

# Ueber Nachweis und Vorkommen des Glycocolls.

Von

**Karl Spiro,**

erstem Assistenten des Instituts.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der Universität Strassburg.  
Neue Folge Nr. 21.)

(Der Redaction zugegangen am 6. Juli 1899.)

## I.

Nachdem Braconnot 1820 beim Kochen von thierischem Leim mit Schwefelsäure das Glycocoll entdeckt hatte,<sup>1)</sup> wurde es dann, ebenfalls schon vor längerer Zeit, von Dessaignes bei der Spaltung der Hippursäure mit Salzsäure und von Strecker bei der Zerlegung der Glycocholsäure mittelst Barytwassers aufgefunden. Unter den  $\alpha$ -Amidosäuren, welche ja fast 90% des Eiweissmoleküls ausmachen, nimmt also die Amidoessigsäure insofern eine besondere Stellung ein, als dieselbe unter normalen physiologischen Bedingungen im Organismus zu Synthesen verwerthet wird, gewissermassen als Baustein dem Körper zur Verfügung steht. Wiener hat in jüngster Zeit durch Ermittlung der nach Verfütterung von Benzoesäure ausgeschiedenen Hippursäure die Menge des im Organismus zu synthetischen Zwecken vorhandenen Glycocolls bestimmt und seine Entstehung im Thierkörper aus  $\alpha$ -Amidosäuren und namentlich aus Harnsäure wahrscheinlich gemacht, aus welcher letzterer es ja auch von Strecker mittelst Jodwasserstoffsäure und von Schultzen mittelst concentrirter Schwefelsäure erhalten worden ist. Auch durch andere physiologische Erfahrungen

<sup>1)</sup> Ein ausführlicher Litteraturnachweis findet sich am Schluss der Arbeit.

wird die Annahme nahe gelegt, dass das Glycocoll im intermediären Stoffwechsel eine besondere Rolle spielt, denn nach den Untersuchungen von Schultzen und Nencki und denen von Salkowski wird das Glycocoll im Organismus besonders leicht in Harnstoff verwandelt, ebenso wie es im Körper der Vögel nach v. Knieriem in Harnsäure übergeht.

In thierischen Geweben<sup>1)</sup> ist das Glycocoll als solches bisher nur ein einziges Mal gefunden worden: N. H. Chittenden untersuchte den Kammmuskel von *Pecten irradians*, einer an den östlichen Küsten der Vereinigten Staaten in grosser Menge gefundenen und auch als Nahrungsmittel geschätzten Kammmuschelart. Das wässrige Extract des Muskels wurde durch Kochen, mit oder ohne Essigsäure, enteiweissst, aus der wässrigen Lösung durch das drei- oder vierfache Volumen Alkohol eine reichliche Menge Glycogen niedergeschlagen, das Filtrat mit Bleiacetat versetzt und das Filtrat des entstandenen (anorganischen) Niederschlages, nach Entfernen des Bleies mittelst Schwefelwasserstoffs, bis zur Ausscheidung weniger prismatischer Krystalle eingedampft: die Krystalle schmolzen bei ungefähr 180° C. und wurden durch die Analyse als Glycocoll erkannt: die Ausbeute an demselben betrug 0,39—0,71%.

Auch als Zersetzungsprodukt der Proteide ist bisher das Glycocoll nur selten gefunden worden. Nachdem Braconnot es, wie erwähnt, bei der Spaltung des Leims mit Schwefelsäure entdeckt hatte, fand es Nencki (und später auch dessen Schüler Jeanneret) unter den Produkten der Pankreasfäulniss des Leims und Nencki's Schüler Wälchli auch unter denen des Elastins: ferner konnte es Horbaczewski unter den Spaltungsprodukten der Hornhaut, Krukenberg unter denen des Spongins, Wetzel unter denen des Conchiolins, endlich Th. Weyl unter jenen der Seide nachweisen. In jüngster Zeit endlich ist es Edwin Faust im Schmiedeberg'schen Laboratorium gelungen, aus dem bei halber Sättigung des Pferdeblutserums mit Ammonsulfat ausfallenden Globulingemenge durch

---

<sup>1)</sup> Nach den Untersuchungen von Shorey scheint es jedoch ein constanter Bestandtheil des Zuckerrohrs zu sein.

nicht zu schwaches Ansäuern mit Essig- oder Salzsäure und nachheriges längeres Einleiten von Kohlensäure ein Albuminoid, das Glutolin, darzustellen, welches bei der Zersetzung mit concentrirter Salzsäure Glycocoll lieferte.

Der Umstand, dass, wie wir sahen, das Glycocoll bei der Zersetzung der Eiweissstoffe so selten zur Beobachtung gelangt, kann seinen Grund haben in einem fundamentalen Unterschied, der zwischen den einzelnen Eiweissstoffen besteht, wie dies in der That Hlasiwetz und Habermann, ferner Hoppe-Seyler annahmen, die zwischen wahren, nicht glycocollliefernden Eiweissstoffen und glycocollliefernden Albuminoiden unterschieden. Es muss jedoch diesem auf negativen Beobachtungen beruhenden Schlusse gegenüber darauf hingewiesen werden, dass gerade die Erkennung resp. Reindarstellung des Glycocolls mit besonderen Schwierigkeiten verknüpft ist: zeigte doch Curtius erst 1882, 62 Jahre nach der Entdeckung des Glycocolls, welche Krystallform und welcher Schmelzpunkt (232—235°, nicht 170°, 178°, 190°) dem reinen Glycocoll ganz abweichend von früheren Angaben, zukomme.

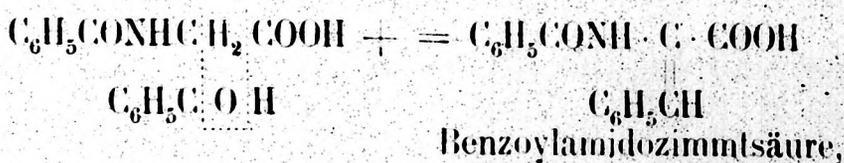
Es war daher als ein grosser Fortschritt dankbar zu begrüssen, als J. Baum in Baumann's Laboratorium zeigte, dass die Ueberführung des Glycocolls in Hippursäure, wie sie im Organismus Statt hat, auch im Reagensglase mit Benzoylchlorid und Natronlauge glatt und quantitativ bewerkstelligt werden kann, die Benzoylirung somit ein expeditives Verfahren zur Charakterisirung und Bestimmung des Glycocolls liefert. Mit Hülfe dieses Verfahrens hat nicht nur Charles S. Fischer und dann Gonnermann die Ausbeute an Glycocoll aus dem Glutin quantitativ bestimmt, sondern auch Faust das Glycocoll als Spaltungsprodukt seines Glutolins entdeckt. Immerhin bietet jedoch auch die Erkennung der Hippursäure einige Schwierigkeiten, zumal wenn es sich darum handelt, dieselbe neben grösseren Mengen der bei der Benzoylirung immer auftretenden Benzoessäure zu charakterisiren, wie dies in Bezug auf den Schmelzpunkt auch Wiener jüngst wieder hervorgehoben hat. Ich habe daher, auf den Vorschlag von Herrn Prof. F. Hofmeister, mich nach einem Verfahren umgesehen, welches

die Erkennung der Hippursäure durch Ueberführung in ein charakteristisches Derivat in ähnlicher Weise erleichtert und sicher stellt, wie dies die Phenylhydrazinprobe für den Zucker leistet; ich glaube ein solches Verfahren in der Condensation von Hippursäure mit Benzaldehyd erprobt zu haben, die von E. Erlenmeyer jun. in einer Reihe wichtiger Abhandlungen studirt worden ist, und dessen Angaben ich im Weiteren gefolgt bin.

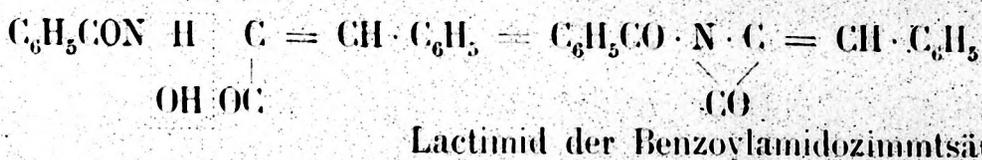
## II.

Setzt man zu einer Lösung von 1 Mol.-Gew. Hippursäure in 3 Mol.-Gew. Essigsäureanhydrid und 1 Mol.-Gew. geschmolzenen essigsauren Natrons 1 Mol.-Gew. Benzaldehyd, so färbt sich die Flüssigkeit beim Erwärmen alsbald gelblich, allmählich immer mehr dunkelgelb, und bei längerem Erwärmen (1/2 Stunde) im Wasserbade oder beim Abkühlen erstarrt alsbald die ganze Masse zu einem Krystallbrei, der aus netzartig durcheinander gelagerten oder wawellitähnlich angeordneten Nadelchen besteht, die schwach gelblich gefärbt sind. Da der Körper in kaltem Alkohol und Aether nur schwer löslich ist, kann er von anhaftendem Bittermandelöl durch Waschen mit Alkohol leicht befreit und durch Krystallisation aus heissem Alkohol oder Benzol leicht gereinigt werden. Er schmilzt bei 165—166° C.

Nach den Untersuchungen von Erlenmeyer entsteht der Körper, indem sich zunächst die Hippursäure mit Benzaldehyd zur Benzoylamidozimmtsäure condensirt:



und aus der gebildeten Benzoylamidozimmtsäure durch weiteren Austritt eines Moleküls Wasser ein Lactimid entsteht:



Die Reaction verläuft in annähernd quantitativer Weise, da bis 80% des Ausgangsmaterials als « Lactimid » gewonnen

werden konnten: Versuche, die Ausbeute zu einer absolut quantitativen zu gestalten, verliefen ergebnisslos, da bei der Condensation das Lactimid nicht das einzige Reactionsprodukt ist, sondern neben diesem stets auch das Natronsalz der Benzoylamidozimmtsäure in nicht unerheblicher Quantität entsteht. Die leichte Bildung der Benzoylamidozimmtsäure aus ihrem Lactimid gestattet nun, in ausserordentlich bequemer Weise letzteres noch weiter zu charakterisiren: Kocht man das Lactimid mit verdünnter Natronlauge vorsichtig auf (zu starkes Erwärmen oder concentrirtere Natronlauge ist wegen der unten zu besprechenden Bildung von Phenylbrenztraubensäure zu vermeiden), so löst sich alsbald das Lactimid auf: die (eventuell filtrirte) Lösung wird heiss mit Säure versetzt, worauf sich alsbald, eventuell nach dem Reiben mit einem Glasstabe, ein krystallinischer Niederschlag abscheidet, der aus Alkohol in prachtvollen, wasserhellen Prismen erhalten werden kann, und dessen Schmelzpunkt interessanter Weise höher als der des Lactimids liegt, nämlich bei 225° C.

Die so dargestellte Säure, die Benzoylamidozimmtsäure, die somit das erste Condensationsprodukt der Hippursäure mit Benzaldehyd darstellt, ist zuerst von Plöchl erhalten, jedoch erst von Erlenmeyer in ihrer Constitution aufgeklärt worden, indem es letzterem gelang, sie mittelst Mineralsäuren oder Alkalien in Benzamid und Phenylbrenztraubensäure zu spalten:

$$\begin{array}{c} \text{C}_6\text{H}_5\text{CONH} \quad \quad \quad \text{H} \quad \quad \quad \text{C}_6\text{H}_5 \text{ CO NH}_2 + \\ \text{C}_6\text{H}_5\text{CH:C COOH} + \text{OH} = \text{C}_6\text{H}_5\text{CH:C(OH) COOH} = \text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2 \cdot \text{CO} \cdot \text{COOH} \end{array}$$

Da die Phenylbrenztraubensäure sowohl mit Eisenchlorid als auch mit Phenylhydrazin in charakteristischer Weise reagirt, so eignen sich diese Reactionen auch zur Erkennung der Hippursäure, zumal die Phenylbrenztraubensäure direkt aus dem Lactimid erhalten werden kann und die intermediäre Darstellung der Benzoylamidozimmtsäure vollkommen entbehrlich ist. Man verfährt, um das Lactimid an seiner Ueberführbarkeit in die Phenylbrenztraubensäure zu erkennen, nach Erlenmeyer am besten in der Art, dass man das Lactimid mit starker Natronlauge erhitzt, bis das Auftreten von Ammoniak (das aus abgespaltenem Benzamid entsteht) deutlich nachweisbar ist, und

darauf ansäuert, wobei sich die Phenylbrenztraubensäure als etwas gefärbter Klumpen abscheidet, der beim Schütteln mit Aether ausserordentlich leicht in diesen übergeht. Mit der abgehobenen ätherischen Lösung stellt man nun folgende zwei Reactionen an: der eine Theil wird direkt mit verdünntem Eisenchlorid versetzt; die wässrige Schicht färbt sich beim Schütteln sofort tief dunkelgrün, welche Färbung allmählich einem charakteristischen Gelb Platz macht: der andere Theil der ätherischen Lösung der Phenylbrenztraubensäure wird mit einer ätherischen Lösung von Phenylhydrazin versetzt, es scheidet sich alsbald das Hydrazon der Phenylbrenztraubensäure ab, das nach dem Waschen mit Aether durch seinen Schmelzpunkt ( $161^{\circ}$  C.) erkannt werden kann.

Wie man sieht, erhält man bei der Condensation von Hippursäure mit Benzaldehyd eine Reihe charakteristischer und leicht fassbarer Produkte: zunächst das Lactimid, das durch Schmelzpunkt und Krystallform wohl charakterisirt, wegen seiner Schwerlöslichkeit in Wasser, Alkohol und Aether leicht rein erhalten werden kann, dann durch Hydratation und Spaltung aus dem Lactimid die Benzoylamidozimmtsäure und die Phenylbrenztraubensäure, beide ebenfalls leicht krystallisirt zu erhalten, von denen ferner noch die letztere auch in kleinen Mengen leicht erkennbare charakteristische Reactionen liefert.

Die Empfindlichkeit der Reaction ist eine für die meisten Fälle wohl ausreichende: 5 mg Hippursäure in Essigsäureanhydrid gelöst ergaben bei der Condensation mit Benzaldehyd noch deutliche Lactimidkrystalle und ebenso konnte noch 1 cg Hippursäure zu 10 cem. Blut zugesetzt, nachgewiesen werden. Ueber den Nachweis unter den Spaltungsprodukten der Eiweisskörper finden sich weiter unten die näheren Angaben.

Es lag endlich noch die Möglichkeit vor, zur Condensation mit Benzaldehyd nicht die Hippursäure, sondern, unter Vermeidung der mit mannigfachen Uebelständen verknüpften Benzoylirung, das Glycocoll selbst oder die Acetursäure zu verwenden. Von den beiden zur Verfügung stehenden, ebenfalls von E. Erlenmeyer ausgearbeiteten Verfahren liefert jedoch das eine, bei dem Essigsäureanhydrid als Condensationsmittel angewandt wird, ein in wässriger Lösung, namentlich bei Gegenwart von Alkalien, unbeständiges Lactimid, während das andere,

bei dem Natronlauge als Condensationsmittel dient, kein für das Glycocoll allein charakteristisches Produkt liefert, da das entstehende Diphenyl-oxäthylamin aus allen  $\alpha$ -Amidosäuren (Leucin, Tyrosin etc.) erhalten werden kann.

An Stelle des Benzaldehyds können eventuell auch andere Aldehyde oder Phtalsäureanhydrid zur Condensation verwendet werden, doch besitzt, nach Versuchen von mir, das Lactimid aus Benzaldehyd bei Weitem an besten die für den vorliegenden Zweck erwünschten Eigenschaften.

### III.

Mit Hülfe der genannten Reaction auf Hippursäure wurden zunächst Versuche angestellt, um über die Synthese der Hippursäure im thierischen Organismus weitere Aufklärung zu erhalten. Seitdem es Bunge und Schmiedeberg in ihrer berühmten Arbeit gelang, diese ältest bekannte vitale Synthese in der überlebenden, durchbluteten Hundeniere nachzuahmen, hat es an Versuchen, diesen Vorgang unabhängig von überlebendem Gewebe, wie die Verdauungs- oder Oxydationserscheinungen, zu erzielen, nicht gefehlt (Kochs, J. Munk u. A.), doch stets mit negativem Erfolg. Auf Grund der gefundenen neuen Methode für Erkennung der Hippursäure und namentlich in der Hoffnung, dass die Zermalmung der Zellen mit scharfem Quarzsand und starkes Pressen, wie es selbst das lang gesuchte Enzym der Hefezelle zugänglich gemacht hat, auch aus der Nierenzelle die synthetischen Fermente gewinnen lassen würde, hat Herr Frank Schultz im Winter 97 98 auf Veranlassung von Herrn Prof. Hofmeister diesbezügliche Versuche angestellt. Trotzdem uns für dieselben durch die Freundlichkeit von Herrn Prof. J. Förster die grosse Presse des hygienisch-bacteriologischen Instituts zur Verfügung stand, verliefen unsere mannigfach variirten Versuche, über die Herr Schultz in seiner Dissertation berichten wird, was die Synthese der Hippursäure aus Benzoesäure anlangt, durchaus negativ. Wohl aber gelang es uns, das von Schmiedeberg entdeckte Histozym, das die Spaltung der Hippursäure in Benzoesäure und Glycocoll bewirkt, mit Hülfe der Presse aus den Nieren verschiedener Thierarten zu gewinnen.

Es mag gestattet sein, hier anzufügen, dass auch Versuche, die von Hofmeister entdeckte Methylierung des Selens

und Tellurs im Organismus mit Extracten von Fischhoden zu erhalten, stets negative Resultate lieferten. Wenn es erlaubt ist, auf Grund negativer Resultate Schlussfolgerungen zu ziehen, da die Methodik für die Versuche immerhin eine im übrigen erprobte und ausgefeilte genannt werden darf, so scheint es synthetische Fermente im Organismus nicht zu geben, die Synthesen im Körper scheinen vielmehr, wie dies schon Hofmeister hervorgehoben hat, nicht rein chemische Vorgänge zu sein, sondern im überlebenden Gewebe sich abspielende Prozesse, für die ein Zwischenvorgang notwendig ist, der seinerseits davon abhängig ist, dass andere Zellfunctionen erhalten geblieben sind.

#### IV.

Zu den Untersuchungen über das Vorkommen von Glycocoll unter den Spaltungsprodukten des Eiweissmoleküls wurden zunächst die Eiweisskörper des Blutes herangezogen, da dieselben am leichtesten in grösserer Menge und in annähernd reinem Zustande gewonnen werden können. Neben dem Serumglobulin, betreffs dessen es mir auch nach eigenen demnächst zur Veröffentlichung gelangenden Untersuchungen fraglich ist, ob es einen einheitlichen Eiweisskörper darstellt, gelangten zur Prüfung das Fibrin aus Rinderblut, wie es vom Schlachthaus bezogen wird, das jedoch durch tagelanges Auswaschen von Blutfarbstoff befreit war, und ferner, da das Fibrin auch einen positiven Befund gab, reines nach den Vorschriften, die Reye im hiesigen Institut ausgearbeitet hat, durch  $\frac{3}{10}$ -Sättigung mit Ammonsulfat dargestelltes Fibrinogen. Versuche mit krystallisirtem Serumalbumin konnten nicht in der erwünschten Weise durchgeführt werden, da uns das kostbare Material an noch nicht in der für diese Versuche nöthigen Menge (20—50 g mindestens für das einzelne Experiment) zur Verfügung stand. Inzwischen ist es im hiesigen Institut (namentlich Herrn Dr. Pemsel) gelungen, ein expeditives Verfahren auszuarbeiten, das gestattet, aus jedem Pferdeblutserum krystallisirtes Albumin darzustellen, so dass die Versuche eventuell demnächst wieder aufgenommen werden sollen. Um jedoch die Versuche an einem

einwandsfreien, krystallisirten Eiweisskörper zu bestätigen, wurden noch Versuche an krystallisirtem Hämoglobin gemacht, das nach dem Ammonsulfatverfahren dargestellt wurde, welches Herr Dr. C. Micko aus Graz im hiesigen Institute während des letzten Winters in nachfolgende zweckmässige Form gebracht hat.

Blutkörperchenbrei (meist durch Absitzenlassen von Pferdeoxalatblut gewonnen) wird mit dem zweifachen Volumen Wasser verdünnt und im Eiskasten oder durch Eintragen von gewogenen Eisstücken gekühlt. Nach dem Abkühlen wird die Flüssigkeit mit Aether (auf 1 Liter 50—70 ccm. Aether) gut durchgerührt, sodann mit ebenfalls gekühlter gesättigter Ammonsulfatlösung, und zwar auf 1 Liter Flüssigkeit 700 ccm. Ammonsulfatlösung, unter fortwährendem Umrühren nach und nach vermischt. Nach 5 bis 15 Minuten beginnt der entstandene voluminöse Niederschlag sich zu heben; tritt dies nicht ein, so muss noch etwas Aether vorsichtig zugefügt werden, doch ist ein grosser Ueberschuss von Aether zu vermeiden, da dann ein grosser Theil des Hämoglobins mit ausgefällt wird. Nach mehreren Stunden oder auch früher hat sich an der Oberfläche ein blassrother Niederschlag gebildet, während die darunter befindliche Flüssigkeitsschicht klar und dunkelgranatroth erscheint. Die letztere wird abgehoben und auf kalte Papierfilter gebracht. Die Filtration geht gut von Statten; Kellertemperatur im Winter (ev. Eisschrank) genügt, um eine vorzeitige Krystallisation zu verhindern; selbst nach zwei Tagen entsteht unter diesen Verhältnissen nur ein ganz unbedeutender Niederschlag. Der erwähnte oben aufschwimmende Niederschlag wird separat auf Filter gebracht, er enthält nur eine verschwindend kleine Menge auskrystallisirten Hämoglobins. Die Filtrate, die nahezu sämtliches Hämoglobin gelöst enthalten, werden in grosse Porcellanschalen gegossen und bei Zimmertemperatur unter zeitweisem Umrühren stehen gelassen. Das Hämoglobin scheidet sich in anfangs rothen, später bräunlichen Krystallen aus. Nach drei Tagen ist fast das ganze Hämoglobin auskrystallisirt, so dass die Filtrate nur schwach bräunlich gefärbt erscheinen. Mikroskopisch untersucht enthält es nur spärliche Verunreinigungen, die eventuell durch Umkrystallisiren entfernt werden können. Das gesammelte Hämoglobin wird zweckmässig auf Büchner'schen Filtern bis zur Bildung fester Kuchen abgesaugt. Zum Umkrystallisiren wird das Hämoglobin in möglichst wenig Wasser gelöst und mit Ammonsulfat, und zwar auf 100 ccm. Hämoglobininlösung 80 ccm. gesättigter Ammonsulfatlösung, versetzt. Die Ausbeute ist nahezu quantitativ. Aus 5 Liter Pferdeblut waren von diesem scharf abgepressten Hämoglobin gegen 1500 g erhalten.

Für die Zersetzung der Eiweisskörper wurde zuerst nach dem erprobten Verfahren von Hlasiwetz und Habermann

concentrirte Salzsäure unter Zusatz von nicht zu wenig Zinnchlorür verwendet und in der bekannten Weise weiter verarbeitet, später bin ich jedoch zur Zersetzung mit Schwefelsäure übergegangen, da dieses Verfahren, wie schon Gonnermann hervorhebt, den Vortheil hat, dass die Schwefelsäure in einfacher und billiger Weise durch Bleicarbonat entfernt werden kann. Die Zersetzung mit Schwefelsäure gestaltet sich namentlich dann zu einer sehr einfachen Procedur, wenn man dieselbe im Papin'schen Topf bei 130° C. und 4 Atmosphären Druck vornimmt. Um die Braunfärbung der Zersetzungsprodukte zu vermeiden, thut man gut, das Ventil bei ca. 100° C. zu öffnen und die Luft heraus zu lassen. Immerhin gelingt es bei einer Reihe von Körpern (namentlich denen, die eine aromatische Gruppe enthalten) auch auf diesem Wege nicht, zu einer Flüssigkeit zu gelangen, die farblos genug wäre, dass man mit derselben die Biuretreaction anstellen könnte: in diesem Falle empfiehlt es sich, nach Ausfällung der Schwefelsäure am Filtrat sich ein Urtheil zu bilden, ob die Zersetzung bereits vollendet ist. Für die weitere Verarbeitung auf Glycocoll sind jedoch die entstandenen gefärbten Produkte (Schmiedberg's Melanoidinsäure) nicht weiter störend, da das nach der Fällung der Schwefelsäure mit Bleicarbonat verbleibende Filtrat gar nicht oder nur schwach hellgelb gefärbt ist.

In einer Anzahl von Fällen habe ich aus dieser vom Bleisulfat resp. Bleicarbonat) abfiltrirten neutralen Flüssigkeit die Diaminosäuren durch Ausfällen mit Phosphorwolframsäure in saurer Lösung entfernt: das Verfahren empfiehlt sich namentlich dann, wenn man auf reine Hippursäure ausgeht, doch ist es für die Anstellung der Lactimidprobe durchaus nicht nothwendig, namentlich nicht bei jenen Körpern, die das Glycocoll in ihrem Molekül in grösserer Quantität enthalten. Vor der Weiterverarbeitung mit Benzoylchlorid muss selbstverständlich die überschüssige Phosphorwolframsäure durch Kochen mit Baryhydrat, das überschüssige Baryhydrat durch Einleiten von Kohlensäure entfernt werden.

Das Filtrat vom Bleiniederschlage ist unter allen Umständen stark einzudampfen, nicht nur weil man auf diesem Wege eventuell reichliche Mengen Tyrosin fortschaffen kann, sondern weil es sich auch empfiehlt, die Benzoylirung — in erster Linie eine additionelle Reaction zwischen der Amino-

gruppe und dem Benzoylchlorid — in möglichst concentrirter Lösung vorzunehmen. Trotz mannigfacher Variationen ist es mir nicht gelungen, eine Methode anzuarbeiten, die stets die gleiche maximale Ausbeute an benzoylirtem Produkt gewährleistet; gerade diese Schwierigkeit complicirt in unserm Verfahren mehr als irgend eine andere die Erkennung des Glycocolls; unter allen Umständen ist jedoch die Anwesenheit eines grösseren Ueberschusses an Alkali zu vermeiden.

Zur Extraction der gebildeten Hippursäure erscheint der von Bunge und Schmiedeberg zuerst empfohlene Essigäther bei weitem am besten geeignet; das Extract ist, wie ebenfalls diese Autoren schon angegeben haben, wiederholt zur Entfernung anhaftenden Farbstoffes zu waschen und der überschüssige Essigäther am besten bei einer Temperatur nicht über 50° C. und unter Vermeidung saurer Reaction abzdampfen. Will man das Extract mit Petroläther, ähnlich wie es Bunge und Schmiedeberg gethan haben, fällen, so muss dasselbe vorher völlig getrocknet sein, wozu ich meist geschmolzenes Glaubersalz verwendete. Fischer empfiehlt zur Fällung der Hippursäure Chloroform, Gonnermann 100 ccm. Chloroform, welchem 5 ccm. Benzol zugefügt sind; die anfänglich klare, rothgelbe Flüssigkeit soll sich rasch trüben und allmählich ein weisses Pulver ausfallen lassen, das nach 24 Stunden auf einem Saugfilter gesammelt werden kann. Ich habe nach diesem Verfahren auch aus Proben, in denen die Lactimidprobe die Anwesenheit von Hippursäure unzweifelhaft darthat, offenbar wegen öligcr Beimengungen, die die Säure in Lösung hielten, ein negatives Resultat erhalten. Da diese Verunreinigungen eventuell auch die Krystallisation des Lactimids hinderten, habe ich meist den Essigätherauszug in Soda gelöst, mit viel Thierkohle ausgekocht, filtrirt, das klare Filtrat angesäuert und bei schwach saurer Reaction und niedriger Temperatur eingedampft, zumal die Lactimidbildung durch Anwesenheit von Salzen gar nicht gestört wird.

Für die Ausführung der Lactimidprobe muss endlich der zu untersuchende Rückstand gut getrocknet und das essigsäure Natron in üblicher Weise durch zweimaliges Schmelzen von

Wasser befreit sein. Was den Zusatz von Benzaldehyd anlangt, so muss sehr vorsichtig zu Werke gegangen werden: zwar kann eventuell überschüssig zugesetzter Benzaldehyd, der als Lösungsmittel für das Lactimid dienen und so dessen Krystallisation hindern kann, durch Destillation mit Wasserdampf entfernt werden, immerhin ist auch aus dem Grunde vor einem Ueberschuss an Benzaldehyd zu warnen, weil beim Schmelzen mit condensirenden Agentien leicht aus Benzaldehyd Produkte entstehen, die nur sehr schwierig zu entfernen sind. Die Condensation selbst wird durch halbstündiges Erhitzen auf dem Wasserbade vorgenommen. Sobald dieselbe vollendet erscheint, wird zu dem Condensationsprodukt Wasser hinzugegossen, gelinde erwärmt, die Lösung der Essigsäure und des essigsauren Natrons abgegossen, das ausgeschiedene Oel in Alkohol heiss gelöst und langsam erkalten gelassen. Um die für die Krystallisation des Lactimids nöthige Alkoholmenge zu ermitteln, ist einiger Aufwand von Geduld nöthig, da so viel Alkohol genommen werden muss, dass die Oele gelöst bleiben, das Lactimid aber sich ausscheiden kann. Es hat gar keinen Zweck, die Abscheidung des Lactimids durch Wasserzusatz zu beschleunigen, man erhält im Gegentheil bei Anwendung eines Ueberschusses von Alkohol, den man ganz langsam verdunsten lässt, die besten Resultate.

Auf diesem Wege ist es mir nun gelungen, aus den oben genannten Eiweisskörpern, dem Fibrinogen, dem Fibrin, dem Globulin und dem Hämoglobin das Lactimid der Benzoylamidozimmtsäure zu erhalten und damit die Anwesenheit des Glycocolls in jenen Eiweisskörpern darzuthun. Ich bin jedoch selbst um so mehr davon entfernt anzunehmen, dass das Glycocoll ein für den Aufbau eines jeden Protein-stoffs wichtige Verbindung sei, als erstens die erhaltenen Quantitäten nur recht geringe waren, ferner auch, wie mich weitere Untersuchungen schon gelehrt haben, nicht aus jedem Eiweisskörper dieses charakteristische Derivat des Glycocolls dargestellt werden kann.

Mit Rücksicht auf die Untersuchungen von W. Hausmann über die Vertheilung des Stickstoffs im Molekül der Eiweiss-

körper habe ich auch das Casein in den Kreis meiner Untersuchungen gezogen, da dasselbe in der Reihe der Proteide gewissermassen am anderen Ende steht, als das so glycocollreiche Glutin. In der That habe ich nun aus dem Casein trotz wiederholter Bemühungen keine Spur des Lactimids erhalten, ein negatives, und darum anscheinend minder beweiskräftiges Resultat, das jedoch durch die im folgenden Abschnitt mitgetheilten Erfahrungen an Hetero- und Protalbumose eine gewisse Stütze erhalten hat.

## V.

Die Hetero- und Protalbumose des Fibrins, die primären Albumosen im Sinne W. Kühne's sind neuerdings aus dem Witte-Pepton durch E. P. Pick zugänglicher gemacht worden, der dieselben durch halbe Sättigung mit Ammonsulfat auszufällen und durch Alkohol trennen gelehrt hat.

Indem ich bezüglich der Einzelheiten des Verfahrens und der bei dem Studium der Albumosen erhaltenen Resultate auf die demnächst erscheinende Arbeit von Pick verweise, möchte ich hier nur hervorheben, dass eine Reihe von Eigenschaften, namentlich die Vertheilung des Stickstoffs im Molekül, das Fehlen der Kohlehydrat- und Tyrosingruppe, die reichliche Ausbeute an Leucin und an Diaminosäuren eine Aehnlichkeit der Heteroalbumose mit dem Leim hervortreten liessen, die eine Untersuchung dieser Albumose auf das Vorkommen von Glycocoll erwünscht erscheinen liessen. Das Material zu diesen und den folgenden Untersuchungen war mir zu einem Theil von meinem Freunde Dr. Pick zur Verfügung gestellt, zum andern Theil von mir aus Witte-Pepton dargestellt und gereinigt worden. Die Zersetzung der Heteroalbumose unter Druck und Schwefelsäure geht ausserordentlich schnell von Statten: auch fiel es auf, dass fast gar keine Dunkelfärbung der Flüssigkeit eintrat: die weiter in der oben dargestellten Weise geführte Untersuchung auf Glycocoll ergab eine relativ sehr reichliche Ausbeute, so dass, da relativ grössere Mengen in Arbeit genommen waren, die erhaltenen Lactimidproben, einzeln genau identificirt werden konnten.

Eine Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl in einer mehrmals aus Alkohol umkrystallisirten Probe ergab:

0.1466 g Substanz gaben 0.101 g  $\text{NH}_3 = 0,0832$  g N.

Berechnet für  $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{NO}_2$

5,6% N.

Gefunden:

5,7% N.

Der Schmelzpunkt zweier verschiedener Proben ergab für die eine  $164^\circ$  C., für die andere  $166^\circ$  C., aus der einen Probe wurde durch vorsichtiges Erwärmen mit verdünnter Natronlauge Benzoylamidozimmtsäure vom Schmelzpunkt  $225^\circ$  C. erhalten, während die andere beim stärkeren Erwärmen mit concentrirter Natronlauge Phenylbrenztraubensäure gab, die mit der Eisenchloridreaction und ätherischer Phenylhydrazinlösung als solche erkannt wurde.

Es erscheint also mit Sicherheit nachgewiesen, dass das Glycocoll ein Spaltungsprodukt der Heteroalbumose des Fibrins darstellt.

Es erschien nun von besonderem Interesse, mit Rücksicht auf die Arbeit E. P. Pick's auch die Protalbumose auf Glycocollauftreten bei der Spaltung zu untersuchen, da dieselbe von der Heteroalbumose in Bezug auf die constituirenden Elementargruppen sehr erheblich abweicht. Dies ist auch bei der Spaltung mit Schwefelsäure sofort zu erkennen, da eine starke Bräunung der Flüssigkeit selbst beim Arbeiten im Papin'schen Topfe nicht vermieden werden konnte. Gross war hierbei die Ausbeute an Tyrosin, wenn der Bleiniederschlag sehr oft mit heissem Wasser ausgewaschen wurde; das beim Eindampfen sich ausscheidende stark gefärbte Produkt konnte nach dem Umkrystallisiren aus ammoniakalischem Alkohol (Huppert) leicht als Tyrosin erkannt werden. Von Glycocoll resp. dem Lactimid konnten jedoch trotz aller Mühe, und trotzdem grössere zu diesem Zweck dargestellte Quantitäten Protalbumose genau wie die Heteroalbumose verarbeitet wurden, nicht einmal Spuren gewonnen werden.

Wenn ich es wage, auf dieses negative Ergebniss hin Schlüsse zu ziehen, so bin ich mir wohl bewusst, mit welcher Reserve dies zu geschehen hat; immerhin möchte ich es nicht für einen Zufall ansehen, dass gerade bei der Protalbumose

und beim Casein kein Glycocoll gefunden wurde, denn gerade das Casein ist nach den Untersuchungen von F. Alexander dadurch besonders charakterisirt, dass unter seinen peptischen Verdauungsprodukten mittelst der Ammonsulfat-Alkoholmethode nur Protalbumose und keine Heteroalbumose gefunden werden konnte. Leider ist es nicht möglich, gewissermassen die Probe aufs Exempel zu machen und zu sehen, ob andererseits unter den Verdauungsprodukten des Leims ebenso die Heteroalbumose überwiegt, da nach Untersuchungen, die ich mit Herrn cand. med. Paul Zahn angestellt habe, aus dem Leim überhaupt keine eigentlichen primären Albumosen zu erhalten sind.

In der Heteroalbumose ist jedenfalls neben Leucin das Glycocoll in der überwiegenden Menge vorhanden, so wie in der Protalbumose das Tyrosin: da nun ferner nach den oben besprochenen Versuchen das Glycocoll auch in zahlreichen echten Eiweisskörpern, nicht nur den Albuminoiden, vorkommt, so ist mithin das Glycocoll den anderen  $\alpha$ -Amidosäuren gleich zu setzen und auch als eine Elementargruppe anzusehen, die für einzelne Eiweisskörper charakteristisch ist.

Ähnliche Ueberlegungen gelten für die Indol liefernde Gruppe, die früher auch als nur den echten Eiweissstoffen zukommend angesehen wurde.

Wenn das Glycocoll freilich in einzelnen Proteinen nur in sehr geringer Menge, in anderen gar nicht vorkommt, so unterscheidet dies die Amidoessigsäure nicht von anderen Amidosäuren: denn auch das leicht nachweisbare Tyrosin ist in einigen Körpern nur in geringer Menge — im Hemiprotein z. B. nur bei der Säurespaltung — in anderen, der Limpricht'schen Protsäure und im Leim, überhaupt nicht nachzuweisen: da die meisten Eiweisskörper stets dieselben Spaltungsprodukte liefern, scheint ja gerade das wechselnde Verhältniss, in dem die einzelnen Elementarbestandtheile zusammengefügt sind, die grosse Mannigfaltigkeit der bekannten Proteinstoffe zu erklären.

In wie weit das in den Eiweisskörpern nachgewiesene Glycocoll auch quantitativ zur Bildung des im Körper als Glycocholsäure oder Hippursäure erscheinenden ausreicht, in wie weit es ferner als intermediäres Produkt bei der Harnstoff-

bildung fungirt, lässt sich auf Grund der obigen Methoden, die keine quantitativen sind, nicht entscheiden. Wenn auch die Ausbeute an Glycocoll aus der Heteroalbumose immerhin eine recht reichliche ist, so möge doch diesbezüglich ausdrücklich auf die Arbeit von Wiener hingewiesen werden, die ein Entstehen von Glycocoll (aus Leucin, aus Harnsäure) im Thierkörper wahrscheinlich gemacht hat. Auch an eine Synthese im Organismus aus den bei der Bildung anderer Körper nachgewiesenen Resten —  $\text{CH}_2 \cdot \text{COOH}$  (Jaffé und Cohn, Tappeiner) und  $\text{NH}_2$  — (R. Cohn) wäre zu denken. Doch ist eine Entscheidung dieser beim Studium des Glycocolls sich aufdrängenden Fragen so lange nicht zu erwarten, bis nicht der Mechanismus der Umwandlung des Glycocolls zu Harnstoff genügend aufgeklärt ist.

### Litteratur-Nachweis.

1) Alexander F. Zur Kenntniss des Caseins und seiner peptischen Spaltungsprodukte. Diese Zeitschr. Bd. XXV, S. 411. 1898.

2) J. Baum. Eine einfache Methode zur künstlichen Darstellung von Hippursäure und ähnlich zusammengesetzten Verbindungen. Diese Zeitschr., Bd. IX, S. 465. 1885.

3) Braconnot. Ann. chim.-phys. (2.) Bd. XIII, S. 114. 1820.

4) Bunge G. und Schmiedeberg O. Ueber die Bildung der Hippursäure. Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. Bd. VI, S. 233. 1876.

5) Chittenden N. H. Ueber Glycogen und Glycocoll in den Muskeln von Reeten irradians. Liebig's Annalen. Bd. 178, S. 266. 1875.

6) Cohn R. Ueber das Auftreten von Benzamid im Harn nach Darreichung von Benzaldehyd. Diese Zeitschr., Bd. XIV, S. 203. 1890.

7) Curtius Th. Ueber einige neue, der Hippursäure analog constituirte, synthetisch dargestellte Verbindungen. Journ. f. prakt. Chemie, Bd. 26, S. 155. 1882.

8) Dessaignes. Ueber Hippursäure, Benzoessäure u. Leimzucker. Liebig's Annalen. Bd. 58, S. 322. 1846.

9) Erlenmeyer E. jr. 1) Condensation von Hippursäure mit Benzaldehyd. Liebig's Annalen. Bd. 271, S. 37, Bd. 275, S. 1, Bd. 307; 2) Condensation von Glycocoll mit Benzaldehyd. a) durch Natronlauge: Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch., Bd. XXV, S. 345; Liebig's Annalen, Bd. 284, S. 36; Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch., Bd. XXVIII, S. 1866, Bd. XXIX, S. 295, Bd. XXX, S. 1524 u. S. 1527, Bd. XXX, S. 2896;

Liebig's Annalen, Bd. 307; b) durch Essigsäureanhydrid: Liebig's Annalen, Bd. 284, S. 48.

10) Faust Edwin S. Ueber das Glutolin, ein Albuminoid des Blutsersums. Archiv f. exper. Pathol. u. Pharm., Bd. 41, S. 307, 1898.

11) Fischer Ch. S. Ueber die quantitative Bestimmung des Glycocolls in den Zersetzungsprodukten der Gelatine. Diese Zeitschr., Bd. XIX, S. 164, 1894.

12) Gonnermann M. Zur quantitativen Bestimmung des Glycocolls durch Ueberführung in Hippursäure. Pflüger's Archiv, Bd. 59, S. 42 (bei O. Nasse), 1894.

13) Hausmann W. Ueber die Vertheilung des Stickstoffs im Eiweissmolekül. Diese Zeitschr., Bd. XXVII, S. 95, 1899.

14) Hlasiwetz H. u. Habermann J. Ueber die Proteinstoffe, erste Abhandlung. Liebig's Annalen, Bd. 159, S. 304, 1871, zweite Abhandlung, ebenda, Bd. 169, S. 150, 1874.

15) Hofmeister Frz. Ueber Methylierung im Thierkörper, Archiv für exper. Pathol. u. Pharm., Bd. XXXIII, S. 198, 1894.

16) Hoppe-Seyler F. Handbuch der physiol. u. pathol. chem. Analyse. 6. Aufl. (mit H. Thierfelder), Berlin 1893, S. 238 u. S. 271.

17) Horbaczewski J. Ueber die durch Einwirkung von Salzsäure aus den Albuminoiden entstehenden Zersetzungsprodukte. Sitzungsberichte d. Kais. Acad. d. Wissensch., Bd. 80, 2. Abth., Juniheft 1879; Wiener Monatshefte, Bd. VI, S. 639, 1885.

18) Jaffé M. und Cohn R. Ueber das Verhalten des Furfurols im thierischen Organismus. Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch. Bd. XX, S. 2311, 1887.

19) Jeanneret J. Untersuchungen über die Zersetzung von Gelatine und Eiweiss durch die geformten Pankreasenzyme bei Luftabschluss (Diss. bei Nencki-Bern). Journ. f. prakt. Chem., Bd. XV, S. 353, 1877.

20) v. Knieriem W. Verhalten der im Säugethierkörper als Vorstufen des Harnstoffs erkannten Verbindungen zum Organismus der Hühner. Zeitschr. f. Biologie, Bd. XIII, S. 36, 1877.

21) Kochs W. Ueber eine Methode zur Bestimmung der Topographie des Chemismus im Thierkörper, Pflüger's Archiv, Bd. XX, S. 64, 1879.

22) Krukenberg C. W. F. Fortgesetzte Untersuchungen über die Skeletine, Zeitschr. f. Biologie, Bd. VI, S. 254, 1886.

23) Limpricht H. Vorläufige Notiz über einige Bestandtheile der Fleischflüssigkeit, Liebig's Annalen, Bd. 127, S. 185, 1863 und über einige Bestandtheile der Fleischflüssigkeit, ebenda, Bd. 133, S. 293, 1864.

24) Munk J. Zur Lehre von den secretorischen und synthetischen Processen in der Niere, Virchow's Archiv, Bd. 107, S. 291, 1887.

25) Nencki M. Ueber die Harnfarbstoffe aus der Indigogruppe

und über die Pankreasverdauung. Bericht d. deutsch. chem. Gesellsch., Bd. VII, S. 1593, 1874.

26) Plöchl J. Ueber Phenylglycidsäure. Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch., Bd. XVI, S. 2815, 1883.

27) Reye W. Ueber Nachweis und Bestimmung des Fibrinogens. Inaug. Diss. (bei F. Hofmeister), Strassburg, 1898.

28) Salkowski E. Weitere Beiträge zur Theorie der Harnstoffbildung. Das Verhalten des Glycocoll, Sarkosin und Alanin im thierischen Organismus. Diese Zeitschr., Bd. IV., S. 55 u. S. 101, 1880.

29) Schmiedeberg O. Ueber die Elementarformeln einiger Eiweisskörper, Archiv f. exper. Pathol. u. Pharm., B, 39, S. 1, 1897.

30) Schultzen O. u. Filehne W. Ueber die Einwirkung der Schwefelsäure auf Harnsäure, Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch., Bd. I, S. 150, 1868; Schultzen O. u. Nencki M., Ueber die Vorstufen des Harnstoffs im Organismus, Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch., Bd. II, S. 566, 1869.

31) Shorey E. S. Nachträgliche Bemerkungen über das Amid des Zuckerrohrs, Journ. of the Americ. Chem. Soc., Bd. XX, S. 133, 1897, vgl. ibidem, Bd. XIX, S. 881.

32) Strecker. Vorläufige Notiz über die Spaltung der Cholsäure in Glycocoll und stickstofffreie Säure: Liebig's Annalen, Bd. 65, S. 130, 1848; vgl. ferner ebenda Bd. 67, S. 16. — Ueber die Bildung von Glycocoll aus Harnsäure, Liebig's Annalen, Bd. 146, S. 142, 1866.

33) Tappeiner H. Ueber das Verhalten einiger Condensationsprodukte des Chlorals mit Ketonen im Thierkörper, Archiv f. exper. Pathol. u. Pharm., Bd. XXXIII, S. 364, 1894.

34) Wälchli G. Ueber Fäulniss von Elastin und Mucin (bei M. Nencki-Bern), Journ. f. prakt. Chemie, Bd. XVII, S. 71, 1880.

35) Wetzell G. Ueber die Spaltungsprodukte des Conchiolins, Centralblatt f. Physiologie, Bd. XIII, S. 113, 1899.

36) Weyl Th. Zur Kenntniss der Seide I. II. Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch., Bd. 21, S. 1407 u. S. 1529, 1888.

37) Wiener H. Ueber das Glycocoll als intermediäres Stoffwechselprodukt, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm., Bd. 40, S. 313, 1898.