

Zur Kenntniss der Nucleoproteïde.

Von

Olof Hammarsten.

(Der Redaction zugegangen am 30. December 1893.)

In denjenigen Fällen von Glykosurie oder Diabetes, in welchen die Abstammung des Zuckers nicht von dem Glykogen oder anderen Kohlehydraten hergeleitet werden kann, hat man bekanntlich den Ursprung des Zuckers in dem Zerfalle von Eiweisskörpern gesucht. Man hat sogar versucht, die Menge Zucker zu berechnen, die im günstigsten Falle aus dem Eiweiss entstehen könnte, und daraus hat man dann weitere Schlüsse über die Art und Grösse des Stoffwechsels in den verschiedenen Formen von Diabetes gezogen. Man darf indessen hierbei nicht übersehen, dass es eine besondere Gruppe von Proteïden gibt, aus denen im Thierkörper wahrscheinlich Zucker abgespaltet werden könne, nämlich die Glykoproteïde; und es ist deshalb auch nicht unwichtig, das Vorkommen von solchen Proteïden in den Geweben und Organen genauer zu erforschen.

Von diesem Gedanken geleitet, machte ich mir schon vor mehreren Jahren zur Aufgabe, zu erforschen, in wie weit es ausser den echten Mucinen und den im Thierkörper weit verbreiteten Mucoïden auch andere Glykoproteïde in den Geweben gäbe. Dabei richtete ich besonders meine Aufmerksamkeit auf die Milchdrüse, das Pankreas und die Leber, und ich fand auch bald, dass besonders aus den zwei erstgenannten Organen

ohne Schwierigkeit ein Proteïd sich isoliren lässt, welches beim Sieden mit verdünnter Mineralsäure eine reducirende Substanz liefert. Die in gewissen Hinsichten unerwarteten Resultate, die ich im Laufe der Arbeit erhielt, und die vielen neuen Fragen, die in Folge davon sich aufdrängten, machten es indessen bald nothwendig, die Untersuchung auf nur ein bestimmtes Organ und ein bestimmtes Proteïd zu beschränken. Aus diesem Grunde liess ich auch bald die Untersuchungen über die Milchdrüse und die Leber bei Seite und wandte mich ausschliesslich zu der Untersuchung des Pankreasproteïdes.

Die Resultate dieser schon vor mehreren Jahren begonnenen Untersuchungen theilte ich im März 1892 der ärztlichen Gesellschaft in Upsala mit, und diese Untersuchungen sind schon vor bald einem Jahre in schwedischer Sprache veröffentlicht worden. Ich hatte gehofft, dieselben vor dieser Veröffentlichung in mehreren Hinsichten vervollständigen zu können; da mir aber die Zeit hierzu gefehlt hat und da ich auch in dem nächsten Jahre diese Arbeit wahrscheinlich ruhen lassen muss, wollte ich mit der Veröffentlichung der bisher gewonnenen Resultate in deutscher Sprache nicht länger zögern.

Wenn die fein zerschnittene oder zerhackte, vorher reinpräparirte, ganz frische Pankreasdrüse von Rindern in Wasser rasch gekocht wird, so erhält man leicht ein ganz klares, blassgelb gefärbtes Filtrat, in dem man nach dem Erkalten durch Zusatz von Salzsäure bis zu 1—2 p. m. oder von Essigsäure, 5—10 p. m., einen reichlichen, weissflockigen Niederschlag erhält. Durch wiederholtes Auflösen in Wasser mit Hülfe von möglichst wenig Alkali und Wiederausfällen mit einer Säure kann dieser Niederschlag, welcher aus dem Proteïde besteht, gereinigt werden. Eine durch Zusatz von sehr wenig Alkali bereitete, wässerige Lösung des so gewonnenen Proteïdes gibt bei Ausführung der Trommer'schen Probe keine Spur einer Reduction. Versetzt man sie dagegen mit einer verdünnten Mineralsäure, so dass sie etwa 1—2% HCl oder 2—4% H₂SO₄ enthält, und erhitzt im Wasserbade eine halbe oder ganze Stunde, so kann man nunmehr, wenn die Lösung mit einer passenden Kupfersulfat- und Alkalimenge

versetzt wird, eine schöne Reduction erhalten. Bei dem Erhitzen im Wasserbade spaltet sich aber auch eine reichliche Menge von Nucleinbasen, besonders Guanin, ab und in Folge dessen erhält man leicht statt der typischen Trommer'schen Probe je nach der Menge des Kupfersulfates einen blassblauen, weisslich grünen oder missfarbigen Niederschlag¹⁾).

Wegen des Auftretens einer reducirenden Substanz nach dem Sieden mit einer Mineralsäure glaubte ich, besonders bevor ich die Abspaltung des Guanins kennen gelernt hatte, hier ein neues Glykoproteid gefunden zu haben. Die weiteren Beobachtungen und in erster Linie die Stickstoffbestimmungen lehrten indessen bald, dass die Verhältnisse hier etwas complicirter waren.

Da die Glykoproteide, wie die Mucine, die Mucoide und das Helicoproteid aus der Weinbergschnecke²⁾ als Spaltungsproducte Eiweiss und Kohlehydrate oder Kohlehydratsäuren liefern, müssen sie selbstverständlich ärmer an Stickstoff als das Eiweiss sein. Dementsprechend schwankt auch der Gehalt der bisher untersuchten Glykoproteide an Stickstoff zwischen 6% und 13,7%. Das aus dem Pankreas dargestellte Proteid hatte dagegen den auffallend hohen Gehalt von 17,4% Stickstoff und es war also sogar etwas reicher an Stickstoff als die meisten genuinen Eiweisskörper thierischen Ursprunges. Offenbar handelte es sich hier also entweder um ein von einer anderen stickstoffreichen Substanz verunreinigtes Glykoproteid oder auch um ein Proteid ganz anderer Art als die bisher bekannten Glykoproteide.

Bei der Zersetzung des fraglichen Proteides mit Schwefelsäure von etwa 2% im Wasserbade beobachtete ich einige Male, dass die saure Lösung, wenn sie etwas concentrirt wurde, nach dem Erkalten einen bräunlich gefärbten, krystallinischen Bodensatz absetzte. Aus einer grösseren Proteid-

¹⁾ Man vergleiche die Beobachtungen von Drechsel und Balke in der Inauguraldissertation von Paul Balke «Zur Kenntniss der Xanthinkörper, Leipzig 1893.

²⁾ Olof Hammarsten, Studien über Mucin etc., Pflüger's Archiv, Bd. 36, S. 428.

menge stellte ich eine grössere Portion der fraglichen Substanz dar und nachdem ich sie durch Entfärben mit Thierkohle und Umkrystallisiren gereinigt hatte, fand ich, dass sie aus Guaninsulfat bestand.

Der hohe Stickstoffgehalt des Pankreasproteïdes war also leicht erklärlich. Er rührte von einem Gehalte desselben an Nucleïnbasen her. Unter diesen Basen findet sich in unverhältnissmässig grösster Menge das Guanin vor, während ich von den anderen Basen so unbedeutende Mengen erhalten habe, dass ich sie nicht zum Gegenstand einer genaueren Untersuchung habe machen können. Aus diesem Grunde spreche ich auch oft in der Folge der Kürze halber statt von Nucleïnbasen einfach von dem Guanin.

Nachdem ich aus dem Proteïde Guanin erhalten hatte, war die nächste Frage also die, ob das Guanin nur als Verunreinigung dem Proteïde beigemischt oder als Spaltungsproduct aus dem Proteïdmolecüle hervorgegangen sei. Für die letztere Möglichkeit spricht schon die constante Zusammensetzung des Proteïdes. Hinsichtlich des Stickstoffgehaltes habe ich 8 verschiedene Präparate analysirt, die durch wiederholtes Auflösen in alkalihaltigem Wasser und Ausfällen theils mit Essigsäure und theils mit Chlorwasserstoffsäure dargestellt und gereinigt waren. In diesen 8 Präparaten schwankte der Stickstoffgehalt nur zwischen 17,3 und 17,45 %.

Um die elementäre Zusammensetzung des Pankreasproteïdes weiter zu beleuchten, theile ich hier diejenigen Zahlen mit, die ich bei der Elementaranalyse drei verschiedener Präparate erhalten habe. Die Zahlen beziehen sich auf die mit Alkohol und Aether erschöpfte, als aschefrei berechnete Substanz.

	C.	Cl.	N.	S.	P.
1.	43,56 %	5,46 %	17,45 %	0,724 %	4,45 %
2.	43,51 »	5,43 »	17,35 »	0,731 »	4,54 »
3.	43,78 »	5,47 »	17,37 »	0,730 »	4,44 »
Mittel	43,62 %	5,45 »	17,39 %	0,728 %	4,48 %

Die Substanz ist stark eisenhaltig. Quantitative Bestimmungen des Eisens habe ich indessen noch nicht ausgeführt.

Wenngleich die constante Zusammensetzung der verschiedenen Präparate entschieden gegen die Annahme spricht, dass das Guanin nur als Verunreinigung der Substanz beigemischt sei, so habe ich doch auch in anderer Weise die Berechtigung einer solchen Annahme zu prüfen mich bemüht. Um das von mir dabei befolgte Verfahren zu beleuchten, theile ich hier als Beispiel den folgenden Versuch mit.

Ich bereitete mir eine 1 procentige Lösung des Proteïdes in schwach ammoniakalischem Wasser und mass von derselben drei Portionen von je 20 cbcm. ab. Die erste Portion versetzte ich mit 10 cbcm. Schwefelsäure (von 10%) und übersättigte darauf mit silbernitrat haltigem Ammoniak (einem Gemenge von 30 cbcm. 10procentigem Ammoniak und 2 cbcm. einer 5procentigen Silbernitratlösung). Diese Portion blieb hierbei absolut klar, und im Laufe von 8 Tagen (länger setzte ich die Beobachtung nicht fort) trat keine Spur einer Trübung oder Fällung auf. Es konnte also in dieser Portion keine Spur von Nucleïnbasen direkt nachgewiesen werden. Die zweite Portion versetzte ich ebenfalls mit 10 cbcm. einer 10procentigen Schwefelsäure, erwärmte sie aber darauf während einer Stunde im Wasserbade. Nach dem Erkalten fügte ich dieselbe Menge ammoniakalischer Silberlösung wie in der ersten Portion hinzu, und es trat dabei sogleich eine starke Trübung auf, die bald in eine flockige Fällung von Guaninäther überging. In dieser Portion konnte also die Gegenwart von Nucleïnbasen nach dem Erwärmen mit verdünnter Schwefelsäure leicht nachgewiesen werden. Gegen die Beweiskraft dieser Versuche könnte man nun den Einwand machen, dass das mit verdünnter Säure in der Wärme nicht behandelte Proteïd vielleicht die Fähigkeit hat, die Ausfällung etwa gebildeten Guaninsilbers zu verhindern. Um die Berechtigung einer solchen Einwendung zu prüfen, verunreinigte ich absichtlich die dritte Portion mit einigen Milligrammen in sehr wenig verdünnter Natronlauge gelösten Guanins und setzte nun verdünnte Schwefelsäure und darauf ammoniakalische Silber-

lösung wie in der Portion 1 hinzu. In dieser Probe trat nun sogleich eine Trübung und bald darauf ein feinflockiger Niederschlag auf, und es konnte also in dieser mit Säure nicht erwärmten Probe das absichtlich zugesetzte Guanin nachgewiesen werden.

Versuche dieser Art und mit gebührend variirten quantitativen Verhältnissen habe ich mehrere Male ausgeführt und immer mit demselben Resultate. In der mit Säure nicht erwärmten Lösung des Proteïdes konnte nie die Spur einer Nucleïnbase nachgewiesen werden; in der mit Säure erwärmten Lösung gelang dieser Nachweis dagegen leicht und sicher.

Aus diesen Versuchen wie auch aus der constanten Zusammensetzung des Proteïdes habe ich mich berechtigt gesehen, den Schluss zu ziehen, dass das Guanin (bezw. die etwaigen anderen Nucleïnbasen) nicht dem Proteïde einfach beigemischt sind, sondern durch eine Spaltung aus demselben hervorgehen.

Es handelt sich hier also um ein Proteïd von sehr complicirter Zusammensetzung, und aus dem hohen Phosphorgehalte wie auch aus dem Auftreten von Nucleïnbasen (Guanin) bei der Zersetzung desselben folgt ohne weiteres, dass es den Nucleïnsubstanzen nahe steht. Als ein echtes Nucleïn konnte ich es indessen nicht auffassen, denn einerseits spaltet sich aus ihm bei der Pepsinverdauung eine nucleïnähnliche Substanz ab und andererseits liefert es beim Sieden mit verdünnter Mineralsäure eine reducirende Substanz.

Löst man das Pankreasproteïd in Chlorwasserstoffsäure von 0,2 — 0,5% HCl, setzt Pepsinlösung hinzu und lässt bei Körpertemperatur stehen, so scheidet sich nach einiger Zeit eine Substanz von den Eigenschaften des Nucleïns ab. Dieses Nucleïn, welches dieselben Spaltungsproducte wie das ursprüngliche Pankreasproteïd liefert, ist etwas, aber nur wenig, reicher an Phosphor als dieses. Der Gehalt an Phosphor war nämlich 5,21%

Hinsichtlich der Löslichkeitsverhältnisse steht das Pankreasproteïd indessen den echten Nucleïnen nahe, indem es nämlich in sehr verdünnter Salzsäure schwer löslich ist. Dies folgt schon aus der Darstellungsmethode, bei deren Be-

sprechung ich schon angab, dass man die Substanz durch Zusatz von verdünnter Salzsäure bis zu 0,1—0,2% HCl ausfällen kann. Um hierbei grössere Verluste an Substanz zu vermeiden, ist es indessen nothwendig, die Ausfällung in einer kalten, nicht zu stark verdünnten Flüssigkeit vorzunehmen. Bei den Verdauungsversuchen arbeitet man dagegen am besten mit stark verdünnten Lösungen; und bei der Verdauung mit Pepsinchlorwasserstoffsäure verfuhr ich in folgender Weise. Ich löste die Substanz in Wasser mit Hülfe von ein wenig Alkali und verdünnte die so gewonnene, neutrale Lösung mit Wasser, bis der Gehalt an Substanz 0,5% betrug. Diese Lösung wurde dann auf etwa 37—40° C. erwärmt und mit dem gleichen Volumen einer ebenfalls auf gegen 40° C. erwärmten Salzsäure von 0,5% HCl gemischt. Von dieser Gemenge wurde eine kleine Portion der Controlle halber abgemessen und in einer Flasche im Verdauungssofen aufbewahrt. Die Hauptmenge der sauren Proteidlösung wurde mit einer kleinen Menge einer sehr kräftigen sauren Pepsinlösung versetzt und bei 40° C. der Verdauung überlassen. Schon nach wenigen Stunden fing diese Probe an sich zu trüben und es trat bald darauf ein flockiger Niederschlag auf, während die Controllprobe tagelang erwärmt werden konnte, ohne sich zu trüben. Im Gegentheil wurde die ursprünglich recht starke Opalescenz etwas schwächer.

Da also das Pankreasproteid bei der Pepsinverdauung unter Abscheidung von einer nucleinähnlichen Substanz sich spaltet, sah ich mich nicht berechtigt, das Proteid selbst als ein Nuclein zu betrachten. Ich bezeichnete es deshalb einfach als ein Nucleoproteid, wenn ich auch gern zugebe, dass es durch seine Schwerlöslichkeit in verdünnter Salzsäure den Nucleinen sehr nahe steht.

Ein weit wichtigerer Grund, die Substanz nicht als ein Nuclein aufzufassen, war für mich der Umstand, dass sie beim Sieden mit einer verdünnten Mineralsäure eine reducirende Substanz gab. Zu jener Zeit, wo ich in meinen Untersuchungen zu diesem Punkte gekommen war, fanden sich nämlich meines Wissens noch keine Beobachtungen über

das Vorkommen von Kohlehydratgruppen in Nucleïnsubstanzen vor. Nunmehr sind durch die bahnbrechenden Untersuchungen von Kossel und seinen Schülern derartige Beobachtungen bekannt geworden, und wenn ich auch fortwährend die Substanz nicht als ein typisches Nucleïn betrachten kann, so trage ich selbstverständlich nunmehr nicht das geringste Bedenken, sie als eine Nucleïnsubstanz, und zwar als ein Nucleoproteïd, zu bezeichnen.

Ich gehe nun zu dem zweiten wichtigen Spaltungsproducte des Pankreasproteïdes, nämlich der reducirenden Substanz über. Ich muss dabei sogleich bemerken, dass meine Bemühungen, diese Substanz in reinem Zustande zu gewinnen, bisher ohne Erfolg geblieben sind. Aus diesem Grunde stand ich auch nach einiger Zeit von diesen Bemühungen ab und versuchte statt dessen ein Osazon derselben darzustellen. Dies ist mir auch gelungen. Bevor ich aber zu der Besprechung dieses Osazons¹⁾ übergehe, will ich erst über die von mir zur Reingewinnung der Substanz am öftersten verwendete Methode berichten, weil diese Methode auch bei der Darstellung des Osazons in der Hauptsache befolgt wurde.

Das Proteïd wird mit Schwefelsäure von etwa 3% H_2SO_4 (etwa 30 gr. Proteïd auf je 1 Liter Säure) einige Stunden im siedenden Wasserbade erwärmt. Darauf wird mit Barythydrat fast vollständig neutralisirt und warm filtrirt. Aus dem Filtrate scheidet sich beim Erkalten etwas Guaninsulfat aus, welches abfiltrirt wird (durch Auskochen der Barytfällung mit verdünnter Schwefelsäure kann noch eine Portion Guanin gewonnen werden). Das von dem Baryumniederschlage getrennte gelbbraune Filtrat wird mit Baryumcarbonat vollständig neutralisirt, auf dem Wasserbade verdunstet, von ausgeschiedenen Nucleïnbasen (Guanin) durch Filtration getrennt, zum dünnen Syrup concentrirt und mit überschüssigem Alkohol gefällt. Die blassgelbe, alkoholische Flüssigkeit wird von dem braungefärbten Niederschlage getrennt. Der letztere wird in wenig Wasser gelöst und zum zweiten Male mit Alkohol

¹⁾ Obzwar die Natur dieser Verbindung noch nicht durch Analysen ermittelt ist, nenne ich sie doch in dem Folgenden der Kürze halber Osazon.

gefällt. Dieses zweite alkoholische Filtrat wird mit dem ersten vereinigt und beide dann bei gelinder Temperatur, 50—60° C., zusammen verdunstet. Die nach dem Verdunsten des Alkohols zurückbleibende Flüssigkeit wird mit etwas Wasser verdünnt und darauf mit Kupfersulfatlösung versetzt, bis kein Niederschlag weiter entsteht. Das neue Filtrat wird mit Barytlösung versetzt, der neue Niederschlag abfiltrirt, das Filtrat mit Kohlensäure von überschüssigem Baryt befreit und wiederum filtrirt. Das zuletzt erhaltene Filtrat wird nun mit einer ziemlich concentrirten Lösung von Gerbsäure in Wasser so lange gefällt, bis keine Trübung mehr entsteht. Die überschüssige Gerbsäure entfernt man darauf aus dem Filtrate zuerst zum grössten Theile mit Bleizuckerlösung und zuletzt mit Bleiessig, wobei indessen ein theilweiser Verlust an reducirender Substanz nicht ganz zu vermeiden ist. Aus dem gerbsäurefreien Filtrate entfernt man das Blei mit Schwefelwasserstoff, welcher letzterer durch einen Luftstrom verjagt wird. Man erhält in dieser Weise zuletzt ein ganz farbloses Filtrat, welches stark reducirend wirkt. Dieses Filtrat bräunt sich indessen bei dem Abdampfen und es liefert sogar bei dem Verdunsten über Schwefelsäure bei Zimmertemperatur einen gelbbraunen, amorphen Rückstand. Behandelt man den letzteren mit Alkohol, so löst sich die Hauptmasse, während ein flockiger, ungelöster Rest zurückbleibt. Lässt man das alkoholische Filtrat über Schwefelsäure verdunsten, so erhält man wiederum einen syrupösen Rückstand, der zum Theil in Alkohol löslich, zum Theil darin unlöslich ist. Die Substanz scheint sich also bei dem Verdunsten zu zersetzen und noch habe ich, wie gesagt, keine Methode zur Reingewinnung der reducirenden Substanz finden können.

Ueber die Eigenschaften derselben habe ich desshalb auch nicht viel zu sagen. Die Substanz ist leicht löslich in Alkohol. Aus dieser Lösung wird sie durch Zusatz von Aether als eine amorphe, weisslich gelbe Masse gefällt, die in Wasser äusserst leicht löslich ist. Diese Lösung hat einen schwach süsslichen und etwas bitteren Geschmack. Ob die Lösung optisch activ ist, habe ich nicht entscheiden können.

weil ich entweder mit zu verdünnten oder, bei stärkerer Concentration mit zu stark gefärbten Lösungen gearbeitet habe. Die Lösung vergäht mit Hefe nicht. Auffallend ist es, dass die Lösung eine starke Reaction auf Pentosen mit Phloroglucinsalzsäure gibt. Ebenso gab die etwas concentrirtere Lösung bei der Destillation mit Salzsäure Furfurol im Destillate.

Zur Darstellung des Osazons verwendete ich am öftersten das, wie oben angegeben, erhaltene, mit Schwefelwasserstoff entbleite Filtrat. Nach dem vollständigen Verjagen des Schwefelwasserstoffs wurde neutralisirt, mit salzsaurem Phenylhydrazin und Natriumacetat versetzt und im Warmbade etwa eine halbe Stunde erwärmt. Nach dem Erkalten scheidet sich dann in reichlicher Menge das Osazon als eine blassgelbe Masse aus, die abfiltrirt wird. Aus dem Filtrate scheidet sich nach fortgesetztem Erwärmen beim Abkühlen noch eine Quantität Osazon aus. Die gelbe Masse, welche an der Luft nach einiger Zeit mit einer braunen, dünnen Haut sich überzieht, zeigt bei mikroskopischer Untersuchung hauptsächlich lange, durcheinander geflochtene Fäden oder zu Rosetten vereinigte feine Nadeln nebst amorphen Massen. Zur Darstellung des Rohproductes ist es übrigens nicht nothwendig, das obige entbleite Filtrat zu verwenden. Ich habe nämlich auch das Osazon aus dem Filtrate vor der Gerbsäurebehandlung darstellen können; doch erhält man leichter ein weniger unreines Product aus dem erstgenannten, entbleiten Filtrate.

Behufs der weiteren Reinigung wird das Osazon wiederholt aus siedendem Wasser oder aus Alkohol durch Verdünnung mit warmem Wasser und Erkaltenlassen umkrystallisirt. Erst nach mehrmaligem Umkrystallisiren kommt man hierbei soweit, dass keine harzigen, amorphen Massen neugebildet werden, und die Reinigung ist desshalb auch leider mit grossen Verlusten verbunden.

Das Osazon ist äusserst schwerlöslich in kaltem Wasser, löst sich aber verhältnissmässig leicht in siedendem. Wenn die Lösung nicht sehr verdünnt ist, so erstarrt sie beim Erkalten zu einer gelben Masse, die aus Häuten und zusammengefilzten Nadeln besteht. Löst man dagegen das Osazon in

viel warmem Wasser, so dass die Ausscheidung langsam aus einer sehr verdünnten Lösung erfolgt, so erhält man, wenn das Osazon im übrigen rein ist, lauter feine Krystallnadelchen, die zu Ballen oder Rosetten gruppiert sind. Das Osazon ist ungemein leicht löslich in Alkohol, Aether und Chloroform. Aus der verdünnten alkoholischen Lösung kann man, wie oben bemerkt, durch Verdünnung mit warmem Wasser bis zur bleibenden Trübung und Erkaltenlassen das Osazon umkrystallisiren.

Nachdem ich bei der Reinigung des Osazons so weit gekommen war, dass es bei mikroskopischer Untersuchung nur rosettenartig gruppierte feine Krystallnadeln ohne Beimengung von amorpher Substanz zeigte, bestimmte ich den Schmelzpunkt desselben. Das Osazon schmolz bei 159° C. oder genauer zwischen $158-160^{\circ}$ C. Selbst nach neuem 4—5maligem Umkrystallisiren blieb der Schmelzpunkt constant.

Trotzdem ich dieses Osazon mehrere Male dargestellt habe, kann ich doch über die elementäre Zusammensetzung desselben keine Angaben machen. Wegen der bei der Reindarstellung unvermeidlichen grossen Verluste habe ich nämlich im Ganzen nur wenig Substanz erhalten und die einzige Elementaranalyse, die ich unternommen habe, ging leider durch einen Unfall verloren.

Aus dem Schmelzpunkte und den Löslichkeitsverhältnissen des in Rede stehenden Osazons folgt indessen, dass es mit keinem der gewöhnlichen Osazone identisch sein kann. Dagegen hat es denselben Schmelzpunkt wie die Osazone der Pentaglykosen, und dieses Verhalten wird von einem besonderen Interesse, wenn man der Beobachtungen von E. Salkowski und M. Jastrowitz¹⁾ sich erinnert. Diese Forscher konnten nämlich aus dem Harne eines Morphinisten ein Pentaglykosazon darstellen, dessen Schmelzpunkt 159° C. war, und welcher mit dem aus dem Pankreasproteide dargestellten auch darin übereinstimmte, dass es in kaltem Wasser schwer, in warmem dagegen verhältnissmässig leicht löslich war. Wenn man sich nun weiter vergegenwärtigt, dass die von mir erhaltenen Lösungen der reducirenden Substanz, aus welchen das

¹⁾ Centralbl. f. die med. Wiss., Jahrg. 30, 1892, Nr. 19 und 32.

Osazon dargestellt wurde, mit dem Tollens'schen Reagense starke Pentaglykosereaction gaben und dass sie ferner bei der Destillation mit Salzsäure reichlich Furfurol lieferten, so dürfte gewiss die Annahme nahe liegen, dass bei der Spaltung des Pankreasproteïdes mit verdünnter Schwefelsäure Pentaglykose entsteht.

Trotz dieser naheliegenden Annahme dürfte es doch vielleicht am richtigsten und vorsichtigsten sein, noch keine ganz bestimmten Schlüsse zu ziehen, denn es gibt ja ausser den Pentaglykosen noch eine andere Substanz, welche ebenfalls die Pentaglykosereactionen gibt, nämlich die Glykuronsäure¹⁾. Bezüglich des Verhaltens dieser Säure zu der Phenylhydrazinprobe gehen indessen leider die Angaben etwas auseinander. E. Fischer²⁾ erhielt aus Glykuronsäureanhydrid mit salzsaurem Phenylhydrazin und Natriumacetat im Wasserbade nach einiger Zeit braune Tropfen und eine zähe schwarze Masse. Thierfelder³⁾ dagegen erhielt aus glykuronsaurem Kali mit derselben Reaction eine flockige gelbe, aus microscopischen Nadeln bestehende Fällung. Die gereinigte Fällung hatte einen Schmelzpunkt von 114—115° C. und einen Gehalt von 16,58% Stickstoff. Geyer⁴⁾ erhielt dagegen sowohl mit Glykuronsäure wie mit glykuronsaurem Natron einen aus gelben, mikroskopischen Nadeln bestehenden Niederschlag, welcher weder hinsichtlich der Krystallform noch bezüglich der Löslichkeit irgend welchen Unterschied von dem gewöhnlichen Glykosazon zeigte. Endlich gibt Hirschler⁵⁾ an, dass er bei Versuchen mit glykuronsaurem Natron bei kurzdauernder Erwärmung zwar Krystalle erhalten hat, dass diese aber nicht ganz wie die gewöhnlichen Phenylglykosazonkrystalle sich verhielten. Beim Erwärmen während einer Stunde oder mehr erhielt er nur einen amorphen braungelben Niederschlag.

¹⁾ Wheeler und Tollens, Ann. d. Chem. u. Pharm., 254; Tollens, Günther und de Chalmot, Berliner Berichte. Bd. 23, S. 1752; und Bd. 25, S. 2569.

²⁾ Berliner Berichte, Bd. 17.

³⁾ Zeitschrift für physiol. Chemie, Bd. 11.

⁴⁾ Wiener Med. Presse, Bd. 30.

⁵⁾ Zeitschrift für physiol. Chemie, Bd. 14.

Eigene Erfahrungen über das Verhalten der Glykuronsäure bei der Phenylhydrazinprobe habe ich nicht mitzutheilen. Wenn ich aber das Verhalten des von mir dargestellten Osazons, sei es mit der einen oder der anderen der obigen, unter einander widersprechenden Angaben vergleiche, so finde ich nur Verhältnisse, welche der Glykuronsäurenatur derselben widersprechen. Ich habe also keinen Grund zu der Annahme, dass die von mir bei der Phenylhydrazinprobe erhaltene krystallisirende Substanz eine Glykuronsäureverbindung sei. Hiermit soll natürlich nicht ausgesagt sein, dass bei der Zersetzung des Proteïdes nicht auch Glykuronsäure vielleicht entsteht. Im Gegentheil macht das Verhalten der Lösung bei der Verdunstung, die ausserordentlich leichte Zersetzung der reducirenden Substanz unter Braunfärbung die Gegenwart von Glykuronsäure unter den Zersetzungsproducten des Proteïdes nicht unwahrscheinlich. Uebrigens muss ich bemerken, dass die obigen Angaben über Pentosereactionen nicht auf das Osazon selbst, sondern auf diejenige Lösung sich beziehen, aus welcher das Osazon dargestellt wurde. Es ist also wohl möglich, dass die fragliche Lösung zwei reducirende Substanzen enthält, von denen die eine die Osazonkrystalle liefert, die andere dagegen die obigen Pentose- oder Glykuronsäurereactionen gibt. Wie es sich hiermit verhält, muss ich diesmal dahingestellt sein lassen.

Die Thatsache, dass unter den Spaltungsproducten des Pankreasproteïdes auch reducirende Kohlehydrate sich vorfinden, die einerseits ein krystallisirendes Osazon liefern können und andererseits Pentosenreactionen geben, gewinnt an Interesse, wenn man die Untersuchungen von Kossel¹⁾ über die Hefenucleïnsäure sich vergegenwärtigt. Unter den Zersetzungsproducten der aus Hefe dargestellten Nucleïnsäure mit verdünnter Säure konnte er nämlich sowohl Pentaglykose wie eine Hexose nachweisen. Meine Untersuchungen zeigen nun, dass auch die Nucleïnsubstanzen thierischen Ursprunges reducirende Kohlehydrate liefern können. Dass ein solches Ver-

¹⁾ Ueber die Nucleïnsäure. Verhandlungen der physiol. Gesellschaft zu Berlin, Sitzung am 14. October 1892 (Separatabzug).

halten nicht dem Pankreasproteide allein, sondern auch anderen Nucleinsubstanzen zukommt, ist schon an und für sich wahrscheinlich und es lässt sich direct beweisen. Ich habe nämlich, wie Eingangs erwähnt wurde, auch aus der Milchdrüse ein Nucleoproteid isoliren können, welches beim Sieden mit verdünnter Mineralsäure eine reducirende Substanz liefert. Auch in diesem Falle ist es mir gelungen, ein krystallisirendes Osazon darzustellen.

Das nun hinsichtlich seiner Zersetzungsproducte von mir besprochene Nucleoproteid kommt übrigens nicht in der Drüse vorgebildet vor. Es entsteht vielmehr beim Sieden der Drüse mit Wasser durch Zersetzung einer anderen weit mehr complicirten Nucleinsubstanz, die in der Drüse vorkommt. Dieses letztere Proteid, welches ich der Kürze halber einfach als Proteid α bezeichne, spaltet sich nämlich, wenn seine Lösung in Wasser gekocht wird, in coagulirtes Eiweiss und das oben besprochene Proteid, welches ich Proteid β nenne. Dies ist der Grund, warum das Proteid β nach dem obigen Verfahren durch Sieden der Drüse mit Wasser gewonnen werden kann. Hierbei spaltet sich nämlich das Proteid α in geronnenes Eiweiss und das Proteid β , welches als Alkaliverbindung in dem Filtrate gelöst bleibt und daraus durch Säurezusatz gefällt werden kann. Das α -Proteid gehört also zu den hochcomplicirten Nucleoproteiden, welche von verschiedenen Forschern als Gewebefibrinogen (Wooldridge), Cellfibrinogen (Wright), Cytoglobin und Präglobulin (Alex. Schmidt), Nucleohiston (Kossel und Lilienfeld), Cellglobulin (Halliburton) und Nucleoalbumin (Pekelharing) beschrieben worden sind. Das β -Proteid steht dagegen dem echten Nuclein sehr nahe.

Man kann nun fragen, warum ich das Proteid β , welches ja nur ein Spaltungsproduct ist, und nicht die Muttersubstanz desselben, das Proteid α , studirt habe. Hierzu kann ich Folgendes antworten. Da es vor Allem daran lag, die nicht eiweissartigen Spaltungsproducte des Proteides zu studiren, war es selbstverständlich einfacher und besser, ein eiweissärmeres Material als Ausgangspunkt für die Untersuchung zu

nehmen. Der wichtigste Grund war aber der, dass die Reindarstellung des Proteïdes α mit so grossen Schwierigkeiten verbunden ist, dass — wenn man es einigermaßen rein erhalten will — die Ausbeute daran gar zu gering wird. Eine äusserst schwer zu entfernende Verunreinigung ist der Blutfarbstoff und ebenso ein anderer Farbstoff, der, wie es scheint, aus dem Proteïde selbst durch Zersetzung an der Luft entsteht. Eine andere Verunreinigung ist das Trypsin. Das Proteïd α wirkt nämlich so ungemein kräftig verdauend, dass ich nach keiner Methode ein kräftiger wirkendes Trypsin habe herstellen können und es war deshalb auch sogar fraglich, ob nicht das Proteïd α als Trypsin zu betrachten wäre. Auf Grund mehrerer älteren Beobachtungen, namentlich der Untersuchungen von Kühne über das Trypsin, glaube ich indessen eine solche Annahme zurückweisen zu müssen, obwohl ich durch eigene Versuche noch keine Klarheit in dieser Frage gewonnen habe. Da die Reindarstellung des Proteïdes α mir noch nicht gelungen ist, und da ich namentlich die Annahme, dass das Trypsin eine Verunreinigung desselben sei, noch nicht sicher zurückweisen kann, so will ich diesmal keine weiteren Mittheilungen über dieses Proteïd machen.

Auf dem Gebiete der Nucleïnsubstanzen besteht hinsichtlich der Nomenclatur gegenwärtig eine gewisse Unklarheit, insofern als einige Forscher alle diejenigen Stoffe, welche bei der Pepsinverdauung ein unlösliches, phosphorhaltiges Spaltungsproduct liefern, als Nucleoalbumine bezeichnen, während andere dagegen theils von Nucleoalbuminen und theils von Nucleoproteïden sprechen. Aus dieser Unklarheit kann leicht eine wirkliche Verwirrung hervorgehen und dies veranlasst mich, meine Stellung zu dieser Namenfrage hier anzugeben.

Kossel¹⁾ hat bekanntlich den Vorschlag gemacht, dass man als echte Nucleïne oder schlechthin als Nucleïne nur diejenigen Nucleïnsubstanzen, welche als Spaltungsproducte Nucleïnbasen liefern, und als Paranucleïne dagegen die übrigen nucleïnartigen Substanzen bezeichnen würde. Diesem Vorschlage stimme

¹⁾ Ueber die chem. Zusammensetzung der Zelle. Verhandl. der physiol. Ges. zu Berlin 1891.

ich nun insoferne bei, als ich ebenfalls es nützlich finde, dass die erstgenannten Nucleïne als eine besondere Gruppe von den übrigen getrennt werden. Dagegen trage ich einige Bedenken, alle anderen sog. Nucleïnsubstanzen als eine besondere Gruppe zu betrachten und mit dem Namen Paranucleïn zu bezeichnen. Es ist nämlich offenbar, dass in diesem Falle die Paranucleïngruppe Stoffe, die unter einander sehr verschiedenartig sind, einzuschliessen kommt.

Als Paranucleïne müsste man also die bei der Pepsinverdauung ungelöst zurückbleibenden Liebermann'schen Lecithalbumine bezeichnen, die nach ihm wahrscheinlich Verbindungen von Eiweiss mit Lecithin sind oder jedenfalls lecithinhaltiges Eiweiss darstellen. Und selbst, wenn man sich nicht genöthigt ansehen will, diese Stoffe als Paranucleïne zu bezeichnen, so bleiben doch noch zwei andere Gruppen von Paranucleïnen übrig, die unter einander sehr verschiedenartig sind.

Aus dem Ichthulin haben Kossel und Walter¹⁾ ein Paranucleïn isolirt, welches bei der Spaltung mit Schwefelsäure ein energisch reducirendes Kohlehydrat gibt, aus dem mit der Phenylhydrazinprobe sogar eine krystallisirende Verbindung erhalten wurde. In ganz anderer Weise verhält sich dagegen dasjenige Paranucleïn, welches aus dem Caseïn bei der Pepsinverdauung entsteht. Aus diesem Paranucleïn hat nämlich meines Wissens bisher Niemand ein reducirendes Kohlehydrat darstellen können, und diese zwei Paranucleïne sind also grundverschiedener Art.

Da man in der Chemie den Begriffen Para, Meta und Ortho eine besondere Bedeutung beilegt, finde ich es kaum angemessen, alle nucleïnähnliche Substanzen, welche keine Nucleïnbasen liefern, als Paranucleïne zu bezeichnen und als eine besondere Gruppe den echten Nucleïnen gegenüberzustellen. Wenn man diejenigen sog. Nucleïne, welche Nucleïnbasen liefern, mit Kossel als echte Nucleïne oder schlechthin als Nucleïne bezeichnet, so würde es nach meiner Ansicht besser sein, wenn man alle anderen nucleïnähnliche Stoffe

¹⁾ Zeitschrift f. physiol. Chemie, Bd. 15.

als Pseudonucleine bezeichnete. Hiermit ist nämlich nichts Anderes ausgesagt, als dass diese Stoffe keine echten Nucleine sind, dass sie vielmehr nur in gewissen Hinsichten den Nucleinen ähneln und also nur scheinbare Nucleine sind, die übrigens unter einander sehr verschiedenartig sein können.

Nachdem ich nun von den Nucleinen gesprochen habe, gehe ich zu den Nucleoalbuminen und Nucleoproteiden über.

Als Proteide bezeichnet man bekanntlich Proteinsubstanzen, die mehr zusammengesetzt als die Eiweissstoffe im eigentlichen Sinne sind und welche dementsprechend als Spaltungsproducte einerseits Eiweissstoffe — bzw. die aus allem Eiweiss hervorgehenden Zersetzungsproducte — und andererseits irgend welche anderen nicht eiweissartigen Stoffe, wie Farbstoffe, Kohlehydrate, Nucleinbasen u. A. liefern.

Zu dieser Gruppe gehört das Casein offenbar nicht. Aus diesem Stoffe hat man nämlich als nächste Spaltungsproducte nur Eiweiss erhalten, nämlich theils phosphorfrees und theils phosphorhaltiges, welches letzteres nach Liebermann eine Verbindung von Metaphosphorsäure mit Eiweiss ist. Bei mehr tiefgreifender Zersetzung hat man nur die Spaltungsproducte des Eiweisses im Allgemeinen erhalten. Das Casein ist also kein Proteid, sondern nur eine phosphorhaltige Albuminsubstanz, und da man schon seit vielen Jahren das Casein als den wichtigsten Repräsentanten der Nucleoalbumingruppe betrachtet hat, so dürfte es wohl am besten und richtigsten sein, den Namen Nucleoalbumine fortwährend nur für solche phosphorhaltige Eiweissstoffe zu gebrauchen, die bei der Pepsinverdauung ein Pseudonuclein von derselben Art wie das aus Casein liefern.

Es ist einleuchtend, dass ich einen solchen Stoff wie das Ichthulin, welches bei seiner Spaltung ein reducirendes Kohlehydrat gibt, nicht als Eiweiss im eigentlichen Sinne betrachten kann. Das Ichthulin muss nach den Untersuchungen von Walter als ein Glykoproteid bezeichnet werden, und es gehört allem Anscheine nach zu derselben Gruppe wie das von mir aus der Eiweissdrüse der Weinbergschnecke dargestellte, nunmehr von mir Helicoproteid genannte phos-

phorhaltige Glykoproteid. Derartige phosphorhaltige Glykoproteide nenne ich zum Unterschied von den phosphorfreien Glykoproteiden (den Mucinsubstanzen und Hyalogenen) einfach Phosphoglykoproteide; und wenn es nun auch wahr ist, dass diese Glykoproteide bei der Pepsinverdauung ein Pseudonuclein liefern, so kann ich doch hierin keinen dringenden Grund dafür sehen, diese Proteide als Nucleoproteide zu bezeichnen. Ein solcher Name passt nämlich viel besser nur für solche Proteide, welche als Spaltungsproducte Xanthinkörper oder sog. Nucleinbasen liefern.

Die echten Nucleine im gewöhnlichen Sinne sind bekanntlich nach Altmann und Kossel Verbindungen zwischen Eiweiss und einer phosphorhaltigen Säure, der sog. Nucleinsäure. Dasselbe gilt ebenfalls von den mehr zusammengesetzten Nucleinsubstanzen, wie dem sog. Nucleohiston, dem Pankreasproteide u. a.; auch diese Stoffe sind Verbindungen von Nucleinsäure mit Eiweiss, und der Unterschied ist wesentlich der, dass sie viel mehr Eiweiss enthalten und dass ein Theil des Eiweisses viel leichter abspaltbar ist. Hieraus folgt also, dass alle sog. echten Nucleine, mit Ausnahme der Nucleinsäure selbst, Proteide — und zwar Nucleoproteide — sind.

Das Consequenteste würde also gewiss sein, entweder alle Nucleinsubstanzen als Nucleoproteide oder alle Nucleoproteide als Nucleine zu bezeichnen; aber dies würde gewiss nicht die Sache klären, sondern umgekehrt mehr verwickeln. Seit vielen Jahren ist man nämlich daran gewöhnt, als wahres Nuclein nur das bei der Verdauung der echten Nucleinsubstanzen mit Pepsinchlorwasserstoffsäure entstehende phosphorhaltige Spaltungsproduct zu bezeichnen. Diesem Sprachgebrauche gemäss bezeichne auch ich fortwährend als echtes Nuclein, oder schlechthin als Nuclein, nur diejenigen in verdünnter Säure unlöslichen Verbindungen zwischen Nucleinsäure und Eiweiss, welche als unlösliche Spaltungsproducte bei der Pepsinverdauung anderer, mehr complicirten Nucleinsubstanzen entstehen. Alle übrigen mehr complicirten Nucleinsubstanzen, die bei der Pepsinverdauung in Eiweiss und echtes Nuclein sich spalten, nenne ich Nucleoproteide.

Dass diese Nucleoproteide untereinander wiederum verschiedenartig sind, unterliegt wohl keinem Zweifel, und es dürfte vielleicht binnen Kurzem nöthig werden, eine weitere Classificirung derselben zu machen. Für jetzt liegt indessen keine derartige Nothwendigkeit vor, und es dürfte gut sein, mit einer weiteren Classificirung zu warten, bis man in die chemische Natur dieser Substanzen tiefer eingedrungen ist.

Als *Nucleïne* bezeichnet man also nach Kossel's Vorschlag am besten nur solche bei der Pepsinverdauung mehr complicirter Proteïnsubstanzen entstehenden, in der Pepsinchlorwasserstoffsäure unlöslichen Stoffe, welche Verbindungen von Eiweiss mit Nucleïnsäure sind und bei weiterer Spaltung Xanthinkörper liefern.

Als *Paranucleïne* bezeichnet man nach Kossel die übrigen bei der Pepsinverdauung verschiedener Proteïnsubstanzen entstehenden nucleïnähnlichen Stoffe. Da aber diese Stoffe untereinander sehr verschiedenartig sein können und nur dasjenige gemeinsam haben, dass sie in gewisser Hinsicht den Nucleïnen ähneln, könnte man sie nach meiner Ansicht besser als *Pseudonucleïne* bezeichnen.

Nucleoalbumine sollte man nach meiner Ansicht nur solche phosphorhaltige Proteïnstoffe nennen, die wie das Caseïn keine Proteide sind und bei der Pepsinverdauung ein Pseudonucleïn liefern.

Nucleoproteide sollte man dagegen alle diejenigen Proteide nennen, welche bei der Pepsinverdauung ausser verdautem Eiweiss als Spaltungsproduct echtes Nucleïn liefern und die bei tieferer Zersetzung auch Nucleïnbasen geben.

Von dieser Auffassung bin ich ausgegangen, da ich in dem Vorigen die aus der Pankreasdrüse dargestellten sehr zusammengesetzten Proteïnsubstanzen als Nucleoproteide bezeichnet habe.