

Ein neues Verfahren zur Abtrennung von Äthanolamin (Colamin) aus Phosphatidhydrolysaten.

Von

H. Thierfelder und Otto Schulze.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen.)

(Der Redaktion zugegangen am 2. Dezember 1915.)

Die Isolierung des Äthanolamins (Colamins) aus dem Hydrolysat von Phosphatiden gelang G. Trier¹⁾ in der Weise, daß er nach Entfernung von Fettsäuren, Glycerinphosphorsäure und Zersetzungsprodukten eine absolut-alkoholische Lösung der Basenchloride herstellte und aus dieser durch Fällung mit Sublimat und Platinchlorid das Cholin fällte. Das vom Metall befreite Filtrat wurde eingeengt, der Rückstand im Exsikkator getrocknet, in starker Salzsäure gelöst und diese Lösung mit sehr konzentrierter Goldchloridlösung versetzt. Es krystallisierte das Goldsalz des Colamins aus. Diese Methode, insbesondere die schließliche Abscheidung als Goldsalz ist auch die von andern Untersuchern benutzte.

Das Goldsalz hat ein ausgezeichnetes Krystallisationsvermögen. Aus reinen Colaminchloridlösungen läßt sich die Base nahezu quantitativ in Form des Aurates gewinnen. So erhielten wir beim Versetzen einer Lösung von Colaminchlorid (enthaltend 13,79 mg N) in konzentrierter Salzsäure mit einer konzentrierten Lösung von Goldchlorid in Salzsäure zunächst 255 mg Aurat = 64,6% der theoretischen Menge; aus der Mutterlauge wurden noch 103 mg = 26,1% und aus der Mutterlauge von dieser Krystallisation noch 26 mg = 6,6% erhalten, im ganzen also 384 mg statt der berechneten 395 mg, d. h. 97%. Alle 3 Krystallisationen hatten den richtigen Schmelzpunkt (188—189°).

Aus Phosphatidhydrolysaten ist es bisher nicht gelungen, das Colamin in einer dem vorhandenen Aminostickstoff entsprechenden Menge zu isolieren. Während man aus den Hy-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 76, S. 496 (1911/12).

drolysaten nach Entfernung von Fettsäuren, Glycerinphosphorsäure und Cholin bis zu 52%,¹⁾ 76,4%²⁾ und 58%³⁾ des Aminostickstoffs als Colamingoldchlorid gewinnen konnte, war die Ausbeute bezogen auf den vor der Entfernung dieser Spaltungsprodukte oder den nach ihrer teilweisen Entfernung vorhandenen Aminostickstoff eine viel geringere. Diese Ergebnisse können bedingt sein durch Verluste, welche bei den vielfachen Fällungen usw. auf mechanische Weise entstanden sind, und durch die Unvollständigkeit der Abscheidung des Colamins als Aurat in unreinen Lösungen, aber auch dadurch, daß in den Phosphatiden das Colamin nicht das einzige Spaltungsprodukt ist, welches Aminostickstoff enthält. Natürlich können auch beide Momente zusammen wirken.

Für den weiteren Fortschritt auf dem Gebiet der Phosphatidforschung ist der Besitz einer quantitativen Bestimmungsmethode des Colamins höchst erwünscht.

Unsere Bemühungen richteten sich deshalb auf das Auffinden eines womöglich quantitativen Verfahrens.

Wir gingen aus von der Angabe Knorrs,⁴⁾ daß Äther ungefähr 1% Colamin zu lösen vermag. Schon beim Ausschütteln einer ganz konzentrierten mit Natronlauge versetzten Colaminchloridlösung mit Äther gelingt es, die Base in ätherische Lösung überzuführen. Die Ausbeute betrug nach energischem und längere Zeit fortgesetztem Schütteln in geschlossener Flasche 29%. Die Bestimmung geschah nach v. Slyke, nachdem der abfiltrierte Äther mit Salzsäure geschüttelt und verdunstet und der Rückstand mit Natronlauge alkalisch und dann mit Essigsäure sauer gemacht worden war. Bei viermaliger Wiederholung mit jedesmal neuem Äther wurden dann insgesamt noch 33,7% erhalten. Eine 5. und 6. Ausschüttelung nach Zusatz von Kochsalz ergab nur noch 2,5%, so daß die Gesamtausbeute 65,2% betrug. Bei diesen Opera-

¹⁾ Trier, Diese Zeitschrift, Bd. 86, S. 151 (1913).

²⁾ Trier, Ebenda, Bd. 86, S. 161 (1913).

³⁾ Baumann, Biochem. Zeitschr., Bd. 54, S. 37 (1913); Parnas, Ebenda, Bd. 56, S. 20, Fußnote 4 (1913).

⁴⁾ Chem. Ber., Bd. 30, S. 909 (1897).

tionen hatte sich eine erhebliche Menge des Colamins verflüchtigt, denn am Schluß wurden in der wässerigen Lösung nur noch 5,6% wiedergefunden.¹⁾ Viel schlechter noch waren die Ergebnisse bei der Extraktion im Lindschen Apparat. Es wurden hier innerhalb mehrerer Stunden nur 10,4% ausgezogen.

Um die Ausbeute zu verbessern, mußte das Wasser entfernt werden. Zu dem Zweck ließen wir auf eine sehr konzentrierte wässerige Lösung von Colaminchlorid, die sich in einer kleinen, in kaltem Wasser stehenden Schale befand, eine kleine Menge reines Calciumoxyd einwirken und erreichten dadurch eine Bindung des Wassers und gleichzeitig eine Freisetzung der Base. Der Schaleninhalt wurde zu einem lockern Pulver zerdrückt und zerrieben und in eine Papierhülse²⁾ gebracht. Die letzten Reste ließen sich leicht mit Papierstückchen quantitativ zusammenwischen; diese kamen ebenfalls in die Hülse. Die Extraktion mit Äther geschah in einem ganz aus Glas hergestellten Soxhlet-Apparate, in dessen Kolben eine gemessene Menge $n/10$ -Schwefelsäure eingebracht worden war.³⁾ Nach Beendigung der Extraktion wurde der Äther verdunstet und die Flüssigkeit mit $n/10$ -Lauge zurücktitriert. In den meisten Fällen schloß sich eine Bestimmung nach v. Slyke an. Dazu wurde der Kolbeninhalt bei schwefelsaurer Reaktion eingedampft und der essigsauer gemachte Rückstand in den Apparat von v. Slyke eingebracht.

Die Tabelle enthält die Ergebnisse, in sie sind von den Versuchen mit kürzerer Extraktionsdauer nur einige, von

¹⁾ Auf die beträchtliche Flüchtigkeit des Colamins mit Ätherdämpfen macht schon Knorr aufmerksam.

²⁾ Die Papierhülsen waren durch mehrfaches Übereinanderwickeln von Filtrierpapier um ein Glasrohr und Zusammendrehen des untersten Teils hergestellt. Der zusammengedrehte Teil war noch umgeschlagen und mit Bindfaden umwickelt, so daß ein Durchsickern von Calciumoxyd nicht stattfinden konnte. Die Hülsen waren, ebenso wie die zum Auswischen der Schale benutzten Papierstückchen vor dem Gebrauch stundenlang mit Äther extrahiert worden.

³⁾ Die Einführung von Säure ist durchaus nötig, um die extrahierte Base sofort zu binden. Tut man das nicht, so entstehen erhebliche Verluste.

denen mit längerer alle, welche in der oben beschriebenen Weise ausgeführt worden sind, aufgenommen.

Tabelle 1.

	Eingeführt wurde Colamin in mg N	Dauer der Extraktion in Stunden	Im Äther wurde gefunden N			
			durch Titration		nach van Slyke	
			in mg	in % des eingef. N	in mg	in % des eingef. N
1	6,66	4	50,02	76,6	—	—
2	26,84	4	16,49	61,4	—	—
3	7,5	6	6,01	80,1	—	—
4	6,66	8	6,01	90,2	—	—
5	7,5	12	5,91	78,8	—	—
6	15,0	12	13,87	92,5	14,23	94,9
7	15,04	12	14,27	94,9	—	—
8	7,52	13	7,31	97,2	—	—
9	7,5	14	6,93	92,4	—	—
10	7,5	14	7,1	94,7	6,91	92,1
11	7,52	14	7,2	95,7	—	—
12	15,0	14	13,23	88,2	13,34	88,9
13	15,0	14	13,92	92,8	14,21	94,7
14	7,5	23	7,0	93,3	7,05	94,0
15	15,0	23	14,0	93,3	14,06	93,7
16	15,0	23	14,25	95,0	14,42	96,1
17	3,15	24	3,02	96,0	3,01	95,6
18	6,66	24	6,30	94,6	6,29	94,4
19	6,85	24	6,82	99,6	—	—
20	13,33	24	13,29	99,7	13,06	98,0
21	15,0	25	13,83	92,2	14,11	94,1
22	6,3	27	5,88	93,3	6,05	96,0
23	9,45	27	9,13	96,6	9,16	96,9
24	12,6	27	12,04	95,6	12,26	97,3

Man sieht aus der Tabelle, daß die Extraktion viele Stunden fortgesetzt werden muß und auch nach 27 Stunden noch keine ganz vollständige ist. Wir haben versucht, sie zu beschleunigen und zu einer quantitativen zu machen, indem

wir das Pulver ganz fein zerrieben, es durch Zufügen von mehr Kalk, von Sand, von Schmirgel verdünnten und es durch Untermischen mit feinem Asbest auflockerten, aber ohne Erfolg. Im Gegenteil machte es den Eindruck, daß durch alle diese Maßnahmen die Ausbeute eher verschlechtert wurde. Das nicht in den Äther übergegangene Colamin findet sich fast vollständig in der Hülse. Wir stellten das fest, indem wir die 3 Hülsen der Versuche 22—24, in denen zusammen 28,35 mg N eingeführt worden waren, nach der 27stündigen Extraktion mit Äther, bei der zusammen 27,47 mg N = 96,9% gelöst worden waren, mit Wasser auszogen, den Auszug nach Ansäuern mit Salzsäure eindampften und den mit Natronlauge alkalisch, dann mit Essigsäure sauer gemachten Rückstand nach v. Slyke untersuchten. Es wurden 0,703 mg N = 2,48% gefunden. Wenn sich also etwas Colamin verflüchtigt haben sollte, so kann es sich nur um Spuren handeln: 0,1745 mg = 0,62%.

Cholin in gleicher Weise behandelt wird auch nicht in kleinster Menge von Äther extrahiert. In zwei Versuchen, in denen Mengen von Cholinchlorid, welche 5,2 und 5,32 mg N enthielten, mit Kalk behandelt und dann 3 bzw. 12 Stunden mit Äther extrahiert wurden, ergab die Untersuchung des Ätherrückstandes nach Kjeldahl ein völlig negatives Resultat.

Das Cholinchlorid reagiert nicht mit Kalk und kann als solches aus der Hülse quantitativ wieder gewonnen werden, wenn man sie im Soxhlet-Apparat mit Alkohol extrahiert. Wir benutzten zu dem Zweck denselben Apparat. Der Kolben wurde zur Hälfte in ein kochendes Wasserbad versenkt und sein oberer Teil und das Extraktionsgefäß mit einem Tuch umwickelt. Von 5,21 mg Cholinstickstoff, welche in den Versuch eingeführt worden waren, wurden nach dreistündiger Extraktion im Alkohol nach Kjeldahl 103%, von 5,32 mg ebenfalls nach dreistündiger Extraktion 99,4% wiedergefunden.

Es folgten jetzt Versuche, mittels des Kalkätherverfahrens Cholin und Colamin quantitativ zu trennen und zu bestimmen. Der Hülseninhalt, welcher bekannte Mengen beider Basen enthielt, wurde zunächst mit Äther und dann mit Alkohol extrahiert. Die Ermittlung der in den Äther gegangenen Colamin-

menge geschah durch Titration und nach v. Slyke, die Ermittlung der vom Alkohol ausgezogenen Cholinmenge teils durch Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl (Tabelle 2a), teils durch Fällung mit Sublimat und Wägung als Chlorid (Tabelle 2b). Im letzteren Fall verfahren wir so: Der Alkohol wurde in eine Schale überführt, nach Zufügen einiger Tropfen Salzsäure verdunstet, der Rückstand im Vakuum getrocknet, mit absolutem Alkohol aufgenommen, die alkoholische Lösung nach hinreichender Konzentration mit alkoholischer Sublimatlösung gefällt, die Fällung am nächsten Tage abfiltriert, mit Alkohol gewaschen, in Wasser zerteilt und mit Schwefelwasserstoff behandelt. Die von Schwefelquecksilber abfiltrierte Flüssigkeit wurde eingedampft, der Rückstand nochmals mit absolutem Alkohol aufgenommen, das Filtrat im Wägegläschen verdunstet und im Vakuum getrocknet. Nach 8 Tagen war Gewichtskonstanz erreicht. Die so gewonnene Substanz (Cholinchlorid) war kristallinisch, farblos und in absolutem Alkohol völlig klar löslich.

Tabelle 2a.

	Eingeführt wurde Colamin in mg N	Dauer der Extraktion in Stund.	Im Äther wurde wiedergefunden N				Eingeführt wurde Cholin in mg N	Dauer der Extraktion in Stund.	Im Alkohol wurde wiedergefunden nach Kjeldahl	
			durch Titration in mg	in % des eingef. N	nach v. Slyke in mg	in % des eingef. N			in mg	in % des eingef. N
1	3,15	21	3,08	97,8	3,13	99,4	16,24	5	15,12	93,1
2	12,6	24	12,18	96,7	12,39	98,3	16,24	5	15,69	96,6

Tabelle 2b.

	Eingeführt wurde Colamin in mg N	Dauer der Extraktion in Stund.	Im Äther wurde wiedergefunden N				Eingeführt wurde Cholinchlorid in mg	Dauer der Extraktion in Stund.	Aus d. Alkohol wurde wiedergewonnen Cholinchlorid	
			durch Titration in mg	in % des eingef. N	nach v. Slyke in mg	in % des eingef. N			in mg	in %
3	6,3	26	6,08	96,5	6,03	95,7	79,09	5	80,9	102,3
4	9,45	26	8,93	94,5	8,93	94,5	79,09	5	75,6	95,6
5	9,45	26	9,10	96,3	9,20	97,4	79,09	5	74,6	94,3

Es handelte sich nun noch darum, eine Verbindung des Colamins zu finden, die zur quantitativen Bestimmung und Identifizierung dieser Base geeignet ist. Wir haben verschiedene Salze des Colamins darauf hin geprüft, am brauchbarsten erwies sich das Pikrolonat. Dieses Salz ist zuerst von Knorr dargestellt und untersucht worden. Er macht folgende Angaben: «Es löst sich erst in ca. 100 Teilen heißen und in ca. 400—500 Teilen kalten Alkohols. Aus wässriger Lösung läßt sich Äthanolamin noch bei sehr großer Verdünnung (aus 3—4%iger Lösung) sehr gut in Form dieses Salzes abscheiden. Es schmilzt unter Schwarzfärbung und Zersetzung sehr rasch erhitzt bei ca. 225°, langsam erhitzt bei ca. 220°. Es krystallisiert in büschelförmig verwachsenen Nadeln mit charakteristischer Zwillingsbildung».

Es war zu erwarten, daß es in Äther und in wenig Alkohol enthaltendem Äther ganz unlöslich ist. Um das festzustellen, versetzten wir eine alkoholische Colaminlösung von bekanntem Gehalt mit dem vielfachen Volumen Äther, fügten eine alkoholisch-ätherische Pikrolonsäurelösung (1 g Pikrolonsäure in 250 ccm 8% Alkohol enthaltendem Äther) in überschüssiger Menge hinzu, filtrierten den entstandenen Niederschlag durch ein gewogenes Filter, wuschen mit Äther aus und wogen nach dem Trocknen im Vakuum. Die Ergebnisse waren stets zu hohe. Da dieser Mehrbetrag wohl nur durch auskrystallisierte Pikrolonsäure verursacht sein konnte, so benutzten wir weiterhin zum Auswaschen Äther, welcher 12—20% Alkohol enthielt.

Tabelle 3.

Colamin- menge in mg N	Gelöst in Alkohol ccm	Äther- zusatz ccm	Pikro- lonsäure- lösung ccm	Waschäther- alkohol		Erhaltene Pikro- lonatmenge	
				ccm	Gehalt an Alkoh. %	in mg	in % der berechn. Menge
3,03	1	25	20	100	20	71,7	102
6,06	2	25	40	100	20	144,8	103
3,03	1	25	20	100	12	71,8	102
6,06	2	25	40	100	12	148,5	105,5
12,12	4	46	80	50	12	292,1	103,9
12,12	4	46	160	50	12	292,2	103,9
5,71	2	48	40	50	12	133,0	100,4
5,71	2	48	40	50	12	135,1	102,0
5,95	2	48	40	50	12	139,1	100,7

Wie man sieht, sind die gefundenen Versuche auch jetzt noch etwas zu hoch, jedenfalls infolge beigemengter Pikrolonsäure. Indessen stimmten die Schmelzpunkte mit den von Knorr angegebenen überein. Beim langsamen Erhitzen schmolzen die Substanzen bei 218 oder 219°, bei schnellem bei 225, 226 oder 227°, stets scharf und unter Schwarzfärbung und Zersetzung. Aus Alkohol krystallisierten die von Knorr beschriebenen Formen mit den Zwillungsbildungen. Bei der Analyse machte sich die beigemengte Pikrolonsäure durch die etwas zu hohen Kohlenstoff- und Wasserstoffwerte bemerkbar.

0,1885 g Substanz : 0,3085 g CO₂, 0,0835 g H₂O
 0,1588 „ „ : 0,2602 „ CO₂, 0,0706 „ H₂O

C₁₂H₁₅N₃O₆. Ber.: C 44,28 H 4,65
 Gef.: C 44,63 H 4,95
 C 44,69 H 4,97

Nachdem sich so das Colaminpikrolonat als eine für unsere Zwecke geeignete Verbindung erwiesen hatte, haben wir die oben beschriebenen Trennungs- und Bestimmungsversuche wiederholt nur mit dem Unterschied, daß in den Kolben des Soxhlet-Apparates statt Äther und titrierter Säure eine ätherische Pikrolonsäurelösung¹⁾ kam. Nach Beendigung der Ätherextraktion wurde das ausgeschiedene Pikrolonat durch gewogenes Filter filtriert, mit 50 ccm 12% Alkohol enthaltenden Äthers ausgewaschen, getrocknet und gewogen (siehe Tabelle 4).

Die Pikrolonate zeigten alle den richtigen Zersetzungspunkt. Ganz befriedigend sind die Ergebnisse noch nicht, besonders in den Versuchen 5 und 6, in denen die Menge des Colamins klein und die Menge des Cholins groß war. Immerhin ist es doch gelungen, 16,56 mg Colamin (= 3,80 mg N) neben 140,4 mg Cholin (= 16,24 mg N) nachzuweisen und bis zu 85% als Pikrolonat zu isolieren.

¹⁾ Pikrolonsäure löst sich zu etwa 3% in Äther. Die Anwendung einer gesättigten Lösung ist zu vermeiden, damit sich nicht während der bei der Destillation stattfindenden Konzentration Pikrolonsäure ausscheidet.

Tabelle 4.

Einge- führtes Colamin in mg N	Dauer der Ex- trak- tion in Stund.	Erhaltenes Pikrolonat		Einge- führ- tes Cholin in mg N	Dauer der Ex- trak- tion in Stund.	Im Alkohol gefundener N nach Kjeldahl				Wiederge- fundener Gesamt-N in % des einge- führten N
		in mg	in % des berechn.			in mg	in % des einge- führten Cholin-N	in % des eingeführten Cholin-N nach Abzug des in der Hülse gebl. Colamin-N ²⁾		
1	7,25	14	165,9	98,6	—	—	—	—	—	—
2	7,50	24	156,0	89,6 ¹⁾	—	—	—	—	—	—
3	15,20	24	332,2	94,1	4,06	5	4,48	110,3	88,2	97,5
4	15,20	24	325,0	92,1	4,06	3	5,32	131	101,5	100,3
5	3,80	24	75,4	85,4	16,24	5	16,32	100,5	97,1	97,7
6	3,80	24	70,4	79,8	16,24	3	15,68	96,6	91,8	93,3

Wir haben nun dieses Verfahren für die Phosphatid-untersuchungen benutzt und als Material zuerst das Lecithinum purissimum ex ovo von Merck, welches ja unzweifelhaft ein Gemenge verschiedener Phosphatide darstellt, verwendet. Etwa 74 g nicht getrocknetes Lecithin wurden mit 725 ccm 16%iger Schwefelsäure 6 Stunden in kochendem Wasserbad am Rückflußkühler erhitzt.³⁾ Nach dem Abkühlen wurde die feste Fettsäuremasse abgesaugt, das Filtrat mit heiß gesättigter Ätzbarytlösung bis zur schwach sauren Reaktion versetzt und zentrifugiert. Die klare Lösung wurde eingeeengt, mit Barytwasser schwach alkalisch gemacht, filtriert, mit basischem Bleiacetat ausgefällt, vom reichlich entstandenen Niederschlag⁴⁾ abgesaugt und mit Schwefelwasserstoff behandelt. Die vom Schwefelblei abfiltrierte Flüssigkeit wurde mit Salzsäure versetzt, eingeeengt, nach Zufügen von Wasser wieder eingeeengt und so wiederholt behandelt, bis die Essigsäure entfernt war.

¹⁾ Die Untersuchung der Hülse nach der Extraktion ergab 0,756 g N = 10,1 %.

²⁾ Dieser Wert wurde erhalten durch Subtraktion des Stickstoffs des Colamins im Pikrolonat von dem Stickstoff in dem eingeführten Colamin.

³⁾ Um das Lecithin in der Schwefelsäure besser zu verteilen, wurde es in ätherischer Lösung mit der Schwefelsäure versetzt und unter beständigem Schütteln der Äther verdunstet.

⁴⁾ Dieser Niederschlag enthielt nach dem Auswaschen 103,6 mg N und 16,6 mg Amino-N.

Durch Aufnahme des Rückstandes mit absolutem Alkohol, Filtrieren, Eindampfen, abermaliges Aufnehmen mit Alkohol und mehrfache Wiederholung dieses Verfahrens ließen sich die anorganischen Salze (Na, Ca, H₂SO₄, H₃PO₄) und durch Kochen der wässerigen Lösung mit Tierkohle Farbstoffe und Schmierer entfernen. Die schließlich erhaltene Masse erstarrte ihrer ganzen Menge nach krystallinisch, löste sich klar und farblos in Wasser und mit einer ganz geringen Opalescenz in Alkohol. Die Lösung wurde auf 100 ccm gebracht und für die Untersuchung verwendet. Sie enthielt in 1 ccm 7,36 mg N und 1,162 mg Amino-N. Der Amino-N betrug also 15,8% des N.

1 ccm	verbrauchte nach Kjeldahl	5,22 ccm	n/10-Säure	=	7,31 mg N	}	7,36
1	»	»	»	5,20	= 7,28 » N		
1	»	»	»	5,35	= 7,49 » N		
5	» gaben nach v. Slyke	11,25 ccm	Gas (724,5 mm, 18,5°)	=	5,81 mg N		
5	»	»	»	11,25	= 5,81 » N		

Von dieser Lösung wurden nun abgemessene Mengen eingedampft und nach der Kalkäthermethode untersucht. Die Ergebnisse finden sich in der Tabelle 5 zusammengestellt. Folgendes ist noch hinzuzufügen.

In den Versuchen 1 und 2 wurde das Colamin als Pikrolonat bestimmt und identifiziert (Zersetzungspunkt, Krystallform, Analyse) in den Versuchen 3 und 4 wurde es nach v. Slyke bestimmt.

Versuch 1 setzt sich aus zwei mit gleichen Mengen Substanz angestellten Parallelversuchen 1a und 1b zusammen. In beiden war die Menge des erhaltenen Pikrolonats die gleiche, 88,5 und 88,2 mg. Die Menge des N und des Amino-N im Alkoholauszug und die Menge des N im Hülsenrückstand wurde in Versuch 1b, die Menge des Amino-N im Hülsenrückstand in Versuch 1a bestimmt. Der Alkoholauszug von Versuch 1a diente für die Isolierung und Identifizierung des Cholins. Wir dampften ihn zu dem Zweck nach Salzsäurezusatz ein, nahmen den Rückstand mit absolutem Alkohol auf, filtrierten ganz geringe Mengen sich nicht lösender Substanz ab und engten wieder ein. Der Rückstand löste sich jetzt völlig klar in Alkohol auf. Die Lösung wurde mit Platinchlorid gefällt, die Fällung am nächsten Tage abfiltriert, getrocknet und gewogen. Sie wog 665,8 mg und enthielt 31,92% Platin, bestand also aus

Cholinplatinchlorid, welches 31,64% Platin besitzt. Im Filtrat der Platinfällung fanden sich noch 0,39 mg Amino-N (0,7 ccm, 739 mm, 19°), während der Alkoholauszug des Parallelversuches 0,65 mg enthielt. Ein Teil des Colamins war also aus der konzentrierten Lösung, in der die Fällung vorgenommen wurde, mitgefällt worden. 665,8 mg Cholinplatinchlorid entsprechen 30,29 mg N.

Tabelle 5.

	1 (1 ^a , 1 ^b)	2	3	4		
Dauer der Ätherextraktion in Stunden	24	42	24	30		
Dauer der Alkoholextraktion in Stunden	5	5	5	5		
Gesamt-N eingeführt . . mg	36,80	58,88	184,00	184,00		
aus Äther {	mg	3,80	5,96	17,98	19,85	
	%	10,3	10,1	9,8	10,8	
aus Alkohol {	mg	30,04	—	158,4	155,30	
	%	81,6	—	85,9	84,4	
Gesamt-N wiedererhalten {	aus Äther + Alkohol	mg	33,84	—	176,02	175,15
	%	91,9	—	95,6	95,2	
aus Hülsenrückstand {	mg	2,63	3,81	—	—	
	%	7,1	6,5	—	—	
Insgesamt {	mg	36,47	—	—	—	
	%	99,0	—	—	—	
Amino-N eingeführt . . . mg	5,81	9,296	29,05	29,05		
aus Äther {	mg	3,80 ¹⁾	5,96 ¹⁾	17,98	19,85	
	%	65,4 ¹⁾	64,10 ¹⁾	61,9	68,3	
aus Alkohol {	mg	0,65	0,44	5,59	6,34	
	%	11,2	4,7	19,2	21,8	
Amino-N wiedererhalten {	aus Äther + Alkohol	mg	4,45	6,4	23,57	26,19
	%	76,6	68,8	81,1	90,1	
aus Hülsenrückstand {	mg	1,03	2,42	—	—	
	%	17,7	26,0	—	—	
Insgesamt {	mg	5,48	8,82	—	—	
	%	94,3	94,8	—	—	

¹⁾ Aus Colaminpikrolonat berechnet.

Belege.

Versuch 1 a.

Ätherauszug. Das Pikrolonat wog 88,5 mg = 3,81 mg N. Zersetzungspunkt 226°, aus Alkohol charakteristische Krystalle mit Zwillingsformen. Analyse siehe bei Versuch 2.

Alkoholauszug. Cholinplatinchlorid 665,8 mg = 30,29 mg N. 289,5 mg hinterließen beim Glühen 92,4 mg Pt = 31,92%.

Hülsenrückstand. Er enthielt 1,03 mg Aminostickstoff (1,9 ccm Gas, 728 mm, 20°).

Versuch 1 b.

Ätherauszug. Das Pikrolonat wog 88,2 mg = 3,80 mg N. Zersetzungspunkt und Krystallform wie oben. Analyse siehe bei Versuch 2.

Alkoholauszug. Die Lösung, welche 50 ccm betrug, enthielt 30,04 mg N und 0,651 mg Amino-N.

6,25 ccm verbrauchten nach Kjeldahl 2,68 ccm $\frac{n}{10}$ -Säure = 3,755 mg N. 25 ccm gaben nach v. Slyke 0,6 ccm Gas (727,5 mm, 21°) = 0,3254

Hülsenrückstand. Er enthielt 2,634 mg N (1,88 ccm $\frac{n}{10}$ -Säure nach Kjeldahl).

Versuch 2.

Ätherauszug. Das Pikrolonat wog 138,3 mg = 5,959 mg N. Zersetzungspunkt und Krystallform wie oben. Für die Analyse wurde es zusammen mit den Pikrolonaten aus Versuch 1 a und 1 b aus Alkohol umkrystallisiert. 0,1109 g gaben nach Dumas 21,66 ccm (728 mm, 16°) = 21,70% N statt 21,54%.

Alkoholauszug. Die Lösung, welche 25 ccm betrug, enthielt 0,436 mg Amino-N.

10 ccm gaben nach v. Slyke 0,35 ccm Gas (730 mm, 17°) = 0,194 mg N.
15 „ „ „ „ 0,42 „ „ (730 „ 18°) = 0,232

Hülsenrückstand. Die wässrige, mit Kohlensäure behandelte Lösung, welche 50 ccm betrug, enthielt 3,81 mg N und 2,418 mg Amino-N. 25 ccm verbrauchten nach Kjeldahl 1,36 ccm $\frac{n}{10}$ -Säure = 1,905 mg N. 25 ccm gaben nach v. Slyke 2,2 ccm Gas (731 mm, 19°) = 1,209

Versuch 3.

Ätherauszug. Die Lösung, welche 25 ccm betrug, enthielt 17,98 mg Amino-N.

3,0 ccm gaben nach v. Slyke 3,9 ccm Gas (729 mm, 17,5°) = 2,1528 mg N.
3,02 „ „ „ „ 3,95 „ „ (729 „ 18°) = 2,1755

Alkoholauszug. Die Lösung, welche 100 ccm betrug, enthielt 158,04 mg N und 5,59 mg Amino-N.

5 ccm verbrauchten nach Kjeldahl 5,61 ccm $\frac{n}{10}$ -Säure = 7,86 mg N.

5 „ „ „ „ 5,67 „ „ = 7,944

5 „ gaben nach v. Slyke 0,45 ccm Gas (721 mm, 19°) = 0,244

5 „ „ „ „ 0,6 „ „ (721 „ 19°) = 0,315

Versuch 4.

Ätherauszug. Die Lösung, welche 50 ccm betrug, enthielt 19,85 mg Amino-N.

4 ccm gaben nach v. Slyke 2,90 ccm Gas (729 mm, 19°) = 1,59 mg N.

4 » » » » 2,90 » » (729 » 19,5°) = 1,585 »

Alkoholauszug. Die Lösung, welche 100 ccm betrug, enthielt 155,3 mg N und 6,34 mg Amino-N.

5 ccm verbrauchten nach Kjeldahl 5,5 ccm $n/10$ -Säure = 7,7 mg N.

5 » » » » 5,59 » » = 7,83 »

5 » gaben nach v. Slyke 0,55 ccm Gas (721 mm, 19°) = 0,2982 mg N.

5 » » » » 0,62 » » (721 » 19°) = 0,336 »

Aus den Versuchen ergibt sich einmal, daß das Verfahren zur Abscheidung des Colamins und zu seiner Identifizierung geeignet ist und weiter, daß in dem untersuchten Phosphatid außer Cholin und Colamin noch ein anderer Atomkomplex vorhanden ist, welcher Stickstoff enthält, und daß dieser Stickstoff jedenfalls zum Teil Aminostickstoff ist.

Die Untersuchungen mit dieser Methode werden fortgesetzt.

