

Universitäts- und Landesbibliothek Tirol

Ueber eine Mikro-Phytosterinacetatprobe und Versuche zur Adsorptionsanalyse

**Kofler, Ludwig
Schaper, Edith**

Stuttgart, 1935

Krystalloptische Untersuchung

auf jedes Mikroskop mit Metalltisch aufgesetzt werden kann, besteht im wesentlichen aus einer elektrisch heizbaren Metallplatte, die durch einen am Rand angebrachten Metallring und eine aufgelegte Glasscheibe von der äußeren Luft abgeschlossen ist. Eine kleine Oeffnung in der Mitte der Heizplatte ermöglicht den Durchtritt des Lichtes. Das Thermometer, das von außen her in eine an der Heizplatte seitlich angebrachte Bohrung eingeführt wird, ist am Apparat selbst mit Hilfe scharf schmelzender Substanzen so geeicht, daß es korrigierte Schmelzpunktwerte ablesen läßt. Die für die Mikro-Schmelzpunktbestimmung benötigte Substanzmenge ist sehr gering; häufig genügt ein Millionstel Gramm oder noch weniger. Eine vorangehende Trocknung der Substanz im Exsiccator ist in der Regel nicht notwendig, da die in der lufttrockenen Substanz vorhandene geringe Feuchtigkeitsmenge beim Erwärmen zwischen Deckglas und Objektträger leicht entweichen kann.

Unter dem Mikroskop läßt sich der Schmelzvorgang genauer verfolgen als bei der üblichen Schmelzpunktbestimmung im Capillarröhrchen. Wenn man bei der Fettuntersuchung ein Gemisch von Cholesterin- und Phytosterinacetaten auf seinen Schmelzpunkt prüft, sieht man bei der Mikromethode keinen einheitlichen Schmelzpunkt. Bei der Beurteilung der Fette sind naturgemäß nur die hochschmelzenden Anteile des Gemisches maßgebend; für praktische Zwecke wird daher der Schmelzpunkt der zuletzt schmelzenden Krystalle angegeben.

Um über die Vorgänge, die sich unter dem Mikroskop abspielen, Klarheit zu gewinnen, hielten wir eine genauere Untersuchung für angebracht. Nach Bömer⁴⁾ bilden Cholesterin- und Phytosterinacetat-Gemische keine isomorphen Mischungen, krystallisieren daher nicht zusammen, sondern entmischen sich. Es fiel uns jedoch auf, daß in Gemischen beider Acetate mehrere Krystallarten mit verschiedenen Schmelzpunkten auftraten. Wir ersuchten daher Frau Dr. A. Kofler um die Durchführung einer krystalloptischen Untersuchung.

Krystalloptische Untersuchung.

Das für diese krystalloptische Untersuchung verwendete Material wurde durch Abkühlen heißer alkoholischer Lösungen in kleinen Röhrchen oder durch Verdunsten eines Tropfens der gesättigten Lösung auf dem Objektträger erhalten. Sowohl Cholesterinacetat und Phytosterinacetat allein als auch Gemische der beiden Acetate in verschiedenen Mengenverhältnissen wurden untersucht.

Ueber das Cholesterinacetat finden sich bereits in einer Arbeit von Reinitzer⁵⁾ Angaben, die teils von Zepharovich, teils von Lehmann stammen. Zepharovich beschrieb die Cholesterinacetat-Krystalle als quergestellte monokline Nadeln. Lehmann hat 3 Modifikationen festgestellt:

1. *Modifikation* wird beim Krystallisieren aus Lösungsmitteln erhalten; es sind die monoklinen, von Zepharovich gemessenen Krystalle. Beim Erwärmen werden die Krystalle trübe und zerfallen in ein Haufwerk von Krystallen der 3. Modifikation.

2. *Modifikation* entsteht beim raschen Erkalten des Schmelzflusses in Sphärokrystallen; bei Zusatz von Xylol sind auch einzelne rautenförmige Krystalle mit einem spitzen Winkel von 63° erhältlich. Beim Erhitzen werden die Krystalle trübe und wandeln sich ebenfalls in die 3. Modifikation um.

3. *Modifikation* entsteht beim Erwärmen der 1. und 2. Modifikation und bei langsamem Abkühlen aus der

Schmelze; keine bestimmbar Krystalle, nur längliche Rechtecke mit symmetrischer Auslöschung.

Bei unseren Untersuchungen gingen wir vom „Cholesterin Merck“ aus. Aus Lösungen des Cholesterinacetats entstanden vorzugsweise schöne rechteckige oder pyramidal abgeschlossene, prismatische Krystalle, die gerade Auslöschung und die Schwingungsrichtung α' in der Längsrichtung besitzen. Die Achsenebene verläuft parallel der Längsrichtung, der optische Charakter ist positiv und der Achsenwinkel groß. Diese Krystalle sind mit denen, die Zepharovich als quergestellte monokline Nadeln beschrieb, identisch. Beim Erhitzen tritt ungefähr bei 80 bis 90° eine Veränderung der Krystalle ein; sie verlieren die einheitliche Auslöschung und wandeln sich in ein Aggregat der stabilen Modifikation um. In manchen Fällen unterbleibt die Umwandlung, dann schmilzt der Krystall bei 94°. Häufig krystallisiert der entstandene Tropfen sofort als ein Aggregat strahlig angeordneter Krystalle aus. Bei weiterem Erhitzen schmelzen die umgewandelten Krystalle bei 112 bis 114°.

Neben den prismatischen Krystallen findet man sehr dünne rautenförmige Krystalle mit einem spitzen Winkel von 72° und große dünne Platten. Die Doppelbrechung ist sehr gering, oft an der Grenze der Bestimmbarkeit; die Rauten haben wahrscheinlich symmetrische Auslöschung und die Schwingungsrichtung γ' in der Richtung der kurzen Diagonale. Die Achsenebene liegt in der Richtung der längeren Diagonale; öfters ist der Austritt einer optischen Achse zu beobachten. Der optische Charakter ist positiv, der Achsenwinkel groß. Auch auf den Platten erhält man häufig den Austritt einer optischen Achse. Beim Erhitzen bleiben die Krystalle bis 108° unverändert, bei etwa 108° scheint eine geringe Menge von Flüssigkeit über die Platten oder größeren Rauten zu laufen. Im Polarisationsmikroskop ist gleichzeitig mit diesem Vorgang eine Strukturänderung zu erkennen; die Platten zerfallen in garbenartig angeordnete Krystallverbände, die Ränder der Platten werden dabei leicht gezähnt. Im gewöhnlichen Licht kann man diese Veränderung meist kaum wahrnehmen, da die Krystalle nach der Umwandlung an Durchsichtigkeit fast nichts verloren haben. An ganz dünnen Rauten, die nur schwach aufhellen, ist eine Veränderung auch im polarisierten Licht nicht wahrnehmbar. Das Schmelzen beginnt bei 112°, bei 114° ist der Hauptteil geschmolzen. Schaltet man die Heizung bei 114° aus, so wachsen bei geringem Sinken der Temperatur die wenigen in der Schmelze verbliebenen Schollen sofort wieder. Die Schollen verschwinden bei 114,5 bis 115°.

Nach dem Verhalten während des Erhitzens und beim Schmelzen müssen die Rauten und die großen dünnen Platten als identisch angesehen werden.

Bei raschem Abkühlen der Schmelze entsteht ein strahliges Aggregat, daneben bilden sich im gewöhnlichen Licht vollkommen durchsichtig erscheinende Massen, die sich zwischen gekreuzten Nikols aber als ein Konglomerat von zackig begrenzten Einzelindividuen mit schwarzen Kreuzen wie bei Sphärokrystallen erweisen. Von Lehmann sind diese Konglomerate beschrieben worden. Er fand bei genauerer Untersuchung, daß diese Konglomerate aus Tropfen bestehen, die nur durch feine Krystalle eine zackige Umgrenzung erhalten. Das Cholesterinacetat liefert nämlich beim Abkühlen nacheinander zwei krystallin-flüssige Modifikationen, die zweite wird durch Druck auf das Deckglas ausgelöst und zeigt optisches Drehungsvermögen⁶⁾. Beim Erhitzen wandeln sich die strahligen Aggregate und die aus Tropfen bestehenden Konglomerate bei 90 bis 100° in ein körniges Aggregat um, das bei weiterem Erhitzen bei 112° zu schmelzen beginnt und bei 114 bis 115° durchgeschmolzen ist. Oft krystallisiert bereits beim Absinken der Temperatur auf 114° ein Teil aus.

*

⁴⁾ A. Bömer, Z. Unters. Nahrsg.- u. Genußmittel 1901, 4, 1070.

⁵⁾ F. Reinitzer, Mh. Chem. 1888, 9, 428.

⁶⁾ F. Rinne u. N. Berek, Anleitung zu optischen Untersuchungen mit dem Polarisationsmikroskop, Leipzig 1934, S. 271.

Als Beispiel für ein Phytosterin verwendeten wir das „Phytosterin Merck“. Das Präparat, über das wir verfügen, ist nach freundlicher Mitteilung der Firma identisch mit der Substanz, die Windaus und Brunken⁷⁾ untersuchten und als reines Sitosterin erkannten. Sitosterin ist bekanntlich das in den pflanzlichen Fetten am häufigsten auftretende Sterin.

Das Phytosterinacetat bildet bei der Krystallisation aus 96proz. Alkohol zweierlei Krystallsorten, und zwar nadelförmige und plattenförmige Krystalle. Die Nadeln sind entweder zu baumartigen Aggregaten oder besonders häufig zu kugeligen, radiärstrahligen Aggregaten vereinigt. Wegen der Kleinheit konnte an den Nadeln nur die Lage der Schwingungsrichtung, α' in der Längsrichtung, und kein anderes optisches Merkmal bestimmt werden. Die Nadeln schmelzen bei 127 bis 128°. Bei Wiedererhitzen nach völligem Erstarren schmelzen sie ebenfalls bei 127 bis 128°.

Die plattenförmigen Krystalle sind sehr dünn; Einzelkrystalle in der Form von Rauten mit einem spitzen Winkel von 72° sind häufig zu finden. Die Doppelbrechung ist sehr gering, die Auslöschung wahrscheinlich symmetrisch und die Schwingungsrichtung γ' in der Richtung der kurzen Diagonale; häufig erscheint im Konoskop eine optische Achse. Beim Erhitzen der Platten und Rauten tritt bei 116° eine Umwandlung ein, bei der gleichzeitig etwas Schmelzflüssigkeit aufzutreten scheint. Die Krystalle beginnen bei 122 bis 123° zu schmelzen. Einige Platten sind bei 124° durchgeschmolzen, andere erst bei 126°. Am häufigsten bleiben in der Schmelze Schollen bestehen, die sich bei Konstanthalten der Temperatur auf 126° nicht verflüssigen. Erst bei 127 bis 129° verschwinden die restlichen Schollen. Beim Erstarren durch rasches Abkühlen bilden sich beim Phytosterinacetat ähnlich wie beim Cholesterinacetat neben festen strahligen Aggregaten auch aus Tropfen bestehende Konglomerate, deren polygonal begrenzte Einzelindividuen zwischen gekreuzten Nikols winzige Sphäritenkreuze zeigen. Offenbar handelt es sich bei letzteren um das Auftreten einer krystallinen flüssigen Modifikation. Erwärmt man das Erstarre auf 114 bis 116°, so wandeln sich die krystallin-festen strahligen Aggregate und krystallin-flüssigen Konglomerate in körnige Aggregate um, was sich im gewöhnlichen Licht öfters durch Trübung zu erkennen gibt. Beim weiteren Erhitzen beginnt wieder bei 122° ein Teil zu schmelzen, der Rest verflüssigt sich erst bei 127 bis 128°. Aus diesen Beobachtungen geht hervor, daß auch das Phytosterinacetat zwei krystallin-feste Modifikationen und eine krystallin-flüssige bildet. Wahrscheinlich sind die stengeligen Krystalle und die durch Umwandlung aus den Platten entstehenden Krystalle identisch.

Aus Mischungen von 95% Cholesterin- und 5% Phytosterinacetat erhält man aus Lösungen in 96proz. Alkohol wieder nadelförmige Krystalle, Platten und Rauten. Oefters ist an den Rauten Zwillingsstreifung zu erkennen. Die Rauten besitzen dieselbe optische Orientierung, wie sie bei den Rauten des Cholesterin- und Phytosterinacetats beschrieben wurde. Die einzelnen Krystalle schmelzen nicht vollkommen gleichzeitig. Die ersten Schmelztropfen erscheinen bei 110°; andere Krystalle schmelzen bei 112° vollständig durch. Der Hauptteil beginnt bei 112° zu schmelzen; die Rauten und die größeren Stengel bilden bei 112° einen Hof von Schmelzflüssigkeit. Stellt man die Heizung ab, so wächst bei Sinken der Temperatur um $\frac{1}{2}$ ° der Kern sofort wieder bis fast zum Rand; hält man die Temperatur längere Zeit auf 112°, so schmilzt der Kern nicht. Bei 114° kann man den Vorgang ähnlich wiederholen, nur ist der Kern wesentlich kleiner geworden. Erst bei 115° bis 116° ist alles durchgeschmolzen.

Bei dem Acetatgemenge aus 90% Cholesterin und 10% Phytosterin treten wieder Platten und Rauten sowie stengelige Krystalle auf. Häufig sieht man Platten mit glänzenden Randleisten; an den Rauten ist

Zwillingsstruktur nicht selten. Beim Erhitzen erscheinen wieder bereits bei 110° einige Schmelztropfen. Die größeren Rauten beginnen bei 112° am Rand zu schmelzen, bei 113 bis 115° schmilzt der Hauptteil, die übrig bleibenden Schollen wachsen bei geringem Sinken der Temperatur sofort wieder weiter; der Kern schmilzt aber erst bei 116 bis 118° vollkommen durch. Einzelne isolierte Stengel schmelzen ziemlich scharf bei 118°. Beim Erstarren durch rasches Abkühlen entstehen aus der Schmelze radiärstrahlige Aggregate, die sich ab 110° in ein körniges Aggregat umwandeln und bei 118° ziemlich scharf schmelzen.

Bei den Acetaten aus 80% Cholesterin und 20% Phytosterin erhält man ähnliche Krystalle wie bei den obigen Gemengen: Rauten, Platten mit glänzenden Randleisten, nadelförmige Krystalle in baumartigen, undurchsichtigen Aggregaten. Das Schmelzen beginnt bei 114°, ein großer Teil schmilzt bei 115 und 116°, die letzten Schollen in Platten und Stengeln schmelzen bei 119 bis 120°. Bei raschem Abkühlen bilden sich Aggregate strahliger Krystalle und schollige, unregelmäßig begrenzte krystalline Massen mit undulöser Auslöschung; bei etwa 112° scheint eine Umwandlung vor sich zu gehen, bei 119 bis 120° ist alles geschmolzen.

75% Cholesterin- und 25% Phytosterinacetat zeigen keinen wesentlichen Unterschied gegenüber dem vorhergehenden Gemenge. Das Schmelzen beginnt bei 114°, bei 116 bis 118° ist der Hauptteil geschmolzen, der Rest bei 119 bis 120°.

Die Schmelze erstarrt zu teils grobkörnigen, teils stengeligen Aggregaten. Einzelne rundlich begrenzte Krystalle haben fast einheitliche Auslöschung und lassen im Konoskop die 1. Bisektrix mit mittelgroßem Achsenwinkel und optisch positiven Charakter erkennen. Beim Wiedererhitzen treten in den erstarrten, grobscholligen Massen bei ungefähr 115° Sprünge auf, bei 118 bis 119° schmelzen sie. In den faserigen Aggregaten erscheint schon bei 110° Flüssigkeit, die allmählich zunimmt, aber erst bei 119 bis 120° ist alles vollständig durchgeschmolzen.

Bei 50% Cholesterin- und 50% Phytosterinacetat bilden sich wieder Platten mit glänzenden Randleisten, daneben Rauten mit Zwillingsstruktur. Die ersten Schmelztropfen erscheinen bei 115°, stärkeres Schmelzen tritt bei 119° ein, bei 124° ist der Hauptteil geschmolzen; gleichzeitig wachsen in den Schmelztropfen einzelne Rauten. Die letzten Schollen schmelzen bei 125 bis 126°. Unterbricht man das Heizen bei 124°, so krystallisiert bei geringer Abkühlung rasch ein Teil der Schmelze an den Schollen und Rauten aus. Bei weiterem Erhitzen auf 125 bis 126° verschwindet der letzte Rest. Beim Erstarren durch rasches Abkühlen auf 120° krystallisieren strahlige Aggregate oder übereinander gelagerte plattenförmige Krystalle aus. Beim Wiedererhitzen schmelzen einige Aggregate schon bei 122° durch, andere erst bei 126°.

Acetatgemische von 25% Cholesterin und 75% Phytosterin bilden in der Hauptmenge große Platten mit mehreren aufgelagerten, orgelpfeifenartig parallel gestellten, glänzenden Leisten. Die Auslöschung der Platten liegt zu der der Stengel schief; die Leisten haben die Schwingungsrichtung α' in der Längsrichtung. Die Leisten beginnen bei 126° zu schmelzen, sind bei 127° geschmolzen und liegen als kleine Tröpfchen auf den Platten. Die Platten selbst schmelzen erst bei 128 bis 129°. Aus der Schmelze erhält man unregelmäßig begrenzte schollige Krystalle oder Rauten und radiärfaserige Aggregate.

Gemische von 90% Phytosterin- und 10% Cholesterinacetat bilden baumartige, undurchsichtige Aggregate und Platten. Die Krystallbäume beginnen bei 124° zu schmelzen und sind bei 128° durchgeschmolzen. Die Platten schmelzen ziemlich scharf bei 128 bis 129°. Das Erstarre liefert rundliche strahlige Aggregate, die bei 125° zu schmelzen beginnen. Einige Aggregate sind bei 126° durchgeschmolzen, andere schmelzen erst bei 128 bis 129° durch.

⁷⁾ A. Windaus u. J. Brunken, Z. physiol. Chem. 1924, 140, 109.

Vergleicht man die Temperaturen miteinander, bei denen vollständige Verflüssigung eintritt, so liegen die Schmelzpunkte der Mischungen im verschiedenen Mengenverhältnis auf einer vom Schmelzpunkt des Cholesterinacetates zu dem des Phytosterinacetates allmählich ansteigenden Kurve, wie sie bei Mischungen isomorpher Substanzen vorkommen kann. Von Bömer^{*)} wurde seinerzeit angegeben, daß die beiden Acetate keine isomorphen Mischungen miteinander bilden, sondern daß die Gemenge bei der Krystallisation sich entmischen. Das Auftreten mehrerer Modifikationen, von denen besonders die in Platten krystallisierenden Modifikationen der beiden Komponenten außerordentlich ähnlich sind, erschwert diese Frage ungemein. Eine geringe Löslichkeit der anisotropen Komponenten ineinander wäre denkbar. Nur eingehendes Studium der Schmelzkurven und Polymorphieverhältnisse kann zur vollständigen Klärung führen. Die eigenartigen, orientierten Verwachsungen, wie sie bei ungefähr gleichprozentigen Mischungen der beiden Acetate in Form von Platten mit aufgelagerten, parallel gestellten, stengeligen Krystallen auftreten, deuten auf eine Annäherung des Feinbaues beider Stoffe hin, die aber den Grad einer vollkommenen Isomorphie nicht erreicht.

Das Auftreten von Schmelztropfen unterhalb des zu erwartenden Schmelzpunktes kann verschiedenartig erklärt werden. Bei reinem Cholesterinacetat rühren die Schmelztropfen unter 100° offenbar von der bei 94 bis 96° schmelzenden, instabilen monoklinen Modifikation her. Bei Gemengen mit steigendem Phytosterinacetatgehalt findet man fast immer bereits Schmelztropfen bei einer Temperatur, die unterhalb des Schmelzpunktes des Cholesterinacetates liegt, die jedoch von der des Schmelzpunktes der instabilen monoklinen Modifikation abweicht. Ob es sich hier um ein Schmelzen von instabilen Modifikationen oder etwa um Mischschmelzpunkte bestimmter Formen handelt, konnte nicht entschieden werden.

Für die praktische Durchführung der Mikro-Phytosterinacetatprobe brauchen diese verwickelten Krystallisationsverhältnisse nicht berücksichtigt zu werden; es genügt, wie oben schon erwähnt, den Schmelzpunkt der zuletzt schmelzenden Krystalle abzulesen.

Versuche mit der Mikro-Phytosterinacetatprobe.

Nach der beschriebenen Methode prüfen wir eine Anzahl unvermischter Fette und Öle. Das Schweinefett und Mandelöl wurden selbst gewonnen, die übrigen Fette und Öle bezogen wir aus dem Handel.

Die angegebenen Mikro-Schmelzpunktswerte entsprechen der zweiten Krystallisation und beziehen sich jedesmal auf den zuletzt schmelzenden Anteil des betreffenden Sterinacetates. Bei den Sterinacetaten aus unvermischten tierischen oder pflanzlichen Fetten glaubt man nicht selten einzelne Krystalle oder Krystallaggregate schon vorher teilweise schmelzen zu sehen. Ob es sich um die oben für Cholesterin- und Phytosterinacetat beschriebenen Umwandlungsvorgänge oder um ein wirkliches Schmelzen oder um beides handelt, haben wir bei den einzelnen Fetten nicht genauer verfolgt.

Zum Vergleich sind in Tabelle 1 die von Allan und Moore^{*)} nach dem üblichen Verfahren erhaltenen Makro-Schmelzpunkte der Sterinacetate angeführt. Die Übereinstimmung der Makro- und Mikro-

werte ist gut, obwohl wir uns schon mit der 2. Krystallisation begnügten, während es sich bei den Werten von Allan und Moore beim Sonnenblumenöl um die 3., bei ihren anderen Ölen um die 4. Krystallisation handelt.

Tabelle 1.

Fett	Mikro-Schmelzpunkt (°C)	Makro-Schmelzpunkt nach Allan und Moore (°C)
Dorschlebertran	113	—
Butter	114	—
Schweinefett	114,5	—
Sonnenblumenöl	119,5	119 und 119,25
Mandelöl	123 bis 125	—
Olivenöl	125	123,5
Baumwollsaamenöl	125,5	125,5
Sesamöl	127	129,5
Erdnußöl	128	129
Rüböl	128	—
Ricinusöl	128	—
Cocosfett (Palmin)	128,5	129,5
Sojaöl	129	—
Leinöl	131	131

Die Beobachtungen von Allan und Moore, daß eine Mischung aus annähernd gleichen Teilen von Cholesterinacetat und Acetylsterinacetat des Phytosterins aus Sonnenblumenöl höher schmilzt als das unvermischte Sonnenblumensterin-Acetat, konnten wir auch bei der Mikromethode bestätigen. Diese auffallende Tatsache regte uns an, die Schmelzpunkte verschiedener Mischungsverhältnisse zu bestimmen. Wir isolierten zunächst aus Sonnenblumensamenöl das Digitoninsterid und stellten Mischungen mit Cholesterin Merck her unter Berücksichtigung der Tatsache, daß 1 Teil Phytosterin ungefähr 4 Teilen Digitoninsterid entspricht. Nach Acetylierung in der oben beschriebenen Weise wurde das erhaltene Acetat dreimal im Röhrchen mit 50proz. Alkohol gewaschen und dann aus 96proz. Alkohol einmal umkrystallisiert. Eine weitere Krystallisation unterließen wir, um einen größeren Verlust an Cholesterinacetat zu vermeiden. Trotzdem sind wir uns bewußt, daß sich das Mischungsverhältnis auch durch einmaliges Umkrystallisieren geringfügig zugunsten des Phytosterinacetates verschiebt. Infolgedessen stellen die unten angegebenen Prozente des Mischungsverhältnisses nur Annäherungswerte dar.

Die höchsten Schmelzpunkte erhält man, wie Tabelle 2 zeigt, bei Krystallisationen aus ungefähr gleichen

Tabelle 2.

Sonnenblumensterin-Acetat (%)	Cholesterinacetat (%)	Mikro-Schmelzpunkt (°C)
100	0	119,5
10	90	118,5
20	80	120,5 bis 121
30	70	122,5
50	50	124
65	35	122 bis 122,5
80	20	118,5
90	10	118
0	100	114

Teilen Cholesterin- und Sonnenblumensterin-Acetat. Der Schmelzpunkt liegt 4,5° höher als der des reinen Sonnenblumensterin-Acetates.

^{*)} J. Allan u. Ch. W. Moore, J. Soc. chem. Ind., Chem. & Ind. 1927, 46, 433.