

Versuche mit dem Staněkschen Verfahren zur quantitativen Bestimmung des Cholins.

Von
A. Kiesel.

(Aus dem agrikultur-chemischen Laboratorium des Polytechnikums in Zürich.)
(Der Redaktion zugegangen am 9. Aug. 1907.)

Die Mannigfaltigkeit der in lebenden Wesen enthaltenen chemischen Verbindungen ist bekanntlich eine sehr große. Jedes Verfahren, das uns ein Mittel an die Hand gibt, das in jedem Organismus enthaltene Stoffgemenge zu zerlegen, ist sehr schätzbar, besonders wenn uns dieses Verfahren gestattet, die Trennung und Ausscheidung der betreffenden Substanzen quantitativ durchzuführen.

Ein Vorzug, den eine neue Methode vor einer älteren haben kann, besteht darin, daß sie uns ermöglicht mit einfacheren Mitteln und mit größerer Schnelligkeit zu arbeiten, sei es durch nicht erforderliches Entfernen einiger anderen Verbindungen, d. h. durch eine ganz spezielle Eigenschaft der Mittel nur auf den einen Körper, oder wenigstens nur auf eine eng begrenzte Gruppe von Körpern fällend oder lösend zu wirken, oder durch die geringere Zahl oder größere Bequemlichkeit einander folgender Prozesse, die dann zum Schluß zur Gewinnung der reinen Substanz führen. Es ist auch ein großer Vorzug, wenn uns die neue Methode erlaubt mit derselben, oder vielleicht noch mit größerer Sicherheit und Genauigkeit bei geringerer Substanzmenge einen in derselben enthaltenen Körper qualitativ oder sogar quantitativ zu bestimmen.

Zu den in den Organismen in großer Verbreitung vorkommenden Körpern gehört bekanntlich das Cholin. Sein Nachweis und seine quantitative Bestimmung sind von Wichtigkeit wegen der nahen Beziehung, in der das Cholin zu Lecithin steht, einem Körper, dessen hohe physiologische Bedeutung

außer Zweifel ist. Deshalb war es von großem Interesse, daß eine neue Methode der quantitativen Bestimmung des Cholins in den letzten Jahren von W. Staněk vorgeschlagen wurde.¹⁾ Da aber diese Methode noch nicht völlig ausgearbeitet ist,²⁾ so war es geboten, die Methode auf ihre Anwendbarkeit auf Pflanzenextrakte zu untersuchen. Im folgenden gebe ich einen Beitrag zur Lösung dieser Frage. Hierbei muß bemerkt werden, daß ich in meinen Versuchen den Angaben von Staněk so weit als möglich zu folgen bestrebt war.

Die in der letzten Zeit angewendete Methode zum Abscheiden des Cholins³⁾ besteht in einer kombinierten Fällung durch Phosphorwolframsäure und Quecksilberchlorid. Außerdem wurde noch die einfache Fällung durch Quecksilberchlorid benutzt,⁴⁾ wie es zuerst von L. Brieger angegeben wurde,⁵⁾ der dieses Salz, welches mit dem Cholinchlorid ein «sogar in heißem Wasser äußerst schwer lösliches» Doppelsalz gibt, zur «völligen Abscheidung des Cholins von übrigen Basen» anzuwenden empfiehlt. Über die Fällbarkeit des Cholins durch Jodverbindungen (Kaliumquecksilberjodid und Kaliumwismutjodid von Jahns,⁶⁾ Jod mit Jodwasserstoff von P. Griesse und Harow⁷⁾ angewandt), finden sich nur vereinzelte Angaben vor.

Der aus dem Untersuchungsmaterial mit Wasser gemachte Auszug wird von Eiweiß usw. durch Bleiessig befreit, das Blei nach Einengen im Filtrate durch Schwefelsäure entfernt, die Konzentration der Schwefelsäure in der eingeengten Lösung bis auf 2—3% gebracht. Dann werden die Basen durch Phosphorwolframsäure gefällt, das Filtrat von dem Niederschlage

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLVI, S. 280; Bd. XLVII, S. 83, und Bd. XLVIII, S. 334.

²⁾ Wie es aus Staněks eigenen Angaben hervorgeht (Diese Zeitschrift, Bd. XLVIII, S. 339), indem er auf die Notwendigkeit der Identifikation hinweist.

³⁾ E. Schulze, Landw. Versuchsst., 1904, S. 344; 1895, Bd. XLVI, S. 27.

⁴⁾ E. Schulze, Landw. Versuchsst., 1895, Bd. XLVI, Methode I, S. 28.

⁵⁾ L. Brieger, Weitere Unters. üb. Ptomaine, 1885, S. 55.

⁶⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XVIII, S. 2519.

⁷⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., XVIII, S. 707.

noch eventuell eingedampft und noch Phosphorwolframsäure zugesetzt. Die vereinigten Fällungen werden nach Auswaschen mit 5%iger Schwefelsäure mit Baryumhydroxyd zerlegt, das Ba durch Kohlensäure entfernt und nach Neutralisation mit Salpetersäure bis auf ein geringes (100—200 ccm) Volumen eingedampft. Aus der Flüssigkeit werden die Nucleinbasen durch Silbernitrat, das Histidin und Arginin durch Silbernitrat und Baryumhydroxyd ausgefällt, dann das Silber durch Salzsäure entfernt und die Flüssigkeit mit Schwefelsäure neutralisiert. Diese Flüssigkeit wird sodann auf ein geringes Volumen (ca. 100 ccm) eingedampft und nach starkem Ansäuern mit Schwefelsäure durch Phosphorwolframsäure gefällt. Der Niederschlag wird wieder in der angegebenen Weise behandelt und die erhaltene Flüssigkeit mit Salzsäure angesäuert. Dann wird zur Trockene eingedampft. Aus den im Vakuumexsikkator vollständig ausgetrockneten salzsauren Verbindungen, die neben organischen Chloriden auch anorganische enthalten können, wird das Cholinchlorid durch kalten absoluten Alkohol ausgezogen; der Alkohol wird verdampft und das Cholin aus wässriger Lösung durch Fällen mit Quecksilberchlorid als Quecksilberchloriddoppelverbindung gewonnen, aus dem man das Cholinchlorid durch Zerlegen mit Schwefelwasserstoff wiedererhält. Die Mutterlauge wird gewöhnlich noch eingedampft und die krystallinischen Ausscheidungen zu dem Früheren zugenommen, um das Cholin bis zu einem nicht mehr in Betracht kommenden Rest zu gewinnen. Schließlich kann man das Cholin als salzsaures Salz wägen oder den N-Gehalt bestimmen, aus dem man das Cholin berechnen kann.

Eine Vereinfachung dieser etwas komplizierten Methode besteht unter Umständen darin, daß man die zweite Fällung durch Phosphorwolframsäure ausläßt und nach der Ausscheidung des Histidins und Arginins, das Cholin in Form des Quecksilberdoppelsalzes fällt.

Diese von E. Schulze angewendete Methode gibt, wie man aus seinen mehrfach gemachten Identitätsbestimmungen ersieht, sehr schöne Resultate und man erhält dabei reines Cholinchlorid. Die später angegebenen von mir ausgeführten

Versuche (I und II) zeigen uns, daß sowohl die Fällung durch Phosphorwolframsäure als auch die Fällung durch Quecksilberchlorid, genügend quantitativ sind. Freilich wurde dabei reines Cholinchlorid verwendet. Es könnte möglich sein, daß in einem Gemenge die Fällungen weniger quantitativ sind. Diese, das Fällen verhindernde Wirkung anderer Substanzen, tritt aber auch bei vielen anderen Methoden bekanntlich ein.

Versuch I.

Es wurden 0,1920 g des Platinchloriddoppelsalzes des Cholins in Wasser gelöst; nach dem Zerlegen mit Schwefelwasserstoff und Entfernen des letzteren durch Erwärmen auf dem Wasserbade wurde die Flüssigkeit auf 50 ccm gebracht, mit 0,7 ccm Schwefelsäure versetzt und nach Ausfällen mit Phosphorwolframsäure 48 Stunden stehen gelassen. Im Filtrat wurden 0,0005 g Stickstoff gefunden (NH_3 -Menge entsprach 0,18 ccm einer Natronlauge, von der 1 ccm 0,002809 g Stickstoff entsprach).¹⁾

Versuch II.

0,1672 g Cholinplatinchlorid wurden in Wasser gelöst und durch Schwefelwasserstoff zerlegt. Nach Entfernen des SH_2 durch Erwärmen auf dem Wasserbade wurde zu der noch warmen Flüssigkeit ein starker Überschuß heißer wässriger Quecksilberchloridlösung zugesetzt. Nach Erkalten und mehrstündigem Stehen wurde die Mutterlauge von den entstandenen Krystallen getrennt und die Krystalle mit kaltem Wasser ausgewaschen. Die vereinigten Filtrate wurden ein wenig eingedampft, wobei noch ein krystallinischer Niederschlag entstand, der zum allergrößten Teile aus Quecksilberchlorid bestehen mußte. Zuletzt wurde die Flüssigkeit auf Stickstoff nach Kjeldahl untersucht. Sie war nachweislich vollständig stickstofffrei. (Die 10 ccm vorgelegter Salzsäure verlangten 25,40 ccm a-Natronlauge, anstatt 25,32 ccm.)

¹⁾ Bei den in der vorliegenden Arbeit ausgeführten N-Bestimmungen nach Kjeldahl wurden zwei Lösungen Natronlauge beim Titrieren der vorgelegten Salzsäure verwendet, die im weiteren durch a (1 ccm NaOH = 0,002809 g N) und b (1 ccm NaOH = 0,00273 g N) bezeichnet sind.

Das von Staněk als Fällungsmittel für Cholin vorgeschlagene Kaliumtrijodid wurde von ihm zuerst zur Fällung und Bestimmung des Betains in Zuckerfabrikationsprodukten angewendet,¹⁾ wobei er diese Fällung nach Entfernen der Eiweißstoffe in schwefelsäurehaltiger Lösung vornahm und das Betain aus der in der Fällung vorgefundenen Stickstoffmenge berechnete. In diesen Arbeiten wurde von ihm schon auf die Möglichkeit einer quantitativen Bestimmung des Cholins mit Hilfe desselben Reagens hingewiesen und in der folgenden Arbeit²⁾ wurde von ihm die Zusammensetzung des Cholinperjodids, sowie seine Eigenschaften beschrieben. Zugleich wurde der Einfluß der Verdünnung, sowie verschiedener Beimengungen (Saccharose, NaCl, Na₂SO₄ und 3 organischer Säuren) auf das Resultat bestimmt, wobei der aus dem Stickstoff berechnete Cholingehalt³⁾ von der verwendeten Menge je nach der Verdünnung Differenzen von 1,9—26,4 mg (99,3—89,4% der verwendeten Menge wiedergefunden) aufwies. Die Differenzen standen in keinem proportionalen Verhältnis zur Verdünnung. Bei Anwesenheit anderer Verbindungen wurden Differenzen von 2,3—14,3 mg erhalten. Ungünstig erwies sich ein Säuregehalt der Flüssigkeit, so daß Staněk neben einer möglichst großen Konzentration der Lösung noch die fast neutrale Reaktion derselben beim Fällen empfiehlt.

Da aber in den Pflanzen, für die Staněk seine Methode empfiehlt, nebeneinander Cholin und Betain öfters gefunden werden, die zusammen durch das Reagens in saurer Lösung gefällt werden, versuchte Staněk⁴⁾ das Cholin in alkalischer Lösung zu fällen. Hierbei ist also die Bedingung für das Fällen des Betains — saure Lösung — nicht vorhanden. Eine Reihe von Versuchen⁵⁾ ergaben, daß das Cholin in alkalischer

¹⁾ Zeitschr. f. Zuckerind. Böhm., Bd. XXVIII, S. 578; Bd. XXIX, S. 410. Ref. Chem. Zentralbl., 1904, II, S. 950; 1905, I, S. 1741.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLVI, 1905, S. 280.

³⁾ 201,4 bis 251,8 mg Cholin bei jeder Bestimmung.

⁴⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLVII, 1906, S. 83.

⁵⁾ Bei diesen Versuchen wurden meistens 200—250 mg Cholin verwendet.

Lösung quantitativ fällbar ist (Differenz zwischen angewendeten und gefundenen Werten — 0,6 bis — 28,2 mg, wiedergefunden wurden 99,7—86,6 % der verwendeten Menge) und daß das Betain keinen Einfluß beim Fällern hat (Differenz + 0,6 bis — 8,2 mg, ohne Einfluß der Betainmenge). Auf Grund dieser Versuche schlug Staněk eine Methode der quantitativen Trennung und Bestimmung von Cholin und Betain¹⁾ vor. Die angewendeten Cholin- und Betainmengen betragen in seinen Versuchen im Durchschnitte je 300 mg, wobei die Differenzen bei den Bestimmungen — 0,1 bis — 6,6 mg für Cholin und — 3,8 bis — 13,5 für Betain betragen, ohne daß eine Proportionalität der Differenzen und der angewendeten Mengen der Basen sich ergab.

Da uns hier nur die Cholinbestimmung interessiert, habe ich Versuche mit Betain nicht vorgenommen. Dagegen führte ich einige Versuche mit Cholin aus.

Versuche III und IV.

Für die zwei ersten Versuche wurde ein vielleicht nicht ganz reines Präparat von Cholinchlorid verwendet, das aus Keimpflanzen durch Überführen in das Cholinquecksilberchlorid dargestellt war und vor der Bestimmung nochmals in kaltem absoluten Alkohol gelöst, dann eingedampft und in Wasser aufgenommen wurde. Die Cholinchloridmengen betragen 0,1584 und 0,1847 g. Sie wurden in je 30 ccm Wasser gelöst; dann wurde nach Zugabe von 1,5 g NaHCO_3 tropfenweise das Reagens zugesetzt (nach Staněk durch Lösen von 153 g J und 100 g JK in 200 ccm Wasser zubereitet). Jeder in die Flüssigkeit fallende Tropfen gab zuerst einen braunen wolkigen Niederschlag, der dann nach kurzer Zeit in Form von kleinen, glänzenden schwarzgrünen Krystallen sich am Boden des Becherglases absetzte. Nach vollständiger Fällung wurde 6 Stunden stehen gelassen, dann in einen Goochtiiegel mit Papiereinlage filtriert und mit wenig Wasser ausgewaschen. In der klar abfließenden Flüssigkeit bildete sich beim Auswaschen ein geringer Niederschlag, der getrennt gesammelt und später nach Kjeldahl auf Stickstoff untersucht wurde.

¹⁾ l. c. S. 85.

a) 0,1584 g Cholinchlorid. Berechneter Stickstoffgehalt 0,0159 g; gefunden 0,0135 g N. (NH_3 -Menge entsprach 4,94 ccm b-Natronlauge.) Differenz — 0,0024 g N.

Der im Filtrat entstandene Niederschlag enthielt 0,0006 g N (NH_3 -Menge entsprach 0,21 ccm b-NaOH.)

b) 0,1847 g Cholinchlorid. Berechneter N-Gehalt 0,0185 g. Gefunden 0,0127 g N (NH_3 -Menge entsprach 4,64 ccm b-Natronlauge). Differenz — 0,0058 g N.

Der im Filtrat entstandene Niederschlag enthielt 0,0008 g N (NH_3 -Menge entsprach 0,3 ccm b-Natronlauge).

Daß in den beiden Bestimmungen die Stickstoffmenge sehr stark von der theoretischen abwich und die von Staněk angegebenen maximalen Differenzen in dem einen Falle sogar stark überstieg, mußte wohl teilweise einer nicht genügenden Reinheit des Cholinpräparats zugeschrieben werden, und so war es geboten, die Bestimmungen mit einer völlig reinen Substanz zu wiederholen.

Zu diesem Zweck wurde ein mir liebenswürdig von Herrn Prof. E. Schulze überlassenes, teilweise aus Kürbiskeimlingen, teilweise aus Kartoffeln dargestelltes Präparat des Cholinplatinchloriddoppelsalzes verwendet, welches völlig rein war und die charakteristischen, orangegelben, großen Tafeln bildete. Das Platinchloriddoppelsalz des Cholins hat den Vorzug vor salzsaurem Cholin beim Wägen, daß es kein Wasser anzieht.

Versuche V und VI.

Die abgewogene Menge des Cholinplatinchlorids wurde in Wasser gelöst und die Lösung heiß durch Schwefelwasserstoff zerlegt. Dann wurde nach Zugabe von NaHCO_3 das Staněksche Reagens tropfenweise zugesetzt, wobei zuerst ein amorpher, brauner Niederschlag entstand, der nach ganz kurzer Zeit in den charakteristischen, krystallinischen, schwarzgrünen überging.

a) 0,2476 g Cholinplatinchlorid = 0,1122 g Cholinchlorid. Berechneter N-Gehalt 0,0112 g. Im Niederschlage aufgefunden 0,0101 g. (Die NH_3 -Menge entsprach 3,59 ccm a-NaOH.) Differenz — 0,0010 g N = 0,010 g Cholinchlorid.

b) 0,2740 g Cholinplatinchlorid = 0,1242 g Cholinchlorid. Berechneter Stickstoffgehalt 0,0125 g, gefundener 0,0114 g. (NH_3 -

Menge entsprach 4,07 ccm a-Natronlauge.) Differenz — 0,0011 g N oder 0,011 g Cholinchlorid.

Versuch VII.

0,2141 g Cholinplatinchlorid = 0,0971 g Cholinchlorid wurden in Wasser gelöst, die Lösung durch SH_2 zerlegt, sodann 0,2117 g Leucin zugesetzt und nach angegebener Weise mit dem Staněkschen Reagens gefällt. Im Niederschlag wurde ein Gehalt von 0,0092 g N gefunden. (NH_3 -Menge entsprach 3,27 ccm a-Natronlauge), anstatt der im Cholinpräparat theoretisch enthaltenen 0,0097 g N. Die Differenz betrug somit — 0,0005 g N oder 0,005 g Cholinchlorid.

Wie aus diesen Zahlen zu ersehen ist, ergab die Methode in den drei beschriebenen Versuchen recht gute Resultate. Der dritte (Versuch VII) Versuch bietet insofern ein Interesse, als er uns zugleich zeigt, daß das Leucin das Resultat der Fällung nicht beeinflußt.

In derselben Arbeit¹⁾ gibt Staněk auch an, daß verschiedene stickstoffhaltige Substanzen mit dem gebrauchten Reagens Fällungen gaben, die aber auf ihren Stickstoffgehalt nicht geprüft wurden, dennoch, der angegebenen Farbe nach zu schließen, nicht einfache Jodausscheidungen waren, sondern die geprüften Substanzen einschließen mußten.

Um die wirkliche Fällbarkeit von anderen in Pflanzen enthaltenen Substanzen, als Cholin und Betain, durch das Reagens zu prüfen, unternahm ich eine Reihe von Versuchen, die im folgenden zusammengestellt sind.

Daß ich dabei meine Versuche ausschließlich mit Basen unternahm, ist verständlich, da das Cholin und Betain basische Eigenschaften besitzen. Zuerst wurden Versuche mit der Histidinfraktion ausgeführt.

Versuch VIII.

Es wurde ein Histidinpräparat verwendet, welches gut kristallisiertes Histidinchlorid darstellte. 0,0636 g desselben wurden in 10 ccm Wasser aufgelöst. Das nach der gewöhnlichen Art tropfenweise zugesetzte Reagens erzeugte in der Flüssigkeit einen braunen, wolkigen Niederschlag, der sich alsbald in Form

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLVII, 1906, S. 83.

von dunklen Krystallen am Boden und an den Wänden des Becherglases ansetzte. Bei dem weiteren Zusatz des Reagens erhielten die Krystalle einen grünlichen Schimmer, der sie den Krystallen der Cholin-fällung dem Ansehen nach vollkommen gleich machte. Nach 6stündigem Stehen wurde der Niederschlag abfiltriert und auf die darin enthaltene Stickstoffmenge untersucht. Es erwies sich, daß der Niederschlag vollkommen stickstofffrei war und demnach aus reinem Jod bestehen mußte (die NH_3 -Menge entsprach 0,02 ccm a-Natronlauge).

Versuch IX.

Desgleichen wurde für einen Versuch ein Filtrat verwendet, das bei der Untersuchung eines aus Kürbiskeimpflanzen gewonnenen Phosphorwolframsäureniederschlags auf Histidin erhalten war. Die aus diesem Niederschlage nach dem Kossel-Kutscherschen Verfahren gewonnene Histidinfraktion wurde mit Schwefelwasserstoff zerlegt und die dabei erhaltene Lösung mit Quecksilbersulfat versetzt. Das Filtrat von dem durch dieses Reagens erzeugten Niederschlage wurde, nach Entfernen des Quecksilbers durch Schwefelwasserstoff, mit dem Stanëkschen Reagens versetzt. Dabei entstand ein erst ölig, dann langsam in eine schwache krystallinische Form übergehender Niederschlag, der eine beträchtliche Menge Stickstoff einschloß. (Die NH_3 -Menge entsprach 2,66 ccm a-NaOH = 0,0075 g N.) Welche Substanzen in diese Fällung übergegangen waren, konnte nicht festgestellt werden. Man kann nur sagen, daß es Nebenbestandteile der Histidinfraktion waren.

Versuch X.

Der nächste Versuch wurde mit einem Präparat von Arginnitrat ausgeführt, wozu ich 0,1772 g desselben in 40 ccm Wasser auflöste und die Flüssigkeit nach Zugabe von 1,5 g NaHCO_3 mit dem Reagens tropfenweise versetzte. Dabei entstand wieder zuerst eine amorphe, wolkige, braune Fällung, die fast augenblicklich in einen grünen krystallinischen Niederschlag überging. Nach 12stündigem Stehen wurde der Niederschlag nach Kjeldahl untersucht. Es ergab sich, daß darin nur Spuren von Stickstoff enthalten waren (0,00025 g; die NH_3 -Menge entsprach

0,09 ccm a-Natronlauge). Das Filtrat wurde angesäuert und noch mit dem Reagens versetzt; es entstand ein starker, krystallinischer, glänzender Niederschlag, in dem aber kein N gefunden wurde (NH_3 -Menge entsprach 0,01 ccm a-NaOH).

In naher Beziehung zum Arginin steht das Guanidin, erstens weil es ein Spaltungsprodukt desselben ist, und zweitens weil es in der Argininfraktion der Basen vorhanden sein kann.

Versuch XI.

Zum Versuch wurde salzsaures Guanidin verwendet. Es wurden 0,1316 g desselben in 25—30 ccm Wasser aufgelöst, 1 g Natriumbicarbonat zugesetzt und mit dem Reagens, wie früher, behandelt. Dabei entstand ein brauner, amorpher Niederschlag, der sogleich in einen grob-krystallinischen überging. Nach 15-stündigem Stehen wurde der Niederschlag abfiltriert und der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt, wobei nur Spuren desselben gefunden wurden (0,0002 g NH_3 -Menge entsprach 0,07 ccm a-Natronlauge). Desgleichen wurde nach Ansäuern des Filtrats und nochmaligem Zusatz des Reagens ein Niederschlag erhalten, der ebenfalls nur aus Jod bestand (die NH_3 -Menge entsprach 0,02 ccm a-Natronlauge).

Jetzt war es angezeigt, einige Basen, deren salzsaure Salze gleich dem Cholinchlorid in absolutem Alkohol löslich sind, auf ihre Fällbarkeit durch das Reagens zu prüfen.

Versuch XII.

Zuerst wurde zum Versuch das Phenyläthylamin in Form seines salzsauren Salzes verwendet. 0,1413 g desselben wurden in 30 ccm Wasser aufgelöst, 1 g NaHCO_3 zugesetzt und tropfenweise das Reagens zugefügt. Es entstand eine schwarze, ölige Fällung, die auch nach längerem Stehen (24 Stunden) keine krystallinische Form annahm, sondern sich an den Wänden des Becherglases fest ansetzte. Beim Filtrieren durch einen Goochtiegel mit Papiereinlage verschmierte es vollständig den Tiegel und ging zum großen Teil durch die doppelte Papiereinlage in das Filtrat über, wodurch erneutes Aufgießen in den Tiegel erforderlich wurde. Da es aber doch möglich war, daß der Niederschlag stickstofffrei war, d. h. daß das Phenyläthylamin

doch nicht gefällt war, so wurde zuerst nur das mit dem Öl beim ersten Einbringen desselben in den Tiegel getränkte Filterpapier nach Kjeldahl auf Stickstoff untersucht. Es erwies sich aber, daß darin 0,0031 g Stickstoff enthalten war (NH_3 -Menge entsprach 1,1 ccm a-Natronlauge). Deshalb wurde das Öl mit großer Sorgfalt, wobei aber doch Verluste wegen seines Anhaftens und Verschmierens nicht zu vermeiden waren, in den Tiegel gebracht und der Inhalt desselben nach vorsichtigem Auswaschen in einen Kjeldahl-Kolben gebracht. Dabei wurden noch 0,0067 g Stickstoff gefunden (NH_3 -Menge entsprach 2,37 ccm a-Natronlauge), was zusammen mit der ersten Stickstoffbestimmung eine Stickstoffmenge von 0,0098 g ausmacht. Der aus der Formel $\text{C}_6\text{H}_5\text{C}_2\text{H}_4\text{NH}_2\text{HCl}$ berechnete Stickstoffgehalt der angewendeten Substanzmenge betrug 0,0126 g. Somit war eine, bei Berücksichtigung der erwähnten Fehlerquellen genügende Übereinstimmung erhalten worden.

Das Ergebnis dieses Versuches hat insofern ein Interesse, als das Phenyläthylamin, wenn es bei der Cholinbestimmung in dem verarbeiteten Material anwesend ist, nicht nur teilweise, was ganz unzweifelhaft, sondern sogar vollständig in die sogenannte Cholinfallung eingehen kann. Dabei könnte eine halb fest, halb ölig aussehende Fällung entstehen. Wie wir unten sehen können, bildet sich bei der Cholinfallung aus Pflanzenauszügen eine derartige kompakte Masse.

Versuch XIII.

Einen weiteren Versuch machte ich mit Lupanin, dem in den Samen von *Lupinus albus* vorkommenden Alkaloid, welches von E. Schulze auch in Keimpflanzen der genannten Art gefunden ist.¹⁾ Es wird, wie das Cholin, durch Quecksilberchlorid gefällt und liefert, wie die genannte Base, ein in kaltem absoluten Alkohol lösliches Chlorid. Daher war es von Interesse zu untersuchen, ob sich das Lupanin gegen das Staněksche Reagens anders, als das Cholin, verhält. Zuerst wurde ein nicht ganz reines Präparat von salzsaurem Lupanin zur Fällung verwendet.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLVII, S. 519 (1906).

Es wurden 0,0595 g dieses Präparats in 40 ccm Wasser gelöst, filtriert, da die Lösung nicht ganz klar war, mit 1,5 g NaHCO_3 versetzt und nach Vorschrift mit Kaliumtrijodid gefällt. Es entstand eine dunkelbraune, amorphe Fällung, die nach 1—1 $\frac{1}{2}$ Minuten in einen grünen, aus miteinander zusammenklebenden Krystallen bestehenden kompakten Niederschlag überging. Nach ca. 14 stündigem Stehen wurde filtriert und das Filtrat auf Stickstoff nach Kjeldahl untersucht. Dabei erwies sich, daß letzteres vollkommen stickstofffrei war und demnach alles im Präparat vorhandene Lupanin durch das Reagens ausgefällt war (NH_3 -Menge entsprach — 0,02 ccm a-Natronlauge).

Ich machte nun einen zweiten Versuch mit einem völlig reinen Präparate salzsauren Lupanins.

Versuch XIV.

Die verwendete Menge des salzsauren Lupanins wog 0,1012 g. Dieselbe wurde in 30 ccm Wasser aufgelöst, 1,2 g Natriumcarbonat zugesetzt und durch das Reagens gefällt. Der gebildete Niederschlag glich vollständig den in früheren Versuchen erhaltenen. Sein Stickstoffgehalt betrug 0,0076 g (NH_3 -Menge entsprach 2,72 ccm a-Natronlauge) anstatt der in dem Präparate durch die Formel $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{OHCl} + 2 \text{H}_2\text{O}$ verlangten theoretischen 0,0088 g. Daraus ersieht man, daß das Lupanin durch das Reagens zum allergrößten Teil gefällt wurde.

Wie aus diesen Versuchen folgt, wird eine Reihe gar nicht untereinander verwandter Substanzen, nämlich das Phenyläthylamin, das Lupanin und die in der Histidinfraktion dem Histidin beigemengten Körper durch das Reagens ausgefällt. Hierzu muß das Muscarin, vielleicht auch noch verschiedene Alkaloide, Stachydrin und Trimethylamin zugezählt werden, wie es aus Staněks Angaben zu sehen ist.¹⁾ Staněk gibt hier an, daß das Trimethylamin, da er den Auszug mit Baryumhydroxid kocht, nicht in Betracht kommt, weil es durch das Kochen vertrieben wird. Anders könnte es aber sein, wenn man das Kochen mit $\text{Ba}(\text{OH})_2$ bei der Bestimmung des vor-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLVIII, 1906, S. 338.

gebildeten Cholins unterläßt. Daß die Alkaloide fällbar sind, wird auch von Staněk angegeben, obgleich man diese Behauptung nicht durch Versuche unterstützt sieht. Der Versuch mit dem Lupanin bestärkt diese Angabe.

Was das Stachydrin angeht, so wurde dessen Fällbarkeit von Staněk nicht untersucht, sondern nur angenommen. Bei einem von mir angestellten Versuche mit salzsaurem Stachydrin entstand eine ölige Fällung, die aber auf Stickstoff nicht untersucht wurde. Eine gleiche, aber weniger ölige Fällung erhielt ich auch beim Versetzen einer Lösung des salzsauren Trigonellins mit dem Reagens; nach den Angaben Staněks ist das Trigonellin jedoch nur bei saurer Reaktion fällbar und kommt demnach bei der Cholinbestimmung nicht in Betracht.

Andere Substanzen wieder bleiben, obgleich das Reagens in ihren Lösungen einen grünlichen krystallinischen Niederschlag hervorruft, vollständig in Lösung, was aus der Stickstoffabwesenheit im Niederschlage klar hervorgeht, so daß dieser nur aus Jod bestehen kann.

Hierher gehören von den von mir untersuchten Körpern: Histidin, Arginin, Guanidin und Leucin.

Der Versuch mit letzterem ist früher bei den Cholinbestimmungen angeführt worden und man darf wohl aus der Nichtfällbarkeit des Leucins auf ein gleiches Verhalten anderer Monoaminosäuren schließen.¹⁾

In seiner zuletzt publizierte Abhandlung «Über die quantitative Bestimmung von Cholin und Betain in pflanzlichen Stoffen»²⁾ beschreibt Staněk die Methode, mittels deren er den Cholin- und Betaingehalt in einigen pflanzlichen Substanzen bestimmte. Das von ihm beschriebene Verfahren zum Extrahieren der Pflanzensubstanz besteht darin, daß er die Substanz mit 96⁰/₀igem Alkohol «so lange extrahiert, bis fast alle löslichen Stoffe ausgelaugt sind». Nach dem Abdestillieren des Alkohols wird dann der Rückstand mit wässriger Barytlösung

¹⁾ Staněk gibt eine Nichtfällbarkeit von Glykokoll, Asparagin, Tyrosin, Glutaminsäure, NH₅-Salze durch das Reagens an (Chem. Zentralblatt, 1904, II, S. 950).

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLVIII, 1906, S. 334.

gekocht, wobei die Lecithine zerfallen und demnach die später in der Lösung enthaltene Cholinmenge nicht der ursprünglich vorhandenen entspricht; sie ist vermehrt durch die bei der Spaltung des Lecithins erhaltene Quantität. Selbstverständlich muß man das Kochen mit Barytwasser unterlassen, wenn man die ursprünglich vorhandene Cholinmenge bestimmen will. In letzterem Falle ist gegen diese Extraktionsmethode einzuwenden, daß bei der leichten Veränderlichkeit des Lecithins letzteres möglicherweise sich während der Verarbeitung des Alkoholextraktes partiell zersetzen kann.¹⁾ Außerdem ist es noch fraglich, ob alles vorhandene Cholin in die alkoholische Lösung quantitativ übergehen wird. E. Schulze fand in einem Versuche mit *Lupinus albus*,²⁾ bei Extraktion mit Alkohol, daß sowohl im alkoholischen, als auch in dem aus dem Rückstand dargestellten wässerigen Extrakte Cholin in beträchtlicher Menge enthalten war. Dasselbe folgt auch aus einem von mir ausgeführten Versuche (Versuch XVIII). Deshalb war in allen von mir im weiteren angegebenen Versuchen die Extraktion dreimal mit einer gegen 70° erwärmten 6—8fachen Menge Wasser vorgenommen, bei welcher Extraktionsmethode man gegen eine Zersetzung des Lecithins so weit als möglich gesichert ist. Da das Cholin, wie auch seine bekannten Salze, gut in Wasser löslich sind, so darf man annehmen, daß das Cholin vollständig in die wässerige Lösung übergeht.

Nach dem Aufnehmen des Rückstandes in Wasser entfernte Staněk das Eiweiß und andere Substanzen mit Tannin, fällte den Überschuß von Tannin mit Baryt und dampfte nach Ansäuern mit Schwefelsäure bis zum dünnen Sirup ein. Die nachstehenden Bestimmungen wurden in der gleichen Weise ausgeführt, mit dem Unterschiede, daß ich das Eiweiß usw. mit Bleiessig fällte und das durch die später hinzugefügte Schwefelsäure nicht ganz entfernte Blei noch mit Schwefelwasserstoff vollständig ausschied.

Staněk bemerkte, daß die Flüssigkeit, wenn sie bei der

¹⁾ E. Schulze, Landw. Versuchsst., 1895; Bd. XLVI, S. 70.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLVII, 1906.

quantitativen Trennung des Cholins und Betains zuerst zum Abscheiden des Cholins alkalisch gemacht wurde, beim Zusatz des Reagens doch sauer wurde, was eine Mitausscheidung des Betains verursachte. Diese Erscheinung hing von der Eigenschaft des im Reagens enthaltenen Jods ab, das bei alkalischer Reaktion derartig mit den im Extrakt anwesenden organischen Substanzen reagierte, daß Jodoform entstand und die Lösung sauer wurde. Er schlug daher vor, eine doppelte Fällung zu unternehmen, indem zuerst beide Basen in saurer Lösung gefällt werden; dann wird nach erfolgtem Zerlegen der Fällung durch Kupfer und Kupferchlorid eine Trennung des Cholins und Betains unternommen, indem je nach der hervortretenden Menge der einen oder der anderen Base verschieden gehandelt wird.¹⁾

Da mich aber speziell das Cholin beschäftigte und ich außerdem Kürbissamen und Keimlinge zur Untersuchung nahm, in denen kein Betain²⁾ gefunden wurde, so unterließ ich stets diese doppelte Fällung und fällte das Cholin direkt aus einer Lösung, in der die Schwefelsäure mit Natronlauge neutralisiert und die dann deutlich alkalisch gemacht wurde.

Die Perjodidfällung ist, wie Staněk angibt, mit Kupfer und Kupferchlorid in das Chlorhydrat überzuführen, das Kupfer durch Schwefelwasserstoff zu entfernen und nach Entfärben mit Blutkohle zur Trockene einzudampfen. In meinen Versuchen folgte ich diesen Anweisungen, mit dem Unterschiede, daß ich in dem einen Versuch (Versuch XV) anstatt mit Kupfer und Kupferchlorid das Zerlegen mit Kupfer und Kupferhydroxyd unternahm und die Lösung nach dem Abfiltrieren mit Salzsäure ansäuerte, was allerdings viel umständlicher ist und von Staněk nur in seiner ersten Arbeit empfohlen wird.³⁾ Diese Modifizierung des Verfahrens änderte, wie es zu erwarten war und aus den Zahlen zu ersehen ist, das Resultat nicht im geringsten. Das Entfärben mit Blutkohle habe ich unterlassen, weil ich befürchtete, daß das Cholin möglicherweise auch zum Teil von der Blutkohle festgehalten wird und durch sorgfältiges Aus-

¹⁾ l. c. S. 337.

²⁾ E. Schulze, Diese Zeitschrift, Bd. XLVII, S. 550.

³⁾ Chem. Zentralbl., 1905.

waschen derselben vielleicht doch nicht völlig zu gewinnen ist, außerdem auch deshalb, weil ich eine Reinigung des Cholinchlorids in anderer Weise vorgenommen habe. Ich dunstete die cholinhaltige Lösung zur Trockene ein, extrahierte den Trockenrückstand mit absolutem Alkohol in der Kälte und wiederholte diese Operation noch einmal. Alsdann wurde nur der in Wasser lösliche Teil des Filtrats zur Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl genommen und das Cholin aus der in ihm gefundenen Stickstoffmenge berechnet.

Staněk weist darauf hin, daß es notwendig sei, eine Identifikation des beim Ausführen der Bestimmung erhaltenen Cholinchlorids vorzunehmen.¹⁾ Durch diese Notwendigkeit verliert aber das Staněksche Verfahren stark an seiner quantitativen Bedeutung für pflanzliche Substanzen. Gesetzt, daß sich bei der Identifikation herausstellt, daß neben dem Cholinchlorid noch ein anderes Chlorid vorhanden ist, so ist eine Berechnung der Cholinmenge selbstverständlich unmöglich. Das Verfahren hat dann keinen Vorzug vor der bisher angewendeten Methode und ist, wie wir aus den unten angeführten Versuchen sehen, im ganzen nicht weniger umständlich und zeitraubend, als diese. Auch besitzt das Verfahren keine größere Genauigkeit und gestattet nicht von einer kleineren Substanzmenge auszugehen. Denn, wie aus der von Staněk angeführten Tabelle zu ersehen ist,²⁾ ist solches nur bei einer Substanzmenge von 960 bis 4620 g möglich gewesen; eine kleinere Menge der Pflanzensubstanz gab Cholinmengen, die zur Identifikation nicht ausreichten, was auch ganz begreiflich ist.

Deshalb habe ich mich bei meinen Versuchen auf die Stickstoffbestimmung in den nach den vorigen Angaben erhaltenen «Cholinfraktionen» beschränkt, so daß die später angegebenen Zahlen nicht als absolute Cholinmengen angesehen werden können, sondern einem als «Cholin» berechneten Gemenge von Substanzen, die sich ähnlich dem Cholin verhalten, entsprechen. Dieses folgt auch aus der bei den Kürbissamen nach der alten Methode von mir erhaltenen Zahl, die sich ohne

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLVIII, S. 339.

²⁾ l. c. 340.

Zweifel auf reines Cholinchlorid bezieht.¹⁾ Es ist nicht anzunehmen, daß die große Differenz dieser und der nach Staněks Verfahren erhaltenen Zahlen durch die Unvollkommenheit der älteren Methode bedingt ist; man hat ihre Ursache vielmehr darin zu suchen, daß das nach dem Staněkschen Verfahren erhaltene Produkt keine einheitliche Substanz ist.

Zu jedem Versuche der Cholinbestimmung nach der Staněkschen Methode wurden von mir 50 g Material verwendet (entfettete Samen oder Keimpflanzen). Die Auszüge wurden in oben angegebener Art zur Fällung vorbereitet. Das Reagens wurde stets tropfenweise zugesetzt. Im folgenden sind die dabei entstehenden Erscheinungen im einzelnen beschrieben.

Gewöhnlich bildete sich bei dem Zusatz der ersten Tropfen des Reagens eine dunkelbraune Trübung, die dann bei der weiteren Zugabe, wenn auch nicht immer völlig verschwand, doch aber nach einiger Zeit kaum zu bemerken war. Anstatt dessen bildeten sich aber schmierige schwarze Flocken, die sich zuerst an der Oberfläche befanden, dann aber, beim Umrühren mit einem Glasstabe, niedersanken und schließlich eine schmierige, doch aber ganz gut von den Wänden des Becherglases trennbare, zähe Masse bildeten. Von dieser ließ sich zwar die Flüssigkeit mit einigen kleinen Flocken meistens ganz bequem in den Goochtiegel zum Absaugen abgießen, jedoch durfte der Niederschlag nicht direkt in den Tiegel gebracht werden (Versuch XX), da sonst das Absaugen bald unmöglich wurde. In keinem Falle entstand bei der Fällung ein gut krystallinischer Niederschlag, vielmehr hatte der Niederschlag ein Aussehen, als ob in einer zähen Masse kleine Krystalle zerstreut wären (vgl. die oben bei dem Versuch mit Phenyläthylamin gemachte Bemerkung). Nach Auswaschen mit einer geringen Menge Wasser, wobei der zähe Niederschlag mit einem Glasstabe so gut wie möglich verrieben wurde und dabei sich wie fester Teig verhielt, wurden in dasselbe Becherglas zu dem dort gelassenen Niederschlage das Filtrierpapier aus dem Tiegel, event. auch die in ihn eingelegte Porzellanplatte hineingebracht; der

¹⁾ E. Schulze, Diese Zeitschrift, Bd. XLVII, 1906, S. 552. In 1000 Samen fand E. Schulze 0,144 g Cholinchlorid.

Tiegel wurde mit Nachhilfe eines Glasstabes mit 30—40 ccm Wasser ausgespült und der so gesammelte Niederschlag mit Kupferstaub und Kupferchlorid versetzt, wobei er sich aber, seiner kompakten Beschaffenheit wegen, nur sehr langsam zersetzte. Erwärmen auf dem Wasserbade, sowie energisches, oft wiederholtes Verreiben mit einem Glasstabe förderte die Zersetzung. Oft waren aber nach langem, sorgfältigem Zersetzen doch noch immer kleine Stückchen zurückgeblieben, so daß es geboten war, stets den Niederschlag auf das Nachbleiben unzersetzter Partikelchen zu prüfen. Die Flüssigkeit wurde dann noch heiß abgesaugt, der Niederschlag noch mit heißem Wasser verrieben, manchmal auch noch Kupferchlorid zugesetzt und dann das Kupfer durch Schwefelwasserstoff ausgefällt. Das Filtrat wurde zur Trockene auf einem Wasserbade verdunstet, im Vakuumexsikkator getrocknet, mit absolutem Alkohol sorgfältig extrahiert und die Lösung wieder eingedunstet. Der Verdunstungsrückstand wurde nach Austrocknen zum zweitenmal mit absolutem Alkohol extrahiert und der nach nochmaligem Verdunsten erhaltene Rückstand mit Wasser ausgezogen. Die wässrige Lösung wurde dann in einen Kjeldahlkolben gebracht und darin nach der gewöhnlichen Weise der Stickstoffgehalt bestimmt. In einigen Versuchen wurde nach der erstmaligen Extraktion mit kaltem absoluten Alkohol die Wasserextraktion und dann die zweite Extraktion nach Trocknen im Vakuumexsikkator mit absolutem Alkohol vorgenommen. Aus den zwei ersten Versuchen ist zu sehen, daß jedesmal in den in Alkohol oder in Wasser unlöslichen Rückständen Stickstoff zu finden war. Diese wiederholte Extraktion, die mit Verlusten nicht verbunden sein konnte, bedingte zwar eine Reinigung der Rohfraktion, dennoch kann man, wie gesagt, nicht sicher sein, daß man in beschriebener Weise reines salzsaures Cholin erhielt.

A. Versuche mit Kürbissamen.

Zu jedem Versuche wurden 50 g entfetteter und fein verriebener Samen verwendet. Diese Menge entsprach 324,6 Samen (2000 Samen wogen fein zerrieben und entfettet 308 g.)

Versuch XV.

Das Zerlegen des Perjodidniederschlags wurde nach den älteren Angaben von Staněk durch Cu und $\text{Cu}(\text{OH})_2$ ausgeführt. Die erhaltene Flüssigkeit wurde mit Salzsäure angesäuert, wobei ein starker flockiger Niederschlag entstand, der 0,0052 g Stickstoff enthielt (NH_3 -Menge entsprach 1,92 ccm b-Natronlauge). Daß dieser Niederschlag Stickstoff enthalten mußte, wurde schon von Staněk vermutet,¹⁾ der dabei annahm, daß hier die letzten Spuren von Eiweißstoffen, Peptonen und Purinkörpern entfernt werden. Beim Eindampfen des Filtrats entstand ein Niederschlag; dessen ungeachtet wurde zur Trockene eingedampft und mit kaltem absoluten Alkohol extrahiert. Im unlöslichen Rückstande wurde 0,0107 g Stickstoff gefunden (NH_3 -Menge entsprach 3,92 ccm b-Natronlauge). Dieser Rückstand war sehr hygroskopisch. Das Gleiche zeigte sich in allen nachfolgenden Versuchen. Nach Verdampfen wurde mit Wasser extrahiert, wobei ein Rückstand nachblieb, der ebenfalls, wenn auch nur wenig, Stickstoff enthielt (0,0015 g N, NH_3 -Menge entsprach 0,57 ccm b-Natronlauge). Im Wasserauszug wurde der Stickstoff als Cholinstickstoff nach Kjeldahl bestimmt. Die Stickstoffmenge betrug 0,0127 g (die NH_3 -Menge entsprach 4,65 ccm b-Natronlauge), was auf salzsaures Cholin berechnet die Menge von 0,126 g gibt.

Versuch XVI.

Die Behandlung war die gleiche, wie im I. Versuche, nur daß das Zerlegen nicht durch Kupferhydroxyd, sondern durch Kupferchlorid vorgenommen wurde. In dem abfiltrierten Kupferniederschlage wurde sehr viel Stickstoff gefunden (0,1143 g; die NH_3 -Menge entsprach 40,69 ccm a-Natronlauge). Bei der Extraktion mit kaltem absolutem Alkohol des mit Schwefelwasserstoff vom Kupfer befreiten und verdunsteten Filtrats, blieb ein Rückstand nach, der 0,0225 g Stickstoff enthielt (NH_3 -Menge entsprach 8,02 ccm a-Natronlauge). Nach nochmaliger Extraktion der verdunsteten alkoholischen Lösung mit kaltem absolutem Alkohol, blieb wieder ein Rückstand nach, der 0,0031 g Stickstoff enthielt (NH_3 -Menge entsprach 1,10 ccm a-Natronlauge).

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLVIII, S. 338.

Das verdunstete Filtrat wurde in Wasser aufgenommen, wobei wieder ein, Spuren Stickstoff enthaltender, Rückstand nachblieb (0,0008 g N; NH_3 -Menge entsprach 0,28 ccm a-Natronlauge). Die Flüssigkeit wurde jetzt nach Kjeldahl behandelt und enthielt 0,0134 g Stickstoff (NH_3 -Menge entsprach 4,78 ccm a-Natronlauge). Auf salzsaures Cholin berechnet, ergab sich der Gehalt von 0,133 g salzsauren Cholins.

In beiden Versuchen wurden demnach 0,126 und 0,133 g Cholinchlorid berechnet.

Auf 1000 Samen gibt es den Mittelgehalt von 0,400 g.

Versuch XVII.

Dieser Versuch wurde unternommen um die Vollständigkeit der Extraktion des Cholins mit 95% Alkohol zu prüfen. 50 g der genannten Pflanzensubstanz wurden fünfmal mit dem Alkohol extrahiert (im ganzen gegen 1,2 l). Nach dem Abdestillieren des Alkohols und Aufnehmen des Rückstandes in Wasser, wurden die durch Bleiessig fällbaren Substanzen entfernt und das Filtrat nach früheren Angaben zur Fällung mit Kaliumtrijodid vorbereitet. Das Reagens gab eine krystallinische Fällung, die sich sehr rasch mit Kupfer und Kupferchlorid umsetzte. Die weitere Verarbeitung geschah in der gewöhnlichen Weise. Die bei den wiederholten Extraktionen des Cholinchlorids mit Alkohol und Wasser erhaltenen Rückstände waren nicht bedeutend. Als schließlich der Stickstoff bestimmt wurde, erwies sich, daß in der erhaltenen «Cholinfraktion» nur 0,0016 g Stickstoff enthalten waren (NH_3 -Menge entsprach 0,56 ccm a-Natronlauge), was einer Cholinchloridmenge von 0,016 g entspricht.

Diese geringe Cholinchloridmenge, deren Differenz mit dem Mittel der zwei früheren Bestimmungen 0,114 g beträgt und die nur 12,3% des letzteren bildet, konnte nur durch eine mangelnde Extraktion mit Alkohol bedingt sein. Deshalb war es von Interesse zu untersuchen, ob in dem mit Alkohol extrahierten Material nicht noch Cholin nach Staněk nachzuweisen war. Der folgende Versuch gibt eine Bestätigung dieser Voraussetzung, die auch aus Versuchen von E. Schulze zu folgern war.¹⁾

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLVII, S. 525.

Versuch XVIII.

Das in dem vorhergehenden Versuch mit Alkohol extrahierte Material wurde mit Wasser extrahiert und der Extrakt in angegebener Weise zur Fällung mit Kaliumtrijodid vorbereitet. Die Fällung war nicht wie in dem vorigen Versuche krystallinisch, sondern bildete eine ölige, zähe Masse, wie es auch in anderen Versuchen mit Pflanzensubstanz der Fall war. Nach der schon angegebenen Art wurde die «Cholinfraktion» dargestellt, in der noch 0,0081 g Stickstoff enthalten waren (NH_3 -Menge entsprach 2,87 ccm a-Natronlauge). Auf Cholinchlorid berechnet, gibt es eine Menge von 0,080 g.

Versuch XIX.

In diesem Versuche wurde der Cholingehalt in den Kürbissamen nach der kombinierten Methode der Fällung mit Phosphorwolframsäure und Quecksilberchlorid ermittelt. Zum Versuche wurden 100 g Substanz verwendet und nach den früheren Angaben gearbeitet. Das gefundene Cholinchlorid wog 0,141 g. Auf 1000 Samen wurde demnach nach dieser Methode 0,217 g gefunden.

B. Versuche mit 14tägigen etiolierten Kürbiskeimpflanzen.

Die zu diesen Versuchen verwendeten Keimpflanzen entsprachen den in den angegebenen Versuchen XV—XIX verwendeten Samen. Die Keimpflanzen wurden grob gemahlen und ohne Entfetten auf der Reibe fein verrieben, was, des geringen Fettgehaltes wegen, sehr gut vorgenommen werden konnte. Zu jedem Versuche wurden 50 g verwendet, was 236,75 Keimpflanzen entsprach (780 Keimpflanzen hatten ein Gewicht von 164,7 g).

Versuch XX.

Das Vorbereiten zur Fällung mit Kaliumtrijodid wurde in üblicher Weise ausgeführt. Die Fällung war sehr ölig und konnte nur sehr langsam filtriert werden. Das Zerlegen des Perjodidniederschlags durch Kupfer und Kupferchlorid ging trotz starkem Verreiben und Erwärmen auf dem Wasserbade nur sehr langsam vor sich. In der «Cholinfraktion» wurden 0,0225 g Stickstoff

gefunden (NH_3 -Menge entsprach 8,00 ccm a-Natronlauge), was 0,224 g Cholinchlorid entspricht.

Versuch XXI.

Verfahren und Erscheinungen waren dieselben, wie in Versuch XX. Der Stickstoffgehalt der «Cholinfraktion» betrug 0,0327 g (NH_3 -Menge entsprach 11,65 ccm a-Natronlauge). Auf Cholinchlorid umgerechnet, gab es 0,325 g.

Ein dritter Versuch mit denselben Keimpflanzen konnte wegen eines unglücklichen Zufalls nicht zu Ende geführt werden.

In beiden Versuchen wurden 0,224 und 0,325 g Cholinchlorid berechnet.

Auf 1000 Keimpflanzen gibt es einen Mittelgehalt von 1,161 g. Wenn man diese Zahl mit der aus Samen erhaltenen vergleicht, so sieht man, daß das Staněksche Verfahren eine Zunahme der Cholinmenge während des Keimungsprozesses ergibt.¹⁾

C. Autolyseversuch.

Zu diesem Versuch wurde ein Material verwendet, das aus 10tägigen Kürbiskeimpflanzen bestand. Sie wurden bei gelinder Temperatur ($35\text{—}40^\circ$) getrocknet, dann gemahlen und auf einer Reibe fein verrieben. Da der Ölgehalt höher war, als in den in den vorstehenden Versuchen verwendeten Keimpflanzen, so war das Verreiben bedeutend schwieriger, indem sich bei längerem Verreiben ein etwas öliger Kuchen auf der Reibplatte bildete. 50 g (I. Portion) dieses Materials wurden gleich auf gewöhnliche Weise zur Cholinbestimmung nach Staněk verwendet. Andere 50 g (II. Portion) wurden in einem großen Erlenmeyerkolben mit 1 l Wasser unter Zusatz von Chloroform und Toluol 17 Tage lang in einem $34\text{—}38^\circ$ warmen Lufttrockenschranke stehen gelassen und später, nach Erhitzen im kochenden Wasserbade, in üblicher Weise verarbeitet.

I. Portion.

Bei der Fällung durch Kaliumtrijodid und dem Zerlegen dieser Fällung traten die früher beschriebenen Erscheinungen

¹⁾ E. Schulze, Diese Zeitschrift, Bd. XLVII, S. 535.

ein. Die Cholinfraktion enthielt 0,0092 g Stickstoff (NH_3 -Menge entsprach 3,27 ccm a-Natronlauge), was auf Cholinchlorid berechnet 0,091 g ausmacht.

II. Portion.

Der Perjodidniederschlag hatte eine stark ölige Konsistenz. Der in der Cholinfraktion enthaltene Stickstoff betrug 0,0411 g (NH_3 -Menge entsprach 14,62 ccm a-Natronlauge). Daraus ergibt sich beim Berechnen 0,409 g Cholinchlorid.

Aus diesem Autolyseversuch ersieht man, daß bei der Autolyse ein beträchtlicher Zuwachs der Cholinmenge nach dem Verfahren von Staněk gefunden wurde. Wenn man diesen Zuwachs, was doch wahrscheinlich ist, zum größten Teil der Vermehrung des Cholins zuschreiben kann, so muß man die Erklärung im Lecithinabbau während der Autolyse suchen.

Zusammenfassung der Resultate.

Zunächst ist hervorzuheben, daß die Methode von Staněk, auf reines Cholin angewendet, recht gute Resultate gibt. Allerdings lasse ich dabei die zwei Versuche, die mit vielleicht nicht vollkommen reinem Cholinchlorid gemacht wurden, außer Acht. Es ist möglich, daß die in minimaler Quantität anwesenden Beimengungen¹⁾ doch das befriedigende Resultat, welches bei reinem Cholinchlorid auch in diesem Falle möglich gewesen wäre, beeinträchtigt haben.

Wenn wir zu den Versuchen übergehen, die mit verschiedenen anderen Basen angestellt wurden, sehen wir, daß einige dieser Basen sich gegenüber dem Reagens dem Cholinchlorid ähnlich verhalten, was eine neue Trennung und Identifizierung bei ihrer gleichzeitigen Anwesenheit in den Extrakten erforderlich macht.

Dadurch verliert das Verfahren von Staněk bei Anwendung auf Pflanzenextrakte, in denen fast immer ein kompliziertes Stoffgemenge enthalten ist, bedeutend an Wert.

Diese Schlußfolgerung wird auch bestätigt durch die viel

¹⁾ Daß es nur geringe Beimengungen sein konnten, schließen wir aus der Darstellungsmethode dieses Präparats (s. oben).

geringere Cholinmenge, die durch das alte Verfahren gegenüber dem Verfahren von Staněk erhalten wurde, was doch wohl durch die Annahme zu erklären ist, daß nach dem Staněkschen Verfahren noch andere Substanzen gefällt wurden. Die Methode kann dem früheren, lange Zeit nicht für quantitativ gehaltenen, aber doch sichere Resultate gebenden Verfahren der kombinierten Fällung mit Phosphorwolframsäure und Quecksilberchlorid gleichgestellt werden, jedoch nur dann, wenn man die Staněksche Methode vielleicht mit der Fällung mit Quecksilberchlorid kombiniert. Dabei verliert aber die Methode an ihrer sie bevorzugenden Einfachheit und ist dann nicht weniger kompliziert als die erwähnte ältere Methode. In solchen Fällen muß man von einer ebenso großen Substanzmenge ausgehen, als wenn man nach der früheren Methode arbeitete. •

Es ist noch darauf hinzuweisen, daß das Zerlegen des kompakten, beim Arbeiten mit Pflanzensubstanzen stets erhaltenen Perjodidniederschlags durch Kupfer und Kupferchlorid sehr umständlich und zeitraubend ist; das spricht keineswegs für die Anwendung dieser Methode. Zuletzt muß ich noch auf die Unsicherheit des von Staněk vorgeschlagenen Extraktionsverfahrens des pflanzlichen Materials mit 95% Alkohol hinweisen; es ist nicht anzunehmen, daß dabei alles Cholin in Lösung geht. Vielmehr wäre in diesen Fällen eine Extraktion mit kaltem oder erwärmtem Wasser vorzuziehen.

Was die von mir mit Samen und Keimpflanzen ausgeführten Versuche speziell, ohne Bezug auf die Methodik des Staněkschen Verfahrens, betrifft, so können wir ihre Resultate nur mit einem gewissen Vorbehalt deuten. Aus dem Vergleich der aus den Samen und Keimpflanzen erhaltenen, auf gleiche Anzahl Objekte berechneten Cholinmengen, kann man auf einen Zuwachs des Cholins, also auf einen Lecithinzerfall während der Keimungsperiode schließen. Ein gleicher Zuwachs, resp. Zerfall, erwies sich auch bei dem Autodigestionsversuche. Es wäre konsequent, daraus zu folgern, daß der Lecithinzerfall in Organismen ein fermentativer Prozeß sein kann.

Daß die angeführten Resultate, auf wirkliches Cholin bezogen, die gefundene Richtung haben würden, war vorauszusehen.

Wir können aber die gefundenen Zahlen nicht für eine absolute Bestätigung der daraus zu folgernden Verhältnisse im Lecithin-stoffwechsel ansehen, sondern können nur sagen, daß die durch die Staněksche Methode erhaltenen Resultate für eine solche Annahme sprechen.

Es sei mir zum Schluß erlaubt, Herrn Prof. E. Schulze, der mich zur Ausführung dieser Untersuchung anregte, für seinen freundlichen Beistand und reges Interesse an meiner Arbeit, meinen besten Dank auszusprechen.

