

Beiträge zur Kenntniss der Eiweisskörper.

Von

Docent Dr. **Adolf Jolles** in Wien.

Aus dem chemisch-mikroskopischen Laboratorium von Dr. M. und Dr. A. Jolles in Wien.)

Der Redaction zugegangen am 1. April 1901.

Die bisher an isolirten reinen Eiweisssubstanzen durchgeführten Versuche haben gezeigt, dass die Elementaranalysen allein durchaus nicht genügen, einen Einblick in die Constitution der Eiweisskörper zu bieten, und dass vor Allem die grossen Verschiedenheiten, die zwischen den einzelnen Eiweisskörpern trotz ihrer ähnlichen procentischen Zusammensetzung bestehen, uns veranlassen müssen, unser Hauptaugenmerk auf die Gruppierung der Elemente im Eiweissmolekül zu lenken.

Um nun der Frage der Gruppierung näher zu treten, gibt es bei den Eiweissstoffen nur folgenden Weg:

Der zu untersuchende Körper muss der Einwirkung verschiedener Reagentien unterworfen werden, die je nach ihrer chemischen Beschaffenheit gewisse Complexe unangegriffen lassen. Diese Complexe sind dann als die Componenten des zu untersuchenden Körpers aufzufassen, und diese Annahme hat um so mehr Wahrscheinlichkeit, je glatter und quantitativer die Einwirkung der Reagentien stattfindet.

Von diesem Gesichtspunkte aus sind bereits eine Reihe von Arbeiten erschienen, welche sich mit der Spaltung des Eiweisses durch verschiedene Reagentien befassen. Die wesentlichsten Spaltungsprodukte waren: Amidosäuren (Glycocoll, Leucin, Monoamidovaleriansäure, Asparaginsäure und Glutaminsäure), aromatische Körper (Tyrosin, Indol, Skatol), Kohlehydrate, ein wenig erforschter schwefelhaltiger Complex und endlich die in jüngster Zeit aufgefundenen Hexonbasen (Lysin, Arginin, Histidin), welche in jedem Molekül mehrere Amidogruppen enthalten.

Die älteste einschlägige und beachtenswerthe Arbeit ist die von P. Schützenberger,¹⁾ welcher Proteinstoffe sowohl der Einwirkung von verdünnter Schwefelsäure als von Aetzbaryt in wässriger Lösung unterworfen hatte. Schützenberger gelangte auf Grund seiner Versuchsergebnisse zu der Annahme, dass im Eiweissmoleküle Oxamidgruppen vorhanden sind, eine Annahme, die nach der kürzlich erschienenen Arbeit von J. Habermann und Ehrenfeld²⁾ unhaltbar geworden ist. Ebenso war es diesen Forschern unmöglich, den von Schützenberger angenommenen quantitativen Ausdruck für das Vorhandensein der Harnstoffgruppe im Eiweissmoleküle verificiren zu können, indem sie nachweisen konnten, dass das von Schützenberger gefundene constante Verhältniss von Ammoniak zu Kohlensäure bei der genannten Spaltung als sehr zweifelhaft zu bezeichnen ist. Einen werthvollen Beitrag zur Kenntniss der Eiweisskörper haben Kossel und seine Mitarbeiter³⁾ geliefert, indem es diesen Forschern gelungen ist, das Vorkommen der Hexonbasen, deren genauere chemische Natur im Wesentlichen aufgeklärt ist, bei der Spaltung sämtlicher Eiweisskörper zu constatiren. Hierauf gestützt, betrachtet Kossel diese Substanzen als Kern des Eiweissmoleküls, an den die übrigen Complexe (aliphatische und aromatische Amidosäuren u. s. w.) angelagert sind.

Eine Arbeit, welche auf der Charakterisirung der Spaltungsprodukte der Eiweisskörper durch Gruppenreactionen beruht, ist die von Hausmann,⁴⁾ in der er der Constitution des Eiweisses mit Bezug auf die Stickstoffvertheilung durch quantitative Gruppenreactionen näher kommen wollte. Wenn es auch nicht möglich ist, aus den erhaltenen Resultaten sich

1) Bulletins de la Société chimique de Paris, Bd. XXIII; Annales de Chimie et de Physique, XVI, V. Série.

2) Ueber Proteinstoffe. Von J. Habermann und R. Ehrenfeld. Zeitschrift für physiol. Chemie, Bd. XXX, S. 453.

3) Zeitschrift für physiol. Chemie, Bd. XXIII, S. 115 und 402; Bd. XXV, S. 165; Bd. XXVI, S. 588; Bd. XXVII, S. 463; Bd. XXXI, S. 165. Deutsche medic. Wochenschrift, 1894, S. 147.

4) Ueber die Vertheilung des Stickstoffes im Eiweissmolekül. Von Cand. med. Hausmann. Zeitschrift für physiol. Chemie, Bd. XXVII, S. 95.

ein präcises Bild über die Stickstoffgruppierung im Gesamtmolekül zu machen, so geht doch aus ihr hervor, dass zwischen den verschiedenen Eiweisskörpern sehr beträchtliche Unterschiede in der chemischen Structur bestehen müssen. Allerdings ist zu bemerken, dass gegen die von Hausmann angewandte Methodik von Kutscher¹⁾ gewichtige Einwände erhoben worden sind.

Cohn²⁾ hat bei der Behandlung von Eiweisskörpern mit Säuren einen Körper erhalten, den er aus dem Leucinimid durch Verdoppelung des Moleküls und Bildung eines Piperazinderivates erklärt. Die Entstehung der piperazinähnlichen Derivate aus dem Eiweiss leitet Cohn aus den Imiden der Amidosäuren ab, wobei er annimmt, dass je zwei Moleküle unter Wasseraustritt zu einem ringförmigen Complexe zusammentreten, womit die Annahme, dass Amidosäuren Componenten des Eiweisses sind, eine weitere Stütze findet.

In jüngster Zeit hat Pröscher³⁾ versucht, die Spaltung von Eiweisskörpern, speciell von krystallisirtem Hämoglobin, durch Zinnchlorür und Salzsäure quantitativ zu verfolgen und ist hierbei zu dem Resultate gekommen, dass bei der Summirung der durch die jetzigen Methoden isolirbaren Bestandtheile nur die Hälfte an Kohlenstoff und Stickstoff wieder gefunden wird, woraus zu schliessen ist, dass die von ihm durchgeführte Reaction kaum im Stande ist, uns in die Zusammensetzung des Eiweisses einen einwandfreien Einblick zu gestatten.

Oxydationsversuche an Eiweisskörpern sind mit Erfolg vor Allem von Hofmeister⁴⁾ gemacht worden. Hofmeister

1) Ueber die Verwendung der Phosphorwolframsäure bei quantitativen Bestimmungen der Spaltungsprodukte des Eiweisses. Von Fr. Kutscher. Zeitschrift für physiol. Chemie, Bd. XXXI, S. 215.

2) Ueber die Bildung von Basen aus Eiweiss. Von Prof. Cohn.

3) Ein Beitrag zur Erforschung der Constitution des Eiweissmoleküls. Von Fr. Pröscher. Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXVII, S. 114.

4) Ueber Bildung des Harnstoffes durch Oxydation. Von Franz Hofmeister. Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie, Bd. XXXVII, S. 426—444.

hat bei der Oxydation von Eieralbumin durch Permanganat bei Anwesenheit eines Ueberschusses von Ammoniak Harnstoff in relativ geringen Mengen nachgewiesen. Eine Discussion der von ihm erhaltenen Resultate erfolgt an einer anderen Stelle dieser Arbeit.

Wie aus Vorstehendem ersichtlich, sind mit verschiedenen Reagentien Eiweisspaltungen vorgenommen worden, die verschiedene Spaltungsprodukte ergeben haben, die dann als Componenten des Eiweisses angesehen wurden. Eine definitive Klärung des Problems der Eiweisszusammensetzung ist jedoch nur dann zu erhoffen, wenn eine grössere Anzahl von glatt verlaufenden Spaltungen bekannt ist, so dass uns so zu sagen mehrere Schmitte durch das Eiweissmolekül in verschiedener Richtung zu Gebote stehen, die in ihrer Gesamtheit ein vollständiges Bild liefern. Nach den Erfahrungen, die ich bei den Purinkörpern¹⁾ gemacht habe, glaubte ich im Permanganat in schwefelsaurer Lösung ein Reagens zu haben, welches auch hier die Aussicht auf eine leicht zu verfolgende und glatte Spaltung bietet, und hierdurch wurde ich veranlasst, die verschiedenen Eiweisskörper analog zu behandeln. Der Vortheil dieser Methode besteht darin, dass gewisse Körper, wie Harnstoff, Mono- und Diamidosäuren unter den angegebenen Bedingungen nicht weiter verändert werden, was gegenüber den alkalischen Spaltungen, bei denen der Harnstoff zu Ammoniak zerfällt, und auch Diamidosäuren nicht unangegriffen bleiben, ein wesentlicher Vortheil ist. Ausserdem ermöglicht das Verschwinden der Permanganatlösung bei der Oxydation eine Fixirung des Endpunktes, wodurch die gleichmässige Spaltung gesichert ist, sofern man sich an gleichbleibende Concentration und Temperatur hält.

Beschreibung des Verfahrens.

0,4—0,6 g Substanz wurden abgewogen, in ein Becherglas von etwa 600 cem. Inhalt gebracht, mit ca. 400 cem.

1) Ueber eine quantitative Reaction bei den Ureiden und Purinderivaten. Von Adolf Jolles. Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. XXXIII, S. 1246 und 2120.

destillirtem Wasser versetzt, 10 ccm. concentr. Schwefelsäure vom spec. Gewichte 1,84 hinzugesetzt, auf dem Drahtnetze erwärmt und Permanganatlösung (ca. 4 g pro Liter) allmählich hinzugesetzt. Zu Beginn des Erwärmens kann der Zusatz der Permanganatlösung cubikcentimeterweise erfolgen; sobald sich die Lösung langsam zu entfärben beginnt, setzt man das Permanganat nur tropfenweise so lange hinzu, bis der letzte Permanganatzusatz nach $\frac{1}{2}$ stündigem Kochen nicht verschwunden ist. Es ist darauf zu achten, dass während der Oxydation die Concentration der Lösung durch zeitweiliges Nachfüllen mit destillirtem Wasser annähernd gleich erhalten bleibe: es empfiehlt sich, das Becherglas während der Oxydation mit einem Uhrglase bedeckt zu halten. Sobald nach dem $\frac{1}{2}$ stündigen Kochen die Färbung der Permanganatlösung nicht verschwunden ist, entfärbt man den Ueberschuss von Permanganat mit einigen Tropfen sehr verdünnter Oxalsäure. Hierauf füllt man den Inhalt des Becherglases in einen $\frac{1}{2}$ Liter-Kolben, spült nochmals mit destillirtem Wasser nach und kühlt den Inhalt des Kolbens ab.

Nunmehr setzt man allmählich Lauge hinzu, wobei nach jedesmaligem Zusatze der Lauge umgeschüttelt und gekühlt wird. Sobald das Mangan auszufallen beginnt, unterbricht man den Zusatz der Lauge und füllt den Inhalt des Kolbens mit destillirtem Wasser bis zur Marke auf. Von dieser Lösung werden nun folgende Bestimmungen durchgeführt:

I. Volumetrische Bestimmung des Stickstoffes.

100 ccm. der Lösung werden in das Schüttelgefäß des Azotometers ¹⁾ gebracht, dann bringt man in das kleine Hartgummigefäß ca. 30–40 ccm. Bromlauge (25 g Brom und 80 g NaOH auf $\frac{1}{2}$ Liter aufgefüllt) und geht im Uebrigen so vor, wie ich es bereits in extenso bei der volumetrischen Bestimmung der Harnsäure angegeben habe.

¹⁾ Siehe Zeitschr. für physiol. Chemie, Bd. XXIX, S. 236. (Ueber eine neue zuverlässige Methode zur quantitativen Bestimmung der Harnsäure im Harn. Von Adolf Jolles.)

II. Bestimmung des Harnstoffes.

100 bis 200 ccm. der Lösung werden mit dem gleichen Volumen destillirten Wassers verdünnt, mit etwas überschüssiger Salzsäure versetzt, am Wasserbade erwärmt, bis die Lösung farblos wird, dann die Lösung etwas eingedampft und hierauf unter Zusatz von etwas Phenolphthalein mit alkoholischer Natronlauge (30 g reines Aetznatron in wenig Wasser gelöst und mit 95%igem Alkohol auf 1 Liter aufgefüllt) versetzt, bis eine schwache Rothfärbung eintritt. Hierauf säuert man mit einem Tropfen verdünnter Salzsäure an, wobei die Rothfärbung verschwindet. Nunmehr lässt man die Lösung ca. 2 Stunden lang stehen, wobei sich ein Theil der Salze ausscheidet, filtrirt hierauf und wäscht den Niederschlag mit absolutem Alkohol mehrmals aus. Das Filtrat wird auf ca. 20 ccm. auf dem Wasserbade eingedampft, abkühlen gelassen und abermals mit 100 ccm. absolutem Alkohol versetzt. Nach mehrstündigem Stehen werden die ausgeschiedenen Salze neuerdings filtrirt und ausgewaschen. Das Filtrat wird abermals auf ein kleines Volumen eingedampft, und der weitere Vorgang so oft wiederholt, bis das eingedampfte und abgekühlte Filtrat keine Ausscheidung von Salzen mehr zeigt. Nunmehr fügt man zu dem Rückstande ca. 100 ccm. einer gesättigten ätherischen Oxalsäurelösung hinzu, rührt um und lässt das bedeckte Glas bei gewöhnlicher Temperatur 24 Stunden lang stehen. Alsdann wird filtrirt, mit dem Filtrate das Becherglas ausgespült und der Niederschlag mit Aether ausgewaschen. Nunmehr wird das Filter sammt Niederschlag in einem Exsiccator über Schwefelsäure getrocknet, gewogen und der Stickstoff nach Kjeldahl in bekannter Weise bestimmt.

III. Stickstoffbestimmung im Phosphorwolframsäureniederschlage.

100 ccm. der Lösung werden in ein Becherglas gebracht, mit der oben angegebenen Bromlauge versetzt, mit einem Uhrglase bedeckt und umgerührt. Nach circa einstündigem Stehen ist die Gasentwicklung vollkommen beendet. Nunmehr bringt man in das Gefäss einen Ueberschuss von Salzsäure, kocht das Brom aus, bis nach vollkommener Austreibung des

Broms die Flüssigkeit ganz farblos erscheint. Hierauf setzt man nach dem Abkühlen einen Ueberschuss an salzsäurehaltiger Phosphorwolframsäure ¹⁾ hinzu, wobei in Anwesenheit fällbarer Substanzen sofort eine milchweisse Fällung auftritt. Nach 24 stündigem Stehen wird der abgeschiedene Niederschlag filtrirt, wobei der noch am Glase haftende Niederschlag mit Hilfe des Filtrates auf das Filter gebracht wird. Hierauf wird der Niederschlag sammt Filter getrocknet und der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt.

IV. Stickstoffbestimmung im Filtrate des Phosphorwolframsäureniederschlags nach Kjeldahl.

Eintheilung der Spaltungsprodukte des Eiweisses mit Bezug auf das vorstehende Verfahren.

I. Die volumetrische Bestimmung ergibt nur den Stickstoff aus Ammoniak und Harnstoff.

II. Nachdem hier nur der Harnstoff bestimmt wird, so lässt sich aus der Differenz von I und II das bei der Differenz eventuell auftretende Ammoniak bestimmen.

III. In dem Phosphorwolframsäureniederschlage können bei dem angegebenen Verfahren, wie ich mich durch einschlägige Versuche überzeugt habe, auftreten: Methylamin, Diamidosäuren und Glycocoll. ²⁾

IV. Im Filtrate des Phosphorwolframsäureniederschlags findet sich bei einzelnen Eiweisskörpern ebenfalls ein Stickstoffgehalt. Welchen Verbindungen dieser Stickstoffgehalt zuzuschreiben ist, ist derzeit noch unentschieden. Man könnte hier beispielsweise an unvollständig ausgefällte Monoamidosäuren denken.

Den Stickstoff dieser Verbindungen werde ich kurzweg Filtrat-Stickstoff nennen.

An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass der auf-

¹⁾ 2—3 g feste Phosphorwolframsäure werden unter Zusatz von Salzsäure gelöst und eventuell filtrirt.

²⁾ Notiz über Glycocoll. Von Adolf Jolles. Zeitschrift für physiologische Chemie. Band XXXI. S. 389.

tretende Harnstoff nicht als Spaltungsprodukt der Hexonbasen (Arginin, Histidin, Lysin etc.) aufzufassen ist, da dieselben beim Kochen mit Permanganat in saurer Lösung unter den von mir angegebenen Bedingungen keinen Harnstoff liefern. Wenn einzelne Forscher aus Hexonbasen, wie Arginin, Lysin und Lysin, durch Sieden mit Barytwasser Harnstoff erhalten haben und diese Erscheinung auf den Organismus derart übertragen, dass sie eine rein hydrolytische Bildung des Harnstoffes aus dem Eiweiss, also ohne Oxydation, annehmen, so erscheint diese Folgerung unzulässig, weil die Hexonbasen in den Eiweisskörpern in relativ geringen Mengen vorhanden sind, und der Stickstoff der Hexonbasen nur zum Theil in Harnstoff umgewandelt wird, z. B. beim Arginin im Maximum die Hälfte.

Ausserdem zeigen die Eigenschaft der Harnstoffbildung durch Barytlauge nur jene Hexonbasen, welche den Harnstoff- oder Guanidinrest bereits enthalten, somit nur ein Theil der Hexonbasen.

Untersuchung des Phosphorwolframsäureniederschlages auf die Anwesenheit von Hexonbasen.

Den Phosphorwolframsäureniederschlag habe ich einer qualitativen Prüfung auf die Anwesenheit von Hexonbasen unterzogen. Bekanntlich hat zuerst Drechsel¹⁾ die Entdeckung gemacht, dass bei der hydrolytischen Spaltung von Eiweisskörpern auch Substanzen von ausgesprochen basischem Charakter auftreten. Als später Kossel²⁾ und Hedin³⁾ die Methodik des Nachweises der drei basischen Spaltungsprodukte: Arginin, Histidin und Lysin — wesentlich exacter gestaltet haben, gelang es, in allen untersuchten Eiweisskörpern diese Substanzen nachzuweisen. In Anbetracht der enormen Zeitinanspruchnahme, welche die Beschaffung eines genügend grossen Ausgangsmateriales beansprucht hätte, habe ich mich damit begnügt, in dem quantitativ gewonnenen Phosphorwolframsäureniederschlage die erwähnten basischen Spaltungsprodukte qualitativ nachzuweisen.

1) Ber. der mathem.-physik. Classe der Kgl. sächs. Gesellschaft der Wissensch. 1892. S. 416.

2) Zeitschrift für physiol. Chemie, Bd. XXI, S. 155.

3) Zeitschrift für physiol. Chemie, Bd. XXV, S. 165.

Der Phosphorwolframsäureniederschlag entspricht dem Stickstoffgehalt an Arginin, Lysin und Histidin und sonstigen durch Phosphorwolframsäure fällbaren Spaltungsprodukten ausser Harnstoff und Ammoniak. Dies gilt nur unter dem Vorbehalte, dass die Fällung mit Phosphorwolframsäure tatsächlich quantitativ erfolgt, was nach den bisherigen Resultaten zu erwarten ist. Im gegentheiligen Falle würde noch ein Theil dieser stickstoffhaltigen Körper im Filtrate sich vorfinden. Eine Identificirung dieser Substanzen kann selbstverständlich nur auf Grund von Versuchen mit sehr bedeutenden Substanzmengen vorgenommen werden.

Experimenteller Theil.

Ich habe für meine Untersuchungen herangezogen: krystallisirtes Eieralbumin, krystallisirtes Serumalbumin, krystallisirtes Serumglobulin (aus Pferdeblut), krystallisirtes Oxyhämoglobin (Pferd), Casein, Fibrin, Antipepton, Vitellin aus Eigelb, Vitellin aus Pflanzen.

Krystallisirtes Eieralbumin.

Darstellung.

Hühnereiweiss wurde zu Schaum geschlagen, 24 Stunden stehen gelassen, filtrirt, mit dem gleichen Volumen gesättigter schwefelsaurer Ammonlösung versetzt, wieder filtrirt, nach Hofmeister ¹⁾ bis zur Ausscheidung von Globuliten-Warzen verdunsten gelassen, dieselben ausgepresst, in einer halbgesättigten Ammonsulfatlösung gelöst und wieder verdunsten gelassen. Der erhaltene Krystallbrei wurde filtrirt, in Wasser gelöst, und das anhaltende Ammoniumsulfat durch Dialyse möglichst entfernt. Aus der so resultirenden Lösung wurde das Eiweiss durch Fällung mit Alkohol und Erhitzen gewonnen, das erhaltene Eiweisspräparat mit Wasser, Alkohol, Aether gewaschen und bei ca. 105° C. getrocknet.

Analytischer Theil.

Von allen Substanzen, die zur oxydativen Spaltung herangezogen wurden, wurde der Stickstoffgehalt nach Kjeld-

¹⁾ Fr. Hofmeister, Zeitschrift f. physiol. Chemie. Bd. XIV, S. 165 und Bd. XVI, S. 187.

dahl in einem besonderen Versuche ermittelt. Auch wurden alle nachstehend verzeichneten Kjeldahl-Bestimmungen zur Kontrolle doppelt ausgeführt.

0,3642 g Substanz lieferten nach Kjeldahl
0,05455 g Stickstoff, entsprechend 14,98% Stickstoff.

Zur Oxydation verwendete Menge 0,5030 g, das Oxydationsprodukt wurde auf 500 ccm. aufgefüllt.

I. Volumetrische Bestimmung.

100 ccm. der Lösung = 0,1006 g Substanz lieferten 10,7 ccm. Stickstoff bei 24°, 748 mm. B = 11,7807 mg Stickstoff = 11,71% Stickstoff.

II. Stickstoffbestimmung im oxalsauren Harnstoff nach Kjeldahl.

200 ccm. der Lösung = 0,2012 g Substanz lieferten 0,0875 g oxalsauren Harnstoff. Die Stickstoffbestimmung ergab 0,0237 g Stickstoff, entsprechend 11,8% Stickstoff.

III. Stickstoffbestimmung im Phosphorwolframsäureniederschlage.

200 ccm. der Lösung wurden nach vorschriftsmässiger Entfernung des Harnstoffes durch Bromlauge und Austreibung des überschüssigen Broms durch Kochen mit Salzsäure mit Phosphorwolframsäurelösung gefällt. Der Niederschlag aus 200 ccm. der Lösung = 0,2012 g Substanz gaben 0,0068 g Stickstoff, entsprechend 3,12% Stickstoff.

IV. Identificirung des Harnstoffes.

Zur genauen Identificirung des durch Oxydation aus dem Eieralbumin gewonnenen Harnstoffes wurden wiederholt geringe Mengen des reinen Präparates nach obigem Verfahren oxydirt, die Niederschläge von oxalsaurem Harnstoff gesammelt und bis zum constanten Gewichte getrocknet. Auch wurde aus dem Oxalate der Harnstoff rein dargestellt und durch den Schmelzpunkt identificirt:

Die Analyse des Oxalates ergab folgende Werthe:

a) 0,2184 g Substanz lieferten 0,1852 g CO₂ u. 0,0964 g H₂O
CON₂H₄)₂C₂O₄H₂. Berechnet: C 22,86% H 4,76%.
Gefunden: C 23,12% H 4,90%.

b) Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl.

0,0875 g Substanz gaben 0,0237 g Stickstoff.

Berechnet: Stickstoff 26,66%; gefunden: Stickstoff 27,08%.

c) In 0,1501 g Substanz wurde die Oxalsäure mit Permanganatlösung titriert. (1 ccm. $\text{KMnO}_4 = 0,002257 \text{ g C}_2\text{H}_2\text{O}_4$). Verbrauchte wurden 28,6 ccm. KMnO_4 Lösung = 0,0645 g $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$.

Berechnet: $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$ 42,86%; gefunden: 42,97%.

Prüfung des Phosphorwolframsäureniederschlags auf Hexonbasen.

Es wurden in allen Fällen geringe Mengen der in Untersuchung gezogenen Substanzen oxydirt, der Harnstoff durch Schütteln mit Bromlauge vollkommen entfernt, das überschüssige Brom durch Kochen mit Salzsäure ausgetrieben, die durch Phosphorwolframsäure hervorgerufenen Niederschläge gesammelt, ausgewaschen und getrocknet.

Der auf diese Weise gewonnene Phosphorwolframsäureniederschlag des Eieralbumins wurde mit Aetzbaryt gekocht, Kohlensäure eingeleitet, heiss filtrirt und mit Quecksilberchlorid im Ueberschuss bis zur sauren Reaction versetzt. Es resultirte ein geringer Niederschlag. Derselbe wurde im Wasser suspendirt, Schwefelwasserstoff eingeleitet, filtrirt und eingedampft. In den in geringer Menge gewonnenen Krystallen von Histidinchlorid wurde eine Chloridbestimmung ausgeführt.

0,068 g Substanz, über Schwefelsäure getrocknet,
gaben 0,0471 g AgCl .

Berechnet für:
 $\text{C}_7\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2\text{HCl} + \text{H}_2\text{O}$
Cl 16,90%

Gefunden:
17,9%.

Die Versuche, nach Kossel und Hedin Arginin als Silberdoppelsalz zu fällen, blieben resultatlos. Es wurde daher von Neuem mit Phosphorwolframsäure gefällt, gekocht, der Baryt mit Schwefelsäure abgeschieden, die jetzt freie Basenlösung stark eingeengt und alkoholische Pikrinsäurelösung zugesetzt. Nach einigem Stehen fallen feine Krystallnadeln aus, die später derberen Charakter annehmen. Die Krystalle wurden nach mehreren Tagen mit heissem Wasser umkrystallisirt. Hierauf wurden die Krystalle mit verdünnter

Salzsäure und Aether geschüttelt, es bildet sich das Chlorhydrat der Basen. Die wässrige Lösung wurde abgedampft, mit Methylalkohol aufgenommen, filtrirt, wieder aufgenommen, stark eingengt und mit concentrirter Platinchloridlösung und Alkohol versetzt. Nur Lysin fällt als Platinat. Es resultirten rothgelbe Prismen, welche mit einem als Vergleichsobject benutzten Lysinplatinchloridpräparate nahezu gleichen Schmelzpunkt zeigten. Die Krystalle wurden bei ca. 120° getrocknet und der Platiningehalt bestimmt.

Filter sammt Glas ohne Niederschlag:	25,6241 g
mit	25,6885 "
	0,0644 g

Tiegel ohne:	11,2405 g
mit:	11,2632 "
	0,0227 g

Berechnet für:	Gefunden:
$C_6H_{14}N_2O_2 \cdot 2HCl \cdot PtCl_4$	
Pt 35,05 %	35,25 %

Die Prüfung des Phosphorwolframsäureniederschlages mit Millon'schem Reagens ergibt ein negatives Resultat, was für die Abwesenheit der tyrosinbildenden Gruppe spricht.

Krystallisirtes Serumglobulin (aus Pferdeblut).

Das Blutserum wurde nach der Vorschrift von Reye¹⁾ von Fibrinogen getrennt und zwar wurden im Sinne des Vorschlages von Hausmann²⁾ auf 2 Vol. Serum 5 Vol. Wasser und 3 Vol. gesättigte Ammonsulfatlösung verwendet. Nach Versetzen des Filtrates mit einer nahezu halbgesättigten Ammonsulfatlösung fällt das Globulin aus. Dasselbe wurde in Wasser gelöst, neuerdings mit Ammonsulfat gefällt, hierauf nach Hofmeister bis zur Abscheidung von Globuliten verdunsten gelassen und die weiteren Operationen so durchgeführt, wie ich dieselben beim krystallisirten Eieralbumin angegeben habe.

¹⁾ W. Reye. Ueber Nachweis und Bestimmung des Fibrinogens. Dissertation, Strassburg, 1898.

²⁾ Zeitschr. f. phys. Chemie, Bd. XXVII, S. 102.

Analytischer Theil.

0,2648 Substanz lieferten nach Kjeldahl 0,0422 g Stickstoff, entsprechend 15,94%.

Zur Oxydation verwendete Menge 0,5028 g, das Oxydationsprodukt wurde auf 500 cem. aufgefüllt.

I. Volumetrische Stickstoffbestimmung.

50 cem. der Lösung = 0,05028 g Substanz lieferten 5,40 cem. Stickstoff bei 20° C. und 748 mm. B = 6,0637 mg Stickstoff = 12,06% Stickstoff.

II. Stickstoffbestimmung im oxalsauren Harnstoff nach Kjeldahl.

200 cem. der Lösung = 0,20112 g Substanz lieferten 0,0899 g oxalsauren Harnstoff. Die Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl ergab 0,02413 g Stickstoff, entsprechend 12,00% Stickstoff.

III. Stickstoffbestimmung im Phosphorwolframsäureniederschlage.

Der Niederschlag aus 200 cem. der Lösung = 0,20112 g Substanz lieferte 0,00790 g Stickstoff, entsprechend 3,93% Stickstoff.

IV. Identificirung des durch Oxydation aus dem Serumglobulin gewonnenen Harnstoffes.

Zu diesem Zwecke wurden wiederholt Mengen von ca. 0,5 g Serumglobulin oxydirt, die Niederschläge von oxalsaurem Harnstoff gesammelt und einer Analyse unterzogen.

a) 0,1982 g Substanz lieferten 0,1679 g CO₂ und 0,0877 g H₂O
(COX₂H₄)₂ · C₂O₄H₂. Berechnet C 22,86%, H 4,76%
Gefunden C 23,10%, H 4,91%.

b) Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl.

0,0899 g Substanz lieferten 0,02413 g Stickstoff.

Berechnet Stickstoff 26,66%; gefunden 26,84%.

Prüfung des Phosphorwolframsäureniederschlages auf Hexonbasen.

Nach dem bereits beim Eieralbumin beschriebenen Verfahren konnte in dem in grösseren Mengen gesammelten Phosphorwolframsäureniederschlage Arginin, Histidin und Lysin qualitativ nachgewiesen werden. Bezüglich der Identificirung

des Arginins habe ich das in Form des Nitrats erhaltene Arginin, welches sich nach dem Ergebnisse der Analyse als unrein erwiesen hat, in einer zweiten Probe in das Arginin-kupfernitrat übergeführt. Die Krystalle schmelzen bei ca. 114°; der Schmelzpunkt eines reinen Argininkupfernitrats liegt nach Schulze bei 112 bis 113°. Die Kupferbestimmung des über Chlorcalcium getrockneten Salzes ergab folgende Zahlen:

Filter sammt Glas ohne Niederschlag:	25,6084 g	
" " " mit " "	25,6865 "	
		0,0781 g
Tiegel ohne:	11,30680 g	
" mit:	11,31751 "	
		0,01071 g CuO.
Berechnet für		Gefunden:
$(C_6H_{14}N_4O_2)_2 Cu(NO_3)_2 + 3H_2O$		
Cu 10,77		11,04%

Krystallisirtes Serumalbumin.

Dargestellt aus Pferdeblutserum nach Gürber.¹⁾

Die erhaltenen Krystalle wurden in Wasser gelöst, durch Dialyse von anhaftendem Ammonsulfat möglichst befreit und aus der erhaltenen Lösung das Serumalbumin durch Alkohol und Kochen gefällt, mit Wasser, Alkohol und Aether gewaschen und bei ca. 105° C. getrocknet.

Analytischer Theil.

0,2546 g Substanz lieferten nach Kjeldahl 0,04084 g Stickstoff, entsprechend 16,04% Stickstoff.

Zur Oxydation verwendete Menge 0,5108 g, das Oxydationsprodukt wurde auf 500 ccm. aufgefüllt.

I. Volumetrische Stickstoffbestimmung.

50 ccm. der Lösung = 0,05108 g Substanz lieferten 5,84 ccm. N bei 18° C. und 750 mm. B = 6,645 mg N = 13,01% N.

¹⁾ Siehe: Zur Kenntniss der Gürber'schen Serumalbuminkrystalle. von Dr. A. Michel, nebst einem Nachtrag von Dr. A. Gürber. Verlag der Stahel'schen Hof- und Universitäts-Buchhandlung. Würzburg, 1895. Ferner: Hans Krieger, Ueber die Darstellung krystallinischer Eiweissstoffe. Dissertation, 1899.

II. Stickstoffbestimmung im oxalsauren Harnstoff nach Kjeldahl.

200 cem. der Lösung = 0,20432 g Substanz lieferten 0,0556 g oxalsauren Harnstoff. Die Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl ergab 0,0265 g N, entsprechend 12,97% N.

III. Stickstoffbestimmung im Phosphorwolframsäureniederschlag.

Der Niederschlag aus 200 cem. der Lösung = 0,20432 g Substanz lieferte 0,00649 g N = 3,18% N.

IV. Identificirung des durch Oxydation aus dem Serumalbumin gewonnenen Harnstoffes.

Geringe Mengen von Serumalbumin wurden wiederholt in oxalsauren Harnstoff übergeführt, die Niederschläge gesammelt, im Exsiccator bis zum constanten Gewichte getrocknet und ein aliquoter Theil der Verbrennungsanalyse unterworfen.

0,2016 g gaben 0,1716 g CO₂ und 0,0896 g H₂O.

Berechnet für (CON₂H₄)₂C₂O₄H₂:

C 22,86%

H 4,76%

Gefunden:

23,23%

4,95%

Prüfung des Phosphorwolframsäureniederschlages auf Hexonbasen.

Nach dem bereits beim Eieralbumin ausführlich beschriebenen Verfahren konnte Histidin in Form von Histidinchlorid-Krystallen abgeschieden werden.

0,071 g Substanz, über Schwefelsäure getrocknet, gaben 0,0490 AgCl.

Berechnet für C₆H₉N₃O₂HCl + H₂O:

Cl 16,90%

Gefunden:

17,7%

Arginin konnte als Silberdoppelsalz nur in vereinzelt Krystallen erhalten werden, so dass eine nähere Identificirung nicht möglich war. Lysin wurde als Platinat gefällt. Die Krystalle wurden bei ca. 120° C. getrocknet und der Platingehalt bestimmt.

Filter sammt Glas ohne Niederschlag: 26,0849

• • • mit • • • : 26,1447

0,0598

Tiegel ohne: 11,1862

• mit: 11,2075

0,0213

Berechnet für
 $C_6H_{14}N_2O_2 \cdot 2HCl, PtCl_4$
 Pt 35,05%

Gefunden:
 35,74%

Krystallisirtes Oxyhämoglobin (vom Pferde).

Dargestellt nach Hoppe-Seyler. (Bezogen von Grübler.)

Analytischer Theil.

0,1423 g Substanz lieferten nach Kjeldahl 0,02406 g N, entsprechend 16,91%.

Zur Oxydation verwendete Menge 0,4911 g, das Oxydationsprodukt wurde auf 500 ccm. aufgefüllt.

I. Volumetrische Stickstoffbestimmung.

50 ccm. der Lösung = 0,04911 g Substanz lieferten 6,60 ccm. N bei 18° und 758 mm. B = 7,582 mg N = 15,44% N.

II. Stickstoffbestimmung im oxalsauren Harnstoff nach Kjeldahl.

200 ccm. der Lösung = 0,19644 g Substanz lieferten 0,0532 g oxalsauren Harnstoff. Die Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl ergab 0,03031 g N, entsprechend 15,43% N.

III. Stickstoffbestimmung im Phosphorwolframsäureniederschlag.

Der Niederschlag aus 200 ccm. der Lösung = 0,19644 g Substanz lieferte 0,00295 g N = 1,5% N.

IV. Identificirung des durch Oxydation aus dem Oxyhämoglobin gewonnenen Harnstoffes.

0,1784 g gaben 0,1511 g CO_2 und 0,0787 g H_2O .

Berechnet für $(CON_2H_4)_2C_2O_4H_2$

C 22,86%

H 4,76%

Gefunden:

23,11%

4,90%

Prüfung des Phosphorwolframsäureniederschlages auf Hexonbasen.

Wegen Mangels an Ausgangsmaterial musste ich vorläufig von der Untersuchung des Phosphorwolframsäureniederschlages auf Hexonbasen Abstand nehmen.

Casein (Merck).

Bereitet nach Hammarsten.¹⁾

Analytischer Theil.

0,2863 g Substanz lieferten nach Kjeldahl 0,0438 g N, entsprechend 15,3% N.

Zur Oxydation verwendete Menge 0,4866 g, das Oxydationsprodukt wurde auf 500 cem. aufgefüllt.

I. Volumetrische Stickstoffbestimmung.

50 cem. der Lösung = 0,04866 g Substanz lieferten 4,74 cem. N bei 18° C. und 758 mm. B = 5,4499 mg N = 11,20% N.

II. Stickstoffbestimmung im oxalsauren Harnstoff nach Kjeldahl.

250 cem. der Lösung = 0,2433 g Substanz lieferten 0,1006 g oxalsauren Harnstoff. Die Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl ergab 0,0270 g N, entsprechend 11,12% N.

III. Stickstoffbestimmung im Phosphorwolframsäureniederschlag.

Der Niederschlag aus 200 cem. der Lösung = 0,19464 g Substanz lieferte 0,0061 g N, entsprechend 3,12% N.

IV. Identificirung des durch Oxydation aus dem Casein gewonnenen Harnstoffes.

Die Analyse des aus einer Reihe von Versuchen gewonnenen Oxalates ergab folgende Werthe:

a) 0,2284 g Substanz lieferten 0,1938 g CO₂ und 0,1009 g H₂O.

CON₂H₄)₂ · C₂O₄H₂. Berechnet C 22,86%, H 4,76%

 Gefunden C 23,13%, H 4,90%

b) Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl.

0,1006 g Substanz lieferten 0,0270 g N.

 Berechnet N 26,66%; gefunden 26,83%.

c) In 0,2016 g Substanz wurde die Oxalsäure mit Permanganat titrirt (1 cem. KMnO₄ = 0,002257 g C₂H₂O₄);

¹⁾ O. Hammarsten, Verhandlungen der kgl. schwedischen Akademie der Wissenschaften. Upsala, 1877.

verbraucht wurden 38,74 ccm. KMnO_4 -Lösung = 0,0874 g $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$.

Berechnet $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$ 42,86 %: gefunden 43,35 %.

Prüfung des Phosphorwolframsäureniederschlages auf Hexonbasen.

Zur Identificirung der Hexonbasen wurde der Phosphorwolframsäureniederschlag in gleicher Weise behandelt, wie es bei dem Eieralbumin eingehend angegeben wurde. Auch hier konnte Histidin und Lysin nachgewiesen werden. Was den Nachweis des Arginins betrifft, so wurde das Filtrat vom Quecksilberchloridniederschlage zunächst vom Quecksilber und von der Salzsäure befreit und hierauf behufs Ausfällung des Arginins Silbernitrat und Barytwasser hinzugefügt. Es resultirte ein minimaler Niederschlag: derselbe wurde durch Schwefelwasserstoff zerlegt, das Filtrat mit Salpetersäure neutralisirt und vorsichtig eingedampft. Nach einigem Stehen fielen einzelne feine Nadeln aus, die unter dem Mikroskope die gleiche Krystallisation erkennen liessen, wie ein zum Vergleiche herangezogenes reines Argininnitrat. Weitere Identificirungen habe ich in Anbetracht der enormen Zeitinanspruchnahme, welche die Gewinnung eines genügend grossen Phosphorwolframsäureniederschlages beansprucht haben würde, nicht gemacht, so dass der exacte Nachweis des Arginins in dieser Fraction noch aussteht. Jedenfalls ist durch die Versuche die Anwesenheit von Hexonbasen im Phosphorwolframsäureniederschlage des Caseins nach der Oxydation constatirt worden.

Mit Millon'schem Reagens gab der Phosphorwolframsäureniederschlag keine Reaction.

Fibrin.

Frisches Ochsenblut wurde mit Reisigbündel geschlagen, die Masse längere Zeit mit Wasser gewaschen, bis sie beinahe weiss ist, sodann mit einer 5%igen Kochsalzlösung und dann wieder mit Wasser so lange gewaschen, bis sie absolut frei von Kochsalz war. Hierauf wurde das Produkt mit Alkohol und dann mit Aether extrahirt.

Analytischer Theil.

0,2491 g Substanz lieferten nach Kjeldahl 0,04085 g N, entsprechend 16,64% N.

Zur Oxydation verwendete Menge 0,6028 g, das Oxydationsprodukt wurde auf 500 ccm. aufgefüllt.

I. Volumetrische Bestimmung.

50 ccm. der Lösung = 0,06028 g Substanz lieferten 3,95 ccm. N bei 18° C. und 758 mm. B = 4,533 mg N = 7,52% N.

II. Stickstoffbestimmung im oxalsauren Harnstoff nach Kjeldahl.

200 ccm. der Lösung = 0,24112 g Substanz lieferten 0,0679 g oxalsauren Harnstoff. Die Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl ergab 0,01823 g N, entsprechend 7,56% N.

III. Stickstoffbestimmung im Phosphorwolframsäureniederschlag.

Der Niederschlag aus 200 ccm. der Lösung = 0,24112 g Substanz lieferte 0,0986 g N, entsprechend 4,09% N.

IV. Stickstoffbestimmung im Filtrate des Phosphorwolframsäureniederschlages.

Das Filtrat aus 200 ccm. der Lösung = 0,24112 g Substanz lieferte 0,1178 g N, entsprechend 4,87% N.

V. Identificirung des durch Oxydation aus dem Fibrin gewonnenen Harnstoffes.

Die Analyse des aus einer grossen Reihe von Oxydationsversuchen gewonnenen Oxalates ergab folgende Werthe:

0,2604 g Substanz lieferten 0,2214 g CO₂ und 0,1108 g H₂O.

CO₂H₄ · C₂O₄H₂. Berechnet C 22,86%, H 4,76%

Gefunden C 23,20%, H 4,72%

Prüfung des Phosphorwolframsäureniederschlages auf Hexonbasen.

Der aus zahlreichen Oxydationsversuchen gesammelte Niederschlag wurde mit 5%iger Schwefelsäure ausgewaschen, bis das Filtrat nur Spuren von Salzsäure enthielt. Hierauf wurde der Niederschlag mit reiner Kalkmilch unter Zusatz von etwas Barytwasser zerlegt, Kohlensäure eingeleitet, filtrirt, das

Filtrat mit Schwefelsäure neutralisirt, und das Arginin nach der Methode von Hedin (Zeitschrift für physiol. Chemie, Bd. XXI, S. 166—168) mit Silbernitrat gefällt. Es resultirte ein geringer Niederschlag von 0,074 g basischem Argininsilbernitrat ($C_6H_{11}N_4O_2 \cdot AgNO_3 + \frac{1}{2}H_2O$).

Die quantitative Silberbestimmung ergab 0,0290 g Ag.

Berechnet 30,59 %; gefunden 30,94 %.

Zum Nachweise von Histidin und Lysin wurde eine frische Probe des Phosphorwolframsäureniederschlages mit 5%iger Schwefelsäure ausgewaschen, mit Barythydrat zerlegt, Kohlensäure eingeleitet, filtrirt und das Filtrat mit Quecksilberchloridlösung versetzt. Nach mehrtägigem Stehen wurde der geringe Niederschlag filtrirt, ausgewaschen, in Wasser vertheilt und durch Schwefelwasserstoff zerlegt. Das Filtrat vom Schwefelquecksilber wurde auf dem Wasserbade stark eingeengt und längere Zeit stehen gelassen. Es schieden sich Krystalle von Histidin ab, jedoch reichte die Menge nur zu einer Chlorbestimmung aus.

0,052 g Substanz, über Schwefelsäure gefrocknet, gab 0,036 g AgCl.

Berechnet für



Cl 16,90 %

Gefunden:

17,16 %.

Das Filtrat vom Quecksilberchloridniederschlage wurde zunächst durch Einleiten von Schwefelwasserstoff vom Quecksilber und durch Silbernitrat von der Salzsäure befreit, und das Arginin nach Kossel durch Ausfällen mit Silberlösung und Barytwasser entfernt. Der durch diese Reagentien hervorgerufene geringe Niederschlag wurde abfiltrirt und das Filtrat mit Phosphorwolframsäure versetzt. Nach Zerlegung des Phosphorwolframsäureniederschlages durch Baryt und Entfernung des Baryts durch Kohlensäure, wurde das Filtrat auf dem Wasserbade stark eingeengt und hierauf mit alkoholischer Pikrinsäurelösung versetzt. Nach mehrstündigem Stehen fielen feine gelbe Nadeln von Lysinpikrat aus. Dieselben wurden nach Kossel's Vorschrift durch Schütteln mit wässriger Salzsäure und Aether in das Chlorhydrat übergeführt. Die wässrige

Lösung wurde eingedunstet, der Verdampfungsrückstand mit Methylalkohol behandelt, filtrirt, wieder abgedampft, der Rückstand in wenig Wasser gelöst, und die Flüssigkeit mit einer concentrirten Platinchloridlösung versetzt. Nach mehrtägigem Stehen fielen gelbrothe Prismen aus. Die Krystalle wurden bei ca. 120° C. getrocknet und eine quantitative Platinbestimmung durchgeführt.

0,0481 g Substanz gaben 0,0170 g Pt.

Berechnet für	Gefunden
$C_6H_{14}N_2O_2, 2HCl, PtCl_4$	
Pt 35,05%	35,45%

Vitellin aus Eigelb.

Dieses Albumin wurde aus Eigelb von Hühnereiern in der Weise dargestellt, dass der Eidotter zunächst mit Alkohol und Aether und hierauf mit Wasser extrahirt wurde. Der Rückstand stellt das Vitellin aus Eigelb dar.

Analytischer Theil.

0,2602 g Substanz lieferten nach Kjeldahl 0,03981 g N, entsprechend 15,30% N.

Zur Oxydation verwendete Menge 0,5864 g, das Oxydationsprodukt wurde auf 500 cem. aufgefüllt.

I. Volumetrische Bestimmung.

50 cem. der Lösung = 0,05864 g Substanz lieferten 6,15 cem. N bei 18° C. und 756 mm. B = 7,06 mg N = 12,04% N.

II. Stickstoffbestimmung im oxalsauren Harnstoff nach Kjeldahl.

200 cem. der Lösung = 0,23456 g Substanz lieferten 0,10498 g oxalsauren Harnstoff. Die Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl ergab 0,02805 g N, entsprechend 11,96% N.

III. Stickstoffbestimmung im Phosphorwolframsäureniederschlage.

Der Niederschlag aus 200 cem. der Lösung = 0,23456 g Substanz lieferte 0,00753 g N, entsprechend 3,21% N.

IV. Identificirung des durch Oxydation aus dem Vitellin gewonnenen Harnstoffes.

Die Analyse des aus einer grösseren Anzahl von Oxydationsversuchen gewonnenen Oxalates ergab folgende Resultate:

0,2369 g Substanz lieferten 0,2009 g CO_2 und 0,1056 g H_2O .
(CON_2H_4)₂ · $\text{C}_2\text{O}_4\text{H}_2$. Berechnet C 22,86 %, H 4,76 %
Gefunden C 23,27 %, H 4,95 %.

Prüfung des Phosphorwolframsäureniederschleges auf Hexonbasen.

Nach dem beim krystallisirten Eieralbumin beschriebenen Verfahren gelang es, im Phosphorwolframsäureniederschlage Histidin in Form von Histidinchloridkrystallen und Lysin als Lysinplatinchlorid abzuscheiden. Hingegen blieben die Versuche, Arginin nachzuweisen, resultatlos. Ich behalte mir vor, an einem grösseren Ausgangsmaterial die Versuche zu wiederholen und später darüber zu berichten.

Vitellin aus Pflanzen.

(Bezogen von Grübler.)

0,2008 g Substanz lieferten nach Kjeldahl 0,0355 g N, entsprechend 17,68 % N.

Zur Oxydation verwendete Menge 0,6142 g Substanz, das Oxydationsprodukt wurde auf 500 cem. aufgefüllt.

I. Volumetrische Bestimmung.

50 cem. der Lösung = 0,06142 g Substanz lieferten 4,46 cem. N bei 20° C. und 749 mm. B = 5,024 mg N = 8,18 % N.

II. Stickstoffbestimmung im oxalsauren Harnstoff nach Kjeldahl.

200 cem. der Lösung = 0,24568 g Substanz lieferten 0,0670 g oxalsauren Harnstoff. Die Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl ergab 0,02938 g N, entsprechend 11,96 % N.

III. Stickstoffbestimmung im Phosphorwolframsäureniederschlage.

Der Niederschlag aus 200 cem. der Lösung = 0,24568 g Substanz lieferte 0,00793 g N, entsprechend 3,23 % N.

IV. Stickstoffbestimmung im Filtrate des Phosphorwolframsäureniederschlages.

Das Filtrat aus 200 ccm. der Lösung = 0,24568 g Substanz lieferte 0,01521 g N, entsprechend 6,19 % N.

V. Identificirung des durch Oxydation aus dem Vitellin aus Pflanzen gewonnenen Harnstoffes.

0,2514 g Substanz lieferten 0,2110 g CO_2 und 0,2110 g H_2O .
 $\text{CON}_2\text{H}_4 \cdot \text{C}_2\text{O}_4\text{H}_2$. Berechnet C 22,86 %, H 4,76 %
Gefunden C 23,27 %, H 4,94 %.

Prüfung des Phosphorwolframsäureniederschlages auf Hexonbasen.

Es gelang, nach dem beim Fibrin ausführlich beschriebenen Verfahren Arginin als basisches Argininsilbernitrat, Histidin in Form von Histidinkristallen und Lysin als Lysinplatinchlorid abzuscheiden. Ich habe speciell beim Vitellin, welches mir in genügender Quantität zur Verfügung stand, das Auftreten der Hexonbasen nicht nur qualitativ, sondern auch quantitativ verfolgt und behalte mir vor, über diese Ergebnisse an anderer Stelle zu berichten.

Folgerungen aus den Resultaten.

Aus der tabellarischen Zusammenstellung der analytischen Daten ergibt sich die Eintheilung der bis jetzt beobachteten Eiweisskörper in drei Typen:

I. Oxyhämoglobin.

Harnstoff-N über 90 % des Gesamtstickstoffes, der Rest im Phosphorwolframsäureniederschlage.

II. Eieralbumin, Serumalbumin, Serumglobulin, Casein, Vitellin aus Eigelb.

Harnstoff-N 70 bis 81 %, der Rest im Phosphorwolframsäureniederschlage.

III. Fibrin, Vitellin aus Pflanzen.

Harnstoff-N 40 bis 50 %, Filtratstickstoff ca. 30 %, der Rest im Phosphorwolframsäureniederschlage.

Mit Ausnahme der ersten Gruppe schwankt der Stickstoff im Phosphorwolframsäureniederschlage zwischen 18 bis 30 %.

Aus diesen Zahlen ergeben sich erhebliche Unterschiede in der Zusammensetzung der Eiweisskörper. Die nächste Auf-

Tabellarische Zusammenstellung der analytischen Daten.

	Gesamtstickstoff	Volumetrischer Stickstoff	Harnstoffstickstoff	Stickstoff im Phosphorwolframsäurefällung	Filtratstickstoff	In Procenten des Gesamtstickstoffes			
						Volumetrischer Stickstoff	Harnstoffstickstoff	Phosphorwolframsäurestickstoff	Filtratstickstoff
Krystallisiertes Eieralbumin	14,98	11,86	11,80	3,12	—	79,17	78,77	20,82	—
Krystallisiertes Serumglobulin	15,94	12,06	12,00	3,93	—	75,65	75,28	24,65	—
Krystallisiertes Serumalbumin	16,04	13,01	12,97	3,18	—	81,10	80,86	19,82	—
Oxyhämoglobin	16,91	15,44	15,43	1,50	—	91,30	91,24	8,87	—
Cäsein	15,30	11,20	11,12	3,90	—	73,20	72,67	25,49	—
Fibrin	16,64	7,52	7,56	4,09	4,87	65,19	65,43	24,57	24,62
Vitellin aus Eigelb	15,30	12,04	11,96	3,21	—	78,69	78,16	20,98	—
Vitellin aus Pflanzen	17,68	8,18	8,22	3,23	6,19	66,26	66,44	18,32	35,04

gabe ist nun die, durch Vervollständigung obiger Daten festzustellen, ob das Eintheilungsprinzip noch einer Modification bedarf, und inwieweit diese chemische Eintheilung mit den sonstigen chemischen und physiologischen Eigenschaften der Eiweisskörper in Beziehung zu bringen ist. Die geringe Differenz zwischen dem volumetrisch entwickelten Stickstoff (Harnstoff, Ammoniak) und dem nach der Oxalsäurefällung erhaltenen Stickstoff (nur Harnstoff) lässt ersehen, dass Ammoniak unter den eingehaltenen Oxydationsbedingungen nur spurenweise erhalten wird. Hiermit soll keineswegs behauptet werden, dass die Harnstoff bildenden Gruppen nicht bei anderer Behandlung (Kochen mit Säuren oder Basen) ebenso quantitativ in Ammoniak übergeführt werden. Vor der Hand sei nur auf die nahe Uebereinstimmung des Harnstoffstickstoffes nach meinem Verfahren und der Summe des Amid- und Monaminostickstoffes nach Hausmann (Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXVII, S. 104) hingewiesen.

In allen Fällen konnte die Anwesenheit von Hexonbasen im Phosphorwolframsäureniederschlag constatirt werden. Hingegen ergab die Prüfung auf Tyrosin ein negatives Resultat.

Die Ueberführung der Eiweisskörper in Harnstoff.

Es ist in der beschriebenen Versuchsanordnung ein Weg gefunden, von den Eiweisskörpern zu demselben Endprodukte zu gelangen, welches als Endglied der Umsetzungen im Organismus resultirt, zum Harnstoff. Hiermit soll durchaus nicht behauptet werden, dass in beiden Fällen die Zwischenstadien des Processes die nämlichen sind, wenn auch hier wie dort die Harnstoffbildung der Abschluss der Eiweisspaltung ist. Im Organismus können wir uns die Entstehung des Harnstoffes erklären, indem wir annehmen, dass er durch hydrolytische Spaltung aus ureidartigen Körpern gebildet wird, die ihrerseits bei der Oxydation des Eiweisses entstehen, oder wir können diese beiden Prozesse (Oxydation und Hydrolyse) uns gleichzeitig verlaufend vorstellen. Schliesslich ist noch eine Erklärung zulässig, die zunächst eine Oxydation des Eiweisses zu Kohlensäure und Ammoniak annimmt, aus denen synthetisch Harnstoff entsteht. Zum Mindesten erscheint der letztgenannte

Weg bei der Oxydation mit Permanganat äusserst unwahrscheinlich, während über die grössere Möglichkeit eines der anderen Wege keine Entscheidung getroffen werden kann.

Die Ueberführbarkeit eines grossen Theiles des Stickstoffes in Harnstoff, während der Rest in Form von Verbindungen auftritt, welche durch Phosphorwolframsäure fällbar sind, ist eine Eigenschaft, welche sämtliche Eiweissstoffe charakterisirt. Inwieweit die übrigen am Stoffwechsel beteiligten Produkte ein analoges Verhalten zeigen, bedarf noch der Untersuchung: vielleicht ist nach dieser Richtung hin eine Abgrenzung des Begriffes *Proteinkörper* möglich.

An dieser Stelle möge darauf hingewiesen werden, dass abgesehen von den früheren weniger beweiskräftigen Arbeiten zuerst von Hofmeister ¹⁾ in sicherer Weise das Auftreten von Harnstoff bei der Oxydation verschiedener stickstoffhaltiger und stickstofffreier Substanzen in ammoniakalischer Lösung durch Kaliumpermanganat beobachtet worden ist. Mit dieser an sich wichtigen Thatsache stehen die von mir erhaltenen Resultate in keinem Zusammenhange:

Erstens ist die Harnstoffbildung bei den Hofmeister'schen Versuchen, besonders bei den stickstofffreien Substanzen sicher durch die gleichzeitige Anwesenheit des Ammoniaks bedingt, und somit der Harnstoff nicht im strengen Sinne als ein Spaltungsprodukt der untersuchten Körper aufzufassen, sondern er entsteht durch die Reaction des Ammoniaks auf die leider nicht leicht fassbaren Spaltungsprodukte der von Hofmeister in Untersuchung gezogenen Substanzen.

Zweitens ist die Menge des Harnstoffes nach Hofmeister in keinem Falle auch nur annähernd so gross, dass man von einer quantitativen Reaction sprechen kann. Es kann natürlich nicht entschieden werden, inwieweit die Reaction im Organismus vollständiger verläuft, als bei den Hofmeister'schen Reactionen. Jedenfalls sprechen die quantitativen Verhältnisse dagegen, die Oxydation in alkalischer Lösung als einen glatt verlaufenden Process zu betrachten.

¹⁾ Ueber Bildung des Harnstoffes durch Oxydation. Von Franz Hofmeister. Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie Bd. XXXVII, S. 426.

Drittens vermögen die Versuche von Hofmeister, so interessant sie auch bezüglich der synthetischen Bildung des Harnstoffes sind, keineswegs klarzustellen, woher der Stickstoff des Harnstoffes stammt, und welches die Bedingungen der Ueberführbarkeit des Stickstoffs in Harnstoff sind. Dieses vorwiegend analytische Problem lässt sich bei den Hofmeister'schen Versuchen, eben in Folge des Ammoniaküberschusses nicht lösen, während auf dem von mir eingeschlagenen Wege in Folge der Abwesenheit anderer stickstoffhaltiger Substanzen und der hierdurch erleichterten quantitativen Durchführung der Versuche der Uebergang des Stickstoffes der Eiweisskörper in Harnstoff quantitativ verfolgt werden konnte.

Ueber die Eiweissoxydation im Organismus.

Die Spaltung der im Organismus vorkommenden organischen Substanzen kann nach zwei Richtungen erfolgen. Erstens, die hydrolytische Spaltung, welche, da ja Wasser überall in genügender Menge zur Verfügung steht, im Wesentlichen von der Anwesenheit von Fermenten oder katalytisch wirkenden Substanzen abhängt. Zweitens, die oxydative Spaltung, welche von der Sauerstoffzufuhr bedingt ist. Durch hydrolytische Spaltung allein lässt sich der Zerfall der Eiweisskörper bis zum Harnstoff nicht erklären, da aus der Zusammensetzung der Eiweisskörper folgt, dass bei der Abspaltung des Stickstoffes in Form des Harnstoffes der übrig bleibende Rest sehr sauerstoffarm ist — auf 1 Atom Sauerstoff ca. 5 Atome Kohlenstoff. — Thatsächlich wird aber der grösste Theil des Kohlenstoffes des Eiweisses aus dem Organismus in Form von Kohlensäure ausgeschieden, so dass hieraus hervorgeht, dass wir mindestens in einem Stadium des Processes eine Oxydation annehmen müssen. Diese Anschauung ist übrigens vollständig evident, wenn man die Gesamtbilanz des Stoffwechsels, speciell hinsichtlich der Athmung, zieht und überdies berücksichtigt, dass man bei ausschliesslicher Eiweisskost gleichzeitig Harnstoff und Kohlensäure ausscheidet. Andererseits ist zu erwägen, dass im Eiweiss fast keine freien Amidogruppen vorhanden sind. Die Amidogruppen des Harnstoffes lassen sich nur dadurch erklären, dass durch eine hydrolytische

Spaltung Wasserstoffatome an den Stickstoff getreten sind. Auf Grund dieser Erwägung muss für den Zerfall der Eiweisskörper im Organismus sowohl eine hydrolytische, als eine oxydative Spaltung angenommen werden. — Ueber die Reihenfolge dieser Vorgänge lassen sich keine bestimmten Aussagen machen; es ist nicht unwahrscheinlich, dass in den ersten Stadien des Processes die hydrolytische Spaltung eine wesentliche Rolle spielt, da die Eiweisskörper im Allgemeinen nach dieser Richtung hin zerlegbar sind. Bezüglich der Oxydation der Eiweisskörper im Organismus lassen sich aus der Betrachtung der Stoffwechselprodukte einige Schlüsse ziehen. Wir wissen, dass bei ausschliesslicher Eiweissnahrung der überwiegende Theil des zugeführten Stickstoffes durch die Nieren als Harnstoff, der Haupttheil des Kohlenstoffes als Kohlensäure durch die Lungen ausgeschieden werden. Wir sehen also im Wesentlichen als Endprodukte der Oxydation Kohlensäure und Harnstoff, von welchem letzterem bei der Spaltung mit Permanganat ebenfalls sehr beträchtliche Mengen erhalten werden. Wenn im Organismus die Oxydation in Folge von pathologischen Veränderungen abnormal verläuft, oder wenn die zugeführte Sauerstoffmenge zur Oxydation der gesammten zugeführten Nahrung nicht ausreicht, so werden anstatt dieser Endprodukte Zwischenprodukte der Oxydation in relativ beträchtlicher Menge ausgeschieden, unter welchen z. B. zu nennen sind: Harnsäure, Xanthinbasen, Fettsäuren etc.

Ueber die Stickstoffbindung der Eiweisskörper.

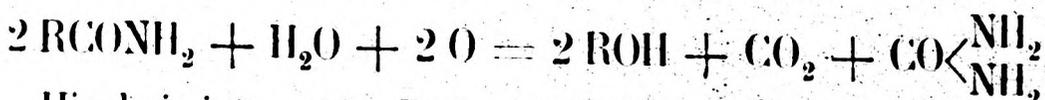
Ausgehend von Versuchen in der Harnsäurereihe, die das Ergebniss geliefert haben, dass bei entsprechender Oxydation gewisser stickstoffhaltiger Körper der ganze Stickstoff oder ein von der Constitution abhängiger Bruchtheil desselben in Harnstoff übergeht, habe ich versucht, festzulegen, welches die Bedingungen für diese Reactionen sind. Als Ergebniss der zu diesem Zwecke unternommenen Arbeiten lassen sich bis jetzt folgende Regeln zur Harnstoffbildung aussprechen:

Der Harnstoff entsteht aus der CONH_2 - resp. CONH -Gruppe. Beispiele hierfür sind — abgesehen von dem ziemlich

selbstverständlichen Verhalten der Ureide — die Purinbasen,¹⁾ Hippursäure,²⁾ Asparagin,³⁾ Lactamid, Succinamid, Benzoylasparaginsäure.⁴⁾ Bei allen diesen Körpern tritt ebenso viel Stickstoff in Form von Harnstoff aus, als CONH_2 - resp. CONH -Gruppen vorhanden sind. So geben z. B. die methylieren Purinkörper den Stickstoff der CONCH_3 -Gruppen nicht in Form von Harnstoff ab, ebensowenig wie die Amidosäuren Glycocoll, Asparaginsäure Harnstoff liefern. Das Asparagin z. B., welches von zwei Stickstoffen einen in der Säure-Aminogruppe enthält, gibt genau die Hälfte des Stickstoffes als Ammoniak ab, die andere Hälfte als Harnstoff.

Ob eine CONH -Gruppe befähigt ist, Harnstoff zu liefern, hängt im Wesentlichen von der leichten Oxydirbarkeit des Complexes ab, an dem sie hängt, und ferner auch von der Structur dieses Restes.

Obzwar der eigentliche Mechanismus der Reaction noch nicht hinlänglich aufgeklärt ist, so kann man sich den Vorgang nach folgendem Schema versinnbildlichen:



Hierbei ist unter R jene Gruppe resp. jener Theil des Gesamtmoleküls zu verstehen, an dem die CONH -Gruppe hängt.

Selbstverständlich kann die Oxydation des Körpers ROH — der einen Alkohol oder eine Säure vorstellt — noch weiter gehen, was auf die Reaction bezüglich des Harnstoffes irrelevant ist, und ich kann für die Richtigkeit dieses Theiles der Reactionsgleichung keineswegs einstehen. Nachdem nun an dem vorliegenden Materiale festgestellt worden war, dass die CONH -Gruppe und keine andere befähigt sei, bei der Oxydation unter bestimmten Bedingungen Harnstoff zu liefern, habe ich eine Reihe von Eiweisskörpern derselben Behandlung unterzogen,

1) Ueber eine quant. Reaction bei den Ureiden und Purinderivaten. Von Adolf Jolles, Berichte XXXIII, S. 1246 und 2119.

2) Ueber die Oxydation der Hippursäure zu Harnstoff. Von Adolf Jolles, Berichte XXXIII, S. 2834.

3) Zur Kenntniss des Asparagins und der Asparaginsäure. Von Adolf Jolles, Berichte XXXIV, S. 386.

4) Ueber den Harnstoff als Produkt der Oxydationsspaltung stickstoffhaltiger Körper. Von Adolf Jolles, Journal f. prakt. Chemie.

um Analogieschlüsse auf die Stickstoffbindung im Eiweissmoleküle ziehen zu können. Die Untersuchungen, deren Einzelresultate im experimentellen Theile ausführlich wiedergegeben sind, haben ausnahmslos sehr bedeutende Bruchtheile des Eiweissstickstoffes in Form von Harnstoff ergeben, immer über 45%, bei gewissen Eiweisskörpern bis 90%. Aus diesen Untersuchungen geht hervor, dass im Eiweiss beträchtliche, ja selbst überwiegende Antheile des Stickstoffes in harnstoffbildenden Gruppen stehen. Nach den bisherigen Erfahrungen können wir nicht umhin, als diese Gruppen die CONH-Gruppen aufzufassen. Wir müssen somit im Eiweiss eine beträchtliche Zahl von CONH-Gruppen annehmen. Es fragt sich jetzt noch, womit diese Gruppen verbunden sind. Betrachtet man das Verhältniss von Stickstoff und Kohlenstoff im gesammten Eiweissmolekül, so sieht man, dass auf 1 Atom Stickstoff ca. 4 Atome Kohlenstoff entfallen, so dass nach Abspaltung von CONH-Gruppen ein kohlenstoffreicher Rest übrig bleiben wird. Inwieweit dieser auf Phenole, Fettsäuren etc. entfällt, ist in quantitativer Weise noch nicht untersucht worden. Nachdem bisher die Harnstoffbildung nur bei jenen CONH-Gruppen constatirt werden konnte, deren Träger ein leicht oxydabler Complex ist, so müssen wir auch hier annehmen, dass der Rest, an dem die CONH-Gruppe stand, einer weiteren Oxydation anheimfällt. Inwieweit diese Oxydation mit Permanganat bei Eiweisskörpern zu Ende geführt wird, habe ich bis jetzt noch nicht untersucht.

Nachdem bei der Oxydation der Eiweisskörper immer ein, wenn auch zuweilen geringer, Antheil des Stickstoffes nicht als Harnstoff auftritt, und ferner für die von Kossel als Kern des Eiweisses angenommenen Hexonbasen, ebenso wie für die nicht mit dem Harnstoff identischen stickstoffhaltigen Spaltungsprodukte des Eiweisses die Fällbarkeit durch Phosphorwolframsäure nachgewiesen ist, so können wir annehmen, dass der Eiweissstickstoff, soweit er nicht als Harnstoff auftritt, im Wesentlichen in Form von Hexonbasen abgespalten wird. In dieser Beziehung bieten die Oxydationsversuche, wobei im Phosphorwolframsäureniederschlage die Hexonbasen allerdings nur qualitativ nachgewiesen wurden, eine Stütze für die Kossel'sche Theorie. Wenngleich aber nachgewiesen ist.

dass dieser Hexonkern sämtlichen Eiweisskörpern gemeinsam ist, und selbst wenn zugegeben wird, dass der chemische Charakter des Eiweisses dadurch bedingt ist, so muss doch hervorgehoben werden, dass keineswegs dargethan ist, dass dieser Kern für die Ernährung ausschlaggebend ist. Es ist viel eher anzunehmen, dass die harnstoffbildende Gruppe, die allen Eiweisskörpern, und zwar in viel grösseren Antheilen gemeinsam ist, für die Functionen des Eiweisses als Nahrungsstoff von grösster Wichtigkeit ist.

Diese Fragen werden sich erst durch eine sehr ausgedehnte chemische und physiologische Vergleichung der Eiweisskörper unter einander beantworten lassen, und es sei zunächst nur nochmals darauf hingewiesen, dass sich unter den Eiweisskörpern erhebliche Differenzen bezüglich der gebildeten Harnstoffmengen gezeigt haben, was für die Charakterisirung der einzelnen Glieder dieser Körperreihe von grossem Interesse ist. Die Analogie, welche sich in gewisser Beziehung zwischen der Permanganatoxydation und der physiologischen Verarbeitung der Eiweisskörper gezeigt hat, wird besonders durch diese Versuchsergebnisse bekräftigt, worüber nach Abschluss der bezüglichen Nährversuche berichtet werden soll.

Zusammenstellung der Resultate.

I. Bei der Oxydation von Eiweisskörpern in saurer Lösung mit Permanganat tritt der Stickstoff in folgenden Formen auf:

- a) Harnstoff,
- b) durch Phosphorwolframsäure fällbare Substanzen,
- c) Filtratstickstoff.

Ammoniak tritt nur in Spuren auf.

Der Harnstoff kann nicht aus Hexonbasen entstanden sein, nachdem diese bei der angegebenen Behandlung keinen Harnstoff liefern, und ausserdem ihre Menge nicht ausreicht, die gesammte Harnstoffbildung zu erklären. — Hexonbasen finden sich im Phosphorwolframsäureniederschlage.

II. Auf Grund der Resultate lassen sich folgende unter einander stark abweichende Typen aufstellen:

a) Oxyhämoglobin gibt über 90% seines Stickstoffes als Harnstoff ab.

b) Krystallisirtes Eieralbumin, krystallisirtes Serumalbumin, krystallisirtes Serunglobulin, Casein, Vitellin aus Eigelb lieferten 70 bis 81% Stickstoff als Harnstoff.

c) Fibrin und Vitellin aus Pflanzen geben 40 bis 50% Stickstoff als Harnstoff, ca. 30% im Filtrate von der Phosphorwolframsäurefällung.

Der Rest des Stickstoffes wurde im Phosphorwolframsäure-niederschlag gefunden und dürfte sich nach qualitativen Versuchen im Wesentlichen auf den Gehalt an Hexonbasen zurückführen lassen.

III. Allen Eiweisskörpern kommt die Eigenschaft zu, einen sehr beträchtlichen Theil des Stickstoffes nach dem angegebenen Verfahren als Harnstoff abspalten zu können. Ebenso allgemein, wenngleich in viel geringerer Menge, ist bei der Oxydation die Bildung von Hexonbasen zu verzeichnen. Abweichend von den Hofmeister'schen Versuchen ist die Eigenschaft der Harnstoffbildung bei den angegebenen Oxydationsversuchen von der Gegenwart anderer stickstoffhaltiger Substanzen (Ammoniak) unabhängig.

IV. Für die Eiweisspaltung im Organismus muss gleichzeitig Hydrolyse und Oxydation angenommen werden.

V. Aus den früher publicirten Arbeiten des Verfassers geht hervor, dass nur die CONH_2 - resp. CONH -Gruppe zur Harnstoffbildung befähigt ist und auch dieses nur, wenn sie sich an einem leicht oxydablen Rest befindet, dessen Structur auch von Einfluss ist. Es ist somit auch für die Eiweisskörper sehr wahrscheinlich, dass die Harnstoffbildung auf CONH -Gruppen zurückzuführen ist, von denen nach den Analysen-Resultaten eine sehr erhebliche Menge im Eiweissmolekül vorhanden sein muss. Der Rest des Stickstoffes sind vornehmlich Hexonbasen.

VI. Ueber die Beziehungen der gebildeten Harnstoffmengen zum chemischen und physiologischen Charakter der Eiweisskörper wird seiner Zeit auf Grund von Nährversuchen berichtet werden.