

Versuche zur quantitativen Gewinnung von Cholin aus Lecithin.

Von

Dr. G. Moruzzi aus Parma.

(Aus der chemischen Abteilung des physiologischen Instituts zu Berlin.)

(Der Redaktion zugegangen am 17. März 1908.)

Seit den Untersuchungen von Diakonow und Strecker nimmt man an, daß das Lecithin eine Verbindung der Glycerinphosphorsäure mit Fettsäuren und Cholin ist und zwar auf Grund der Elementaranalyse und der qualitativen Feststellung der Spaltungsprodukte. Die Versuche, bei der Spaltung das Cholin in einer mit der Theorie übereinstimmenden Menge zu erhalten, sind bisher erfolglos geblieben. Als Spaltungsmittel wurde Barytwasser benutzt. Erlandsen¹⁾ erhielt nur 42%, Heffter²⁾ sogar nur 25%. Doch handelt es sich bei ihm um ein Phosphatidgemenge (aus Leber), während Erlandsen ein reines Lecithin (aus Herzmuskel) benutzte. Es ist das um so auffallender, als einerseits die Platinverbindung für sehr geeignet zur quantitativen Abscheidung des Cholins gilt und andererseits Cholin in verdünnter Lösung gegen Baryumhydroxyd in der Hitze sehr widerstandsfähig ist. Gulewitsch³⁾ löste eine aus 1,33 g reinem Cholinplatinchlorid hergestellte 0,2%ige wässrige Cholinlösung mit überschüssigem Barythydrat in einem Kolben, welcher mittels eines Rückflußkühlers mit einer verdünnten Salzsäure enthaltenden Drechselschen Flasche verbunden war, 6 Stunden, während dessen von Zeit zu Zeit ein Luftstrom durchgesaugt wurde. Nach entsprechender Behandlung wurde aus dem Kolbeninhalt 1,29 g eines Platinchloridniederschlages erhalten, welcher

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. LI, S. 113.

²⁾ Arch. f. exp. Pathol. u. Pharm., Bd. XXVIII, S. 97.

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXIV, S. 513.

abgesehen von einer kleinen Beimengung einer dunkelbraunen amorphen Substanz aus reinem Cholinplatinchlorid bestand. Beim Verdunsten des Inhalts der Drechselschen Flasche wurden nur 0,007 g Rückstand erhalten, welcher mit alkoholischer Lösung von Platinchlorid einen Niederschlag gab. Diese Resultate zeigen, daß sich verdünnte Lösungen von Cholin beim Kochen mit Barytwasser nicht zersetzen, oder daß wenigstens die Zersetzung so geringfügig ist, daß sie praktisch nicht in Betracht kommt. Kocht man Lecithin mit Barytwasser, so tritt Geruch nach Trimethylamin auf. Von dieser schon von Heffter beobachteten Zersetzung kann man sich leicht überzeugen. Daß sie aber der Grund für die geringe Ausbeute an Cholin bei der quantitativen Spaltung des Lecithins mit Barytwasser ist, möchte ich mit Erlandsen¹⁾ in Abrede stellen, denn in Übereinstimmung mit ihm fand ich, daß die Menge der bei der Verseifung des Lecithins mit Barytwasser überdestillierenden Base nur sehr gering ist.

Ich habe, nachdem Experimente, das Barytwasser durch Baryummethylat zu ersetzen, zu keinem befriedigenden Resultat geführt hatten, auf Anregung von Herrn Professor Thierfelder versucht, ob vielleicht die Spaltung in saurer Lösung eine bessere Ausbeute an Cholin gestattet, und berichte im folgenden über meine Erfahrungen.

Hydrolyse des Lecithins in saurer Lösung.

Eine Abspaltung von Cholin aus Lecithin beim Schütteln einer ätherischen Lösung mit wässriger verdünnter Schwefelsäure findet nach Diakonow²⁾ schon in der Kälte statt. Sie ist aber eine unvollständige (Gilson,³⁾ Heffter⁴⁾). Die Spaltung des Lecithins durch Säure in der Hitze zum Zwecke der Gewinnung des Cholins wurde von Brieger⁵⁾ und neuerdings von J. D. Riedel⁶⁾ ausgeführt. Brieger benutzte Salzsäure,

¹⁾ a. a. O.

²⁾ Zentralbl. f. d. med. Wiss., 1868, S. 434.

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XII, S. 591.

⁴⁾ a. a. O.

⁵⁾ Ptomaine.

⁶⁾ Riedels Berichte, 1907, S. 26.

J. D. Riedel 30—40%ige Schwefelsäure. Angaben über die quantitative Ausbeute fehlen. Um festzustellen, ob in der Hitze die Abtrennung vollständig verläuft und welche Säurekonzentration und Kochdauer dazu notwendig ist, stellte ich einige Versuche an, in denen die Zeit des Erhitzens und die Stärke der Säure wechselten. Die Menge des abgespaltenen Cholins wurde durch Bestimmung des Stickstoffs in der filtrierten Flüssigkeit ermittelt.

Als Material benutzte ich nicht freies Lecithin, sondern ihrer besseren Haltbarkeit und bequemeren Dosierbarkeit wegen eine Lecithinchlorcadmiumverbindung, welche aus käuflichem, in Alkohol löslichem Lecithin von Riedel¹⁾ hergestellt worden war und ein hellgelbes Pulver darstellte.

Sie enthielt 1,42% N und 3,09% P, also N : P = 1 : 1,02.

Die Stickstoffbestimmungen wurden nach Kjeldahl, die Phosphorbestimmungen nach Neumann ausgeführt.

0,4461 g verbrauchen	4,16 ccm	n_{10} -Säure	= 1,30% N
0,7358 »	8,24 »	»	= 1,57% »
0,6941 »	6,9 »	»	= 1,39% »
0,3756 »	20,85 »	n_2 -NaOH	= 3,08% P
0,2667 »	15,33 »	»	= 3,18% »
0,4606 »	24,95 »	»	= 3,0% »

Im einzelnen gestalteten sich die Versuche folgendermaßen. Eine bekannte Menge der Lecithinverbindung wurde in einem mit Steigrohr versehenen Kolben mit einer abgemessenen Menge einer Schwefelsäure von bestimmter Konzentration übergossen, der Kolben in ein Wasserbad versenkt und unter häufigem Umschütteln eine gewisse Zeit der Temperatur des siedenden Wassers ausgesetzt. Die Substanz wurde alsbald flüssig und bedeckte als dunkelbraune ölige Masse die Oberfläche, klebte auch zum Teil an den Wandungen. Nach dem Erkalten wurde sie fest und bröckelig. Ich filtrierte nun und brachte mit Hilfe von Wasser und einem Glasstabe die bröckelige, schwammige Masse möglichst quantitativ auf das Filter. Die ablaufende Flüssigkeit war gelb, aber völlig klar. Der Filtrerrückstand wurde

¹⁾ Das Lecithin wurde von der Firma J. D. Riedel freundlichst zur Verfügung gestellt, wofür ich auch an dieser Stelle besten Dank sage.

in eine Reibschale gespritzt, mit dem Pistill fein zerrieben, wobei die Masse eine teigige Beschaffenheit annahm, und nach gründlichem Durcharbeiten mit Wasser wieder filtriert. Diese Operation wiederholte ich mehrmals, bis alle wasserlöslichen Bestandteile extrahiert waren, dampfte dann die vereinigten Filtrate ein und bestimmte in dem Rückstand den Stickstoff nach Kjeldahl. Folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die Versuche.

Lecithin-cadmiumchlorid		Schwefelsäure		Kochdauer in Stunden	Stickstoff im Filtrat	
Gesamtmenge in g	Stickstoffmenge in mg	in ccm	Konzentration in %		in mg	in % des Lecithinstickstoffs
0,968	13,75	50	40	5	13,37	97,2
1,420	14,40	50	40	4	13,58	94,3
0,968	13,75	50	20	5	13,72	99,8
1,420	14,40	50	20	4	13,65	94,8
0,968	13,75	50	10	5	13,72	99,8
0,968	13,75	50	10	4	13,72	99,8
1,420	14,40	50	10	4	13,58	94,3
0,956	13,58	50	10	3	12,80	94,3
1,420	14,40	25	10	3	13,13	91,2
0,956	13,58	25	10	3	12,21	89,8
0,956	13,58	50	10	2	12,20	89,8
1,420	14,40	25	10	2	13,06	90,7
0,956	13,58	25	10	2	11,90	87,6
1,420	14,40	25	10	1	11,65	80,9
1,420	14,40	50	2	4	12,20	84,9

Es ergibt sich aus diesen Versuchen, daß man zweckmäßigerweise zur Hydrolyse 10%ige Schwefelsäure in einer Menge, welche etwa das 50fache des angewendeten Lecithins beträgt, benutzt und 4 Stunden erhitzt. Die Abspaltung des Cholins erfolgt unter diesen Bedingungen offenbar vollständig. Der kleine Unterschied zwischen dem gefundenen und dem berechneten Wert erklärt sich aus der Schwierigkeit, den Niederschlag völlig auszuwaschen.

Nicht so quantitativ verläuft unter diesen Verhältnissen die Abspaltung der Phosphorsäure. Das ergibt sich aus zwei Versuchen, in denen je 0,956 g der Lecithinverbindung mit 50 ccm 10%iger Schwefelsäure 4 Stunden erhitzt wurden. Das Filtrieren der erkalteten Flüssigkeit und gründliche Auswaschen des Rückstandes geschah in der oben beschriebenen Weise. In den vereinigten Filtraten bestimmte ich nach dem Einengen und Veraschen mit Säuregemisch den Phosphor nach A. Neumann. Es wurden verbraucht in dem einen Versuche 41,63 ccm, in dem andern 41,45 ccm $\frac{n}{2}$ -NaOH, im Mittel also 41,54 ccm. Das entspricht 23,013 mg P. Da die angewendete Menge Lecithin 29,54 mg P enthielt, so wurden also 77,9% P wiedergefunden. Es war also fast der vierte Teil der Phosphorsäure (oder Glycerinphosphorsäure) der Abspaltung entgangen.

Um zu entscheiden, wieviel Phosphorsäure als Glycerinphosphorsäure vorhanden ist, habe ich einen weiteren Versuch angestellt, in dem aus dem Filtrat der hydrolysierten Flüssigkeit vor der Veraschung und Phosphorbestimmung die Phosphorsäure durch Baryumcarbonat entfernt worden war, so daß die gefundene Phosphormenge auf Glycerinphosphorsäure zu beziehen war.

3,8425 g Lecithinverbindung wurden in der bekannten Weise hydrolysiert, Filtrat und Waschwasser eingedampft und in einen Meßkolben von 300 ccm übergeführt. Nach Auffüllen mit Wasser bis zur Marke nahm ich zweimal je 50 ccm ab, versetzte mit Baryumcarbonat, filtrierte, wusch aus und bestimmte in dem eingeengten Filtrat nach vorausgegangener Veraschung und nach Zufügen ¹⁾ von je 10 ccm einer Natriumphosphatlösung von bekanntem Gehalt (entsprechend 18,85 ccm $\frac{n}{2}$ -NaOH) die Phosphormenge. Es wurden verbraucht in dem einen Versuche 23,75, in dem andern 24,5 ccm $\frac{n}{2}$ -NaOH. Das macht nach Abzug von 18,85 ccm 4,90 und 5,65 oder im Mittel 5,27 ccm = 2,92 mg P. Da die in Betracht kommende Lecithinmenge $\frac{3,8425}{6} = 0,6404$ g 19,79 mg P enthielt, so sind etwa 15% wiedergefunden. Die Hauptmenge der Phosphorsäure ist also als freie Phosphorsäure und nur ein kleiner Teil als Glycerinphosphorsäure in der hydrolysierten Flüssigkeit vorhanden.

Isolierung des Cholins aus dem Filtrat der hydrolysierten Flüssigkeit.

Zur Abscheidung benutzte ich entweder Sublimat, das meines Wissens zuerst von Brieger zur Abtrennung des Cholins verwendet wurde und das auch neuerdings gerade zu seiner Ge-

¹⁾ Dieser Zusatz geschah, da bei einem allzu geringen Phosphorsäuregehalt die Methode ungenau ist.

winnung aus dem durch Kochen mit Säure hydrolysierten Lecithin empfohlen worden ist, oder eine Kombination von Phosphorwolframsäure und Sublimat. Zur Wägung kam das Cholin als Cholinplatinchlorid.

Durch Phosphorwolframsäure wird die stickstoffhaltige Substanz aus der hydrolysierten Flüssigkeit nur zu 82% gefällt, wie aus folgenden Versuchen hervorgeht, während nach Kiesel¹⁾ reines Cholin durch Phosphorwolframsäure so gut wie quantitativ abgeschieden wird.

Es wurden zweimal je 1,9127 g der Lecithinverbindung mit 100 ccm 10%iger Schwefelsäure 4 Stunden lang erhitzt. Die abfiltrierte und mit dem Waschwasser vereinigte Flüssigkeit wurde auf etwa 100 ccm eingengt und mit 10%iger Phosphorwolframsäure unter Vermeidung eines Überschusses des Fällungsmittels ausgefällt, der Niederschlag abgesaugt und mit wenig 10%iger Schwefelsäure ausgewaschen. In dem Filtrat bestimmte ich den Stickstoff nach Kjeldahl. Es waren 3,3 und 3,7 ccm n_{10} -Säure erforderlich, was 4,62 und 5,18, im Mittel 4,90 mg N entspricht. Da die angewendete Menge Lecithin 27,16 mg N enthielt, so sind also im Filtrat 18% wiedergefunden oder 82% sind durch Phosphorwolframsäure gefällt worden.

Ein zweiter Versuch, in dem zweimal je 0,956 g Lecithincadmiumchlorid zur Verwendung kamen, wurde in derselben Weise durchgeführt, nur mit dem Unterschiede, daß eine konzentrierte Phosphorwolframsäurelösung zur Fällung diente. Bei der Kjeldahlbestimmung wurden 1,95 und 1,58 ccm n_{10} -Säure verbraucht, entsprechend 2,73 und 2,21, im Mittel 2,47 mg N. Die angewendete Menge Lecithin enthielt 13,58 mg N. So sind also 18,2% wiedergefunden oder 81,8% durch Phosphorwolframsäure gefällt worden.

Ich habe die Fällung mit Phosphorwolframsäure trotzdem einigemal angewendet in der Erwartung, daß vielleicht die durch sie bewirkte Entfernung anderer Substanzen der quantitativen Ausfällung des Cholins durch Sublimat zugute kommt.

Im einzelnen verfuhr ich in folgender Weise: Das Filtrat der hydrolysierten Flüssigkeit wurde in den Fällern, in denen

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. LIII, S. 218.

die Phosphorwolframsäurefällung unterblieb (Nr. 3, 4 und 5), durch Baryumcarbonat und Baryumhydroxyd von der Schwefelsäure befreit, das Filtrat mit Kohlensäure behandelt, wieder filtriert und nach Ansäuern mit etwas Schwefelsäure eingedampft. In den andern Fällen (Nr. 1 und 2) wurde es konzentriert, mit 10%iger Phosphorwolframsäure ausgefällt, der Niederschlag abfiltriert, ausgewaschen, mit Baryumhydroxyd zerlegt, das Filtrat durch Kohlensäure von Baryum befreit, wieder filtriert und nach Ansäuern mit Salzsäure eingedampft. Die Versuche 4 und 5 unterschieden sich dadurch von den andern, daß die hydrolysierte Flüssigkeit gleich nach dem Abfiltrieren vor der weiteren Behandlung durch Schwefelwasserstoff vom Cadmium befreit wurde.

In allen Fällen behandelte ich den Trockenrückstand mit absolutem Alkohol, filtrierte und fällte das Filtrat mit alkoholischer Sublimatlösung. Am nächsten Tag wurde abfiltriert, das Filtrat eingengt, der entstehende Niederschlag abfiltriert, mit dem ersten zusammen in heißem Wasser gelöst, die Lösung mit Schwefelwasserstoff behandelt. Das Filtrat vom Schwefelquecksilberniederschlag dampfte ich zur Trockene, nahm den Rückstand mit absolutem Alkohol auf, filtrierte und fällte mit alkoholischer Platinchloridlösung. Der Niederschlag wurde am nächsten Tag abfiltriert, getrocknet und gewogen. Um ihn als Cholinplatinchlorid zu charakterisieren, wurde eine Platinbestimmung ausgeführt.

Für den Versuch 1 diente die schon oben benutzte Chlorcadmiumverbindung mit 1,42% N, für die Versuche 2—5 die Chlorcadmiumverbindung eines aus frischem Eigelb hergestellten, in absolutem Alkohol leicht löslichen Lecithins mit 1,39% N.

0,8071 g verbrauchten 8,0 ccm n_{10} -H₂SO₄ = 1,39% N

0,5657 „ „ 5,6 „ „ = 1,39% „

Versuch 1. 7,4 g Lecithincadmiumchlorid (mit 1,42% N) wurden mit 370 ccm 10%iger Schwefelsäure 4 Stunden erhitzt. Phosphorwolframsäurefällung. Es wurden erhalten: 1,6438 g Cholinplatinchlorid statt der berechneten 2,31 g, also **71,2%**.

0,3139 g hinterließen beim Glühen 0,0988 g Platin = 31,47%.

Berechnet für Cholinplatinchlorid 31,63%.

Versuch 2. 3,5679 g Lecithincadmiumchlorid (mit 1,39% N) wurden mit 180 ccm 10%iger Schwefelsäure 4 Stunden erhitzt. Phosphorwolframsäurefällung. Es wurden erhalten: 0,7844 g Cholinplatinchlorid statt der berechneten 1,0908 g, also **71,91%**.

0,3157 g hinterließen beim Glühen 0,0994 g Platin = 31,49%.

Berechnet für Cholinplatinchlorid 31,63%.

Versuch 3. 2,845 g Lecithincadmiumchlorid (mit 1,39% N) wurden mit der etwa dreifachen Menge 35%iger Schwefelsäure 4½ Stunden erhitzt. Es wurden erhalten: 0,6642 g Cholinplatinchlorid statt der berechneten 0,8687 g, also **76,5%**.

0,3878 g hinterließen beim Glühen 0,1234 g Platin = 31,82%.

Berechnet für Cholinplatinchlorid 31,63%.

Versuch 4. 1,4952 g Lecithincadmiumchlorid (mit 1,39% N) wurden mit 75 ccm 10%iger Schwefelsäure 4½ Stunden erhitzt. Es wurden erhalten: 0,3507 g Cholinplatinchlorid statt der berechneten 0,4574 g, also **76,7%**.

0,3103 g hinterließen beim Glühen 0,1004 g Platin = 32,32%.

Berechnet für Cholinplatinchlorid 31,63%.

Versuch 5. 1,8147 g Lecithincadmiumchlorid (mit 1,39% N) wurden mit 5,5 ccm 35%iger Schwefelsäure 4½ Stunden erhitzt. Es wurden erhalten: 0,4425 g Cholinplatinchlorid statt der berechneten 0,5542 g, also **79,8%**.

0,3096 g hinterließen beim Glühen 0,0970 g Platin = 31,33%.

Berechnet für Cholinplatinchlorid 31,63%.

Die Fällung mit Phosphorwolframsäure erwies sich also als unzweckmäßig. Die bei ihrer Anwendung erhaltenen Resultate waren etwa 6% niedriger. Bei den übrigen Versuchen wurden im Mittel 77,7% der aus dem Stickstoffgehalt berechneten Menge Cholin erhalten. Die Ausbeute betrug also fast das Doppelte der bei der Spaltung mit Barytwasser gewonnenen.¹⁾

¹⁾ Eine Fortsetzung dieser Untersuchung bringt die folgende Arbeit von Dr. MacLean.