Zeitschrift

für

Untersuchung der Nahrungs- und Genußmittel, sowie der Gebrauchsgegenstände.

Heft 11.

1. Juni 1917.

Band 33.

Zur Technik der Abscheidung gebundener Sterine und das Digitoninausfällungsverfahren nach Marcusson-Schilling.

Von

Dr. J. Prescher.

Mitteilung aus dem Staatlichen chemischen Untersuchungsamte für die
Auslandsfleischschau in Cleve (Vorsteher: Dr. M. Fritzsche).

[Eingegangen am 11. April 1917.]

Klostermann und Opitz haben in dieser Zeitschrift¹⁾ darauf hingewiesen, daß für den Nachweis pflanzlicher Fette in tierischen zur Isolierung der Sterine die vorherige Verseifung nicht zu umgehen sei, weil der Anteil an gebundenem Phytosterin in den pflanzlichen Fetten bedeutend größer als der an Cholesterin in Tierfetten sei. Wie aus den von Olig²⁾ mitgeteilten Untersuchungsergebnissen hervorgeht, ist dies aber im allgemeinen für den qualitativen Nachweis von Zusätzen pflanzlicher Fette zu tierischen beim Digitoninausfällungsverfahren nicht unbedingt erforderlich, weil, wie auch aus der Tabelle von Klostermann und Opitz ersichtlich ist, erwartet werden kann, daß die Mengen des in freier Form in Pflanzenölen enthaltenen Phytosterins dessen Nachweis bis auf wenige Ausnahmefälle ermöglichen.

Die Methode dieser Abscheidung der Sterine aus den Fettsäuren ist von Kühn und Wewerinke³⁾ inzwischen in eine einfachere, für fleischschauamtliche Untersuchungen schneller durchführbare Form gekleidet worden, indem sie die aus der Kaliseife abgeschiedenen Fettsäuren unter Umgehung der weiteren Behandlung mit Äther und Petroläther direkt zur Digitoninfällung benutzen, nachdem sie festgestellt hatten, daß sämtliches Sterin in den von der Unterlauge getrennten Fettsäuren enthalten war.

Diese Abänderung ist als nicht nur zweckmäßig anzusehen, sondern sie verbilligt auch nicht unwesentlich das ganze Verfahren.

Von der Herstellung der Fettsäuren ausgehend, habe ich nun versucht, auch den z. Z. im Preis ungewöhnlich hochstehenden Alkohol entbehrlich zu machen, indem ich die Verseifung mit wässriger Lauge durchführte und die nach Lösung der erhaltenen Seife in heißem Wasser mit Salzsäure abgeschiedenen Fettsäuren in ähnlicher Weise, wie dies Kühn und Wewerinke empfehlen, der weiteren Behandlung unterwarf.

¹⁾ Diese Zeitschrift 1914, 28, 143; auch 1913, 26, 433 und 1914, 27, 713.

²⁾ Diese Zeitschrift 1914, 28, 137.

³⁾ Diese Zeitschrift 1914, 28, 377.

Ich verfuhr auf folgende Weise:

43 g Fett wurden unter allmählichem Zusatz von 58 g Kalilauge (1,34) und 100 g einer 4%-igen Kaliumcarbonatlösung in der Weise verseift, daß das in einer eisernen Schale¹⁾ mit Griff über der Gasflamme geschmolzene Fett zunächst mit 20 g der 15%-igen Kalilauge, verdünnt mit der doppelten Gewichtsmenge Wasser, unter häufigem Rühren mit einem Glasstabe einige Zeit mäßig gekocht wurde. Dieser erste Arbeitsgang bezweckt zunächst die Darstellung einer Emulsion, die im allgemeinen spätestens innerhalb einer halben Stunde erfolgt sein wird. Sobald die Verbindung zwischen Lauge und Fett einigermaßen hergestellt ist, erhitzt man nach Zugabe von warmem Wasser (zwecks Ersatzes des durch Verdunstung verloren gegangenen) stärker (bis zum Sieden), wodurch eine vollständigere Bindung des Alkalis durch die Fettsäuren erzielt wird. Durch weitere Zugabe von 20 g Kalilauge wird der Verband immer dicker, sodaß man jetzt zweckmäßig einen Teil der erwärmten Kaliumcarbonatlösung zusetzt, um die zähe gewordene Masse zu lockern. Schließlich gibt man den Rest Lauge und den Rest Kaliumcarbonatlösung hinzu und führt unter gelindem Kochen die Verseifung zu Ende, sodaß die gesamte Behandlung nach Verlauf einer Stunde als beendet gelten kann. Es ist nicht unbedingt notwendig, die restlose Verseifung durchzuführen, da, wie auch schon Klostermann²⁾ erwähnt hat, es nichts zu bedeuten hat, wenn etwas Fett unverseift bleibt, weil es ja auf die quantitative Ausbeute hier nicht ankommt.

Der zweite Arbeitsgang bezweckt die Abscheidung der Fettsäuren. Nach Zugabe von heißem Wasser zum verseiften Fett spült man in ein etwa 400—500 ccm fassendes Becherglas über, stellt dieses auf ein Drahtnetz, ergänzt durch Wasser auf 350—450 ccm und erhitzt bis nahe zum Sieden. Auf Zusatz von 25—30 ccm Salzsäure (1,124) scheiden sich die Fettsäuren vollständig ab. Die Abtrennung von der Unterlauge erfolgt in der von Kühn und Wewerinke³⁾ beschriebenen Weise. Man kann die Fettsäuren aber auch in einem Scheidetrichter von etwa 250 ccm Rauminhalt nach möglichster Trennung von der Glycerin-Chlorkaliumlösung mit 20 ccm Chloroform versetzen, wobei allenfalls noch vorhandenes Waschwasser⁴⁾ abgestoßen wird und sich oberhalb der spezifisch schwereren Chloroform-Fettsäurenlösung (Dichte etwa 1,13) sammelt. Das durch die Trichtermündung auf ein trockenes Filter gegebene Fett-Chloroform-Gemisch wird in das zugleich als Fällungsgefäß zu benutzende Becherglas von 100 ccm Rauminhalt klar abfiltriert und nach dem Erwärmen seines Inhaltes auf 50° mit der ebenso warmen alkoholischen Digitoninlösung versetzt.

Auf die Fällung hat die zeitige Zugabe von Chloroform keinerlei nachteiligen Einfluß, denn wie schon Kühn und Wewerinke durch den Versuch bewiesen haben, bewirkt Chloroform, wie man sich selbst leicht überzeugen kann, keine Ausfällung des Digitonins aus seiner 1%-igen alkoholischen Lösung.

Von der Tatsache ausgehend, daß die Pflanzenfette bedeutend mehr Phytosterin enthalten als die Tierfette Cholesterin, haben Klostermann und Opitz bei ihren Phytosterinbestimmungen sich mit der Verseifung von 10 g, bei stärker phytosterin-

¹⁾ Ich fand Tiegel von 6 cm Höhe und 10—11 cm Durchmesser und etwa 400 ccm Rauminhalt geeignet.

²⁾ Diese Zeitschrift 1913, 26, 433.

³⁾ Diese Zeitschrift 1914, 23, 373.

⁴⁾ Starkes Ausschütteln der Fettsäuren mit Wasser ist zu vermeiden, weil trotz Chloroformzusatzes sonst die Bildung eines emulgierten Gemenges eintritt.

haltigen sogar von 5 g Fett genügen lassen. Für diese Fälle spielt der Chemikalienverbrauch kaum eine Rolle und würde daher die leichtere Verseifung mit alkoholischer Lauge vorzuziehen sein. Hierbei kann zur Gewinnung der Fettsäuren die bekannte Huggenberg'sche Scheidebürette benutzt werden, indem man den mit heißem Wasser verdünnten Seifenalkohol in die zuvor mit 20 bzw. 40 ccm 10 0/0-iger Schwefelsäure beschickte Bürette einträgt.

Eine Ausnahme in bezug auf Steringehalt bildet das phytosterinarme Cocosfett. Bei Fälschungen hiermit halten ebenso wie Klostermann auch Kühn und Wewerinke¹⁾ die Verarbeitung von mindestens 200 g für notwendig, wodurch, wenn man nach Klostermann arbeiten würde, nicht allein erhebliche Mengen Alkohol, Äther und Petroläther benötigt würden, sondern auch reichlich Digitonin. Eine Vereinfachung und Verbilligung der Verseifung würde sich bei Cocosfetten in der Weise erzielen lassen, daß man in das 55° warme Cocosfett hochprozentige Kalilauge von 1,333 spez. Gewicht einrührt und die eingeleitete Verseifung durch Zugabe von Kaliumcarbonatlösung vom spez. Gewicht 1,24 unterstützt. Auf alle Fälle würde man hier schon mit der Wasserbadwärme leicht zum Ziele gelangen.

Kühn, Bengen und Wewerinke²⁾ stellen zur Ausfällung der Sterine die alkoholische Digitonin-Fettsäurenlösung im unbedeckten Becherglas auf ein geschlossenes siedendes Wasserbad, indem sie von Zeit zu Zeit mit dem Glasstabe umrühren. Fritzsche³⁾ hatte Ausrühren mit der Turbine empfohlen, da er nicht die Fettsäuren, sondern die Fette selbst der Untersuchung unterwarf und diese zur innigen Berührung der alkoholischen Digitoninlösung mit den darin fast unlöslichen Fetten eine starke Bewegung erfordern.

Infolge zufälligen Versagens der Turbine und weil mir der Notbehelf der Ausschüttelung im Scheidetrichter nach Marcusson und Schilling⁴⁾ nicht recht gefallen wollte, nahm ich den Polenske'schen Rührer, wie ihn dieser Autor s. Z. beim Nachweis tierischer Fette in anderen tierischen Fetten⁵⁾ erfolgreich benutzte, zu Hilfe. Die Einrichtung des Polenske'schen Erstarrungspunkt-Bestimmungsapparates setze ich als bekannt voraus, sodaß die nähere Beschreibung sich erübrigt. Im übrigen verweise ich auf die in dieser Zeitschrift⁶⁾ wiedergegebene Zeichnung.

Von den verschiedenen Apparateteilen benötigt man bei der Digitonidausfällung den Luftmotor, den kleinen Rührer nebst Erstarrungsgefäß, den Luftmantel und, wenn man will, auch das Thermometer. Das Kühlgefäß kommt außer Betracht; da aber seine Entfernung die Stabilität der Apparatur stören würde, ändert man am besten nichts daran. Oben wurde bereits darauf hingewiesen, daß Klostermann und Opitz bei sehr phytosterinhaltigen und natürlich auch cholesterinhaltigen Fetten Mengen von 5 g für ausreichend halten. Hierher würden gehören von den pflanzlichen Ölen das Sesamöl, Mohnöl, Baumwollsamöl, Leinöl, Erdnußöl und, wenn man nicht vorzieht, bei der Ausfällung des Phytosterins aus den Fettsäuren sich auf die von Kühn, Bengen und Wewerinke empfohlene Abscheidung auf dem ge-

¹⁾ Diese Zeitschrift 1914, 28, 371.

²⁾ Diese Zeitschrift 1915, 29, 322.

³⁾ Diese Zeitschrift 1913, 26, 644.

⁴⁾ Chem.-Ztg. 1913, 37, 1001.

⁵⁾ Arbeiten a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte 1907, 26, 444—463.

⁶⁾ Diese Zeitschrift 1907, 14, 760.

schlossenen siedenden Wasserbade durch einfaches Umrühren mit dem Glasstabe zu beschränken, auch des Rüböls¹⁾; von den tierischen Fetten käme Lebertran in Frage.

Man füllt nun die Aufnahmeröhre (Polenske'sches Erstarrungsgefäß B) mit 5 g des Fettes oder der Fettsäure, die entsprechend ihrer Beschaffenheit auf eine für zweckmäßig erachtete Temperatur gebracht sind, gibt bis zum Strich, das wird 1 cm sein, 5 0/0-ige alkoholische Digitoninlösung nach Klostermann (je nach größer oder geringer zu erwartendem Steringehalt können es auch 2 und mehr cm sein) zu, setzt Kork mit Thermometer und Rührer auf, führt den Apparat in den mit warmem Wasser teilweise gefüllten Luftmantel ein, stellt die Verbindung des Rührers mit dem Motor her und setzt diesen in Tätigkeit. In gleicher Weise kann auch die von Fritzsche gewählte und von Sprinkmeyer und Diedrichs²⁾, sowie von Olig beibehaltene Temperatur von 60° bis 70° während des Ausrührens erzielt werden. Ob es an der Hand der etwa 1 cm oberhalb des Bodens des Polenske'schen Erstarrungsgefäßes befindlichen beiden geschwärzten wagerechten Parallelstriche möglich sein wird, aus der innerhalb einer bestimmten Zeit eintretenden Trübung infolge der Ausfällung der Sterine einen Schluß auf die ungefähre Menge letzterer zu ziehen, bedarf weiterer Überlegung und Beobachtung. Jedenfalls müßte hierbei für Digitonin ein Lösungsmittel gefunden werden, in welchem auch Fett oder wenigstens die jeweiligen Fettsäuren klar löslich blieben, in dem dagegen die Digitoninsteride quantitativ fällbar wären.

Zu meinen praktischen Versuchen habe ich talgähnliche tierische Fette benutzt und deren Mengen so gewählt, wie dies Fritzsche in seiner Arbeit über die Prüfung von tierischen Fetten auf Phytosterin in Vorschlag gebracht hatte, also 50 g. Zu der daraus oben beschriebenen Fettsäurengewinnung nahm ich 43 g in Angriff. Für solche Mengen kann natürlich das Polenske'sche Erstarrungsgefäß nicht in Betracht kommen, wohl aber ein 100 cm fassendes Becherglas.

An Stelle des Polenske'schen Erstarrungsgefäßes setzt man das Becherglas in den mit 75° heißem Wasser soweit beschickten Luftmantel ein, daß es völlig vom Wasser umgeben ist. Besitzt auch das Fett eine ähnliche hohe Temperatur, so kann man sicher sein, daß auch nach Zugabe der 20 cm warmer 1 0/0-iger alkoholischer Digitoninlösung die von Fritzsche als zweckmäßig empfohlene Temperatur von 60 bis 70° während des Rührens erhalten bleibt. Als Rührer dient in diesem Falle ein solcher aus Glas, nach Art der bei der Schmelzpunktbestimmung von Fetten benutzten. Legt man Wert darauf, während des Ausrührens der Digitoninsteride die Temperatur zu verfolgen, so findet sich für das hierzu einzuführende Beobachtungsthermometer innerhalb der ringförmigen Biegung des Rührers genügend Spielraum.

Erleichtert schon die Zugabe von Chloroform nach der Fällung das Abtrennen des Fettes vom voluminösen Digitonidniederschlag durch Absaugen, so wirkt die Gegenwart dieses Fettlösungs- und Verdünnungsmittels weiterhin beschleunigend auf die Abscheidung von Digitoninsterid während des Fällungsprozesses, indem die Berührung des Fettes mit Digitonin eine innigere wird. Aus diesem Grunde empfiehlt sich Erhöhung der Chloroformmenge auf zweimal 20 g. Wie Pfeffer³⁾ beschreibt,

¹⁾ Die Menge des Phytosterins in Esterform beträgt nach Klostermann und Opitz in 100 g Rüböl 296,4 mg gegenüber 48,6 mg freier Sterine.

²⁾ Diese Zeitschrift 1914, 28, 238.

³⁾ Diese Zeitschrift 1916, 31, 39.

schwimmen die nach der Kühn'schen Methode abgeschiedenen Digitoninsteride häufig oben in dem Reaktionsgemisch. Dies wird stets der Fall sein, wenn der Niederschlag locker beschaffen ist und infolge der spezifisch schwereren Fettsäuren dem an der Oberfläche sich ansammelnden Alkohol zuströmt. Um zu vermeiden, daß beim Absaugen auf der Nutsche die Filterporen sich verstopfen, wie diesen Übelstand Pfeffer [vergl. auch Wagner¹⁾] sehr richtig durch direkte Filtration der unverdünnten Fettsäuren ohne Anwendung von Druck durch ein glattes, am besten quantitatives Filter im Wassertrockenschrank zu beseitigen sucht, empfiehlt es sich vor allem, die Filtrirnutsche nebst Filter im Trockenschrank vorzuwärmen und letzteres durch Aufgießen warmem Chloroforms für das nun folgende Fettfreiwaschen des Niederschlags vorzubereiten. Die auch von Olig²⁾ erwähnten Nachteile bei Zugabe von rasch verdunstenden Fettlösungsmitteln, wie Äther und Petroläther unmittelbar nach dem Ausrühren des Digitonidniederschlags zur warmen Fettlösung, treffen für das Chloroform kaum zu; um sicher zu sein, daß keinerlei Fettspurenreste beim Nachwaschen mit Äther dem Filter mehr anhaften, lohnt es sich der Mühe, das von der Nutsche abgelöste Filter vor dem Trocken nochmals in ein mit Glasstopfen verschließbares Röhrchen (siehe Zeichnung) zu geben und nach Abspülung des Digitoninsterids mit Äther, dieses Gemisch nochmals auf einer Nutsche mit gehärtetem Filter nacheinander mit wenig Feinsprit, wenig Äther, wenig denaturiertem Alkohol und zuletzt wieder mit Äther zu behandeln³⁾.

Die Vornahme der Spaltung der komplexen Verbindung durch Essigsäureanhydrid und die Überführung des hierdurch frei werdenden Sterins in das Acetat erscheint mir nach der Kühn'schen Arbeitsweise — auch Pfeffer kocht in einem Reagensglase — nicht recht zweckmäßig. Ich empfehle vielmehr Erhitzen des Digitonids in einem trockenen, mit Steigrohr versehenen Probierrohr über kleiner Flamme, wie dies auch Fritzsche schon früher angegeben hat. Die für das hiesige Amt durch die Firma Paul Altmann in Berlin angefertigten Rohre mit Glasstopfen sind gleichzeitig als Zentrifugenrohre bei der quantitativen Bestimmung von Kartoffelstärke in Margarine verwendbar. Sie sind 12 cm hoch, ihr Durchmesser beträgt 26 mm. Zwecks Kochens am Rückflußkühler sind dieselben mit in den Schliff passenden Steigrohren von 70 cm Länge versehen (siehe die Zeichnung).

¹⁾ Diese Zeitschrift 1915, 30, 269.

²⁾ Vergl. auch diese Zeitschrift 1917, 33, 79.

³⁾ Diese Zeitschrift 1917, 33, 80.