

Sterin 系化合物の界面化学的研究 (続報)

佐 藤 均

Surface Chemistry of Association systems containing sterols.

(..... Fortsetzungsarbeit)

Oberflächen-chemische Studien über Dreikomponent
Assoziations Systeme von Sterin Verbindungen, und
ihres Adsorption Phänomenen auf dem flüßiges
Kohlenwasserstoff/Wasser Grenzflächen.

Von Hitoshi Sato

Mit 8 Text Abbildungen u. 2 Tabellen

(Eingegangen, nach Revision am 15 April 1977)

Zusammenfassung: Zuerst behandelt es hier um den Entwicklung der Cholesterin enthaltende mesomorpher Phasen durch Wechselwirkung von wäßrige Seifenlösungen mit feste Cholesterin Kristall. Löslichkeit des Sterins in Na-Kaprylat Lösugen bei 20°C wurde um Dreiecke Zustand-Diagramme aufzustellen, untersuchte.

Es kommt darauf an Solubilisierungsgleichgewicht zwischen Cholesterin enthaltende Mesomorpher Phasen und isotrope Naky-Lösungen zu untersuchen mittels von meist Phaseidentifizierung durch beide polar-und unpolar Mikroskop, Kleinwinkel Röntgenbeugungs Vakuumkamera und chemische Analyse des jedes Komponentes für abgetrenntene Mesophasen. Auch einige wesentliche medizinische Begleit-Stoffe wie Gallensäuresalz zB. Na-Cholat, Na-Taurocholol, die reagieren mit Sterinen wurde hier berücksichtigt. Schließlich mit Hilfe von Oberflächen-Spannungswaage studierte wir auch über Adsorption-sphänomene des Cholesterins auf dem unpolar Kohlenwasserstoff (wie n-C₇H₁₆)/Wasser Grenzflächen und berechnete Areal pro verschiedenen Sterinmoleküle, usw.

Einleitung und vergleichende Übersicht: Unsere früheren Erfahrungen über die Bildung mesomorpher saurerer Seifen zeigen, hat man mit prinzipiell gleichartigen Systemen auch dort zu tun, wo der Paraffinketten Alkohol wie Dekanol durch eine Verbindung mit Sterin-Körperbau, ersetzt wird. Dies dürfte auch für eben medizinische und biochemische wichtige wäßrige Lipoid Systeme zu treffen. Überdies, für uns es scheint intressant zu studieren, einfaches Eiweißstoff wie Grindes Serumalbumin oder Gallensäuresalz zB. Natriumtaurocholol sind möglich zu beschleunigen oder verhindern den Entwicklung der mesomorpher Phasen, die selber besteht aus Cholesterin-Seifen-Wasser, durch den Wechselwirkung mit Fettsäure Anionen. Wie unsere früheren Erkenntnis über Na·ky-Dek-H₂O heterogen Systeme, Natrium-Kaprylat wurde gewählt wegen seiner guten mizellbildende

Fähigkeit und verhältnismäßig hohen CMC, das Cholesterin wegen seiner äußerst niedrigen Wasserlöslichkeit, trotzdem dieser eine polare Gruppe enthält. In diesem Fall assoziieren sich die Molekül mit den Seifenmolekeln zu gemischten Mizellen. Wir wissen wohl, daß man zwei nicht mischbare Flüssigkeiten zu Mischung bringen kann mit Hilfe eines dritten gemeinsamen Lösungsmittels. Seit schon 40 Jahre länger vor hat Lindau mit Hilfe von der Phasenregel erzeugt, daß die hydrotrope Substanz nur die Rolle einer dritten mischbaren Flüssigkeit spielt. Wie wir weiter wissen wässrige Lösungen, die enthalten Eiweiß Assoziation-Kolloid Komplex sind vermögen zu solubilisieren verschiedene Verbindungen wie Steroid Hormonen, polyzyklischen-aromatische Kohlenwasserstoffe und fettlösliche Vitaminen, und hinüfugt man festes Cholesterin zu diesen zahlreichen obigen Lösungen, dann mesomorpher Phasen trennen häufig ab.

Im Jahre 1946 in Frankreich, zeigte Dervichian ¹⁶⁾ [den myelinähnliche Substanz, bei Anwesenheit von Wasser durch Mischung des Cholesterins mit einiger medizinische wirkende Substanzen mit langkettetes Struktur wie Lysolecithin, Alkylcholin-Chloriden, Alkyl-Phosphaten, Alkylsulfaten und sogar Fettsäuresalzen und neuerlich Lawrence ¹⁷⁾ berichtete daß die flüssige Kristallin Substanz, die gebildet in 20% ige Na-Dodecylsulfat Lösung mit äquimolar Menge an Cholestesin ist sehr temperaturbeständig oben bis zu ca 200° C, wo es separiert zwei isotrope Lösungen ab.

Beiträge zu medizinische Anwendbarkeit: Der Autor möchte gerne behandeln angehende nur Grundforschungen darüber. Mizellarbildung der Lipoidverbindungen in Gallensäuresalz Lösungen und systematische Untersuchung der kolloidchemische Eigenschaften wurde von Ekwall ^{13) 15)} und seinen Mitarb. ^{3) 14) 19)} schon länger durchgeführt. Wir fanden damals daß das Gallensalzkonzentration in selber Gallen liegt ungefähr an 0.1 M, die ist schon höher als CMC, und es ist doch nicht genügend Cholesterin, das befindet sich gewöhnlicherweise in Gallen, zu vollständig solubilisieren: Mit anderen Worten, Galle enthält auch anderen Assoziation Kolloid wie Fettsäuresalzen, Phospholipiden, die verstärken ihren Solubilisierungs Fähigkeit über Sterinverbindungen. In diesem Zusammenhang, es ist wesentlich zu notieren daß Ekwall hatten schon um Möglichkeit gefunden durch Hinzufügung einen Paraffinketter Alkohol, wie Dekanol gegen Natriumcholat Lösungen zu erhalten homogene Lösungen tatsächlich über ganzen Gebiet von Wasser zur n-Dekanol. Glover und seiner Mitarb. ²¹⁾ haben auch festgestellt daß Phospholipiden spielen eine sehr wesentliche Rolle an Sterinsolubilisation durch Gallen und daß Cholesterin wohl wie anderen Sterinen wird in mizellar Zustand absorbiert. Versuchung zeigte auch die Umwandlung des Cholesterins zur Koprostanol. Außerdem, es muß auch berühren daß Buttersäure und Milchsäure, die erscheinen sich in Darmewand als Gärungsprodukten oder wird dieser Säuren aufgenommen mit Speisen, dann senken sie merkwürdigen CMC-Werte von Gallensäuresalzen,

wie Natrium-Taurocholat etc. Nach Gemant, Triethanolaminsalze der Fettsäuren zeigte sich außerordentlich wirkungsvoll gegen Beseitigen der Cholesterin-Ausscheidung zB. wie bei Cholesterinkalkstein, Cholesterinverfettung usw. Wir ^{14) 15)} hatten schon länge vor um den Einflußgrad der Löslichkeit von Geschlecht Hormone in wäßrige Lösung von verschiedenen Assoziation Kolloid bei 40°C untersuchte; 1) Oestron Menge g/l in verschiedenen Assoziation Kolloid Lösungen (bis zu 12%) vermindern sich nach folgende Ordnung: HexadecylTrimethyl-Ammonium Bromid > Na-Dodecyl Sulfat > Na-Kaprat >> Na-Kaprylat > Aerosol-MA. 2) Verschiedene Geschlechtshormonens Löslichkeit in Na-Dodecyl-sulfat Lösungen (bis zu 8%) bei 40°C, vermehren sich nach folgender Weise, nämlich Oestron < Oestradiol << Cortexon Acetat < Progesteron < Testosteron Propionat.

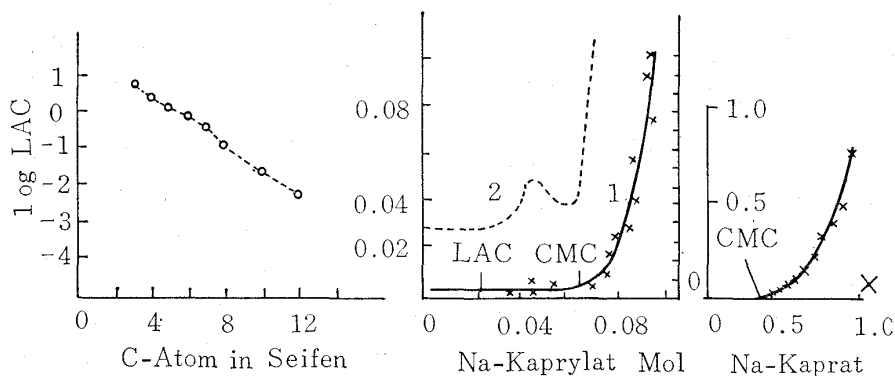


Abb. 1A

Abb. 1B

Abb. 1C

Gemeinsame Übersicht über den Cholesterin Adsorption auf den flüßiger Kohlenwasserstoff (oder Seifen)-Wasser Oberflächen.

Wie wir schon länge weiß, polar fettlösliche Verbindungen wie Cholesterin, Paraffin Ketter Alkoholen, Monoglyzeriden ^{1) 6)} usw haben die Fähigkeit zu verbessern die Eigenschaften des Anion-oberflächenaktive Stoff und Emulsierungsstabilität. Löslichkeit und Solubilisierungsgleichgewicht des Cholestrins $C_{27}H_{46}O$ und ihre Derivaten hatte nicht nur aus medizinische physiologische-, sondern auch aus reinem oberflächen-chemische Gesichtspunkten insbesondere stark Intresse gewidmet, im verschiedene wäßriger und organische Lösungen.

Cockbain ⁴⁾ et al schon voraussetzte daß die polar Verbindungen bilden oberflächliche Komplexen mit Tensiden(Seifen). Nach Untersuchungen über Einfluß der Cholesterinmyristat und anderen öllösliche Verbindungen auf Oberflächen Spannung des 0.01 Mol Na-Dodecysulfates gegen Benzol. Anderseit Schulman und Alexander ¹⁹⁾ haben daß die Abnahme in der Oberflächen Spannung veranlaßte durch die öllösliche Verbindungen nachweisen Vorhandensein der solchen Grenzflächen Komplexen, sollte, geschlossen.

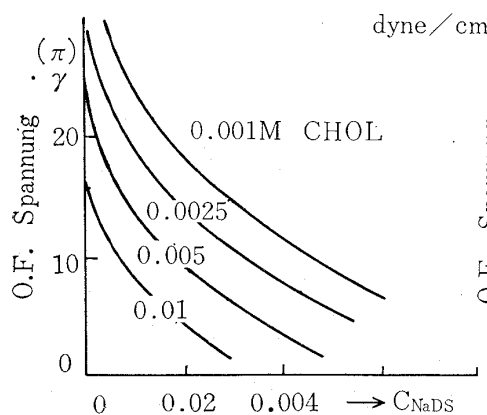


Abb. 2A

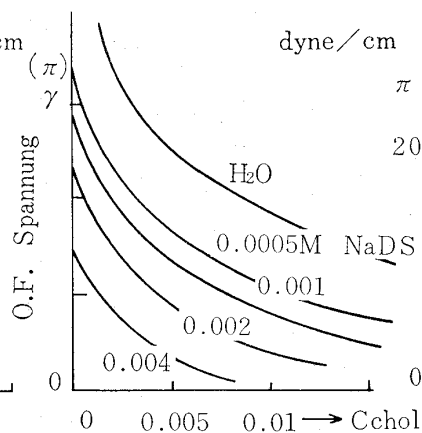


Abb. 2B

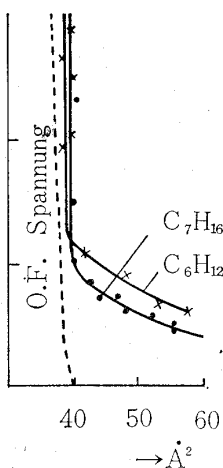


Abb. 2C

Dieser Schluß wurde dennoch nicht genügend untergestützt von subsektiv Messung der Oberflächenspannung. Zum Beispiel, Hutchinson konnte nicht nachweisen den Bildung der Grenzflächen Komplexverbindungen als er untersuchte um die Einfluß des Oktylalkohols auf dem Oberflächenspannung zwischen wäßrige Na-Dodecylsulfatlösung und Benzol. Cockbain und McMullen ⁴⁾ haben zu demselben Schluß gelangen nach Versuchung der Einfluß der Cholesterin, Sitosterin und Oktadekanol auf der Oberflächenspannung des wäßriger NaDodecylsulfat und Kariumlaurat Lösungen respektive gegen Benzol und normal-Dekan.

Weil Adsorption des Cholesterins auf den Grenzflächen ^{7) 9)} zwischen einen organische Lösungsmittel und Wasser wurde noch nicht quantitative nachgesucht eine Reihe der Oberflächenspannungs-Messungen wurde zur Studier diese Adsorptionphänomenen mit Hilfe der Gibbsche Theorie ausgeführt.

Obwohl es konnte nicht erwähne genaue Resultaten wegen des Messungs-schwierigkeit, das ist dennoch wünschenswert, daß Sie sollte beibringen Information über dem Eigenschaft der Adsorbierte Film und eine Indikation der Wechselwirkung zwischen gelöster stoff auf dem Oberlächen zu erhalten.

Vorbereitungsversuch: Am meisten, bis heute zuverlässigste Wert der Cholesterin Löslichkeit in Wasser ist nur 0.06 mg/l, und, es ist wohl bekant daß diese Löslichkeit nimmt sich plötzlich zu, bei Anwesenheit von Seifenlösungen und anderen Oberflächenaktivstoffe, wegen des mizellar Solubilisations. Diese Wert nimmt so rasch beinahe exponential Takt zu mit Zunehmen der Naky Konzentration bis zu ungefähr 2.4M und bald danach nimmt plötzlich ab (Abb 1B, Abb 1C). Abb.1 zeigt LAC (Grenze Ass. Konz.)-Abhängigkeit von verschiedene Ketterlänge der Fettsäuresalze, also je mehr Kohlenstoff Zahl der Fettsäuren desto noch weniger von Log LAC geworden ist, bei konstant Dek-Gehalt. In Abb 1 C, Y bedueutet Cholesterol g/kg Lösung und X Molen von Naky/kg Lösung. Dann Löslichkeit Kurve wird ungefähr durch Formel angegeben kann; $Y=5e^x-2.5$

In Abb 1B, Kurve 1: Löslichkeit um CMC (rechts Maßstab) und Kurve 2: Löslichkeit zwischen LAC und CMC (links Maßstab).

Vorbereitungsmessung: Adsorption des Cholesterins auf den Grenzflächen zwischen unpolar Kohlenwasserstoff und wäßrige Na-Dodecylsulfat-Lösungen. Gemäß der thermodynamische Theorie, die Abnahme des Oberflächenspannunges ist durch folgende Formel angegeben kann:

$$-d\gamma = \sum \Gamma_i d\mu_i \quad \left\{ \begin{array}{l} \Gamma: \text{Oberflächen Überschuß ml/cm}^2 \\ \mu: \text{Chemische Potential} \end{array} \right. \quad \gamma = \pi \text{ dyne/cm}^2$$

Angenommen jetzt daß Cholesterinaktivität ist gleich mit dem Molarkonzentration in verdünnte Lösung, Cholesterinmenge adsorbierende pro Einheitareal ist durch folgende Gleichung angegeben kann:

$$n = - \frac{1}{2.3 kT} \frac{d\pi}{d\log[C]} \quad pC = -\log[C]$$

wobei n: Zahl der Cholesterinmolekülen/cm² und k: Boltzmannsche Konstant. Im Falle daß der Adsorbierende Film ist eine Monomolekularschicht, so Areal pro Molekül ist gerechnet kann. Areal = 10¹⁶ · n⁻¹ Å². Wenn die Neigung für π-pC Kurve ist bekant, ist es möglich zu rechnen aus die adsorbierte Cholesterinmenge und Molekularareal in verschiedene Werte der Oberflächenspannung (Abb 2C). Die punktierte Linie im Abb, 2C bedeutet Kompressionkurve der Cholesterinmonoschicht auf 3 M NaCl Lösung, nach Studier von Ekwall et al.

Abb 2B bedeutet Abnahme der Oberflächenspannungen zwischen Cholesterinlösung (in Heptan) und wäßrige Na-Dodecylsulfat bei 25°C, und Abb. 2A hinweist Oberflächenspannungsabnahme zwischen wäßrige Na Dodecylsulfat Lösungen und Cholesterinlösung in n-Heptan. Cholesterin bildet einen unvollständig Film auf den Öl/Wasser grenzflächen bei niedrige Oberflächenspannungen. Die Abhängigkeit von Oberflächenspannung und Molekularareal wird durch sogenannte zweidimensional Van der Waalsche Gleichung angegeben soll: $(\pi - \pi_0)(A - A_0) = xkT$

Wir erhalten folgende Data:

Tabell 1

Kohlenwasserstoff	n Molekülen/cm ²	π dyne/cm	A Å ² /Molekül	A ₀	x
n-C ₇ H ₁₆	2.5 × 10 ¹⁴	9	41	23	0.4
zykl. -C ₆ H ₁₂	2.45 × 10 ¹⁴	11	39	20	0.54
C ₈ H ₆	2.48 × 10 ¹⁴	7.5	40.3	15.3	0.45

Ergebnis der Untersuchung

Experimenteller Teil für NaKaprylat-Cholesterolin-Wasser System.

Probeherstellung:

Wie Schwede, Bergström¹⁸⁾ bestätigt hatte, fanden wir auch daß Cholesterin, das befindet sich in fein verteilt Assoziation Kolloid Mizelle der Seifen übergeht so schnell Oxdation von Luft über 40°C. Um solche ungünstigen Oxdation des

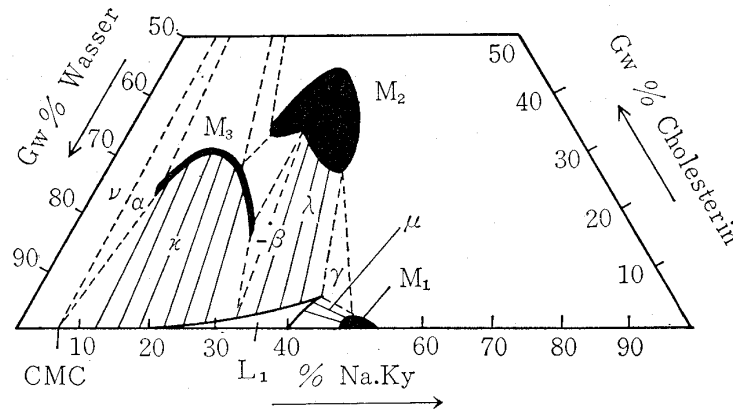


Abb. 3 Zustanddiagramm

Phasegleichgewicht Diagramm für heterogen Systeme

Na • Kaprylat-Cholesterin Wasser bei 20°C.

L₁ : homogene isotrope wäßrige Lösung

M₁M₂M₃: homogene mesomorpher Phasen

1, 2, 3, 4: 3 Phase-Dreiecke gezogenen mit punktierten Linien

$\alpha, \lambda, \mu, \nu$: 2-Phase Bereich

Tabell 2

Meso-phase	mikroskopische Aussehen × 200 vgr	Kleinwinkel Röntgen Muster
M ₁	Muschelschale	deutlich Ring
M ₂	Mosaik, Sphärische	mittelmäßig deutlich //
M ₃	Schnurre, Spule	sehr diffus //

Cholesterins im Kolloid Zustand zu vermeiden, haben wir immer bei Probeherstellung unter Schutzzug von gedrucktem Stickstoffgas-Strom bei 20°C ausgeführt (Abb. 4). Wir sättigen den Naky-Assoziationskolloid-Lösungen mit Cholesterin durch kräftige Schütteln und Mischung der Proben mit magnetischen Umrührern über sehr lange Stunden, mindestens unter 1~3 Wochen, um schließlich Gleichgewichtszustand zu beschleunigen. Aufschwemmung des Cholesterins und Abtrennung der mesomorphen Phasen aus isotropen Lösungen wurde durch Ultrazentrifugierung und Filtrierung durchgeführt.

Phaseidentifizierung mittels Mikroskopes; Während Fettverhalten sich meist einfachbrechend als isotrop, Lipoid häufig doppelbrechend (anisotrop). Sind die Tropfen als Sphärokristalle vorhanden, dann zeigen sie im polarisierten Licht ein dunkles Achsenkreuz mit vier hell aufleuchtenden Quadranten. Also für den qualitativen Nachweis²⁰⁾ von Cholesterinverbindungen ist die Untersuchung im polarisierten Mikroskop von besonderer Bedeutung mit ×200 Vergrößerung. Erwärmt man das Präparat durch 15 Minuten langes Einlegen in ein Bad ca. 50°C, Cholesterinverbindungen verlieren dann ihre Doppelbrechung, um beim Abkühlen auf 20°C als doppelbrechende Sphärokristalle mit typischem schwarzem Achsenkreuz und hellen Quadranten wieder aufzutreten. Durch Beobachtung beider polar und unpolar Licht, Minimumkonzentration der Seifen, die

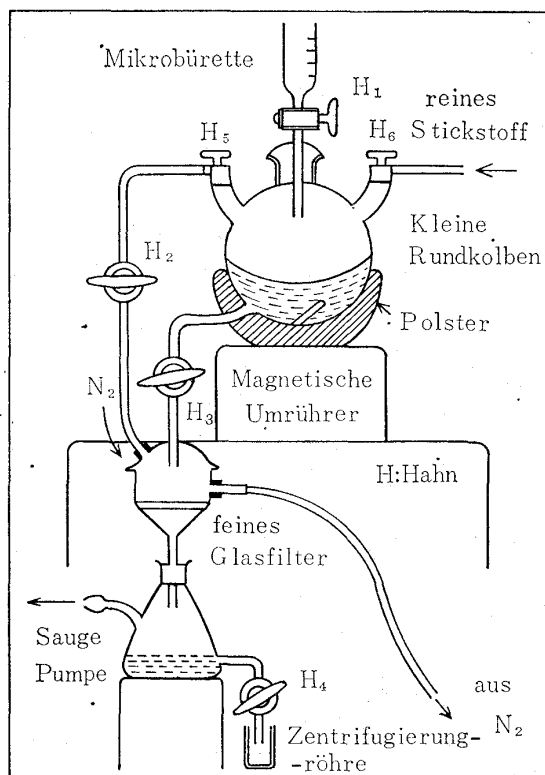


Abb. 4 Luftdicht Reaktion Gefäß

erfordert übergehen Cholesterin Kristalle ins mesomorpher Zustand bei Anwesenheit von verschiedenen Konzentration, wurde bestimmt konnte. (Tabell 2).

Chemische Analyse für jeden Komponent der mesomorpher Phasen;

1) Na-Kaprylat: Naky Gehalt wurde analysierte nach Trockung den abgetrennte Phasen oben P_2O_5 bis zum konstante Gewicht (Der Gewichtverlust des Präparates entspricht ungefähr dem Wassergehalt) und dieser Rückstand wurde in Eissessig gelöst und titrierte mit Standard $HClO_4$ Lösung mit Kristall Violet als Indikator.

2) Wassergehalt: Karl Fischer Metod mit Autobürett.

3) Bestimmung von Cholesterin: 0.1ml Proben werden in einem Schliffzentrifugenglas zu 5ml einer Lösung von 0.1% $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ in reinem Eissessig pipettiert. Nach Schütteln wird 15 Minuten stehen gelassen und dann zentrifugiert. 4ml der klaren Lösung kommen in ein Schliffreagensglas, werden mit 3ml konz. H_2SO_4 versetzt und bei verschlossenem Glas durchgeschüttelt. Nach Lüftung des Stopfens läßt man noch 20 min stehen und mißt dann in Spektrometer bei $\lambda 560 m\mu$. Standard: Eine Cholesterinlösung in Eissessig (1mg/ml) wird 1 auf 50 mit dem $FeCl_3$ -Eissessig-Reagens verdünnt wie obenbehandelt. Die Farbreaktion ist ungefähr von 0.01~0.05 mg an Cholesterin Menge geeignet. ¹²⁾ (Es emphielt sich einen Standartwert und Reagentienleerwerte mitzumessen.)

Kleinwinkel Röntgen-Beugungs Photogramm; Ergebnis war ganz einfach, und es deutet den Vorhandensein nur von Schichtstruktur der Mizellen an für gesamtliche meso-Phasen $M_1M_2M_3$. (keinen hexagonal Struktur bemerkte,).

Besprechung über Zustand-Phasediagramme. (Abbildung 3)

Lass uns jetzt sehen nach Abb. 3. Das ist heterogene System von Naky-Cholesterin-Wasser bei 20°C. Aus dem Phasenregelsgesichtspunkt, es bedeutet daß in drei Komponent Phasediagramme, eine von der Ecke der 3-Phase Dreiecke liegt in angegebene Konzentrationsbereich der homogene Seifenlösungen, während zwei andere Ecke repräsentieren feste Kristallin Cholesterin und mesomorpher Phasen, die im Solubilisierungsungleichgewicht stehen mit Seifenlösung, respektive. Diese Dreiecke scheidet zwei 2-Phase Gebieten ab, die eine bestehende aus wäßrige Lösung von niedriger Konzentration, der im Gleichgewicht steht mit feste Kristallin Cholesterin und die andere, bestehende aus mehr konzentrierte wäßrige Lösungen in Gleichgewicht stehend mit mesomorpher Phase, voneinander. Drei Dreiecke α , β , γ , gezogenen mit punktierten Linien repräsentieren den Bereiche, wo drei verschiedene Phasen zusammenexistieren; Deren Zusammensetzung sind den Punkten auf der Hörne der Dreiecke angegeben, nämlich in diesen Drei Phase Dreiecke, α ; 6%-rige Naky Lösung, feste Cholesterin und Mesophase M_3 sind im Gleichgewicht gestanden; in die Dreiecke β ; ungefähr 30%-rige Naky Lösung enthaltend 1.7% (Cholesterin und mesomorpher Phasen M_2 , M_3 stehen im Solubilisierungs Gleichgewicht, und schließlich in die Dreiecke γ ; ungefähr 43% rige Naky Lösung enthaltend ca 5.5% Cholesterin und mesomorpher Phasen M_1 , M_2 stehen im Gleichgewicht miteinander. κ , λ , μ und ν bedeuten 2-Phase Gebiete.

Überlegung; Bei Bildung der gemischt Mizellen, Ion-Dipol Wechselwirkung und auch Wasserstoffbrücke zwischen Hydroxylgruppen und den benachbart ionisierte Karboxylgruppen spielen hier entscheidende Rolle. Wie gewöhnlich ist es, der großes Kohlenwasserstoff Teile der Cholesterinmolekül wird innerhalb der Mizelle einverleibt und Hydroxylgruppe (wie Karboxylgruppe der Kaprylat) sind sicher eingerichtet auf der Oberflächen der Mizelle nahe an Wasser. Cholesterin Kristall, das zeigt deutliche Doppelbrechung, wird allmählich gelöst und verschwindet von Durchdringung der Kaprylatlösung und danach leicht gespalten ist durch mechanische Wirkung hinein den dünne Teilchen, die selber reagieren schnell noch weiter.

Mesomorpher Substanz, das ist von konzentrierte Kaprylatlösungen nieder bis zum ungefähr 2.4mol/l gebildet, besteht aus stark Doppelbrechende Phase, die koaliert sich mehr oder weniger Sphäroid. In Lösungen von ca 2.4 M bis zu nieder CMC (0.4 M Naky/l). so bildet mesomorpher Substanz lange, schmale, oft gekrümmt schnüreformige Struktur aus, mit Doppelbrechung. ²⁰⁾

Wir fanden gleichzeitig daß eine kraftige Zunehmen an Solubilisierungs Fähigkeit der Mizellar Kaprylat gegen Cholesterin, liegt um Konz-Bereiche ca 1.0~1.9 Mol Naky.

Schließlich, im Gegensatz zum Kristallin Cholesterin faden wir daß das Cholesterin in mesomorpher Zustand [wurde keineswegs gefärbt durch öllösliche Farbstoffe zB. Sudan Red III, Oil Red 4B ¹⁰⁾ und Scharlach R, die sind häufig zur Nachweise des Cholesterins auf dem Gewebschnitt angewendet.

Summary: One prominent difference in both heterogeneous system Naky-Dek-H₂O and Naky-Sterol-H₂O consists mainly in preparation method of these samples. In the latter, reaction velocity is much smaller, then we were compelled to use magnetic stirrer under very long period, and a special precaution was necessary to avoid air-oxydation and higher

temperature, say 37°C for sterol in the micellar state. Not only soaps, but also biochemical essential matters f.ex. bilic acid salts have been taken into consideration. In small angle X-ray diagram, each phase shows only existence of layer structure of micells. The interaction between solid sterol and Naky-solutions was followed with microscope between crossed nicols and unpolarised light with or without using a phase contrast condenser.

Anmerkung: Der Autor möchte hier Herrn Prof. P. Ekwall, aus dem Institut für Physikalische Chemie Abo Akademi, für die Bereitstellung des Experimentes seinen herzlichen Dank ausdrücken, und gleichzeitig schwedische Prof. Herrn H. Gustavson ist Autor für eine freundliche Diskussion der Dissertations Arbeit noch einmal zu Dank verpflichtet.

Schrifttum:

1): L. de Bernard, Bull. Soc. Chim Biol 40 (1958) 161. 2): C. Heitlee, Analyst 83(1958) 233. 3). P. Ekwall R. Ekholm & A. Norman Acta Chem Scand 11(1957)(693. 4): E. Cockbain & A. McMullen, Trans Faraday Soc. 47(1951)322. 5): Heckmann K. Naturwiss. 40(1953) 478. 6): Heckmann K. Z. phys Chem 9(1956)318. 7): ibid 20(1959)42. 8): Brunn H. H. Finska Kemistsamf. Medd. 63(1954)22. 9): Schönfeldt, N. Oberflächenktive Anlagerungsprodukte, ihre Herstellung, Eigenschaften und Anwendung, Stuttgart, 1959. 10): Trurnit, H.J. Über monomolekulare Filme an Wassergrenzflächen und über Schichtfilme, Fortschritt der Chemie organische Naturstoff, Band 4 1955. 11): Lettré H. Inhoffen, Über Sterine, Gallensäuren und verwandte Naturstoffe, Band 1 Ferdinand Ecke Stuttgart. 12): Zlatkis, Zak und Boyle, A. J. J. Lab. Clin. Med. 41(1953) 486). 13): Ekwall, P. & Lundsten, T Acta Chem Scand. 5 (1951) 1383. 14): Ekwall, P & Sjöblom, L Acta Chem Scand. 7(1953)347. 15): Sjöblom, L, Acta Acad. Aboensis, Math. Phys. 20,14 1956. 16): Dervichian, D. Bull, soc. Chim. biol. 28 1946 419. 17): Lawrence, A.S.C. Discussion Faraday Soc. 25 1958. 18): Bergström, S. Arkiv Kemi Mineral. Geol. 16A 10 1. 19): Ekwall, P. Proc. 3rd Intern. Congr. Surface Activity, Cologne 1960, Vol. 1, Section A. 193,189. 20): Taschenbuch der mikroskopischen Technik, 13 Auflage (Romeis) 21): Glover, J. J Biochem J. 79 (1961) p.31