

Ueber die Methoden, die zur Abscheidung der Cholesterine aus den Fetten und zu ihrer quantitativen Bestimmung verwendbar sind.

Von
E. Ritter.

Aus dem agriculturchemischen Laboratorium des Polytechnikums in Zürich.
(Der Redaction zugegangen am 19. Dezember 1901.)

Einleitung.

Bekanntlich treten die Cholesterine im Thierkörper und im Pflanzenkörper in grosser Verbreitung auf. Ist auch ihre Quantität in der Regel nur eine geringe, so deutet doch ihr regelmässiges Erscheinen an den betreffenden Orten darauf hin, dass sie im Lebensprocess von Bedeutung sind, wenn freilich auch die Rolle, die sie hier spielen, noch nicht aufgeklärt ist. Es muss daher von Werth sein, gute Methoden zu ihrer Trennung von den andern Bestandtheilen des Thier- und Pflanzenkörpers und zu ihrer quantitativen Bestimmung zu besitzen.

In neuester Zeit hat man sich auch viel Mühe gegeben, die für diese Zwecke verwendbaren Methoden zu vervollkommen. Die dazu gemachten Vorschläge sind zum grossen Theil von Vertretern der Nahrungsmittelchemie ausgegangen. Es liegt auch auf der Hand, dass Bestimmungen des Cholesteringehaltes, sowie die Untersuchung der specifischen Eigenschaften des vorhandenen Cholesterins bei Untersuchung der Nahrungsmittel von Wichtigkeit sein können. So könnte zum Beispiel eine Cholesterinbestimmung zum Nachweis der Verfälschung irgend eines Fettes durch ein anderes dienen, falls das erstere einen ganz andern Cholesteringehalt besitzt, als das zur Verfälschung benutzte; ebenso kann eine Verfälschung eines

thierischen Fettes durch ein pflanzliches als nachgewiesen betrachtet werden, wenn man aus dem verfälschten Material ein Cholesterin abzuscheiden vermag, das nicht die Eigenschaften der thierischen Cholesterine besitzt und daher zu den Phytosterinen zu rechnen ist.¹⁾

Ich stellte mir die Aufgabe, die bemerkenswerthesten der in letzter Zeit zur Abscheidung der Cholesterine und zu ihrer quantitativen Bestimmung vorgeschlagenen Methoden in der Weise einer Prüfung zu unterwerfen, dass ich diese Methoden auf das gleiche Material anwendete und dann die dabei erhaltenen Resultate unter einander verglich. Als Material verwendete ich das an Cholesterin relativ reiche Fett, welches sich aus Weizenkeimen durch Extraction mit Aether gewinnen lässt. Das Cholesterin, um das es sich hier handelt, gehört also zu der Untergruppe, die man nach dem Vorgang von O. Hesse²⁾ als Phytosterine zu bezeichnen pflegt.

Daneben stellte ich mir noch eine zweite Aufgabe. In den letzten Jahrzehnten ist eine grosse Anzahl von Phytosterinen beschrieben worden, die sich nach den darüber gemachten Angaben hauptsächlich im Schmelzpunkt und im specifischen Drehungsvermögen unterscheiden und oft auch in dieser Hinsicht keine grossen Differenzen zeigen. Es kann nun für fraglich erklärt werden, ob diese aus verschiedenen Materialien dargestellten Phytosterine sämmtlich chemische Individuen waren und ob nicht vielleicht manche von denselben nur deshalb nicht genau die gleichen Eigenschaften zeigten, weil die untersuchten Präparate noch Verunreinigungen enthielten, was um so leichter möglich ist, als manche von ihnen nur in recht kleiner Quantität erhalten wurden. So ist es z. B. denkbar, dass manche von den untersuchten Phytosterinpräparaten Gemenge zweier verschiedener Phytosterine waren und nur deshalb verschiedene Eigenschaften zeigten, weil sie die Gemengtheile in ungleichen Quantitäten enthielten. Bei dieser Sach-

1) Vergleiche z. B. die Angaben von A. Bömer: *Ztschr. f. Untersuch. v. Nahrungs- u. Genussmitteln.* 1898. S. 21 u. 81.

2) *Ann. d. Chem.* 1878. S. 175—179.

lage muss es für wünschenswerth erklärt werden, die verschiedenen Phytosterine und ihre Derivate einer möglichst genauen Untersuchung zu unterwerfen und dabei auch die Frage, ob sie Gemenge sind oder nicht, zu berücksichtigen. Eine solche Untersuchung lässt sich freilich nicht ausführen, falls man von dem betreffenden Körper nicht eine genügende Quantität zur Verfügung hat. Die Weizenkeime sind ein Material, aus welchen man leicht eine sehr bedeutende Quantität von Phytosterin gewinnen kann. Ich habe mir daher eine grössere Menge dieses Phytosterins dargestellt und dasselbe einer nähern Untersuchung unterworfen. Allerdings ist der gleiche Körper schon von R. Burián untersucht und mit dem Namen Sitosterin belegt worden.¹⁾ Dennoch erschien es mir nicht unzweckmässig, die Untersuchung noch nach andern Seiten hin zu erweitern. Auch war es von Interesse, zu prüfen, ob ich bei Untersuchung dieses Phytosterins zu den gleichen Resultaten kommen konnte, wie Burián, der aus Weizenkeimen anderer Herkunft sich diesen Körper dargestellt hatte.

Im Folgenden mache ich zunächst einige Bemerkungen über das von mir verwendete Ausgangsmaterial. Dann lasse ich die Beschreibung der zur Prüfung der verschiedenen Abscheidungs- und Bestimmungsmethoden ausgeführten Versuche folgen. Hierauf beschreibe ich ein von mir selbst ausgearbeitetes Verfahren. Die Ergebnisse, die ich bei Untersuchung des aus Weizenkeimen dargestellten Phytosterins (Sitosterin) erhielt, sind in der zweiten Abhandlung mitgetheilt.

Das Ausgangsmaterial.

Die Weizenkeime, die ich als Ausgangsmaterial verwendete, erhielt ich aus hiesiger Stadtmühle (Besitzer: Herr Maggi). Sie waren von guter Qualität und nur insofern verunreinigt, als den einzelnen Keimen meistens kleine Stücke des Endosperms anhafteten. Keime ohne dieses Endosperm könnte man nur gewinnen durch mühseliges Aussuchen mit

¹⁾ Monatshefte f. Chem., Bd. 18, S. 551—574. Wien.

der Lupe und Pincette.¹⁾ Dieselben wurden zuerst, ohne sie vorher zu zerkleinern, in einem kupfernen Extractionsapparat mit Aether behandelt, dann gemahlen und nun noch einmal mit Aether extrahirt. Die zweite Aetherextraction lieferte aber so wenig Fett, dass ich sie bei spätern Extraktionen unterlassen habe. Nach dem Abdestilliren des Aethers erhielt ich das Fett als braungelbes Oel. Es enthielt noch kleine Mengen von Aether; zur Entfernung derselben wurde es in Porzellanschalen eine Zeit lang auf dem Sandbad erhitzt.

Für die meisten meiner Versuche diente ein in dieser Weise gewonnenes grösseres Quantum Oel; für einige wenige Versuche benutzte ich 2 zwar in der gleichen Weise, aber aus andern Mustern von Weizenkeimen hergestellte Oele. Ich habe im Folgenden diese Fettsorten mit a, b und c bezeichnet.

I. Versuche zur Prüfung der Methoden, die zur Trennung der Cholesterine von den Fetten und zur Bestimmung ihrer Quantität bis jetzt vorgeschlagen sind.

Die von mir auf ihre Brauchbarkeit geprüften Methoden haben das Gemeinsame, dass man bei Ausführung derselben die Fette verseift und sodann die Cholesterine von den Seifen durch Extraction mit Aether trennt. Die in der einen oder andern Weise gereinigte ätherische Lösung hinterlässt beim Eindunsten das Cholesterin, allerdings nicht in reinem Zustande. Doch gehen die Vorschriften, die für die von mir geprüften Methoden gegeben sind, meistens nur dahin, dass man den ganzen Verdampfungsrückstand zu wägen hat, ohne die Trennung des Cholesterins von den Verunreinigungen zu versuchen. Auch ich musste selbstverständlich zunächst in der gleichen Weise verfahren und bezeichne deshalb im Folgenden den zu wägenden Verdampfungsrückstand immer als Cholesterin bzw. Phytosterin.

Verfahren von A. Bömer.²⁾

Bömer ist von der Salkowski'schen Methode,³⁾ die bis

1) Man vergleiche hinsichtlich dieses Materials die Untersuchung von S. Frankfurt in den Landw. Versuchsstationen. Bd. 47, S. 449.

2) Ztschr. f. Untersuch. v. Nahrungs- u. Genussmitteln. 1898. S. 21.

3) Ztschr. f. analyt. Chem. 1887. S. 557.

dahin fast ausschliesslich angewendet worden ist, ausgegangen. Diese besteht bekanntlich darin, dass man die wässerigen Seifenlösungen, die aus den Fetten hergestellt worden sind, durch Ausschütteln mit Aether von den Cholesterinen befreit. Bömer hat die von diesem Autor vorgeschlagene Arbeitsweise namentlich dadurch verbessert, dass er das Verhältniss zwischen Fett, Kaliumhydroxyd, Alkohol und Aether feststellte, bei dessen Innehaltung die lästigen Aetheremulsionen, die vorher fast stets auftraten, so gut wie ganz vermieden werden können. Dieses Verhältniss ist: 100 g Fett, 10 ccm. Alkohol (95—96° Tr.) und dazu $\frac{1}{3}$ der angewendeten Fettmenge an Kaliumhydroxyd und an Wasser (ca. 33 g KOH in 33 ccm. H₂O gelöst). Bömer verwendet zu einer Bestimmung 50 g Fett. Er verseift auf kochendem Wasserbad am Rückflusskühler, wobei man Anfangs häufig und kräftig umschüttelt, bis der Kolbeninhalt beim Schütteln klar geworden ist, und erwärmt dann noch $\frac{1}{2}$ —1 Stunde unter zeitweiligem Umschütteln auf dem Wasserbade. Darauf gibt man die Seifenlösung noch warm in einen Schütteltrichter von etwa 1—1 $\frac{1}{2}$ Liter Inhalt und spült die im Kolben verbliebenen Seifenreste mit 200 ccm. Wasser in den Schütteltrichter. Nachdem die Seifenlösung hinlänglich abgekühlt ist, setzt man 500 ccm. Aether hinzu und schüttelt den Inhalt etwa $\frac{1}{2}$ —1 Minute durch. Nachdem sich die Aetherlösung vollkommen klar abgesetzt hat, trennt man sie in bekannter Weise von der Seifenlösung. Sodann extrahirt man letztere noch 2—3 Mal mit je 200—250 ccm. Aether. Die vereinigten ätherischen Flüssigkeiten werden der Destillation unterworfen. Den Destillationsrückstand erhitzt man zur Entfernung geringer Alkoholreste im Wasserbad unter Einblasen von Luft. Dann kocht man zur Umwandlung etwa noch vorhandener Fettreste nochmals während 5—10 Minuten mit 10 ccm. obiger Kalilauge. Die Flüssigkeit wird dann während einer Minute mit 80—100 ccm. Aether behandelt und die von der Seifenlösung getrennte ätherische Cholesterinlösung 3 Mal mit 5—10 ccm. Wasser geschüttelt und dann die filtrirte Flüssigkeit durch Abdunsten vom Aether befreit. Das so erhaltene Produkt gelangt zur Wägung.

Nach Bömer's Vorschrift wurden von mir zunächst 2 Bestimmungen ausgeführt, deren Resultate die folgenden sind:

1. Angewendetes Oel (a) = 49.725 g.
 Erhaltenes Phytosterin = 1.3587 g
 Entspricht = 2.73 % Phytosterin.
2. Angewendetes Oel (a) = 49.970 g
 Erhaltenes Phytosterin = 1.2850 g
 Entspricht = 2.57 % Phytosterin.

Hierzu folgende Bemerkungen: Die Aetherschicht schied sich in beiden Bestimmungen nach dem Schütteln mit der Seifenlösung schnell ab. Wie man sieht, ist bei Nr. 1 eine grössere Ausbeute erzielt worden als bei 2. Das rührt davon her, dass bei 1, entgegen der Vorschrift, zuerst 2 Mal mit je 500 ccm. und dann noch 3 Mal mit je 250 ccm. ausgeschüttelt wurde. Bei 2 verfuhr ich genau nach der Vorschrift. Das Resultat deutet nun darauf hin, dass man bei genauer Innehaltung der Angaben nicht alles Phytosterin aus der Seifenlösung herausbekommt. Nach dem zweiten Verseifen wurde in beiden Beispielen gleichmässig 3 Mal mit je 100 ccm. Aether extrahirt. Man konnte bei der Ausführung der Operation sofort erkennen, dass ein einmaliges Ausschütteln, wie es die Vorschrift verlangt, nicht genügte, um das Phytosterin ziemlich vollständig zu isoliren. Da man nun am Schlusse eine bedeutend grössere Aethermenge erhielt, als sie in der Vorschrift vorgesehen ist, so musste auch mit mehr Wasser gewaschen werden. Ich verwendete 3 Mal je 100 ccm. Wasser.

Kritik der Methode: Abgesehen davon, dass es kaum möglich ist, das Cholesterin nach dieser Methode vollständig zu gewinnen, haften derselben auch einige Unbequemlichkeiten an. Es ist unangenehm, mit so grossen Aethermengen zu arbeiten. Auch können die Emulsionsbildungen nicht immer vermieden werden. Die Filtration von ätherischen Cholesterinlösungen ist eine etwas lästige Operation. Es entstehen am Filterrand immer «Ausblühungen» von Cholesterinkrystallen, die durch das rasche Verdunsten des Aethers veranlasst werden. Dieser Umstand kann, wenn nicht mit grösster Sorgfalt gearbeitet wird, Anlass zu Verlusten geben. Dadurch, dass man 2 Mal

verseifen muss, wird viel Zeit und Arbeit gefordert. Die Vorschrift, nach dem Abdestilliren des Aethers nach der ersten Verseifung die letzten Spuren des Alkohols durch Lufteinblasen in das auf dem kochenden Wasserbad stehende Gefäss zu entfernen, scheint mir überflüssig zu sein, da man ja später bei der zweiten Verseifung wieder Alkohol verwenden muss.

Verfahren von C. Virchow.¹⁾

Dieses Verfahren lehnt sich in der Hauptsache an das soeben besprochene von A. Bömer an. Zu einer Bestimmung nimmt man auch 50 g Fett. Diese werden mittels 20 g Kaliumhydroxyd, 50 ccm. absolutem Alkohol und 30 ccm. Wasser durch 10 Minuten langes Erwärmen auf 60—70° auf dem Wasserbad verseift. Das Verseifungsprodukt wird dann, nachdem man das Gefäss, in dem die Umwändlung vorgenommen worden ist, noch mit 300 ccm. Wasser nachgespült hat, in einem Scheidetrichter 2 Mal mit je 500 ccm. Aether ausgeschüttelt. Der beim Abdestilliren des Aethers verbleibende Rückstand wird nochmals unter Zusatz von 0,5 g Aetzkali erhitzt (diese Angabe habe ich so verstanden, dass von der ursprünglich verwendeten alkoholischen Kalilauge so viel genommen werden soll, dass darin 0,5 g KOH enthalten sind) und dann wieder 2 Mal mit je 100 ccm. Aether extrahirt. Den Destillationsrückstand behandelt man behufs Entfernung noch vorhandener kleiner Menge Seife mit absolutem Aether; die filtrirte Lösung wird wieder eingedunstet, der Rückstand getrocknet und gewogen. Virchow hat diese Arbeitsmethode selber nach der quantitativen Seite hin geprüft und gefunden, dass sie zu diesem Zwecke nicht wohl zu brauchen sei.

Ich habe mit Fett a 3 Versuche ausgeführt, deren Resultate die folgenden sind:

| | | |
|------------------------|---|----------------------------|
| 1. Angewendetes Oel | = | 50.230 g |
| Erhaltenes Phytosterin | = | 2.3210 " |
| Entspricht | = | <u>4.62</u> % Phytosterin. |

¹⁾ Ztschr. f. Untersuch. v. Nahrungs- u. Genussmitteln. 1899. S. 562.

2. Angewendetes Oel = 50,265 g
 Erhaltenes Phytosterin = 2,0416 »
 Entspricht = 4,06 ‰ Phytosterin.
3. Angewendetes Oel = 50,500 g
 Erhaltenes Phytosterin = 2,5476 »
 Entspricht = 5,04 ‰ Phytosterin.

Zu bemerken ist, dass in diesem dritten Versuch, abweichend von den 2 vorhergehenden, nach der ersten Verseifung noch ein drittes Mal mit 500 ccm. Aether ausgeschüttelt worden ist.

Die folgenden 2 Proben wurden mit dem Fett b ausgeführt und die Resultate können deshalb, weil der Phytosterin-gehalt des Weizenkeimenöles schwankt, nur unter sich selbst verglichen werden.

4. Angewendetes Oel = 49,590 g
 Erhaltenes Phytosterin = 1,3156 »
 Entspricht = 2,65 ‰ Phytosterin.
5. Angewendetes Oel = 50,525 g
 Erhaltenes Phytosterin = 1,2518 »
 Entspricht = 2,48 ‰ Phytosterin.

Aus den ersten drei Versuchen erhellt Folgendes: Durch bloss zweimaliges Ausschütteln der Seifenlösung ist es unmöglich, sämtliches Phytosterin auszuziehen. Im dritten Fall, wo ein drittes Mal mit der gleichen Aethermenge extrahirt wurde, ist wesentlich mehr erhalten worden. Aus dem gleichen Grund ist auch die Ausbeute bei Nr. 4 und 5 ungenügend, wenn auch hier die Beträge untereinander ziemlich übereinstimmen. Ich kann also C. Virchow's Urtheil unterstützen, wenn er dieses Verfahren als nicht quantitativ bezeichnet. Dieses Resultat erklärt sich aus nachstehenden Gründen. Vorausschicken möchte ich die Frage, ob es nicht bequemer wäre, auf kochendem Wasserbad zu verseifen, als die Temperatur bloss auf 60—70° zu steigern. Auch würde ich der Sicherheit halber die Zeitdauer der Verseifung etwas verlängern. Wenn nämlich schon die ganze Masse klar geworden ist, so kann das noch nicht als sicherer Beweis dafür gelten, dass nun die Umwandlung vollständig ist. Die störenden Aetheremulsionen sind auch bei

genauer Innehaltung der Vorschrift nicht immer zu vermeiden. Die Nachteile einer zweimaligen Verseifung und der nothwendigen grossen Aethermengen sind schon bei Bömer's Verfahren hervorgehoben worden. Ich habe genau nach Vorschrift den ersten Aetherrückstand im Dampfbad durch einströmende wasserfreie Luft vollkommen trocknen wollen. Ich musste diese umständliche Operation aber Tage lang wiederholen, bis ich zu einigermaßen constantem Gewicht gelangte. Zwei Beispiele mögen das hier darthun. In beiden Fällen wurde das Phytosterin nach der zweiten Verseifung ausgeäthert, der Aether abdestillirt, der Rückstand mit wasserfreiem Aether aufgenommen und das klare Filtrat in einem kleinen gewogenen Erlenmeyer'schen Kölbchen abdestillirt und nun der Rückstand, wie oben beschrieben, unter beständigem Einblasen von trockener Luft auf dem siedenden Wasserbade belassen. Nach bestimmten Intervallen, die eine Stunde und mehr betragen, wurde das Kölbchen, das vorher in einem Exsiccator über concentrirter Schwefelsäure gestanden hatte, gewogen. Die Resultate dieser Wägungen sind folgende:

| | | | | | |
|--------------|------------|----------|---|-------|-------------|
| I. Beispiel. | 1. Wägung. | Kölbchen | + | Phyt. | = 37.3234 g |
| | 2. | " | + | " | = 37.3116 » |
| | 3. | " | + | " | = 37.3056 » |
| | 4. | " | + | " | = 37.2955 » |
| | 5. | " | + | " | = 37.2829 » |
| | 6. | " | + | " | = 37.2798 » |
| | 7. | " | + | " | = 37.2797 » |

Der letztgefundene Werth wurde nun in die Berechnung eingeführt, da jetzt das Gewicht in den beiden letzten Fällen nahezu constant blieb.

| | | | | | |
|---------------|------------|----------|---|-------|-------------|
| II. Beispiel. | 1. Wägung. | Kölbchen | + | Phyt. | = 37.4835 g |
| | 2. | " | + | " | = 37.4742 » |
| | 3. | " | + | " | = 37.4453 » |
| | 4. | " | + | " | = 37.4411 » |
| | 5. | " | + | " | = 37.4349 » |
| | 6. | " | + | " | = 37.4349 » |

Der letztgefundene Werth wurde in die Berechnung eingeführt.

Obige Erscheinung erklärt sich daraus, dass eben in der

Substanz noch eine ziemliche Menge Glycerin vorhanden ist, die bei der Extraction des verseiften Fettes in den Aether übergegangen war. Nun ist Glycerin bekanntlich sehr hygroskopisch. Beim Stehen an der Luft nimmt das trockene Glycerin bis zu 50% Wasser auf. Nach vorgenommenen Versuchen könnte Glycerin allerdings bei sehr lange fortgesetztem Erhitzen auf dem Wasserbade vollständig verflüchtigt werden. Solche Erhitzungsdauern, wie sie da gefordert würden, sind nun aber praktisch nicht anwendbar, sondern würden wahrscheinlich auch die Phytosterine selbst substantiell verändern. Den Extractionsrückstand, den man nach der zweiten Verseifung erhält, will Virchow durch Anwendung von absolutem Aether von noch vorhandener Seife trennen. Diese Reinigung erscheint mir aber als ungenügend. Denn bekanntlich sind die Alkalisalze der hier in Betracht kommenden Fettsäuren, namentlich der Oelsäure, in Aether nicht unlöslich. Ferner kann auf diese Weise auch das Glycerin nicht vollständig entfernt werden. Diese beiden Uebelstände werden noch vergrößert, indem man nicht gut verhindern kann, dass der Aether während der Filtration wieder Feuchtigkeit aufnimmt. Namentlich in Folge der nicht zu vermeidenden Verdunstung und der dadurch bewirkten Abkühlung schlägt sich sehr bald aus der Luft ein Tau nieder. Die grosse Flüchtigkeit des Aethers bringt noch einen andern Uebelstand mit sich. Beim Umgiessen von ätherischen Cholesterinlösungen, welche Operation hier wiederholt vorgenommen werden muss, bleibt im entleerten Gefäss auf der ganzen Fläche, welche von der Lösung benetzt war, eine feine Schicht ausgeschiedenen Cholesterins zurück, die sich bei der Ausgussöffnung stets noch etwas auf die Aussenfläche fortsetzt. Man muss nun mit der grössten Sorgfalt und unter Aufwendung einer gewissen Gewandtheit überall mit frischem Aether nachspülen, wenn man Verluste vermeiden will. Natürlich stellen sich hier auch die schon anlässlich der Besprechung des Bömer'schen Verfahrens erwähnten « Ausblühungen » von Cholesterinkrystallen an den Filterrändern ein.

Die schliesslich erhaltenen Produkte, die zur Wägung

kamen, waren ziemlich stark braungelb gefärbt und gaben einen nicht unangenehmen, eigenthümlichen Geruch von sich.

Verfahren von H. Kreis und O. Wolf.¹⁾

Die Verfasser verseifen das Fett mit alkoholischer Natronlauge und verwandeln die erhaltene Natronseife durch Ausfällen mit Chlorcalcium in Kalkseife, welche letztere getrocknet und pulverisirt durch Auskochen mit 95%igem Alkohol und Filtriren der erkalteten Masse von Cholesterin befreit werden soll. Das Filtrat wird noch einmal verseift, zur Trockene verdampft und der Verdampfungsrückstand gepulvert. Aus dem erhaltenen Pulver wird durch Schütteln mit Aether, Filtriren und Abdunsten des Lösungsmittels das Cholesterin erhalten, das noch einmal aus möglichst wenig heissem Alkohol umkrystallisirt wird.

Nach dieser Methode wurden zwei Versuche mit dem Fett b ausgeführt. Eine Bestimmung der Ausbeute, die nach der ersten Verseifung erhalten worden war, zeigte aber, dass diese hier kaum $\frac{1}{3}$ derjenigen betrug, welche aus dem gleichen Fett nach Bömer's Verfahren erzielt wurde. Daher habe ich bei Zuendeführung des Versuches nur noch auf die Qualität des zu erhaltenden Produktes mein Augenmerk gerichtet. Die äusserst geringe Ausbeute wird durch verschiedene Gründe veranlasst. Einmal kann schon beim Auspressen der Calciumseife im Filtertuch nicht gut vermieden werden, dass hier Seife durch die Maschen des Tuches durchgeht und so Verluste bringt. Der Hauptgrund ist aber folgender: Bekanntlich lösen sich die Cholesterine in heissem Alkohol sehr leicht, in der Kälte dagegen recht schwierig. Wenn nun die Verfasser die Calciumseife mit Alkohol auskochen, so mag alles Cholesterin in Lösung gehen. Da aber vor dem Filtriren wieder abgekühlt wird, so kann sich ein bedeutender Theil des vorher gelösten Cholesterins wieder ausscheiden. Um hier mehr Cholesterin aus der Seife herauszubringen, müsste die gleiche Operation sehr vielmal wiederholt werden. Es stellt sich aber

¹⁾ Chemiker-Zeitung. 1898. S. 805.

noch ein weiterer grosser Uebelstand ein: der nämlich, dass beim Kochen der Calciumseife mit Alkohol diese zu einer schleimigen, kaum zu filtrirenden Masse zusammensintert. Die Aethermenge, die zur Extraction nach der zweiten Verseifung verwendet werden soll, erscheint auch als ganz ungenügend. Was nun die Reinheit des schliesslich erhaltenen Produktes anbetrifft, so ist zu bemerken, dass es allerdings nur ganz wenig gelb gefärbt war. Doch liess die zähe, stark an die mit Alkohol gekochte Calciumseife erinnernde Consistenz auf die Anwesenheit von nicht unbeträchtlichen Mengen dieses Körpers schliessen. So wie die Methode hier vorliegt, ist sie also für quantitative Versuche nicht brauchbar.

Bemerkt sei hier noch, dass auch Otto Förster¹⁾ nach diesem Verfahren nur eine sehr geringe Ausbeute erzielte.

Verfahren von H. Kreis und E. Rudin.²⁾

H. Kreis beschreibt mit dem neuen Mitarbeiter E. Rudin eine Modification der soeben besprochenen Methode, die er mit O. Wolf ausgearbeitet hatte. Die Autoren geben hier den grossen Verlust an Cholesterin zu, den man bei Innehaltung der früheren Vorschrift erleidet, und wollen denselben durch einige Veränderungen vermeiden. Die in ungefähr gleicher Weise hergestellte Calciumseife wird zur Extraction nicht mehr mit Alkohol gekocht, sondern mit einem Gemisch gleicher Theile Alkohol und Aether während einer Stunde unter öfterem Umschütteln stehen gelassen. Der Filterrückstand wird mit dem gleichen Lösungsgemisch ausgewaschen. Es wird auch wieder ein zweites Mal mit Natronlauge verseift, aber nun die erhaltene Seife mit etwas Quarzsand vermischt, um sie im Soxhlet'schen Apparat leichter mit Aether extrahiren zu können. Der beim Abdestilliren der ätherischen Lösung verbleibende Rückstand wird gewogen. Ich habe im Ganzen drei Versuche ausgeführt.

| | | |
|-------------|----------------------------------|----------------------|
| 1. Versuch. | Angewendetes Oel (b) | = 50,540 g |
| | Erhaltenes Phytosterin | = 0,6953 " |
| | Entspricht | = <u>1,38%</u> Phyt. |

1) Chem. Centralblatt. 1899. Bd. I. S. 794.

2) Chemiker-Zeitung. 1899. S. 986.

Hier sieht man, dass die Ausbeute allerdings bedeutend grösser ist als die, welche man erhält, wenn man nach der frühern Methode arbeitet. Immerhin ist sie doch nur etwa halb so gross, wie die mit der Bömer'schen Methode erzielte. Es verursacht hier, wie schon bei der früheren Methode, ziemlich viel Mühe, um die Calciumseife als trockenes Pulver zu erhalten. Ferner ist zu bemerken, dass, nachdem die Seife mit Aetheralkohol gemischt gestanden hat, die Filtration an der Saugpumpe äusserst schlecht geht. Nicht nur geht die Sache sehr langsam vor sich, sondern man bringt es auch kaum fertig, die Flüssigkeit ohne Trübung durchfliessen zu lassen. Die Extraction im Soxhlet'schen Apparat während einer Stunde (wie die Vorschrift es fordert) genügt nicht. Der abfliessende Aether war auch nach Ablauf dieser Zeit immer noch gefärbt, ein Beweis, dass der Extractionsprocess noch nicht beendet war. Ich extrahirte daher während 3 Stunden und erhielt aber auch so nur die schon angegebene geringe Ausbeute. Der gewogene Rückstand der ätherischen Extractionsflüssigkeit war schwach gelb gefärbt.

Bei den nun folgenden zwei weitem Versuchen nach dieser Methode wurde Fett c verwendet, wie denn von nun an für alle noch folgenden Untersuchungen ausschliesslich noch dieses Fett c in Anwendung gekommen ist.

| | | |
|-------------|----------------------------------|----------------------|
| 2. Versuch. | Angewendetes Oel | = 49,865 g |
| | Erhaltenes Phytosterin | = 1,7339 " |
| | Entspricht | = <u>3,48% Phyt.</u> |

Es machten sich hier wieder die gleichen Uebelstände wie bei 1. bemerkbar. Was nun die Ausbeute anbelangt, so war dieselbe in später mit dem gleichen Oel, aber nach andern Methoden vorgenommenen Versuchen annähernd doppelt so gross wie hier.

Im folgenden dritten Versuch wurde ein von der Vorschrift in einem Punkt abweichendes Verfahren angewendet.

| | | |
|-------------|----------------------------------|----------------------|
| 3. Versuch. | Angewendetes Oel | = 49,740 g |
| | Erhaltenes Phytosterin | = 0,8776 " |
| | Entspricht | = <u>1,76% Phyt.</u> |

Hier wurde entgegen der Vorschrift das erste und zweite Mal im Soxhlet'schen Apparat extrahirt, was, wie man sieht, die Ausbeute herabgemindert hat.

Aus den gemachten Versuchen erhellt, dass die neue Methode von Kreis und Rudin allerdings nur schwach gefärbte Produkte liefert, dass sie aber recht umständlich und zeitraubend ist. Für quantitative Bestimmungen kann sie nicht in Betracht fallen.

Verfahren von Forster und Riechelmann.¹⁾

50 g Fett werden 2 Mal mit je 75 cem. 95—96%igem Alkohol am Rückflusskühler unter starkem Schütteln ca. 5 Minuten lang ausgekocht: das Fett wird durch gutes Abkühlen zum Erstarren gebracht und der Alkohol durch ein Filter gegossen. Die Filtrate werden dann durch Kochen mit NaOH verseift und die getrocknete Seife mit Aether ausgeschüttelt. Nachdem dann zur Trockene abdestillirt worden, wird, um noch vorhandene Seife zu entfernen, mit wenig Aether aufgenommen und in ein gewogenes Glas filtrirt. Nach dem Trocknen wird gewogen.

Mit dieser Methode habe ich nur folgenden Versuch ausgeführt.

| | | |
|----------------------------------|---|--------------------|
| Angewendetes Fett (c) | = | 50.033 g |
| Erhaltenes Phytosterin | = | 0.6673 » |
| Entspricht | = | <u>1.33%</u> Phyt. |

Das Auskochen mit Alkohol und Trennen der alkoholischen Lösung, wie es vorgeschrieben ist, mag bei starren Fetten angehen; bei flüssigen dagegen ist dieses Verfahren umständlich. Man muss hier durch Abhebern die alkoholische Lösung vom Rückstand zu trennen suchen. Bei meinem Material hat sich der Alkohol über dem ungelösten Fett nach 24 stündigem Stehen noch nicht ganz geklärt. Da man nach dem Kochen erkalten lassen muss, so kann nach früher Gesagtem wieder viel von dem vorher im Alkohol gelöst gewesenen Cholesterin ins Fett zurückgehen. Wenn man also nur

¹⁾ Chem. Centralbl. 1897. Bd. I, S. 563. Ztg. f. öffentl. Ch. Bd. 3, S. 10—12.

2 Mal auskocht, so kann unbedingt nur ein Theil des gesammten im Fett befindlichen Cholesterins gewonnen werden. Würde man aber dieses Auskochen genügend oft wiederholen, so würde man auch schliesslich den grössten Theil des Fettes in Lösung bringen, und es liegt auf der Hand, dass es dann viel einfacher wäre, gerade von Anfang an sämtliches Fett zu verseifen. Das erhaltene Produkt war verhältnissmässig stark gelb gefärbt, was auf ziemliche Unreinheit hinweist.

Verfahren von Raumer. 1)

Verfasser schlägt vor, 50 g Fett mit 100 ccm. Meissl'scher Kalilauge zu verseifen, die erhaltene Seife zu trocknen und zu pulverisiren und dann im Soxhlet'schen Extractionsapparat mit 50—75 ccm. Aether zu extrahiren. Nach dem Verjagen des Aethers wird der Rückstand aufs Neue mit 10 ccm. Köttsdorfer'scher Lauge verseift und die getrocknete mit reinem Sand vermischte Seife wieder im Soxhlet'schen Apparat während zwei Stunden extrahirt.

Die hier angegebene Methode, die getrocknete Seife im Soxhlet'schen Apparate mit Aether auszuziehen, ist schon früher von Juckenack und Hilger in ihrer Arbeit «Die durch das Rösten hervorgerufenen Veränderungen der Kaffeesamen»²⁾ bereits ausführlich beschrieben. Da einerseits diese Extractionsmethode in spätern von mir gemachten Versuchen eingehend geprüft wurde, andererseits gegen die Anwendung des Raumer'schen Verfahrens zu Quantitätsbestimmungen zum vorneherein Bedenken erhoben werden können, so wurde dasselbe hier keiner nähern Prüfung unterzogen.

Verfahren von K. Obermüller.

Die vorliegenden Untersuchungen haben ergeben, dass, um zu einer möglichst brauchbaren Cholesterinbestimmung für Fette zu gelangen, man unbedingt die ganze Fettmenge in Seifen überführen muss. Erst aus dieser soll dann der unver-

1) Chem. Centralbl. 1898. Bd. II. S. 367. Ztschr. f. angew. Ch. 1898. S. 555.

2) Forsch. Ber. üb. Lebensmittel u. ihre Beziehg. z. Hyg. Bd. 4, S. 119.

seifbare Anteil des Fettes gewonnen werden. Bei allen von mir besprochenen Vorschriften wird eine zweimalige Verseifung gefordert. Dadurch werden die Verfahren aber nicht nur complicirter, sondern die Gelegenheit zum Eintreten von Verlusten wird auch vergrössert. Es wurde nun von A. Kossel und K. Obermüller¹⁾ eine neue Verseifungsmethode angegeben, über die dann später von A. Kossel und M. Krüger²⁾ noch weitere Mittheilungen veröffentlicht wurden. Diese Methode besteht darin, dass man das in Aether oder Alkohol gelöste Fett einer Behandlung mit alkoholischer Lösung von Natriumalkoholat (C_2H_5ONa) unterwirft. Nach den von den Autoren gemachten Angaben wird das Fett durch die Alkoholateinwirkung schon in einer ersten Operation quantitativ in Seife übergeführt. Man kann 2 Wege einschlagen, nämlich entweder das Fett in Aether lösen, zu dieser Lösung die Alkoholatflüssigkeit in der Kälte zugiessen und die dabei sich ausscheidende Seife durch Filtration entfernen, oder man kann auch für das Fett Alkohol als Lösungsmittel in Anwendung bringen und schliesslich dann die ganze Operation dadurch beschleunigen, dass man den Alkohol, der Fett und Alkoholat enthält, verdunstet und den Rückstand kurze Zeit auf dem Wasserbad erhitzt.

Mit Anwendung dieser neuen Verseifungsmethode hat nun K. Obermüller³⁾ ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Cholesterinen ausgearbeitet, deren Hauptpunkte die Folgenden sind:

Das Fett wird in Aether gelöst und zu dieser Lösung Natriumalkoholat (hergestellt durch Auflösen von Na in 99^o/_oigem Alkohol) gegeben. Zur Lösung des im Ueberschuss anzuwendenden Natriums soll möglichst wenig Alkohol verwendet werden. Die zugesetzte Menge Aether muss so gross gewählt werden, dass die ausgeschiedene Seife beim Umschwenken des Kolbens, in welchem man den Process vornimmt, einen nicht zu dicken Brei bildet; es könnten sonst an den Wandungen

1) Zeitschr. f. physiol. Chem. 1890. S. 599.

2) Zeitschr. f. physiol. Chem. 1891. S. 321.

3) Zeitschr. f. physiol. Chem. 1892. S. 143.

noch Seifenreste mit eingeschlossenem Fett haften bleiben. Nach öfterem Umschwenken lässt man während 3 Stunden stehen und bringt dann die Seife auf ein Filter, saugt schwach ab und wäscht unter vorsichtigem Durchrühren mit einem Glasstab mit Aether gehörig aus. Scheidet sich im Filtrat später noch etwas Seife aus, so muss diese durch Filtration entfernt werden. Das Filtrat fängt man in einem Kolben auf, destillirt den Aether ab, entfernt die noch zurückbleibende Menge Alkohol durch Aussaugen der Luft aus dem Kolben unter Eintauchen desselben in ein siedendes Wasserbad und trocknet schliesslich den Inhalt bei 100—120°. Nun wird dieser Rückstand mit möglichst wenig absolutem Aether übergossen, einige Stunden stehen gelassen und dann, wenn ein sichtbarer Rest ungelöst stehen geblieben ist, von diesem durch Filtration getrennt. Das Filtrat liefert nach dem Abdunsten und kurzen Erhitzen auf 120° das Cholesterin in wägbarem Zustande.

Ich führte 2 Versuche nach diesen Angaben aus, wobei zu bemerken ist, dass dieses Fett nicht als sehr günstiges Object zu betrachten ist; denn Obermüller gibt an, dass sein Verfahren für flüssige Fette sich nicht so gut verwenden lasse wie für feste Fette. Ich komme darauf weiter unten noch zurück.

1. Versuch: Angewendetes Oel (c) = 25,240 g
 Erhaltenes Phytosterin = 1,2368 g
 Entspricht = 4,90 % Phytosterin.

Es wurden 5 g Na in 100 ccm. 99%igem Alkohol gelöst und von dieser Lösung 80 ccm. zur Verseifung verwendet. Zur Lösung des Fettes nahm ich 400 ccm. Aether. Das Gemisch wurde über Nacht stehen gelassen. Nachdem dann die ätherische Lösung mit Hülfe einer Nutsche bei ganz schwacher Luftverdünnung abfiltrirt war, verwandte ich zum Nachwaschen noch 1½—2 Liter Aether. Nächstträglich schied sich im Filtrat noch etwas Seife aus, die abfiltrirt wurde.

2. Versuch: Angewendetes Oel (c) = 25,130 g
 Erhaltenes Phytosterin = 1,0960 g
 Entspricht = 4,36 % Phytosterin.

Hier wurde der gleiche Weg eingeschlagen wie bei 1. Wie man sieht, stimmen die Resultate nicht gut miteinander überein. Sowohl bei 1. als auch bei 2. habe ich nun die mit Aether ausgewaschene Seife getrocknet, zerrieben und dann im Soxhlet'schen Extractionsapparat neuerdings einer Aetherbehandlung unterworfen, um zu erfahren, ob sie frei sei von Cholesterin oder nicht. In beiden Fällen wurden wirklich noch kleine Mengen Phytosterin extrahirt. Es ist aber wahrscheinlich, dass bei Anwendung von noch mehr Aether zum Auswaschen auf dem Filter auch diese kleinen Mengen noch ins ursprüngliche Filtrat gelangt wären. Obermüller prüft die Seife nach dem Auswaschen mit Aether in der Weise auf Cholesterine, dass er die Seife in Wasser löst. Löst sie sich klar, so nimmt er an, dass kein Cholesterin mehr vorhanden ist; löst sie sich trüb, so nimmt er sie als cholesterinhaltig an. Ich halte aber diese Probe für unsicher. Denn bekanntlich können beim Lösen von Seife in viel Wasser saure fett-saure Alkaliverbindungen ausgeschieden werden; beim Lösen in wenig Wasser kommt aber der Umstand in Betracht, dass Cholesterin in der Seifenlösung in nicht zu vernachlässigender Menge sich auflösen kann.

Obermüller hat zur Prüfung dieser seiner Methode allerdings nur je 1 g Fett verwendet, dem er aber durchschnittlich etwa 10% Cholesterin zufügte und dieses dann wieder zu gewinnen suchte. Bei solchen Verhältnissen stellen sich allerdings die Uebelstände, welche durch die nothwendigen grossen Aethermengen bedingt werden, nur in geringem Maasse ein. Es ist aber zu beachten, dass wir es in der Praxis wohl selten mit Körpern zu thun haben, die einen so grossen Procentsatz an Cholesterin aufweisen. Uebrigens konnte Obermüller, wie schon früher bemerkt worden ist, nur bei festen Fetten zufriedenstellende Resultate erreichen. Die ungenügenden Resultate bei flüssigen Fetten glaubt er der Anwesenheit von beträchtlichen Mengen von ölsaurem Natron zuschreiben zu müssen. Diese Annahme scheint richtig zu sein. Der Umstand, dass Aether namentlich ölsaure Alkalien aufzulösen vermag, wird hier den misslichen Einfluss ausüben. Doch liegt

die Möglichkeit vor, die ätherische Cholesterinlösung durch Schütteln mit Wasser von den darin enthaltenen Seifen zu befreien. (Dieses Verfahren ist in hiesigem Laboratorium schon seit langer Zeit angewendet worden.)

Nach meiner Meinung besitzt das Verfahren von Obermüller gegenüber den früher besprochenen Verfahren durch die Art der Verseifung einen Vorzug und ermöglicht wohl auch eine vollständige Gewinnung des Cholesterins, aber nur unter Anwendung sehr grosser Aethermengen zum Auswaschen der Seife auf der Nutsche. Es ist aber auch noch darauf aufmerksam zu machen, dass der nach Obermüller's Vorschrift gewonnene Rückstand der ätherischen Lösung, welcher als Cholesterin in Rechnung gestellt wird, vermuthlich nicht frei von Glycerin ist und dass es auch zweifelhaft erscheint, ob man dasselbe durch das vorgeschriebene Auflösen in wenig wasserfreiem Aether von etwa vorhandener Seife vollständig trennen kann.

II. Eigene Versuche zur Auffindung eines für die Abscheidung und quantitative Bestimmung der Cholesterine geeigneten Verfahrens.

Nachstehend theile ich die Resultate einiger von mir mit dem Fett c ausgeführten Versuchsreihen mit, deren Zweck es war, die vorhandenen Verfahren so umzugestalten, dass es möglich ist, die Cholesterine unter Aufwendung einer nicht zu grossen Aethermenge von den Fetten zu trennen und in möglichst reiner für die Wägung geeigneter Beschaffenheit zu gewinnen.

Bei allen diesen Versuchen wurde das Fett in einer Porzellanschale auf dem Wasserbad in Alkohol gelöst, hierauf die Natriumalkoholatflüssigkeit zugegeben, die erhaltene Seife zu trockenem Pulver verarbeitet, welches dann im Extractionsapparat von Soxhlet mit Aether ausgezogen wurde. Der bei der Destillation der ätherischen Lösung verbleibende Rückstand wurde dann theils direkt gewogen, theils vorher noch weitem Reinigungsprocessen unterworfen. Zu allen diesen Verseifungen wurde ein Ueberschuss von Natriumalkoholat verwendet, nämlich auf ca. 50 g Fett 8 g Na in 160 ccm. Alkohol gelöst. Die Unterschiede, die bei den einzelnen Versuchen hinsichtlich

der Versuchsanordnung stattfanden, ergeben sich aus den nachfolgenden Mittheilungen.

Versuch 1. Das Fett wurde in 100 ccm. Alkohol gelöst. Nach Zusatz der Alkoholatlösung wurde auf dem Wasserbad erhitzt, bis der Alkoholgeruch vollständig verschwunden war. Alsdann wurde die Masse wieder in etwas Wasser gelöst und mit Kochsalz gemischt und auf dem Wasserbad wieder zur Trockene verdampft. Das getrocknete und pulverisirte Produkt wurde im Soxhlet-Apparat während 3 Stunden mit Aether extrahirt. Der Zusatz von Kochsalz sollte nicht nur den Zweck haben, eine für die Extraction vortheilhafte grössere Porosität zu erzeugen, sondern auch bewirken, dass im Soxhlet-Apparat ein Uebergang von Seife in die Flüssigkeit auf ein Minimum reducirt würde. Näheres über diesen Punkt und weitere Vorthelle, welche die Anwendung des Kochsalzes mit sich bringt, siehe weiter unten. Die Ausbeute (6.67%) war in diesem Versuch ausserordentlich gross. Das hat seinen Grund in Folgendem: Die Wandungen des Gefässes, in welchem der Rückstand der ätherischen Lösung gewogen wurde, war von einer farblosen, klebrig feuchten Substanz bedeckt. Auch bei wiederholtem längern Erwärmen im Trockenschränk bei ca. 120° war von einem Verschwinden dieses Körpers nichts zu bemerken. Das Gewicht nahm wohl nach jedem Erhitzen um einen kleinen Betrag ab. Gewogen wurde dann, nachdem schliesslich die Gewichts-differenz von einer Wägung zur andern nur noch ganz gering war. Dieser dem Phytosterin beigemengte Körper konnte nichts anderes als Glycerin sein, das ja bei der Verseifung des Fettes in reichlicher Menge entsteht. Es konnte constatirt werden nicht nur durch die sich hier zeigende bekannte Hygroskopieität, sondern auch durch den charakteristischen süssen Geschmack. Aether ist für Glycerin allerdings nur ein schlechtes Lösungsmittel. Bei der langen Einwirkungsdauer wird aber schliesslich doch eine beträchtliche Menge gelöst. Wir sehen also, dass bei dieser Bestimmung das Resultat zu hoch ausfallen musste. Das Produkt selber ist ziemlich dunkelbraun gefärbt. Das deutet darauf hin, dass noch andere verunreinigende Substanzen anwesend sind.

Versuch 2. Das Fett wurde ebenfalls in 100 ccm. Alkohol gelöst, die Seifenlösung mit Kochsalz versetzt und während 3 Stunden extrahiert. Den Aetherextract löste ich in ganz wenig heissem Alkohol und fügte dann nach und nach eine grössere Wassermenge hinzu, sodass das Phytosterin vollständig aus der Lösung ausgefällt wurde. Nun filtrirte ich. Dadurch wurde das Glycerin und eventuell noch vorhandene Seife vom Phytosterin getrennt. Das so erhaltene Produkt wurde in einem Erlenmeyer-Kölbchen getrocknet und gewogen. Es war bedeutend reiner als das bei Versuch 1 erhaltene. Nach dem Erwärmen im Trockenschrank wurde bald Gewichtsconstanz erzielt. Die dunkelbraune Färbung bei 1 hat einer ganz hellgelben Platz gemacht. Das so erhaltene Phytosterin (5,55% des Fettes) war das reinste von allen bis jetzt erhaltenen Produkten.

Versuch 3. Hier wurde trotz der doppelten Menge Fett auch in nur 100 ccm. Alkohol gelöst. Es erwies sich, dass diese Menge vollständig genügt. Die Seife wurde auch hier wie nun bei allen folgenden Versuchen, mit Ausnahme von Nr. 9, mit Kochsalz vermischt. Die Extractionsdauer betrug 3 Stunden. Um das Phytosterin zu reinigen, wurde die ätherische Lösung dieses Mal im Scheidetrichter 3 Mal mit Wasser ausgeschüttelt. Der Aetherrückstand schien etwas weniger rein zu sein als bei 2. Immerhin war er auch ziemlich hell gefärbt. Die Ausbeute (5,30%) ist um einen kleinen Betrag geringer.

Versuch 4. Die zur Lösung des Fettes verwendete Menge Alkohol betrug auch hier, wie in den übrigen noch folgenden Versuchen dieser Reihe 100 ccm. Die Extractionsdauer war auf 5 Stunden erhöht. Der Aetherextract wurde wieder im Scheidetrichter durch Ausschütteln mit Wasser gereinigt. Das Produkt (6,25%) ist etwas dunkler gefärbt als das vorhergehende.

Versuch 5. Extractionsdauer 5 Stunden. Um womöglich grössere Reinheit zu erzielen, wurde hier der Aetherextract 7 Mal im Scheidetrichter mit Wasser ausgeschüttelt. Im Aussehen war das schliesslich erhaltene Produkt wenig

verschieden von 4. Ob die geringere Ausbeute (5,42%) durch das sehr gesteigerte Ausschütteln mit Wasser bedingt sei, konnte vorläufig nicht entschieden werden.

Versuch 6. Die ätherische Lösung wurde 5 Mal im Scheidetrichter mit Wasser ausgeschüttelt. Im Uebrigen war das Verfahren ganz gleich wie bei Nr. 5. Nur war die verwendete Salzmenge nicht die gleiche. Das Produkt ist heller gefärbt als das vorhergehende.

Versuch 7. Extractionsdauer 5 Stunden. Zur Entfernung von Glycerin und Seife wurde der Rückstand der ätherischen Extractionsflüssigkeit in ganz wenig heissem Alkohol gelöst und dann das Phytosterin wieder ausgefällt durch Hinzufügen von ca. $\frac{3}{4}$ Liter Wasser. Das schliesslich erhaltene Produkt, das zur Wägung kam, wurde an Reinheit bis jetzt noch von keinem andern erreicht. Der Körper war fast ganz weiss.

Versuch 8. Wurde genau so verfahren wie bei Nr. 7, nur etwas weniger Kochsalz verwendet. Das Produkt bei 7. schien etwas reiner zu sein, indem die Färbung etwas heller war.

Versuch 9. Hier wurde zur Seife gar kein Kochsalz zugefügt. Die Extractionsdauer betrug 7 Stunden. Es scheint aber, dass auch die verlängerte Extractionsdauer nicht genügt hat. Nachdem nämlich 7 Stunden vorbei waren, wurde über Nacht stehen gelassen, und zwar so, dass die die Seife enthaltende Papierhülse im Soxhlet-Apparat fast ganz unter Aether stand. Am nächsten Morgen war dieser wieder schwach gelblich gefärbt, ein Beweis, dass noch weitere Lösung stattgefunden hat. Die Extraction setzte ich aber nicht mehr weiter fort. Nach dem Abdestilliren des Aethers erstarrte die zurückgebliebene Menge nicht sofort auf dem heissen Wasserbad, wie es bei den vorhergehenden Versuchen der Fall war. Erstarrung trat erst ein nach längerem Erwärmen auf stark kochendem Wasserbad. Allerdings wenn man erkalten liess, trat in beiden Fällen Erstarrung ein. Bis jetzt, das heisst in allen Fällen, wo Kochsalz verwendet wurde, konnte man die zum Extrahiren bestimmte Seife sehr leicht aus der Schale, in welcher die Umwandlung stattgefunden, entfernen. Um keine Verluste zu erleiden, soll das auch möglichst vollständig

geschehen. Im Versuch 9 aber gestaltete sich das Ablösen der letzten Seifenreste von den Schalenwandungen viel schwieriger. Das ziemlich hell gefärbte Produkt wurde in gleicher Weise, wie schon früher angegeben, durch Ausfällen mit Wasser gereinigt. Das Filtrat erschien von Weitem milchartig, fast weiss. Die gleiche Erscheinung, aber in wesentlich geringerem Grade wurde immer beobachtet, wenn durch Ausfällen mit Wasser gereinigt wurde. Man konnte aber mit blossem Auge keine Spur eines Niederschlages bemerken. Um zu constatiren, ob sich darin Phytosterin befände, wurde dieses Filtrat wiederholt mit Aether ausgeschüttelt. Es konnte aber keine bemerkbare Menge Phytosterin erhalten werden. Dieses eigenartige Aussehen schien von der grossen Menge der anwesenden Seife herzurühren. Diese wird durch Einwirkung der grossen Wassermenge in saure fettsaure Alkalien übergegangen sein, und zwar in so feiner Vertheilung, dass ein Niederschlag nicht bemerkt werden konnte. Diese Ansicht wird dadurch unterstützt, dass eine Flüssigkeit, hergestellt durch Auflösen von etwas Seife und Glycerin in Wasser, unserm Filtrat täuschend ähnlich war. Bemerkt sei noch, dass der Aether im Soxhlet'schen Apparat hier mindestens eben so gut und schnell durch die pulverisirte Seifenschicht hindurchsickerte, wie in den Fällen, wo Kochsalz verwendet worden ist. Die Ausbeute (1,88%) ist trotzdem ausserordentlich niedrig.

Versuch 10. Hier wurden ca. 60 g Kochsalz verwendet. Um eine innige Mischung zu erzielen, wurde das Salz vorher in Wasser gelöst und dann der Seifenflüssigkeit zugefügt. Extractionsdauer 7 Stunden. Der Aether, der über Nacht den Behälter anfüllte, welcher die während 7 Stunden extrahirte Seife enthielt, war am nächsten Morgen noch ganz farblos und hinterliess beim Verdunsten keinen Rückstand, ein Beweis, dass die Extraction vollständig war. Während der Extraction wurde die Flüssigkeit im Erlenmeyer'schen Kölbchen unten etwas trübe. Nach einigem Stehen trat aber wieder vollständige Klärung ein, indem das Glycerin, welches die Trübung bewirkt hatte, sich vollständig, meist in Form von Tropfen an den Gefässwandungen niedergeschlagen hatte.

Die Reinigung wurde vorgenommen durch Auflösen in wenig heissem Alkohol und Ausfällen mit etwa $\frac{3}{4}$ l Wasser. Die Ausbeute (6.36%) ist sehr gross.

In folgender Tabelle sind nun die Resultate der Versuchsreihe zusammengestellt.

| Angewendet | Erhalten | |
|--------------|-------------|--------|
| Fett | Phytosterin | |
| 1. 25,240 g | 1,6855 g | 6.67 % |
| 2. 25,100 » | 1,3936 » | 5.55 » |
| 3. 50,253 » | 2,6639 » | 5.30 » |
| 4. 49,974 » | 3,1215 » | 6.25 » |
| 5. 50,105 » | 2,7134 » | 5.42 » |
| 6. 50,435 » | 2,5522 » | 5.06 » |
| 7. 50,045 » | 2,6398 » | 5.27 » |
| 8. 50,012 » | 2,5005 » | 5.00 » |
| 9. 50,046 » | 0,9429 » | 1.88 » |
| 10. 50,020 » | 3,1831 » | 6.36 » |

Fassen wir nun die Hauptresultate, welche die Versuchsreihe zu Tage förderte, zusammen, so ist in erster Linie auf die grosse Wichtigkeit der Anwendung von Kochsalz als Zusatz zu der mit Aether zu extrahirenden Seife hinzuweisen. Aus Versuch 9 folgt, dass ohne Kochsalz, selbst bei langer Extractionsdauer, nur ein vollständig ungenügendes Resultat erzielt werden kann. Der gleiche Versuch und noch einige später ausgeführte thun auch dar, dass das Kochsalz nicht etwa dadurch in erster Linie vortheilhaft wirkt, dass es der zu extrahirenden Masse eine grössere Lockerheit gibt und somit durch beliebige andere Materialien, z. B. Sand, fein vertheiltes Papier u. s. w. ersetzt werden könnte. Bei Abwesenheit von Kochsalz wird das trockene Seifenpulver vom Aether ebenso gut durchsickert, wie bei Anwesenheit dieses Materiales. Man sieht auch, dass die Menge des angewendeten Kochsalzes eine Rolle spielt, indem in genau derselben Weise ausgeführte Versuche verschiedene Resultate ergaben, wenn die Salzquantitäten verschieden waren. Die Befreiung des Aetherextractes von Glycerin und Seife scheint besser vor sich zu gehen durch Ausfällen seiner heissen, concentrirten alkoholischen Lösung

mit Wasser, als durch Schütteln der ätherischen Lösung mit der gleichen Flüssigkeit. Es ist ausserdem wahrscheinlich, dass durch öfters wiederholte Behandlung einer ätherischen Phytosterinlösung mit Wasser Verluste entstehen können, ganz abgesehen von den auch hier noch zuweilen durch Emulsionsbildung eintretenden Störungen, welche das Arbeiten sehr erschweren. Bekanntlich löst ja Wasser etwa 10% Aether auf. Unter diesen Verhältnissen kann jedenfalls auch Phytosterin in gelöstem Zustand in das mit Aether gesättigte Waschwasser übergehen. Um sicher zu sein, dass die Extraction der Seife mit Aether vollständig ist, wird man die Zeitdauer von 7 Stunden noch überschreiten müssen.

Die vier nachstehenden Versuche sollen uns noch über folgende zwei Punkte Aufklärung verschaffen:

1. Soll ermittelt werden, wie gross die zur Seife hinzuzufügende Salzmenge sein muss, um das günstigste Resultat zu erhalten.

2. Soll die Extractionsdauer ermittelt werden, bei deren Innehaltung mit Gewissheit sämtliches Phytosterin aus der Seife ausgezogen wird.

Angewendet wurden je ca. 50 g Oel (c), gelöst in 100 cem. Alkohol; verseift wurde dann mit einer Lösung von 8 g Na in 160 cem. Alkohol. Die Flüssigkeit wurde nachher auf dem Wasserbad verdampft, der Rückstand im Luftbad bei ca. 80° vollständig getrocknet. Die Masse wurde dann direkt in der Schale pulverisirt und in den Soxhlet'schen Apparat gebracht. Da wo ich Kochsalz zufügte, wurde nach dem Verseifen auf dem Wasserbade solange erwärmt, bis der Alkohol sich verflüchtigt hatte, und nachher so viel Wasser zugefügt, dass sich Seife und Kochsalz zusammen auflösten. Dadurch sollte eine innige Mischung entstehen. Nun erst wurde vollständig zur Trockne gebracht. Extractionsdauer in allen Fällen 9 Stunden. In allen 4 Versuchen wurde der Aetherextract dadurch gereinigt, dass er in ganz wenig heissem Alkohol gelöst und dann mit je ca. $\frac{3}{4}$ l Wasser gefällt wurde.

Die Resultate dieser Versuche sind folgende:

| | Angewendet | | Erhalten | |
|----|------------|-------|-------------|--------|
| | Fett | NaCl | Phytosterin | |
| 1. | 50,015 g | 0 g | 1,4083 g | 2,82 % |
| 2. | 50,046 „ | 50 „ | 3,3588 „ | 6,71 „ |
| 3. | 50,331 „ | 80 „ | 3,4124 „ | 6,78 „ |
| 4. | 51,008 „ | 100 „ | 3,4379 „ | 6,74 „ |

Zu diesen Versuchen ist Folgendes zu bemerken:

Bei 1. schied sich im Extractionsgefäss des Soxhlet'schen Apparates unten nach und nach eine ziemliche Quantität eines festen, weisslichen Körpers aus, der sich später als Seife erwies. Er löste sich leicht im Wasser auf und gab beim Schütteln den charakteristischen Seifenschaum. Diese Erscheinung thut, wie schon einmal ein früherer Versuch, wieder die Wichtigkeit des Vermischens der zu extrahirenden Seife mit Kochsalz dar. Die Farbe des zu wägenden Produktes war ziemlich stark gelblich braun. Ausbeute ganz ungenügend.

Bei 2. ist das Produkt ganz hellgelb gefärbt. Ausbeute sehr gross. Das gleiche ist von 3. und 4. zu sagen. In den letzten beiden Fällen sieht das Produkt fast noch etwas reiner aus, indem sich die Farbe noch mehr dem Weissen genähert hat.

Aus dieser Versuchsreihe folgt nun, dass man zum besten Resultat gelangt, wenn man zur Seife das ca. 1 $\frac{1}{2}$ fache des angewendeten Fettes an Kochsalz zugibt. Um nun zu erfahren, wie es sich mit der Vollständigkeit der Extraction verhalte, wurde die in den Versuchen 2., 3. und 4. schon extrahirte Seife noch einmal längere Zeit mit frischem Aether im gleichen Soxhlet'schen Apparat behandelt. Ich konnte aber keine Spur von Phytosterin mehr erhalten, was zur Annahme berechtigt, dass eine Extractionsdauer von 9 Stunden sämmtliches in der Seife enthaltene Phytosterin gewinnen lässt. Dass man aber nicht viel unter diese Zeitdauer gehen darf, beweist der Versuch Nr. 10 der vorletzten Versuchsserie (Seite 453). Dieser Versuch wurde ungefähr so ausgeführt wie die 3 letzten der jetzt besprochenen Versuche. Die Seife wurde aber nur während 7 Stunden extrahirt und deshalb wurde auch eine etwas geringere Ausbeute, nämlich nur 6,36 %, erhalten.

Auf Grund der Resultate, die ich in den im Vorigen beschriebenen Versuchsreihen erhielt, kann ich nun für mein Verfahren zur quantitativen Abscheidung der Cholesterine aus Fetten folgende Vorschrift geben.

Etwa 50 g Fett werden abgewogen in eine ca. 1 $\frac{1}{2}$ l fassende Porzellanschale gebracht und hier mit 100 cem. Alkohol auf dem Wasserbad gekocht. Zu der Lösung gibt man nun eine Natriumalkoholatflüssigkeit, die man so herstellt, dass man 8 g Na¹) in 160 cem. 99%igem Alkohol, ohne zu kühlen, auflöst. Diese Alkoholatlösung giesst man unter beständigem Umrühren noch warm in die alkoholische Fettlösung. Man erwärmt dann noch einige Zeit auf dem Wasserbad, bis der Alkohol entwichen ist. Hierauf fügt man das ca. 1 $\frac{1}{2}$ fache Gewicht des verwendeten Fettes an Kochsalz und so viel Wasser zu, dass der Inhalt der Schale sich ganz oder zum grössten Theil auflöst. Dies ist wünschenswerth, um eine innige Mischung der Seife mit dem Salz zu erzielen. (Das Salz muss natürlich so gereinigt sein, dass der Aether keine Stoffe aus demselben extrahiren kann.) Es wird nun unter häufigem Umrühren zur Trockne verdampft. Das kann im Anfang direkt über einer kleinen Gasflamme geschehen. Sobald ein Brei sich zu bilden beginnt, muss die Verdampfung auf dem Wasserbad fortgesetzt werden. Um die Masse ganz trocken zu erhalten, erwärmt man schliesslich noch im Trockenschrank bei ca. 80°. Man beginnt dann mit dem Pulverisiren direkt in der Schale, sobald der Tröckenheitszustand es erlaubt. Nachher wird die Masse noch weiter im Trockenschrank belassen und schliesslich zu feinem Pulver verarbeitet, das dann noch warm einige Zeit in einem Exsiccator über concentrirte Schwefelsäure gestellt wird. Alsdann schreitet man zur Extraction in einem geräumigen Soxhlet'schen Extractionsapparat. Mit Vortheil verwendet man die käuflichen, schon entfetteten Papierhülsen aus dichtem Filtrirpapier. Das in die Hülse gebrachte Seifenpulver bedeckt man mit einem entfetteten Wattebausch, um

1) Die organischen Reste, welche demselben anhaften und vom Petroleum herrühren, müssen abgeschabt werden.

das Hinübertreten von Theilen des feinen Pulvers in die Flüssigkeit zu verhindern. Die Extraction, welche mit gewöhnlichem Aether vorgenommen werden kann, soll ca. 9 Stunden dauern. Unten im Gefäss trübt sich der Aether anfangs gewöhnlich ein wenig. Das rührt davon her, dass sich Glycerin in fein vertheiltem Zustand ausscheidet. In kurzer Zeit schlägt sich aber dieses Glycerin am Boden und an den Wandungen des Gefässes nieder, sodass die Lösung klar wird. Zur Entfernung noch vorhandener Spuren von Seife und Glycerin giesst man den ätherischen Extract in einen $\frac{3}{4}$ bis 1 l haltenden Erlenmeyer-Kolben und wäscht mit frischem Aether einige Mal nach. Durch dieses Umgiessen hat man das in das Extractionskölbchen übergegangene Glycerin zum allergrössten Theile entfernt, indem es an den Wandungen des ersten Gefässes fest haften bleibt. Der Aether wird dann abdestillirt und der Destillationsrückstand auf dem Wasserbad in ganz wenig Alkohol gelöst. Alsdann giesst man unter Umschwenken nach und nach so viel Wasser zu, bis der Erlenmeyer-Kolben annähernd gefüllt ist. Man bringt die gefällte Substanz auf ein Papierfilter und wäscht mit reinem Wasser etwas nach. Nun wird der so gereinigte Körper im Filter getrocknet, indem man dasselbe im Trichter in einen Trockenschrank bringt und hier bei ca. 60° belässt. Mit einem kleinen Spatel wird nun sorgfältig so viel als möglich von dem getrockneten Produkt in ein gewogenes Erlenmeyer-Kölbchen gebracht. Die letzten Reste des Cholesterins auf dem Filter spült man mit Aether in das gewogene Gefäss. Der Aether wird dann wieder abdestillirt oder direkt verdunstet und der Rückstand im Trockenschrank bei $100-120^{\circ}$ vollständig getrocknet und dann gewogen.

Zum Vergleich mit meinem Verfahren habe ich nun noch Bömer's Verfahren, das mir als die beste der bisher beschriebenen Methoden erschien,¹⁾ auf das gleiche Object (Fett c) angewendet und dabei folgendes Resultat erhalten:

1) Allerdings hat Obermüller's Methode in Bezug auf die Art der Verseifung einen Vorzug vor dem Bömer'schen Verfahren, doch ist es als ein Mangel desselben zu bezeichnen, dass das gewonnene Phytosterin kaum frei ist von Glycerin und Seife.

| | | |
|------------------|---|-----------------|
| Angew. Oel | = | 50,020 g |
| Erhalt. Phytost. | = | 2,6573 g |
| Entspr. | = | 5,31 % Phytost. |

Wie man sieht, habe ich nach Bömer's Methode mehr als 1% Phytosterin weniger erhalten. Auch war das so gewonnene Produkt dunkler gefärbt als dasjenige, welches ich nach meinem Verfahren erhielt.

Schlussbemerkungen. Auf Grund der im Vorigen gemachten Mittheilungen glaube ich behaupten zu dürfen, dass bei Anwendung meines Verfahrens mehrere der Hauptmängel, welche mit der Bömer'schen Methode¹⁾ verbunden sind, umgangen werden können. So erfüllt hier statt der zweimaligen Verseifung eine einmalige den Zweck vollständig. Die bei Bömer erforderlichen grossen Aethermengen, welche, wie wir gesehen haben, dort noch vergrössert werden sollten, um eine bessere Ausbeute zu erhalten, konnte auf eine ganz kleine Quantität reducirt werden. Ferner konnten das lästige Umgiessen aus grossen Gefässen und ebenfalls das sehr unbequeme Filtriren von ätherischen Cholesterinlösungen vermieden werden. Eine Verwendung von absolutem Aether, der zwar auch bei Bömer's Verfahren deshalb den Zweck nicht völlig erfüllt, weil bekanntlich palmitin- und stearinsaures Alkali nicht ganz unlöslich sind, ölsaures Alkali aber sich in ziemlich beträchtlicher Menge in Aether löst, ist nicht erforderlich. Als Hauptvorthheil meines Verfahrens möchte ich den mit der Anwendung von Kochsalz verbundenen bezeichnen. Von der Erwägung ausgehend, dass in einer wässrigen Kochsalzlösung gewisser Concentration die Seifen unlöslich sind, habe ich die Seife vor der Extraction mit Kochsalz innig gemischt, um möglichst zu verhüten, dass während der Extraction Seife in den Aether, der selbstverständlich nicht wasserfrei ist, übergeht.²⁾ Aus den

1) Die übrigen Methoden ziehe ich nicht noch einmal zum Vergleich heran. Das hat seinen Grund darin, dass dieselben, wie aus den früher von mir gemachten Darlegungen hervorgeht, in der Brauchbarkeit gegenüber Bömer's Methode zurückstehen.

2) Da die Seife nicht absolut trocken ist, so würde selbst bei Anwendung von absolutem Aether derselbe im Laufe der Operation wieder Wasser aufnehmen.

von mir gemachten Beobachtungen geht hervor, dass dieser Zweck sich auch erreichen liess. Der Zusatz von Kochsalz kann selbstverständlich auch dadurch günstig wirken, dass er der mit Aether zu extrahirenden Masse eine grössere Lockerheit gibt. Doch kann man das Kochsalz nicht ohne Nachtheil durch beliebige andere Lockerungsmittel, z. B. Sand oder Papier ersetzen;¹⁾ denn es scheint, dass das Kochsalz durch eine von ihm ausgeübte specifische Wirkung den Uebergang des Cholesterins in den Aether befördert. Wie dies zu erklären ist, vermag ich freilich nicht mit Sicherheit zu sagen. Ich erinnere hier an die Wirkung, welche Schütteln mit Kochsalzkrystallen auf die in einer ätherischen Lecithinlösung entstandene Emulsion ausübt.²⁾

Man könnte einwenden, dass es gleichgültig wäre, wenn auch mehr Seife in das Extract gelangen würde, da man sie nachher durch Auswaschen mit Wasser wieder entfernen kann. Dabei ist aber zu beachten, dass durch die auf diese Weise gebildete Seifenlösung Verluste verursacht werden können, da ja Cholesterin bekanntlich in nicht zu verdünnten Seifenlösungen nicht unlöslich ist. Zu den Vorzügen meines Verfahrens rechne ich auch die Art und Weise, wie ich die Cholesterine durch Ausfällen mit Wasser aus alkoholischer Lösung von Beimengungen befreie, die bei Behandlung der Seife mit Aether in den letzteren übergegangen sein können.

Das nach meinem Verfahren gewonnene Produkt kann, wenn es auch reiner ist als die nach den bisher beschriebenen Methoden erhaltenen Produkte, doch nicht für absolut reines Phytosterin erklärt werden: denn es ist ja möglich, dass in manchen Untersuchungsobjecten das Phytosterin von Substanzen begleitet wird, die durch die angewendeten Operationen nicht von letzterem getrennt werden können. Nun drängt sich der Gedanke auf, dass man auf die nach meinem Verfahren ge-

1) Die gepulverte Seife wird auch, wenn man kein Kochsalz zusetzt, ohne Schwierigkeit vom Aether durchdrungen: trotzdem ist die Extraction ohne Kochsalz keine vollständige.

2) Vergl. E. Schulze und A. Likiernik, Ueber das Lecithin der Pflanzensamen (Zeitschr. f. physiol. Chemie, 1891, 405).

wonnenen Produkte die Methoden anwenden kann, die von K. Obermüller¹⁾ und von Lewkowitsch²⁾ zur quantitativen Bestimmung von Cholesterin vorgeschlagen worden sind. Die Methode von Obermüller gründet sich auf die Fähigkeit der Cholesterine,³⁾ 2 Atome Brom zu addiren. Lewkowitsch hat 2 Methoden vorgeschlagen:

1. Cholesterin wird mit Acetanhydrid vollständig acetyliert, dann durch Bestimmung der Köttsdorfer'schen Verseifungszahl die Quantität des Cholesterins ermittelt.

2. Cholesterin wird nach der Hübl'schen Methode vollständig jodirt und dann die Hübl'sche Jodzahl bestimmt.

Inwieweit die Resultate, die bei Anwendung dieser Methoden auf das von mir gewonnene Produkt sich erhalten lassen, auf Genauigkeit Anspruch machen können, weiss ich freilich nicht zu sagen, da ich Versuche darüber nicht angestellt habe.

1) Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XVI, S. 143.

2) D. chem. Ges. Ber. 25, 65.

3) Trifft bei Koprosterin nicht zu.