

Beitrag zur Kenntnis einer krystallinischen Harnalbumose.

II.

Von

Alide Grutterink und C. J. Weevers de Graaff.

(Aus dem chemischen Laboratorium des städt. Krankenhauses zu Rotterdam.)

(Der Redaktion zugegangen am 22. November 1905.)

Die Harnalbumose, über welche hier berichtet wird, ist die Albumose, deren Bereitung und Krystallisation in Band XXXIV dieser Zeitschrift ausführlich beschrieben wurde. Leider wurde die Veröffentlichung folgender Resultate verspätet, teils durch die Wiederholung vergeblicher Versuche über die Bestimmung des Molekulargewichtes unserer Substanz, teils durch äußere Umstände. Das Erscheinen der Abhandlung von Abderhalden und Rostoski in Heft I und II des XLVI. Bandes dieser Zeitschrift veranlaßt uns dazu, jetzt über unsere Resultate zu berichten. Aus den Versuchen, die über Verdauungs- und Abbauprodukte angestellt wurden, ist hervorgegangen, daß wir Abderhalden und Rostoski vollkommen beistimmen, d. h. daß auch unsere Bence-Jones'sche Albumose den wirklichen Eiweißkörpern sehr nahe steht. Abderhalden und Rostoski verwandten zu ihren Versuchen Eiweiß, das durch dreimalige Ausfällung mit Ammonsulfat und Dialysieren gereinigt war. Sie schreiben: «wir müssen allerdings die Frage offen lassen, ob der Bence-Jones'sche Eiweißkörper ein «einheitliches» Produkt ist oder nicht vielmehr ein Gemisch darstellt.» Wir hingegen haben unsere Versuche nur angestellt mit krystallisierter Substanz und benutzten zur Reinigung meistens die merkwürdige Schwerlöslichkeit der Krystalle in Wasser. Sie wurden durch oft wiederholtes Dekantieren mit Wasser bis auf Spuren von Ammonsulfat befreit. Die gesättigten wässerigen Lösungen wurden mit Alkohol versetzt und so das gelöste Eiweiß wieder gewonnen. Da uns keine krystallisierte Eiweißsubstanz bekannt ist, die sich so schwer in Wasser bezw.

sehr verdünnter Ammonsulfatlösung löst, glauben wir zu der Annahme berechtigt zu sein, daß wir mit einer einheitlichen Substanz und sogar mit einer sehr reinen gearbeitet haben.

Die mit Wasser ausgewaschenen Krystalle lösten sich leicht in verdünnter Salzsäure (0,25%) von 40°. Zu Verdauungsversuchen wurden 100 ccm dieser Lösung mit 0,040 g Pepsinum purissimum Grübler versetzt und die Proben bei 37° in den Brutschrank gestellt. Orientierende Versuche ergaben, daß schon nach einer halben Stunde «Primäre» Albumosen nachweisbar waren, die größte Menge war anwesend nach etwa drei Stunden, dann verminderte sich ihre Quantität, bis sie nach neun Stunden nur noch in Spuren, nach acht Tagen nicht mehr nachweisbar waren. Auch die Deuteroalbumosen A und B waren schon nach einer Stunde, mehr nach zwei bis drei anwesend, am meisten aber nach acht bis neun Stunden, nach 23 Stunden hatte sich ihre Menge stark vermindert. Die Albumose C war immer in geringer Menge vorhanden; weiter wurden ein in Alkohol lösliches und ein unlösliches Pepton gefunden.

Aus der anfangs vollkommen klaren Flüssigkeit wurde nach kurzer Digestion eine gallertartige Masse ausgeschieden, die sich der weiteren Verdauung sehr resistent erwies (Acidalbumin?). Im Filtrat wurde ein Neutralisationsprodukt nicht erhalten. Aus diesen Versuchen war also hervorgegangen, daß die größte Ausbeute an «Primären» Albumosen nach etwa zwei, die an Deuteroalbumosen nach acht bis neun Stunden zu erwarten war.

30 g der Substanz wurden verdaut mit 1500 ccm Pepsinsalzsäure, von der gallertartigen Masse abfiltriert, nach zwei Stunden ein Drittel neutralisiert und aufgeköcht, und nach zwei Stunden der Rest ebenso behandelt. Die beiden Flüssigkeiten wurden gemischt und die Fällungsgrenze gegen Ammonsulfat in einer gegen Lackmus neutralen Lösung bestimmt.

| | | Primäre Albumose | Sekundäre Albumose | | |
|--------|----------------|------------------|--------------------|-----|--|
| | | | A | B | C |
| Untere | Fällungsgrenze | 3,2 | 5,4 | 7,2 | Sättigung. |
| Obere | | 4,4 | 6,6 | 8,0 | Sätt. + $\frac{1}{10}$ Vol. $\frac{1}{10}$ N.-H ₂ SO ₄ |

Bei anderen Untersuchungen waren diese Zahlen bestimmt zu:

| | Primäre Albumose | Sekundäre Albumose | |
|--|------------------|--------------------|-----|
| | | A | B |
| Fibrin Pick ¹⁾ | 2,6 | 5,4 | 7,2 |
| | 4,4 | 6,2 | 9,5 |
| Eieralbumin Umber ²⁾ | 3,6 | 5,6 | 7,0 |
| | 4,6 | 6,0 | 7,8 |
| Serumalbumin Umber ²⁾ | 4,2 | 5,4 | 7,2 |
| | 4,6 | 6,2 | 8,0 |
| Serumglobulin Umber ²⁾ | 3,8 | 5,6 | 7,8 |
| | 4,6 | 7,2 | 8,6 |
| Bence-Jonesscher Körper Magnus Levy ³⁾ | 3,2 | 5,6 | 7,8 |
| | 4,8 | 7,2 | 9,2 |

Aus diesen Zahlen geht hervor, daß die Verdauungsprodukte unseres Eiweißkörpers am meisten übereinstimmen mit denen des Serumalbumins, während Magnus Levy für seinen Körper die größte Übereinstimmung fand mit denen des Serumglobulins.

Ein Teil der verdauten Flüssigkeit wurde versetzt mit dem gleichen Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung und die primären Albumosen ausgefällt; aus dem Filtrat durch $\frac{2}{3}$ -Sättigung die sekundäre Albumose A abgeschieden und aus dem Filtrat dieser durch Salzsättigung die sekundäre Albumose B. Die sekundäre Albumose C fiel am besten aus der Flüssigkeit aus nach Versetzen mit $\frac{1}{10}$ Volumen salzgesättigter $\frac{1}{10}$ norm. Schwefelsäure.

Die primären Albumosen wurden zur Reinigung in Wasser

¹⁾ Pick, Untersuchungen über die Proteinstoffe, Diese Zeitschrift, Bd. XXIV, S. 246.

²⁾ Umber, Die Spaltung des krystallinischen Eier- und Serumalbumins, sowie des Serumglobulins durch Pepsinverdauung, Diese Zeitschrift, Bd. XXV, S. 258.

³⁾ Magnus Levy, Über den Bence-Jones'schen Eiweißkörper, Diese Zeitschrift, Bd. XXX, S. 200.

gelöst, mit Ammonsulfat niedergeschlagen und dieses einigemal wiederholt. Schließlich wurde in üblicher Weise mit Baryumacetat die Schwefelsäure, und das überschüssige Baryumsalz mit Ammoncarbonat entfernt. Diese, die gesamten primären Albumosen enthaltende Flüssigkeit wurde nach Pick untersucht; sie wurde auf ein kleines Volumen eingedampft und mit dem doppelten Volumen Alkohol von 95%o versetzt. Der entstandene Niederschlag wurde auf Heteroalbumose, das Filtrat auf Protoalbumose verarbeitet. Der gut ausgewaschene und ausgepreßte Niederschlag wurde auf dem Filter in heißem Wasser gelöst, das Filtrat trübte sich beim Erkalten und gab beim Versetzen mit $\frac{1}{2}$ Volumen Alkohol einen schönen, weißen Niederschlag, der zur weiteren Reinigung noch einigemal in derselben Weise behandelt wurde. Er gab alle Reaktionen der aus Fibrin dargestellten Heteroalbumose.¹⁾

Der Rest unserer Verdauungsflüssigkeit wurde jetzt nach Pick's neuer Methode²⁾ weiter verarbeitet, die alkoholunlöslichen Produkte wurden entfernt durch Fällung mit dem doppelten Volumen Alkohol, die alkoholische Lösung eingedampft, nach Entfernung des Alkohols mit dem gleichen Volumen Ammonsulfat die Protoalbumose und durch weitere Zufügung eines halben Volumens Salzlösung die alkohollösliche Fraktion der Deuteroalbumose A niedergeschlagen. Zur Reinigung wurde dieser Niederschlag in Wasser gelöst, mit dem 3- bis 4fachen Volumen Alkohol niedergeschlagen und aus der wässerigen Lösung des Niederschlags etwa anwesende Reste der Protoalbumose mit dem gleichen Volumen Ammonsulfatlösung entfernt. Sowohl hier wie später wurden die Präparate mit essigsaurem Baryt und Ammoncarbonat salzfrei gemacht und mit Alkohol im Überschuß gefällt. Sie stimmt in ihren Eigenschaften überein mit Pick's schwefelarmer Deuteroalbumose A. Von den meisten Fraktionen wurde soviel erhalten, daß damit die wichtigeren Reaktionen angestellt werden konnten, zu aus-

¹⁾ Um die Reaktionen vergleichen zu können, haben wir uns aus Pepton Witte die verschiedenen Albumosen bereitet.

²⁾ Pick, Zur Kenntnis der peptischen Spaltungsprodukte des Fibrins, Hofmeister's Beiträge, Bd. II, S. 481.

fürlicheren Bestimmungen, wie Pick sie anstellte, genügten sie leider nicht.

Die Darstellung der Fraktion BII erfolgte auch hier durch Sättigung mit Ammonsulfat und Entfernung des Salzes. Wurde die wässrige Lösung mit dem doppelten Volumen Alkohol versetzt, so blieb sie vollkommen klar. Beim Vermischen hingegen mit dem 4fachen Volumen entstand ein reichlicher Niederschlag, welcher eine sehr starke Molisch'sche Reaktion gab. Der entsprechende Anteil aus Pepton Witte wurde von Pick auf Grund ihrer sehr stark hervortretenden Molisch'schen Reaktion Glycoalbumose genannt.

Die letzte Fraktion BIII dieser Deuteroalbumose wurde erhalten aus dem alkoholischen Filtrat der Glycoalbumose: diese wurde auf ein sehr kleines Volumen eingedampft und mit dem 6fachen Volumen Alkohol versetzt.

Die alkohollösliche Albumose C befand sich noch in der salzgesättigten Lösung, sie wurde ausgefällt mittels verdünnter Schwefelsäure. Wurde dieser Niederschlag in Wasser gelöst, die Lösung mit NH_3 neutralisiert und unter gelindem Erwärmen mit Ammonsulfat gesättigt, so wurden, wie Pick angibt, noch Albumosen niedergeschlagen, Fraktion BIC. Aus dem Filtrat wurde die Fraktion C mittels $\frac{1}{10}$ -Normal-Schwefelsäure niedergeschlagen. Das Filtrat von C enthielt Pepton B.

Der im Anfang mit Alkohol entstandene Niederschlag wurde nach Lösung in Wasser in derselben Weise mit Ammonsulfat getrennt, zuerst mit dem gleichen Volumen die Heteroalbumose, und aus dessen Filtrat mit $\frac{1}{2}$ Volumen Salzlösung, die Albumose A, Pick's Thioalbumose wegen der sehr starken Schwefelbleireaktion. Sie ist unlöslich in Alkohol von 65 $\frac{0}{10}$.

Die Albumose BI konnte erhalten werden durch Salzsättigung des Filtrates: sie war nur in sehr spärlicher Menge vorhanden. In dem Filtrate konnte durch Versetzen mit Säure keine Albumose mehr nachgewiesen werden, wohl aber enthielt es Pepton A.

Der Bence-Jones'sche Eiweißkörper liefert also bei der Pepsinverdauung alle bisher bekannten primären und sekundären Verdauungsprodukte der Eiweißkörper. Dieser Punkt ist von

Bedeutung, denn nach Zunz und Pick stellen die Proto- und die Heteroalbumose die primären Spaltungsprodukte dar. Da unser Bence-Jones'scher Körper mit Sicherheit die Proto- und die Heteroalbumose abspaltet, so ist sie den echten Albumosen in bezug auf Kompliziertheit des Baues übergeordnet und steht danach den echten Eiweißkörpern näher.

Reaktionen des Bence-Jones'schen Eiweißkörpers und seiner Verdauungsprodukte.

| | Biuret- reaktion | Reaktion mit Millon's Reagens | Xantho- protein- reaktion | Toluol- u. Skatol- geruch bei der Schmelze | Kohlen- hydrat- reaktion nach Molisch | Schwefel- blei- reaktion |
|---------------------------------------|---------------------|--|---------------------------------|--|---|--------------------------------|
| Bence- Jones'scher Eiweißkörper | violett- rot | intensiv | in der Kälte gelb | — | vor- handen | Schwär- zung |
| Hetero- albumose | rot | sehr schwach | vor- handen | — | fehlt | vor- handen |
| Proto- albumose | rot | sehr stark | vor- handen | stark | fehlt | vor- handen |
| Thio- albumose | violett | stark | vor- handen | — | schwach | sehr stark |
| Schwefelarme Albumose A | rot | — | — | — | fehlt | vor- handen |
| Albumose B ^I | — | — | — | — | — | — |
| Glyco- albumose | violett | vor- handen | vor- handen | schwach | sehr stark | vor- handen |
| Albumose B/C III | violett- rot | vor- handen | vor- handen | stark | fehlt | — |
| Albumose C | blau- violett | sehr schwach | stark | — | fehlt | fehlt |
| Pepton A | blau- violett | — | — | — | — | fehlt |
| Pepton B | rot | schwach | — | — | — | fehlt |

Da mit Sicherheit nachgewiesen ist, daß Glycocoll ein Spaltungsprodukt der Heteroalbumose darstellt, war es von besonderem Interesse, zu untersuchen, ob wir bei unserem Eiweißkörper dieses Spaltungsprodukt nachweisen konnten. Wir benutzten dazu die Methode Spiro's¹⁾. Die Eiweißsubstanz wurde mit Schwefelsäure zersetzt, diese mit Bleicarbonat gefällt, aus dem Filtrat mit Phosphorwolframsäure die Diaminosäuren gefällt, die überschüssige Phosphorwolframsäure mit Barythydrat und diese wieder mit Kohlensäure entfernt. Das Filtrat wurde stark eingeengt und benzoyliert: die gebildete Hippursäure extrahiert mittels Essigäthers, der Auszug gelöst in Soda, mit Tierkohle entfärbt, das Filtrat angesäuert und eingedampft. Der gut getrocknete Rückstand wurde mit essigsaurem Natron, Benzaldehyd und Essigsäureanhydrid im Wasserbade erhitzt und die Hippursäure in das Lactimid der Benzoylamidoessigsäure übergeführt. Nach einer halben Stunde wurde gelinde mit Wasser erwärmt, die Lösung der Essigsäure und des essigsauren Natrons abgegossen, das ausgeschiedene Öl in Alkohol gelöst und diese Lösung der langsamen Erkaltung überlassen. Auf diese Weise gelang es, sowohl in dem Bence-Jones'schen Eiweißkörper selbst, sowie in der aus diesem bereiteten Heteroalbumose das Glycocoll nachzuweisen. Das Lactimid ist sehr leicht zu erkennen an Krystallform und Schmelzpunkt. Der Schmelzpunkt des aus reinem Glycocoll dargestellten Lactimids wurde bestimmt zu 165°, für das Lactimid des Bence-Jones'schen Eiweißkörpers 163° gefunden. Beim Erhitzen mit konzentrierter Natronlauge spalteten beide Ammoniak ab und lieferten Phenylpyrotraubensäure, welche mit der Eisenchloridreaktion und ätherischer Phenylhydrazinlösung als solche erkannt wurde. Mit Sicherheit war also nachgewiesen, daß Glycocoll ein Spaltungsprodukt unseres Eiweißkörpers war, diese Resultate stimmen also vollkommen überein mit denen Abderhalden's und Rostoski's, welche Glycocoll mit Hilfe der Estermethode nachweisen konnten, während es Magnus Levy nicht gelang, in seinem Körper Glycocoll nachzuweisen.

¹⁾ K. Spiro, Über Nachweis und Vorkommen des Glycocolls, Diese Zeitschrift, Bd. XXVIII, S. 174.

Ein zweiter Versuch, etwas Näheres über unsre Substanz zu erfahren, war die Hydrolyse mit Schwefelsäure nach Kossel und Kutscher. Vorversuche mit aus Harn durch Alkohol-fällung erhaltener Substanz ergaben eine reichliche Ausbeute an Leucin und Tyrosin; hingegen wurden wenig Lysin, Histidin und Arginin nachgewiesen. Die zu den eigentlichen Versuchen verwandte krystallisierte Substanz enthielt nach dem Trocknen bei 110° 15,65% N, Asche 0,1%. Der Ammoniakgehalt der Flüssigkeit nach Entfernen des Huminstickstoffs I wurde anstatt mit MgO mit reinem BaCO_3 bestimmt. Der Gehalt an Diamino-säuren berechnet aus den Kjeldahl-Bestimmungen.

Die Ergebnisse dieser Versuche sind:

| | Stickstoff in | | Prozent des | |
|--|---------------|------|-------------|-------|
| | Gramm | | Gesamt- | |
| | | | stickstoffs | |
| Gesamtmenge | 15,65 | — | 100 | — |
| A. Basenstickstoff | 3,93 | — | 25,10 | — |
| Davon im Ammoniak | — | 0,62 | — | 3,99 |
| » » Histidin | — | 0,51 | — | 3,26 |
| » » Arginin | — | 1,53 | — | 9,80 |
| » » Lysin | — | 1,27 | — | 8,05 |
| B. Stickstoff in nicht bestimmter Form | 11,75 | — | 74,88 | — |
| Davon im ersten Barytniederschlag | — | 0,85 | — | 5,43 |
| » » zweiten | — | 0,92 | — | 5,85 |
| » » Silberniederschlag | — | 0,15 | — | 0,99 |
| » » Leucin-Tyrosin | — | 9,83 | — | 62,81 |

Zur Elementaranalyse verwandten wir das Präparat, abgebildet Seite 400, Band XXXIV dieser Zeitschrift; es war ganz frei von amorphen Beimengungen und einheitlich krystallisiert. Es wurde mit Wasser ausgewaschen, bis im Filtrat Ammonsulfat nicht mehr nachweisbar war, und bei 110° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Es enthielt 0,1% Asche. C und H wurden bestimmt durch Verbrennen mit Bleichromat und vorgelegter Kupferspirale, der Stickstoff nach Kjeldahl und der Schwefel nach Hammarsten mit Salpetersäure.

Die Analysen ergaben folgende Resultate:

| | | | | | | | | |
|------|----------|----------|-------|----------|-----------------|-------------------|----------|-------------------|
| I. | 0,1658 g | Substanz | gaben | 0,3186 g | CO ₂ | = | 0,1026 g | H ₂ O. |
| II. | 0,2018 | » | » | 0,3872 | » | » | = | 0,1222 |
| III. | 0,3186 | » | » | 0,05005 | » | N | | |
| IV. | 0,1951 | » | » | 0,03053 | » | | | |
| V. | 0,2686 | » | » | 0,04176 | » | | | |
| VI. | 0,9242 | » | » | 0,0985 | » | BaSO ₄ | | |
| VII. | 0,7041 | » | » | 0,0745 | » | | | |

Auf aschefreie Substanz berechnet:

| | I | II | III | IV | V | VI | VII |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| C | 52,47 | 52,38 | — | — | — | — | — |
| H | 6,88 | 6,78 | — | — | — | — | — |
| N | — | — | 15,72 | 15,66 | 15,60 | — | — |
| S | — | — | — | — | — | 1,465 | 1,455 |
| O | — | — | — | — | — | — | — |

Im Mittel also C_{52,42} H_{6,83} N_{15,66} S_{1,46} O_{23,63}

Von dieser selben Substanz wurde der «leicht abspaltbare Schwefel» bestimmt nach Schulz,¹⁾ die Substanz wurde mit konzentrierter Natronlauge und schwefelfreiem Zink gekocht und nach und nach versetzt mit Bleiacetat oder Wismuthnitrat: das Schwefelwismuth wurde gesammelt mit Salpetersoda geschmolzen und der «leicht abspaltbare» Schwefel bestimmt als BaSO₄. Kontrollbestimmungen mit derselben Menge der benutzten Reagentien ergaben im Mittel 0,002 g BaSO₄.

0,887 g Eiweiß ergaben 0,0387 g, also 0,0365 g BaSO₄ oder 0,570% S.
0,407 » » » 0,0183 » » 0,0163 » BaSO₄ » 0,552% S.

Im Mittel 0,561%. Das Verhältnis des leicht abspaltbaren Schwefels zum Gesamtschwefel ist also $\frac{0,561}{1,465}$ etwa 2/5.

Da die Schwefelbestimmungen allein für die Berechnung der Molekulargröße nur beschränkten Wert besitzen, haben wir versucht, das Molekulargewicht auf andre Weise zu finden.

Von den direkten Methoden ist bei anderen Eiweißkörpern die Methode der Siedepunktserhöhung unanwendbar, da sie beim Erhitzen unlöslich werden, bei unsrem Körper schien sie an-

¹⁾ Fr. N. Schulz, Die Bindungsweise des Schwefels im Eiweiß, Diese Zeitschrift, Bd. XXV, S. 16.

gebracht, weil dieser Körper sich beim Kochen völlig löst. Professor Franchimont, Direktor des organisch-chemischen Laboratoriums der Leidener Universität, war so gütig, uns zu diesen Versuchen sein Laboratorium zur Verfügung zu stellen; für diese Freundlichkeit sowie für seine Hilfe bei allen unsren leider vergeblichen Versuchen sagen wir ihm an dieser Stelle herzlichen Dank.

Die Versuche wurden angestellt mit Landsberger's Apparat.¹⁾ Wurde wasserfreie Essigsäure benutzt als Lösungsmittel, so löste sich die Substanz beim Kochen nicht völlig. Wasser als Lösungsmittel war ausgezeichnet, aber die völlig klare Lösung fing immer zu schäumen an und kochte über. Da wir mit diesem einfachen Apparat das Ziel nicht erreichen konnten, haben wir es gar nicht versucht mit dem Beckmann'schen Apparat, in welchem das Schäumen noch viel schneller eintritt. In andren gewöhnlich zu diesen Versuchen benutzten Lösungsmitteln war die Substanz unlöslich.

Also blieb nur die Methode der Gefrierpunktserniedrigung übrig. Dazu konnten wir nur die wässrige Lösung benutzen, aber — es wurde schon hervorgehoben — die Krystalle sind in Wasser sehr schwer löslich (100 g einer gesättigten wässrigen Lösung enthielt 0,603 g), und die Gefrierpunktserniedrigung konnte also nur sehr gering sein.

Aber selbst wenn alle Vorsichtsmaßregeln genommen wurden, welche es uns möglich war zu nehmen,²⁾ waren bei den Versuchen mit destilliertem Wasser die Abweichungen größer, als die berechnete Erniedrigung des Gefrierpunktes der Eiweißlösung. Leider sind wir aus Mangel an Zeit gezwungen, diese Versuche zu beendigen: falls aber jemand Lust hat, zu versuchen, das Molekulargewicht dieser Substanz auf andre Weise zu bestimmen, stellen wir ihm unsre Krystalle gern zur Verfügung.

¹⁾ Landsberger, Ein neues Verfahren der Molekelgewichtsbestimmung nach der Siedemethode, Berichte der Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXI, S. 458, 1898.

²⁾ Nernst und Abegg, Über den Gefrierpunkt verdünnter Lösungen, Zeitschr. f. Physikal. Chemie, Bd. XV, S. 652. E. Beckmann, Beiträge zur Bestimmung von Molekulargrößen VII, Zeitschrift f. Physik. Chemie, Bd. XLIV, Seite 141.