

Zur Kenntniss des Ichthulins und seiner Spaltungsproducte.

Von

Dr. G. Walter.

(Aus der chemischen Abtheilung des physiologischen Instituts zu Berlin.)
(Der Redaction zugegangen am 20. April 1891.)

Seitdem Virchow¹⁾ und Lehmann²⁾, Dumas und Cahours³⁾ die Eiweissnatur der Dotterplättchen erkannt und damit die ältere Anschauung, die sie für Fett (oder Stearin) ausgab, widerlegt hatten, sind dieselben wiederholt Gegenstand eingehenderer chemischer Untersuchungen geworden.

A. Valenciennes und Frémy⁴⁾ gehören zu den Ersten, welche die Dotterplättchen zu analysiren unternahmen. Es erwiesen sich dazu die Dotterplättchen der Knorpelfische wegen ihrer Unlöslichkeit in Wasser besonders geeignet, weil die Eier nur mit Wasser zerdrückt und die sich reichlich absetzenden Eiweisskörper geschlämmt und mit Alkohol und Aether ausgewaschen zu werden brauchten, um ein von

¹⁾ R. Virchow, Ueber Sarcine. Froriep's Not., 1846, No. 825, Sp. 173; und: Ueber die Dotterplättchen bei Fischen und Amphibien. v. Siebold u. Koelicker's Zeitschr. f. wissenschaftl. Zoologie, Bd. IV, Heft II, S. 236.

²⁾ C. G. Lehmann, Lehrb. d. physiol. Chemie, Bd. II, 1850, S. 349, und Zoochemie, S. 282.

³⁾ Dumas et Cahours, Mém. sur les matières azotées neutres de l'organisation. Ann. de chim. et de physique, 3^e série, T. VI, p. 423.

⁴⁾ A. Valenciennes et Frémy, compt. rend., T. 38 (1854), p. 471 u. ff.; Recherches sur la composition des œufs dans la série des animaux.

fremden Beimengungen freies Präparat zu erhalten, das sie sodann der chemischen Analyse unterwarfen und «Ichtine» benannten. In der eigenthümlichen, regelmässigen Form der tafelförmigen Körnchen glaubten sie Krystalle zu erkennen, was sie indessen mit der Eiweissnatur derselben nicht in Einklang zu setzen wussten. Aehnliche tafelförmige Gebilde (... des granules transparents, en tablettes, qui rappellent tout à fait ceux du vitellus de la Raie) fanden sie in der Reihe der Knorpelfische nur in den Eiern unseres einheimischen Karpfen und einer chinesischen Karpfenart, die sie aber, weil in Wasser löslich, als verschieden von jenen der Knorpelfische, dem Ichthin, erkannten und als «Ichtidine» bezeichneten. Radlkofer¹⁾ hat die Dotterplättchen des Karpfeneis einer sorgfältigen mikroskopischen Untersuchung unterworfen. Er beschreibt sie als in der Mehrzahl «rectanguläre oder nahezu quadratische, platte Täfelchen» von wechselnder Grösse, die, vermischt mit Dotterbläschen (Dotterzellen), den grössten Theil des Eies ausmachen; er weist nach, dass sie wirkliche Krystalle und als solche doppelbrechend und spaltbar sind, dass sie umkrystallisirt werden können — allerdings nach einer nur für den Mikroskopiker brauchbaren Methode — und unterzieht sie sodann einer ausführlichen mikrochemischen Untersuchung.

Während die Substanz dieser Dotterplättchen sich zunächst durch ihre Löslichkeit in Wasser der chemischen Analyse zu entziehen schien, erhielten die oben genannten Autoren, Valenciennes und Frémy, aus derselben wässrigen Lösung, in welche die Dotterplättchen übergegangen waren, durch Zusatz reichlicherer Wassermassen den Niederschlag eines Eiweisskörpers, dem sie den Namen «Ichtuline» beilegten und den sie im Verlauf ihrer ausgedehnten Untersuchungen allgemein in den Eiern der Knochenfische verbreitet fanden. Obgleich der gewonnene Körper nur in physikalischer Hinsicht sich von dem Ichthidin unterschied, chemisch sich aber

¹⁾ L. Radlkofer, Ueber Krystalle proteinartiger Körper pflanzlichen und thierischen Ursprungs, Leipzig 1859. Dasselbst vollständiges Verzeichniss der älteren Literatur.

demselben ganz ähnlich verhielt¹⁾, so glaubten sie dennoch in den Karpfeneiern das Vorhandensein zweier verschiedener Eiweisssubstanzen annehmen zu müssen, deren eine, das Ichthidin (Dotterplättchen), in Wasser löslich sei, während die andere, das in der Eimasse gelöste Ichthulin, durch Wasser gefällt werde.

«L'examen des œufs de carpe, encore jeunes, nous a aussi démontré que, pour étudier les œufs de ces Cyprinoides, il faut se garder de les mettre en contact avec l'eau, qui dissout souvent des corps dont il est important de constater la présence, et qui, dans des autres cas, précipite des substances telles que l'Ichthuline qui étaient d'abord en dissolution.»

Dass der Unterschied ihrer beiden Substanzen nur ein scheinbarer ist, geht aus der Eigenschaft des frisch gefällten Ichthulins hervor, sich in verdünnten Salzlösungen vollkommen zu lösen, bei reichlichem Wasserzusatz aber wieder auszufallen; beim Behandeln der salzreichen Karpfeneier mit Wasser treten nach einander dieselben Erscheinungen auf, indem Salzlösungen gebildet werden, welche erst das krystallisirte Eiweiss lösen, bei starker Verdünnung aber wieder fallen lassen. Es stellt also das Ichthulin wohl nichts Anderes als die amorphe Ausfällung des Ichthidins vor, wenn man auch immerhin wird insofern einen Unterschied gelten lassen müssen, als das Ichthidin vielleicht die krystallisirte Verbindung von Ichthulin mit einem Metall (Na, Mg), vielleicht auch mit Lecithin oder einer ähnlichen, phosphorhaltigen Base repräsentirt. Wenn es erlaubt ist, allgemein für die Eier der unter sich doch nah verwandten Arten der Knochenfische eine einheitliche organische Zusammensetzung vorauszusetzen, so erklärt sich die Ausnahmestellung des Karpfeneis einfach dadurch,

¹⁾ L. c., S. 529. «L'Ichthuline, qui par ses propriétés physiques s'éloigne sous tous les rapports de l'Ichthine, s'en rapproche beaucoup par ses caractères chimiques. Elle est, comme cette dernière, soluble dans les acides acétique et phosphorique; elle se dissout aussi dans l'acide chlorhydrique, sans produire de coloration violette.»

dass hier eben das Ichthulin für die Krystallisation günstige Bedingungen findet, während es in den Eiern anderer Knochenfische in Lösung gehalten bleibt.

Gewinnung, Analyse und Eigenschaften des Ichthulins.

Valenciennes und Frémy stellten Ichthulin in grösserer Menge aus Salmenrogen her. Aus der durch Auspressen der Eier zwischen Leinwand unter Zusatz von wenig Wasser gewonnenen Flüssigkeit wurde durch Zusatz grösserer Mengen Wassers Eiweiss gefällt, welches durch Auswaschen mit Alkohol und Aether gereinigt wurde. Die Analyse ergab: C 52,5, H 8,0, N 15,2, P 0,6, S 1,0, O 22,7; in einer zweiten Analyse wurde gefunden: C 53,3, H 8,3. Ausser seiner Löslichkeit in Salzsäure und Phosphorsäure gaben sie keine Eigenschaften ihres Eiweisskörpers an.

Im Anschluss an eine Reihe von Untersuchungen über Eiweisskörper nahm Herr Prof. Kossel das fast vergessene Ichthulin wieder auf. Herr Prof. Kossel hatte die grosse Liebenswürdigkeit, eine sorgfältigere, auf die heutige, vertiefte Kenntniss der Eiweissstoffe basirte Untersuchung des Ichthulins mir zu überlassen, wofür ich ihm, sowie für seine geschätzten Rathschläge, an dieser Stelle meinen verbindlichsten Dank aussprechen möchte.

Als Ausgangsmaterial wurden die am leichtesten zu beschaffenden Rogen des Karpfen gewählt; doch hätte man nach den Befunden Valenciennes' und Frémy's ebensowohl von irgend einem anderen weiblichen Knochenfisch ausgehen können. Nach ihren Angaben sollen sowohl Ichthidin als Ichthulin nur in unreifen Eiern enthalten sein und mit zunehmender Reife verschwinden. «Il résulte, en effet, de nos analyses, que les œufs de carpe entièrement formés ne contiennent plus de traces d'Ichthidine, que l'Ichthuline disparaît aussi peu à peu, et que, quand ils sont devenus tout à fait transparents, ces œufs sont formés uniquement par une liqueur fortement albumineuse qui tient en suspension de la graisse phosphorée.» Da meine Versuche in die Zeit von October bis Februar fielen, so kamen bei der Herstellung

der Präparate nur unreife Eier — die Laichzeit des Karpfen fällt in die Monate Mai und Juni — zur Verwendung; während jenes Zeitraums konnte ich neben einem merklichen Wachsthum der Rogen nur ein erfreuliches Anwachsen der daraus erzielten Eiweiss-Ausbeuten constatiren.

Die Geschlechtsapparate der Fische bieten bei der Herstellung von Eiweisspräparaten vor anderen thierischen Organen den grossen Vortheil, dass bei ihrer Verarbeitung die so lästige Verunreinigung mit Blut fast gänzlich ausgeschlossen ist. So brauchten die Eierstöcke des Karpfen nur von der sie sackförmig umgebenden Haut abgetrennt und mit etwas Wasser abgespült zu werden, um ein nach dieser Richtung hin tadelloses Rohmaterial abzugeben. Die Rogen wurden zunächst mit gut ausgewaschenem Sand zerdrückt und mit Wasser zu einem dünnen Brei angerührt, welcher nach etwa einstündigem Stehen unter Auspressen colirt und filtrirt wurde. Das gelbbraune, nie vollkommen klare, opalisirende Filtrat wurde unter Umrühren in grosse Mengen destillirten Wassers gegossen, wo sofort eine weisse, wolkige Trübung entstand, die bei fortgesetztem Einleiten von Kohlensäure einer flockig-voluminösen Fällung wich. Der sich ziemlich langsam absetzende Niederschlag, das rohe Ichthulin Valenciennes' und Frémy's, ballte sich zu einer klebrigen, röthlich-weissen Masse zusammen, die nach Abgiessen des darüber stehenden trüben Wassers auf dem Filter gesammelt und in der eben ausreichenden Menge einer sehr verdünnten Magnesiumsulfatlösung gelöst und filtrirt wurde. Da das Filtriren der klebrig schleimigen Flüssigkeit äusserst langsam von statten ging, bei längerem Contact mit Wasser aber das Ichthulin seine Löslichkeit einbüsst, so ging stets ein beträchtlicher Theil des Niederschlages, als unlöslich geworden, für die weitere Verarbeitung verloren. Aus dem ziemlich klaren, gelbbraunen Filtrat wurde nochmals in der gleichen Weise wie zuvor der Eiweisskörper gefällt, der Niederschlag auf dem Filter gesammelt (eventuell durch Centrifugiren abgeschleudert) und nun durch Auswaschen mit Alkohol und Aether gereinigt. Nach Abdunsten des Aethers unter der Luftpumpe hinterblieb das Ichthulin

als ein schneeweisses, zartes, hygroskopisches Pulver, welches beim Trocknen bei 110° eine gelbliche Färbung annahm.

Der Elementaranalyse unterworfen, zeigte es sich bald, dass übereinstimmende Werthe nur dann erzielt wurden, wenn zunächst die jeweils zur Verbrennung bestimmte Substanzmenge, die selbst im Exsiccator bei längerem Liegen an Gewicht zunahm, kurz vor deren Ausführung bei $100-110^{\circ}$ bis zur Gewichtsconstanz getrocknet worden war, die Verbrennung aber in der Weise ausgeführt wurde, dass nach der in der üblichen Weise erfolgten Veraschung mittelst Bleichromat und Kupferoxyd unter Vorlegen einer Kupferspirale noch mindestens 30 Minuten lang Sauerstoff übergeleitet wurde.

C- und H-Bestimmungen:

I. 0,2183 gr. Substanz gaben	{	0,1462 gr. H_2O = 7,45% H,
		0,4282 gr. CO_2 = 53,59% C.
II. 0,2171 gr. Substanz gaben	{	0,1484 gr. H_2O = 7,58% H,
		0,4228 gr. CO_2 = 53,12% C.
III. 0,1882 gr. Substanz gaben	{	0,1298 gr. H_2O = 7,66% H,
		0,3674 gr. CO_2 = 53,24% C.

N-Bestimmung:

0,2834 gr. Substanz gaben bei Barom. 771,5 mm., t. $19,3^{\circ}$, Vol. 38,0 cbcm. = 15,63% N.

Im Mittel berechnet sich die Zusammensetzung der nach der beschriebenen Methode dargestellten Präparate, die ich als Präparat I bezeichnen will, folgendermassen:

C 53,33, H 7,56, N 15,63, O (S, P, Fe) 23,48.

Die qualitative Untersuchung hatte ausser Schwefel auch die Gegenwart von Phosphor und Eisen im Eiweissmolekül ergeben, von deren quantitativer Bestimmung aus Mangel an Substanz aber vorerst abgesehen werden musste und die nach obigem Verfahren sich auch nicht leicht in genügender Menge beschaffen liess. Dieser Umstand einerseits, andererseits die Umständlichkeit des Verfahrens, dessen verschleppender Gang nicht blos grosse Opfer an Material, sondern auch an Zeit erforderte, drängten nach einer Verbesserung der Darstellungsmethode.

Bei näherer Betrachtung musste die Gegenwart des aus den Eiern mit in die Präparate übergeführten Fettes besonders hinderlich erscheinen; denn durch das anhaltende Zerreiben der Eier wurde unter Vermittelung von Eiweiss, das als mechanisches Bindemittel zwischen Fett und Wasser fungirte, nach allen Regeln der Kunst eine Emulsion angefertigt, durch welche eines- theils ein Theil des Eiweisses eo ipso der Fällung mit Wasser entzogen, anderntheils das Niederfallen des übrigen Eiweisses gehemmt und namentlich das Filtriren der Lösungen erschwert wurde. Dass diese Voraussetzung richtig war, stellte sich durch die Erfolge des in diesem Sinne abgeänderten Verfahrens heraus. Anstatt das durch Auspressen erhaltene, colirte Rogextract zu filtriren, wurde dasselbe zur Entziehung des Fettes im Scheidetrichter mit Aether ($\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{6}$ Vol.) einigemal leicht umgeschüttelt und sodann der Ruhe überlassen. Nach 2—3 Stunden hatte sich die trübe Mischung in eine klare, braun- gelbe, jedoch stark weiss opalisirende¹⁾, leicht filtrirbare untere Schichte und in eine schaumige, schmutziggelbe, ätherische obere Schichte getrennt. Die wässerige, flott filtrirende Flüssig- keit wurde nun in der früheren Weise durch Verdünnen mit Wasser und Einleiten eines Kohlensäurestroms behandelt, wobei alsbald ein sich rasch zu Boden setzender, röthlich- weisser, feinpulveriger Niederschlag entstand, der auf dem Filter gesammelt, mit Wasser durch mehrmaliges Aufgiessen ausgewaschen, mit Alkohol wiederholt digerirt und endlich mit Aether vollends erschöpft wurde. Die noch feuchte, vom Filter sich leicht ablösende gelbliche Masse wurde mit dem Spatel in kleine Stücke zertheilt und unter der Luftpumpe

¹⁾ Die auffallende Opalescenz liess die Gegenwart von Glycogen vermuthen, auf dessen Nachweis ein besonderer Versuch gerichtet wurde. 20 gr. mit Sand zerriebenen Rogens wurden auf dem Dampfbad mit Wasser ausgelaugt, filtrirt und abwechselnd mit Jodquecksilberjodkalium und Salzsäure tropfenweise so lange versetzt, als Niederschläge entstanden. Das Filtrat, mit dem gleichen Volumen Alkohol versetzt, liess nach einiger Zeit einen Niederschlag fallen, der auf dem Filter mit heissem Wasser gelöst, das klare Filtrat aber mit Jodlösung versetzt wurde. Die negativ ausfallende Reaction ergab, dass in den Karpfeneiern keine Spur von Glycogen vorhanden war.

getrocknet. Die beim Abdunsten des Aethers rein weiss gewordenen Stücke zerfielen beim Zerreiben in ein zartes, lockeres Pulver, das beim Trocknen bei 110° eine gelbliche Farbe annahm. Die Ausbeuten nach der so modificirten Darstellungsweise steigerten sich bis zu 8% des Gewichts des in Arbeit genommenen Rogens. Gleichwie der nach der ersteren Methode gewonnene Eiweisskörper enthielt auch dieser, den ich als Präparat II bezeichne, neben Schwefel auch Phosphor und Eisen, und dass er mit jenem überhaupt identisch ist, zeigen die aus seiner Analyse resultirenden Werthe.

C- und H-Bestimmungen:

I. 0,2208 gr. Substanz gaben	}	0,1520 gr. H_2O = 7,64% H.
		0,4222 gr. CO_2 = 53,56% C.
II. 0,2221 gr. Substanz gaben	}	0,1556 gr. H_2O = 7,78% H.
		0,4358 gr. CO_2 = 53,49% C.

N-Bestimmung:

0,2356 gr. Substanz gaben bei Bar. 761,5 mm., t. $18,3^{\circ}$. Vol. 31,9 cbcm.
= 15,64% N.

Die Veraschung grösserer Substanzmengen zum Zwecke der Bestimmungen von Schwefel, Phosphor und Eisen wurde meist in der Weise ausgeführt, dass die Substanz mit der annähernd gleichen Menge von Soda und wenig Salpeter durch vorsichtiges Erhitzen erst verkohlt, dann die schaumigporöse Kohle durch weiteren Zusatz der 3—4fachen Menge Salpeters vollständig verbrannt wurde. Dieses nachträgliche Zusetzen des Salpeters empfahl sich aus dem Grunde, weil bei directem Veraschen mit grösseren Salpetermengen auch beim vorsichtigsten Anwärmen sich eine so stürmische Verbrennung einleitete, dass ein Verlust an Asche nicht zu vermeiden war.

S-Bestimmung:

1,0469 gr. Substanz wurden mit Soda verascht und aus der salzsauren Lösung Schwefel als Baryumsulfat gefällt, und gaben 0,0279 gr. $BaSO_4$
= 0,367% S.

P- und S-Bestimmung:

Aus 2,0395 gr. Substanz wurde Phosphorsäure als Molybdänverbindung gefällt und als Magnesiumpyrophosphat gewogen: 0,0310 gr. $Mg_2P_2O_7$
= 0,426% P. Im salpetersauren Filtrat wurde die Salpetersäure durch Salzsäure verdrängt, vom abgeschiedenen Molybdänoxyd abfiltrirt und Schwefel als Baryumsulfat gewogen: 0,0687 gr. $BaSO_4$ = 0,448% S.

P- und Fe-Bestimmung:

In 4,0550 gr. Substanz wurde Phosphor wie oben bestimmt: 0,0633 gr. $Mg_2P_2O_7 = 0,433\%$ P. Aus dem salpetersauren Filtrat wurde die überschüssige Säure verjagt, Eisen mit Ammoniak gefällt und als Oxyd gewogen: $0,0053 Fe_2O_3 = 0,13\%$ $Fe_2O_3 = 0,091\%$ Fe.

Fe-Bestimmung:

Aus der Schmelze von 3,7408 gr. Substanz mit Soda und Salpeter wurde die Salpetersäure durch Schwefelsäure verdrängt, mit Zink reducirt und das Eisen mit Chamäleon titirt. Es wurden 84 cem. der auf $\frac{1}{100}$ -Norm.-Oxalsäure eingestellten Chamäleonlösung verbraucht: $0,004402 FeO = 0,167\%$ $Fe_2O_3 = 0,117\%$ Fe.

Zusammenstellung der Analysen:

	Präparat I. (Nach der ersten Darstellungsweise.)			Präparat II. (Nach der zweiten Darstellungsweise.)						
	C	H	N	C	H	N	S	P	Fe	(Fe ₂ O ₃)
	53,59	7,45	15,63	53,56	7,64	15,64	0,367	0,426	0,091	(0,13)
	53,12	7,58	—	53,49	7,78	—	0,448	0,443	0,117	(0,167)
	53,24	7,66	—	—	—	—	—	—	—	—
Im Mittel:	53,33	7,56	15,63	53,52	7,71	15,64	0,41	0,43	0,10	(0,15)

Die folgende Tabelle gibt die Zusammensetzung des Ichthulins nach den Durchschnittszahlen der vorstehenden Analysen. Vergleichshalber wurden die von Valenciennes und Frémy gefundenen Zahlen für die Zusammensetzung ihres aus Salmenrogen gewonnenen Präparates mit aufgeführt. Ein wesentlicher Unterschied zeigt sich namentlich im Schwefelgehalt, der sich vielleicht von der Verschiedenheit des Rohmaterials herleitet, vielleicht auch daher, dass sie nach ihrer einfachen Darstellungsmethode keinen reinen Körper erhalten hatten. Gleichzeitig glaubte ich auch die von Goble¹⁾ schon im Jahre 1850 ausgeführte Analyse seines aus Karpfeneiern gewonnenen «Paravitellins» nicht unterdrücken zu dürfen,

¹⁾ M. Goble, Recherches chimiques sur les œufs de carpe. Journ. de Pharm. et de Chimie. IIIe série, T. XVII, 1850, p. 401.

welches in der Zusammensetzung namentlich dem Präparat von Valenciennes und Frémy nahekommt, jedoch nach der rohen Art seiner Gewinnung gleich diesem als ein stark verunreinigtes Ichthulin aufzufassen ist.

	Präparat I.	Präparat II.	Ichthulin nach A. Valenc. u. Frémy.	Paravitellin von Gobley.
C	53,33	53,52	52,5 — 53,3	52,60
H	7,56	7,71	8,0 — 8,3	7,74
N	15,63	15,64	15,2	15,15
O	} 23,48	22,19	22,7	23,24
S		0,41	1,0	0,90
P		0,43	0,6	0,37
Fe		0,10	—	—
		100,00	100,00	100,00

Wenn durch die Modification des ersten Darstellungsverfahrens einerseits Zeit und Mühe wesentlich verringert, die Ausbeute an Ichthulin aber verzehn- oder verzwanzigfach wurde, so lehrt andererseits die genaue Uebereinstimmung der Präparate I und II im Kohlenstoff-, Wasserstoff- und Stickstoffgehalt, dass durch dieselbe der Körper nicht verändert wurde, und damit liefert sie einen werthvollen Beleg für seine chemische Individualität.

Nach seinem Phosphorgehalt und seinen Löslichkeitsverhältnissen stellt sich das Ichthulin in die Reihe der Vitelline. Frisch gefällt löst es sich in verdünntem Ammoniak oder Natronlauge, in verdünnter Salzsäure oder Essigsäure mit Leichtigkeit zu wasserhellen bzw. gelb gefärbten Flüssigkeiten. Verdünnte Salzlösungen von Magnesiumsulfat, Chlornatrium, schwefelsaurem, phosphorsaurem oder essigsaurem Natron bewirken zwar vollständige, jedoch schwach opalisirende Lösungen, aus welchen das Vitellin beim Sättigen mit dem betr. Salz wieder mehr oder weniger vollständig abgeschieden wird. Auch durch starkes Verdünnen mit Wasser wird es aus diesen Lösungen wieder abgeschieden, besonders unter Mitwirkung von Kohlensäure. Bei längerem Liegen unter

Wasser verliert es seine Löslichkeit in Salzlösungen. Auf Lackmuspapier wirkt es wie eine Säure. Bezüglich seiner Zusammensetzung ist der, wenn auch geringe, Eisengehalt (0,10% Fe oder 0,15% Fe₂O₃) beachtenswerth; doch bietet derselbe keine auffällige Erscheinung, da auch andere, verwandte Eiweisssubstanzen Eisen enthalten müssen, weil ihre, in der Regel durch künstliche Verdauung bewirkten, Spaltungsproducte eisenhaltig sind: so das in vielen Beziehungen dem Ichthulin nahestehende Casein der Kuhmilch, ferner die vitellinartige Muttersubstanz des von Bunge¹⁾ aus dem Hühnerei gewonnenen «Hämatogens» u. a.

Gelegentlich wurde auch die beim Behandeln des Rogenextractes mit Aether im Scheidetrichter entstandene obere Schichte zur Untersuchung herangezogen. In der Centrifuge schleuderte sich eine gelbe Masse von butterartiger Consistenz ab, die zunächst zur Verdrängung eines hartnäckig festgehaltenen Aetherrestes mit verdünntem Alkohol versetzt, dann mit absolutem Alkohol und Aether ausgezogen wurde. Es hinterblieb ein gelblichweisser, Phosphor und Eisen enthaltender Eiweisskörper von der Zusammensetzung C 51,32, H 7,30, N 15,02, O (S + Fe) 25,78, P 0,58; dem Gewichte nach betrug er etwa 50% der Ausbeute an reinem Ichthulin. Ich möchte denselben seiner Hauptmasse nach als ein mit fremden Körpern verunreinigtes Ichthulin ansprechen, das beim Herauslösen des Fettes aus der Emulsion durch den Aether mit in die Höhe gehoben worden war. Die gelb gefärbten, alkoholischen und ätherischen Waschflüssigkeiten hinterliessen beim Verdunsten neben schleimigen Massen ein dottergelbes Fett, das wieder in Aether aufgenommen, filtrirt und über Soda und Salpeter eingedampft und geschmolzen wurde. Die Schmelze enthielt Phosphorsäure, womit die Anwesenheit von Lecithin, der einzigen, hier in Betracht kommenden, phosphorhaltigen, ätherlöslichen Substanz erwiesen erscheint, und welches in das Fett löslich über-

¹⁾ G. Bunge, Ueber die Assimilation des Eisens. Zeitschrift für physiol. Chemie, Bd. IX, S. 49.

gegangen war¹⁾. Es ist denkbar, dass dasselbe zuvor mit dem Ichthulin (als Dotterplättchen?) in chemischer Verbindung gestanden war²⁾.

Spaltungsproducte des Ichthulins.

Paranuclein.

Wie Lubavin³⁾ zeigte, entstehen bei der verdauenden Einwirkung von Pepsin auf salzsaure Lösungen von Casein oder Vitellin Niederschläge, welche bis in die neueste Zeit mit den Nucleinen identificirt worden sind. In der That haben sie mit den ächten Nucleinen, den Bestandtheilen des Zellkerns, viele Eigenschaften gemein: wie diese reich an Phosphor, besitzen sie ähnliche Löslichkeitsverhältnisse, zeigen die Kennzeichen einer Säure, sind resistent gegen Pepsinlösung und zerfallen unter dem Einfluss von Alkali in Eiweiss und eine phosphorreiche Säure, welche mit dem analogen Spaltungsproduct der ächten Nucleine, der Nucleinsäure, die grösste Aehnlichkeit hat. In einem Punkt unterscheiden sie sich aber wesentlich: während die ächten Nucleine bei der Spaltung mittelst Säuren stets gewisse Basen (die sog. Nucleinbasen Guanin, Adenin, Xanthin und Hypoxanthin) liefern, deren Auftreten somit als Kriterium für ihre Qualität gelten kann, zeigen die durch Pepsinverdauung bewirkten, phosphorreichen Spaltungsproducte der Vitelline und Caseine dieses Verhalten nicht. Demgemäss hat Kossel⁴⁾ zur Unterscheidung von den ächten Nucleinen für diese Substanzen den Namen «Paranuclein» vorgeschlagen.

¹⁾ De la graisse phosphorée, nach Valenciennes und Frémy.

²⁾ Vergl. Hoppe-Seyler, Physiologische Chemie, S. 781.

³⁾ Lubavin, Med.-chem. Untersuchungen, herausgeb. v. Hoppe-Seyler, Heft 4, S. 463. Vergleiche daselbst auch: Hoppe-Seyler, Ueber das Vitellin, Ichthin etc.; ferner: Diakonoff, Ueber die phosphorhaltigen Körper der Hühner- und Störeier, Heft 2; und: Miescher: Ueber die Kerngebilde im Dotter des Hühnereis, S. 502.

⁴⁾ A. Kossel, Ueber die chem. Zusammensetzung der Zelle. Verhandl. d. Physiol. Ges. zu Berlin, Sitzung vom 30. Jan. 1891; abgedruckt in E. du Bois-Reymond's Archiv f. Physiologie, physiol. Abth., 1891, S. 181.

Durch die von Hammarsten gemachte Beobachtung¹⁾, dass eine klare Lösung des Caseins, mit Pepsinlösung versetzt, sich allmählig unter Abscheidung dieses nucleinartigen Körpers trübt, sind die Versuche zur Reindarstellung des Paranucleins sehr erleichtert worden.

Aus dem Vitellin der Karpfeneier gewinnt man Paranuclein dadurch, dass frisch gefälltes, nur mit Wasser ausgewaschenes Ichthulin, in 0,1 procentiger Salzsäure gelöst, der Einwirkung künstlichen Magensaftes bei Körpertemperatur während 16—18 Stunden ausgesetzt, der entstandene schmutziggelbe, etwas klebrige Niederschlag centrifugirt, erst mit 50procentigem Alkohol ausgezogen, hierauf mit absolutem Alkohol und endlich mit Aether erschöpft und unter der Luftpumpe getrocknet wird. Zerrieben stellt es ein äusserst zartes, fast rein weisses, geruchloses Pulver vor, das sich beim Trocknen bei 100—110° schwach gelb färbt. Die Ausbeute betrug im Maximum etwa 4% des in Verwendung genommenen Vitellins. Leicht und klar löslich in Ammoniak und Alkalilauge wird das Paranuclein durch überschüssige Essigsäure oder Weinsäure vollständig wieder abgeschieden; denn das essigsaure Filtrat gibt auf Zusatz von Salzsäure und Alkohol keine weitere Fällung. Eine Abscheidung von Nucleinsäure, wie sie Altmann²⁾ aus einem aus Vogeleiern gewonnenen Paranuclein gelang, liess sich also hier nicht ausführen. Beim Glühen bläht es sich, gleichwie Ichthulin, zu einer schwer verbrennlichen Kohle auf, in deren stark sauer reagirender Asche neben Eisen Spuren von Chlor, Calcium und Magnesium nachweisbar sind.

Die geringen Ausbeuten, die auch bei Inangriffnahme relativ grosser Ichthulinmengen erzielt wurden, erschwerten die quantitative Analyse insofern, als für die Einzelbestimmungen stets nur die kleinstmöglichen Substanzmengen ver-

¹⁾ Hammarsten, Zur Frage, ob das Casein ein einheitlicher Stoff sei. Zeitschrift für physiologische Chemie, Bd. VII, S. 264.

²⁾ R. Altmann, Ueber Nucleinsäuren. Archiv für Anatomie und Physiologie, physiol. Abth., 1889, S. 524.

wendet, manche Bestimmungen am gleichen Präparat nur ein einziges Mal ausgeführt werden konnten. Für die technische Ausführung der Analysen gilt das unter Ichthulin Gesagte.

Präparat I.

C- und H-Bestimmungen:

I. 0,2147 gr. Substanz gaben	}	0,1402 gr. H ₂ O = 7,25% H,
		0,3765 gr. CO ₂ = 47,83% C.
II. 0,2100 gr. Substanz gaben	}	0,1341 gr. H ₂ O = 7,10% H,
		0,3710 gr. CO ₂ = 48,13% C.
Im Mittel: 47,98% C, 7,18% H.		

N-Bestimmung:

0,2165 gr. Substanz gaben bei Barom. 758 mm., t. 15,9°, Vol. 27,3 cbcm.
= 14,66% N.

S-Bestimmung:

0,4785 gr. Substanz gaben 0,0105 gr. BaSO₄ = 0,301% S.

P-Bestimmung:

0,4995 gr. Substanz gaben 0,0432 gr. Mg₂P₂O₇ = 2,42% P.

Präparat II.

C- und H-Bestimmung:

0,2042 gr. Substanz gaben	}	0,1313 gr. H ₂ O = 7,15% H,
		0,3275 gr. CO ₂ = 47,75% C.

N-Bestimmungen:

- I. 0,2250 gr. Substanz gaben bei Barom. 771 mm., t. 20,3°, Vol. 24,8 cbcm.
= 12,65% N.
- II. 0,2106 gr. Substanz gaben bei Barom. 775 mm., t. 18,1°, Vol. 22,8 cbcm.
= 12,75% N.

Im Mittel: 12,70% N.

P- und Fe-Bestimmung:

1,5523 gr. Substanz wurden mit Soda und Salpeter verascht, Phosphorsäure als Ammoniummolybdophosphat gefällt und als 0,1583 gr. Mg₂P₂O₇ gewogen, = 2,85% P. Im Filtrat wurde die überschüssige Säure verdrängt, mit Wasser aufgenommen, filtriert, Eisen als basisches Acetat gefällt, letzteres in Salzsäure wieder gelöst, mit Ammoniak gefällt und als Oxyd gewogen: 0,0056 Fe₂O₃ = 0,36% Fe₂O₃
= 0,252% Fe.

	Paranuclein aus Vitellin.		Paranuclein aus Casein.	
	Präparat I.	Präparat II.	Präparat nach Lubavin.	
C	47,98	47,75	46,4 — 49,7	
H	7,18	7,15	6,4 — 6,9	
N	14,66	12,70	13,8 — 14,6	
O	(+ Fe) 27,46	(+ S) 29,30	— —	
S	0,30	—	— —	
P	2,42	2,85	I. 1,12	II. 1,07
			2,11	1,71
			3,07	2,45
Fe	—	0,25 (0,36 Fe ₂ O ₃)	0,59 — 0,80 — 0,94 Fe ₂ O ₃	
	100,00	100,00		

Verglichen mit dem Ichthulin erscheint der Procentgehalt an Sauerstoff, Phosphor und Eisen in seinem Paranuclein wesentlich erhöht, während derjenige der übrigen Elemente, Schwefel am wenigsten, Stickstoff am meisten, herabgedrückt ist. Unter sich verglichen weichen die Präparate des Paranucleins erheblich im Phosphorgehalt, noch mehr im Stickstoffgehalt von einander ab. In einem anderen Präparat betrug der letztere sogar nur 11,87%.

Diese Schwankungen in der procentischen Zusammensetzung lassen die chemische Reinheit meiner Präparate bzw. ihre Individualität zweifelhaft erscheinen. Jedenfalls wird man das Paranuclein — wenn überhaupt als eine einheitliche — als eine überaus leicht veränderliche Substanz betrachten müssen. Lubavin¹⁾ fand für die Zusammensetzung seines aus Casein gewonnenen Paranucleins ähnliche variirende Verhältnisse, die er dadurch zu erklären suchte, dass er die durch Pepsin bewirkten Niederschläge als Gemenge verschiedenartiger Nucleine betrachtete und sie dementsprechend durch fractionirte Fällungen zu trennen suchte (vergl. Tabelle). Die Durchschnittswerthe seiner Präparate zeigen mit der Zu-

¹⁾ Ber., X, S. 2237, Ref. von G. Wagner.

sammensetzung meiner aus Ichthulin gewonnenen Präparate im Grossen und Ganzen eine so unverkennbare Uebereinstimmung, dass in Verbindung mit ihren chemischen und physikalischen Eigenschaften auch die Paranucleine in ähnlicher Weise wie ihre Muttersubstanzen, Casein und Vitellin, als analoge Körper gelten müssen.

Bei der künstlichen Verdauung des Vitellins der Karpfeneier tritt neben Paranuclein auch Lecithin auf, welches beim Verdampfen der filtrirten alkoholischen und ätherischen Waschflüssigkeiten zurückbleibt und durch den Nachweis seiner Zersetzungsproducte¹⁾ — Fettsäuren, Glycerinphosphorsäure und Cholin (als Platindoppelsalz) — erkannt wird. Da aber zu den Pepsinversuchen lösliches, d. h. nur mit Wasser ausgewaschenes Vitellin verwendet worden war, so blieb die Frage unentschieden, ob das Lecithin als dessen Zersetzungsproduct aufzufassen sei, oder ob dasselbe nicht vielmehr als Begleiter des rohen Ichthulins aus den Karpfeneiern (in welchen es, wie oben gezeigt wurde, enthalten ist) mechanisch in die Pepsinlösung hineingebracht worden sei. Um sich darüber Gewissheit zu verschaffen, wurde mit Alkohol und Aether völlig erschöpftes, nunmehr coagulirtes Ichthulin mit 0,2procentiger Salzsäure angerührt und in der üblichen Weise verdaut. Zwar liessen sich neben Paranuclein auch jetzt Fettsäuren und Phosphorsäure nachweisen, dagegen kein Cholin. Es musste also durch Pepsinwirkung aus Ichthulin noch ein Phosphor und Fettsäuren enthaltender, dem Lecithin vielleicht ähnlicher Körper abgespalten werden. Man konnte hierbei an Protagon denken, auf dessen eventuellen Nachweis ein zweiter Versuch gerichtet wurde. Derselbe wurde nach einem von Herrn Prof. Kossel angegebenen Verfahren in der Weise ausgeführt, dass Ichthulin mit 85procentigem, heissem Alkohol erschöpft, letzterer durch Aether verdrängt und nach dessen Abdunsten wie zuerst verdaut wurde. Durch die fast vollständige Löslichkeit in verdünntem Ammoniak konnte ich mich überzeugen, dass das Verdauungsproduct zum grössten

¹⁾ Hoppe-Seyler, Chem. Analyse, V. Aufl., S. 168.

Theil aus Paranuclein bestand. Dasselbe wurde wieder mit 85procentigem, heissem Alkohol ausgezogen, die Auszüge zur Syrupconsistenz eingeeengt, in Methylalkohol gelöst und mit einer gesättigten Lösung von Aetzbaryt in Holzgeist während 10 Minuten auf dem Wasserbade digerirt. Der hierbei entstehende Niederschlag wurde zum Nachweis des aus Protagon entstandenen Cerebrins zunächst in Wasser zertheilt, durch dasselbe längere Zeit Kohlensäure geleitet, filtrirt, der Filtrerrückstand mit heissem Alkohol ausgezogen, wieder filtrirt und die neben Baryumcarbonat zurückbleibenden Barytseifen auf Fettsäuren geprüft durch Abscheiden derselben mit Salzsäure, Lösen in Aether, Ausschütteln mit Natronlauge und Wiederabscheiden mit Salzsäure. Das alkoholische Filtrat wurde eingedampft, der Rückstand mit conc. Schwefelsäure verrieben, in siedendes Wasser eingetragen und 5—10 Minuten lang mit letzterem gekocht. Die filtrirte Flüssigkeit reducirte alkalische Kupferlösung. Daher glaubte ich, die reducirende Substanz unter Berücksichtigung ihrer Entstehungsverhältnisse als aus Protagon bezw. Cerebrin entstandene Galactose ansehen zu dürfen. Doch stellt der nachfolgende Versuch diese Schlussfolgerung in Frage, weil er zeigt, dass das Paranuclein ebenso wie das Nuclein der Hefe ein zuckerartiges Spaltungsproduct liefert.

In dem schon citirten Sitzungsbericht machte Herr Prof. Kossel die interessante Mittheilung, dass die aus Hefe dargestellte Nucleinsäure nach längerem Kochen mit verdünnter Schwefelsäure ausser freier Phosphorsäure und Nucleinbasen verschiedene Spaltungsproducte liefere, von welchem das eine mit neutralem, das andere mit basischem Bleiacetat Niederschläge gebe, und dass nach seinem chemischen Verhalten das letztere in das Gebiet der Kohlehydrate gehöre.

Gelänge es, auch aus thierischem Eiweiss diesen Körper abzuspalten, so wäre die Lösung der physiologisch wichtigen Frage nach der Bildung von Kohlehydraten im Thierkörper aus Eiweisssubstanzen insofern näher gerückt, als wenigstens einmal experimentell die Möglichkeit dieser Umwandlung erwiesen wäre. Die engen Beziehungen zwischen Nucleinen und Paranucleinen liessen eine ähnliche Spaltbarkeit der letzteren

erhoffen, und so führte ich denn einen Parallelversuch mit aus Ichthulin dargestelltem Paranuclein aus.

Zwei Gramm sorgfältig mit Wasser, Alkohol und Aether ausgewaschener Substanz wurden erst längere Zeit mit stark verdünnter Schwefelsäure am Rückflusskühler gekocht, abfiltrirt, die gelbbraune Lösung wieder mit concentrirterer Schwefelsäure (1 : 5) in der vorigen Weise erhitzt, die Säure mit Baryt zum grösseren Theil ausgefällt, genau mit Natronlauge neutralisirt, hierauf das Filtrat mit überschüssigem, neutralem Bleiacetat versetzt und das Filtrat dieses Niederschlages mit basischem Bleiacetat gefällt. Der letztere Niederschlag, mit Schwefelwasserstoff in Wasser zerlegt, lieferte beim Eindampfen des Filtrats einen fast farblosen, pulverigen Rückstand, welcher alkalische Kupferlösung energisch reducirte. Er enthielt, jedenfalls als mechanische Verunreinigung, minimale Spuren von Phosphorsäure. Eine Probe der reducirenden Substanz, mit salzsaurem Phenylhydrazin und Natriumacetat etwa eine Stunde im Dampfbade erwärmt, lieferte gut ausgebildete, doppelbrechende Krystallnadeln, zu strahlig angeordneten Büscheln vereinigt.

Nach diesem Verhalten konnte es nicht zweifelhaft sein, dass das von Kossel aus Hefenuclein gewonnene Kohlehydrat oder wenigstens ein diesem ähnlicher Körper auch hier vorlag und dass somit in der That bei der Spaltung des thierischen Vitellins bezw. Paranucleins reducirende Kohlehydrate gebildet werden.
