

## Bilden sich Cholesterine in Keimpflanzen, welche bei Lichtabschluss sich entwickeln?

Von  
**E. Schulze.**

(Aus dem agricultur-chemischen Laboratorium des Polytechnikums in Zürich.)  
(Der Redaction zugegangen am 26. April 1890.)

Im Jahre 1882 habe ich in Verbindung mit J. Barbieri eine Untersuchung publicirt<sup>1)</sup>, welche die in den Lupinensamen und etiolirten Lupinenkeimlingen enthaltenen Cholesterine zum Gegenstand hatte. Ein Resultat dieser Untersuchung war, dass in den genannten Keimlingen zwei Glieder jener Stoffgruppe sich vorfinden<sup>2)</sup>. Die Wahrnehmung, dass dieselben sich in relativ beträchtlicher Quantität zur Abscheidung bringen liessen, veranlasste uns, den Versuch zu einer vergleichenden quantitativen Bestimmung des Cholesteringehalts der ungekeimten Lupinensamen und der Lupinenkeimlinge zu machen. Auf die dabei erhaltenen Resultate muss ich heute zurückkommen. Die Veranlassung dazu giebt mir eine Besprechung derselben, welche sich in einer vor Kurzem erschienenen Abhandlung Burchard's<sup>3)</sup> findet.

Jene Bestimmungen führten wir in folgender Weise aus:  
Das aus den fein zerriebenen Samen und Keimlingen mittelst

<sup>1)</sup> Journal für practische Chemie, N. F., Bd. 25, S. 159.

<sup>2)</sup> Die eine dieser Substanzen, welche sich in den Axenorganen der Keimlinge vorfand, haben wir Caulosterin genannt; die zweite, welche dem von Hesse dargestellten Phytosterin sehr ähnlich und vielleicht mit demselben identisch ist, wird am zweckmässigsten mit diesem Namen zu bezeichnen sein. Für die ganze Stoff-Gruppe gebrauche ich, wie es auch von Anderen geschehen ist, die Bezeichnung «Cholesterine».

<sup>3)</sup> Beiträge zur Kenntniss der Cholesterine, Inaugural-Dissertation, Rostock 1889.

Aethers extrahirte Rohfett wurde durch Erhitzen mit alkoholischer Kalilauge verseift, die dabei erhaltene Lösung eingedunstet, bis der Alkohol fast vollständig verjagt war, der Verdampfungsrückstand in viel Wasser aufgenommen, die Flüssigkeit kräftig mit ungefähr dem gleichen Volumen Aether durchgeschüttelt. Es entstand eine Emulsion, welche sich erst nach längerem Stehen in eine wässrige und eine ätherische Schicht trennte<sup>1)</sup>. Die letztere wurde nach völliger Klärung abgehoben, die wässrige Schicht sodann noch drei mal in der gleichen Weise mit Aether behandelt<sup>2)</sup>. Die vereinigten ätherischen Extracte unterwarfen wir der Destillation und lösten den dabei erhaltenen Rückstand in möglichst wenig heissem Weingeist. Die beim Erkalten sich ausscheidenden Krystalle wurden auf ein Filter gebracht, mit etwas kaltem Weingeist gewaschen, zwischen Fliesspapier abgepresst, über Schwefelsäure getrocknet und sodann gewogen. Die in solcher Weise aus den ungekeimten Samen und aus den Cotyledonen der etiolirten Keimlinge erhaltenen krystallisirten Substanzen wurden direct als Cholesterin in Rechnung gestellt. Bei den übrigen Theilen der Keimlinge, welche wir der Kürze halber als die Axenorgane bezeichnen wollen, ging dies nicht an, weil die aus

<sup>1)</sup> Zuweilen erst nach mehreren Tagen. Von Mitteln zur Beschleunigung der Klärung soll an anderem Orte die Rede sein.

<sup>2)</sup> In den zuletzt erhaltenen ätherischen Lösungen findet sich nur noch sehr wenig Cholesterin vor. Um zu prüfen, in wie weit die rückständige Seifenlösung von Cholesterin befreit ist, habe ich noch folgenden Versuch angestellt: Die bei Verarbeitung des Aetherextracts aus 150 gr. entschälten Lupinensamen in der beschriebenen Weise erhaltene Seifenlösung wurde, nach der Behandlung mit Aether, mit Chlorbaryum in schwachem Ueberschuss versetzt. Den dabei erhaltenen Niederschlag trennte ich durch Filtration von der klaren Flüssigkeit; dann wurde derselbe getrocknet, zerrieben und nun mit Aether extrahirt. Die ätherische Lösung wurde eingedunstet, der Verdampfungsrückstand mit Weingeist behandelt. Ich vermochte aus der weingeistigen Lösung keine Cholesterinkrystalle zu gewinnen. Die in später beschriebener Weise ausgeführte colorimetrische Prüfung zeigte nur das Vorhandensein einer äusserst geringen Cholesterinmenge an. Ein genaues Resultat konnte die colorimetrische Bestimmung nicht liefern, weil nach dem Zusatz der bezüglichen Reagentien keine reinen Färbungen auftraten.

denselben in der beschriebenen Weise gewonnene Substanz ein Gemenge von Cholesterin mit einem weit niedriger schmelzenden Körper, vielleicht einem aus wachsartigen Stoffen abgetrennten Alkohol, war<sup>1)</sup>. In diesem Falle schmolzen wir daher den nach der Verseifung noch in Aether löslichen Theil des Aetherextracts mit Benzoesäure-Anhydrid zusammen, behandelten die so erhaltenen Benzoylverbindungen mit heissem Weingeist und berechneten aus dem Gewicht des dabei ungelöst Gebliebenen, welches nach dem Ergebniss der qualitativen Untersuchung wenigstens der Hauptsache nach aus Cholesteryl-Benzolat bestehen musste, die Menge des Cholesterins.

Nach diesen Bestimmungen war der procentige Cholesteringehalt der etiolirten Keimlinge doppelt so gross, als derjenige der ungekeimten Samen. Die in einem bestimmten Gewicht der letzteren enthaltene Cholesterinmenge fand sich allein schon in den Cotyledonen der zugehörigen Keimlinge nahezu vollständig wieder. Und da nun auch die übrigen Theile der Keimlinge einen relativ beträchtlichen Cholesteringehalt zeigten, so musste man schliessen, dass während der im Dunkeln stattfindenden Keimung eine Vermehrung der Cholesterinmenge eingetreten war. Mit Rücksicht auf die Unvollkommenheit der von uns angewendeten Bestimmungsmethode haben wir jedoch jene Schlussfolgerung keineswegs als eine bestimmte, sondern nur als eine der Wahrscheinlichkeit entsprechende hingestellt. Mit Bestimmtheit haben wir nur ausgesprochen, dass die Cholesterine nicht zu denjenigen Stoffen gehören, welche während der im Dunkeln stattfindenden Keimung verbraucht, d. h. also aufgezehrt werden.

<sup>1)</sup> Aus einer Lösung in heissem Weingeist schied sich diese Substanz beim Erkalten sehr schnell, meistens vor dem Cholesterin, aus. Unter Benutzung dieses Verhaltens war es möglich, dieselbe durch fractionirte Krystallisation fast vollständig vom Cholesterin zu trennen. Das so gewonnene Product krystallisirte in äusserst feinen Nadeln oder Blättchen und schmolz bei 73° (während das Gemenge dieser Substanz mit dem Caulosterin bei ungefähr 100° schmolz). Vielleicht findet sich diese Substanz in sehr geringer Menge auch in den Cotyledonen der Lupinenkeimlinge vor.

Ganz ähnlich habe ich mich bei Reproduction jener von Barbieri und mir erhaltenen Versuchsergebnisse in einer später erschienenen Abhandlung ausgesprochen<sup>1)</sup>.

Im Hinblick auf diese Aeusserungen darf ich behaupten, dass J. Barbieri und ich den Mängeln der von uns angewendeten Bestimmungsmethode bei Ableitung der Schlussfolgerungen Rechnung getragen haben. Auch sei hier noch constatirt, dass ich in keiner meiner Abhandlungen die Behauptung aufgestellt habe, es müsse auch in anderen Keimlingen eine Vermehrung der Cholesterinmenge stattfinden, und dass ich ferner über die Frage, aus welchem Material in den Keimlingen Cholesterin sich bildet, mich nirgends geäußert habe<sup>2)</sup>.

In der oben citirten Abhandlung bezweifelt nun Burchard die Zulässigkeit der aus den erwähnten Versuchsergebnissen von Barbieri und mir abgeleiteten Schlussfolgerungen und stellt den an Lupinenkeimlingen von uns gewonnenen Resultaten andere gegenüber, welche er an Linsen- und Gras-Keimlingen nach einem colorimetrischen Verfahren erhalten hat.

Ueber letzteres Verfahren ist zunächst Folgendes mitzutheilen: Burchard hat die im Jahre 1885 von Liebermann entdeckte Cholestol-Reaction, d. h. die Färbung, welche die Cholesterine sowie das Cholestol beim Zusammenbringen

<sup>1)</sup> Landw. Versuchsstationen, Bd. 36, S. 416.

<sup>2)</sup> Die von Burchard bekämpfte Ansicht, dass das Cholesterin durch Spaltung von Eiweissstoffen entstehe, ist mir völlig fremd. Wenn Barbieri und ich in unserer Abhandlung auf S. 147 äussern, «dass insbesondere für das Caulosterin eine Entstehung durch Spaltung anderer Substanzen wahrscheinlich sei, da dieser Stoff sich in den wachsenden Theilen der Keimlinge neben Substanzen vorfinde, welche zweifellos Spaltungsproducte, und zwar Spaltungsproducte der Eiweisskörper seien», so haben wir — wie kaum besonders erwähnt zu werden braucht — damit keineswegs sagen wollen, dass der genannte Stoff aus Eiweisssubstanzen entstehe; wir wollten durch jenen Ausspruch nur darlegen, warum wir geneigt seien, für das Caulosterin eine Entstehung durch Spaltung anzunehmen. Dass man übrigens in Beziehung auf letzteren Punkt auch anderer Ansicht sein kann, verkenne ich nicht.

mit Essigsäure-Anhydrid und concentrirter Schwefelsäure geben, so umzugestalten gesucht, dass sie für colorimetrische Bestimmungen brauchbar ist. Er fand, dass man eine ziemlich beständige Grünfärbung erhält, wenn man in einem Probirröhrchen 2 ccm. einer stark verdünnten, z. B. 0,05 procentigen Lösung von Gallenstein-Cholesterin in Chloroform mit 10 Tropfen Essigsäure-Anhydrid und einem Tropfen Schwefelsäure vermischt (ein etwas stärkerer Zusatz dieser Reagentien veränderte die Färbung nicht). Zur Herstellung einer Farbenscala brachte er nun 1,8, 1,6, 1,4, 1,2, 1,0, 0,8, 0,6, 0,4 und 0,2 ccm. einer Lösung von 0,05 gr. Gallenstein-Cholesterin in 100 ccm. Chloroform in gleich weite Probirröhrchen, füllte alle mit reinem Chloroform auf 2 ccm. auf und fügte dann Essigsäure-Anhydrid und Schwefelsäure in den oben angegebenen Quantitäten hinzu. Mit Hülfe der so gewonnenen Farbenscala vermochte er ohne Schwierigkeit in reinen Cholesterinlösungen unbekannter Concentration den Gehalt zu bestimmen, indem er dieselben mit den oben genannten Reagentien zusammenbrachte und nach Verlauf von einer Viertelstunde die Färbung beobachtete.

Burchard versuchte nun dieses Verfahren zur Bestimmung des Cholesteringehalts thierischer und vegetabilischer Substanzen anzuwenden, stiess aber dabei auf Schwierigkeiten. Als Versuchsobjecte benutzte er Hundeleber und Gerstenkörner. Diese Substanzen wurden mit Aether extrahirt, die Extracte eingedunstet, die Verdampfungsrückstände in Chloroform aufgenommen, die so erhaltenen Lösungen mit Essigsäure-Anhydrid und Schwefelsäure zusammengebracht. Es zeigte sich aber, dass eine Färbung, welche die in der beschriebenen Weise erhaltenen Extracte schon vor dem Zusatz der eben genannten Reagentien besaßen, die bei der Reaction auftretenden Färbungen so stark beeinflusste, dass eine Einreihung der letzteren in die Farbenscala unmöglich war. Auf Grund dieser Versuche gelangt Burchard auf S. 18 seiner Abhandlung zu folgenden Schlussfolgerungen: «So ist denn die Cholestol-Reaction wohl ein überaus brauchbares Mittel, um die Cholesterine auch in sehr erheblichen|Verdünnungen

nachzuweisen und aufzufinden, zu genauen quantitativen Resultaten zu verhelfen, die uns wichtige Aufschlüsse geben könnten über die Stellung des Cholesterins im Haushalte des Organismus, ist sie leider aber nicht im Stande. Man wird also neue Mittel und Wege suchen müssen, das Cholesterin in geeigneterer Weise von den mit ihm zu gleicher Zeit vorkommenden Seifen etc. zu trennen, um so genauere quantitative Bestimmungen zu erzielen.»

Trotz des ungünstigen Urtheils, welches Burchard selbst über die Brauchbarkeit seiner colorimetrischen Bestimmungsmethode fällt, will er dieselbe aber doch benutzen, «um die Resultate der Bestimmungen von Schulze und Barbieri auf ihre Richtigkeit zu prüfen». Für diesen Zweck verwendet er aber merkwürdigerweise nicht das von uns benutzte Versuchsobject, sondern er experimentirt mit Linsen- und Gras-Keimlingen. Gleiche Mengen ungekeimter und im Dunkeln gekeimter Samen wurden von ihm in einer Reibschale zerstoßen und mit Aether extrahirt, die Aetherextracte in Chloroform aufgenommen und die so erhaltenen, in geeigneter Weise verdünnten Lösungen sodann für die colorimetrische Prüfung benutzt. Er erhielt bei den Linsen-Keimlingen «deutlich schwächere Grünfärbung als bei den ungekeimten Linsen»; bei den Graskeimlingen war Grünfärbung des Extracts überhaupt nicht mehr zu beobachten, sondern es hatte dieselbe einer Gelbfärbung Platz gemacht. Auf Grund dieser Versuchsergebnisse bezweifelt Burchard die Richtigkeit der von Barbieri und mir gemachten Angaben und erklärt es für wahrscheinlich, dass bei unseren Versuchen eine dem Cholesterin nahestehende Substanz, welche die Cholestol-Reaction nicht giebt, als Cholesterin mit gewogen worden sei.

Gegen eine solche Behandlung der von Barbieri und mir gemachten Angaben muss ich denn doch in der nachdrücklichsten Weise Einsprache erheben. Gesetzt auch, dass wirklich in den keimenden Linsen- und Gras-Samen die Cholesterinmenge sich vermindert, folgt daraus, dass die an Lupinenkeimlingen von uns gemachten Beobachtungen un-

richtig sind? Lassen sich die an diesen Keimlingen von uns ausgeführten Bestimmungen auf ihre Richtigkeit prüfen, indem man an beliebigen anderen Objecten Versuche anstellt? Hat Burchard also irgend eine Thatsache an's Licht gebracht, welche ihn zu der Annahme berechtigt, dass den für die Lupinenkeimlinge von uns erhaltenen Ergebnissen der oben näher bezeichnete Versuchsfehler zu Grunde liegt?

Ferner aber muss ich bezweifeln, dass die von Burchard in den Samen- und Keimpflanzen-Extracten ausgeführten colorimetrischen Bestimmungen zuverlässige Resultate geliefert haben. Der Genannte verwendet für seine Bestimmungen die unverseiften Roh-Extracte, welche zweifellos neben wenig Cholesterin ungleich grössere Quantitäten anderer Stoffe enthielten. Hat keiner dieser Nebenbestandtheile die Farbenreaction beeinflusst?<sup>1)</sup>

Burchard's eigene Angaben sprechen dagegen. Der Genannte sagt auf S. 25 seiner Abhandlung, es sei aufgefallen, dass die Reaction in den Extracten aus Linsenkeimlingen einen mehr gelben Farbenton zeigte, als bei den ungekeimten Linsensamen. Daraus muss man doch wohl schliessen, dass der Zusatz von Essigsäure-Anhydrid und Schwefelsäure in jenen Extracten nicht nur Grünfärbung, sondern auch Gelbfärbung hervorrief<sup>2)</sup>; das Entstehen eines gelben Farbstoffs musste aber doch der Vergleichung der Färbung mit derjenigen der Samen-Extracte hinderlich sein. Burchard giebt ja auf S. 17 selbst an, dass der gelbgrüne Farbenton, welchen ein gelb gefärbter cholesterinhaltiger Extract nach dem Zusatz von Essigsäure-Anhydrid und Schwefelsäure annahm,

<sup>1)</sup> Dass Nebenbestandtheile sogar den qualitativen Nachweis des Cholesterins mittelst der Cholestolreaction unmöglich machen können, hat doch Burchard selbst beobachtet.

<sup>2)</sup> Oder es enthielt der Extract schon vor dem Zusatz der Reagentien einen gelben Farbstoff, was selbstverständlich den gleichen Effect hervorgerufen haben würde. Burchard macht keine Angabe darüber, ob die Extracte aus Linsensamen und Linsenkeimlingen vor dem Zusatz der Reagentien farblos waren oder nicht.

sich nicht mit dem in einer reinen Cholesterin-Lösung entstehenden blaugrünen Farbenton vergleichen liess, und dass in Folge davon jener Extract für die colorimetrische Bestimmung unbrauchbar war. Bei Ausführung der colorimetrischen Versuche mit Keimpflanzen-Extracten, zu denen ich durch Burchard's Publication veranlasst wurde, ist auch mir ein Fall vorgekommen, in welchem der Zusatz der oben genannten Reagentien zunächst Gelbfärbung, später erst Grünfärbung hervorrief, und ich konnte mich leicht davon überzeugen, dass auf einen Extract von solchem Verhalten die auf die Cholestol-Reaction gegründete colorimetrische Bestimmungsmethode nicht anwendbar ist. In den Extracten aus Graskeimlingen erhielt Burchard überhaupt nur Gelbfärbung, keine Grünfärbung, woraus man doch schliessen müsste, dass diese Extracte gar kein Cholesterin mehr enthielten. Dieses Resultat steht in so starkem Gegensatze zu denjenigen, welche ich an etiolirten Graskeimlingen erhielt (m. vgl. w. u.), dass ich an der Richtigkeit desselben zweifeln muss, so lange nicht von Burchard bewiesen worden ist, dass in einem Extract aus den von ihm verwendeten Graskeimlingen auch nach dem Verseifen Cholesterin nicht nachweisbar war.

Im Hinblick auf das im Vorigen Mitgetheilte<sup>1)</sup> wird denn doch Niemand annehmen wollen, dass durch die von Burchard ausgeführten Bestimmungen die Resultate widerlegt seien, zu denen Barbieri und ich nach einem ganz

---

<sup>1)</sup> Es lassen sich noch andere Umstände namhaft machen, welche die nach Burchard's Verfahren erhaltenen Resultate fehlerhaft machen können. So ist es z. B. nicht sicher, dass die von dem Genannten colorimetrisch verglichenen Extracte aus Samen und Keimlingen Cholesterine von gleicher Beschaffenheit enthalten (nach den Untersuchungen von Barbieri und mir findet sich in den Axenorganen der Lupinenkeimlinge das Caulosterin vor, ein Glied der Cholesteringruppe, welches allem Anschein nach in den ungekeimten Lupinensamen fehlt). Ferner ist es möglich, dass in den unverseiften Aetherextracten das Cholesterin theilweise in Verbindung mit Fettsäuren sich vorfindet, und es liegen keine Versuche darüber vor, ob dies von Einfluss auf das Resultat der colorimetrischen Bestimmung ist oder nicht.

anderen Verfahren gelangt sind — auch ganz abgesehen davon, dass wir ein anderes Versuchsobject verwendeten!

Was das von uns benutzte Verfahren betrifft, so haben Barbieri und ich (l. c.) genügend hervorgehoben, dass dasselbe nach unserer Meinung nur approximative Resultate zu liefern im Stande sei. Burchard bezweifelt aber sogar, dass die nach demselben erhaltenen Zahlen unter einander vergleichbar seien. Zur Begründung dieses absprechenden Urtheils weist er lediglich auf die von Barbieri und mir<sup>1)</sup> keineswegs unbeachtet gelassene Thatsache hin, dass manche Alkali-seifen sich in ziemlich beträchtlichem Masse in Aether lösen. Er sagt auf S. 13 u. 14: «Es werden doch durch den Aether aus der verseiften Substanz nicht nur Cholesterine extrahirt, sondern ebenso wohl auch etwas von den gebildeten Seifen, die ja durchaus nicht ganz unlöslich in Aether sind. Je nachdem nun mehr oder weniger Seifen in den zweiten Aetherextract gelangen, werden dieselben, im Alkohol in der Kälte gelöst, eine alkoholische Seifenlösung hervorbringen, die ihrerseits wiederum Cholesterin nach dem Grade ihrer Concentration in Lösung zu halten vermag.»

Dieser Beweisführung muss ich widersprechen. Allerdings lösen sich manche Alkaliseifen<sup>2)</sup> ziemlich leicht in Aether. Da dieselben aber durch Schütteln mit Wasser der ätherischen Lösung entzogen werden können<sup>3)</sup>, so gehen beim Durchschütteln einer wässrigen Seifenlösung mit Aether nur so geringe Seifenmengen in letzteren über, dass dieselben die von Burchard angenommene Wirkung nicht haben können. Zum Beweise können z. B. die folgenden Experimente dienen: Ich verseifte den Aetherextract aus 250 gr. entschälten Lupinensamen

<sup>1)</sup> M. vgl. unsere Abhandlung, S. 173, Anmerkung.

<sup>2)</sup> Nach den in den chemischen Handbüchern sich findenden Angaben gilt dies besonders für die ölsauren Alkalien.

<sup>3)</sup> M. Märcker und ich (Journ. f. pract. Chemie, Bd. 108, S. 194—196) haben z. B. gezeigt, dass man die sehr stark mit Seifen verunreinigten Aetherextracte aus roher Schafwolle durch Schütteln mit Wasser leicht nahezu vollständig von den Seifen befreien kann.

(= 235,7 gr. wasserfrei) und behandelte die dabei erhaltene Seifenlösung, deren Volumen ungefähr 500 cbcm. betrug, in der früher beschriebenen Weise drei mal mit Aether. Die vereinigten ätherischen Extracte unterwarf ich der Destillation und krystallisirte den dabei erhaltenen Rückstand aus einer möglichst geringen Menge von Weingeist um. Ich erhielt 0,323 gr. Krystalle, einschliesslich einer geringen aus der Mutterlauge noch gewonnenen Substanzmenge. Die mit möglichster Vermeidung von Verlusten aufgesammelte Mutterlauge wurde mit Weingeist auf 75 cbcm. aufgefüllt. 25 cbcm. davon gaben beim Eindunsten und vorsichtigem Einäschern des Rückstandes nur  $\frac{1}{2}$  mgr. Asche, können demnach nur ungefähr  $2\frac{1}{2}$  mgr. Seife enthalten haben<sup>1)</sup>. Der Rest der Mutterlauge (= 50 cbcm.) wurde eingedunstet, der Verdampfungsrückstand in Aether gelöst, die Lösung zur möglichst vollständigen Entfernung der Seifen wiederholt mit Wasser durchgeschüttelt, dann wieder eingedunstet, das dabei Zurückbleibende in Alkohol aufgenommen. Diese Lösung hätte von Neuem eine Krystallisation von Cholesterin liefern müssen, falls letzteres durch Beimengung von Seife vorher am vollständigen Auskrystallisiren verhindert worden wäre. Ich vermochte aber nicht zu bemerken, dass die Entfernung der Seifen irgend einen Einfluss auf das Krystallisationsvermögen der Mutterlauge ausgeübt hatte. Dass aber durch die Behandlung der ätherischen Lösung mit Wasser die Seifen wirklich entfernt worden waren, wird dadurch bewiesen, dass die rückständige Flüssigkeit beim Eindampfen und Verbrennen des Rückstandes keine wägbare Aschenmenge lieferte.

Ich habe ferner die drei mal mit Aether behandelte Seifenlösung noch zwei mal unter wiederholtem Durchschütteln mit je 300 cbcm. Aether extrahirt. Die nach völliger Klärung sorgfältig von der wässrigen Flüssigkeit getrennten Extracte wurden der Destillation unterworfen, der Destillationsrückstand ohne Verlust in ein kleines Platinschälchen übergeführt, ausgetrocknet und verbrannt. Ich erhielt nur 1 mgr. Asche.

<sup>1)</sup> Unter der Annahme, dass die Asche aus kohlen-saurem Kalium bestand und durch Verbrennung von ölsaurem Kalium entstanden war.

Aehnliche Resultate erhielt ich bei Untersuchung der in entsprechender Weise bei Verarbeitung von Lupinenkeimlingen erhaltenen Extracte.

Diese Versuche beweisen, dass Burchard's absprechendes Urtheil über das von Barbieri und mir zur Bestimmung des Cholesteringehalts der Lupinensamen und Lupinenkeimlinge angewendete Verfahren auf Annahmen beruht, welche der Wirklichkeit nicht entsprechen. Wenn man das aus den genannten Objecten gewonnene Rohfett in der von uns beschriebenen Weise verarbeitet, so gehen in die ätherischen Lösungen neben dem Cholesterin nur so geringe Seifenmengen über, dass dieselben bei der Bestimmung jenes Stoffes eine Störung, wie sie Burchard annimmt, nicht hervorbringen können<sup>1)</sup>.

Mir sind auch aus der Fachliteratur keine mit Burchard's Behauptung übereinstimmende Angaben bekannt. Burchard reproducirt zwar auf S. 14 seiner Abhandlung ein von Hoppe-Seyler zur Trennung der Seife vom Cholesterin angegebene Verfahren in solcher Weise, dass man glauben könnte, der genannte Forscher halte die Anwendung desselben zur Reinigung des mittelst Aethers aus einer Seifenlösung extrahirten Cholesterins für nöthig.

Dies ist aber keineswegs der Fall. Die von Burchard citirten Angaben Hoppe-Seyler's beziehen sich auf etwas ganz Anderes, nämlich auf die Trennung der bei Zerlegung des Lecithins in Form von Barytseifen erhaltenen Fettsäuren vom beigemengten Cholesterin. Dagegen giebt Hoppe-

<sup>1)</sup> Ob man etwa zu anderen Resultaten gelangt, falls man sehr concentrirte seifenhaltige Flüssigkeiten mit Aether behandelt, weiss ich nicht; ich habe jene Flüssigkeiten stets stark mit Wasser verdünnt, ehe ich sie mit Aether durchschüttelte. Auch sei noch bemerkt, dass ich die bei letzterer Operation erhaltenen ätherischen Lösungen sich sehr sehr gut klären liess, ehe ich sie der Destillation unterwarf. Ich liess sie zu diesem Zweck nach der Trennung von den wässrigen Flüssigkeiten noch ca. 24 Stunden lang in einem Glasgefäss stehen. Am Boden des letzteren schieden sich öfters noch Tropfen wässriger Flüssigkeit ab, von denen die ätherische Lösung dann abgossen wurde.

Seyler an einer anderen Stelle<sup>1)</sup> an, wie man das behufs quantitativer Bestimmung mittelst Aethers aus einer Seifenlösung ausgeschüttelte und beim Verdunsten der ätherischen Flüssigkeit zurückbleibende Cholesterin behandeln soll. Es heisst daselbst: «Es bleibt Cholesterin zurück, verunreinigt mit ein wenig Seife, deren Abtrennung am besten durch Behandlung der völlig getrockneten Masse mit mehreren kleinen Portionen kalten Alkohols geschieht, da kalter Alkohol die Seifen leicht löst, das Cholesterin dagegen ungelöst lässt.»

Es liegt nach den oben gemachten Mittheilungen auf der Hand, dass auch Durchschütteln der ätherischen Cholesterinlösungen mit reinem Wasser ein geeignetes Mittel sein kann, um die in jene Lösungen übergegangenen geringen Seifenmengen theilweise oder ganz zu entfernen.

Ich gehe nun zur Besprechung der von Burchard geäußerten Vermuthung über, dass Barbieri und ich bei Bestimmung des Cholesteringehalts der Lupinenkeimlinge mit dem Cholesterin eine Substanz anderer Art gewogen und nur aus diesem Grunde in den Keimlingen mehr Cholesterin gefunden haben, als in den ungekeimten Samen.

Wer unsere oben citirte Abhandlung durchliest, der wird finden, dass Barbieri und ich nicht nur Quantitätsbestimmungen des in den Lupinensamen und Lupinenkeimlingen enthaltenen Cholesterins auszuführen gesucht, sondern das letztere auch einer qualitativen Untersuchung unterworfen haben. Die dabei erhaltenen Resultate sicherten uns gegen die Möglichkeit, bei den quantitativen Bestimmungen Präparate in Rechnung zu stellen, welche etwa der Hauptsache nach gar nicht aus Cholesterin bestanden; sie gestatteten jedoch kein Urtheil darüber, ob jene Präparate sämmtlich den gleichen Reinheitsgrad besaßen. Zur Entscheidung der letzteren Frage fehlten uns die Mittel<sup>2)</sup>. Dass darin

<sup>1)</sup> Handbuch der physiologisch- u. pathologisch-chemischen Analyse. 5. Auflage, S. 425.

<sup>2)</sup> Die Bestimmung des Schmelzpunktes ist kein geeignetes Mittel zur Erreichung jenes Zweckes; denn abgesehen davon, dass schon sehr geringe der Quantität nach kaum in's Gewicht fallende Beimengungen

ein Mangel jener Untersuchungen liegt, habe ich niemals verkannt; auch war dieser Umstand eine der Hauptursachen dafür, dass wir die Ergebnisse unserer Bestimmungen nur als approximative hingestellt haben.

Ich habe nun versucht, die früher erhaltenen Resultate durch colorimetrische Bestimmungen zu controliren. Ueber die Art und Weise, in welcher ich dabei verfuhr, ist Folgendes zu bemerken: Die Aetherextracte aus den Lupinensamen und aus den etiolirten Lupinenkeimlingen waren so stark gelb gefärbt, dass sie nicht direct für colorimetrische Bestimmungen verwendet werden konnten. Gesetzt aber auch, dass sie farblos gewesen wären, so würde ich es doch für richtig gehalten haben, nicht diese Roh-Extracte, sondern vielmehr die aus den verseiften Producten durch Ausschütteln mittelst Aethers gewonnenen Cholesterinlösungen für jene Bestimmungen zu benutzen<sup>1)</sup>. Die bei Verarbeitung der Axenorgane der Keimlinge auf letzterem Wege erhaltene Cholesterinlösung war so wenig gefärbt, dass sie ohne jedes Bedenken direct zur Verwendung kommen konnte<sup>2)</sup>; dagegen zeigten die aus den ungekeimten Samen und aus den Cotyledonen der Keimlinge in der gleichen Weise dargestellten Lösungen starke Gelbfärbung. Ich habe aus denselben daher das Cholesterin in der früher beschriebenen Weise durch Krystallisation zur Abscheidung gebracht, getrocknet und gewogen. Da die so erhaltenen Krystalle noch gefärbt waren, so wurden sie einmal unter möglichster Ver-

---

den Schmelzpunkt eines Cholesterinpräparates stark erniedrigen können, ist auch noch darauf aufmerksam zu machen, dass in den Lupinenkeimlingen nach unseren Untersuchungen zwei Glieder der Cholesteringruppe vorkommen und dass Gemenge derselben einen niedrigeren Schmelzpunkt besitzen, als die reinen Substanzen.

<sup>1)</sup> Denn diese Lösungen enthalten zweifellos neben dem Cholesterin weit weniger andere Bestandtheile, als die Roh-Extracte; auch ist es nicht sicher, dass in den letzteren das Cholesterin seiner ganzen Menge nach in freiem Zustande sich vorfindet.

<sup>2)</sup> D. h. es konnte diese Flüssigkeit direct eingedunstet und die beim Aufnehmen des Verdampfungsrückstandes in Chloroform erhaltene Lösung für die colorimetrische Prüfung benutzt werden.

meidung von Verlusten<sup>1)</sup> aus Weingeist umkrystallisirt und sodann zwischen Fliesspapier stark abgepresst. Um den Reinheitsgrad der so gewonnenen farblosen Präparate zu bestimmen, löste ich Proben derselben in Chloroform und verwendete die Lösungen für die colorimetrische Prüfung<sup>2)</sup>. Als Vergleichsobject diente in letzterem Falle ein Präparat von Cholesterin (Phytosterin), welches bei Verarbeitung einer grösseren Quantität von Lupinensamen-Rohfett erhalten worden war, während bei den an den Axenorganen der Keimlinge ausgeführten Bestimmungen für den gleichen Zweck ein Caulosterin-Präparat verwendet wurde.

Die colorimetrischen Bestimmungen gründete ich aber zur Erreichung grösserer Sicherheit nicht nur auf die Cholestol-*Reaction*, sondern auch auf die von O. Hesse<sup>3)</sup> beschriebene

<sup>1)</sup> Die von der ersten Krystallisation abfiltrirte Mutterlauge wurde stets weiter verdunstet, um noch eine zweite Krystallisation zu erhalten. Dieselbe wurde mit der ersten vereinigt oder, in einem Falle, für sich untersucht.

<sup>2)</sup> Für diese colorimetrische Prüfung würde ich die Roh-Präparate, deren Quantität durch Wägung bestimmt war, direct verwendet haben, falls dieselben nicht eine Färbung gezeigt hätten, welche vermuthlich von Einfluss auf das Resultat gewesen wäre. Dass übrigens durch einmaliges Umkrystallisiren der Roh-Präparate aus Weingeist der Cholesterin-gehalt derselben in einem auf colorimetrischem Wege nachweisbaren Grade verändert wurde, ist nicht wahrscheinlich. Wie oben schon erwähnt ist, suchte ich beim Umkrystallisiren der Präparate die Verluste möglichst gering zu machen. Dass beim Umkrystallisiren der aus den Cotyledonen der Keimlinge dargestellten Präparate nicht eine an Cholesterin arme, an einem Nebenbestandtheil reiche Mutterlauge übrig blieb, geht daraus hervor, dass die zweite Krystallisation, welche in einem Falle für sich untersucht wurde, sich bei der colorimetrischen Prüfung nicht als ärmer, sondern sogar als reicher an Cholesterin erwies, als die erste Krystallisation (eine das Cholesterin verunreinigende Substanz krystallisirte also leichter aus, als das Cholesterin). Schliesslich ist noch darauf aufmerksam zu machen, dass ja das aus den ungekeimten Samen gewonnene Präparat ganz ebenso behandelt wurde, wie die aus den Cotyledonen der Keimlinge dargestellten, und dass demnach ein durch das Umkrystallisiren bedingter Versuchsfehler sich bei ersterem ebenso wohl geltend machen musste, als bei den letzteren.

<sup>3)</sup> Liebig's Annalen der Chemie, Bd. 211, S. 283. Die Hesse'sche Reaction ist eine Modification der von H. Salkowski angegebenen.

Rothfärbung, welche chloroformische Cholesterinlösungen beim Durchschütteln mit Schwefelsäure vom specifischen Gewicht 1,76 annehmen. Bei Ausführung der auf dem ersteren Princip beruhenden Bestimmungen hielt ich mich an die von Burchard gegebenen Vorschriften; ich brachte je 2 ccm. der in geeigneter Weise verdünnten chloroformischen Lösungen mit je 10 Tropfen Essigsäure-Anhydrid und 1 oder 2 Tropfen concentrirter Schwefelsäure<sup>1)</sup> in gleich weiten Probirrohren zusammen und beobachtete die nach Verlauf einer gewissen Zeit auftretenden Färbungen. Bei Ausführung der anderen Bestimmungen wurden je 5 ccm. der chloroformischen Lösungen mit je 5 ccm. Schwefelsäure vom specifischen Gewicht 1,76 in kleinen gleich weiten Stöpselcylindern von circa 16 ccm. Inhalt fünf Minuten lang durchgeschüttelt. Die Rothfärbung, welche die Chloroform-Schicht bei dieser Behandlung annimmt, geht nach Verlauf von einigen Stunden in Violett, später in Blau über. Jede dieser nach einander auftretenden Färbungen lässt sich bei Ausführung colorimetrischer Bestimmungen zur Verleichen benutzen.

Ehe ich diese Methoden zur Ermittlung des Cholesteringehalts der Lupinensamen und Lupinenkeimlinge verwendete, stellte ich unter Mitwirkung meines Assistenten, Herrn A. Likiernik, Versuche mit reinen Lösungen der aus den genannten Materialien dargestellten Cholesterine (Phytosterin und Caulosterin) an. Wir bereiteten uns zunächst chloroformische Lösungen, welche in 100 ccm. je 0,050 gr. der genannten Substanzen enthielten. Indem wir abgemessene Mengen dieser Lösungen in verschiedenem Verhältniss mit reinem Chloroform mischten, stellten wir Lösungen geringerer Concentration in den von Burchard angegebenen Abstufungen her. Es zeigte sich, dass eine Lösung von  $\frac{1}{10}$  mgr. Phytosterin oder Caulosterin in 2 ccm. Chloroform beim Zusammenbringen mit Essigsäure-Anhydrid und Schwefelsäure noch

<sup>1)</sup> In den meisten Versuchsreihen setzten wir je 2 Tropfen Schwefelsäure zu, in anderen nur je einen. Es hat übrigens, wie auch Burchard angiebt, keinen Einfluss auf die Färbung, ob man etwas mehr oder etwas weniger Schwefelsäure zusetzt.

sichtbare Grünfärbung, dass gleich concentrirte Lösungen der genannten Substanzen bei Anwendung der Hesse'schen Reaction aber auch noch deutliche Rothfärbung gaben. Die concentrirteren Lösungen gaben entsprechend stärkere Färbungen. Während gleich concentrirte Lösungen des Phytosterins und des Caulosterins nach dem Burchard'schen Verfahren Färbungen von ungefähr gleicher Intensität gaben, zeigte die Lösung des ersteren Stoffes beim Durchschütteln mit Schwefelsäure stärkere Rothfärbung, als diejenige des Caulosterins; auch gab die letztere Substanz bei dieser Reaction eine etwas andere Farbennuance.

Obgleich man durch die obigen Reactionen noch äusserst geringe Cholesterin-Quantitäten nachzuweisen vermag, so besitzen doch die auf diese Reactionen sich gründenden colorimetrischen Bestimmungen keinen hohen Grad von Genauigkeit. Die Ursache dafür liegt darin, dass man geringe Differenzen in der Intensität der Färbung nicht zu unterscheiden vermag, und zwar um so weniger, je concentrirter die Flüssigkeiten sind<sup>1)</sup>. A. Likiernik und ich vermochten z. B. nach dem Burchard'schen Verfahren noch zu unterscheiden, ob eine Lösung in 2 cbcm.  $\frac{4}{10}$  oder  $\frac{5}{10}$  mgr. Cholesterin enthielt; auch konnten wir erkennen, ob in 2 cbcm.  $\frac{8}{10}$  oder 1 mgr. des genannten Stoffes sich vorfanden; nicht aber, ob in jener Flüssigkeitsmenge  $\frac{40}{100}$  oder  $\frac{45}{100}$ , bzw.  $\frac{8}{10}$  oder  $\frac{9}{10}$  mgr. enthalten waren. Daraus folgt, dass wir zwar unter günstigen Umständen z. B. noch festzustellen vermochten, ob ein Extract 0,04 oder 0,05 gr., bzw. 0,08 oder 0,10 gr. Cholesterin enthielt, dass aber geringere Gehaltsdifferenzen sich nicht mehr erkennen liessen — dass wir ferner in einem Cholesterinpräparat eine Verunreinigung, welche 20% beträgt, auf jenem Wege noch nachzuweisen vermochten, nicht aber eine solche von 10%.

---

<sup>1)</sup> Lösungen, welche in 100 cbcm. mehr als 0,050 gr. Cholesterin enthalten, sind unter den von uns gewählten Versuchsbedingungen überhaupt nicht mehr geeignet für die colorimetrische Bestimmung, wie auch von Burchard angegeben wird.

Die auf die Hesse'sche Reaction sich gründende colorimetrische Bestimmungsmethode steht nach unseren Beobachtungen dem Burchard'schen Verfahren an Brauchbarkeit keineswegs nach; in einigen Fällen vermochten wir sogar mit Hülfe derselben geringere Gehaltsunterschiede sicherer zu erkennen, als vermittelt des letzteren Verfahrens.

Ein Hinderniss für die Anwendung der colorimetrischen Methode auf cholesterinhaltige Extracte aus vegetabilischen Substanzen etc. besteht in vielen Fällen darin, dass diese Extracte schon vor dem Zusatz der Reagentien gelb gefärbt sind. Eine solche Färbung ist insbesondere hinderlich für die Anwendung des Burchard'schen Verfahrens; denn der gelbgrüne Farbenton, welchen die gelbgefärbten Extracte nach dem Zusatz von Essigsäure-Anhydrid und Schwefelsäure annehmen, lässt sich, wie auch Burchard gefunden hat, nicht mit den blaugrünen Farbentönen der mit Hülfe einer reinen Cholesterinlösung hergestellten Farbenscala vergleichen. Die gelbgefärbten Extracte lassen sich in der Regel durch Eintragen von Thierkohle vollständig entfärben. Diese Massregel kann aber Fehler verursachen. Schon seit langer Zeit weiss man, dass Aetherextracte aus vegetabilischen Substanzen an Thierkohle ausser den Farbstoffen auch andere Bestandtheile abgeben<sup>1)</sup>. Allem Anschein nach wird auch das Cholesterin von der Absorption durch die Kohle betroffen, wenn auch vielleicht nicht in starkem Maasse<sup>2)</sup>.

<sup>1)</sup> M. vgl. die Mittheilung, welche ich in den Landw. Versuchstationen, Bd. 15, S. 81, gemacht habe.

<sup>2)</sup> Ich habe darüber folgende Versuche angestellt: Von einer chloroformischen Cholesterinlösung, welche in 100 cbcm. 0,020 gr. Substanz enthielt, wurde ein Theil mit einer beträchtlichen Quantität Thierkohle circa 24 Stunden lang unter häufigem Umschütteln in Berührung gelassen, dann filtrirt. Die colorimetrische Bestimmung nach Burchard's Verfahren liess in dem Filtrat eine Verringerung des Cholesteringehalts gegenüber der ursprünglichen Flüssigkeit nicht erkennen; eine auf die Hesse'sche Reaction gegründete Bestimmung schien jedoch eine Verminderung der Cholesterinmenge anzuzeigen, deren Betrag freilich wohl nur ein geringer gewesen sein kann. In diesem Versuch hatte also die Thierkohle nur geringen Einfluss ausgeübt. Als ich jedoch einen Theil

Zuweilen entfärben sich die Extracte bei Ausführung der colorimetrischen Bestimmungen nach dem Zusatz der Säure, ehe die den beschriebenen Reactionen eigenthümlichen Färbungen hervortreten. Es kommt aber auch vor, dass der Zusatz der Reagentien in ursprünglich farblosen Extracten Nebenfärbungen hervorbringt, welche dann natürlich das Resultat ganz unsicher machen.

Zieht man alle diese Umstände in Betracht, so muss man zu der Schlussfolgerung kommen, dass die Anwendbarkeit der colorimetrischen Cholesterin-Bestimmungsmethode eine sehr beschränkte ist.

Ich gehe nun zur Mittheilung der Ergebnisse über, welche ich an den Lupinensamen und Lupinenkeimlingen erhielt. Ueber die Beschaffenheit des Untersuchungsmaterials ist Folgendes zu bemerken: Die ungekeimten Samen, sowohl wie die Keimlinge waren von den Schalen befreit und auf einer Dreefs'schen Reibe in ein äusserst feines Pulver verwandelt. Die Keimlinge wurden auf Gazenetzen, welche über flache, mit destillirtem Wasser gefüllte Glasschalen gespannt waren, bei Lichtabschluss gezogen. Nach 14tägiger Vegetationsdauer erfolgte die Ernte. Die Cotyledonen wurden an den Ansatzstellen von den Keimlingen abgetrennt, sodann getrocknet, gewogen und fein zerrieben; das Gleiche geschah mit den nach Entfernung der Cotyledonen übrig gebliebenen Theilen der Keimlinge, welche ich im Folgenden der Kürze halber als die Axenorgane bezeichnen will.

Die fein zerriebenen Substanzen wurden mit Aether behandelt, bis der letztere nur noch minimale Substanzmengen in Lösung brachte, die so erhaltenen Extracte in der früher beschriebenen Weise verarbeitet. Von den beim Durchschütteln

---

eines bei Verarbeitung der Axenorgane der Lupinenkeimlinge erhaltenen fast farblosen Extracts (vgl. w. u.) mit Thierkohle behandelte, denselben sodann eindunstete, den Verdampfungsrückstand in Chloroform löste und die so erhaltene Lösung colorimetrisch mit einer nicht mit Thierkohle zusammengebrachten, im Uebrigen aber ebenso behandelten Probe des gleichen Extracts verglich, erhielt ich ein verschiedenes Resultat; die erstere Lösung gab zweifellos schwächere Färbung.

der Seifen-Lösungen mit Aether gewonnenen cholesterin-haltigen Extracten<sup>1)</sup> wurde einer — nämlich derjenige, welchen ich bei Verarbeitung der Axenorgane erhielt — direct für die colorimetrische Prüfung verwendet (wie w. o. schon erwähnt worden ist); die übrigen unterwarf ich der Destillation. Die Destillationsrückstände wurden in möglichst wenig heissem Alkohol gelöst, die beim Erkalten sich ausscheidenden Krystalle abfiltrirt, mit kaltem Alkohol gewaschen, zwischen Fliesspapier abgepresst, sodann über concentrirter Schwefelsäure bis zur Constanz des Gewichts getrocknet und gewogen. Aus der Mutterlauge erhielt ich, beim Verdunsten derselben, noch eine geringe Krystallmenge, welche ebenso wie die erstere Portion behandelt und sodann mit dieser vereinigt wurde. Die so erhaltenen Zahlen theile ich im Folgenden mit.

#### A. Ungekeimte Samen.

Aus 235,7 gr. Trockensubstanz<sup>2)</sup> wurden bei Ausführung der Cholesterinbestimmung 0,323 gr. = 0,137% Krystalle erhalten<sup>3)</sup>. Dieselben wurden einmal aus Weingeist um-

<sup>1)</sup> Die Seifenlösungen wurden je drei mal mit Aether extrahirt. Für jede Extraction wurde eine der wässrigen Seifenlösung dem Volumen nach ungefähr gleiche Aethermenge angewendet. Alle Operationen wurden möglichst gleichmässig ausgeführt.

<sup>2)</sup> Die für die quantitativen Bestimmungen verwendeten feingepulverten Substanzen enthielten noch hygroskopische Feuchtigkeit. Dieselbe wurde in abgewogenen Proben quantitativ bestimmt und auf Grund der dabei erhaltenen Resultate der Trockengehalt der zur Verwendung gelangten Substanzmengen berechnet. Der Kürze halber gebe ich nur die Trockensubstanzmengen an.

<sup>3)</sup> Es sei hier erwähnt, dass für das Roh-Cholesterin aus entschälten Lupinensamen ein Schmelzpunkt von 127° gefunden wurde und dass man durch einmaliges Umkrystallisiren desselben zu Producten gelangt, welche bei 135—137° schmelzen. Einen höheren Schmelzpunkt zeigte das aus dem genannten Material dargestellte Cholesterin (Phyosterin) auch nach wiederholtem Umkrystallisiren nicht. Nach Jacobson (diese Zeitschrift, Bd. 13, S. 32) ist dem aus Lupinensamen dargestellten Roh-Cholesterin eine sehr geringe Menge von Cerylalkohol beigemischt; doch ist es nicht sicher, dass dies auch für unsere Präparate gilt, da Jacobson das Fett aus nicht entschälten Lupinensamen verarbeitete.

krystallisirt. Eine Lösung des so erhaltenen farblosen Präparats in Chloroform gab bei der colorimetrischen Prüfung sowohl die Cholestol-Reaction wie die Hesse'sche Reaction in der gleichen Stärke, wie eine gleich concentrirte Lösung eines Phytosterin-Präparats, welches unter Verwendung einer grösseren Materialmenge aus Lupinensamen dargestellt und durch Umkrystallisiren gereinigt war.

Barbieri und ich (l. c.) fanden in den für die frühere Untersuchung verwendeten Samen von *Lupinus luteus* 0,135 und 0,152% Cholesterin. In zwei anderen Mustern der gleichen Samen (aus anderen Jahrgängen stammend) wurden in meinem Laboratorium 0,177 und 0,178% Cholesterin gefunden<sup>1)</sup>. Es scheint demnach, dass der Cholesterin-gehalt der genannten Samen nur ziemlich geringen Schwankungen unterliegt.

### B. Etiolirte Keimlinge.

a) Cotyledonen. 71,06 gr. Trockensubstanz gaben 0,2750 gr. = 0,387% Krystalle. Die letzteren wurden einmal aus möglichst wenig Weingeist umkrystallisirt. Ein Theil des so erhaltenen farblosen Präparates wurde in Chloroform gelöst, die Lösung in verschiedenen Verdünnungen colorimetrisch geprüft<sup>2)</sup>. Es wurden dabei Färbungen erhalten, die nur äusserst wenig hinter denjenigen zurückstanden, welche von gleich concentrirten Lösungen des aus den ungekeimten Samen dargestellten Cholesterins (Phytosterins) gegeben wurden; einige Proben liessen sogar keinen Unterschied erkennen. Ich will letzteres unberücksichtigt lassen und annehmen, dass das aus den Cotyledonen erhaltene Präparat nur 80% Cholesterin ent-

<sup>1)</sup> Landw. Versuchsstationen, Bd. 36, S. 405.

<sup>2)</sup> Es wurde zunächst eine Lösung hergestellt, welche in 100 ccm. 0,050 gr. Substanz enthielt. Abgemessene Quantitäten dieser Lösung wurden sodann mit Chloroform gemischt, um Lösungen geringerer Concentration herzustellen.

hielt<sup>1)</sup>. Dann berechnet sich der Cholesteringehalt der Cotyledonen auf 0,310%<sup>2)</sup>.

b) Uebrige Theile der Keimlinge (Axenorgane etc.). Der Aetherextract aus 36,61 gr. Trockensubstanz wurde verseift, das Cholesterin aus der Seifenlösung mittelst Aethers ausgeschüttelt, die so erhaltene ätherische Lösung auf 500 ccm. gebracht. Ich dunstete 50 ccm. dieser fast farblosen Flüssigkeit ein und nahm den Verdampfungsrückstand in der gleichen Menge Chloroform wieder auf. Die colorimetrische Prüfung führte zu dem Resultat, dass in 5 ccm. dieser Lösung 0,00075 gr. Cholesterin, oder in 500 ccm. 0,075 gr. enthalten waren. Vorstehende Zahlen sind aus dem Resultat abgeleitet, welches bei Anwendung der Hesse'schen Reaction erhalten wurde; beim Vermischen mit Essigsäure-Anhydrid und Schwefelsäure nahm die Lösung sofort eine Gelbfärbung an, welche dem Einreihen der später auftretenden Grünfärbung in die Farbenscala hinderlich war. Danach berechnet sich der Cholesteringehalt der nach Abtrennung der Cotyledonen übrig bleibenden Theile der Keimlinge auf 0,205%.

Um mit Hülfe vorstehender Procentzahlen berechnen zu können, ob die absolute Cholesterinmenge in den keimenden Samen sich vermehrt hat, muss man noch das Mengenverhältniss sowohl der Cotyledonen zu den übrigen Theilen der Keimlinge, als auch der Keimpflanzentrockensubstanz zur Samentrockensubstanz kennen. Das erstere Verhältniss ist direct von mir bestimmt worden; es zeigte sich, dass von der Keimpflanzentrockensubstanz 47,2% auf die Cotyledonen und 52,8% auf die Axenorgane etc. fielen. Was das Mengen-

<sup>1)</sup> Eine nur 10% betragende Verunreinigung durch andere Substanzen liess sich nach den w. o. gemachten Mittheilungen mittelst der colorimetrischen Methode in einem Cholesterinpräparat nicht entdecken; ist also der Nachweis geleistet, dass bei der colorimetrischen Prüfung die Färbungen in geringerer Stärke auftreten, so muss daraus auf eine Verunreinigung von circa 20% geschlossen werden.

<sup>2)</sup> Nach der Proportion  $100 : 80 = 0,387 : x$ . In Betreff der Berechtigung, die Rechnung in dieser Weise auszuführen, vergleiche man die Anmerkung 2 auf S. 504.

verhältniss zwischen ungekeimten Samen und Keimlingen betrifft, so kann ich dasselbe aus früheren Untersuchungen ableiten<sup>1)</sup>; 100 Th. Samen (wasserfrei, ohne Schalen) lieferten bei 14tägiger Dauer der Keimung im Mittel 78,5 Th. etiolirte Keimlinge (wasserfrei, ohne Schalen). Unter Berücksichtigung dieser Zahlen gelangt man zu folgendem Endresultat:

100 Th. Samen (mit 0,137 Th. Cholesterin) lieferten 78,5 Th. Keimlinge, bestehend aus 37,05 Th. Cotyledonen (mit 0,115 Th. Cholesterin) und 41,45 Th. Axenorgane etc. (mit 0,085 Th. Cholesterin). Den in den ungekeimten Samen enthaltenen 0,137 Th. Cholesterin stehen demnach in den Keimlingen 0,200 Th. Cholesterin gegenüber. Daraus berechnet sich eine Vermehrung der Cholesterinmenge während der Keimung um 46%.

Zur Ergänzung der im Vorigen aufgeführten Bestimmungen untersuchte ich noch 14tägige Keimlinge, welche aus den gleichen Samen in grossen, mit Flusssand gefüllten Kästen in einem verdunkelten Zimmer gezogen worden waren. Da der Lichtabschluss kein vollständiger gewesen war, so hatten die Cotyledonen sich schwach grün gefärbt; im Uebrigen besaßen die Keimlinge vollständig das Aussehen etiolirter Pflänzchen. Nachdem diese Keimlinge getrocknet und mit der Hand gröblich zerkleinert worden waren, wurden sie auf ein Sieb gebracht. Die zerkleinerten Axenorgane liessen sich grösstentheils absieben, während die Cotyledonen oben zurückblieben. Die Keimlinge liessen sich auf diese Weise in zwei dem Gewicht nach ungefähr gleiche Hälften trennen, von denen die eine zum allergrössten Theil aus den Cotyledonen, die zweite fast ausschliesslich aus den Axenorganen bestand. Obwohl das so gewonnene Material, welches ursprünglich für andere Zwecke bestimmt war, dem für die anderen Versuche benutzten an Qualität nachstand, so habe ich es doch für einige Bestimmungen verwendet, weil ich es in grösserer Quantität vorrätlich hatte. Ich erhielt dabei folgende Resultate:

<sup>1)</sup> M. vgl. Landw. Versuchsstationen, Bd. 36, S. 415 u. 463, sowie Landw. Jahrbücher, herausgegeben von H. Thiel, Bd. 5, S. 820.

a) Erste Hälfte, zum allergrössten Theil aus den Cotyledonen bestehend. 83,63 gr. Trockensubstanz lieferten bei Ausführung der Cholesterinbestimmung 0,2845 gr. = 0,340% Krystalle. In einem zweiten, in grösserem Massstabe aber nicht völlig quantitativ durchgeführten Versuch erhielt ich aus ca. 500 gr. Trockensubstanz 1,50 gr. = ca 0,30% Krystalle. Die so gewonnene Substanz wurde beim Umkrystallisiren in zwei Krystallisationen zerlegt; beide wurden in der w. o. schon angegebenen Weise colorimetrisch geprüft. Für die erste Krystallisation ergab sich ein Reinheitsgrad von 80%; die zweite schien reiner zu sein. Ich will jedoch für beide Cholesterin-Präparate nur einen Reinheitsgrad von 80% annehmen. Dann berechnet sich für diese Hälfte der Keimlinge ein Cholesteringehalt von 0,272%.

b) Zweite Hälfte, fast ausschliesslich aus den Axenorganen bestehend<sup>1)</sup>. Der Aetherextract aus 104,34 gr. Trockensubstanz wurde verseift, das Cholesterin aus der Seifenlösung mittelst Aethers ausgeschüttelt, die so erhaltene Lösung auf 500 ccm. gebracht. 50 ccm. davon wurden eingedunstet, der Verdampfungsrückstand in Chloroform gelöst, die Lösung wieder auf 50 ccm. gebracht; ausserdem wurde in der gleichen Weise noch eine halb so starke chloroformische Lösung hergestellt. Die colorimetrische Prüfung dieser in dünner Schicht vollkommen farblosen Flüssigkeiten, welche sich sowohl mittelst der Cholestol-Reaction als mittelst der Hesse'schen Reaction ausführen liess, führte zu dem Ergebniss, dass in 2 ccm. der ursprünglichen Lösung 0,0009 gr. Cholesterin, also in 500 ccm. 0,225 gr., enthalten waren. Danach berechnet sich für diese zweite Hälfte der Keimlinge ein Cholesteringehalt von 0,216%.

Das Mittel aus den in solcher Weise für den Cholesteringehalt der beiden Hälften der Keimlinge gefundenen Zahlen

<sup>1)</sup> Den Wurzeln der Keimlinge haftete eine geringe Menge von Sand so hartnäckig an, dass derselbe durch Abspülen mit Wasser nicht entfernt werden konnte. In einer Probe der für obige Bestimmung verwendeten Substanz wurde der Sandgehalt quantitativ bestimmt und sodann von der Trockensubstanzmenge abgezogen.

ist 0,244%. Unter der Annahme, dass auch in diesem Falle wieder 100 Th. Samentrockensubstanz 78,5 Th. Keimpflanzen-trockensubstanz geliefert haben, gelangt man zu folgendem Endresultat: 100 Th. Samen mit 0,137 Th. Cholesterin lieferten 78,5 Th. Keimlinge mit 0,192 Th. Cholesterin. Dies entspricht der Annahme, dass während des Keimungsvorganges die Cholesterinmenge sich um 40% vermehrt hat.

Die im Vorigen mitgetheilten Versuchsergebnisse liefern eine vollständige Bestätigung der Resultate, welche von Barbieri und mir früher erhalten wurden. Nicht nur fand ich in etiolirten Lupinenkeimlingen einen weit höheren Procentgehalt an Cholesterin vor, als in den ungekeimten Lupinensamen, sondern es war auch die in einem bestimmten Gewicht der letzteren enthaltene absolute Cholesterinmenge beträchtlich geringer, als diejenige, welche in der daraus entstandenen Keimpflanzen-Quantität gefunden wurde. Hält man diesen Befund mit der von Barbieri und mir gemachten Beobachtung zusammen, dass in den Axenorganen der etiolirten Lupinenkeimlinge ein Glied der Cholesteringruppe sich vorfindet, welches allem Anschein nach in den ungekeimten Samen nicht vorhanden ist<sup>1)</sup>, so wird man es trotz der Mängel der zur Verwendung gekommenen analytischen Methoden doch für fast zweifellos erklären müssen, dass während der bei Lichtabschluss erfolgenden Keimung der Lupinensamen eine Zunahme des Cholesterins erfolgt.

Besonders reich an Cholesterin zeigten sich in den früheren sowohl wie in den jetzt ausgeführten Versuchen

<sup>1)</sup> Keine Beobachtung spricht für das Vorhandensein dieses Gliedes der Cholesterin-Gruppe, des Caulosterins, in den ungekeimten Lupinensamen. Der Schmelzpunkt desselben wurde bei 158—159° gefunden. In meinem Laboratorium ist wiederholt aus den genannten Samen Cholesterin dargestellt und es ist dabei niemals ein Präparat erhalten worden, dessen Schmelzpunkt höher als 137° lag. Auch Jacobson (diese Zeitschrift, Bd. 13, S. 32) hat das Cholesterin aus Lupinensamen untersucht und für dasselbe nur einen Schmelzpunkt von 135,5—136,5 gefunden. Dass alle diese Präparate Gemenge eines bei 158—159° und eines weit niedriger schmelzenden Cholesterins gewesen sind, ist doch kaum anzunehmen.

die Cotyledonen der etiolirten Lupinenkeimlinge; der procentige Cholesteringehalt derselben war mehr als doppelt so hoch, als derjenige der ungekeimten Samen. Das Verhalten des Cholesterins steht demnach in diesem Falle in auffallendem Gegensatz zu demjenigen der in den Cotyledonen enthaltenen stickstofffreien und stickstoffhaltigen Reservestoffe, welche während der bei Lichtabschluss stattfindenden Keimung eine rasche Abnahme erfahren.

Auf Grund dieser wie der w. o. mitgetheilten Versuchsergebnisse weise ich die Kritik, welcher Burchard die von Barbieri und mir gemachten Angaben unterworfen hat, als eine unberechtigte auf das Entschiedenste zurück.

Die über das Verhalten des Cholesterins in Lupinenkeimlingen von uns gemachten Beobachtungen zwingen selbstverständlich nicht zu der Schlussfolgerung, dass die genannte Substanz bei der in jenen Keimlingen stattfindenden Neubildung von Stoffen gar keine Verwendung finde. Denn es ist ja denkbar, dass in den Keimlingen einerseits Bildung von Cholesterin, andererseits Verbrauch desselben erfolgt, dass aber die Bildung stärker ist, als der Verbrauch. Auf diesen Punkt hat schon J. Reinke im Biologischen Centralblatt (Bd. 2, S. 132) bei Gelegenheit einer Besprechung der von Barbieri und mir ausgeführten Untersuchungen aufmerksam gemacht<sup>1)</sup>.

<sup>1)</sup> Reinke weist an jenem Orte darauf hin, dass die über den Cholesteringehalt etiolirter und normaler Lupinenpflänzchen von uns gemachten Beobachtungen sich z. B. durch folgende Annahmen erklären lassen:

a) Cholesterinmoleküle vermögen sich im Zustande der Inanition einer Pflanze bei Abschluss des Lichts aus kleineren, durch Spaltung entstandenen Atomgruppen aufzubauen, welche bei normaler Ernährung der Pflanzen im Licht ausschliesslich oder doch ganz überwiegend für anderweitige Synthesen Verwendung finden.

b) Die Differenz im Cholesteringehalt etiolirter und normaler Pflanzen erklärt sich daraus, dass in den ersteren die Bildung den Verbrauch überwiegt, in den letzteren die Production von Cholesterin gegenüber dem Verbrauch so sehr herabgedrückt wird, dass die Substanz kaum zur Anhäufung gelangen kann.

Ob diese oder eine andere Deutung die richtige sei, kann man, so sagt Reinke, nur durch fernere Untersuchungen entscheiden, welche

Wenn man den an Lupinenkeimlingen gemachten Beobachtungen diese Deutung giebt, so würde man auch wohl keinen Widerspruch zu denselben in dem etwa erbrachten Nachweis sehen können, dass in anderen bei Lichtabschluss keimenden Samen der Cholesteringehalt sich vermindert; denn es ist ja denkbar, dass in manchen Fällen der Verbrauch überwiegt.

Auffallen musste jedoch die von Burchard gemachte Beobachtung, dass ein Extract aus den etiolirten Keimlingen einer von ihm nicht näher bezeichneten Gras-Art beim Zusammenbringen mit Essigsäure-Anhydrid und Schwefelsäure keine Grünfärbung, sondern nur Gelbfärbung gab; denn es würde daraus zu schliessen sein, dass jener Extract gar kein Cholesterin mehr enthielt<sup>1)</sup>. Ich habe mich daher veranlasst gesehen, etiolirte Gramineen-Keimlinge auf Cholesterin zu untersuchen, und zwar solche von italienischem Raygras (*Lolium perenne*) und von Weizen (*Triticum vulgare*). Dieselben waren in einem dunkeln Raum in Flusssand gezogen und 16—17 Tage alt. Nach dem Trocknen wurden sie auf der Dreefs'schen Reibe in ein äusserst feines Pulver verwandelt und sodann mit Aether extrahirt. Die Aetherextracte wurden verseift, die Seifenlösung mit Aether durchgeschüttelt, die so erhaltenen ätherischen Flüssigkeiten der Destillation unterworfen. Die Lösungen der Destillationsrückstände in heissem Weingeist lieferten beim Erkalten Ausscheidungen, welche sowohl die Hesse'schen wie die Cholestol-Reaction gaben<sup>2)</sup>. Demnach enthielten diese etiolirten Keimlinge Cholesterin.

---

aber wohl kaum an der Pflanze sich werden ausführen lassen. Die Entscheidung kann eher von dem rein chemischen Studium des Cholesterins, den Bedingungen seiner Bildung und seiner Zersetzung erwartet werden.

<sup>1)</sup> Wenigstens kein die Cholestol-Reaction gebendes Glied der Cholesterin-Gruppe.

<sup>2)</sup> Neben Cholesterin schien ein anderer, aus der alkoholischen Lösung beim Erkalten sich rasch ausscheidender Körper (vielleicht ein aus wachsartigen Stoffen abgeschiedener Alkohol) sich vorzufinden.

Sowohl die ätherischen Roh-Extracte aus den etiolirten Weizen- und Graskeimlingen, als auch die beim Ausschütteln des Cholesterins aus den Seifenlösungen mittelst Aethers erhaltenen Flüssigkeiten waren so stark gelb gefärbt, dass sie nicht direct für colorimetrische Bestimmungen brauchbar waren. Sie liessen sich aber durch Eintragen von Thierkohle vollständig entfärben. Dieser Umstand veranlasste mich, noch folgenden Versuch anzustellen: Die Aetherextracte aus je 30 gr. feingepulverten lufttrocknen Grassamen und Graskeimlingen wurden verseift, die beim Ausschütteln des Cholesterins aus den Seifenlösungen erhaltenen ätherischen Lösungen auf je 200 cbcm. gebracht. Ich entfärbte nun je 100 cbcm. dieser Flüssigkeiten durch Eintragen von annähernd gleichen Quantitäten von Thierkohle, verdunstete dieselben sodann, zur Trockne, löste die Rückstände in Chloroform und füllte die so gewonnenen Lösungen auf je 50 cbcm. auf. Von diesen in ganz gleicher Weise behandelten Flüssigkeiten enthielt die bei Verarbeitung der Graskeimlinge erhaltene nach den Ergebnissen der colorimetrischen Prüfung mehr als doppelt so viel Cholesterin, als diejenige, welche bei Verarbeitung der Grassamen erhalten war; denn 1 cbcm. der ersteren Flüssigkeit, gemischt mit 1 cbcm. reinem Chloroform, gab nach dem Burchard'schen Verfahren stärkere Färbung, als 2 cbcm. der letzteren<sup>1)</sup>. Das gleiche Resultat gab eine, auf die Hesse'sche Reaction gegründete colorimetrische Bestimmung.

Ein zweiter Versuch, zu welchem ich den Rest der im ersten Versuch aus den Graskeimlingen gewonnenen cholesterinhaltigen Flüssigkeit und einen neuen Extract aus Grassamen verwendete, lieferte das gleiche Resultat. In der Ausführung

<sup>1)</sup> Diese Flüssigkeiten schienen für die Anwendung des Burchard'schen Verfahrens sehr geeignet zu sein. Bemerkenswerth ist, dass in denselben nach dem Zusatz von Essigsäure-Anhydrid und Schwefelsäure zuerst eine Blaufärbung entstand, welche weit stärker war, als diejenige, welche ich in verdünnten Phytosterin-Lösungen auftreten sah (diese Blaufärbung ging später in Grün über). Dies scheint anzudeuten, dass hier wieder ein besonderes Glied der Cholesterin-Gruppe vorlag.

unterschied sich dieser Versuch vom ersten nur dadurch, dass ich zur Entfärbung der aus den Samen gewonnenen cholesterinhaltigen Flüssigkeit weniger Thierkohle anwendete, als zur Entfärbung des Extracts aus Keimlingen<sup>1)</sup>; der auf der Absorption von Cholesterin durch Thierkohle beruhende Fehler musste demnach bei der ersteren Flüssigkeit geringer sein, als bei der letzteren<sup>2)</sup>).

Aus diesen Versuchsergebnissen ist zu schliessen, dass die lufttrocknen etiolirten Graskeimlinge procentig mindestens doppelt so viel Cholesterin enthielten, als die lufttrocknen Grassamen. Um das Mengenverhältniss zwischen Keimlingen und Samen annähernd zu bestimmen, wurde eine grössere Anzahl derselben gewogen; dabei ergab sich Folgendes:

100 Stück lufttrockne Samen	wogen	0,2065 gr.
100 » » Keimlinge	»	0,1712 »

100 Theile lufttrockne Samen hatten demnach ungefähr 83 Theile lufttrockne Keimlinge geliefert. Der mit dem Keimungsvorgang verbundene Substanzverlust war also nicht gross genug, um eine Zunahme des procentigen Cholesteringehalts der Keimlinge gegenüber demjenigen der Samen auf mehr als das Doppelte verursachen zu können<sup>3)</sup>. Man muss demgemäss annehmen, dass auch die absolute

<sup>1)</sup> Der erstere Extract war schwächer gelb gefärbt, als der letztere, und bedurfte daher weniger Kohle zur Entfärbung.

<sup>2)</sup> In diesem Falle bestimmte ich auch das Gewicht der trocknen Rückstände, welche beim Eindunsten der mit Thierkohle entfärbten cholesterinhaltigen Flüssigkeiten (aus je 15 gr. Rohmaterial) erhalten wurden. Das Gewicht betrug

bei den Grassamen	0,026 gr.
» » Graskeimlingen	0,065 »

Aus 15 gr. lufttrockner Graskeimlinge wurde also mehr als doppelt so viel Substanz erhalten, als aus der gleichen Menge lufttrockner Grassamen. Ohne Zweifel bestand aber der Rückstand weder in dem einen noch in dem anderen Falle nur aus Cholesterin.

<sup>3)</sup> Wäre die Zunahme des procentigen Cholesteringehalts der keimenden Samen nur eine Folge des mit dem Keimungsvorgang verbundenen Trockensubstanz-Verlustes gewesen, so hätte diese Zunahme nur in dem Verhältniss 83 : 100 erfolgen können.

Cholesterinmenge in den keimenden Grassamen sich vermehrt hat<sup>1)</sup>).

Ob das völlig abweichende Resultat, zu welchem Burchard an Graskeimlingen gelangte, etwa darauf zurückzuführen ist, dass er mit einer anderen, von ihm nicht näher bezeichneten, Grasart experimentirte, oder ob der von ihm verwendete unverseifte Extract Stoffe enthielt, welche die Cholestol-Reaction verdeckten, oder ob irgend ein anderer Umstand von Einfluss war<sup>2)</sup>, vermag ich nicht zu beurtheilen.

<sup>1)</sup> Allerdings gilt dieser Schluss nur unter der Voraussetzung, dass in den Keimlingen nicht ein Glied der Cholesterin-Gruppe sich vorfand, welches die Farbenreactionen weit intensiver giebt, als das Cholesterin der Samen.

<sup>2)</sup> Lediglich in dem Wunsche, eine Erklärung für die auffallenden Differenzen zu finden, welche zwischen Burchard's und meinen Versuchsergebnissen hervorgetreten sind, möchte ich noch auf Folgendes aufmerksam machen: Burchard giebt an, dass er die zur Darstellung der Extracte bestimmten Samen in einer Reibschale zerstoßen und die getrockneten Keimlinge ebenso behandelt habe. Die von mir untersuchten Graskeimlinge liessen sich in einer gewöhnlichen Reibschale nur ganz unvollständig zerkleinern und es liegt wohl nicht ausser dem Bereich der Möglichkeit, dass es sich mit Burchard's Keimlingen ebenso verhalten hat; man weiss aber, dass unvollständig zerkleinerte vegetabilische Substanzen sich auch nur unvollständig durch Aether extrahiren lassen. Vielleicht erklärt sich auch auf diese Weise noch eine Verschiedenheit, welche zwischen Burchard's und meinen Aetherextracten stattgefunden hat. Die von mir aus den Keimlingen dargestellten ätherischen Roh-Extracte waren sämmtlich stark gelb gefärbt, was in Uebereinstimmung mit der Angabe steht, dass etiolirte Keimpflanzen einen in Alkohol und Aether löslichen gelben Farbstoff, das Etiolin, enthalten (m. vgl. z. B. Sachsse, Die Chemie und Physiologie der Farbstoffe, Kohlenhydrate und Protein-substanzen, S. 62). Die von Burchard dargestellten Roh-Extracte können kaum stark gelb gefärbt gewesen sein; denn er hätte dieselben doch anderenfalls nicht für die colorimetrischen Bestimmungen verwenden können. Angaben darüber sind von Burchard für die Extracte aus Linsenkeimlingen gar nicht gemacht worden; für die Extracte aus Grassamen und Graskeimlingen giebt er an, dass *eigenthümlicher Weise* von den in den Parallelversuchen aus Samen und Keimlingen gewonnenen Lösungen je eine sich stärker gelblich gefärbt zeigte als die andere. Die letzteren Lösungen bezeichnet Burchard weiterhin als farblos.

In derselben Weise, wie in den Extracten aus Gräsern und Graskeimlingen, führte ich schliesslich auch noch colorimetrische Bestimmungen in den Extracten aus Weizensamen und Weizenkeimlingen aus. Die Aetherextracte aus je 30 gr. fein zerriebenen lufttrocknen Samen und Keimlingen wurden verseift, die beim Ausschütteln des Cholesterins aus den Seifenlösungen erhaltenen ätherischen Flüssigkeiten auf je 300 cbcm. gebracht. Ich entfärbte je 150 cbcm. mittelst Thierkohle (wobei der aus den Samen gewonnene, nur schwach gefärbte Extract weit weniger Thierkohle erforderte, als der aus den Keimlingen erhaltene, so dass der durch Anwendung der Kohle bedingte Fehler in ersterem Falle weit geringer sein musste, als in letzterem), dunstete dieselben sodann ein, löste die trocknen Rückstände in Chloroform und füllte die so erhaltenen Lösungen auf je 20 cbcm. auf. 2 cbcm. der in dieser Weise aus den Samen erhaltenen Lösung gaben nach dem Burchard'schen Verfahren schwächere Grünfärbung, als eine Mischung von 1 cbcm. der aus den Keimlingen erhaltenen Lösung mit 1 cbcm. reinem Chloroform. Daraus ist zu schliessen, dass die letztere Lösung mehr als doppelt so viel Cholesterin enthielt, als die erstere<sup>1)</sup>.

Ein Versuch mit einer zweiten, gleichfalls circa 16 Tage alten Vegetation von etiolirten Weizenkeimlingen gab das gleiche Resultat.

Das Mengenverhältniss zwischen Samen und Keimlingen habe ich in diesem Falle nicht bestimmt; aus den an anderen Objecten in dieser Hinsicht erhaltenen Resultaten lässt sich aber schliessen, dass der Substanzverlust keimender Weizensamen bei 16tägiger Dauer der Keimung nicht gross genug sein kann, um eine Steigerung des procentigen Cholesteringehalts der Keimlinge gegenüber demjenigen der ungekeimten

<sup>1)</sup> Mittelst der Hesse'schen Reaction liess sich in diesem Falle eine colorimetrische Bestimmung nicht ausführen, da die chloroformischen Lösungen beim Durchschütteln mit Schwefelsäure sofort eine bräunliche Färbung annahmen.

Samen auf mehr als das Doppelte zu verursachen. Zur Erklärung dieser Steigerung muss man demnach auch hier die Annahme zu Hilfe nehmen, dass die in den Samen enthaltene absolute Cholesterinquantität während des Keimungsvorganges sich vermehrt hat.

Die an den keimenden Samen von *Lolium perenne* und *Triticum vulgare* von mir gewonnenen Resultate stimmen also vollständig mit denjenigen überein, welche ich sowohl neuerdings wie früher in Verbindung mit J. Barbieri an den keimenden Samen von *Lupinus luteus* erhalten habe.

---