

Ueber die Vertheilung des Stickstoffs im Eiweissmolekül.

II. Mittheilung.

Von

cand. med. **Walther Hausmann** (aus Meran).

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strassburg. Neue Folge Nr. 25.)

Der Redaction zugegangen am 5. Januar 1900.)

I.

Vor einiger Zeit habe ich über Untersuchungen berichtet,¹⁾ welche den Zweck verfolgten, eine vorläufige Vorstellung über die Bindungsweise des Stickstoffs in den thierischen Proteinkörpern zu gewinnen, und zwar bestimmte ich nach Zerlegung mit Salzsäure neben dem Gesamtstickstoff 1. den in Form von Ammoniak abgespaltenen Stickstoff, 2. den Stickstoff der basischen, durch Phosphorwolframsäure fällbaren Verbindungen und 3. den festgebundenen, aber nicht basischen Spaltungsprodukten angehörigen Stickstoff.

Der Kürze wegen habe ich, unserer augenblicklichen Kenntniss der Eiweisskörper entsprechend, diese verschiedenen Arten des Eiweissstickstoffs als: Amid-, Diamino-, Monaminostickstoff bezeichnet. Damit sollte natürlich der Frage, ob sich nicht noch andere Bindungsformen des Stickstoffs im Eiweiss vertreten finden, nicht vorgegriffen werden.

Es ergaben sich nun bei Untersuchung verschiedener Eiweisskörper so grosse Differenzen in der Vertheilung des Stickstoffs, dass es wünschenswerth erschien, noch andere, namentlich in reiner Form erhältliche Eiweisskörper der Untersuchung in gleicher Richtung zu unterziehen. Ich habe deshalb auf Veranlassung von Herrn Professor Hofmeister die

¹⁾ Ueber die Vertheilung des Stickstoffs im Eiweissmolekül. Diese Zeitschrift, Bd. XXVII, S. 95.

Bindungsweise des Stickstoffs in einigen weiteren Proteinkörpern bestimmt.

Es gelangten zur Untersuchung krystallisirtes Oxyhämoglobin (vom Pferde), Globin (vom Pferde) und krystallisirtes Edestin (aus Hanfsamen).

Zur Untersuchung des Oxyhämoglobins stand mir ein nach Hoppe-Seyler dargestelltes Präparat zur Verfügung.

Das Globin wurde nach F. N. Schulz¹⁾ dargestellt. Als Ausgangsmaterial zur Darstellung des Globins benutzte ich ein nach dem Verfahren von Micko²⁾ hergestelltes Präparat.³⁾ Nach diesem Verfahren gelingt es leicht, schön krystallisirtes Oxy- bzw. Methämoglobin in grosser Menge zu gewinnen und beliebig oft umzukrystallisiren. Den abfiltrirten Krystallen haftet aber noch salzhaltige Mutterlauge an, welche, wie Schulz hervorhebt, die Trennung des Globins vom abgespaltenen Hämatin verhindert. Ich löste daher die abgepressten Krystalle in wenig Wasser, wenn nöthig unter Zusatz einer Spur von Ammoniak, und dialysirte gegen viel destillirtes Wasser, welches mehrmals gewechselt wurde. Die salzarme, im Dialysirschlauche verbliebene Lösung wurde filtrirt und konnte dann genau nach Schulz auf Globin verarbeitet werden. Die Globinlösung wurde mit Ammoniak und Chlorammonium versetzt, der entstandene Niederschlag einige Male durch Decantiren gewaschen, sodann mit Alkohol in der Hitze coagulirt und auf dem Seidentfilter gewaschen, bis das Filtrat keine Ammoniakreaction mit Nessler's Reagens mehr gab.

Krystallisirtes Edestin aus Hanfsamen wurde nach der bei Griessmayer⁴⁾ angegebenen Methode dargestellt. Gemahlene, mit Benzin extrahirte Hanfsamen wurden in 10%iger Kochsalzlösung aufgenommen, filtrirt und gegen destillirtes Wasser dialysirt. Nach kurzem Stehen schieden sich reich-

1) Diese Zeitschrift, Bd. XXIV, S. 449.

2) Vergl. Spiro, Diese Zeitschrift, Bd. XXVIII, S. 182.

3) Ich verdanke dasselbe der Freundlichkeit des Herrn Dr. Fuld.

4) Griessmayer, Die Proteide der Getreidearten u. s. w., 1897, S. 271.

lich oktaedrische, schön ausgebildete Krystalle aus. In die aus dem Dialysirschlauch entleerte krystallführende Flüssigkeit wurde festes Kochsalz eingetragen, bis der Niederschlag sich löste. Die filtrirte Flüssigkeit wurde abermals gegen destillirtes Wasser dialysirt. Das Edestin schied sich frei von amorphen Beimengungen schön krystallisirt aus. Die Stickstoffbestimmung des trockenen, nicht bis zur völligen Chlorfreiheit gewaschenen Präparates ergab nach Kjeldahl untersucht 18,62% und 18,44%, im Mittel 18,53% Stickstoff, in guter Uebereinstimmung mit Ritthausen's und Osborne's Analysen.

II. Zur Versuchsanordnung.

Wie schon früher bemerkt, ist die von mir angewandte Versuchsanordnung zwar nicht ausreichend, um so exacte Zahlen zu liefern, wie man es von der Analyse anorganischer Stoffe zu verlangen gewohnt ist, doch genügt sie, wie ich mich jetzt neuerdings überzeugt habe, die quantitativen Verschiedenheiten in der Stickstoffbindung der Eiweisskörper sicher erkennen zu lassen. Ich habe sie daher im Wesentlichen beibehalten und möchte nur auf einige einschlägige Punkte näher eingehen.

Ogleich für Monaminosäuren allgemein angenommen ist, dass sie durch Phosphorwolframsäure nicht gefällt werden, habe ich, wohl zum Ueberfluss, um neuerdings auftauchende Zweifel auf ihre Richtigkeit zu prüfen, die mir zugänglichen Aminosäuren, namentlich auch Phenylalanin und Aminovaleriansäure, in verdünnter saurer Lösung auf ihre Fällbarkeit mit Phosphorwolframsäure untersucht, aber nur negative Resultate erhalten. Hingegen wird Guanidin in saurer Lösung gefällt, sein Stickstoff somit auch in dem an sich unwahrscheinlichen Falle, dass Guanidin durch Säure aus dem Arginincomplex abgespalten wird, mit dem Stickstoff der Diaminoverbindungen zusammen bestimmt.

Ich habe weiter, um mich zu unterrichten, ob die quantitative Ausfällung der Diaminosäuren mit Phosphorwolframsäure aus der durch Destillation mit Magnesia vom Amidstick-

stoff befreiten salzsauren Zerkochungsflüssigkeit von der Concentration der letzteren merklich beeinflusst werde, Parallelversuche in der Art angestellt, dass ich die Ausfällung 1) aus sehr concentrirter, 2) aus der auf das doppelte Volumen verdünnten Lösung vornahm. Ich habe dabei einen Einfluss der verschiedenen Concentration nicht beobachtet.

Was die Zersetzung des Niederschlages der Diaminosäuren und der Aminosäurenlösung mit Kjeldahl-Schwefelsäure betrifft, so ist die früher befolgte Art des Zusatzes von Permanganat insofern geändert worden, als ich zur ursprünglichen Angabe von Kjeldahl (nämlich Erhitzen bis zur Schwärzung, Abkühlenlassen, Zusatz von Permanganat, sodann weiteres Erhitzen) zurückgekehrt bin.

Da die Permanganatoxydation bei einzelnen Substanzen zu kleinen Stickstoffverlusten führt, habe ich mich vergewissert, dass meine Bestimmungen diesem Fehler nicht unterliegen. Gleiche Volumina derselben Flüssigkeit wurden einerseits mit Hülfe von Permanganat, andererseits unter Zusatz von Kaliumsulfat und Kupfersulfat zersetzt. Ein Unterschied in den Resultaten konnte in diesen Parallelversuchen nicht nachgewiesen werden: nur erwies sich bei Anwesenheit von viel Phosphorwolframsäure die Zersetzung mit Kaliumsulfat und Kupfersulfat als rascher und bequemer ausführbar, so dass ich sie von da ab bevorzugte.

Bezüglich der Spaltung des Hämoglobins mit concentrirter Salzsäure sei noch Folgendes bemerkt. Bei mehrstündigem Kochen des Oxy- resp. Methämoglobins mit concentrirter Salzsäure scheidet sich ein schwarzer Niederschlag aus, der, wie die mikroskopische Untersuchung lehrt, aus gänzlich undurchsichtigen, ziemlich grossen, kugeligen Körnern besteht. Der völlig ausgewaschene Niederschlag ist löslich in Alkali, in Ammoniak, in starker Essigsäure, in säurehaltigem Aethylalkohol und Methylalkohol, nicht in verdünnter Essigsäure, Aceton und Amylalkohol. In concentrirter Schwefelsäure löst er sich mit braunrother Farbe. Bei Reduction mit Zinn und verdünnter Schwefelsäure wird er entfärbt. Das Spectrum der alkalischen Lösung zeigt vier Absorptionsstreifen, die am meisten

jenen des Hämatoporphyrins in alkalischer Lösung entsprechen, wie denn überhaupt die Eigenschaften des Körpers, z. B. der Farbenwechsel bei Behandlung mit warmer Salpetersäure und die Lösungsverhältnisse, denen des Hämatoporphyrins nahe stehen.

Auf die genauere Untersuchung dieses Hämatinabkömmlings habe ich vorläufig verzichten müssen. Bemerkt sei aber, dass er zweifellos mit merklichen Mengen des bei der Säureeinwirkung aus der chromogenen Gruppe des Eiweisses entstehenden melaninartigen Pigments verunreinigt war. Bei Weiterführung der Versuche ergab sich nämlich, dass bei Spaltung des Globins mit Salzsäure ebenfalls ein schwarzer Körper, Schmiedeberg's Melanoidinsäure entsprechend, in relativ grosser Menge gebildet wird, welcher von dem Hämatinabkömmling in seinen Eigenschaften verschieden, aber von ihm doch nicht leicht zu trennen ist.

Ich habe beim Hämoglobin den Stickstoffgehalt des Hämatinderivates gesondert bestimmt, indem ich nach der Destillation der salzsauren Zerkochungsflüssigkeit mit Magnesia, den Niederschlag auf Filtern sammelte, wusch und Filter sammt Niederschlag nach Kjeldahl verarbeitete. (Der in mehreren Parallelversuchen bestimmte Stickstoffgehalt des Filters lag innerhalb der unvermeidlichen Fehlergrenzen.)

In den Uebersichtstabellen habe ich, um weitere Columnen zu vermeiden, die Stickstoffwerthe des Farbstoffes in die Columnne der Diaminosäuren, wenn auch getrennt von diesen, eingereiht. Nach dem Gesagten dürften die für den Hämatinstickstoff erhaltenen Zahlen etwas zu hoch, die für den Diaminostickstoff gefundenen entsprechend zu niedrig ausgefallen sein. Doch ist sicherlich der Fehler nicht erheblich, da die Menge des aus der chromogenen Gruppe des Eiweisses durch Salzsäure erhältlichen Melanins in der Regel nur 1—2% beträgt.

III.

Die Resultate meiner Versuche theile ich nachstehend tabellarisch mit.

A. Bestimmung des Amidstickstoffs.

Tabelle I.

	Gewicht der Probe	N des mit MgO abdestillirten NH ₃	Amid-N in %	
				Mittel
Krystallisirtes Hämoglobin	0,7720	0,0085	1,10	1,07
	0,6308	0,0066	1,05	
Globin	0,7725	0,0063	0,82	0,78
	0,8735	0,0066	0,75	
Krystallisirtes Edestin	0,8886	0,0175	1,97	1,90
	0,9582	0,0175	1,83	

B. Bestimmung des Stickstoffs des bei der Spaltung von Hämoglobin entstehenden schwarzen Körpers.

Tabelle II.

Gewicht der Probe	Gefunden N		
	direkt	in %	Mittel
0,7720	0,0054	0,71	0,72
0,6308	0,0046	0,73	

C. Bestimmung des Diaminostickstoffs.

Tabelle III.

	Gewicht der Probe	Volumen der Lösung des Phosphor- wolfram- säurenieder- schlages	Volumen des zur Bestimmung ver- wendeten Theiles	Gefunden			
				direkt in g	in der ganzen Probe	N in %	Mittel
Krystallisirtes Oxyhämoglobin	0,7720	210	60	0,0098	0,0343	4,44	4,07
	0,6308	226	60	0,0064	0,0241	3,82	
	0,6308	226	60	0,0066	0,0249	3,94	
Globin	0,8735	250	45	0,0079	0,0439	5,02	4,96
	0,7725	250	45	0,0068	0,0378	4,89	
	0,7725	250	45	0,0069	0,0383	4,96	
Krystallisirtes Edestin	0,9592	250	45	0,0118	0,0655	6,84	7,07
	0,9582	250	45	0,0126	0,0700	7,30	

D. Bestimmung des Monaminostickstoffes.

Tabelle IV.

	Gewicht der Probe	Volumen des Phosphor- wolfram- säure- filtrates	Volumen des zur Bestimmung ver- wendeten Theiles	Gefunden			
				direkt in g	in der ganzen Probe	N in %	Mittel
Krystallisirtes Oxyhämoglobin	0.7720 1.3733	500 500	120 60	0.0209 0.0175	0.0871 0.1458	11.28 10.62	10.95
Globin	0.8735 0.7725	500 500	90 90	0.0171 0.0164	0.0950 0.0911	10.88 11.79	11.33
Krystallisirtes Edestin	0.8886 0.9582	500 500	45 90	0.0079 0.0181	0.0877 0.1005	9.88 10.49	10.19

Tabelle V enthält die Zusammenstellung der gefundenen Mittelwerthe behufs Vergleich der sich aus diesen Summanden ergebenden Gesamtstickstoffwerthe mit den für den Gesamtstickstoff von den betreffenden Autoren gefundenen Zahlen.

Tabelle V.

	Amido- stickstoff	Diamino- stickstoff	Monamino- stickstoff	Summe	Stickstoffgehalt	
						nach
Krystallisirtes Oxyhämoglobin	1.07	0.721 4.07	10.95	16.81	17.31	Hoppe-Seyler
Globin	0.78	4.96	11.33	17.07	16.89	Schulz
Krystallisirtes Edestin	1.90	7.07	10.19	19.16	18.53	eigener Analysen

Tabelle VI enthält eine Zusammenstellung der bisher über die Vertheilung des Stickstoffs bei den verschiedenen Eiweisskörpern ermittelten Daten in Procenten des Gesamtstickstoffs. Die Analysenzahlen vom Eiweisskörper der Coni-

1 Stickstoff des Hämatins.

terensamen» rühren her von E. Schulze¹⁾, die der Proto- und Heteroalbumose von E. P. Pick.²⁾ Die Eiweisskörper sind angeordnet nach dem steigenden Gehalte von Diamino-säuren, so dass Casein die Reihe beginnt, ein Pflanzeneiweisskörper und Heteroalbumose dieselbe beschliessen.

Tabelle VI.

	Amid- stickstoff %	Diamino- stickstoff %	Monamino- stickstoff %	Stickstoff in Summe gefunden statt 100%
Casein	13,37	11,71	75,98	101,06
Krystallisiertes Eieralbumin	8,53	21,33	67,80	97,66
Krystallisiertes Oxyhämoglobin (Pferd)	6,18	4,16 ³⁾ 23,51	63,26	97,11
Serumglobulin (Pferd)	8,90	24,95	68,28	102,13
Protoalbumose des Fibrins	7,14	25,42	68,17	100,73
Globin (Pferd)	4,62	29,37	67,08	101,07
Eiweisskörper der Coniferensamen	10,3	32,8	56,90	—
Leim	1,61	35,83	62,56	—
Krystallisiertes Edestin	10,25	38,15	54,99	103,39
Heteroalbumose des Fibrins	6,45	38,93	57,40	102,78

1) Diese Zeitschrift, Bd. XXIV, S. 276 u. Bd. XXV, S. 360.

2) Diese Zeitschrift, Bd. XXVIII, S. 258.

3) Stickstoff des Hämatins.

Im Hinblick auf voranstehende Tabelle ist es kaum nöthig, nochmals auf die grossen Unterschiede hinzuweisen, die nach den gefundenen Verschiedenheiten im constitutionellen Aufbau der einzelnen Proteinkörper bestehen müssen.

Ganz speciell betreffen diese Unterschiede die quantitativen Verhältnisse der basischen Spaltungsprodukte, und zwar machen sich hier die Abweichungen viel deutlicher bemerkbar, als bei den in viel grösserer Menge vorhandenen Monaminosäuren.

Beachtenswerth ist die Thatsache, dass die zwei bisher in Betreff ihrer Stickstoffbindung untersuchten pflanzlichen Eiweisskörper — E. Schultze's aus Coniferensamen dargestellter Proteinkörper und das krystallisirte Edestin aus Hanfsamen — einen sehr hohen Gehalt an basischem Stickstoff aufweisen. Es dürfte aber vorläufig noch nicht gestattet sein, hieraus zu schliessen, dass pflanzliche Eiweisskörper überhaupt reicher an basischen Gruppen sind. Die beim Globin, Leim und der Heteroalbumose des Fibrins, also bei Stoffen, welche den nativen thierischen Eiweisskörpern zum mindesten sehr nahe stehen, gefundenen Werthe lassen das Vorkommen von an basischen Gruppen reicheren Eiweissstoffen auch für den Thierkörper möglich scheinen.

Was die Zahlen für Oxyhämoglobin und Globin betrifft, so dürfte dem Obengesagten zu Folge dem Unterschied von 5,84% im Diaminostickstoff insofern nicht zu grosse Bedeutung beizumessen sein, als der dem Globin entstammende, wenn auch in geringer Menge erhältliche Stickstoff der Melanoidinsäure bei Untersuchung des Hämoglobins vom Niederschlage der Diaminosäuren getrennt und mit dem Hämatinabkömmling vereinigt bestimmt wurde, und ausserdem die Summanden beim Hämoglobin eine etwas zu niedrige, beim Globin eine zu hohe Zahl für den Gesamtstickstoff ergaben. Hingegen scheint die beim Hämoglobin und Globin sich ergebende Differenz im Amidstickstoff in Anbetracht der sonstigen grossen Schärfe der Bestimmung desselben trotz ihrer absoluten Kleinheit nicht unwichtig für die Beurtheilung der Entstehung des Globins aus dem Hämoglobin. Der Unterschied meiner

Amidstickstoffwerthe von denen Pröscher's¹⁾ dürfte sich ungezwungen daraus erklären, dass Pröscher nach der Zerkochung des Hämoglobins mit Salzsäure und Zinnchlorür das entstandene Ammoniak mit Kalilauge statt mit Magnesia austrieb, wobei eine nachträgliche Abspaltung von Ammoniak aus den gegen Säure beständigen Spaltungsprodukten des Eiweisses nicht ausgeschlossen ist.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXVII, S. 114.