

Ueber die Beeinflussung der Eiweisscoagulation durch stickstoffhaltige Substanzen.

Von
K. Spiro.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strassburg. Neue Folge Nr. 36.)
(Der Redaction zugegangen am 20. Juni 1900.)

Gelegentliche Beobachtungen, welche ich über das Ausbleiben der Eiweisscoagulation bei Gegenwart von anscheinend indifferenten Stoffen machte, haben mich veranlasst, den Einfluss einer Anzahl von organischen Substanzen nach dieser Richtung zu untersuchen. So überraschend zunächst einige Befunde waren, so ergab doch die nachträgliche Durchsicht der Litteratur, dass vereinzelt ähnliche Beobachtungen schon früher zur Beschreibung gelangt sind, ohne jedoch irgendwie Beachtung zu finden. Bei der Wichtigkeit der Eiweisscoagulation für nahezu alle biologisch-chemischen Untersuchungen schien mir eine Verfolgung des Gegenstandes um so mehr geboten, als sich daran die Hoffnung knüpfte, durch Vermehrung des Thatsachenmaterials neue Anhaltspunkte für die Aufklärung des so dunklen Coagulationsvorganges zu gewinnen.

Als Eiweissmaterial für eine derartige Untersuchung wäre derzeit, streng genommen, die durchgängige Verwendung von einheitlichem krystallisiertem Eiweiss geboten gewesen. Doch scheinen für die vorliegenden, im Allgemeinen mehr orientirenden Versuche zunächst die soviel leichter zu beschaffenden nativen Eiweisslösungen um so mehr zu genügen, als die an ihnen erhaltenen Befunde allein für praktische Zwecke von Bedeutung sind und zum Vergleich mit älteren

Beobachtungen derselben Richtung herangezogen werden können.

Zumeist benutzte ich Eierklar, seltener Blutserum vom Pferd. Letzteres eignet sich, wie ganz allgemein schon seit Heynsius bekannt, zu Coagulationsversuchen durchaus nicht so gut wie das Hühnereiereiweiss. Gelegentlich wurde auch bei einzelnen Versuchen vom Globulin (durch Ammonsulfat) befreites Eieralbumin benutzt oder krystallisirtes Serumalbumin, das nach dem von Pemsel ausgearbeiteten Verfahren¹⁾ dargestellt war.

Für die Darstellung der Eiweisslösungen wurde das Eierklar von frischen Eiern mit der Scheere zerschnitten, geschlagen und im Eisschrank absetzen gelassen. Das abgegossene Eiweiss war bisweilen so stark alkalisch, dass ein Einfluss auf die Gerinnung statt hatte; daher wurde stets angesäuert, und zwar mit saurem Kaliumphosphat bis zur deutlich sauren Reaction gegen Lackmuspapier — oder mit verdünnter Essigsäure zunächst bis zur sauren Reaction gegen Congo, worauf dann Natriumphosphat zugegeben wurde, bis die saure Reaction gegen Congo verschwand, die Lösung aber gegen Lackmus noch schwach sauer reagierte. Als bestes Kriterium für die richtige Ansäuerung darf die Filtrirbarkeit der Eiweisslösungen gelten, denn namentlich die mit Kaliumhydrophosphat angesäuerten Lösungen filtriren überraschend schnell. Ebenso gelingt in solchen Proben die Coagulation leicht und vollständig, so dass auch die Filtration von den Coagulis schnell und gut vor sich geht.

Die Coagulation selbst wurde in Reagensröhrchen vorgenommen; die Anwendung von Capillarröhrchen, wie sie bei der Schmelzpunktbestimmung üblich ist, verbot sich, obgleich die geringe dabei nothwendige Quantität das Verfahren a priori einladend erscheinen lässt, aus mehreren Gründen. Einerseits ist die Temperaturablesung genauer, wenn das Thermometer direkt in der Flüssigkeit sich befindet, während in den Capillaren leicht zu starke Erhitzung eintritt, andererseits kann der Vorgang der Gerinnung in den Capillaren im Einzelnen nicht mit der wünschenswerthen Genauigkeit beobachtet werden, namentlich ob bei einer bestimmten Temperatur nur Opalescenz oder schon Trübung oder bereits flockige

1. Siehe Hans Th. Krieger, Ueber die Darstellung krystalliniger, thierischer Eiweissstoffe. Inaug.-Diss. Strassburg i. E. 1898.

Abscheidung auftritt: zudem schliesst sich dieses Verfahren bei jenen Versuchen, wo die Vollständigkeit der Hitzecoagulation eventuell am Filtrat geprüft werden soll, von selbst aus.

Bezüglich der Geschwindigkeit des Erhitzens bin ich von dem üblichen Verfahren der meisten Beobachter bewusst aus folgenden Gründen abgewichen. Namentlich Corin und Anstiaux¹⁾ haben den Gerinnungspunkt bei äusserst langsamem Ansteigen der Temperatur bestimmt, was für einzelne Fälle gewiss durchaus zweckmässig ist. Bei den Schmelzpunktbestimmungen kann die Erhitzung beliebig langsam vorgenommen werden, wenn beim Schmelzvorgang keine Zersetzung stattfindet, d. h. wenn es sich um einen einfachen reversiblen Vorgang handelt. Findet dabei jedoch eine chemische Veränderung, ein irreversibler Vorgang statt, so wird in neuerer Zeit ganz allgemein (E. Fischer²⁾ hat wiederholt auf die Nothwendigkeit dieses Vorgehens hingewiesen jener Punkt als Schmelzpunkt (resp. Zersetzungspunkt) angegeben, wo bei schnellem Erhitzen Schmelzung resp. Zersetzung stattfindet. Da es sich beim Coaguliren regelmässig um eine mit einer Umsetzung einhergehende Zustandsänderung, einen irreversiblen Process handelt, muss auch hierbei zur genauen Fixation des Coagulationspunktes schnell erhitzt werden. Im Uebrigen kam es für die vorliegenden Untersuchungen, die, an nicht einheitlichem Material ausgeführt, auch nicht die Beibringung absoluter Zahlen (physikalischer Constanten) bezwecken konnten, mehr auf ein unter sich für die einzelnen Versuchsreihen vergleichbares Zahlenmaterial an. Dies wurde freilich erst nach einiger Uebung durch mannigfache Vorversuche erreicht.

Die Anordnung der Versuche entsprach im Wesentlichen derjenigen, die W. Pauli³⁾ kürzlich publicirt hat: durch ein

1) Bulletins de l'Academie royale des sciences etc. de Belgique, 3^{me} série, Bd. 15, S. 643, 1888 und ebenda Bd. 21, S. 321, 1891.

2) Vgl. Berichte der Deutsch. chem. Gesellschaft, Bd. 20, S. 827, 1887 und Bd. 21, S. 987, 1888.

3) Die physikalischen Zustandsänderungen der Eiweisskörper, Pflüger's Archiv, Bd. 78, S. 315, 1899.

an das äussere Glassgefäss geheftetes Schriftstück konnte an dem Verschwinden von Buchstaben ein bestimmter Punkt als Coagulationspunkt festgehalten werden; es wurden Buchstaben von dicker Schrift gewählt, da nicht der Beginn der Trübung, sondern das Ausfallen eines flockigen, dicken Niederschlages als Coagulationspunkt angesehen wurde.

Die Nothwendigkeit, bei vergleichenden Untersuchungen eine gleichmässige Verdünnung des Eiweisses zu wählen, ähnlich wie dies für die Salzfällung in den Arbeiten F. Hofmeister's und seiner Schüler geschieht, ergab sich aus der Nothwendigkeit, bei gleichem Salzgehalt zu arbeiten, und aus der bereits mehrfach gemachten Beobachtung,¹⁾ dass mit steigender Concentration der Hühnereiweisslösung die Gerinnungstemperatur sinkt. Auch für andere Eiweisskörper als diejenigen des Eierklars scheint diese Gesetzmässigkeit zu gelten, denn Hammarsten²⁾ gibt gelegentlich seiner Studien über das Paraglobulin an, dass drei Proben seines Präparates, welche 2,6, bzw. 1,72 und 0,86% enthielten, die Coagulation bei 68, 71 und 74° C. zeigten.

Als Beispiele für den Einfluss der Concentration der Eiweisslösung auf die Gerinnungstemperatur folgen zwei Protokolle:

Protokoll I und II.

cem. Wasser	cem. Albuminlösung	Gerinnungspunkt			
		Eiweisslösung I		Eiweisslösung II	
9	1	60,6	60,6	60,2	60,0
8	2	60,6	60,4	59,3	59,1
7	3	60,0	60,2	58,2	58,4
6	4	59,5	59,7	57,5	57,3

1) K. V. Starke (bei Hammarsten) erwähnt gelegentlich seiner Studien über Eieralbumin, dass dasselbe in 1—3% iger Lösung fast constant bei 56° coagulirt wird, mit steigender Verdünnung jedoch die Gerinnungstemperatur steigt und sehr verdünnte Lösungen erst beim Sieden nach Säurezusatz gerinnen (cf. Maly's Jahresbericht, Bd. 11, S. 19, 1881). Vgl. auch Pauli, a. a. O. S. 320.

2) Pflüger's Archiv, Bd. 18, S. 65. 1878.

cem. Wasser	cem. Albu- min- lösung	Gerinnungspunkt			
		Eiweisslösung I		Eiweisslösung II	
5	5	59.2	59.0	56.7	56.9
4	6	58.8	58.6	56.8	56.8
3	7	58.5	58.4	56.8	56.6
2	8	58.2	58.2	56.5	56.4
1	9	57.8	57.6	56.2	56.0
0	10	57.2	57.2	56.0	56.0

In zwei anderen Versuchsreihen, die in derselben Art angestellt wurden, stieg der Gerinnungspunkt bei der zehnfachen Verdünnung um 2,2 resp. 2,8° im Mittel der Zahlen.

Man könnte vielleicht geneigt sein, gegen dieses Resultat einzuwenden, dass die Verschiebung des Gerinnungspunktes nur eine scheinbare sei, bedingt dadurch, dass in verdünnteren Lösungen die Masse der coagulablen Substanz geringer sei und so die schwerer erkennbare Coagulation auch erst bei höherer Temperatur sich zeige, daher die allmähliche flockige Ausfällung auch erst später deutlich werde. Hiergegen kann jedoch eingewandt werden, dass, wie aus den obigen Protokollen ersichtlich, die Depression des Gerinnungspunktes auch schon bei geringer Verdünnung recht concentrirter Lösungen deutlich in Erscheinung tritt, also auch da zu erkennen ist, wo die Menge der coagulablen Substanz noch gross ist. Ferner handelt es sich ja auch bei der Coagulation nicht um einen mit steigender Temperatur allmählich verlaufenden Process, sondern um einen solchen, der, an eine bestimmte Temperatur geknüpft, bei dieser vollständig vor sich geht, so dass also das spätere Gerinnen nicht als eine Verzögerung angesehen werden kann.

Da ich meine Coagulationsversuche zum Theil auch in alkoholischer Lösung ausgeführt habe, sei in dieser Richtung Nachstehendes bemerkt. Die alkalische Reaction des nativen Eiereiweisses oder des Serums ist zwar deutlich, aber doch nur ganz ausnahmsweise so stark, dass nicht durch die

gleichzeitig vorhandenen Salze, wenn wenigstens nicht allzu stark verdünnt wurde, eine sichtbare Wirkung verhindert wäre. Wohl aber ist in genuinen Eiereiweisslösungen die alkalische Reaction deutlich genug, dass sie beim Erwärmen in alkoholischer Lösung in Wirkung tritt. Wiederholt wurden Eiereiweisslösungen angetroffen, die zwar für sich oder nach Zufügung des doppelten Volumens Wassers, aber nicht mehr nach Zufügung des doppelten Volumens Alkohol in der Hitze gerannen. Es muss daher bei Untersuchung in alkoholischer Lösung auf diesen Umstand Bedacht genommen werden, doch soll dieser Punkt erst bei Mittheilung anderer Versuche ausführlicher erörtert werden.

Ich berichte im Nachstehenden zunächst über Versuche, welche den Einfluss stickstoffhaltiger Stoffe auf den Gerinnungsvorgang zeigen, wobei neben den eigenen Erfahrungen ältere einschlägige Beobachtungen, soweit sie mir bekannt geworden sind, angeführt werden sollen. Von den in der Litteratur hierüber vorliegenden Angaben müssen an erster Stelle die Versuche über die Wirkung von Cholin auf Eiweiss genannt werden, die J. Mauthner¹⁾ bereits im Jahre 1874 veröffentlicht hat. Derselbe stellte fest, dass Fibrin in Cholinlösung sehr stark aufquillt und sich dann vollständig auflöst, dass auch Hühnereiweiss mit Cholin gekocht werden kann, ohne dass Gerinnung auftritt, und dass auch coagulirtes Hühnereiweiss durch Cholin in Lösung gebracht werden kann. Das entstandene Produkt fasste Mauthner als eine dem Kalialbuminat analoge Verbindung, als Cholinalbuminat auf.

¹⁾ Medic. Jahrbücher, 1874, S. 347: «Ueber das Verhalten des Neurins gegen Eiweisskörper». Nach der in der vorhergehenden Arbeit Liebig's Annal. der Chem., Bd. 166, S. 202) mitgetheilten Darstellungsweise und den Eigenschaften konnte es keinem Zweifel unterliegen, dass das von Mauthner benutzte Präparat nicht «Neurin» im heutigen Sinne, d. h. nicht die Oxyvinylbase, sondern die Oxäthylbase war, also nach der heutigen Terminologie als «Cholin» zu bezeichnen ist. Herr Professor Dr. Mauthner hatte die Freundlichkeit, mir auf meine Anfrage dies zu bestätigen und mich zur Richtigstellung der von ihm seiner Zeit gebrauchten und in die Litteratur übergegangenen Benennung zu autorisiren.

Ganz ebenso wie das Cholin verhält sich nach meinen Erfahrungen auch das Piperidin. Durch Zufügung desselben zu Eiweisslösungen wird ein mehr oder weniger grosser Theil des Eiweisses der Coagulation entzogen, ebenso wie auch coagulirtes Eiweiss durch Piperidin in Lösung gebracht werden kann. Die Anwesenheit von Eiweiss in diesen Lösungen lässt sich in sehr einfacher Weise zeigen, indem man der zu untersuchenden Lösung einen Tropfen verdünnter Kupfersulfatlösung zufügt: es tritt eine rothviolette Färbung auf, der Biuretreaction der Albumosen im Farbenton etwa entsprechend. Für die Anstellung der Biuretprobe ist also die Anwesenheit eines fixen Alkalis nicht nothwendig, es genügt vielmehr die Gegenwart einer starken Basé, wie des Piperidins. Bei der Ueberführung des Hühnereiweisses in die auch bei der Siedehitze nicht mehr gerinnende Modification findet übrigens keine oder nur eine geringe Schwefelwasserstoffabspaltung statt, das entstehende Produkt gibt noch recht intensiv die Reaction mit Bleiessig auf abspaltbaren Schwefel.

Aber auch Basen, die eine starke fällende Wirkung auf Eiweiss ausüben, können doch noch einen Theil des Eiweisses so verändern, dass derselbe der Coagulation entzogen wird; dies gilt z. B. für Pyridin und Anilin. Pyridin ist, wie aus dem beifolgenden Protokoll hervorgeht, ein sehr starkes Fällungsmittel für Eiweiss und setzt den Gerinnungspunkt desselben herab, dennoch vermag es Eiweiss beim Sieden in Lösung zu halten.

Protokoll III.

ccm. Wasser	ccm. Eiweisslösung	ccm. Pyridin	Gerinnungspunkt		Bemerkungen
8.0	2.0	0.0	62.0	61.8	
7.8	2.0	0.2	52.0	52.0	
7.6	2.0	0.4	45.5	45.6	Deutliche Trübung
7.4	2.0	0.6	—	—	Beginn der Fällung

Das für Pyridin Gesagte gilt auch für Anilin und dessen Homologe, dessen eiweissfällende Wirkung schon

Heintz¹⁾ gefunden und O. Nasse²⁾ bestätigt hat. Von den Homologen des Anilins wirken wie dieses Orthotoluidin (nicht Paratoluidin) und Xylidin, dagegen wird durch den Eintritt von Nitrogruppen die fällende Wirkung des Anilins ebenso aufgehoben, wie wir dies in einem späteren Abschnitt beim Phenol sehen werden.

Neben diesen stark basischen Aminen sind jedoch auch andere stickstoffhaltige organische Verbindungen im Stande, Eiweiss mehr oder weniger vor der Ausfällung zu schützen, auch solche, die nicht ausgesprochene Basen sind. Hierher gehören die Säureamide, Amidosäuren, Harnstoffe und Senföle.

Das Urethan z. B., das einerseits in concentrirter Lösung Eiweiss ausfällt, vermag andererseits die vollständige Coagulation einer Eiweisslösung zu hindern, wie das folgende Protokoll zeigt.

Protokoll IV.

cem. Eiweisslösung	cem. Wasser	cem. 50% Urethan	Gerinnungspunkt		Bemerkungen
2.0	8.0	0.0	63.0°	63.0°	
2.0	7.0	1.0	57.4°	57.2°	
2.0	6.0	2.0	Trübung, bei ca. 50° keine vollständige Gerinnung		Beim Erhitzen auf 100° bleibt Eiweiss zum Theil in Lösung.
2.0	5.0	3.0	Fällung		Die Fällung ist gallertig.

Während somit angesäuertes Eiereiweiss durch Urethan gefällt wurde, zeigte Pferdeblutserum auf Zusatz einer gesättigten Urethanlösung nur eine Trübung. Kocht man Serum mit einer genügenden Menge Urethan hinreichend lange, so tritt auch nach dem Ansäuern mit Essigsäure keine Coagulation ein, sondern die für Alkalialbuminatbildung typische Gallertbildung, die in der Hitze wieder verschwindet.

Der besonderen Verhältnisse halber seien für das Formamid z. B. mehrere Protokolle gegeben, da dasselbe, ähn-

¹⁾ Lehrbuch der Zoochemie, S. 643, Berlin, 1853.

²⁾ Zur Anatomie und Physiologie der quergestreiften Muskelsubstanz, Leipzig, 1882, S. 14.

lich wie dies nach W. Pauli's systematischen Untersuchungen für einige Salze gilt, in niederer Concentration (10 % den Gerinnungspunkt erhöht, in höherer jedoch herabsetzt, und bei einem Gehalt von ca. 25 % zu fällen beginnt. — Das Acetamid soll nach O. Nasse stärker fällen als Formamid (?), Oxamid und Benzamid überhaupt nicht.

Protokoll V. Formamid.

ccm. Eiweisslösung	ccm. Wasser	ccm. Formamid	Gerinnungspunkt		Bemerkungen
2.0	8.0	0.0	60.8	61.0	
2.0	7.0	1.0	64.6	64.8	Klar
2.0	6.0	2.0	59.0	59.4	Die Flüssigkeit trübt sich in der Kälte, allmählich Niederschlag
2.0	5.0	3.0	53.8	53.4	Fällung in der Kälte. Beim Erhitzen bleibt Eiweiss in Lösung

Protokoll VI. Formamid.

ccm. Eiweisslösung	ccm. Wasser	ccm. Formamid	Gerinnungspunkt		Bemerkungen
2.0	8.0	0.0	62.0	62.2	
2.0	7.0	1.0	65.2	65.4	In der Kälte Spur Trübung
2.0	6.0	2.0	61.3	61.1	Trüb. beginnende Fällung
2.0	5.0	3.0	54.0	53.8	Deutliche Fällung
2.0	4.0	4.0	—	—	Filtrat von der Fällung ist eiweisshaltig, zeigt beim Erhitzen keine Gerinnung

Protokoll VII. Formamid.

ccm. Eiweisslösung	ccm. Wasser	ccm. Formamid	Gerinnungspunkt		Bemerkungen
2.0	8.0	0.0	60.5	60.4	
2.0	7.8	0.2	60.7	60.8	
2.0	7.6	0.4	61.0	61.1	
2.0	7.4	0.6	61.9	62.1	

ccm. Eiweisslösung	ccm. Wasser	ccm. Formamid	Gerinnungspunkt	Bemerkungen
2.0	7.2	0.8	63.8	63.4
2.0	7.0	1.0	64.4	64.4
2.0	6.8	1.2	62.9	63.5
2.0	6.6	1.4	62.6	62.7
2.0	6.4	1.6	62.0	62.1
2.0	6.2	1.8	61.4	61.7
2.0	6.0	2.0	60.6	60.2
2.0	5.8	2.2	56.6	56.2
2.0	5.6	2.4	54.0	54.2

In der Kälte Beginn der Fällung:

Harnstoff dagegen treibt den Coagulationspunkt bei niederen Concentrationen stark in die Höhe und verhindert die Gerinnung bei höherer Concentration sogar vollständig. Ich gebe nur ein Protokoll:

Protokoll VIII. 50%ige Harnstofflösung.

ccm. Eiweisslösung	ccm. Wasser	ccm. Harnstofflösung	Gerinnungspunkt	Bemerkungen
1.0	9.0	0.0	60.5	60.5
1.0	8.8	0.2	61.2	61.5
1.0	8.6	0.4	63.2	63.7
1.0	8.4	0.6	65.0	65.2
1.0	8.2	0.8	66.3	66.5
1.0	8.0	1.0	Trübung bei ca. 67°	Selbst bei 100° nur unvollständige Ausfällung.

Neben diesem Verhalten gegenüber Eiweisslösungen zeigt der Harnstoff — und ganz gleich verhält sich der Sulfoharnstoff — auch auf coagulirtes Eiweiss eine starke Einwirkung: so wurde gut ausgewaschenes Fibrin sowohl beim Kochen als auch bei Brutschranktemperatur zunächst zu starkem Aufquellen gebracht und dann vollkommen gelöst, auch (durch Hitze) coagulirtes Hühnereiweiss kann man durch Harnstofflösung wieder in Lösung bringen. In wie hohem Grade endlich der Harnstoff auch die Coagulation von Eiweiss durch Alkohol zu hindern vermag, wird später auf Grund quantitativer Versuche des Näheren auseinander gesetzt werden.

Diese Einwirkung des Harnstoffs auf Eiweiss scheint geeignet, manche Angabe in der Litteratur zu ergänzen resp. zu erläutern. So schreibt Phil. Limbourg in seiner Arbeit *Beiträge zur chemischen Nervenreizung und zur Wirkung der Salze*:¹⁾ «Legt man einen Froschmuskel in starke Harnstofflösung, so wird er sulzig, lässt sich leichter zerdrücken, die Sehne ist unschwer abzuziehen — man erhält eine schleimige, fadenziehende, bei geringem Erwärmen in Wasser lösliche Masse. — Es handelt sich vielleicht um einen katalytischen Vorgang. Schwefelharnstoff zeigt dieselbe Wirkung, dagegen nicht salpetersaurer oder oxalsaurer Harnstoff, welche nur eine geringe Löslichkeit besitzen.» Derselbe Autor hat dann später gelegentlich seiner Untersuchungen über die Einwirkung von Salzen auf Fibrin²⁾ auch die Löslichkeit von Fibrin in Harnstoff gefunden, auch die Uncoagulirbarkeit seiner Harnstoffeiweisslösungen richtig beobachtet, ohne jedoch die Sache, die er für einen rein physikalischen Vorgang anzusprechen geneigt ist, weiter zu verfolgen. Da er zudem die Fibrinauflösung in Gegenwart von Salzen derjenigen durch Harnstoff vollkommen an die Seite stellt, so braucht auf die einschlägigen Betrachtungen Limbourg's nicht des Ausführlichen eingegangen zu werden.

Die eiweisslösende Wirkung des Harnstoffs wird jedoch auch sonst bisweilen in Erscheinung treten, und je nach dem Harnstoffgehalt werden daher eventuell auch in harnstoffhaltigen Flüssigkeiten bezüglich der Coagulation von Eiweisskörpern Verschiedenheiten auftreten. Die Berechtigung dieser Vermuthung muss allerdings im einzelnen Fall durch direkte Untersuchung erwiesen werden. Herr Prof. Hofmeister hat mich z. B. darauf aufmerksam gemacht, dass dies Verhalten zur Erklärung der sich widersprechenden Angaben über den Bence-Jones'schen Eiweisskörper beizutragen geeignet ist. Die nachfolgende Arbeit von Herrn Dr. A. Magnus-Levy aus dem hiesigen Institut bringt eine solche auf den Bence-Jones'schen Eiweisskörper bezügliche Untersuchung.

1) Pflüger's Archiv, Bd. 41, S. 303, 1887.

2) Zeitschr. für physiol. Chemie, Bd. XIII, S. 450, 1889.

Als stickstoffhaltige organische Verbindungen, die im Stande sind, Eiweiss mehr oder weniger vor der Ausfällung durch Hitze zu schützen, sind endlich noch die Senföle zu nennen. Die Wirkung der letzteren auf Eiweissstoffe ist schon vor längerer Zeit von R. Buchheim festgestellt: *Wahrscheinlich werden die eiweissartigen Körperbestandtheile durch sie verändert, wenigstens wird durch das gewöhnliche Allyl-Senföl die Gerinnung des Hühnereiweisses durch Kochen verhindert.*¹⁾ O. Nasse hat dies dann für die anderen Homologen bestätigt: *Alle Senföle, welche ich erhalten konnte, Methyl-, Aethyl-, Allyl- und Phenylsenföl fällen die Eiweisskörper nicht, ein Zusatz derselben zur Eiweisslösung hebt deren Gerinnung auf.* Nun ist aber dabei zu beachten, fährt O. Nasse fort, *dass die Gerinnung sofort und in der gleichen Weise wie bei der reinen Eiweisslösung eintritt, wenn der Mischung eine kleine Menge Säure, um so mehr, je mehr Senföl zugefügt war, zugesetzt wird. Die Senföle wirken also wie ein Alkali, bilden vielleicht eine Verbindung mit dem Eiweiss, eine Verbindung, die aber nicht fest sein kann, denn auch im zugeschmolzenen Rohre im Wasserbade erhitzt, tritt Gerinnung des Eiweisses auch bei reichlichem Zusatz von Senföl ein. Immerhin müsste ein Versuch, die interessante Beobachtung von Buchheim zu erklären, an die neutralisirende Wirkung der Säure anknüpfen!*

Da unter den bisher angeführten Stoffen, denen eine gerinnungshemmende Wirkung zukommt, sich Substanzen von sehr verschiedenem Aufbau finden, Basen, Säureamide, Senföle, so ist kaum als sicher anzunehmen, dass es sich überall um den gleichen Vorgang handelt.

Soweit die vorliegenden Beobachtungen einen Schluss gestatten, handelt es sich bei den basischen organischen Stoffen um eine den Alkalihydraten entsprechende Wirkung. Beim Cholin und Stoffen, deren basische Eigenschaften sich direkt, z. B. beim Zusammenbringen mit Indicatoren nachweisen lassen, ist dies anscheinend selbstverständlich. Aber

¹⁾ Lehrbuch der Arzneimittellehre, 3. Aufl., 1878, S. 383.

auch bei Aminen, welche zwar nicht auf Farbstoff wirken, aber doch sonst unzweifelhafte basische Eigenschaften zeigen, wie Anilin, Toluidin u. s. w., liegt diese Annahme bei Weitem am nächsten.

Weniger passend scheint zunächst eine Ausdehnung dieser Annahme auf die Säureamide und Harnstoffe. Doch lässt sich für den basischen Charakter derselben nicht bloss ihre Verbindungsfähigkeit mit Säuren anführen, sondern wir besitzen in der Reactions-geschwindigkeit und der elektrischen Leitfähigkeit ihrer Salze sogar ein Maass desselben. Von diesem Gesichtspunkt aus ist durch W. Ostwald¹⁾ wie für die anderen Basen auch für den Harnstoff in wässriger Lösung

eine hydroxylhaltige Formel z. B. $\text{CO} \begin{matrix} \text{NH}_3\text{OH} \\ \text{NH}_2 \end{matrix}$ wahrscheinlich

gemacht. Zum Vergleich lasse ich einige der vorhandenen Zahlen über die Affinitätsgrössen der von mir untersuchten Verbindungen folgen, wie dieselben namentlich von Ostwald's Schülern J. Walker²⁾ und G. Bredig³⁾ festgestellt worden sind. Während die Muttersubstanz aller organischen Amine, das Ammoniak, eine ziemlich niedrige Dissociationsconstante ($K = 0,0023$) zeigt, ist dieselbe bei anderen Verbindungen sogar bisweilen recht erheblich, z. B. für

Piperidin $K = 0,158$ (direkt gemessen).

Auch das Neurin hat nach Ostwald eine hohe Dissociationsconstante wie alle quaternären Basen. Ähnliche Daten ergeben sich auch aus der von J. Walker gemessenen Leitfähigkeit der salzsauren Salzen: aus den hierbei erhaltenen Zahlen (Schwefelharnstoff 371,0; Acetamid 369,9; Harnstoff 368,6; Asparaginsäure 226,0; Asparagin 217,0; Glycocoll 195,3; Pyridin 108,1) seien diejenigen für das Anilin (99,4) und Nitranilin (376) hervorgehoben, die zeigen, dass in Uebereinstimmung mit den oben angegebenen Eigenschaften der beiden Basen bezüglich der fällenden Wirkung auf Eiweiss-

1) Journ. f. prakt. Chemie, Bd. XXX, XXXIII u. XXXV.

2) Zeitschr. f. physik. Chemie, Bd. IV, S. 319, 1889.

3) Zeitschr. f. physik. Chemie, Bd. XIII, S. 289, 1894.

körper auch bezüglich der physikalisch-chemischen Eigenschaften der Einfluss der Nitrogruppe sich sehr deutlich zeigt.

Auf Grund dieser Erfahrungen scheint das Verhalten concentrirter Harnstofflösungen gegen Eiweiss viel weniger überraschend. In der That gleicht, wie nunmehr gezeigt werden soll, das bei der Harnstoffeinwirkung entstehende Produkt in allen wesentlichen Punkten typischem Alkalialbuminat, so schon in seinem äusseren Habitus, indem es, namentlich bei höherer Concentration, eine sulzige, gallertige Masse darstellt. So auch in allen typischen Lösungs- und Fällungsreactionen: durch Zusatz verdünnter Säure wird es leicht abgeschieden, während es in concentrirter Salzsäure und auch in starker Essigsäure löslich ist, ebenso ist es auch in verdünnten Alkalien leicht löslich.

Weiter wurde die Eiweiss-harnstofflösung einer ausgiebigen Dialyse in fliessendem Wasser unterworfen. Dabei verblieb im Dialysirschlauch eine ziemlich stark opalisirende Flüssigkeit, aus der sich nichts abgeschieden hatte, ganz wie sich auch das Alkalialbuminat bei der Dialyse verhält. Eine solche von Harnstoff befreite Eiweisslösung zeigte nunmehr beim Erhitzen typische Gerinnung: auch dies stimmt mit den Erfahrungen am Alkalialbuminat überein, denn auch eine durch Dialyse alkaliarm gemachte Alkalialbuminatlösung gerinnt beim Sieden.

Hervorheben möchte ich endlich noch, dass zur Ausfällung der Verbindung ein bestimmter Säuregrad nöthig ist, und dass dazu ein Ueberschuss von Kaliumhydrophosphat ebenso schwer ausreicht, wie zur Fällung von Alkalialbuminat. Das tritt auch deutlich zu Tage bei der Bildung der Verbindung.

Versetzt man eine durch Kaliumhydrophosphat deutlich saure Eiweisslösung mit steigenden Quantitäten einer 50^o ige Harnstofflösung, so tritt allerdings bei einem Gehalt von 1:10 noch eine geringe Coagulation ein, während dieselbe in einer schwach sauren Eiweisslösung, wie oben hervorgehoben, bei einem Gehalt von 0,4 cem. Harnstofflösung in 10 cem. vollkommen ausbleibt. Aber die Coagulation ist unvollständig, es

bleibt selbst bei Siedehitze viel Eiweiss in Lösung: setzt man mehr von der Harnstofflösung hinzu, so tritt keine Coagulation mehr ein, wie dies z. B. schon bei 2,0 cem. Harnstofflösung zu 10 cem. Gesamtflüssigkeit der Fall ist.

Anscheinend anders gestaltet sich der Vorgang, wenn wir eine mit Essigsäure stark (deutliche Reaction gegen Congo) angesäuerte Eiweisslösung mit steigenden Quantitäten Harnstofflösung versetzen, wie folgendes Protokoll zeigen möge.

Protokoll X.

Eiweiss mit Essigsäure bis zur sauren Reaction gegen Congo-Papier angesäuert: Harnstofflösung 50 procentig.

cem. Eiweisslösung	cem. Wasser	cem. Harnstofflösung	Gerinnungspunkt		Bemerkungen
1.0	8.0	1.0	70.4	70.6	Beim Erhitzen feine Flocken
1.0	7.0	2.0	67.2	67.6 trüb
1.0	6.0	3.0	63.5	63.2
1.0	5.0	4.0	58.5	—
1.0	4.0	5.0	49.5	50.0
1.0	3.0	6.0	51.5	52.0
1.0	2.0	7.0	70.1	70.4	Gerinnung unvollständig, viel in Lösung
1.0	1.0	8.0	—	—	Nur geringe Trübung
1.0	0.0	9.0	—	—	Bleibt klar.

Wie man sieht, wirkt Harnstoff in der stark sauren Eiweisslösung zunächst nur wie gewisse Salze, die den Coagulationspunkt herabdrücken, allmählich jedoch, allerdings erst bei hohen Concentrationen, wird die Wirkung der Essigsäure neutralisirt, und bei einem Gehalt der Lösung an Harnstoff von 45% ist die Coagulation vollkommen aufgehoben. Dieser Antagonismus zwischen Essigsäure und Harnstoff ist wohl als ein Beweis mehr anzusehen, dass letzterer bei seiner Wirkung wie eine typische Base fungirt.

Diese basische Valenz des Harnstoffs Säuren gegenüber, mit denen er keine beständigen Salze bildet, lässt sich durch Versuche zeigen, in denen die Verseifung von Essigäther durch Schwefelsäure nach Art der bekannten Versuche von

W. Ostwald als Maass gewählt wurde, wie es ähnlich schon für die Basen J. Walker in der oben citirten Arbeit mit Salzsäure gemacht hat. In parallelen Versuchsreihen, bei denen in der einen mit Wasser, in der anderen mit Harnstofflösung verdünnt wurde, verhielten sich die Mengen der vorhandenen Säuren (zugesetzten + neugebildeten) wie 14,85: 10,35, 15,05: 12,55, 19,3: 13,5, 25,00: 18,20, 28,2: 20,7, 47,7: 39,5 etc. Auch hier hat also Harnstoff die spaltende Wirkung von Ionen zu hindern vermocht, resp. Säure wie ein echtes Alkali neutralisirt.

Die Annahme, dass es in der Säureamidlösung Hydroxylionen sind, welche die coagulationhemmende Wirkung entfalten, setzt voraus, dass das Phänomen nur in wässriger Lösung auftritt. Dies lässt sich in der That am besten durch die Versuche am coagulirten Eiweiss zeigen. Wie oben hervorgehoben, vermögen in wässriger Lösung sowohl Harnstoffe als auch Piperidin coagulirtes Eiweiss aufzulösen: die Lösung wird durch Alkohol nicht gefällt. Dagegen geht keine Spur von Eiweiss in Lösung, wenn alkoholische Harnstofflösung oder Piperidinlösung angewandt wird oder Piperidin für sich mit Eiweiss erhitzt wird. Dies zeigt deutlich, dass für das Phänomen die Gegenwart von Wasser nöthig ist.

Wenn bei der Fähigkeit des Harnstoffs, Formamids etc., die Hitzeerinnung der nativen Eiweisskörper zu hindern, von der Bildung eines dem Alkalialbuminat ähnlichen Körpers die Rede war, so ist damit natürlich keine Identität des entstandenen Körpers mit den durch Alkalihydroxyde erhältlichen Produkten behauptet. Die viel intensivere Wirkung der fixen Alkalien führt frühzeitig zu chemischen Veränderungen, wie Ammoniak- und Schwefelwasserstoff-Abspaltung, welche bei Einwirkung der genannten Amide nicht beobachtet werden.

Es darf aber nicht ausser Augen gelassen werden, dass der Begriff des Albuminats selbst kein chemisch definirter ist, indem je nach der Intensität die Einwirkung von Alkalien nachweisbar Albuminate (resp. Albuminsäuren) mit verschiedenem Stickstoffgehalt (wie namentlich zuerst O. Nasse gezeigt hat), vermuthlich auch mit verschiedenem Schwefelgehalt

erhalten werden. Ueber die in solchen Fällen zweckmässige Nomenclatur wird wohl erst später eine Entscheidung getroffen werden können. Vorderhand wird es sich empfehlen, an dem Begriff, wie er sich aus den ursprünglichen Untersuchungen ergeben hat, festzuhalten, wobei das physikalische Verhalten des Alkalialbuminats die Hauptrolle spielte. In Bezug hierauf herrscht zwischen der Wirkung der Alkalien und des Harnstoffs eine vollkommene Analogie: Wie oben ausführlich gezeigt, vermag Harnstoff in geringerer Concentration bis zu 4^o den Coagulationspunkt zu erhöhen, genau wie es verdünnte Alkalien thun¹⁾; bei höherer Concentration wird die Coagulation ganz verhindert, ja beide sind im Stande, coagulirtes Albumin wieder in wässrige Lösung überzuführen.

Wie oben erwähnt, hat O. Nasse auch in Betreff der Senfölvirkung die Analogie mit der Albuminatbildung betont. Bei dem chemischen Charakter der Senföle erscheint aber diese Annahme bedenklich, so geeignet sie ist, eine Uebereinstimmung mit dem sonst bei stickstoffhaltigen Stoffen beobachteten Verhalten herzustellen. Es darf vor Allem nicht ausser Betracht bleiben, was, als O. Nasse seine Vermuthung aussprach, noch nicht bekannt war, dass Senföle mit stickstoffhaltigen Substanzen leicht unter Bildung von Additionsprodukten reagiren; namentlich ist es bekannt, dass gerade mit den Spaltungsproducten des Eiweisses, den Amidosäuren, die Senföle unter Bildung von Thiohydantoinen sich umsetzen. Nachdem O. Aschan²⁾ dies zuerst festgestellt und die Natur der entstehenden Verbindungen erkannt hatte, haben W. Marckwald, M. Neumark und R. Stelzner³⁾ gezeigt, dass alle Amidosäuren in alkalischer Lösung bereits in der Kälte unter starker Erhitzung mit allen Senfölen unter Bildung der entsprechenden

¹⁾ Was Halliburton (Journ. of Phys., Bd. V. S. 152, 1884 für die Eiweisskörper des Serums gezeigt hat, dass durch Zusatz verdünnten Alkalis der Opalescenzzpunkt (allmählich von 70° auf 73° C. und der Coagulationspunkt von 76° auf 80° C.) steigt, gilt nach eigenen Erfahrungen auch für andere Eiweisskörper.

²⁾ Berl. Berichte, Bd. XVI. S. 1544, 1883 u. Bd. XVII. S. 426, 1884.

³⁾ Ebenda, Bd. XXIV. S. 3278, 1891.

Thiohydantoinsäuren reagiren, ein Verfahren, das erst kürzlich wieder von F. Röhmann¹⁾ zur Abscheidung des Leucins aus dem Rohleucin verwendet wurde. Ich möchte daher für die Erklärung des Ausbleibens der Eiweiscoagulation bei der Behandlung von Albumin mit Senfölen die Möglichkeit nicht ausschliessen, dass es sich um Bildung von Senföleiweissverbindungen handelt.

¹ Ebenda. Bd. XXXI. S. 2188. 1898.