Anna in München über. Meine Vorbildung schloss ich am 26. März 1931 mit einer erfolgreichen Reifeprüfung ab. Ab Wintersemester 1931/32 studierte ich an der hiesigen Universität Chemie. Am 16. Februar 1934 bestand ich das erste und am 4. Oktober 1935 das zweite Verbandsexamen. Anschließend begann ich mit der vorliegenden Promotionsarbeit. Das Nahrungsmittelchemische Vorexamen bestand ich am 21. Oktober 1935 und das Nahrungsmittelchemische Staatsexamen am 21. April 1937.