

Ueber die Bestimmung des Lecithingehaltes der Pflanzenbestandtheile.

Von

Dr. Béla v. Bittó.

(Der ungar. Akademie der Wissenschaften vorgelegt in der Sitzung am 23. April.)
(Der Redaction zugegangen am 27. April 1894.)

Die ersten Versuche der Bestimmung des Lecithingehaltes der Pflanzensamen wurden mit Hilfe der Aetherextraction in der Weise ausgeführt, dass aus dem Phosphorsäuregehalt des Aetherextractes die Lecithinmenge berechnet wurde. Später erfuhr diese Methode von *Jacobsen*¹⁾ eine Modification, indem er die Samen mit Alkohol extrahirte, den alkoholischen Extract aber mit Aether auszog, und in diesem die Phosphorsäure, respective das Lecithin bestimmte. Die Phosphorsäurebestimmung selbst wurde in folgender Weise ausgeführt: nach Zusammenschmelzen des Extractes mit einem Gemisch von Soda und Salpeter und Lösen der Schmelze in Wasser, sowie nach dem Ansäuern und Kochen mit Salpetersäure wurde die Phosphorsäure mit molybdänsaurem Ammon gefällt. Der erhaltene Niederschlag aber wurde, wie gewöhnlich, in Ammoniak gelöst, und die Lösung mit Magnesiamixtur versetzt. Die abgewogene Menge des pyrophosphorsauren Magnesia, mul-

¹⁾ Ueber Pflanzenfette. Inaug.-Dissert. Königsberg, s. Zeitschrift f. physiol. Chemie, Bd. XIII, S. 38.

tiplicirt mit dem Factor 7,2703, gibt die anwesende Lecithinmenge.

Die resultirenden Werthe zeigten aber von solchen, durch andere Forscher gefundenen, bedeutende Abweichungen; was Jacobson anfangs zu der Annahme bewog, seine Zahlen seien nur deshalb so hoch, weil mit dem Lecithin auch andere, zum Theil vielleicht nucleinartige Verbindungen extrahirt und als Lecithin mit in Rechnung gestellt werden. Später machte Schulze und Steiger darauf aufmerksam¹⁾ dass im Extract und in den Pflanzen bis nun andere phosphorhaltige Bestandtheile nicht nachgewiesen werden konnten, abgesehen natürlich von den phosphorsauren Salzen, welche bekanntlich weder in Alkohol noch in Aether löslich sind. Ferner wissen wir aus ihren Untersuchungen, dass bei der Aetherextraction ein Theil des Lecithins ungelöst bleibt, und nur dann leichter in Lösung geht, wenn es schon früher mittelst Alkohol aus den Samen extrahirt wurde. Bei dem Umstande, dass weder im alkoholischen, noch im ätherischen Extracte der Pflanzen, eine andere phosphorhaltige organische Verbindung als Lecithin in nennenswerther Menge bisher nicht nachgewiesen werden kann, weiter, dass die phosphorsauren Salze weder mit Alkohol, noch mit Aether in Lösung gehen, erschien es zweifellos, dass die von Jacobson empfohlene Methode zur Bestimmung des Lecithingehaltes der Pflanzensamen noch vereinfacht werden kann, u. z. derart, dass man die Substanz nach der Erschöpfung mit Aether noch zweimal je eine Stunde lang mit Alkohol auskocht, und die sodann vereinigten Extracte zur Bestimmung des Phosphors (richtiger der Phosphorsäure) verwendet²⁾. Nach Schulze und Steiger's³⁾ Untersuchungen hat sich auch diese Methode bewährt, da sie derart zu den-

¹⁾ E. Schulze und E. Steiger: Ueber den Lecithingehalt d. Pflanzensamen, Zeitschr. f. phys. Chemie, Bd. XIII, S. 365.

²⁾ Näheres hierüber ist in Schulze und Steiger's oben citirter Abhandlung, sowie in einer neuestens von Schulze und Frankfurt in den «landw. Versuchstationen» erschienenen Arbeit: «Ueber den Lecithingehalt einiger vegetabilischer Substanzen», Bd. XLIII, S. 307, zu finden.

³⁾ Siehe die öfters citirte Abhandlung von Schulze u. Steiger.

selben Zahlen gelangen, als wie bei der Aetherextraction, sowie der abermaligen Behandlung des erhaltenen alkoholischen Auszuges mit Aether¹⁾).

Bei den jüngst durch mich, nach Schulze und Steiger ausgeführten Lecithinbestimmungen bekam ich öfters derart niedrige Werthe, dass ich trotz der von genannten Forschern erwähnten Argumente die Brauchbarkeit der Methode in Zweifel zu ziehen genöthigt war, worin mich noch jene Erfahrung bestärkte, welche ich bei physiologischen Untersuchungen zu machen Gelegenheit hatte, und die darin gipfelt, dass das Lecithin auch mit Alkohol erst durch wiederholtes, längere Zeit andauerndes Kochen extrahirt werden kann; während Schulze und Steiger zweimaliges, je eine Stunde andauerndes Auskochen dafür schon als genügend erachten, um den in Aether nicht aufgenommenen Theil des Lecithins völlig in Lösung zu bringen.

Um die Richtigkeit meiner Auffassung, sowie die Berechtigung meiner Zweifel beweisen zu können, bestimmte ich in einigen Pflanzensamen den Lecithingehalt nach Schulze und Steiger und versuchte dann, wie viel Lecithin erhalten wird, wenn dieselbe Substanz nach der Aetherextraction noch 10, 24 und 30 Mal mit Alkohol extrahirt wird. Schon beim ersten Versuche, welcher mit Samen von *Capsicum annuum* angestellt wurde, zeigte sich, dass die öfters erwähnte Methode nur annähernd übereinstimmende Werthe giebt; ähnliches fand ich auch bei anderen Samen. So erhielt ich z. B. aus dem Samen von *Capsicum annuum* auf Trockensubstanz berechnet bei genauer Befolgung der Angaben von Schulze und Steiger 0,435 % Lecithin; während durch Aetherextraction und hierauf folgendes 10maliges Auskochen mit Alkohol sich diese Zahl auf 0,926 % nach 24maligem Aus-

¹⁾ Diese Methode wandten sie eben nur so lange an, als bis sie sich davon überzeugten, dass auf diese Weise andere phosphorhaltige Verbindungen nicht extrahirt werden, was auch noch dadurch bekräftigt wurde, dass bei der Anwendung beider Methoden gleiche Werthe resultirten.

kochen (selbstverständlich unter genau denselben Bedingungen) auf 1,391 % und nach dreissigmaligen auf 1,545 % steigerte.

Bemerken will ich, dass nach dreissigmaligen Auskochen keine Phosphorsäurereaction mehr erhalten werden konnte.¹⁾ Um die in den Samen von *Capsicum annuum* enthaltenen circa 1½ % betragende Menge Lecithins völlig extrahiren zu können, war es also nöthig, die Auskochung mittelst Alkohol dreissigmal zu wiederholen. Auch dürfte es interessant sein zu erwähnen, dass der Lecithingehalt der trockenen *Capsicum*-samen, bloss aus dem ätherischen Auszuge bestimmt 0,043 % beträgt; wir finden demnach auch hier eine Bestätigung der Erfahrung Jacobson's, wodurch mit Aether nur ein Theil des Lecithins extrahirt werden kann, während sich die übrige Menge erst bei der weiteren Behandlung abspaltet.

Bevor ich jedoch meine früher erwähnten Erfahrungen, die ich bei der Bestimmung des Lecithingehaltes einiger Pflanzensamen gemacht, benutzt hätte, stellte ich auch noch in der Richtung einige Versuche an, den als Extractionsmittel angewendeten Aethylalkohol durch ein besseres Lösungsmittel zu ersetzen. Nach einigen Versuchen, die von negativem Resultate begleitet waren, wandte ich mich dem Methylalkohol zu und fand, dass dieses als das beste Lösungsmittel des Lecithins zu betrachten ist, indem Methylalkohol unter gleichen Temperaturverhältnissen, in gleichen Zeiträumen beinahe die doppelte Menge Lecithin zu lösen im Stande ist, als Aethylalkohol. Ich bemerke noch, dass ich den zur Extraction dienenden Methylalkohol durch fractionirte Destillation des Rohproductes darstellte und die zwischen 60—70° übergehende Fraction benutzte. Es erschien als wünschenswerth, vergleichsweise den Lecithingehalt der Pflanzensamen mit Anwendung beider Lösungsmittel zu bestimmen, u. z. so, dass aus ein und demselben Samenmuster stammende Proben, die natürlich immer sehr fein gemahlen sein müssen, mit Aether und hierauf 10, 24 und 30 Mal mit Aethylalkohol

¹⁾ Nach meinen Erfahrungen genügt es, wenn das einmalige Auskochen mit Alkohol 8—10 Minuten lang und keinesfalls länger als eine Viertelstunde dauert.

und ebenso vorbereitete Proben 10- und 20mal mit Methylalkohol ausgekocht wurden. Das dreissigmalige Auskochen mit Aethylalkohol, sowie das zwanzigmalige mit Methylalkohol nahm ich als Grenzwerthe an, da überdieses hieraus keine wägbaren Phosphorsäuremengen erhalten werden konnten.

Es sei hier ausdrücklich betont, dass es nöthig war, für jede Bestimmung, beziehungsweise Extraction, eine besondere Probe zu nehmen, da, wie ich öfters wahrnahm, die erhaltenen Resultate in dem Falle immer kleiner ausfielen, als bei directer Bestimmung, wenn die z. B. bereits vierundzwanzigmal mit Aether und Alkohol extrahirten Samen noch sechsmal mit Alkohol extrahirt wurden, und letztere Zahl zur früheren bei der Extraction mit Aether und vierundzwanzigmaligen Auskochen mit Alkohol erhaltenen addirt wurde. Die so erhaltenen Phosphor-, beziehungsweise Lecithinmengen habe ich auf 100 Gew.-Theile Trockensubstanz berechnet in folgenden Tabellen zusammengestellt¹⁾; zur Orientirung sind noch die diesbezüglichen, von Schulze und Steiger erhaltenen Werthe beigefügt:

Phosphorgehalt in 100 Gew.-Theilen Trockensubstanz.

Samen von	Nach der Extraction mit Aether mit Aethylalkohol ausgekocht:			Nach der Extraction mit Aether mit Methylalkohol ausgekocht:		Phosphorgehalt nach Schulze und Steiger.
	10 mal.	24 mal.	30 mal.	10 mal.	20 mal.	
Capsicum annuum (Paprika) .	0,0356	0,0529	0,0588	0,0653	0,0712	—
Vicia sativa (Wicke)	0,0497	0,0559	0,0622	0,0590	0,0684	0,0468
Lupinus luteus (gelbe Lupine)	0,0619	0,0680	0,0742	0,0742	0,0804	0,0603
Soja hispida (Sojabohne) . . .	0,0600	0,0660	0,0750	0,0720	0,0780	0,0629
Weizen	—	—	—	—	0,0190	0,0249
Roggen	—	—	—	—	0,0256	0,0218
Gerste	—	—	—	—	0,0259	0,0284
Gelber Mais	—	—	—	—	0,0185	0,0095

¹⁾ Da es sich bei den im pflanzlichen Organismus vorkommenden phosphorhaltigen organischen Verbindungen zur Zeit nur um das Lecithin handelt, so wäre es richtiger, statt Phosphor: Phosphorsäure (Glycerinphosphorsäure als Bestandtheil des Lecithins) anzugeben; nachdem dies aber bisher nicht geschehen ist, so nehme ich vorläufig Abstand hiervon, um das Vergleichen der Resultate nicht zu erschweren.

Lecithingehalt in 100 Gew.-Theilen Trockensubstanz.

Samen von	Nach der Extraction mit Aether mit Aethylalkohol ausgekocht:			Nach der Extraction mit Aether mit Methylalkohol ausgekocht:		Lecithingehalt nach Schulze und Steiger.
	10 mal.	24 mal.	30 mal.	10 mal.	20 mal.	
Capsicum annuum (Paprika) .	0,926	1,391	1,545	1,699	1,854	—
Vicia sativa (Wicke)	1,131	1,455	1,618	1,536	1,779	1,22
Lupinus luteus (gelbe Lupine)	1,610	1,771	1,939	1,939	2,093	1,57
Soja hispida (Sojabohne) . . .	1,564	1,720	1,955	1,876	2,033	1,64
Weizen	—	—	—	—	0,495	0,65
Roggen	—	—	—	—	0,677	0,57
Gerste	—	—	—	—	0,676	0,74
Gelber Mais	—	—	—	—	0,483	0,25

Wie ersichtlich, konnte bei den viel in Aether lösliches enthaltenden Samen im Allgemeinen mehr Lecithin erhalten werden, als Schulze und Steiger erhielten, während bei den extractarmen Cerealien die von mir erhaltenen Werthe von denen der genannten Forscher nur innerhalb der Fehlergrenzen liegende Abweichungen zeigen. Eine Ausnahme hiervon dürfte der gelbe Mais machen, bei dem ich beiläufig die doppelte Menge Lecithin erhielt. Die kleinen Abweichungen in den Grössen, die durch Extraction mit Aethylalkohol resp. Methylalkohol erhalten wurden, erlauben uns, eine jede dieser Modificationen nach Belieben zu verwenden. Die durch die verschiedenen Lösungsmittel erhaltenen, von einander nur innerhalb der zulässigen Fehlerquellen variirenden Werthe lassen es auch als unzweideutig erscheinen, dass die von mir erhaltenen Zahlen den absoluten Grenzwerten viel näher stehen, als diejenigen Schulze und Steiger's.

Die Bestimmung des Lecithins auf der angegebenen Weise ausgeführt, ist eine sehr langwierige Operation, nicht nur, weil das Auskochen selbst viel Zeit in Anspruch nimmt, sondern auch deshalb, weil in dem Falle als eine präzise Bestimmung ausgeführt werden soll, wenigstens 15—20 gr. Substanz zu einer Analyse genommen werden müssen, wodurch besonders bei ölreichem Samen sehr viel Oel mit Soda und Salpeter verbrannt werden muss, was nicht nur eine

sehr unangenehme Operation ist, sondern auch auf Rechnung der Genauigkeit der Bestimmung geht, da solche Mengen Oeles kaum ganz ohne Phosphorverlust verbrannt werden können. Es schien deshalb wünschenswerth, die früher angegebene Bestimmungsweise zu vereinfachen und danach zu trachten, dass in dem Falle, als schon das so häufige Auskochen nicht unterbleiben kann, wenigstens diejenigen in Aether löslichen Bestandtheile eliminirt werden, welche bei der Lecithinbestimmung nicht in Betracht kommen. Um das zu erreichen, schien es am zweckmässigsten, die Extraction mit Aether zu umgehen, und zum Auskochen Methylalkohol zu benutzen, welcher die Glyceride nur ziemlich schwer löst, wodurch diese zum Theil wenigstens eliminirt werden, während das Lecithin leichter in Lösung gebracht wird. Bei diesen Bestimmungen, wo die einzelnen Samenmuster also bloss 20 Mal mit Methylalkohol ausgekocht wurden, erhielt ich folgende Phosphor- respective Lecithinmengen:

S a m e n:	Phosphor.	Lecithin.
Capsicum annuum (Paprika)	0,0687	1,788
Vicia sativa (Wicke)	0,0621	1,618
Lupinus luteus (gelbe Lupine)	0,0746	1,933
Soja hispida (Sojabohne)	0,0750	1,955
Weizen	0,0222	0,578
Roggen	0,0256	0,667
Gerste	0,0227	0,592
Gelber Mais	0,0185	0,482
	in 100 Gew.-Theilen Trockensubstanz.	

Wie ersichtlich, sind die derart erhaltenen Zahlen von jenen, die durch Extraction mit Aether und Methylalkohol erhalten wurden, kaum verschieden, und sind die Differenzen nicht grösser, als sie sich eben bei derartigen complicirten, mit Fehlerquellen so belasteten Methoden einzuschleichen pflegen.

Um schliesslich zweifellos festzustellen, dass die bei der Extraction erhaltene, phosphorhaltige Substanz thatsächlich Lecithin sei, verfuhr ich in folgender Weise: die mit Aether und hierauf zehnmal mit Aethyl- oder Methylalkohol extrahirten Samen wurden noch zwanzigmal mit Alkohol ausgekocht, worauf letztere alkoholische Lösungen vereinigt verdunstet, und am Wasserbade eingetrocknet wurden. Der Trockenrückstand wurde mit Aether extrahirt, die erhaltene ätherische Lösung dann öfters mit Wasser ausgewaschen und letztere verdunstet. Der Rückstand bildet eine körnige Masse, welche angefeuchtet zerfliesst, und unter dem Mikroskop die charakteristischen Myelintropfen zeigt. Wird ferner der Rückstand der ätherischen Lösung verseift, und die Seife zerlegt, so lässt sich in der wässerigen Lösung Phosphorsäure nachweisen, welche, eben weil sie aus einer ätherischen Lösung stammt, nur von der Glycerinphosphorsäure, einem Bestandtheile des Lecithins, herrühren kann. Andererseits aber tritt beim Verseifen gewöhnlich ein starker Geruch nach Trimethylamin auf, welches nur von der Zersetzung des Cholins herrühren kann.

Da auf diese Weise die Fettsäuren, Trimethylamin und Phosphorsäure, nachgewiesen wurden, welch' letztere nur von der Glycerinphosphorsäure herrühren kann, eben weil sie durch Verseifung einer in Aether löslichen Substanz stammt, so unterliegt es keinem Zweifel, dass man es hier mit Lecithin zu thun hat, welches, wie bekannt, nach Diakonow¹⁾ in die oben erwähnten Bestandtheile zerfällt. Der in Aether nicht lösliche Theil aber des alkoholischen Auszuges enthält Phosphor in wägbarer Menge nicht.

Wiewohl ich schon Eingangs erwähnte, dass die Samen des *Capsicum annum* sehr verschiedene Werthe für Lecithin geben, je nachdem man nach Schulze und Steiger verfährt, oder aber die von mir angewendeten Modifikationen anwendet, so hielt ich es doch noch als wünschenswerth, noch in einem der Samen, die zu meinen Bestimmungen benutzt wurden und deren Lecithingehalt in den beigeschlossenen Tabellen enthalten

¹⁾ Tüb. med. chem. Unters., Heft 2, 1867 und 3, 1868.

ist, die Lecithinmenge auch einfach nach dem Verfahren der genannten Forscher zu bestimmen. Es sei mir gestattet, hier zu erwähnen, dass ich bei den Lupinensamen, deren Lecithin-gehalt von Schulze und Steiger zweimal übereinstimmend gefunden wurde, auf Trockensubstanz berechnet

0,0648 % Phosphor entsprechend
1,692 % Lecithin, also um 0,13 % mehr

als Schulze und Steiger erhielt; während dasselbe Samenmuster nach dem von mir beobachteten Verfahren folgende Zahlen gab:

mit Aether und dreissigmal	mit Methylalkohol extrahirt:	1,939 %
» » » zwanzigmal » » »		2,093 »
blos zwanzigmal	mit Methylalkohol extrahirt	1,933 »

Aus diesen Zahlen gefolgert, kann eine jede der erwähnten Modifikationen zur Lecithinbestimmung benutzt werden, wobei aber zu bemerken ist, dass es in dem Falle, als bei ölreichen Samen die Extraction mit Aether dem Auskochen der Samen mit Aethyl- oder Methylalkohol vorangeht, es zweckmässig ist, den Aetherextract für sich mit Soda und Salpeter zu verbrennen, indem hiedurch, wie früher erwähnt, die Verbrennung der Alkoholextracte erleichtert wird. Da die aus dem Aetherextract stammende Schmelze gewöhnlich nur sehr wenig Phosphorsäure enthält, so empfiehlt es sich, die Schmelze nach dem Lösen mit der aus dem alkoholischen Auszug stammende zu vereinigen.

Der Umstand, dass die Cerealien nur wenig Lecithin neben geringen Mengen ätherlöslichen Bestandtheilen enthalten, liess es als wünschenswerth erscheinen, zu versuchen, ob es nicht möglich wäre, wenigstens bei diesen mit einem dreimaligen Auskochen mittelst Aethyl- oder Methylalkohol die darin enthaltene gesammte Menge Lecithin zu erhalten und so die Methode wenigstens für Cerealien zu vereinfachen. Diese Versuche hatten aber ein negatives Resultat im Gefolge, indem in allen Fällen kleinere Zahlen erhalten wurden, wie bei den früher erwähnten Bestimmungsmethoden.

Es wurden nämlich erhalten:

	3mal mit Methylalkohol.		3mal mit Aethylalkohol.	
	Phosphor.	Lecithin.	Phosphor.	Lecithin.
Weizen	0,0174	0,455	0,0142	0,371
Roggen	0,0175	0,458	0,0143	0,374
Gelber Mais . . .	0,0124	0,322	—	—

in 100 Gew.-Theilen auf Trockensubstanz berechnet.

Aus all' diesen Versuchen ist ersichtlich, dass man von dem zwanzigmaligen Auskochen mit Methylalkohol kaum abgehen kann, wenn für die in den Samen enthaltenen Lecithinmengen richtige Werthe erhalten werden sollen. Damit will ich aber nicht gesagt haben, dass es nicht möglich sei, aus einer oder der anderen Samenart die gesammte Lecithinmenge etwa durch sechzehn- oder achtzehnmaliges Auskochen zu entfernen, sondern nur, dass das zwanzigmalige Auskochen eine, unter den bisherigen Verhältnissen nöthige Operation ist, um sicher der Wirklichkeit entsprechende Zahlen zu bekommen.

Auf Grund dieser Versuche entfällt auch das, was Schulze und Frankfurt¹⁾ bezüglich der Schulze und Steiger'schen Methode erwähnen, dass sie nämlich nach dem zweimaligen Auskochen mit Alkohol entweder gar keinen oder nur Spuren von Phosphor nachweisen konnten, da es sonst unmöglich wäre, dass man nach der von mir empfohlenen Modifikation mehr Lecithin bekommt, als genannte Forscher bei Anwendung ihrer Methode erhielten.

Das Endresultat meiner bisherigen Versuche lässt sich kurz in dem Folgenden zusammenfassen:

1. Wenn irgend eine Substanz pflanzlichen Ursprungs mit Aether und hierauf zweimal je eine Stunde lang mit Alkohol extrahirt wird, so geht nur ein Theil des Lecithins in Lösung.
2. Behufs quantitativer Bestimmung des Lecithins muss die Substanz nach der Extraction mit Aether wenig-

¹⁾ Landw. Versuchsstat. XLIII, S. 313.

stens dreissigmal mit Aethyl- oder zwanzigmal mit Methylalkohol ausgekocht werden, u. z. derart, dass eine Auskochung 8—10 Minuten dauert, keinesfalls aber länger als eine Viertelstunde.

3. Vereinfacht kann die Methode derart werden, dass die Substanz blos zwanzigmal u. z. mit Methylalkohol ausgekocht wird.

Budapest, Chemische Reichsanstalt 1894, 22. April.