

<b>Zeitschrift:</b>	Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène
<b>Herausgeber:</b>	Bundesamt für Gesundheit
<b>Band:</b>	44 (1953)
<b>Heft:</b>	4
<b>Artikel:</b>	Über eine gravimetrische Cholinbestimmungsmethode sowie über den Gehalt an Lecithin, Sphingomyelin und Kephalin in Hühnereiern und Eipulvern
<b>Autor:</b>	Hadorn, H. / Jungkunz, R.
<b>DOI:</b>	<a href="https://doi.org/10.5169/seals-982857">https://doi.org/10.5169/seals-982857</a>

#### **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. [Mehr erfahren](#)

#### **Conditions d'utilisation**

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. [En savoir plus](#)

#### **Terms of use**

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. [Find out more](#)

**Download PDF:** 22.02.2026

**ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>**

# MITTEILUNGEN

AUS DEM GEBIETE DER

## LEBENSMITTELUNTERSUCHUNG UND HYGIENE

VERÖFFENTLICHT VOM EIDG. GESUNDHEITSAMT IN BERN

Offizielles Organ der Schweizerischen Gesellschaft für analytische und angewandte Chemie

## TRAVAUX DE CHIMIE ALIMENTAIRE ET D'HYGIÈNE

PUBLIÉS PAR LE SERVICE FÉDÉRAL DE L'HYGIÈNE PUBLIQUE À BERNE

Organe officiel de la Société suisse de chimie analytique et appliquée

---

### ABONNEMENT:

Schweiz Fr. 17.— per Jahrgang (Ausland Fr. 22.—)	Preis einzelner Hefte Fr. 3.— (Ausland Fr. 4.—)
Suisse fr. 17.— par année (étranger fr. 22.—)	Prix des fascicules fr. 3.— (étranger fr. 4.—)

---

BAND - VOL. 44

1953

HEFT - FASC. 4

---

## Über eine gravimetrische Cholinbestimmungsmethode sowie über den Gehalt an Lecithin, Sphingomyelin und Kephalin in Hühnereiern und Eipulvern

*H. Hadorn und R. Jungkunz*

(Laboratorium VSK, Basel)

### Einleitung

In der Fachliteratur findet man nur vereinzelte und recht ungenaue Angaben über die Cholinbestimmung in Lebensmitteln, sowie über den Cholingehalt von Hühnereigelb bzw. von Trockeneiprodukten. Im Handbuch der Eierkunde<sup>1)</sup> sind lediglich die von *Nottbohm* und *Mayer*<sup>2)</sup> ausgeführten Analysen von 6 Hühnereidottern und 2 Enteneidottern angegeben. Eine Bestätigung dieser Werte von anderer Seite fehlt, und weitere Angaben waren in der uns zugänglichen Literatur nicht auffindbar. Dieser Umstand ist um so merkwürdiger, als Eigelb eines unserer lecithinreichsten Lebensmittel ist. Neben Lecithin, dem bekanntesten Phosphatid, sind im Eigelb noch Kephalin und Sphingomyelin enthalten. Da Cholin ein charakteristischer Baustein des Lecithins und des Sphingomyelins ist, müssen im Eigelb beträchtliche Mengen von gebundenem Cholin zu erwarten sein.

In der vorliegenden Arbeit sollen zunächst zwei Methoden zur Cholinbestimmung, sowie die wenigen, in der Literatur angegebenen Werte für den Cholingerhalt von Eigelb, überprüft werden. Wir haben verschiedene Eipulver des Handels und einige selbst hergestellte Präparate analysiert. Neben dem Cholingerhalt wurden auch die Gesamt-Lipoide, der lipoidlösliche Gesamt-Stickstoff und der Gesamt-Phosphatid-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Gehalt bestimmt. Aus diesen Gehalten lassen sich interessante Angaben über die Verteilung der verschiedenen Phosphatide machen. Schliesslich wurden noch einige Versuche zur direkten Bestimmung des Sphingomyelins unternommen.

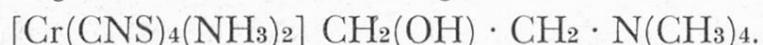
### I. Die Cholinbestimmung

Zur Bestimmung des Cholins schienen uns hauptsächlich zwei von den in der Literatur beschriebenen Methoden für unsere Zwecke geeignet. Nach der Methode von *Roman*<sup>3)</sup>, welche von *Nottbohm* und *Mayer*<sup>4)</sup> angewendet wurde, fällt man das Cholin aus salzsaurer Lösung mit Jod als Enneajodid. Dieses wird zentrifugiert, ausgewaschen, in Alkohol gelöst und mit Natriumthiosulfat titriert. Bei Vorversuchen befriedigte aber diese Methode nicht ganz, weil beim Auswaschen des Cholinenneajodids mit Eiswasser, infolge seiner Löslichkeit, Cholin-Verluste eintraten.

*Kampfhammer* und *Bischoff*<sup>5)</sup> beschreiben ein kolorimetrisches Verfahren, welches auch von *Florence Beattie*<sup>6)</sup> übernommen wurde. Darnach wird das Cholin in salzsaurer Lösung als Reineckat gefällt, dieses abfiltriert, in Aceton gelöst und kolorimetriert.

#### Gravimetrische Cholinbestimmung

Cholin gibt, wie bereits erwähnt, in salzsaurer Lösung mit Ammonium-Reineckat ein schwer lösliches, in rosaroten Blättchen kristallisierendes Salz. Als Reineckate bezeichnet man die Salze der sogenannten Reinecke-Säure = Tetra-rhodanato-diammin-chromisäure. Das übliche Ammonium-Rheineckat besitzt die Formel NH<sub>4</sub>[Cr(CNS)<sub>4</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], und die ausfallende Cholin-Reineckat-Verbindung hat folgende Zusammensetzung:



Wir arbeiteten unter möglichst gleichen Bedingungen wie *Beattie*, jedoch mit etwas grösseren Mengen. Das ausgefällte Cholin-Reineckat wurde durch gewogene Goochtiegel abfiltriert, ausgewaschen und anstatt kolorimetrisch, gravimetrisch bestimmt.

#### a) Modellversuche mit reinen Cholinchlorid-Lösungen

Für unsere Modellversuche verwendeten wir ein reines Cholinchlorid des Handels, welches bekanntlich hygroskopisch ist. Der Wassergehalt wurde zu 0,74 % und der Chlorgehalt zu 25,24 % ermittelt. Der Cholinchloridgehalt des Präparates berechnet sich aus dem Chlorgehalt zu 99,27 %, und die Trockensubstanz betrug 99,26 %.

Durch Auflösen von 1,9831 g wasserfreiem Cholinchlorid in 500 cm<sup>3</sup> Wasser stellten wir uns eine Stammlösung dar, welche in 1 cm<sup>3</sup> 3,442 mg Cholin enthielt. Steigende Mengen dieser Stammlösung (entsprechend 6 bis 20 mg Cholin) wurden in kleinen Bechergläsern mit 4 cm<sup>3</sup> 25%iger HCl versetzt und mit Wasser auf 30 bis 40 cm<sup>3</sup> verdünnt. Hierauf wurde tropfenweise mit 3 cm<sup>3</sup> einer zirka 4%igen Reineckatlösung gefüllt. Das Auswaschen und Trocknen erfolgten genau wie im Abschnitt Methodik beschrieben.

Die Resultate dieser Versuchsreihe sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Sie beweisen, dass diese Methode brauchbar ist.

*Tabelle 1*  
*Modellversuche zur Cholin-Bestimmung*

Zugesetzt mg Cholin	Auswaage mg	Gefunden mg Cholin	In % der Theorie	Fehler in %
6,884	23,2	6,66	96,7	— 3,3
10,326	35,6	10,21	98,9	— 1,1
13,77	47,6	13,64	99,1	— 0,9
17,21	60,4	17,30	100,5	+ 0,5
20,65	72,5	20,80	100,7	+ 0,7
20,84	72,2	20,70	99,3	— 0,7
34,42	122,0	35,00	101,7	+ 1,7

Der Fehler beträgt, je nach Cholingerhalt, — 3 bis + 1,7%. Bei Gehalten unter 10 mg fallen die Resultate etwas zu niedrig aus, vermutlich infolge der Löslichkeit des Cholin-Reineckates. Bei höheren Gehalten (10 bis 20 mg Cholin) stimmen die Ergebnisse gut mit den theoretischen Werten überein, wobei der Fehler höchstens ± 1% beträgt.

Die Löslichkeit des Cholin-Reineckates in Wasser haben wir ebenfalls bestimmt und gefunden:

$$100 \text{ cm}^3 \text{ Wasser lösen bei } 0^\circ = 5,5 \text{ mg Cholin-Reineckat} \\ \text{bei } 20^\circ = 13,7 \text{ mg Cholin-Reineckat}$$

### b) Aufschlussbedingungen

Im Hühner-Eigelb findet sich kein freies Cholin, was schon *Barbieri*<sup>7)</sup> festgestellt hat und von *Nottbohm* und *Mayer* bestätigt worden ist. Das im Lecithin gebundene Cholin muss deswegen vor der Bestimmung durch einen Aufschluss mit Salzsäure im Autoklaven abgespalten werden.

Die Literaturangaben über die Bedingungen, unter welchen das Cholin quantitativ aus dem Lecithin abgespalten wird, gehen auseinander. *Nottbohm* und *Mayer*<sup>4)</sup> erhitzen die Substanz mit 5,5%iger HCl, während einer Stunde im Autoklaven bei 4,5 atü. *Florence Beattie*<sup>6)</sup> hat Lecithinemulsionen in 7,8%iger

HCl bei 110° hydrolysiert und festgestellt, dass das Maximum der Cholin-Ausbeute erst nach 21stündiger Hydrolyse erreicht wird. (78 % des Gesamtstickstoffs waren als Cholin erfassbar.)

Da lange Aufschlusszeiten unerwünscht sind, haben wir uns für die Methode von *Nottbohm* entschlossen und dieselbe überprüft. Die aus 1 g Trockenvollei isolierten Gesamtlipoide wurden mit 20 cm<sup>3</sup> 5,5 %iger HCl im Autoklaven bei 4,5 atü (abgelesene Temperatur = 152°) erhitzt. Zwei Proben wurden vorschriftsgemäss während 1 Stunde, zwei weitere während 4 Stunden aufgeschlossen und anschliessend das Cholin nach der im Abschnitt Methodik beschriebenen Vorschrift bestimmt.

Wir fanden die nachstehenden, gut reproduzierbaren Werte:

1 Stunde im Autoklaven bei 4,5 atü erhitzt: 1,78 %; 1,77 %

4 Stunden im Autoklaven bei 4,5 atü erhitzt: 1,77 %; 1,79 %.

Die Versuche zeigen eindeutig, dass die Hydrolyse nach 1 Stunde bei 152° beendet ist. Durch weiteres Erhitzen wurde bei dem verwendeten Eierlipoid keine höhere Ausbeute erzielt.

#### Modellversuch

Es war noch zu überprüfen, ob beim Aufschluss mit Salzsäure und der anschliessenden Reinigung der Lösung mit Aktivkohle keine Cholinverluste zu befürchten sind. Daher wurde ein Modellversuch, welcher sich genau an die endgültige Vorschrift anlehnt, mit einem cholinfreien Fett, durchgeführt.

0,5 g Kakaobutter + 4 cm<sup>3</sup> HCl 25 %ig + 5 cm<sup>3</sup> einer Cholinchlorid-Stammlösung (17,21 mg Cholin) + 11 cm<sup>3</sup> Wasser (Gesamtvolumen der wässerigen Phase = 20 cm<sup>3</sup>) wurden im Autoklaven während 1 Stunde auf 4,5 atü erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde das Volumen der wässerigen Phase auf 25 cm<sup>3</sup> ergänzt, die Lösung mit 0,05 g Tierkohle geschüttelt und filtriert. In 20 cm<sup>3</sup> des Filtrates (entsprechend 4/5 der verwendeten Substanz) wurde das Cholin bestimmt.

In 20 cm <sup>3</sup> gefunden:	13,73 mg Cholin
theoretisch:	13,77 mg Cholin
Differenz:	0,04 mg Cholin
Fehler:	-0,3 %

Wie obige Zahlen zeigen, wurde nahezu der theoretische Wert gefunden. Beim Säureaufschluss und bei der Reinigung mit Tierkohle geht demnach kein Cholin verloren.

#### II. Zusammensetzung von Eigelb- und Volleipulver

Es sind 7 Volleipulver des Handels sowie einige selbst hergestellte Präparate untersucht worden. Neben dem Cholin sind auch die Gesamtlipoide, die lipoidlösliche Phosphorsäure sowie der lipoidlösliche Gesamt-Stickstoff bestimmt worden. Um die Resultate besser miteinander vergleichen zu können, sind in der

Tabelle 2 alle Werte auf Trockensubstanz umgerechnet worden. Die Werte für Gesamtlipoide sowie für die lipoidlösliche  $P_2O_5$ , welche unzutreffenderweise meistens als Lecithin- $P_2O_5$  bezeichnet werden, geben keinen Anlass zu besonderen Bemerkungen. Sie bewegen sich innerhalb der normalen Grenzen<sup>8)9)10)</sup>.

### a) Cholingerhalt

Bei den von uns untersuchten Volleipulvern des Handels schwanken die Cholingerhalte, auf Trockensubstanz berechnet, zwischen 1,73 und 1,92 %. Für selbst hergestelltes Trockeneigelb fanden wir 2,59 bis 2,69 %. Diese Werte sind durchwegs höher als die von *Nottbohm* und *Mayer*<sup>4)</sup> gefundenen. Nach letzteren Autoren enthält frischer Eidotter 0,958 bis 1,160 %, im Mittel von 6 Eiern 1,074 % Cholin. Rechnet man diesen Wert auf Trockeneigelb um, so erhält man 2,1 %. Auf die Trockensubstanz des gesamten Eierinhaltes bezogen, ergibt sich dann 1,41 %, gegenüber 1,73 bis 1,92 % nach unseren Bestimmungen.

Unsere Cholin-Werte sind im Mittel um etwa 20 % höher als die von *Nottbohm* und *Mayer* festgestellten. Bei Doppelbestimmungen und Modellversuchen haben wir stets gut übereinstimmende Zahlen erhalten (Abweichung  $\pm 1\%$ ), so dass unsere Resultate als gesichert angesehen werden können.

Zu der Arbeitsweise von *Nottbohm* und *Mayer* ist zu bemerken, dass die von ihnen benutzte Enneajodidmethode leicht zu Cholinverlusten führen kann, infolge der merklichen Löslichkeit des Enneajodids selbst in Eiswasser. Im Gegensatz zu unserer Methode, bei welcher nur die reinen Gesamtlipoide mit Salzsäure im Autoklaven aufgeschlossen werden, haben die genannten Autoren das gesamte Eigelb mit Salzsäure hydrolysiert. Die aus den Proteinen entstehenden Hydrolysenprodukte können möglicherweise die quantitative Ausfällung des Cholin-Enneajodids hemmen. Es ist aus den genannten Gründen durchaus möglich, dass *Nottbohm* und *Mayer* niedrigere Werte gefunden haben als wir.

*Mac Lean*<sup>11)</sup> stellte fest, dass 66 % des Stickstoffs aus Eigelbphosphatid in Form von Cholin isolierbar waren. Diese Befunde können durch unsere Analysen von Hühnereigelb und Trockenvollei des Handels bestätigt werden. Der Cholin-Gehalt, ausgedrückt in Äquivalenten, macht 65 bis 70 % des lipoidlöslichen Gesamt-Stickstoffs aus.

*Florance Beattie*<sup>6)</sup> fand in einem Eierlecithin-Präparat des Handels 78 % Cholin-Stickstoff, bezogen auf Gesamt-Stickstoff. Dieser auffallend hohe Wert erscheint uns etwas unwahrscheinlich, stützt er sich doch nur auf eine Einzelanalyse.

Der Cholin-Gehalt von Hühnereiweiss ist gering, er bewegt sich zwischen 13 und 25 mg % bezogen auf die Trockenmasse.

### b) Das Verhältnis von Lecithin zu Sphingomyelin, zu Kephalin in den Eigelb-Lipoiden

Von einem Interesse sind die gegenseitigen Verhältnisse von lipoidlöslichem Gesamt-Stickstoff, lipoidlöslicher Phosphorsäure und Cholin, weil hier-

aus etwas über die Mengenverhältnisse von Lecithin, Sphingomyelin und Kephalin ausgesagt werden kann. In der einschlägigen Literatur finden sich hierüber keine näheren Angaben.

*Tabelle 2*  
*Zusammensetzung der Eierlipide (in % der Eitrockensubstanz)*

Bezeichnung	Gesamt-Lipoide (mit Äther gerei- nigt) %	Lipoid- lösliche P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> %	Lipoid- löslicher Gesamt- stick- stoff % N	Cholin %	Äquivalente			
					P	Gesamt- N	Cholin	Colamin + andere Basen (Diffe- renz)
<i>Handelspräparate</i>								
Volleipulver	50,7	1,30	0,320	1,81	1	1,25	0,82	0,43
Volleipulver	49,6	1,29	0,318	1,92	1	1,25	0,87	0,38
Volleipulver	48,8	1,25	0,290	1,76	1	1,18	0,83	0,35
Volleipulver	49,4	1,25	0,307	1,83	1	1,25	0,86	0,39
Volleipulver	48,8	1,27	0,316	1,77	1	1,26	0,82	0,44
Volleipulver	48,5	1,23	0,298	1,73	1	1,23	0,83	0,40
Volleipulver	49,9	1,21	0,303	1,75	1	1,27	0,85	0,42
<i>Selbsthergestellte Präparate</i>								
Volleipulver, hergestellt aus 3 dän. Frischeiern	42,5	1,12	0,287	1,60	1	1,30	0,84	0,46
Eigelbpulver, hergestellt aus 3 dän. Frischeiern	69,5	1,82	0,437	2,59	1	1,22	0,84	0,38
Eigelbpulver, hergestellt aus 3 franz. Kühlh'eiern	70,1	1,81	0,456	2,69	1	1,28	0,87	0,41
Trockeneiweiss, hergestellt aus Frischeiern	0,43	—	—	0,025				
Trockeneiweiss, hergestellt aus Kühlhauseiern*)	1,17	—	—	0,056				
Trockeneiweiss des Handels, chinesisch	0,22			0,013				

\* mit etwas Dotter verunreinigt.

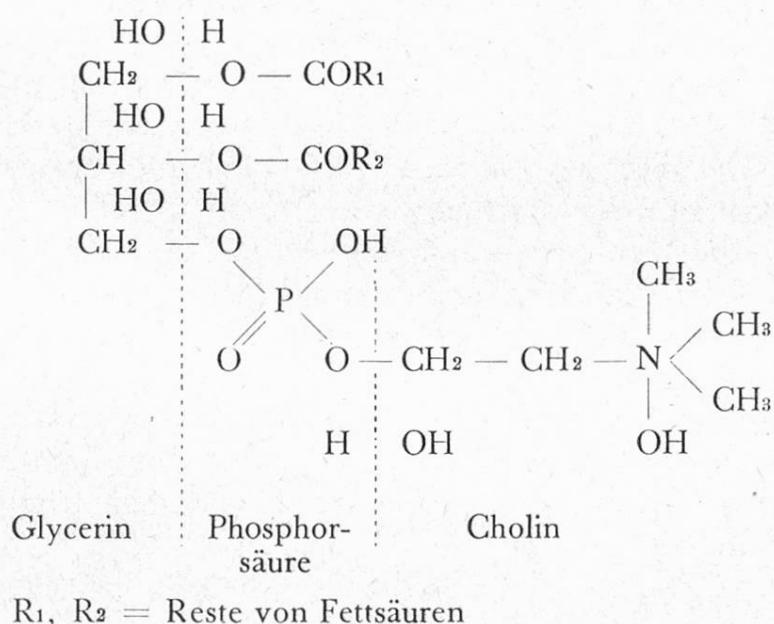
In Tabelle 2 wurden vorerst die experimentell ermittelten absoluten Werte in Gewichtsprozenten angegeben. Daraus sind Äquivalente berechnet worden, wobei durchwegs  $P = 1$  gesetzt wurde, da in den bekannten Phosphatiden stets 1 P-Atom enthalten ist.

Im reinen Lecithin ist das Molverhältnis P : N = 1 : 1. Auch dasjenige von Cholin : Gesamt-N ist 1 : 1. In allen untersuchten Eipräparaten sind die Äquivalente Gesamt-Stickstoff bedeutend höher gefunden worden als der P-Gehalt. Es müssen demnach neben dem Lecithin noch beträchtliche Mengen eines Phosphatids mit zwei basischen Gruppen pro 1 Mol Phosphorsäure enthalten sein. Ein derartiges Diaminophosphatid, das aus Phosphatiden isoliert werden konnte, ist das Sphingomyelin.

### Berechnung der drei verschiedenen Phosphatide

Im Hühner-Eigelb sind drei verschiedene Phosphatide nachgewiesen worden, es sind dies: Lecithin, Kephalin und Sphingomyelin mit nachstehenden schematischen Konstitutionsformeln.

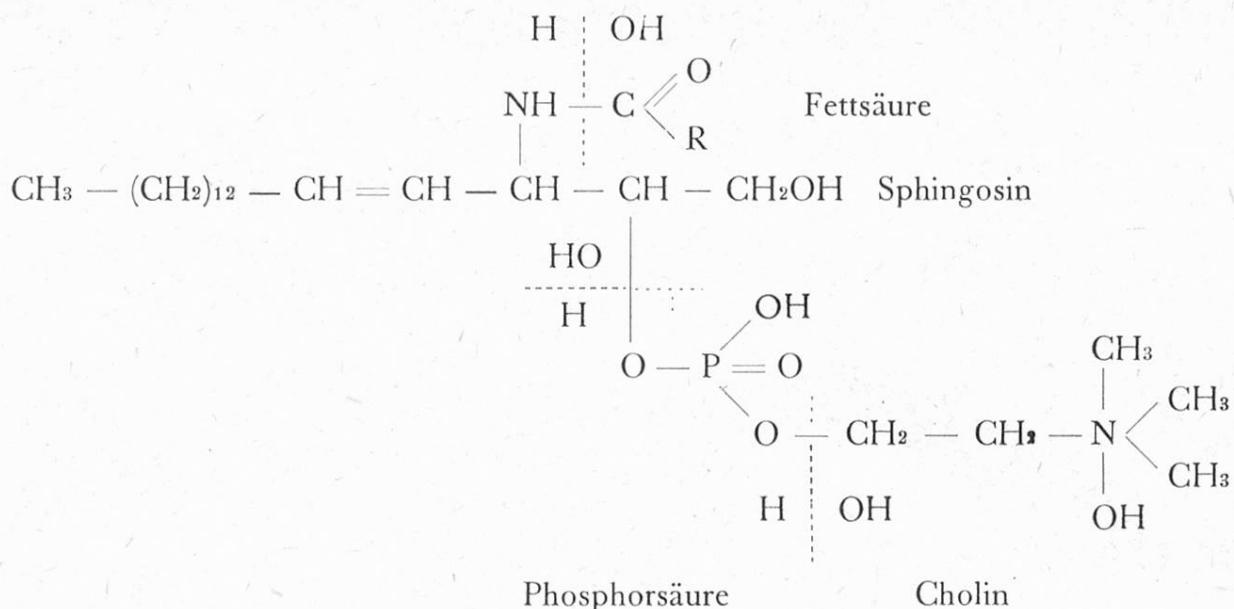
*Lecithin* setzt sich aus folgenden Bausteinen zusammen: 1 Molekül Glycerin, 2 Fettsäure-Molekülen und je 1 Phosphorsäure- und Cholin-Molekül. Diese Bausteine sind durch 4 esterartige Bindungen miteinander verknüpft.



*Kephalin* ist analog zusammengesetzt, wie die Lecithine. An Stelle des Cholins enthält es jedoch Colamin (Aminoäthylalkohol)



*Sphingomyeline* sind Diaminophosphatide. Sie enthalten den zweiwertigen Aminoalkohol Sphingosin, welcher amidartig mit einer Fettsäure verbunden ist. Eine Hydroxylgruppe ist mit Phosphorsäure verestert und an dieser haftet wiederum 1 Cholin-Molekül



Die Trennung dieser drei nahe verwandten Verbindungen voneinander ist mit beträchtlichen Schwierigkeiten verbunden. Sie erfolgt in der Regel auf Grund von Löslichkeitsunterschieden in verschiedenen organischen Lösungsmitteln<sup>12)</sup> oder durch Fällung mit Metallsalzen. Die Methoden sind jedoch alle umständlich und zeitraubend. Besondere Vorsichtsmassnahmen erfordert bereits die Isolierung der Roh-Phosphatide aus dem Ausgangsmaterial, weil sie leicht zersetzlich sind. Die Einwirkung von Luft, Licht, Feuchtigkeit und höherer Temperatur muss vermieden werden.

Aus unseren Analysen lassen sich die Anteile an Lecithin, Kephalin und Sphingomyelin annähernd berechnen, unter der Voraussetzung, dass in den Hühnereigelb-Lipoiden, neben den drei genannten, keine anderen N- und P-haltigen Verbindungen vorhanden sind. Partielle Zersetzung der zum Teil labilen Phosphatide während der Isolierung der Gesamtlipide sind dabei ohne Einfluss auf das Resultat, weil von den analytisch bestimmten Komponenten, dem lipoidlöslichen Gesamt-N, dem Gesamt-P und dem Cholin nach unserem Analysengang nichts verloren geht.

Die Berechnung der drei verschiedenen Phosphatide erfolgte auf Grund nachstehender Überlegungen: Jedes Molekül der drei erwähnten Phosphatide enthält 1 Atom Phosphor. Lecithin und Kephalin enthalten je 1 Atom N, Sphingomyelin dagegen 2 Atome N. Lecithin und Sphingomyelin enthalten je 1 Äquivalent Cholin, während im Kephalin kein Cholin enthalten ist. Es können daher die nachstehenden drei Gleichungen aufgestellt werden, wobei alle Werte in Äquivalenten einzusetzen sind:

(I) Chol. = Lec. + Sphing.  
 (II) P = Lec. + Keph. + Sphing.  
 (III) N = Lec. + Keph. + 2 Sphing.

Chol. = Cholin, Lec. = Lecithin, Keph. = Kephalin. Sphing. = Sphingomyelin

Nachdem die Gleichungen aufgelöst sind, ergeben sich folgende Beziehungen:

$$\begin{aligned}\text{Sphing.} &= \text{N} - \text{P} \\ \text{Lec.} &= \text{Chol.} + \text{P} - \text{N} \\ \text{Keph.} &= \text{P} - \text{Chol.}\end{aligned}$$

Die Äquivalente für den lipoidlöslichen Phosphor und Stickstoff, sowie für Cholin, sind in der Tabelle 2 bereits berechnet worden. Dabei wurde, wie erwähnt, der lipoidlösliche Phosphor willkürlich als 1 angenommen.

Mit Hilfe der drei Gleichungen lassen sich die Äquivalente an Lecithin, Kephalin und Sphingomyelin, bezogen auf lipoidlöslichen Phosphor = 1 berechnen. Da die absolute Menge an lipoidlöslichem Phosphor des Eipulvers bestimmt worden ist, lassen sich auch die absoluten Gehalte an Lecithin, Kephalin und Sphingomyelin berechnen, wenn man ihre Molekulargewichte kennt.

Nun sind bekanntlich die Molekulargewichte dieser drei Phosphatide abhängig von der Kettenlänge der im Molekül gebundenen Fettsäuren. Man muss daher für die Berechnung des Phosphatidgehaltes entweder ein mittleres Molekulargewicht für die Phosphatide einsetzen oder aber die Resultate für ein ganz bestimmtes, z. B. ein mit Palmitin- oder Stearinsäure verestertes Phosphatid berechnen. Nach *Grün*<sup>13)</sup> sind die Lecithine, Lysolecithine und Sphingomyelin als Anhydroverbindungen aufzufassen, d. h. innere Salze von Phosphorsäure-Cholinestern.

Wir haben zur Berechnung unserer Werte willkürlich die nachstehenden Molekulargewicht zu Grunde gelegt, welche dem Handbuch entnommen worden sind:

Name	Molekulargewicht der Anhydroform	Umrechnungsfaktor f ( $f \times \text{P}_2\text{O}_5 = \text{Phosphatid}$ )
Stearo-oleo-lecithin	787,7	11,10
Stearo-sphingomyelin	730,7	10,30
Stearo-linolo-kephalin	743,7	10,48

In Tabelle 3 sind sowohl die Äquivalente, als auch die daraus berechneten Mengen von Lecithin, Kephalin und Sphingomyelin in Prozenten der Trockensubstanz angegeben. Die Zahlen der drei letzten Spalten sind allerdings mit einiger Vorsicht zu bewerten. Während die in der Tabelle 2 aufgeführten absoluten Werte für P, N und Cholin innerhalb der Versuchsfehlergrenze ( $\pm 2\%$ ) richtig sind, stimmen die daraus berechneten Gehalte an Lecithin, Kephalin und Sphingomyelin, wie bereits erwähnt, nur unter der Voraussetzung, dass in den Eigelblipoiden keine anderen stickstoff- und phosphorhaltigen Verbindungen enthalten sind. Nach *Grün* ist es allerdings unwahrscheinlich, dass im Hühner-Eigelb, ausser den drei genannten Typen, Phosphatide von anderer Konstitution vorkommen. Bei den zahlreichen in der Literatur beschriebenen Präparaten mit anderem N- und P-Verhältnis soll es sich um Gemische oder teilweise abgebaute Phosphatide handeln.

Tabelle 3  
Berechnete Anteile von Lecithin, Kephalin und Sphingomyelin

	Lipoid- lös. $P_2O_5$ i. d. Tr. %	Äquivalente bezogen auf P = 1			In der Eitrockensubstanz		
		Lecithin	Kephalin	Sphingo- myelin	Lecithin %	Kephalin %	Sphingo- myelin %
1 Volleipulver	1,30	0,57	0,18	0,25	8,2	2,4	3,3
2 Volleipulver	1,29	0,52	0,13	0,25	7,4	1,8	3,3
3 Volleipulver	1,25	0,65	0,17	0,18	9,0	2,2	2,3
4 Volleipulver	1,25	0,61	0,14	0,25	8,5	1,8	3,2
5 Volleipulver	1,27	0,56	0,18	0,26	7,9	2,4	3,4
6 Volleipulver	1,23	0,60	0,17	0,23	8,2	2,2	2,9
7 Volleipulver	1,21	0,58	0,15	0,27	7,8	1,9	3,4
8 Volleipulver selbst hergestellt	1,12	0,54	0,16	0,30	6,7	1,9	3,5
9 Eigelbpulver selbst hergestellt	1,82	0,62	0,16	0,22	12,5	3,1	4,1
10 Eigelbpulver selbst hergestellt	1,81	0,59	0,13	0,28	11,9	2,5	5,2

*Nottbohm* und *Mayer*<sup>14)</sup> nehmen an, dass Sphingomyeline in nennenswerten Mengen in Eigelb- und Pflanzenphosphatiden nicht vorkommen. Nach unseren Berechnungen in Tabelle 3 dagegen würde der Sphingomyeline-Anteil im Mittel rund  $1/4$  der gesamten Eigelb-Phosphatide ausmachen.

### III. Sphingomyelin-Bestimmungen

*Tannhauser* und Mitarbeiter haben die Phosphatide im Blutserum<sup>15)</sup> sowie in verschiedenen tierischen Organen<sup>16)</sup> bestimmt und neben Lecithin und Kephalin durchwegs beträchtliche Mengen Sphingomyelin gefunden. Wir haben die von *Tannhauser* angegebene Methodik<sup>15)</sup> an einigen unserer Eipulver ausprobiert. Sie beruht auf folgendem Prinzip:

Das Phosphatid-Gemisch wird in Methylalkohol gelöst, dann wird mit Salzsäure angesäuert und hierauf mit einer Lösung von Reineckesalz in Methylalkohol versetzt. Die Sphingomyeline werden als Reineckate gefällt, während Lecithine und Kephaline auf diese Weise in Lösung bleiben. *Tannhauser* und Mitarbeiter filtrieren die Sphingomyelin-Reineckate ab, waschen sie mit Äther aus, trocknen und wägen den Rückstand.

Wir haben in analoger Weise wie folgt gearbeitet:

0,5 bis 0,7 g Eitrockensubstanz wurden in einem Zentrifugenglas mit 15 bis 20 cm<sup>3</sup> Aceton versetzt, mit einem Glasstab alle Knöllchen gut verrieben, dann kräftig geschüttelt, zentrifugiert und die überstehende klare Lösung abgegossen. Diese Acetonbehandlung wurde noch zweimal wiederholt, um das Material möglichst vollständig vom Neutralfett zu befreien. Die so erhaltene fettfreie,

aber phosphatidhaltige Eisubstanz wurde hierauf mit 10 bis 15 cm<sup>3</sup> einer Mischung bestehend aus gleichen Raumteilen Methanol-Chloroform geschüttelt, im Wasserbad zum Sieden erhitzt und dann zentrifugiert. Die überstehende Lösung mit den Phosphatiden wurde in ein Kölbchen abgegossen und die Extraktion des Rückstandes noch zweimal in gleicher Weise wiederholt. Die drei Phosphatid-Auszüge wurden vereinigt und das Lösungsmittel auf dem Wasserbad abdestilliert. Der Abdampf-Rückstand wurde in 3 bis 4 cm<sup>3</sup> Methanol unter Erwärmung gelöst und durch ein Asbestfilter (Allihnröhrchen) filtriert und gut mit Methanol nachgewaschen. Die klare Methanolösung der Phosphatide, welche 10 bis 15 cm<sup>3</sup> betrug, wurde in einem kleinen Becherglas mit drei Tropfen konzentrierter Salzsäure und 0,1 g Reineckesalz (gelöst in 2 cm<sup>3</sup> Methanol) versetzt. Zunächst entstand eine Trübung, dann eine Fällung. Das Gemisch blieb über Nacht im Eisschrank stehen. An den Wandungen bildeten sich Drusen von weichen, rosarot gefärbten Kristallen. Der Niederschlag des Sphingomyelin-Reineckates wurde durch einen gewogenen Goochiegel filtriert, mit eisgekühltem Methanol ausgewaschen bis die Waschflüssigkeit farblos abtropfte. Dann wurde vorschriftsgemäss mit Äther gewaschen. Der Äther löste beträchtliche Mengen einer rosarot gefärbten Verbindung, welche auf Zusatz von Methanol wieder ausgeschieden wurde. Nach den Angaben von *Tannhauser* hat die Ätherbehandlung den Zweck evtl. gefällte Sterine zu lösen. Das Sphingomyelin-Reineckat sollte in Äther nicht löslich sein. Der mit Äther gewaschene Niederschlag wurde schliesslich getrocknet und gewogen. Die gefundenen Resultate sind in Tabelle 4 wiedergegeben. Zur Berechnung des Sphingomyelins multiplizieren *Tannhauser* und *Setz*<sup>15)</sup> das gewogene Sphingomyelin-Reineckat mit 0,877. Diesen Faktor haben sie auf Grund von eigenen Molekulargewichts-Bestimmungen berechnet.

*Tabelle 4*  
*Sphingomyelin-Bestimmungen in Trockeneipräparaten*

	Vollei-pulver Nr. 5	Vollei-pulver Nr. 6	Eigelb Nr. 9 selbst hergestellt	Eigelb Nr. 10 selbst hergestellt
Sphingomyelin-Reineckat, Auswaage in % der Eitrockensubstanz	0/0	0/0	0/0	0/0
% P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> im Reineckat-Niederschlag	4,88	5,75	9,25	8,25
Als Reineckat fällbare P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> in der Eitrockensubstanz	7,02	7,11	7,52	7,41
0,343	0,408	0,690	0,672	
Stearosphingomyelin, ber. aus P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> des Reineckat-Niederschlages (f = 10,3)	3,5	4,2	7,1	6,9
Sphingomyelin, ber. nach <i>Tannhauser</i> (f = 0,877)	4,27	5,04	8,10	7,23
Stearosphingomyelin, ber. aus den Ge- halten an N, P und Cholin	3,4	2,9	4,1	5,2

Wir haben anschliessend im Sphingomyelin-Reineckat noch den P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Gehalt bestimmt. Der Rückstand wurde mit Chloroform vom Tiegel gelöst, dann mineralisiert und die Phosphorsäure nach Lebensmittelbuch gefällt. Der P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Gehalt der Sphingomyelin-Reineckat-Niederschläge schwankte zwischen 7,0 und 7,5 %. Aus dem P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Gehalt lässt sich das Sphingomyelin ebenfalls berechnen. Wir benutzten den Faktor 10,3, welcher einem Stearosphingomyelin (Molekulargewicht = 730,7) entspricht. Die aus der Reineckat-Fällung berechneten Sphingomyelin-Gehalte sind durchwegs um 1—4 % höher als die aus dem Molverhältnis von N : P : Cholin berechneten. An der Anwesenheit von Sphingomyelin in Eigelb-Phosphatiden dürfte auf Grund dieser Ergebnisse kaum gezweifelt werden. Die Übereinstimmung der nach den verschiedenen Methoden berechneten Sphingomyelin-Gehalte ist allerdings unbefriedigend. Die Reineckat-Methode gibt zweifellos zu hohe Werte. Die Vermutung liegt nahe, dass bei der Reineckat-Fällung neben Sphingomyelin noch andere Verbindungen mitgefällt werden. Die Ätherlöslichkeit eines beträchtlichen Anteils des Niederschlages deutet ebenfalls auf andere Verbindungen hin. Möglicherweise handelt es sich dabei um Zersetzungspprodukte von Phosphatiden, da die Herstellung der Trockeneipräparate und die Gewinnung der Phosphatide nicht unter den schonendsten Bedingungen erfolgte.

Die Methode *Tannhauser* kann daher in der von uns angewandten Form für die Untersuchung von Lebensmitteln nicht empfohlen werden. Sie scheint nicht unbedingt spezifisch für Sphingomyelin zu sein.

## IV. Methodik

### 1. Bestimmung der Gesamtlipole

*Prinzip:* Die Gesamtlipole werden mit Alkohol-Benzol extrahiert.

*Ausführung:* Zirka 1 g Eipulver (genau gewogen) werden in ein Faltenfilter von 15 cm Durchmesser gebracht und in dem von uns<sup>17)</sup> früher empfohlenen Apparätschen extrahiert. Das Faltenfilter wird zunächst ins 150 cm<sup>3</sup> fassende Weithalskölbchen mit 40 bis 50 cm<sup>3</sup> einer Mischung bestehend aus gleichen Raumteilen Alkohol und Benzol gebracht und während 1 Stunde gekocht. Dabei wird das «gebundene» Fett abgespalten, und der grösste Teil der Lipoide wird bereits herausgelöst. Der Aufsatz wird nun abgenommen, das Faltenfilter mit einer Pinzette herausgezogen und nach dem Abtropfen in den Aufsatz gebracht. Man stellt die einzelnen Teile wieder ineinander und extrahiert nochmals während einer weiteren Stunde, womit die Extraktion beendet ist. Bei längerer Extraktion wird, wie Versuche ergeben haben, kein Fett mehr aus dem Rückstand herausgelöst. Man destilliert das Lösungsmittel-Gemisch auf dem Wasserbad ab, trocknet unter öfterem Durchblasen von Luft und wägt nach dem Erkalten im Exsikkator die Gesamtlipole. Die Lipoide sollen in Äther klar löslich sein. Andernfalls wird die ätherische Lösung durch ein Asbestfilter (Allihn-Röhrchen)

filtriert und in einem 50 bis 100 cm<sup>3</sup> fassenden Stehkölbchen oder Erlenmeyer wieder eingedampft. Sie hinterlässt die reinen Gesamtlipoide, welche getrocknet und endgültig gewogen werden.

## 2. Bestimmung des Cholins

*Prinzip:* Die mit Alkohol-Benzol extrahierten Gesamtlipoide werden mit HCl im Autoklaven gespalten. In einem aliquoten Teil der filtrierten, sauren Aufschlussflüssigkeit fällt man das Cholin mit Reineckesalz und bringt es als Cholin-Reineckat zur Wägung.

*Reagenzien:* Frisch zubereitete 4 % ige Ammonium-Reineckat-Lösung NH<sub>4</sub>[Cr(CNS)<sub>4</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>].

Man löst das Salz in warmem Wasser und filtriert die Lösung.

### Ausführung:

- a) *Spaltung der Lipoide.* Zu den aus 1 g Eitrockensubstanz herrührenden, unzureinigten Gesamtlipoiden (im kleinen Stehkölbchen oder Erlenmeyer) gibt man mittels Pipette oder Bürette 4 cm<sup>3</sup> 25 % ige Salzsäure (d = 1,12) und 16 cm<sup>3</sup> Wasser. Das Gesamtvolumen der wässrigen Phase beträgt somit 20 cm<sup>3</sup>. Man wägt das Kölbchen samt Inhalt auf der Tarierwaage und notiert das Gewicht. Nun erhitzt man die Mischung während 1 Stunde im Autoklaven auf 4,5 atü. Nach dem Abkühlen wägt man das Kölbchen wieder, ergänzt das verdampfte Wasser und setzt noch weitere 5 cm<sup>3</sup> Wasser zu. Die wässrige Phase beträgt jetzt 25 cm<sup>3</sup>. (Das Überführen der Aufschlussflüssigkeit in ein 25 cm<sup>3</sup> Messkölbchen ist wegen den beträchtlichen Mengen ungelöster Fettsäuren nicht empfehlenswert.) Zur Entfärbung der Lösung setzt man 0,05 g Aktivkohle zu, schwenkt gut um und filtriert durch ein trockenes Rundfilter von 9 cm.
- b) *Fällung des Cholins.* Man pipettiert 20 cm<sup>3</sup> des klaren, meist farblosen Filtrates (entsprechend 4/5 der Einwaage) in ein 50 cm<sup>3</sup> Becherglas. Unter Rühren mit einem Glasstab gibt man tropfenweise 3 cm<sup>3</sup> einer frisch bereiteten, filtrierten 4 % igen Reineckesalz-Lösung zu, wobei sofort eine Fällung von rosafarbenem, seidenglänzendem Cholin-Reineckat entsteht. Zur vollständigen Abscheidung lässt man das Becherglas mindestens 30 Minuten im Eisschrank stehen. Man filtriert durch einen gewogenen Goochtiegel oder Glassintertiegel und wäscht portionenweise (je 1 cm<sup>3</sup>) mit total 6 cm<sup>3</sup> Eiswasser und anschliessend ebenfalls in kleinen Portionen mit insgesamt 6 cm<sup>3</sup> eisgekühltem absolutem Alkohol. Der Tiegel wird während 30 Minuten bei 103° getrocknet und gewogen.

Berechnung: 1 Teil Cholin-Reineckat = 0,2867 Teile Cholin.

## 3. Bestimmung der lipoidlöslichen Phosphorsäure

Die aus 0,5 bis 1,0 g Eitrockensubstanz isolierten Gesamtlipoide werden mit 5 cm<sup>3</sup> 0,5 n-alkoholischer Kalilauge während 15 Minuten verseift. Die Seifen-

lösung führt man quantitativ in eine Platinschale über, versetzt mit 1 cm<sup>3</sup> 10%iger Magnesiumacetatlösung, dampft auf dem Wasserbad zur Trockne und verascht vorsichtig. In der Asche bestimmt man die Phosphorsäure entweder gravimetrisch nach *von Lorenz*<sup>18)</sup> in der Modifikation von *von Fellenberg*<sup>19)</sup> oder kolorimetrisch nach *Wuhrmann* und *Högl*<sup>20)</sup>

#### 4. Bestimmung des lipoidlöslichen Gesamtstickstoffs

Die aus 2 g Eitrockensubstanz isolierten Gesamtlipoide werden in Äther gelöst, durch ein Allihn-Röhrchen filtriert und quantitativ in einen Kjeldahlkolben übergeführt. Nach dem Abdestillieren des Äthers verbrennt man die Lipoide mit 7 cm<sup>3</sup> konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> unter Zusatz von 3 g K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,1 g HgO, 0,01 g Se und 10 bis 20 cm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, welches man in kleinen Portionen zugibt. Nach vollständiger Verbrennung bestimmt man das gebildete Ammoniak wie üblich.

#### Zusammenfassung

1. Es wird eine Methode für die gravimetrische Cholin-Bestimmung beschrieben, welche auf der Fällung des Cholins mit Reinecke-Salz beruht.
2. Der Cholin-Gehalt verschiedener Eipulver des Handels, sowie von selbst präparierten Trockenvollei und Trockeneigelb wurde bestimmt. Die gefundenen Werte für Trockenvollei schwanken von 1,60 bis 1,92 % Cholin. Sie sind durchwegs etwas höher als diejenigen von *Nottbohm* und *Mayer*, was auf Cholinverluste bei der von diesen Autoren verwendeten Enneaiodid-Methode zurückgeführt werden dürfte.
3. Neben dem Cholingerhalt wurden ausserdem die Gesamtlipoide, die lipoidlösliche Phosphorsäure und der lipoidlösliche Stickstoff bestimmt. Aus diesen Werten sind die Gehalte an Lecithin, Kephalin und Sphingomyelin der Trockeneipräparate berechnet worden.
4. Eine von *Tannhauser* und Mitarbeitern veröffentlichte Methode zur direkten Bestimmung des Sphingomyelins mittels Reinecke-Salz wurde bei Eipulvern angewendet. Die nach dieser Methode erhaltenen Werte fielen zu hoch aus. Vermutlich ist das Verfahren zu wenig spezifisch, und es werden neben Sphingomyelin auch andere Phosphatide oder Zersetzungspprodukte von Phosphatiden erfasst.

#### Résumé

1. On décrit une méthode de dosage gravimétrique de la choline basée sur sa précipitation comme reineckate.
2. On a dosé la teneur en choline de diverses poudres d'œuf du commerce ainsi que celle de poudres d'œuf entier et de jaune d'œuf préparées soi-même. Les valeurs trouvées pour la choline, dans la poudre d'œuf entier, varient entre 1,60 et 1,92 %. Ces valeurs sont, en règle générale, un peu plus élevées que celles indiquées par *Nottbohm* et *Mayer*. Ces deux auteurs ont utilisé la méthode à l'enneaiodure, dans laquelle, semble-t-il, il se produit des pertes de choline.
3. En sus de la teneur en choline on a dosé les lipoids totaux, l'acide phosphorique liposoluble et l'azote liposoluble. Des valeurs ainsi obtenues on a calculé les teneurs en lécithine, en céphaline et en sphingomyéline des poudres d'œuf examinées.

4. On a appliqué aux poudres d'œuf une méthode de dosage direct de la sphingomyéline comme reineckate, publiée par *Tannhauser* et ses collaborateurs. Les valeurs obtenues ainsi sont trop élevées. Il se peut que cette méthode soit trop peu spécifique et que d'autres phosphatides ou des produits de dégradation des phosphatides soient dosés avec la sphingomyéline.

### Summary

1. A method for the gravimetric determination of choline as reineckate is described. The choline contents of various whole egg powders and egg yolk powders has been determined; whole egg powders contain from 1,60 to 1,92 % choline always slightly more than found by *Nottbohm* and *Mayer* (these authors used the ennea-iodide-method).
2. Besides the choline, the total fat substances, the oil-soluble phosphoric acid and oil-soluble nitrogen were also determined. From the data thus obtained the lecithine, cephaline and sphingomyeline contents of egg powders can be calculated.
3. The method of *Tannhäuser* and co. for the direct determination of sphingomyelin as reineckate has been applied to egg powders. This method gives too high results, and is therefore not sufficiently accurate.

### Literatur

- <sup>1)</sup> *J. Grossfeld*: Handbuch der Eierkunde, Verlag J. Springer, Berlin, S. 129 (1938).
- <sup>2)</sup> *F. E. Nottbohm* und *F. Mayer*: Z.U.L. **66**, 585 (1933).
- <sup>3)</sup> *W. Roman*: Biochem. Ztschr. **219**, 218 (1930) zitiert nach Handbuch der Lebensmittelchemie, Bd. IV, S. 179 (1939).
- <sup>4)</sup> *F. E. Nottbohm* und *F. Mayer*: Z.U.L. **63**, 176 und 620 (1932); **65**, 55 (1933); **66**, 585 (1933); Chem. Ztg. **56**, 881 (1932).
- <sup>5)</sup> *J. Kampfhammer* und *C. Bichoff*: Ztschr. physiolog. Chem. **191**, 179 (1930), zitiert nach Handbuch Bd. IV, S. 719 (1938).
- <sup>6)</sup> *Florence Jan Ross Beattie*: Biochem. Journ. (Brit.) **30**, 1554 (1936).
- <sup>7)</sup> *N. A. Barbieri*: Gazz. chim. Ital. **47**, I, 1 (1917).
- <sup>8)</sup> *J. Grossfeld* und *G. Walter*: Z.U.L. **67**, 510 (1934).
- <sup>9)</sup> *J. Grossfeld*: Handbuch der Eierkunde, S. **127** (1938).
- <sup>10)</sup> *H. Hadorn* und *R. Jungkunz*: diese Mitt. **43**, 1 (1952).
- <sup>11)</sup> *A. Mac Lean*: Z. physiolog. Chem. **59**, 223 (1919).
- <sup>12)</sup> Handbuch der Lebensmittelchemie Bd. IV. S. 715—721, Verlag J. Springer, Berlin (1939).
- <sup>13)</sup> *A. Grün*: In «Chemie und Techologie der Fette und Fettprodukte» von Hefter-Schönfeld Bd. I S. 456, Verlag J. Springer (1936).
- <sup>14)</sup> *F. E. Nottbohm* und *F. Mayer*: Z.U.L. **66**, 21 (1933).
- <sup>15)</sup> *S. J. Tannhauser* und *P. Setz*: Journ. Biol. Chem. **116**, 533 (1936).
- <sup>16)</sup> *S. J. Tannhauser*, *J. Benotti*, *A. Walcott* und *H. Reinstein*: Journ. Biol. Chem. **129**, 709 (1939); **129**, 717 (1939).
- <sup>17)</sup> *H. Hadorn* und *R. Jungkunz*: Z.U.L. **93**, 277 (1951).
- <sup>18)</sup> *N. von Lorenz*: Z.U.L. **17**, 449 (1909).
- <sup>19)</sup> *Th. von Fellenberg*: diese Mitt. **21**, 212 (1930); Schweiz. Lebensmittelbuch 4. Aufl. S. 132 (1937).
- <sup>20)</sup> *H. Wührmann* und *O. Högl*: diese Mitt. **35**, 273 (1944).