

Mitteilung aus dem Institut für Lebensmittel- und Gärungschemie der  
Sächsischen Technischen Hochschule Dresden

## Zur Kenntnis der pflanzlichen Phosphatide

Von A. Heiduschka und W. Neumann

(Eingegangen am 29. März 1938)

Die natürlichen Phosphatide sind meist Gemische verschiedener Phosphatide, die entweder in gegenseitiger Bindung oder frei nebeneinander vorkommen.

Die ersten grundlegenden Untersuchungen über Phosphatide wurden von Gobley<sup>1)</sup> ausgeführt. Die Gewinnung pflanzlicher Phosphatide ist erst seit jüngerer Zeit bekannt und demzufolge befinden sich nur wenige Angaben in der Literatur. Diese Tatsache liegt darin begründet, daß in den Pflanzen die Mengen an Phosphatiden sehr gering sind, gewöhnlich 0,1 bis 0,2%, günstigstenfalls können 2% auftreten.

Obwohl schon Hoppe-Seyler<sup>2)</sup> aus dem Samen von *Bertholletia excelsa* und Jacobson<sup>3)</sup> aus dem Samen von Wicken, Erbsen, Lupinen und Bohnen dem Eigelb-Lecithin gleichende, phosphorhaltige Substanzen darstellten, sind erst die Arbeiten von E. Schulze<sup>4)</sup> und Trier<sup>5)</sup> für die wissenschaftliche Erforschung der pflanzlichen Phosphatide maßgebend. Als Untersuchungsmaterial dienten Leguminosen-, Cerealien- und Kastaniensamen, Zuckerrübe und Zuckerrohr.

<sup>1)</sup> Gobley, J. Pharmac. Chim. (3) 9, 1, 81, 161 (1846).

<sup>2)</sup> Hoppe-Seyler, Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. 1867, 219.

<sup>3)</sup> Jacobson, ebenda 13, 32 (1899).

<sup>4)</sup> E. Schulze, ebenda 20, 225 (1895); Landw. Versuchsst. 49, 203 (1898); Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 55, 338 (1908); Chemiker-Ztg. 32, 981 u. a. (1908); Likiernik, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 15, 405 (1891).

<sup>5)</sup> G. Trier, ebenda 73, 388 (1911); 86, 1, 141, 153, 407 (1913); Biochem. Z. 211, 199 u. a. (1929).

Über das Phosphatid aus Sojabohnen wurden größere Untersuchungen von Levene und Rolf<sup>1)</sup> ausgeführt und die einzelnen Spaltungsprodukte des Lecithin- und des Kephalinanteils festgestellt. Neuere Arbeiten von Magistris und Schäfer<sup>2)</sup> und von Bleyer und Diemair<sup>3)</sup> geben Aufschluß über das Phosphatid der Ackerbohne, der Mohrrübe und des Weizenkeimlings, während Hansteen-Cranner<sup>4)</sup> „wasserlösliche Phosphatide“ beschrieb, die er durch Dialyse aus Pflanzenteilen erhielt. Er ist der Ansicht, daß diese Phosphatide als die genuinen anzusehen und daß die durch organische Lösungsmittel erhaltenen schon denaturiert sind. Sullivan und Bailey<sup>5)</sup> untersuchten die Phosphatide des Weizenembryos. Wie aus all den Untersuchungen hervorgeht, kommen die pflanzlichen Phosphatide hauptsächlich im Samen vor; andere Vorkommen in Wurzeln, Stengeln und Blättern sind nur untergeordneter Bedeutung.

Durch die jetzt besonders einsetzende Förderung der Rapsölgewinnung standen uns größere Mengen der bisher noch nicht untersuchten Rapsrohphosphatide zur Verfügung, deren Untersuchung wir durchführten. Die erhaltenen Resultate waren folgende:

Das Rapsphosphatid stellt ein Gemisch von Monoaminomonophosphatiden dar; es wurden zwei Fraktionen, eine Lecithin- und eine Kephalinfraktion gewonnen, von denen die erstere an Menge weit zurückstand. Trotzdem unter den günstigsten Bedingungen gearbeitet wurde, konnte eine vollständige Trennung des Kephalins vom Lecithin nicht erreicht werden; die Lecithinfraktion schloß einen Teil des Kephalins ein.

Die Untersuchung der einzelnen Fraktionen ergab, daß an ihrem Aufbau die gleichen Fettsäuren und Glycerinphosphorsäure beteiligt waren, während den Basenanteil einerseits

---

<sup>1)</sup> Levene u. Rolf, *Biochem. Z.* 62, 759 (1925); 65, 545 (1925); 67, 659 (1926).

<sup>2)</sup> Magistris u. Schäfer, ebenda 214, 401 (1929).

<sup>3)</sup> Bleyer u. Diemair, ebenda 235, 243 (1931); 275, 242 (1935).

<sup>4)</sup> Hansteen-Cranner, *Meldinger fra Norges Landbrukshiskole* 2. Hl., 2, (1922).

<sup>5)</sup> Sullivan u. Bailey, *C.* 1936, I, 4172.

Cholin und zum anderen Colamin ausmachte. Von gesättigten Fettsäuren war nur Palmitinsäure nachweisbar; die flüssigen Fettsäuren stellten ein Gemisch von Linolsäure und Ölsäure dar; die vorwiegende Linolsäure trat in  $\alpha$ - und  $\beta$ -Form auf, von denen die  $\alpha$ -Säure experimentell, die  $\beta$ -Säure nur indirekt zu ermitteln war.

Die Glycerinphosphorsäure war zum größten Teil durch die  $\alpha$ -Form vertreten, so daß angenommen werden muß, daß ursprünglich nur  $\alpha$ -Kephalin und  $\alpha$ -Lecithin den Phosphatidkomplex bildeten, und daß die isomere  $\beta$ -Verbindung erst bei der Spaltung mit Barytwasser entstand. Die früher ausgesprochene Vermutung, daß an das Phosphatid Kohlenhydrate chemisch gebunden seien, konnten wir nicht bestätigen; die zweifellos im Rapsamen vorhandenen Kohlenhydrate waren schon bei der Gewinnung und Reinigung des Phosphatids entfernt worden. Das Rapsphosphatid zeigte die gleichen Spaltungsprodukte wie das Sojabohnenphosphatid; es scheint daher in ähnlicher Weise aufgebaut zu sein.

### Experimenteller Teil

Das rohe Rapsphosphatid wurde in gleicher Weise gewonnen, wie man auch Sojabohnenphosphatide gewinnt, nämlich durch Extraktion der zerkleinerten Samen mit Benzin. Nach dem Abtreiben des Benzins scheidet sich das Rohphosphatid als Satz ab, der dann möglichst von Fett befreit wird.

#### Reinigen des Rapsphosphatids

2 kg Rapsphosphatid wurden mit der gleichen Menge Benzol versetzt und mehrere Stunden bei 2° geschüttelt, wobei es sich löste. Hierauf wurden etwa 1,5 kg Benzol i. V. bei 50° abdestilliert, der Rückstand auf 5° abgekühlt und mit etwa 1 kg eisgekühltem Methylacetat versetzt. Das Phosphatid fällt aus, während anhaftende Fettsubstanzen in Lösung bleiben. Der Rückstand wurde im Vakuumexsiccator über konz. Schwefelsäure 48 Stunden getrocknet. Zur weiteren Reinigung wurde das erhaltene Phosphatid in Äther gelöst und wieder mit derselben Menge Methylacetat ausgefällt; diese Operation wurde nochmals wiederholt.

Das gereinigte Phosphatid war von gelber Farbe und wurde durch längeres Trocknen im Vakuumexsiccator über konz. Schwefelsäure als Pulver erhalten. Es ist sehr hygroskopisch. In den bekannten organischen Lösungsmitteln, Benzol, Äther, Tetrachlorkohlenstoff, Chloroform, Petroläther ist es leicht löslich, in Alkohol bei höherer Temperatur teilweise, während es in Aceton und Methylacetat fast unlöslich ist.

## 1. N.

0,5087 g = 5,13 ccm n/10-HCl = 1,43 % N }  
 0,5112 g = 5,20 „ n/10-HCl = 1,42 % „ } Im Mittel 1,43 % N

## 2. P.

Phosphorsäurebestimmung nach Thierfelder-Neumann<sup>1)</sup>

0,5086 g = 24,16 ccm n/20-NaOH = 2,63 % P }  
 0,5375 g = 26,02 „ n/20-NaOH = 2,68 % „ } Im Mittel 2,66 % P  
 Verhältnis P:N = 1 : 1,19

## 3. V.-Z.

2,9017 g = 10,01 ccm n/1-KOH = 193,2 V.-Z.  
 3,0689 g = 10,60 „ n/1-KOH = 193,3 „

## 4. J.-Z. nach Hübl.

0,7782 g = 44,53 ccm n/10-Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> = 72,56 J.-Z.  
 0,7114 g = 39,94 „ n/10-Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> = 71,19 „

### Trennung des gereinigten Rapsphosphatids in den Lecithin- und Kephalinanteil

Die Trennung der beiden Anteile beruht auf ihrem Verhalten gegen Alkohol; Lecithin ist in abs. Alkohol löslich, Kephalin nicht. Das gereinigte Rapsphosphatid wurde in  $\frac{1}{2}$  kg wasserfreiem und peroxydfreiem Äther gelöst und mit 1 kg abs. Alkohol von 5° versetzt; es entstand ein gelblich-grauer Niederschlag, den man längere Zeit absetzen ließ und dann von der überstehenden Flüssigkeit trennte. Der Rückstand wurde auf Tontellern im Vakuumexsiccator über konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und noch zweimal auf gleiche Weise behandelt. Aus den ätheralkoholischen Auszügen wurde der Äther im Stickstoffstrom abdestilliert und der Rückstand mit 500 ccm Methylacetat versetzt; der ausgefallene gelbe Niederschlag wurde getrocknet, Kephalinanteil: 550 g; Lecithinanteil: 115 g.

<sup>1)</sup> Thierfelder-Neumann, Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. 37, 129 (1902/03).

1. N im Kephalin.

0,5064 g = 5,00 ccm n/10-HCl = 1,38% N } Im Mittel 1,39% N  
 0,5426 g = 5,46 „ n/10-HCl = 1,40% „ }

N im Lecithin.

0,5329 g = 6,13 ccm n/10-HCl = 1,61% N } Im Mittel 1,57% N  
 0,5117 g = 5,61 „ n/10-HCl = 1,54% „ }

2. P im Kephalin.

0,5032 g = 28,50 ccm n/2-NaOH = 3,14% P } Im Mittel 3,25% P  
 0,5074 g = 1,0434 g Molybdat = 3,37% „ }

P im Lecithin.

0,5202 g = 28,60 ccm n/2-NaOH = 3,05% P } Im Mittel 3,04% P  
 0,5122 g = 0,9503 g Molybdat = 3,04% „ }

3. Verhältnis P:N.

Im Kephalin: P:N = 1:0,95. Im Lecithin: P:N = 1:1,14.

4. V.-Z. im Kephalin.

2,2635 g = 8,65 ccm n/1-KOH = 214,0.  
 2,2154 g = 8,13 „ n/1-KOH = 211,3.

V.-Z. im Lecithin.

2,0310 g = 7,52 ccm n/1-KOH = 207,4.  
 2,1997 g = 8,33 „ n/1-KOH = 212,1.

5. J.-Z. im Kephalin.

0,5937 g = 38,74 ccm n/10-Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> = 82,74.  
 0,6326 g = 40,54 „ n/10-Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> = 81,26.

J.-Z. im Lecithin.

0,9026 g = 57,52 ccm = 80,40. 0,6592 g = 43,22 ccm = 83,13.

	N%	P%	P:N	V.-Z.	J.-Z.
Kephalin	{ 1,38	{ 3,14	1:0,95	214,0	82,74
	{ 1,48	{ 3,37			
Lecithin	{ 1,61	{ 3,05	1:1,14	207,4	80,40
	{ 1,54	{ 3,04			

Aus den Verseifungs- und den Jodzahlen ist ersichtlich, daß am Aufbau des Kephalin- und des Lecithinkomplexes anscheinend die gleichen Säuren beteiligt sind. Die beiden Anteile unterscheiden sich nur durch die Basenbestandteile. Die Richtigkeit dieser Annahme soll in weiteren Versuchen bestätigt werden.

Hydrolyse des Kephalins und des Lecithins

180 g Kephalin wurden mit 2 Liter 10%iger HCl versetzt und zuerst auf dem Wasserbad, nach dem Aufhören des

Schäumens am Rückflußkühler über direkter Flamme 24 Stdn. hydrolysiert. Die anfangs hell aussehende Lösung wurde nach und nach dunkelbraun. Nach der Aufspaltung wurde das salzsaure Reaktionsgemisch durch Asbest filtriert. Auf dem Filter sammelte sich der größte Teil der Fettsäuren an, die mit Wasser gereinigt und dann mit peroxydfreiem Äther aufgenommen wurden. Die ätherische Lösung wurde über geglühtem  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und im N-Strom unter vermindertem Druck eingeeengt. Die Filtrate wurden mit peroxydfreiem Äther ausgeschüttelt und in gleicher Weise getrocknet und eingeeengt; es hinterblieb eine geringe Menge eines Fettsäuregemisches (5,9 g), das in der Kälte teilweise erstarrte. Dieser Anteil wurde zu der Hauptmenge an Fettsäuren gegeben.

Auf gleiche Weise wurden 50 g Lecithin mit 600 ccm 10% iger Salzsäure hydrolysiert und aufgearbeitet. Insgesamt erhielten wir im Kephalinanteil 123 g oder 68,3%, im Lecithinanteil 35,4 g oder 70,8% eines dunkelbraunen, fettigen Rückstandes.

#### Trennung der festen von den flüssigen Fettsäuren

Durch Vorversuche wurde festgestellt, daß die Methode von Großfeld<sup>1)</sup> sich im vorliegenden Fall am besten eignet. Es wurden 52,82 g Fettsäuregemisch nach ihr vom Kephalinanteil und 20,97 g vom Lecithinanteil verarbeitet.

##### Ausbeuten.

Kephalinanteil: 52,82 g feste Fettsäure = 9,62 g = 18,21 %	
flüssige „ = 35,69 g = 67,57 %	
Der Schmelzpunkt der festen Fettsäure = 49,5°	
Lecithinanteil: 20,97 g = feste Fettsäure = 3,33 g = 15,88 %	
flüssige „ = 14,43 g = 68,81 %	

Bekanntlich ist eine absolut quantitative Trennung der festen von den flüssigen Fettsäuren nur schwer zu erreichen, weil immer ein Teil der flüssigen Fettsäuren sich mit den festen abscheidet. Um festzustellen, ob dieses hier der Fall ist, wurde die Jodzahl bestimmt.

Kephalinanteil: 0,4160 g = 4,07 ccm $n/10\text{-Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ = 12,40 J.-Z.
0,3723 g = 4,03 „ $n/10\text{-Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ = 13,73 „

<sup>1)</sup> Großfeld, Chem. Umschau 37, 23 (1930); vgl. auch Twitchell, J. Ind. engin. Chem. 13, 806 (1921).

Lecithinanteil: 0,3885 g = 0,84 ccm  $n/10\text{-Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 = 2,74 \text{ J.-Z.}$   
 0,3922 g = 0,99 „  $n/10\text{-Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 = 3,20 \text{ „}$

Es zeigte sich, daß die Trennung bei dem Kephalinanteil durchaus nicht befriedigend ausgefallen war. Daher wurden die erhaltenen festen Fettsäuren nochmals nach Großfeld behandelt.

Die daraufhin erhaltenen Resultate waren folgende:

0,3143 g = 0,84 ccm  $n/10\text{-Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 = 3,38 \text{ J.-Z.}$   
 0,3627 g = 1,18 „  $n/10\text{-Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 = 4,13 \text{ „}$   
 0,3594 g = 1,02 „  $n/10\text{-Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 = 3,59 \text{ „}$   
 0,3421 g = 1,01 „  $n/10\text{-Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 = 3,74 \text{ „}$

Die festen, ungesättigten Fettsäuren hatten in beiden Anteilen ein bräunliches Aussehen; die ungesättigten waren flüssig, von gelbbrauner Farbe und schieden beim Abkühlen auf  $0^\circ$  keine festen Teile ab.

#### Untersuchung der festen Fettsäuren

Die aus pflanzlichem Material gewonnenen Kephaline und Lecithine enthalten größtenteils zwei feste Fettsäuren, die Palmitinsäure und die Stearinsäure. Levene und Rolf<sup>1)</sup> konnten diese Säuren im Sojabohnenphosphatid nachweisen; im Phosphatid der Ackerbohne fanden H. Magistris und P. Schäfer<sup>2)</sup> nur Palmitinsäure; zu demselben Ergebnis kamen B. Bleyer und W. Diemair, die im Phosphatid der Mohrrübe<sup>3)</sup> und im Phosphatid des Weizenkeimlings<sup>4)</sup> von den gesättigten Fettsäuren nur die Palmitinsäure charakterisierten.

Zur Reinigung wurde je ein Teil der Fettsäuren beider Anteile bei 25 mg Hg-Druck im Kohlensäurestrom destilliert. Als Apparatur benutzten wir den Mengen angepaßt einen 25 ccm fassenden Claissensäbelkolben. Die Fettsäuren gingen bei  $223^\circ$  über und erstarrten zu einer weißen Substanz, deren Schmelzpunkt bei  $61,2^\circ$  lag. Daraus kann der Schluß gezogen werden, daß am Aufbau des Rapsphosphatids von den festen Fettsäuren nur die Palmitinsäure (theoret. Schmp.  $62,6^\circ$ ) beteiligt ist. Zur Identifizierung wurden die Säurezahl (S.-Z. der Pal-

<sup>1)</sup> Levene u. Rolf, a. a. O. **62**, 759 (1914); **68**, 285 (1915).

<sup>2)</sup> Magistris u. P. Schäfer, Biochem. Z. **214**, 401 (1929).

<sup>3)</sup> B. Bleyer u. W. Diemair, ebenda **235**, 243 (1931).

<sup>4)</sup> Dieselben, ebenda **275**, 242 (1935).

mitinsäure berechnet = 218) bestimmt und das Silbersalz hergestellt.

Kephalinanteil:	0,2380 g =	9,27 ccm	n/10-KOH =	220 S.-Z.
	0,3199 g =	12,50 „	n/10-KOH =	219 „
Lecithinanteil:	0,2045 g =	7,98 ccm =	218 S.-Z.	
	0,1217 g =	4,76 „ =	219 „	

Silbersalz: Ein Teil der Fettsäuren wurde in etwa 30 ccm 96<sup>o</sup>/<sub>o</sub>-igem Alkohol gelöst und mit alkoholischer Kalilauge neutralisiert. Das Gemisch wurde mit 50 ccm 96<sup>o</sup>/<sub>o</sub>-igem Alkohol und 50 ccm Wasser verdünnt und mit 70 ccm einer 3<sup>o</sup>/<sub>o</sub>-igen Silbernitratlösung versetzt. Das ausfallende Silbersalz wurde wiederholt umkristallisiert.

#### Kephalinanteil.

0,3174 g Silbersalz =	0,1221 g AgCl =	0,0919 g Ag =	28,95 % Ag
0,1071 g Fettsäuren =	0,2957 g CO <sub>2</sub> =	75,80 % =	0,1229 g H <sub>2</sub> O = 12,85 %

#### Lecithinanteil.

0,2530 g Silbersalz =	0,0978 g AgCl =	0,0736 g Ag =	29,09 % Ag	
0,1259 g Fettsäuren =	0,3470 g CO <sub>2</sub> =	75,17 % =	0,1429 g H <sub>2</sub> O = 12,70 %	
Palmitinsäure C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub> :	Ber. C	74,92 %	H 12,59 %	Ag 29,74 %
Im Kephalinanteil:	Gef. „	75,30 „	„ 12,85 „	„ 28,95 „
Im Lecithinanteil:	Gef. „	75,17 „	„ 12,70 „	„ 29,09 „

Die Analysenergebnisse und der Schmelzpunkt zeigen, daß die festen Fettsäuren, die man bei der Spaltung des Rapsphosphatids gewinnt, nur aus Palmitinsäure bestehen.

### Untersuchung der flüssigen Fettsäuren

Die aus den alkoholischen Filtraten isolierten flüssigen Fettsäuren wurden über geglühtem Natriumsulfat getrocknet. Sie waren von brauner Farbe und ergaben 68<sup>o</sup>/<sub>o</sub> der Gesamtfettsäuren. Die rohen Fettsäuren wurden durch Destillation unter vermindertem Druck so lange gereinigt, bis die anfallenden Destillate nur schwach gelb gefärbt waren.

Ihre Jodzahlen waren folgende:

Kephalinanteil:	0,4142 =	41,05 ccm	n/10-Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> =	125,7 J.-Z.
	0,4573 =	46,39 „	n/10-Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> =	128,6 „
Lecithinanteil:	0,4331 =	43,68 „	n/10-Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> =	127,9 „
	0,4395 =	45,80 „	n/10-Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> =	132,1 „

Die Jodzahlen lassen erkennen, daß ein Gemisch von ungesättigten Fettsäuren vorliegen muß, und zwar Öl- und Linol-

säure, die auch in anderen pflanzlichen Phosphatiden nachgewiesen werden konnten.

Die errechnete Jodzahl der Ölsäure ist 90,07, die der Linolsäure 181,4. Die Elaidinprobe auf Ölsäure fiel positiv aus.

### Bestimmung der ungesättigten Fettsäuren durch Bromierung

15 g flüssige Fettsäuren vom Kephalinanteil wurden in 200 ccm wasserfreiem Äther gelöst und bei 5° tropfenweise mit Brom versetzt, bis das Reaktionsgemisch eine bleibende tiefe Braunfärbung zeigte. Nach längerem Stehen bei der gleichen Temperatur wurde das Lösungsmittel im Stickstoffstrom unter Vakuum abdestilliert, der Rückstand mit Petroläther behandelt, in dem das Dibromid sich leicht löst, während das Tetrabromid wenig löslich ist. Das Gemisch wurde 24 Stunden auf Eis gestellt, damit sich in Lösung gegangenes Tetrabromid wieder abscheidet. Der gelbe Niederschlag wurde abgesaugt, mit eisgekühltem Petroläther gewaschen, durch wiederholtes Lösen in Äther und Ausfällen mit Petroläther unter Eiskühlung gereinigt und getrocknet. Das gereinigte Tetrabromid war weiß und hatte den Schmp. 113°. In gleicher Weise wurden 8 g flüssige Fettsäure vom Lecithinanteil verarbeitet.

#### Kephalinanteil.

15 g flüssige Fettsäuren ergaben 21,31 g  $\alpha$ -Linolsäure-tetrabromid = 66,81%  $\alpha$ -Linolsäure; Schmp. = 113°.

0,1735 g = 0,2171 g AgBr = 53,25% Br.

$C_{18}H_{32}O_2Br_4$  Ber. Br 53,33%

#### Lecithinanteil.

8 g flüssige Fettsäuren ergaben 10,873 g  $\alpha$ -Linolsäure-tetrabromid = 82,84%  $\alpha$ -Linolsäure; Schmp. 113°.

0,1327 g = 0,1685 g AgBr = 53,17% Br.

$C_{18}H_{32}O_2Br_4$  Ber. Br 53,33%

Die Jodzahlbestimmung der entbromten<sup>1)</sup> Fettsäuren ergab:

Kephalinanteil: 0,2957 g = 40,13 ccm  $n/10-Na_2S_2O_3$  = 172,1 J.-Z.

Lecithinanteil: 0,2319 g = 32,03 ccm  $n/10-Na_2S_2O_3$  = 175,1 „

Linolsäure ber. 181,5 J.-Z.

Die hohen Jodzahlen und die Bromadditionsprodukte zeigen, daß  $\alpha$ -Linolsäure am Phosphatidaufbau beteiligt ist.

<sup>1)</sup> Grün, Analyse der Fette u. Wachse I, 225 Berlin 1925.

Der in Petroläther lösliche Anteil wurde auf Dibromstearinsäure untersucht. Das überschüssige Brom wurde mit Thiosulfatlösung<sup>1)</sup> entfernt, die Lösung mit Wasser gewaschen, über geglühtem Natriumsulfat getrocknet und durch Vakuumdestillation vom Petroläther befreit. Der hellgelbe Rückstand wurde im Vakuumexsiccator getrocknet.

Kephalinanteil: 0,1236 g = 0,1225 g AgBr = 42,17% Br

Lecithinanteil: 0,1373 g = 0,1385 g „ = 42,92% „

$C_{18}H_{34}O_2Br_2$  Ber. Br 36,18%

Jodzahl der entbromten Säure.

Kephalinanteil: 0,2573 g = 19,79 ccm n/10- $Na_2S_2O_3$  = 97,5 J.-Z.

Lecithinanteil: 0,2771 g = 22,36 „ n/10- $Na_2S_2O_3$  = 102,3 „

Ölsäure: 89,9 J.-Z.

Wie ein Vergleich der gefundenen und berechneten Werte ergibt, besteht der Rückstand nicht nur aus Dibromstearinsäure. Der höhere Gehalt an Brom und die höhere Jodzahl lassen vermuten, daß eine andere ungesättigte Säure vorhanden ist. Da Linolsäure mit der Hexabromidprobe nach Eibner und H. Muggentaler<sup>2)</sup> nicht nachgewiesen werden konnte, wird es sich jedenfalls um  $\beta$ -Linolsäure handeln. Nach Hehner und Mitchell<sup>3)</sup> kann diese Säure aus dem Gemisch nicht isoliert werden; sie läßt sich aber aus dem gefundenen Bromgehalt der Dibromstearinsäure annähernd berechnen.

$x + y = 100$ ;  $36,18 \cdot x + 53,33 \cdot y = \text{gef. Br-Gehalt} \cdot 100$ ;  $x = \text{Gehalt an Ölsäuredibromid}$ ,  $y = \text{Gehalt an } \beta\text{-Linolsäure-tetrabromid}$ .

Für den Kephalinanteil errechnet sich:

$x = 65,07\%$  Ölsäuredibromid =  $41,55\%$  Ölsäure.

$y = 34,93\%$   $\beta$ -Linolsäure-tetrabromid =  $16,32\%$   $\beta$ -Linolsäure.

Für den Lecithinanteil errechnet sich:

$x = 60,70\%$  Ölsäuredibromid =  $38,76\%$  Ölsäure.

$y = 39,30\%$   $\beta$ -Linolsäure-tetrabromid =  $18,36\%$   $\beta$ -Linolsäure.

Da die Gesamtfettsäuren im Kephalin aus  $67,6\%$ , im Lecithin aus  $68,8\%$  flüssigen Fettsäuren bestehen, muß folgende Zusammensetzung dieser Fettsäuren angenommen werden.

<sup>1)</sup> Holde, Kohlenwasserstofföle u. -Fette 7. Aufl. 715 (1933).

<sup>2)</sup> Eibner u. Muggentaler, Farben-Ztg. 18, 131 (1911), Berlin.

<sup>3)</sup> Hehner u. Mitchell, Analyst 1898, 313.

## Im Kephalin.

28,09% Ölsäure; 11,03%  $\beta$ -Linolsäure; 44,83%  $\alpha$ -Linolsäure.

## Im Lecithin.

26,67% Ölsäure; 12,63%  $\beta$ -Linolsäure; 43,23%  $\alpha$ -Linolsäure.

## Bestimmung der ungesättigten Säuren auf rhodanometrischem Wege

Ausführung der Bestimmung<sup>1)</sup>: 0,2—0,3 g gereinigte Gesamtfettsäuren wurden in einem sorgfältig getrockneten Jodkolben mit 20 ccm frisch bereiteter Rhodanlösung versetzt, umgeschüttelt und 24 Stunden im Dunkeln aufbewahrt, wobei sich gelbe Rhodanierungsprodukte der Fette abscheiden. Dann wurde unter starkem Schütteln auf einmal 20 ccm 10%-ige Kaliumjodidlösung hinzugegeben, mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt und das ausgeschiedene Jod mit n/10-Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Lösung zurücktitriert. Unter den gleichen Bedingungen wurde ein Blindversuch angestellt.

## Kephalinanteil.

0,2492 g = 14,61 ccm	n/10-Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> = 74,41%	Rh.-Z.	} Im Mittel
0,2575 g = 15,41 „	n/10-Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> = 75,95%	„	

## Lecithinanteil.

0,2683 g = 16,18 ccm	n/10-Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> = 76,54%	Rh.-Z.	} Im Mittel
0,2501 g = 15,39 „	n/10-Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> = 78,10%	„	

Nach den oben angegebenen Formeln lassen sich aus der Jodzahl und der Rhodanzahl die einzelnen Komponenten berechnen und ergeben folgende Werte.

## Kephalinanteil.

16,7% gesättigte Fettsäuren, 25,75% Ölsäure, 57,43% Linolsäure.

## Lecithinanteil.

14,33% gesättigte Fettsäuren, 27,40% Ölsäure, 58,16% Linolsäure.

Die Versuchsergebnisse nach dem Bromierungsverfahren und nach der rhodanometrischen Methode bestätigen, daß von den flüssigen Fettsäuren Öl- und Linolsäure im Rapsphosphatid nachweisbar sind.  $\alpha$ -Linolsäure konnte einwandfrei festgestellt werden, während die isomere  $\beta$ -Form nur indirekt zu ermitteln war.

<sup>1)</sup> Kaufmann, Chem. Umschau, Fette, Öle, Wachse, Harze 37, 113 (1930); Holde, ebenda 37, 173 (1930); Kaufmann, Ber. dtsch. pharm. Ges. 263, 701 (1925); Chemiker-Ztg. 51, 667 (1927); Holde, Kohlenwasserstofföle u. -Fette S. 776 (Vorschr. der „Wizöff“ 1935, Berlin).

## Untersuchung der Basenbestandteile des Kephalin und des Lecithins

Zur Bestimmung der Stickstoffbasen wurden je 20 g Kephalin und Lecithin mit 10 % Salzsäure hydrolysiert, die Fettsäuren durch Filtration und Ausäthern entfernt und die vereinigten salzsauren Filtrate auf dem Wasserbad vorsichtig eingedampft. Der Rückstand wurde wiederholt mit abs. Alkohol ausgezogen, der erhaltene dunkelbraune Auszug mit Tierkohle entfärbt und nach Zugabe von konz. Salzsäure wiederum vollkommen eingedampft. Durch Behandeln mit Alkohol in der Wärme lösten sich die Basenbestandteile und konnten durch Filtration von den Begleitstoffen getrennt werden.

### Bestimmung des Colamins im Kephalin

Zur quantitativen Ermittlung des Colamins wurde die Bestimmung des Aminostickstoffs nach van Slyke<sup>1)</sup> durchgeführt. Die alkoholische Lösung wurde mit Salzsäure angesäuert und durch Eindampfen auf dem Wasserbad vom Alkohol befreit. Den Rückstand neutralisierten wir mit Soda und füllten diese Lösung mit Wasser auf 200 ccm auf. Zur Untersuchung wurden je 5 ccm davon verwendet. Es wurde erhalten: 10,35, 9,95, 10,18, 10,44; im Mittel 10,23 ccm N = 12,79 mg N = 6,40 mg Aminostickstoff nach der Gleichung  $R-NH_2 + HNO_3 \rightarrow R.OH + H_2O + N_2$ .

In 5 ccm der Lösung sind 27,86 mg Colamin, woraus sich unter Berücksichtigung der 20 g hydrolysiertem Kephalin 1,1144 g Colamin = 5,59 % ergeben. 1,1144 g Colamin entsprechen 0,2558 g oder 1,28 % Colaminstickstoff. Bei einem Gesamtstickstoffgehalt von 1,39 % sind 92,09 % Colaminstickstoff.

### Bestimmung des Cholins im Lecithin

Die quantitative Bestimmung des Cholins wurde nach der von Stannek<sup>2)</sup> angegebenen und von W. Roman<sup>3)</sup> modifizierten Methode vorgenommen.

<sup>1)</sup> v. Slyke, Ber. dtsch. chem. Ges. 43, 3, 3170 (1910).

<sup>2)</sup> Stannek, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 44, 83 (1904); 46, 280 (1905).

<sup>3)</sup> Roman, Biochem. Z. 219, 218 (1930).

Die alkoholische Lösung des Lecithinanteils wurde mit Wasser auf 2000 ccm aufgefüllt und in je 5 ccm dieser Lösung das Cholin bestimmt.

An n/10-Natriumthiosulfat wurde verbraucht: 4,06, 4,02, 4,05, 4,06; im Mittel 4,05 ccm. 4,05 ccm n/10-Natriumthiosulfat entsprechen 5,407 mg Cholin oder auf 2000 ccm Lösung umgerechnet, 2,1628 g Cholin entsprechen 10,81% bei 20 g Lecithin. Hieraus errechnen sich 0,2520 g oder 1,26% Cholinstickstoff. Bei einem Gesamtstickstoffgehalt von 1,57% sind 80,25% des Gesamtstickstoffs Cholinstickstoff.

Es mußte noch festgestellt werden, ob Colamin als Stickstoffbase vertreten war. Da sich Colamin nur in geringer Menge vorfinden kann, mußten 1000 ccm der hergestellten Lösung (entsprechend 10 g Lecithin) auf 50 ccm eingeeengt werden. In je 5 ccm dieser vorbereiteten Lösung wurde Colamin nach van Slyke<sup>1)</sup>, wie früher bereits beschrieben, ermittelt.

2,13, 1,93, 2,05; im Mittel 2,01 ccm. 2,01 ccm N<sub>2</sub> entsprechen 2,513 mg N<sub>2</sub> oder 1,257 mg Colaminstickstoff, woraus sich, 5,477 mg Colamin auf 10 g Lecithin bezogen, 54,77 mg oder 0,5477% Colamin errechnen. So ergeben sich für Colaminstickstoff 12,57 mg oder 0,1257%; das sind 8,01% des Gesamtstickstoffs als Colaminstickstoff.

Die Untersuchung der Basenbestandteile zeigte, daß sich Colamin und Cholin am Aufbau des Rapsphosphatidkomplexes beteiligen, weshalb zwischen einem Kephalin- und einem Lecithinanteil zu unterscheiden ist. Die Kephalinfraktion konnte rein dargestellt werden, während die Lecithinfraktion noch 10% Kephalin enthielt. Demnach ist mit abs. Alkohol eine vollständige Trennung dieser beiden Fraktionen nicht möglich; ein Teil des Kephalins bindet sich an das Lecithin und wird dadurch von der Fällung geschützt.

Bei der Aufarbeitung des rohen Rapsphosphatids wurden 550 g Kephalin und 115 g Lecithin gefunden. Unter Berücksichtigung der 10% Kephalin im Lecithinanteil ergeben sich 562 g Kephalin und 103 g Lecithin, wodurch zum Ausdruck kommt, daß 84,51% Kephalin und 15,49% Lecithin den Phos-

<sup>1)</sup> v. Slyke, a. a. O.

phatidkomplex aufbauen. Colamin beteiligt sich mit 5,19%, Cholin mit 1,62%.

### Bestimmung der Glycerinphosphorsäure

Es erschien weniger vorteilhaft, Glycerin quantitativ als Spaltungsprodukt des Kephalin und des Lecithins zu ermitteln, denn nach den üblichen Methoden, der Jodidmethode von Willstätter<sup>1)</sup> und der Bichromatmethode von Hehner<sup>2)</sup>, kommt man zu nicht befriedigenden Resultaten. Wir versuchten deshalb, Glycerinphosphorsäure aus dem Komplex zu isolieren. Da die Phosphorsäure in organisch gebundener Form vorliegt, ist eine Hydrolyse in die beiden Komponenten während der Spaltung mit Laugen nicht möglich.

Nach Willstätter und Lüdecke<sup>3)</sup> wird die Spaltung mit Barytwasser bei gewöhnlicher Temperatur vorgenommen. Levene und Rolf<sup>4)</sup> führten sie in der Siedehitze durch, ohne daß das Ergebnis beeinflußt wurde. Wir stellten die Glycerinphosphorsäure nach Willstätter und Lüdecke folgendermaßen dar: je 30 g Kephalin und Lecithin wurden mit je 300 ccm 10%-iger Barytlauge bei 20° geschüttelt bis sich alles umgesetzt hatte. Zur Spaltung waren beim Lecithin 16 Stdn., beim Kephalin 30 Stunden erforderlich. Durch Einleiten von Kohlensäure wurde das überschüssige Bariumhydroxyd ausgefällt, abfiltriert und im Filtrat das glycerinphosphorsaure Barium mit abs. Alkohol abgeschieden. Das Rohprodukt mußte noch 4-mal umgefällt werden, was aus konz. wäßrigen Lösungen durch Zugabe von Alkohol möglich war. Es fiel ein feinflockiger, gelblicher Niederschlag aus, der abfiltriert und getrocknet wurde.

Im Kephalin wurden 4,890 g Bariumsalz oder 2,736 g Glycerinphosphorsäure gefunden, das entspricht 13,68% Glycerinphosphorsäure; im Lecithin 4,376 g Bariumglycerinphosphat oder 2,449 g Glycerinphosphorsäure, woraus sich 12,25%

<sup>1)</sup> R. Willstätter u. A. Madinaveita, Ber. dtsh. chem. Ges. **45**, 2825 (1912).

<sup>2)</sup> Hehner, J. Soc. chem. Ind. **8**, 4 (1889).

<sup>3)</sup> Willstätter u. Lüdecke, Ber. dtsh. chem. Ges. **37**, 3, 3753 (1904).

<sup>4)</sup> Levene u. Rolf, a. a. O. **40**, 1 (1919).

errechnen. Vergleicht man die Ergebnisse mit den theoretischen Werten (Kephalin enthält 22,9%; Lecithin 22,05% Glycerinphosphorsäure), so muß man einen Verlust feststellen, der sicherlich durch die mehrfache Umfällung entstanden ist. Zur sicheren Identifizierung wurde in diesen Salzen Ba und P bestimmt.

Bariumglycerophosphat aus Kephalin.

0,2575 g = 0,1889 g	BaSO <sub>4</sub> = 0,1111 g	Ba = 43,2%	Ba
0,2931 g = 0,2128 g	„ = 0,1252 g	„ = 42,72%	„
0,3953 g = 2,1394 g	Molybdat = 0,03507 g	P = 8,87%	P
0,3664 g = 1,9960 g	„ = 0,03272 g	„ = 8,93%	„

Bariumglycerophosphat aus Lecithin.

0,2795 g = 0,2022 g	BaSO <sub>4</sub> = 0,1190 g	Ba = 42,57%	Ba
0,2503 g = 0,1816 g	„ = 0,1069 g	„ = 42,70%	„
0,3278 g = 1,7683 g	Molybdat = 0,0289 g	P = 8,85%	P
0,3475 g = 1,8626 g	„ = 0,0305 g	„ = 8,79%	„

C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> O <sub>8</sub> PBa + H <sub>2</sub> O	42,4%	Ba	9,21%	P
wasserfrei:	44,68%	„	10,09%	„

Die Resultate zeigen, daß es sich tatsächlich um glycerinphosphorsaures Barium handelt, und somit ist auch Glycerinphosphorsäure eindeutig als Spaltungsprodukt nachgewiesen.

Zu klären war noch, ob die  $\alpha$ - oder die  $\beta$ -Glycerinphosphorsäure vorlag, oder ob es sich um ein Gemisch beider Formen handelte. Wir arbeiteten nach der Methode von Karrer und Salomon<sup>1)</sup>, die eine Trennung der isomeren Verbindungen über ein Doppelsalz vornehmen. Wenn eine wäßrige Lösung von Bariumglycerophosphorsäure mit Bariumnitratlösung versetzt wird, fällt nur  $\beta$ -Verbindung von der Formel (C<sub>2</sub>H<sub>7</sub>PBa)<sub>2</sub>.Ba(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> aus. 1 g Bariumsalz wurde in 10 ccm heißem Wasser gelöst und dazu wenig heiße Bariumnitratlösung gegeben. Nach längerem Stehen unter Eiskühlung fiel eine geringe Menge des Doppelsalzes aus, die abgesaugt und mit eiskaltem Wasser, dann mit wenig Alkohol gewaschen und im Vakuumexsiccator getrocknet wurde.

Gefunden wurden 0,1213 g Doppelsalz der  $\beta$ -Glycerinphosphorsäure, woraus sich 0,0851 g oder 8,51% des Gesamtglycerophosphates als  $\beta$ -glycerinphosphorsaures Barium errechnen. Von einer quantitativen Erfassung des  $\alpha$ -Glycerin-

<sup>1)</sup> Karrer u. Salomon, *Helv. chim. Acta* 9, 3 (1926).

phosphates wurde abgesehen, weil die bis jetzt bekannten Methoden große Fehlerquellen in sich schließen. Berücksichtigen wir, daß unter Umständen ein kleiner Teil der  $\beta$ -Verbindung in Lösung geblieben ist, so kommen der  $\alpha$ -Form 90% der Gesamtglycerinphosphorsäure zu. Demzufolge halten wir es für wahrscheinlich, daß ursprünglich nur  $\alpha$ -Kephalin und  $\alpha$ -Lecithin den Phosphatidkomplex darstellten, während die isomere Verbindung erst durch die Aufarbeitung entstand.

Die Untersuchung daraufhin, ob Kohlenhydrate sich im Kephalin und im Lecithin chemisch gebunden befinden, verlief negativ. Dieses Ergebnis läßt den Schluß zu, daß die Kohlenhydrate bei der Aufarbeitung des Rapsphosphatids entfernt worden waren, was nur möglich ist, wenn man eine adsorptive Bindung des Kohlenhydrates an den Phosphatidkomplex annimmt.

#### Versuche über Entbitterung von Phosphatiden

Bei der Nachprüfung der bisher bekannten Entbitterungsversuche wurde die Feststellung gemacht, daß sich Methylacetat sehr gut hierzu eignet. Die Arbeitsweise war folgende.

1 Teil Handelslecithin wurde mit 3 Teilen Methylacetat so lange geschüttelt, bis sich alles verteilt hatte; die überstehende Lösung wurde abgegossen und dieselbe Operation wiederholt. Nach Verdampfen des Methylacetats aus dem Rückstand unter vermindertem Druck ergab sich ein völlig geschmack- und geruchloses Präparat. Die gesamten Bitterstoffe waren durch Methylacetat aus dem Lecithin herausgelöst worden, ohne daß Lecithin mit in Lösung gegangen war. Da der Siedepunkt des Methylacetats bei  $57^{\circ}$  liegt, kann es sehr leicht wieder aus dem Gemisch entfernt werden. Deshalb halten wir dieses Lösungsmittel zur Entbitterung von Handelslecithin für geeignet und geben ihm gegenüber der Acetonentbitterung den Vorzug; nach unserem Verfahren ist eine Reinigung bedeutend einfacher und ohne Verlust an Lecithin.