

Beiträge zur Analyse der stickstoffhaltigen Substanzen des Thierkörpers.

Von

Dr. August Hirschler.

(Aus dem chemischen Laboratorium des physiologischen Institutes in Berlin.)
(Der Redaktion zugegangen am 3. August 1886.)

So unbestrittene Kenntnisse man auch über die chemischen Eigenschaften und die physiologische Bedeutung der stickstoffhaltigen Substanzen des Thierkörpers besitzt, gibt es doch eine Reihe von Fragen auf diesem Gebiete, die trotz mannigfacher Untersuchungen noch zu keiner endgültigen Entscheidung gelangten.

Die in den folgenden Zeilen mitzutheilenden Untersuchungen habe ich auf Veranlassung des Herrn Dr. Kossel ausgeführt und ich glaube mit denselben zur physiologischen Kenntniss der benannten Substanzen Einiges beitragen zu können, sowohl was deren Nachweis, als auch Entstehung im thierischen Organismus betrifft.

I. Die Methoden, welche einen Einblick in die quantitativen Verhältnisse gestatten, die zwischen den stickstoffhaltigen Bestandtheilen der Gewebe obwalten, sind bisher nur wenig ausgebildet. Seitdem die Phosphorwolframsäure durch Scheibler und Hofmeister als Fällungsmittel für eine grosse Menge stickstoffhaltiger Stoffe in die Chemie eingeführt ist, besitzen wir ein Mittel, um eine Klasse der Gewebsbestandtheile von einer andern Klasse zu trennen. Von den häufiger vorkommenden Thierstoffen werden — abgesehen von den Ammonsalzen — folgende durch Phosphorwolframsäure gefällt: Eiweiss, Pepton, Leim und die verwandten

Stoffe, ferner die stickstoffreichen Basen (Xanthin, Guanin, Hypoxanthin, Adenin) und Kreatinin; nicht gefällt werden: Leucin, Asparaginsäure, Glycocoll, Harnstoff, Kreatin.

Die Phosphorwolframsäure eignet sich demnach zur Trennung von Pepton einerseits und dem Leucin, Asparaginsäure, Glycocoll andererseits.

Für die Erkenntniss vieler physiologischer Verhältnisse ist eine selbst nur annähernde quantitative Trennung in dem gedachten Sinne sehr wichtig.

Ich habe demgemäss die Wirkung dieses Fällungsmittels einer erneuten Untersuchung unterzogen und seine Anwendung auf einige physiologisch interessante Fälle versucht. Ich muss ausdrücklich hervorheben, dass die Beurtheilung der mit Hülfe meiner Methoden erzielten Resultate eine Kritik des einzelnen Falles erheischt; denn der Umstand, dass irgend eine stickstoffhaltige Substanz durch Phosphorwolframsäure gefällt wird oder nicht, gestattet nur den Schluss, dass diese Substanz einer der beiden Klassen angehört, sagt aber nichts Weiteres über die Natur der betreffenden Substanz aus.

Prüfung des angewandten Verfahrens.

Die Versuche wurden — im Anschluss an frühere Versuche von Dr. Kossel, die bisher nicht mitgetheilt wurden — in der Weise angestellt, dass das Verhältniss des Stickstoffs der durch Phosphorwolframsäure nicht fällbaren Substanzen zu dem Gesamtstickstoff des untersuchten Objectes festgestellt wurde. Die Stickstoffbestimmungen wurden mit Hülfe der Kjeldahl'schen Methode ausgeführt. Zunächst waren folgende Fragen zu entscheiden:

A. Beeinträchtigt die Gegenwart von Phosphorwolframsäure die Ausführung der Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl, oder ist es nöthig, den Ueberschuss dieses Fällungsmittels vor Beginn der Analyse zu entfernen?

B. Wird Eiweiss, Propepton, Pepton völlig durch Phosphorwolframsäure gefällt?

C. Wird Leucin oder ein ähnlicher durch Phosphorwolframsäure an sich nicht fällbarer Körper mit dem entstehenden Niederschlage mitgerissen?

A. Zur Entscheidung der ersten Frage wurden folgende Versuche angestellt:

a) Eine Lösung von Asparagin wird in zwei gleiche Theile getheilt, der erste Theil mit 10 cbcm. concentrirter H_2SO_4 und 5 cbcm. Phosphorwolframsäurelösung versetzt, eingedampft und nach Kjeldahl behandelt; der zweite Theil in gleicher Weise ohne den Zusatz von Phosphorwolframsäure. Der erste Theil neutralisirt 26,6; der zweite Theil ebenfalls 26,6 cbcm. $\frac{1}{20}$ Normal-Schwefelsäure.

b) 10 cbcm. Leucinlösung ohne Phosphorwolframsäure neutralisirt 9,4 cbcm.; 10 cbcm. derselben Lösung mit Phosphorwolframsäure 9,5 cbcm. $\frac{1}{20}$ Normal-Schwefelsäure. Nach dem Erfolge dieses Versuches hielt ich es nicht für nothwendig, die überschüssige Phosphorwolframsäure vor der Ausführung der Kjeldahl'schen Bestimmung zu entfernen.

B. Die zweite Frage, ob Propepton und Pepton völlig durch Phosphorwolframsäure gefällt werden, versuchte ich durch folgende Experimente zu lösen:

Ich bereitete mir vorerst Propepton und Pepton auf folgende Weise: 100 gr. Witte's Pepton wurden in einem Liter Wasser aufgelöst, filtrirt, das Filtrat mit kohlensaurem Natron neutralisirt, aufgeköcht, filtrirt. In dem mit Essigsäure angesäuerten Filtrate die Propeptone durch Sättigung mit Kochsalz gefällt, die Flüssigkeit filtrirt, der Rückstand mit Alcohol gefällt (Propepton). Das obige Filtrat wurde eingedampft, durch Dialyse vom Salze befreit, mit Alcohol gefällt (Pepton).

Weiters stellte ich mir Pepton so dar, dass ich 100 gr. käufliches Pepton von Witte mit künstlicher Verdauungsflüssigkeit (Schweinemagenschleimhaut mit verdünnter Salzsäure 8 : 1000 extrahirt und filtrirt) bei constanter Temperatur von $37^\circ C$. 24 Stunden lang, unter weiterer Zufügung von HCl , der Verdauung überliess. Durch Neutralisation mit

Na_2CO_3 und Aufkochen wurde die weitere Verdauung sistirt; die Propeptone fällte ich in saurer Lösung durch Sättigung mit Kochsalz; die filtrirte Flüssigkeit, welche mit Essigsäure und Ferrocyankalium keine Trübung gab, wurde eingedampft, behufs Entfernung des NaCl dialysirt, wieder eingedampft, das Pepton mit absolutem Alcohol gefällt, filtrirt. Der Rückstand bei 100° getrocknet, gab mir das «Pepton». Eine weitere Trennung durch Ammoniumsulfat wurde nicht vorgenommen, da das Ammoniaksalz schwer zu entfernen ist.

Im Besitze dieser Präparate machte ich nun mittelst der Kjeldahl'schen Methode in zwei Richtungen Versuche über die Fällbarkeit derselben durch Schwefelsäure und Phosphorwolframsäure:

50 cbcm. einer 1procentigen Peptonlösung, 10 cbcm. concentrirte Schwefelsäure, vor dem Zugießen verdünnt; 40 cbcm. Phosphorwolframsäurelösung wurden auf 200 cbcm. verdünnt; vom entstehenden Niederschlage abfiltrirt. Vom Filtrat 100 cbcm. mit 5 cbcm. concentrirter H_2SO_4 versetzt; davon ungefähr der dritte Theil in ein Kölbchen gegossen und auf dem Sandbade erhitzt, während aus einem Gasometer durch ein fein ausgezogenes, bis zum Boden des Kölbchens reichendes Rohr ein ständiger Luftstrom durchging; allmählich wurde der Rest hinzugefügt. Die Durchleitung eines Luftstromes erwies sich bei meinen Untersuchungen als sehr zweckmässig, theils um das Eindampfen der Flüssigkeit zu fördern, theils um das lästige, eventuell mit Verlusten verbundene Stossen des Kölbchens zu vermeiden. Das Erhitzen der Flüssigkeit mit H_2SO_4 wurde so lange fortgesetzt, bis über dem grünlich gelben Niederschlag die Flüssigkeit klar wurde; nach der Oxydation mit überschüssigem Permanganat wurde die Bestimmung des Ammoniak durch Destillation, Auffangen in $\frac{1}{20}$ Normal-Schwefelsäure und Titrirung mit Natronlauge ausgeführt, als Indicator diente Rosolsäure.

Bei diesem Versuche, den ich ein zweites Mal wiederholte, stellte sich heraus, dass zur Neutralisation des in 50 cbcm. $\frac{1}{20}$ Normal- H_2SO_4 geleiteten Destillates 50 cbcm.

$\frac{1}{20}$ Normal-NaHO erforderlich waren, somit das Pepton durch Schwefelsäure und Phosphorwolframsäure vollkommen fällbar ist.

C. Nachdem ich somit erwiesen hatte, dass das Pepton völlig durch Phosphorwolframsäure gefällt wird, wurden weitere Versuche angestellt, theils um die Fällbarkeit des Propeptons durch das genannte Reagens zu untersuchen, theils um festzustellen, ob die durch Phosphorwolframsäure nicht fällbaren Substanzen in ihrem Verhalten gegen dieses Reagens durch einen etwa entstehenden Niederschlag beeinflusst werden.

Es wurde vorerst der Stickstoffgehalt in 10 cbcm. einer beliebigen Asparaginlösung bestimmt. Der Gesamtstickstoff in 10 cbcm. Asparaginlösung entsprach einem Stickstoffgehalt der Lösung von 18,76 % N. Sodann der Stickstoffgehalt in 10 cbcm. derselben, nachdem in dieser Lösung ein Niederschlag von Propepton mit Phosphorwolframsäure erzeugt war:

- 20 cbcm. Asparaginlösung,
- 20 cbcm. Propeptonlösung,
- 10 cbcm. concentrirte H_2SO_4 ,
- 40 cbcm. Phosphorwolframsäurelösung

wurden auf 200 cbcm. verdünnt, filtrirt. Vom Filtrat genau 100 cbcm. abgemessen, mit 5 cbcm. conc. H_2SO_4 versetzt und der Stickstoff bestimmt. Gefunden: 18,69 % N.

Ein weiterer Versuch war der folgende:

a) Bei der Stickstoffbestimmung in 10 cbcm. Leucinlösung wurden gefunden: 10,85 % N.

- b) 20 cbcm. Leucinlösung,
- 20 cbcm. Propeptonlösung,
- 40 cbcm. Phosphorwolframsäurelösung,
- 10 cbcm. conc. H_2SO_4 auf 100 cbcm. verdünnt,

vom entstehenden Niederschlag abfiltrirt. 100 cbcm. des Filtrates mit 5 cbcm. conc. H_2SO_4 versetzt, ergaben: 10,78 % N.

Aus diesen Versuchen geht demnach hervor, dass bei peptonhaltigen Lösungen die Kjeldahl'sche Methode nach völliger Ausfällung der Peptone zum

Nachweise und zur quantitativen Bestimmung gleichzeitig anwesenden Leucins oder Asparagins zu verwenden ist.

Nach Feststellung dieser Thatsache ging ich nun daran:

II. Ueber die Entstehung der Amidosäuren bei der Pepsinverdauung mittelst derselben Methode Untersuchungen anzustellen, die uns zur Entscheidung der noch immer Gegenstand gegentheiligter Ansichten bildenden Frage, ob bei verlängerter Einwirkung der Magenverdauungsflüssigkeit sich aus den Peptonen auch Amidosäuren bilden, geeignet schien.

Während Hoppe-Seyler behauptet¹⁾, dass: «bei verlängerter Einwirkung der Verdauungsflüssigkeit sich aus den Peptonen langsam Leucin, Tyrosin und unbekannte Körper bilden», bestreitet Kühne²⁾ diese weitere Spaltung bei der Magenverdauung. Während letzterer Forscher bei der Verdauung von reinen Eiweissstoffen mit gereinigtem Trypsin fand, dass «zunächst von dem Pepsinpepton nicht zu unterscheidende Körper entstehen und dass es diese sind, welche in Antipepton und die übrigen meist krystallinischen Zerstellungsproducte zerfallen», behauptet Kühne, dass «ein derartiger Process bei der Pepsinverdauung echter Eiweissstoffe nicht vorkommt; diese liefert vielmehr ein etwas grösseres Gewicht Pepton, als dem in Verdauung gegebenen Albumin entspricht (durch H₂O Aufnahme), beim Fibrin keine Spur von Amidosäuren, wenn man die selbstverständliche Vorsicht beachtet, Beimengungen aus der Drüsensubstanz der Magenschleimhaut zu vermeiden».

Das Princip, welches den nun zu beschreibenden Untersuchungen zu Grunde lag, war folgendes: Nachdem die Kjeldahl'sche Methode nach den Obigen sich zur Trennung von Propepton und Pepton einerseits, von gleichzeitig anwesendem Leucin andererseits brauchbar erwies, konnte dieselbe auch verwendet werden, um zu ermitteln, ob der Process der

1) Physiologische Chemie, Bd. II. S. 228.

2) Verhandlungen des naturhist. med. Vereins zu Heidelberg, N. F., Bd. 1. Heft 3.

Pepsinverdauung von Eiweissstoffen mit der Entstehung der Peptone beendet ist, oder ob er zur Bildung solcher Substanzen führt, welche durch Phosphorwolframsäure nicht fällbar sind.

Zu den Untersuchungen wurde im I. Versuche Propepton verwendet. 10 gr. Propepton wurden mit 800 ccm. salzsaurer Pepsinlösung ¹⁾ versetzt und vor Beginn des Versuches sowohl der Gesamtstickstoff als auch der Stickstoffgehalt der durch Phosphorwolframsäure nicht fällbaren Substanzen bestimmt. Letzteres erschien nothwendig, um die Quantität des präformirten, aus der Magenschleimhaut stammenden Leucins zu erkennen. Dann wurde die Verdauungsmischung bei constanter Temperatur von 32—36° C. im Bruttofen der Verdauung überlassen und in gewissen Zeiträumen zur Bestimmung des durch Phosphorwolframsäure nicht fällbaren Stickstoffes Proben entnommen. Sowohl in diesem als auch in den übrigen Versuchen wurden die Bestimmungen des Gesamtstickstoffes und des durch Phosphorwolframsäure nicht fällbaren Stickstoffes, wie oben angegeben, ausgeführt.

Der Gesamtstickstoff in 10 ccm. der Verdauungsmischung in Form von Ammoniak neutralisirte vor Beginn des Versuches 25,3 ccm. $\frac{1}{20}$ Normal-Schwefelsäure.

Der durch Phosphorwolframsäure nicht fällbare Stickstoff in 100 ccm. der Verdauungsmischung neutralisirte:

vor Beginn des Versuches:	16,6 ccm.	$\frac{1}{20}$ Norm.-Schwefels.
nach 18stündiger Verdauung:	25,0	» » » »
nach 28stündiger Verdauung:	28,8	» » » »

Das Verhältniss des Gesamtstickstoffes zu dem durch Phosphorwolframsäure nicht fällbaren N war also:

vor Beginn des Versuches:	100 : 6,56,
nach 18stündiger Verdauung:	100 : 9,88,
nach 28stündiger Verdauung:	100 : 11,38.

¹⁾ In allen Versuchen wurde die Magenschleimhaut des Schweines mit verdünnter HCl (8 : 1000) extrahirt, die salzsaure Lösung filtrirt.

II. Versuch: mit Syntonin.

Ich stellte mir das Syntonin in folgender Weise dar: 1 Pfund frisch gehacktes Rindfleisch wurde mit 3 Liter Wasser 2 Stunden lang extrahirt, das Extract filtrirt, das rückständige Fleisch nach tüchtigem Auspressen mit 2 Liter Wasser, dem 16 cbcm. concentrirte HCl zugesetzt waren, unter öfterem Umrühren extrahirt, filtrirt; das Filtrat mit Na_2CO_3 neutralisirt, filtrirt. Der Rückstand wurde nun in 500 cbcm. verdünnter HCl (4 cbcm. p. M.) gelöst.

Vorerst musste das Verhältniss des Gesamtstickstoffes zu dem durch Phosphorwolframsäure nicht fällbaren Stickstoff im Syntonin bestimmt werden, wobei sich fand, dass 0,44% des Gesamtstickstoffes durch das benannte Reagens nicht fällbar ist.

Die Syntoninlösung wurde nun mit 1000 cbcm. salzsaurer Pepsinlösung versetzt.

Der Gesamtstickstoff vor Beginn des Versuches in 10 cbcm. der Mischung entsprach:

41,7 cbcm. $\frac{1}{20}$ Normal-Schwefelsäure.

Der durch Phosphorwolframsäure nicht fällbare N in 100 cbcm. der Mischung entsprach:

vor Beginn des Versuches: 22,4 cbcm. $\frac{1}{20}$ Norm.-Schwefels.

nach 18stündiger Dauer: 56,2 » » » »

» 40 » » 63,4 » » » »

Das Verhältniss des Gesamtstickstoffes zu dem durch Phosphorwolframsäure nicht fällbaren N war also:

vor Beginn des Versuches: 100 : 5,37,

nach 18stündiger Dauer: 100 : 13,47,

» 40 » » 100 : 15,20.

III. Versuch: mit Syntonin.

Die Gesamtstickstoffmenge der Mischung in 10 cbcm. entsprach vor Beginn des Versuches:

24,0 cbcm. $\frac{1}{20}$ Normal-Schwefelsäure.

Der durch Phosphorwolframsäure nicht fällbare Theil des Stickstoffes in 100 cbcm. der Mischung entsprach:

vor Beginn des Versuches:	20,2	cbcm.	$\frac{1}{20}$	Norm.-Schwefels.
nach 2stündiger Dauer:	25,0	»	»	»
» 4	»	»	»	»
» 10	»	»	»	»
» 26	»	»	»	»

Das Verhältniss des Gesamtstickstoffes zu dem durch Phosphorwolframsäure nicht fällbaren Stickstoff war also:

vor Beginn des Versuches:	100 : 8,41,
nach 2stündiger Dauer:	100 : 10,41,
» 4	» 100 : 11,75,
» 10	» 100 : 14,7,
» 26	» 100 : 18,79.

Da in den vorliegenden Versuchen die Menge der stickstoffhaltigen, durch Phosphorwolframsäure nicht fällbaren Substanzen während der Verdauung fortwährend anstieg, so war der Einwand, dass etwa präformirtes Leucin eine Täuschung veranlasse, ausgeschlossen.

Die vorliegenden Versuche wurden mit dem salzsauren Extracte der Schweinemagenschleimhaut angestellt, weil dieses erfahrungsgemäss am kräftigsten wirkt. Es sei noch ein IV. Versuch erwähnt, bei dessen Beginn alle in Wasser löslichen Stoffe, also auch etwa präformirtes Leucin, weggeschafft wurden.

Es wurde das salzsaure Extract der Magenschleimhaut mit der salzsauren Lösung von Syntonin zusammengegossen, sofort mit Na_2CO_3 , unter Vermeidung eines Ueberschusses, neutralisirt, der entstehende Niederschlag abfiltrirt, gründlich ausgewaschen und dann wieder in einem Liter verdünnter Salzsäure (8 cbcm. : 1000) gelöst. Bei dem beschriebenen Verfahren wird das Pepsin auf dem Eiweissniederschlage fixirt und tritt erst nach dem Auswaschen des Niederschlages in Wirkung, sobald die Reaction sauer wird. In der sauren Lösung wurden nun die Stickstoffbestimmungen ausgeführt:

Der Gesamtstickstoff von 10 cbcm. der Mischung entsprach:

vor dem Beginn des Versuches 23,1 cbcm. $\frac{1}{20}$ Norm.-Schwefels.

Der durch Phosphorwolframsäure nicht fällbare N in 100 ccm. der Mischung entsprach:

während des Beginns der Verdauung (circa $\frac{1}{2}$ Stunde):

19,3 ccm. $\frac{1}{20}$ Norm.-Schwefels.,

nach 10stündiger Dauer: 32,7 ccm. $\frac{1}{20}$ Norm.-Schwefels.

Verhältniss des Gesamtstickstoffes zu dem durch Phosphorwolframsäure nicht fällbaren Stickstoff:

während des Beginnes der Verdauung: 100 : 8,35,

nach 10stündiger Dauer: 100 : 14,15.

Nach den Ergebnissen dieser Versuche müssen wir annehmen, dass bei protrahirter Pepsinverdauung des Syntonins eine Zersetzung der anfänglich gebildeten Peptone stattfindet. Hierbei entstehen stickstoffhaltige Körper, welche durch Phosphorwolframsäure nicht fällbar sind. Die Ergebnisse meiner Versuche stimmen mit der Lehre Hoppe-Seyler's, nach welcher Leucin durch Pepsin aus Eiweiss gebildet wird, überein.

In allen Fällen, auch in dem zuletzt beschriebenen Versuche, konnte ich aus dem durch Phosphorwolframsäure nicht fällbaren Theil eine in Alcohol lösliche Masse isoliren, welche mehr oder minder deutlich leucinähnliche Knollen organischer Substanz erkennen liess. Eine Analyse derselben wurde wegen der geringen Menge des bei dem letzten Versuche gewonnenen Materials nicht angestellt. Es schien mir interessant, mit Hülfe des beschriebenen Verfahrens eine Vergleichung anzustellen zwischen der Wirkung des Pepsins und der des Pancreas, nachdem bereits Corvisart ¹⁾ und Kühne ²⁾ darauf hingewiesen haben, dass bei der Wirkung des Pancreas die Bildung der Amidosäuren aus Peptonen sehr schnell vor sich geht.

Das auf die beschriebene Weise dargestellte Syntonin wurde in sehr stark verdünnter Lösung von Natriumcarbonat gelöst und mit 500 ccm. wässerigen Pancreasauszuges, dem

1) Sur une fonction peu connue du Pancreas, Paris 1858.

2) Archiv f. pathol. Anatomie, Bd. 39, S. 130.

einige Tropfen einer concentrirten alcoholischen Thymollösung zugefügt waren, zusammengegossen. In der Verdauungsmischung sofort der Gesamtstickstoff und der durch Phosphorwolframsäure nicht fällbare Stickstoff bestimmt, sodann die Mischung bei Bruttemperatur der Verdauung überlassen.

Der Gesamtstickstoff in 10 cbcm. der Verdauungsmischung entsprach:

vor Beginn des Versuches; 24,0 cbcm. $\frac{1}{20}$ Norm.-Schwefels.

Durch Phosphorwolframsäure nicht fällbarer N in 100 cbcm. der Mischung entsprach:

vor Beginn des Versuches: 22,6 cbcm. $\frac{1}{20}$ Norm.-Schwefels.

nach 2stündiger Dauer: 36,8 » » » »

» 22 » » 87,0 » » » »

» 26 » » 90,8 » » » »

Von 100 Theilen N sind demnach durch Phosphorwolframsäure nicht fällbar bei der:

	Pepsinver- dauung (Versuch III).	Pancreasver- dauung.
Beginn	8,4	9,4
Nach 2 Stunden	10,4	15,3
» 4 »	11,7	—
» 10 »	14,7	—
» 22 »	—	36,2
» 26 »	18,8	37,8

Im Anschluss an die geschilderten Versuche habe ich eine Untersuchung der im Handel vorkommenden Peptonpräparate ausgeführt. Es ist nicht mein Zweck, hier in die Debatte über den Nährwerth der pilzartig empor-schiessenden neuen Peptonpräparate einzutreten, vielmehr beabsichtige ich die Aufmerksamkeit auf die Anwendung dieses Verfahrens zur Untersuchung dieser und ähnlicher Präparate zu lenken. Immerhin dürfte es von Interesse sein zu wissen, wieviel der werthvollen peptonartigen Stoffe mit den minder werthvollen, durch Phosphorwolframsäure nicht

fällbaren Körpern gemischt sind. Selbstverständlich ist auf etwaigen Ammoniakgehalt Rücksicht zu nehmen.

Von den in Wasser durchgehends leicht löslichen Peptonpräparaten wurde stets eine etwa 1procentige Lösung bereitet. Davon wurden 10 ccm. zur Bestimmung des Gesamtstickstoffes nach Kjeldahl benützt, in 100 ccm. mit 10 ccm. conc. H_2SO_4 , 40 ccm. Phosphorwolframsäure etc. der nicht fällbare N bestimmt und dann das Verhältniss des Ersteren zu diesem berechnet. Bei jedem Präparate wurden zwei Bestimmungen (a, b) ausgeführt.

Die Resultate der Bestimmungen sind die folgenden:

Kochs' Fleischpepton.

I. Gesamt-N in 10 ccm. entsprach:

- | | | |
|--|------------|---------------|
| a) 11,5 ccm. $\frac{1}{20}$ Normal-Schwefelsäure | = 8,05 % N |) Mittelwerth |
| b) 11,6 » » » » » | = 8,12 » » | |

II. Nicht fällbarer N in 100 ccm. entsprach:

- | |
|---|
| a) 12,5 ccm. $\frac{1}{20}$ Normal-Schwefelsäure. |
| b) 12,4 » » » » » |

Verhältniss von I zu II:	a) 10,8 %) Mittelwerth
	b) 10,7 »	

Witte's Pepton.

I. Gesamt-N in 10 ccm. entsprach:

- | | | |
|--|-----------|---------------|
| a) 19,2 ccm. $\frac{1}{20}$ Normal-Schwefelsäure | = 13,4 % |) Mittelwerth |
| b) 19,1 » » » » » | = 13,37 » | |

II. Nicht fällbarer N in 100 ccm. entsprach:

- | |
|---|
| a) 12,4 ccm. $\frac{1}{20}$ Normal-Schwefelsäure. |
| b) 12,2 » » » » » |

Verhältniss von I zu II:	a) 9,25 %) Mittelwerth
	b) 9,17 »	

Weyl's Casein- (Milch-) Pepton.

I. Gesamt-N in 10 ccm. entsprach:

- | | | |
|--|-----------|---------------|
| a) 18,2 ccm. $\frac{1}{20}$ Normal-Schwefelsäure | = 12,7 % |) Mittelwerth |
| b) 18,1 » » » » » | = 12,67 » | |

II. Nicht fällbarer N in 100 ccm. entsprach:

- | |
|---|
| a) 25,4 ccm. $\frac{1}{20}$ Normal-Schwefelsäure. |
| b) 25,3 » » » » » |

Verhältniss von I zu II:	a) 13,9 %) Mittelwerth
	b) 13,9 »	

Kemmerich's Fleischpepton.

I. Gesamt-N in 10 cbcm. entsprach:

- | | | | |
|---------------|-------------------------------------|-------------|-------------|
| a) 14,3 cbcm. | $\frac{1}{20}$ Normal-Schwefelsäure | = 10,01 % N | Mittelwerth |
| b) 14,4 | | = 10,08 | 10,04 % N. |

II. Nicht fällbarer N in 100 cbcm. entsprach:

- a) 14 cbcm. $\frac{1}{20}$ Normal-Schwefelsäure,
 b) 13,9 » » » » »

Verhältniss von I zu II:	a) 9,79 %		Mittelwerth
	b) 9,65 »	9,72 %	nicht-fällbarer N.

Simon's Pepton.

I. Gesamt-N in 10 cbcm. entsprach:

- | | | | |
|--------------|-------------------------------------|--------------|-------------|
| a) 14 cbcm. | $\frac{1}{20}$ Normal-Schwefelsäure | = 10,08 % | Mittelwerth |
| b) 14,6 » | | = 10,22 » | 10,15 % N. |

II. Nicht fällbarer N in 100 cbcm. entsprach:

- a) 14,2 cbcm. $\frac{1}{20}$ Normal-Schwefelsäure.
 b) 14,3 » » » » »

Verhältniss von I zu II:	a) 9,86 %		Mittelwerth
	b) 9,76 »	9,86 %	nicht-fällbarer N.

Tabellarische Uebersicht des Stickstoffgehaltes der
 untersuchten Peptonpräparate.

	Kochs.	Kem- merich.	Witte.	Weyl.	Simon.
Gesamt-N in %	8,08	10,04	13,3	12,68	10,15
Davon nicht fällbarer N in %	10,7	9,72	9,21	13,9	9,86

III. Nachdem ich mich durch die erwähnten Versuche von der Möglichkeit überzeugt hatte, mittelst des geschilderten Verfahrens gewisse stickstoffhaltige Körper, insbesondere Amidosäuren, auf quantitative Weise von anderen zu sondern, habe ich einige Versuche angestellt, um dieses Verfahren auch auf die Analyse thierischer Organe zu übertragen. Wir dürfen erwarten, dass wichtige pathologische Veränderungen der Organe in gewissen Fällen in einer Veränderung des Verhältnisses zwischen den durch Phosphorwolframsäure fällbaren und den nicht fällbaren Sub-

stanzen Ausdruck finden. Wenn z. B. eine Anhäufung von Leucin und ähnlichen Stoffen in den Geweben stattfindet, müsste die Menge des durch Phosphorwolframsäure nicht fällbaren Stickstoffes zunehmen. Im Hinblick auf das Interesse, welches der Bildung von Amidosäuren in der Leber bei Phosphorvergiftung zuerkannt ist, habe ich mit Hülfe des erwähnten Verfahrens die Leber in einem Falle von Phosphorvergiftung untersucht und mit den Verhältnissen in normalen Organen verglichen. Zunächst versuchte ich mir Aufschluss darüber zu verschaffen, ob die Extraction mit Alcohol genügt, um alle durch Phosphorwolframsäure nicht fällbaren stickstoffhaltigen Stoffe aus der normalen Leber zu gewinnen, oder ob es zweckmässig ist, der Alcoholextraction eine Extraction mit verdünnter organischer Säure vorausgehen zu lassen. Es wurden daher von derselben Leber eines frisch getödteten normalen Hundes zwei Proben entnommen; die eine (A) mit verdünnter Essigsäure, die zweite (B) nur mit Alcohol extrahirt und in beiden Proben die Menge des durch Phosphorwolframsäure nicht fällbaren Stickstoffes bestimmt. Ausserdem wurden eine Bestimmung des Gesamtstickstoffes der Leber und eine Trockenbestimmung in demselben Organe ausgeführt.

A. Es wurden 125 gr. Lebersubstanz in einer Porcellanschale mit verdünnter Essigsäure bis fast zur Trockne eingedampft, auf den Rückstand 300 ccm. Alcohol gegossen, mit dem Letzteren in ein geräumiges Becherglas gespült; in dem bedeckten Becherglase auf dem Wasserbade bis zum Sieden des Alcohols erhitzt, $\frac{3}{4}$ Stunden im Sieden erhalten und filtrirt. Der Filtrerrückstand wurde in gleicher Weise noch zweimal mit Alcohol extrahirt. Die alcoholischen Filtrate wurden durch Destillation vom Alcohol befreit, der Rückstand mit Aether extrahirt. Der in Aether unlösliche Rückstand wurde mit Wasser übergossen und zum Sieden erhitzt. Nach dem Erkalten wurden 10 ccm. conc. H_2SO_4 und 40 ccm. Phosphorwolframsäurelösung hinzugefügt, die Lösung auf 200 ccm. aufgefüllt, filtrirt; in 100 ccm. des Filtrates mit 5 ccm. conc. H_2SO_4 der nicht fällbare Stickstoff bestimmt. Es ergab sich ein Stickstoffgehalt von 0,13636 gr.

Die gleiche Menge (B) der Lebersubstanz wurde ebenso untersucht, nur mit dem Unterschiede, dass die Behandlung mit Essigsäure nicht vorgenommen wurde, sondern die Extraction mit Alcohol direct geschah. Der Stickstoffgehalt betrug 0,0927 gr.

Der Procentgehalt der feuchten Leber an Stickstoff betrug 3,93 %.

Die Trockensubstanz der Leber betrug in Procenten 33,06 %.

Das Verhältniss des Gesamtstickstoffes zu dem durch Phosphorwolframsäure nicht fällbaren Stickstoff war:

in Versuch A 100 : 2,77,

in Versuch B 100 : 1,88.

Das Resultat dieses Versuches veranlasste mich, in den folgenden Experimenten stets nach A zu verfahren.

II. Versuch. In demselben wurde ebenfalls die Leber eines mittelgrossen normalen Hundes unmittelbar nach dem Tode verwendet und wie im I. Versuche untersucht.

Der Procentgehalt der feuchten Leber an Stickstoff betrug 3,46 %.

Der Procentgehalt an Trockensubstanz betrug 28,58 %.

Das Verhältniss des Gesamtstickstoffes zu dem durch Phosphorwolframsäure nicht fällbaren Stickstoff betrug 100 : 2,2.

Nun wurde im III. Versuche einem den früheren Versuchsthieren gleich grossen Hunde durch 5 Tage täglich 0,5 gr. Phosphor in Substanz mit der Nahrung verabreicht. Die Leber des am 6. Tage verendeten Thieres wurde kurz nach dem Tode untersucht; dieselbe bot das exquisite Bild der Fettleber. Die Ergebnisse der nach dem obigen Verfahren geführten Untersuchung sind die folgenden:

Der Procentgehalt der feuchten Leber an Stickstoff betrug 2,62 %.

Der Procentgehalt an Trockensubstanz betrug 25,9 %.

Das Verhältniss des Gesamtstickstoffes zu dem durch Phosphorwolframsäure nicht fällbaren Stickstoff betrug 100 : 3,4.

Die in dem letzten Versuche nachgewiesene Zunahme des Procentgehaltes an nicht fällbarem Stickstoffe erhebt sich so wenig über den der beiden ersten Versuche, dass wir nicht anstehen, dieselbe als innerhalb der durch die Methode bedingten Fehlerquellen verursachte zu bezeichnen. Jedenfalls ist durch meine Versuche festgestellt, wieviel Stickstoff sich in der normalen Leber des Hundes in der Form von Harnstoff, Amidosäuren und ähnlichen durch Phosphorwolframsäure nicht fällbaren Stoffen befindet. Fernerhin dürfen wir den Schluss ziehen, dass in gewissen Fällen von typischer Phosphorvergiftung die Bildung von Amidosäuren ganz fehlt oder doch sehr unbedeutend ist. Die obigen Resultate stimmen mit Ergebnissen von bisher nicht publicirten Versuchen des Herrn Dr. Kossel überein, der in der Phosphorleber nach der Dumas'schen Bestimmung ebenfalls keine Zunahme des durch Phosphorwolframsäure nicht fällbaren Stickstoffes constatiren konnte. Auch weichen die Angaben von Schotten ¹⁾ und Sotnitschewsky ²⁾ bezüglich der Tyrosinbildung in der Leber bei der Phosphorvergiftung von einander ab.

¹⁾ Zeitschrift für physiologische Chemie, Bd. VII, Heft 1.

²⁾ Ibidem, Bd. III, S. 321.