

Versuche über den Cholingehalt des Herzmuskellecithins.

Von

Hugh MacLean M. D., Carnegie Research Fellow.

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

(Der Redaktion zugegangen am 22. August 1908.)

In einer vor kurzem erschienenen Mitteilung¹⁾ konnte ich zeigen, daß bei der Spaltung von Lecithin-Riedel, welches von beigemengtem Ammoniumchlorid befreit und dessen Phosphor-Stickstoffverhältnis wie 1 : 1,08 war, mit Baryt in alkoholischer und wässriger Lösung 77—78% seines Stickstoffs als Cholinstickstoff erhalten werden konnte. Von den fehlenden 22—23% ließ sich feststellen, daß 8,5% in dem Barytniederschlag verblieben und 1—2% sich verflüchtigten. Das nun noch bleibende Defizit erklärte sich durch die Unvollständigkeit der Fällung des Cholins als Cholinplatinchlorid in genügender Weise. Es ergab sich also, daß in dem Lecithin-Riedel aller Stickstoff als Cholinstickstoff angesehen werden muß.

Ich habe inzwischen diese Versuche der quantitativen Cholinbestimmung auf reine Phosphatide ausgedehnt und berichte im folgenden über die beim Herzmuskellecithin erhaltenen Resultate.

Darstellung. Die Darstellung dieses Phosphatids geschah aus Ochsenherzen genau nach der präzisen Vorschrift von Erlandsen.²⁾ Ich konnte die Angaben dieses ausgezeichneten Forschers in allen wesentlichen Punkten bestätigen. Kleine unwichtige Abweichungen, die ich beobachtete, erklären sich ohne weiteres aus der im einzelnen Fall ja niemals ganz gleichen Zusammensetzung des Ausgangsmaterials.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. LV, S. 360.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. LI, S. 71.

Das Lecithin stellte eine orangegefärbte, sehr hygroskopische Masse dar, welche auch im trockenen Zustande eine leicht klebrige Beschaffenheit behielt und sich nicht pulverisieren ließ. Es ist in Alkohol und Äther löslich und wird aus seiner Lösung durch Aceton gefällt.

Die Analysen gaben folgende Werte:

1. 0,1747 g lieferten 0,4234 g CO₂ und 0,1641 g H₂O,
das ist 66,12% C und 10,44% H.
2. 0,1925 g lieferten 0,4688 g CO₂ und 0,1784 g H₂O,
das ist 66,41% C und 10,20% H.
3. 0,5232 g verbrauchten 6,9 ccm n/10-Säure = 1,84% N
4. 0,4134 » » 5,5 » » = 1,86% »
5. 0,3872 » » 27,22 » n/2-Säure = 3,9% P
6. 0,2918 » » 21,37 » » = 4,05% »

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	Mittel	Mittel der Analysen von Erlandsen
C	66,12	66,41	—	—	—	—	66,27	66,29
H	10,44	10,20	—	—	—	—	10,32	10,17
N	—	—	1,84	1,86	—	—	1,85	1,87
P	—	—	—	—	3,9	4,05	3,975	3,95

$$N : P = 1 : 1,03.$$

Spaltung in alkoholischer Lösung. In den ersten Versuchen, welche Aufschluß über die Verteilung des Stickstoffs bei der Hydrolyse geben sollten, kochte ich das Lecithin (0,3 bis 0,7 g) mit 100 ccm Methylalkohol und 5 g Ätzbaryt wechselnde Zeit (2—4 Stunden) am Rückflußkühler, goß nach einigem Stehen die klare überstehende Flüssigkeit durch ein Filter, kochte den im Kolben bleibenden Rückstand 5 Minuten mit 80—100 ccm Methylalkohol, ließ absitzen, filtrierte durch dasselbe Filter und wiederholte den ganzen Prozeß noch zweimal. Darauf wurde in dem ungelösten Anteil und in dem Rückstand der vereinigten Filtrate der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt. Durch Abzug dieser beiden Werte vom Gesamtstickstoff des benutzten Lecithins erfährt man die Menge Stickstoff, welche sich verflüchtigt hat. Die folgende Tabelle 1 enthält die absoluten und relativen Werte.

Tabelle 1.

Nr.	Eingeführt		Kochdauer in Stunden	Gefundener Stickstoff		Verflüchtigter Stickstoff Differenz zwischen eingeführtem u. gefundenem mg	Stickstoff in % des eingeführten			
	Lecithin g	Lecithinstickstoff mg		im Filtrat mg	im Rückstand mg		im Filtrat	im Rückstand	verflüchtigt	
1	0,4393	8,12	2	6,58	0,58	0,96	80,8	7,1	11,8	
2	0,6721	12,43	3	9,81	0,76	1,86	79,5	6,1	14,9	
3	0,3114	5,76	3	4,69	0,54	0,53	81,3	9,4	9,2	
4	0,4219	7,8	4	6,02	0,49	1,29	77,2	6,3	16,5	
Mittel								79,70	7,2	13,1

Ein Vergleich der Resultate mit den bei der Hydrolyse des Lecithin-Riedel erhaltenen zeigt, daß bei dem Herzmuskellecithin der flüchtige Stickstoff größer ist (13,1 gegen 1,7%), der Filtratstickstoff kleiner (79,70 gegen 89,6%), während der Rückstandstickstoff ungefähr der gleiche ist (7,2 gegen 8,5%).

Weiter suchte ich festzustellen, wie viel Cholin aus dem Filtrat erhalten werden kann. Die Ausführung der Versuche war zunächst die oben beschriebene. Die vereinigten Filtrate wurden etwa auf 100 ccm eingeengt, mit Salzsäure angesäuert, vorsichtig erhitzt, nach dem Erkalten filtriert und zur Trockene verdunstet. Der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen, die Lösung filtriert, eingedampft, der Rückstand in wenig absolutem Alkohol aufgenommen und die filtrierte und auf ein kleines Volumen eingeengte Flüssigkeit mit alkoholischem Platinchlorid gefällt. Am nächsten Tage wurde der Niederschlag abfiltriert, ausgewaschen, getrocknet und gewogen. Außerdem bestimmte ich in diesen Versuchen auch den in dem unlöslichen Gemenge der Baryumsalze vorhandenen Stickstoff. Die Tabelle 2 enthält die Resultate.

Bei der Betrachtung der Tabelle fällt die geringe Menge des erhaltenen Cholins auf. Während in den früheren Versuchen mit Lecithin-Riedel im Durchschnitt 77,3% des Stick-

stoffs als Cholinstickstoff gefunden wurde, beträgt hier die Menge im Durchschnitt der 4 ersten Versuche nur 41,4 und im Durchschnitt aller Versuche sogar nur 37,3%. Ferner ist das erhaltene Cholin offenbar nicht ganz rein, wie aus den Platinbestimmungen hervorgeht. Für diese Bestimmungen wurden die aus den Versuchen 1—4, 6 und 7 sowie 9 und 10 erhaltenen Platinate vereinigt und auf ihren Platingehalt untersucht. Die erste Portion enthielt 31,9%, die zweite 32,3% und die dritte 31,7% Pt. Da Cholinplatinchlorid 31,64% Pt liefert, so ist nur die Portion 3 als rein anzusehen, die beiden andern und besonders die Portion 2 sind durch ein Platinsalz mit einem höheren Platingehalt verunreinigt. Weiterhin ist zu bemerken, daß bei über 4 bis 5 Stunden fortgesetztem Kochen die Ausbeute an Cholin sinkt. Auch das steht nicht im Einklang mit den beim Lecithin-Riedel gemachten Beobachtungen. Hier hatte längeres Kochen (bis zu 10 Stunden) keinen Einfluß auf die Menge des Cholins.

Tabelle 2.

Nr.	Eingeführt		Kochdauer in Stunden	Im Rückstand gefundener Stickstoff		Im Filtrat gefundenes Cholinplatinchlorid	
	Leci- thin g	Leci- thin- stick- stoff- mg		in mg	in % des ein- geführten	in g	in % des aus dem ein- geführten Stickstoff berechneten
1	0,5231	9,68	2	0,616	6,4	0,0879	41,3
2	0,4875	9,01	2	0,546	6,0	0,0792	40,0
3	0,5916	10,94	3	0,630	5,8	0,1015	42,2
4	0,4757	8,8	3	0,490	5,6	0,0810	42,0
Mittel aus 1—4					5,95		41,4
5	0,6218	11,50	5	0,686	5,9	0,0989	39,1
6	0,8311	15,37	5½	0,798	5,2	0,1330	39,4
7	0,7621	14,09	7	0,546	3,9	0,1078	34,8
8	0,5214	9,64	7½	0,504	5,2	0,0754	35,6
9	0,6514	12,05	10	0,560	4,6	0,0994	37,5
10	0,6566	12,15	10	0,588	4,8	0,0894	33,5
Mittel aus allen Versuchen . .					5,08		37,3

Die folgenden Versuche hatten den Zweck, festzustellen, wie viel des Filtratstickstoffs als Cholinstickstoff vorhanden ist oder richtiger erhalten wird. Die Menge ließ sich zwar aus den in den Tabellen 1 und 2 enthaltenen Werten berechnen (die Rechnung ergibt unter Benutzung der Versuche 1—4 der Tabelle 2 52,2%), ich habe es indessen vorgezogen, noch einige direkte Experimente nach dieser Richtung anzustellen.

Ungefähr 1 g Lecithin wurde mit methylalkoholischer Barytlösung 3 Stunden am Rückflußkühler gekocht, die Flüssigkeit filtriert, das Filtrat eingeeengt und mit überschüssigem Aceton*) versetzt. Es entstand ein geringer flockiger Niederschlag, welcher nach einigem Stehen im Eisschrank abfiltriert wurde. Das Filtrat wurde nun eingeeengt und weiter, wie auf Seite 298 angegeben, verfahren. Die in der dort geschilderten Weise gewonnene alkoholische Lösung dampfte ich nochmals ein, nahm den Rückstand wieder in absolutem Alkohol auf, filtrierte und brachte das Filtrat durch Zusatz von absolutem Alkohol auf etwa 55 ccm. Von diesen wurden in einer Burette je 25 ccm abgemessen. Der eine Teil floß direkt in den Kjeldahl-Kolben und wurde auf seinen Stickstoffgehalt untersucht, der andere floß in ein kleines Becherglas, wurde eingeeengt und zu einer Cholinbestimmung benutzt. In dieser Weise wurden die Versuche 1—5 der Tabelle 3 ausgeführt; die Versuche 6 und 7 ebenso nur unter Weglassung der Acetonfällung. In den Versuchen 8 und 9 dampfte ich die Filtrate von den Baryumsalzniederschlägen bei alkalischer Reaktion ohne Zusatz von Salzsäure vorsichtig ein, nahm den Rückstand mit Alkohol auf, dampfte das Filtrat auf Zusatz von Salzsäure wieder ein usw. wie oben abgegeben. Auf diese Weise wurde die Glycerinphosphorsäure entfernt. Die Resultate waren in diesen Versuchen dieselben, wie in den anderen, woraus hervorgeht, daß die Anwesenheit der Glycerinphosphorsäure die Ausfällung des Cholinplatinchlorids nicht nachweisbar hindert.

*) Es geschah das in dem Gedanken, so vielleicht eine Entfernung anderer Stoffe, z. B. unveränderter Phosphatidreste, erreichen zu können.

Tabelle 3.

	Stickstoff gefunden in mg	Cholinplatinchlorid		
		gefunden in g	aus dem ge- fundenen Stick- stoff berechnet in g	von der be- rechneten Menge gefunden in %
1	5,60	0,0619	0,1230	50,3
2	7,70	0,0864	0,1692	51,1
3	5,88	0,0648	0,1292	50,2
4	8,596	0,0983	0,1888	52,1
5	7,14	0,0786	0,1569	50,1
6	5,04	0,0566	0,1108	51,1
7	5,74	0,0624	0,1261	49,5
8	3,78	0,0408	0,0830	49,2
9	2,80	0,0314	0,0615	51,0
Mittel				50,5

Für die Platinbestimmungen wurden die aus den Versuchen 1—3 erhaltenen Mengen vereinigt, ebenso die aus den Versuchen 4 und 5 sowie 6 und 7 erhaltenen. Die erhaltenen Werte betragen für die erste Portion 31,79%, für die zweite 31,93% und für die dritte 31,79% Pt. Also auch hier lag kein ganz reines Cholinplatinchlorid vor.

Zur Kontrolle habe ich dann noch genau in der oben beschriebenen Weise zwei Versuche mit Lecithin-Riedel durchgeführt und dabei 92,3 und 91,2% des Filtratstickstoffs als Cholinstickstoff erhalten. Das steht in bester Übereinstimmung mit meinen früheren Ergebnissen; ja die erhaltenen Werte sind sogar noch etwas höher als die damaligen.

Spaltung in wässriger Lösung. 0,4—0,8 g Lecithin wurden in einem Mörser mit Ätzbaryt gründlich verrieben und nach Zufügen der für Herstellung einer gesättigten Barytlösung nötigen Wassermenge in einem Kolben am Rückflußkühler verschieden lange gekocht unter besonders im Beginn des Erhitzens häufigem Umschütteln. Die weitere Behandlung geschah in der für die Darstellung des Cholins üblichen Weise, die

Bestimmung des Cholins weiter als Cholinplatinchlorid. Außerdem wurde auch in diesen Versuchen der im Gemenge der unlöslichen Baryumsalze verbleibende Stickstoff ermittelt.

Die Resultate sind in Tabelle 4 enthalten.

Tabelle 4.

Nr.	Eingeführt		Kochdauer in Stunden	Im Rückstand gefundener Stickstoff		Im Filtrat gefundenes Cholinplatinchlorid	
	Leci- thin g	Leci- thin- stick- stoff mg		in mg	in % des einge- führten	in g	in % des aus dem ein- geführten Stickstoff berechneten
1	0,4227	7,81	2	0,770	9,86	0,0634	37,0
2	0,5244	9,70	4	0,798	8,23	0,0856	40,1
3	0,7678	14,20	5	—	—	0,1330	42,63
4	0,6820	12,61	7	—	—	0,1085	39,16
5	0,4132	7,64	10	—	—	0,0676	40,26
6	0,3411	6,31	3	0,448	7,1	—	—
7	0,4420	8,17	4	0,672	8,22	—	—
8	0,4122	7,62	3	0,686	9,0	—	—
Mittel					8,48		39,83

Die erhaltenen Werte entsprechen den bei der alkoholischen Spaltung gewonnenen (siehe Tabelle 2), nur der Rückstandstickstoff ist um einige Prozente höher.

Was die Menge des Filtratstickstoffes betrifft, so konnte ich aus Mangel an Material allerdings nur eine Bestimmung ausführen. Diese ergab genau denselben Wert (79,9 %), wie bei der alkoholischen Spaltung (Tabelle 1), und ebenso wurde das Verhältnis zwischen Gesamtstickstoff und Cholinstickstoff im Filtrat ganz entsprechend dem bei der alkoholischen Spaltung ermittelten festgestellt, wie folgende beiden Versuche (Tabelle 5) zeigen. Die Kochdauer betrug 3 Stunden, die Ausführung schließt sich der auf S. 300 beschriebenen an.

Aus den Spaltungsversuchen in alkoholischer und wässriger Lösung geht übereinstimmend hervor, daß von dem Gesamtstickstoff des Herzlecithins nicht mehr als 42,6, im Durchschnitt

38,56 ‰, und von dem bei der Spaltung in Lösung gehenden Stickstoff des Herzlecithins nicht mehr als 52, im Durchschnitt 50,84 ‰ als Cholinstickstoff erhalten werden.

Tabelle 5.

Nr.	Stickstoff gefunden in mg	Cholinplatinchlorid		
		gefunden in g	aus dem gefundenen Stickstoff berechnet in g	von der berechneten Menge gefunden in ‰
1	2,59	0,0295	0,057	51,75
2	3,22	0,0358	0,0707	50,6
Mittel				51,18

Von großem Interesse ist es nun, daß Erlandsen¹⁾ bei der Spaltung des Herzlecithins dieselbe Menge Cholin erhielt, nämlich 42 ‰.

Wenn auch die tatsächlich vorhandene Cholinmenge etwas größer ist, als die mit der nicht ganz quantitativen Bestimmungsmethode ermittelten, so bleibt doch immer ein Fehlbetrag von 30—40 ‰, zu dessen Erklärung man wohl zunächst an das Vorhandensein eines zweiten stickstoffhaltigen Atomkomplexes im Herzlecithin denken wird.

Ich bin mit weiteren Untersuchungen über diese Frage beschäftigt.

Desgleichen sind Untersuchungen über das Cuorin und die Phosphatide des Eigelbs in bezug auf die basischen Bestandteile im Gange.

Die Kosten dieser Arbeit wurden von dem Carnegie-Trust bezahlt.

¹⁾ a. a. O. S. 113.