

Zur Frage nach der Einwirkung von verdünnter Salzsäure auf die Eiweißstoffe.

Von

Ed. Swirlowsky.

(Aus dem pharmakologischen Laboratorium von Prof. D. Lawrow in Dorpat.)

(Der Redaktion zugegangen am 2. Juni 1906.)

Von den klassischen Arbeiten Braconnots, Hlasiwetz', Habermanns usw. angefangen, bis auf die neueren Forschungen E. Fischers, H. Skraups u. a. ist die Frage über die Einwirkung von mehr oder weniger konzentrierten Mineralsäurelösungen auf die Eiweißkörper vielfachen, wie vielseitigen Untersuchungen unterworfen worden. Die Spaltung des Eiweißmoleküls durch solche Säurelösungen ist zur Zeit eine der am häufigsten angewandten Methoden. Infolgedessen ist die Literatur über die genannte Frage zu einer recht umfangreichen herangewachsen.

Viel dürftiger, als die eben erwähnte Frage, ist diejenige über die Einwirkung bzw. Spaltung der Eiweißkörper durch mehr oder weniger verdünnte Mineralsäurelösungen bestellt. Da die Spaltung der Eiweißkörper hauptsächlich zum Ziele hat, das komplizierte Eiweißmolekül in seine einfacheren Atomkomplexe zu zerlegen, und so der Aufklärung über die Zusammensetzung des genannten Moleküls näher zu rücken, hat die Spaltung durch starke Mineralsäurelösungen einen großen Vorzug an Raschheit des Verlaufs der Reaktion vor der Spaltung durch verdünnte Mineralsäurelösungen. Darin ist wohl die Ursache zu suchen, daß die Frage über die Einwirkung von verdünnten Mineralsäurelösungen auf Eiweißkörper bis jetzt so nebensächlich behandelt wird. Letztere Frage verdiente aus folgenden Gründen einem eingehenden Studium unterworfen zu werden. Erstens ist das Studium der Einwirkung von ver-

dünnten Säuren auf die Eiweißkörper von nicht zu unterschätzender Bedeutung für die nähere Erforschung der proteolytischen Wirkung des Pepsins, und zweitens könnte es auch manche Dienste zur Aufklärung der Zusammensetzung des Eiweißmoleküls leisten. Inwiefern letzteres möglich wäre, wird aus folgendem ersichtlich. Daß den verdünnten Säuren an und für sich eine proteolytische Wirkung zukommt, haben, außer den Arbeiten älterer Forscher, wie z. B. v. Wittich, Brücke, Wolffhügel u. a. die neueren Arbeiten von F. Goldschmidt¹⁾ und D. Lawrow²⁾ gezeigt. Ersterer Autor hat die Einwirkung von $\frac{n}{4}$ und $\frac{n}{16}$ Salzsäure, sowie Schwefelsäure derselben Konzentrationen, studiert. Unter den Spaltungsprodukten hat er sowohl Albumosen, wie auch Peptone konstatieren können. Er kommt zum Schlusse, daß: «die Wirkung des Pepsins + Salzsäure bei 40° C. sich von jener der reinen Salzsäure bei 40° C. nur durch die Raschheit des Verlaufs, nicht durch die Qualität der Endprodukte unterscheidet». Nach dem Versuch des Autors soll Salzsäure etwas rascher als die Schwefelsäure wirken.

D. Lawrow unterwarf Gelatine und Hämoglobin einer langandauernden Einwirkung von 0,5%iger Salzsäure bei einer Temperatur von 35—38° C. Die Gelatine wurde bei diesen Versuchen einer Einwirkung der betreffenden Säure bis zu 63 Tagen ausgesetzt, wogegen das Hämoglobin einer Einwirkung bis zu 161 Tagen unterworfen wurde. In beiden Fällen konstatierte der genannte Autor, daß unter den Spaltungsprodukten stickstoffhaltige Körper entstehen, welche durch Phosphorwolframsäure nicht gefällt werden, und zwar bei Gelatine betrug die Stickstoffmenge solcher Körper 15,5% des Gesamtstickstoffs der Gelatine. Beim Hämoglobin stieg die Menge des Stickstoffs dieser durch Phosphorwolframsäure nicht fällbarer Körper bis auf 36% des Gesamtstickstoffs. Dieselben Erscheinungen ließen sich auch bei der Einwirkung von 0,5%iger Salzsäure bei 35—38° C. auf frische Schweinemagen nachweisen. D. Lawrow nimmt unter anderem an, daß «unter dem Einfluß von 0,5%iger Salzsäure

¹⁾ F. Goldschmidt, Inaug.-Dissert. Straßburg 1898.

²⁾ D. Lawrow, Diese Zeitschrift, Bd. XLIII (1905).

die Spaltung der Eiweißkörper, welche zu meinen Versuchen benutzt wurden, bei einer Temperatur von 35—38° so intensiv vor sich geht, daß sich Amphopepton von W. Kühne (wenigstens einige seiner basischen Bestandteile) und stickstoffhaltige Spaltungsprodukte, welche durch Phosphorwolframsäure nicht gefällt werden — höchstwahrscheinlich Monoaminosäuren — bilden. » Den eben angeführten Untersuchungen zufolge muß man annehmen, daß verdünnte Säuren eine zwar langsam verlaufende, allmähliche, aber doch tiefgreifende Spaltung des Eiweißmoleküls einzuleiten imstande sind, also ganz analog dem Vorgange, welchen wir bei der peptischen Verdauung der Eiweißkörper finden, — nur daß im letzteren Falle der Verlauf der Reaktion ein bedeutend rascherer sein würde. Aus den Arbeiten E. Fischers und Abderhaldens¹⁾ geht hervor, daß bei der fermentativen Spaltung der Eiweißkörper Produkte entstehen, welche ihrem chemischen Charakter nach in manchem den synthetischen Polypeptiden E. Fischers ähnlich sind. Aus dem Grunde wäre es nicht eine allzu vage Vermutung, anzunehmen, daß auch bei der viel langsamer verlaufenden Hydrolyse der Eiweißkörper durch verdünnte Säuren ähnliche polypeptidartige Stoffe entstehen, vielleicht in ihren verschiedenen Abstufungen. Ein näheres Studium solcher Stoffe könnte unter Umständen vielleicht einiges zur Aufklärung sowohl über den Verlauf der Hydrolyse der Eiweißkörper überhaupt, als auch über die Zusammensetzung des Eiweißmoleküls beitragen.

Die nachstehende Untersuchung hat mir Herr Prof. D. Lawrow gütigst vorgeschlagen, wie er auch gleichfalls die wissenschaftliche Leitung bei der Ausführung der Arbeit geführt hat. Es ist mir daher eine angenehme Pflicht, meinem hochverehrten Lehrer, Prof. D. Lawrow, sowohl für die liebenswürdige Freistellung seines Laboratoriums, wie auch für das mir vorgeschlagene Thema, für die vielfachen, wertvollen Anweisungen während der Ausführung der Arbeit meinen herzlichsten Dank auszusprechen.

Bei der Ausführung der Arbeit über die Einwirkung von verdünnten Säuren auf verschiedene Eiweißkörper habe ich mir

¹⁾ E. Fischer usw., Diese Zeitschrift, Bd. XXXIX, S. 81.

das Ziel gesteckt, die Wirkung der 0,5%igen Salzsäure bei 36—38° C. auf solche Eiweißkörper zu studieren, wobei ich besonders den Nachweis der von D. Lawrow vermuteten Monoaminosäuren in den Spaltungsprodukten bei der erwähnten Hydrolyse im Auge hatte. Die Salzsäure in der angegebenen Konzentration wurde aus dem Grunde zur Hydrolyse benutzt, weil diese Säure ja in erwähnter Konzentration bei der künstlichen peptischen Verdauung Anwendung findet.

Als Objekte meiner Untersuchungen dienten folgende Eiweißkörper:

- a) Gelatine,
- b) koagulierte, und zwar zum Teil feuchte, zum Teil auch bei 103—105° C. getrocknete Eiweißkörper des Pferdeblutserums,
- c) Casein der Kuhmilch,
- d) krystallinisches Pferdebluthämoglobin und
- e) aus dem Pepton Wittes ausgesalzene Albumosen.

Die Gelatine.

900 g der besten Sorte französischer Gelatine wurden in kleine Stücke zerschnitten, in einer geräumigen, gut verkorkten Flasche mit 15 l 0,5%iger Salzsäure übergossen und unter Zusatz von Chloroform (den 7. X. 1904) im Thermostaten bei einer Temperatur von 36—38° C. digeriert. Bei öfterem Rühren der Mischung löste sich die Gelatine bald auf.

Von Zeit zu Zeit wurden der zum Digerieren aufgestellten Flüssigkeit einzelne Proben entnommen, in welchen sowohl die Menge des Gesamtstickstoffs, als auch die Menge des Monoaminostickstoffs (der Stickstoff der durch Phosphorwolframsäure nicht fällbaren Produkte) bestimmt wurde. Eine wiederholte Bestimmung des Gesamtstickstoffs schien mir aus dem Grunde nötig, weil bei der andauernden Digestion die Gesamtstickstoffmenge, wenn auch in geringem Maße, so doch einiger Variation unterliegen könnte. Die Resultate dieser Bestimmungen sind aus den Tabellen 1 und 2 zu ersehen.

Die Fällung der Eiweißstoffe und ihrer Spaltungsprodukte vermittelt Phosphorwolframsäure wurde, wie mir Prof. D. Lawrow vorschlug, in Gegenwart von 0,5%iger Schwefelsäure

ausgeführt, und zwar wurde in einem Meßkolben zu einem mit 0,5%iger Schwefelsäure entsprechend verdünnten, genau mit der Pipette abgemessenen Volumen der zu fällenden Lösung solange eine Lösung von Phosphorwolframsäure hinzugefügt, bis noch ein Niederschlag, bezw. Trübung entstand. Die Mischung wurde ca. 2 Stunden stehen gelassen, worauf der Kolben mit 0,5%iger Schwefelsäure bis zur Marke angefüllt, der Inhalt des Kolbens filtriert und in dem Filtrat die Stickstoffmenge nach Kjeldahl bestimmt.¹⁾

Tabelle 1.

	Proben	Menge der zur Stickstoffbestimmung genommenen Lösung ccm	Menge der an NH_3 gebundenen $\frac{n}{10}\text{-H}_2\text{SO}_4$ in der Vorlage ccm	Menge des Stickstoffs in 100 Teilen der Gelatinelösung g
7. X. 1904	I	10	53,8	= 0,790
	II	10	53,9	
13. XI. 1904	I	10	54,1	= 0,796
	II	10	54,3	
14. XII. 1904	I	10	53,3	= 0,799
	II	10	53,5	
14. I. 1905	I	10	54,6	= 0,797
	II	10	54,6	
4. II. 1905	I	10	53,2	= 0,776
4. III. 1905	I	10	53,2	= 0,776
27. III. 1905	I	10	52,8	= 0,770

Anmerkung: Der Titer von 1 ccm $\frac{n}{10}\text{-H}_2\text{SO}_4$ bis zum 13. XI. 1904 entspricht 0,00147 g N; der Titer von 1 ccm dieser Säure in den übrigen Proben entspricht 0,00146 g N. Dieselben Daten haben auch für Tabelle 2 Gültigkeit.

¹⁾ In allen in dieser Arbeit angeführten Fällen wurde der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt.

Vom 20. XII. 1904 bis zum 12. I. 1905 wurde die Digestion der Gelatine unterbrochen; während dieser Zeit stand die Lösung der Gelatine bei Zimmertemperatur.

Nach ca. 2 $\frac{1}{2}$ monatlichem Stehenlassen der Lösung im Thermostaten wurde in derselben die Menge der freien Salzsäure durch Titration mit n_{10} -Natronlauge bei Phloroglucin-Vanillin, als Indikator, bestimmt.

Die Menge der freien Säure betrug 0,1%. Durch Hinzufügen von Salzsäure (den 8. I. 1905) in der nötigen Quantität wurde die Menge der freien Säure in der Lösung bis zu 0,5% gebracht. Nach den ausgeführten quantitativen Bestimmungen der freien Salzsäure (den 8. II. 1905 und 10. IV. 1905) in der zur Digestion gestellten Gelatinelösung erwies es sich, daß die eben genannte Lösung im ersteren Falle 0,43%, im zweiten Falle 0,29% freie Salzsäure enthielt. Es ist daraus zu ersehen, daß bei der Digestion der Gelatine mit 0,5%iger Salzsäure bei 36—38° C. eine Bindung der freien Salzsäure vor sich geht.

Die zur Hydrolyse mit 0,5% HCl aufgestellte Lösung wurde auf Gegenwart von proteolytischem Ferment nach Mett geprüft, wobei ein negatives Resultat zu verzeichnen war.

Die auf Seite 256 angeführte Tabelle 1 dient als Ergänzung der Tabelle 2. Es ist aus ihr der Gesamtstickstoff der in Rede stehenden Gelatinelösung zu ersehen.

Zur Erklärung der Tabelle 2 muß ich folgendes bemerken. In der Rubrik «Proben» werden Daten angeführt, bei welcher Verdünnung (mit 0,5%iger Schwefelsäure) die Fällung der Gelatine durch Phosphorwolframsäure vorgenommen worden ist, so daß z. B. «50—1000 ccm» darauf hinweisen, daß zur Fällung 50 ccm Gelatinelösung genommen worden sind, und daß nach der Fällung der Inhalt des 1000 ccm fassenden Meßkolbens bis zur Marke mit 0,5%iger Schwefelsäure verdünnt worden ist. Außerdem wird in dieser Rubrik angegeben, wieviel Kubikzentimeter des nach der Fällung erhaltenen Filtrates zur Stickstoffbestimmung genommen wurden. Die letzte Rubrik der Tabelle enthält quantitative analytische Daten des Monoaminostickstoffs auf je 100 ccm der zur Hydrolyse aufgestellten Gelatinelösung; diese quantitativen Daten sind außerdem noch

in Prozenten ausgedrückt, berechnet auf die Gesamtmenge des Stickstoffs in 100 ccm der Gelatinelösung.

Tabelle 2.

	Proben	Menge der an NH_3 gebundenen $\frac{n}{10}\text{-H}_2\text{SO}_4$ in der Vorlage	Menge des Monoaminostickstoffs in 100 ccm der Gelatinelösung
8. X. 1904	1. Probe: 50—1000 ccm. Zur N-Bestimm. 100 ccm genommen.	0,35 ccm	$\left. \begin{array}{l} 0,01 \text{ g} \\ 0,008 \text{ g} \\ 0,009 \text{ g} \end{array} \right\} = 0,009 \text{ g} = 1,1\% \text{ des Gesamtstickstoffs.}$
	2. Probe: 50—500 ccm. Zur N-Bestimmung 100 ccm genommen.	0,54 >	
	3. Probe: 100—500 ccm. Zur N-Bestimmung 100 ccm genommen.	1,3 >	
13. XI. 04	1. Probe: 50—500 ccm. Zur N-Bestimmung 150 ccm genommen.	7,7 ccm	$\left. \begin{array}{l} \\ \\ \end{array} \right\} = 0,076 \text{ g} = 9,5\% \text{ des Gesamtstickstoffs.}$
	2. Probe: Wiederholung der ersten.	7,7 >	
	3. Probe: 100—514,3 ccm. Zur N-Bestimm. 150 ccm genommen.	9,9 >	$\left. \begin{array}{l} \\ \\ \end{array} \right\} = 0,052 \text{ g} = 6,25\% \text{ des Gesamtstickstoffs.}$
	4. Probe: Wiederholung der dritten.	9,8 >	
14. XII. 04	1. Probe: 25—500 ccm. Zur N-Bestimmung 150 ccm genommen.	5,1 ccm	= 0,099 g = 12,7% des Gesamtstickstoffs.
	2. Probe: 50—500 ccm. Zur N-Bestimmung 150 ccm genommen.	9,3 >	= 0,09 g = 11,5% des Gesamtstickstoffs.
	3. Probe: 75—500 ccm. Zur N-Bestimmung 150 ccm genommen.	11,6 >	= 0,075 g = 9,5% des Gesamtstickstoffs.
14. I. 1905	50—500 ccm. Zur N-Bestimmung 150 ccm genommen.	10,5 ccm	= 0,1 g = 12,5% des Gesamtstickstoffs.
4. II. 05	50—500 ccm. Zur N-Bestimmung 150 ccm genommen.	16,4 ccm	= 0,16 g = 20,6% des Gesamtstickstoffs.
4. III. 05	50—500 ccm. Zur N-Bestimmung 150 ccm genommen.	20,6 ccm	= 0,2 g = 25,8% des Gesamtstickstoffs.

Tabelle 2 (Fortsetzung).

	Proben	Menge der an NH_3 gebundenen $\frac{n}{10}\text{-H}_2\text{SO}_4$ in der Vorlage	Menge des Monoaminostickstoffs in 100 ccm der Gelatinelösung
27. III. 05	1. Probe: 50—500 ccm. Zur N-Bestimmung 150 ccm genommen.	24,1 ccm	= 0,23 g = 28,5% des Gesamtstickstoffs.
	2. Probe: 75—500 ccm. Zur N-Bestimmung 150 ccm genommen.	33,1 >	= 0,21 g = 27,2% des Gesamtstickstoffs.

Aus den oben angeführten Daten der Tabelle 2 ergibt sich folgendes:

1. Bei einer langandauernden Einwirkung von 0,5%iger HCl bei 36—38° C. in Gegenwart von Chloroform auf Gelatine erleidet letztere eine Spaltung, wobei durch Phosphorwolframsäure nicht fällbare, stickstoffhaltige Spaltungsprodukte gebildet werden.

2. Je nach der Dauer der Einwirkung von 0,5%iger HCl unter oben genannten Bedingungen ist eine progressive Zunahme von den genannten stickstoffhaltigen Produkten zu verzeichnen, so daß in gegebenem Falle (nach ca. 50tägiger Einwirkung) die Stickstoffmenge dieser Produkte sich auf ca. 27 bis 29% der Gesamtstickstoffmenge der Lösung beläuft.

3. Die bei der Fällung der genannten Gelatinelösung durch Phosphorwolframsäure zu erhaltenden Mengen des Monoaminostickstoffs sind bei verschiedenen Verdünnungen verschieden: je weniger die Lösung bei der obigen Fällung verdünnt war, desto größere Mengen der erwähnten stickstoffhaltigen Produkte gingen in das Filtrat über, und umgekehrt.

Die vorsichtige Spaltung der Gelatine ließ sich auch durch die Polarisation verfolgen. Die Drehung der Polarisations ebene wurde mit zunehmender Spaltung eine immer geringere, wie es aus der Tabelle 3 ersichtlich ist. Die genannte Drehung wurde durch den Halbschattenapparat von Laurent bei $l = 10$ cm, bei Anwendung von Natriumlicht ausgeführt.

Tabelle 3.

Proben	$[\alpha]$ bei $l = 10$ cm
15. XII. 1904	— $5^{\circ} 8'$
24. I. 1905	— $5^{\circ} 0'$
1. II. 1905	— $4^{\circ} 37'$
15. II. 1905	— $4^{\circ} 26'$
4. III. 1905	— $4^{\circ} 2'$
26. III. 1905	— $4^{\circ} 0'$

Nach ca. 150tägigem Stehenlassen der Gelatine im Thermostaten bei 36 — 38° C. wurde (28. III. 1905) die Digestion unterbrochen und die stark nach Chloroform riechende Lösung filtriert. 8,3 l der filtrierten Lösung wurden mit Schwefelsäure bis auf 0,5% angesäuert und der sauren Flüssigkeit so lange eine wässrige Lösung der Phosphorwolframsäure hinzugefügt, bis bei weiterem Hinzufügen derselben noch ein Niederschlag resp. Trübung entstand. Etliche Stunden nach der Fällung wurde der so entstandene Niederschlag abfiltriert, wiederholt mit destilliertem Wasser, welches mit Schwefelsäure unter Zufügung von etwas Phosphorwolframsäure angesäuert worden war, angerührt und jedesmal mit der Nutsche abgesogen. Der so durchgewaschene Niederschlag wurde nach der üblichen Art bei ca. 40° C. mit Baryumhydrat in sehr geringem Überschuß zerlegt, das entstandene Phosphorwolframat des Baryums mehrmals mit destilliertem Wasser ausgewaschen, filtriert und zuletzt mit der Nutsche abgesogen. Das erste, sowie die darauf folgenden Filtrate des Waschwassers wurden vereinigt, der geringe Überschuß des Baryumhydrats an Kohlensäure gebunden, die Mischung bis auf ca. 5 l auf dem Dampfbade bei ca. 40° C. eingedampft, von Baryum teilweise durch Filtration, gänzlich durch Schwefelsäure (ein Überschuß der Säure wurde vermieden) befreit, und das von dem Baryumsulfat erhaltene Filtrat bei ca. 40° C. bis auf 2,66 l eingengt. Diese durch Phosphorwolframsäure fällbare Produkte enthaltende Lösung benenne ich der Kürze wegen «Lösung B». Diese Lösung enthielt:

Stickstoff	1,5%	=	39,9	g in	2,66 l	der Lösung
Trockensubstanz	6,76%	=	179,81	» »	2,66 l	» »
Asche	0,01%	=	0,266	» »	2,66 l	» »
Organ. Substanz	6,75%	=	179,55	» »	2,66 l	» »

Die durch Phosphorwolframsäure nicht fällbaren Spaltungsprodukte der Gelatine. Das erste, sowie die darauf folgenden Filtrate des von der Fällung der Gelatine-lösung durch Phosphorwolframsäure entstandenen Niederschlages wurden vereinigt und, behufs Bindung von freier Schwefel-säure und Salzsäure, mit Baryumhydrat in geringem Überschuß versetzt. Der Überschuß des letzteren wurde an Kohlensäure gebunden und die Flüssigkeit auf dem Dampfbade bei ca. 40 bis 50° C. bis zu ca. 4 l konzentriert. Hierauf wurde das kohlen-saure Baryum mit Schwefelsäure zersetzt, das gebildete schwefel-saure Baryum abfiltriert und die freigewordene Salzsäure durch frisch gefälltes Silberoxyd in Gegenwart von freier Schwefel-säure aus der Lösung entfernt. Das entstandene Chlorsilber wurde abfiltriert, der Überschuß an gelöstem Silber durch Schwefelwasserstoff, die Schwefelsäure durch Baryumhydrat (unter Vorbeugung eines Überschusses) aus der Lösung entfernt und das Filtrat von den hierdurch entstandenen Nieder-schlägen bei ca. 40° C. bis auf 3 l eingeengt. Die so erhaltene Lösung wurde «Lösung M» benannt. Diese Lösung enthielt:

Stickstoff	0,4 %	=	12	g in	3 l	der Lösung
Trockensubstanz	2,86%	=	85,8	» »	3 »	» »
Asche	0,18%	=	5,4	» »	3 »	» »
Organ. Substanz	2,68%	=	80,4	» »	3 »	» »

Mit den Lösungen M und B wurden die unten beschriebenen Reaktionen ausgeführt. Zu diesem Zwecke wurde die Lösung B, da sie größere Mengen an organischer Substanz enthielt, mit der entsprechenden Menge Wasser bis zum gleichen Gehalt mit der Lösung M an organischer Substanz verdünnt — Lösung B'.

Lösung M.

Lösung B'.

Reagens: 10 %ige Lösung der Phosphorwolframsäure.

1. 5 ccm der Lösung + 1 ccm 20% H ₂ SO ₄ + Wasser bis zu 40 ccm + 1 ccm des Reaktivs, tropfenweise hinzugefügt — leichte Opaleszenz.	5 ccm der Lösung + 1 ccm 20% H ₂ SO ₄ + Wasser bis zu 40 ccm + 1 ccm des Reaktivs — reichlicher flockiger Niederschlag. Bei weiterem
---	---

Durch Hinzufügen eines Tropfens der Lösung B' entsteht in der Mischung eine reichliche Trübung.

2. 5 ccm der Lösung + 5 ccm Wasser + 1 ccm 20% H_2SO_4 + 1 ccm des Reagens — sehr geringer, staubartiger, sich rasch zu Bodensetzender Niederschlag.

Hinzufügen des Reagens wird die Mischung in einen dicken Brei verwandelt.

Biuretreaktion.

1 ccm der Lösung + 9 ccm Wasser + 1 ccm 10% NaOH + 3 Tropfen 5% $CuSO_4$: rosenrote Färbung, die durch weiteres Hinzufügen von $CuSO_4$ in eine blau-violette übergeht.

1 ccm der Lösung + 9 ccm Wasser + 1 ccm 10% NaOH + 3 Tropfen 5% $CuSO_4$: anfangs eine schwache rosenrote Färbung. Bei weiterem Zusatz des $CuSO_4$ wird die Färbung eine intensiv rote.

Esbachs Reagens.

Die Lösung mit dem Reagens zu gleichen Teilen gemengt bleibt vollständig unverändert.

Die Lösung mit dem Reagens zu gleichen Teilen gemengt bildet einen reichlichen flockigen Niederschlag.

5%ige wässrige Sublimatlösung.

Bei tropfenweisem Hinzufügen des Reagens erleidet die Lösung keine Veränderung. Vorsichtiges Hinzufügen von 10% NaOH verursacht einen flockigen Niederschlag.

Das tropfenweise Hinzufügen des Reagens zu der Lösung verursacht einen reichlichen Niederschlag.

Rotes resp. blaues Lakmuspapier.

Schwach saure Reaktion.

Alkalische Reaktion.

Die Lösung M.

Um die Monoaminosäuren abzuscheiden, wurden mit der Lösung M folgende Operationen ausgeführt:

1. Ausscheidung der Monoaminosäuren durch Einengen der Lösung,
2. Ausscheidung der Monoaminosäuren in Form ihrer Kupfersalze,
3. Behandlung der Lösung mit β -Naphthalinsulfochlorid,
4. Benzoylieren der Lösung nach der Methode von Ch. Fischer und
5. Zersetzung der Lösung mit 20%iger Salzsäure.

Ausscheidung der Monoaminosäuren durch Einengen der Lösung. 500 ccm der Lösung M wurden anfänglich auf dem Dampfbade, nachher im Vakuumapparat bei Zimmertemperatur bis zur Sirupkonsistenz eingengt. Selbst nach dreiwöchentlichem Stehenlassen der eingengten Flüssigkeit (unter Ersatz des verdunsteten Wassers) war keine Krystallisation zu bemerken. Der Versuch, die Krystallisation durch Zusatz von Alkohol hervorzurufen, mußte als gescheitert angesehen werden. Folglich gelang es weder durch Einengen der Lösung an und für sich, noch durch Einengen unter Hinzufügen von Alkohol, irgend welche krystallisierbaren Produkte zu erhalten.

Ausscheidung der Monoaminosäuren in der Form ihrer Kupfersalze. 180 ccm der Lösung wurden auf ca. 100 ccm eingengt und der eingengten Lösung beim Erwärmen auf dem Wasserbade frisch gefälltes Kupferoxydhydrat im Überschuß hinzugefügt, wobei bemerkbar Kupferoxydhydrat gelöst wurde. Die intensiv blau gefärbte Mischung wurde heiß filtriert, der auf dem Filter gebliebene Überschuß des Kupferoxydhydrats mit heißem Wasser mehrmals durchgewaschen, die erhaltenen Filtrate vereinigt und bei 45—60° C. eingengt. Nach mehrwöchentlichem Stehenlassen der eingengten Flüssigkeit erfolgte keine Krystallisation.

Da die Isolierung der Monoaminosäuren nach dem Esterisierungsverfahren von E. Fischer mir insofern bedenklich erschien, daß das Verfahren schon an und für sich auf die Spaltungsprodukte der Lösung M energisch einwirken könnte, führte ich den weiteren Versuch der Isolierung der Monoaminosäuren durch Behandlung der Lösung mit β -Naphtalinsulfochlorid und durch Benzoylieren der letzteren nach Ch. Fischer aus.

Behandlung der Lösung mit β -Naphtalinsulfochlorid. Den Versuch, die Monoaminosäuren als β -Naphtalinsulfoprodukte zu isolieren, habe ich nach der Methode von E. Fischer und P. Bergell mit einigen Abänderungen von A. Ignatowsky¹⁾ in folgender Weise ausgeführt. 500 ccm der Lösung wurden durch Einengen auf ca. 100 ccm gebracht, der alkalisch gemachten Lösung 5 g β -Naphtalinsulfochlorid, gelöst

¹⁾ A. Ignatowsky, Diese Zeitschrift, Bd. XLII, S. 371.

in 50 g Äthyläther, hinzugefügt und 3 Stunden lang unter Erhaltung der alkalischen Reaktion geschüttelt. Darauf wurde der Mischung 2 mal zu je 3 g β -Naphtalinsulfochlorid in je 30 g Äthyläther gelöst hinzugefügt, wobei sie bei Einhaltung der alkalischen Reaktion je 3 Stunden lang geschüttelt wurde. Die so behandelte Mischung wurde zur Abscheidung der Ätherschicht stehen gelassen und die obere ätherische Schicht abgegossen. Die untere, wässrige Schicht wurde filtriert und mit Salzsäure, bis zur deutlichen Reaktion mit Kongo, versetzt, wobei eine milchige, gelbliche Trübung entstand. Die sauer reagierende, milchige Flüssigkeit wurde 2 mal je 3 Stunden mit gleichen Teilen Äther geschüttelt, die ätherischen Auszüge vereinigt und der Äther durch Destillation entfernt. Als Rückstand wurden geringe Mengen einer harzigen, dickflüssigen Masse der β -Naphtalinsulfoprodukte erhalten, welche zu den Lösungsmitteln folgendes Verhalten zeigte: 1. Der Rückstand löste sich nur teilweise in kochendem Wasser, wobei nach dem Erkalten der Lösung eine milchige Trübung entstand. 2. Der Rückstand ist, obgleich schwer, in heißem 20%igen Alkohol zu einer klaren, hellgelben Flüssigkeit löslich, die beim Erkalten der Lösung trübe wird. 3. In starkem Alkohol, Chloroform und Essigäther leicht löslich, in Äthyläther merkbar schwerer.

Die harzige Masse der β -Naphtalinsulfoprodukte wurde in geringer Menge heißen 20%igen Alkohols gelöst und in der Kälte der Krystallisation ausgesetzt. Selbst nach 10tägigem Stehenlassen hatte sich kein krystallinischer Niederschlag gebildet, woraus zu schließen wäre, daß in der betreffenden Lösung keine Monoaminosäuren als solche sich vorfanden.

Das Benzoylieren nach Ch. Fischer.²⁾ 500 ccm der Lösung M wurden auf dem Wasserbade bis auf ca. 100 ccm eingeengt und bei Beobachtung alkalischer Reaktion mit Benzoylchlorid geschüttelt. Letzteres wurde in Portionen von 5–10 g so lange hinzugefügt, bis der Geruch des Reagens bei weiterem Hinzufügen desselben noch verschwand. Es wurden in dem in Rede stehenden Falle 35 g Benzoylchlorid verbraucht. Aus der Mischung schieden sich amorphe, harzige Massen aus und

²⁾ Ch. Fischer, Diese Zeitschrift, Bd. XIX.

ein amorpher Niederschlag. Nach dem Hinzufügen von starker Salzsäure zu der Masse wurden die dadurch ausgeschiedene Benzoessäure und Benzoylprodukte mit Essigäther so lange ausgezogen, bis die Essigätherauszüge nach dem Verdunsten keinen merklichen Rest mehr hinterließen, was verhältnismäßig leicht zu erreichen ist. Die Essigätherauszüge wurden von dem Essigäther durch Destillation befreit und aus der zurückbleibenden Masse der Benzoylprodukte die Benzoessäure durch kochenden Petroläther entfernt. Es resultierte eine amorphe, harzige Masse, die zu den Lösungsmitteln folgendes Verhalten zeigte: 1. Leicht und vollständig in Chloroform löslich, was ohne Zweifel darauf hinweist, daß die Masse keine Hippursäure enthält. 2. Teilweise, wenn auch schwer, in kochendem Wasser löslich, wobei beim Erkalten der Lösung eine milchige Trübung entsteht, welche beim Erhitzen der Flüssigkeit verschwindet. Die Trübung klärte sich sofort bei Zusatz zu der Lösung Lauge. Der Zusatz einiger Tropfen Kupfersulfatlösung zu einer solchen alkalischen Lösung rief eine deutliche Biuretreaktion hervor. 3. In kaltem Äthyläther sehr schwer löslich, merkbar leichter in kochendem. 4. Löslich in 90°igem Alkohol.

Beim Ansäuern einer heißen wässerigen Lösung der Benzoylprodukte mit Schwefelsäure und Hinzufügen einer Lösung von Phosphorwolframsäure zu einer solchen Lösung entsteht ein staubfeiner, weißer Niederschlag.

Wenn man in Betracht zieht, daß das Glykokoll eines der Hauptbestandteile der Gelatine vorstellt, und daß es sich leicht benzoylieren und in Form von Hippursäure nach dem Verfahren von Ch. Fischer aus den Gemischen von anderen Benzoylprodukten der Monoaminosäuren leicht isolieren läßt, so muß man aus den negativen Resultaten der eben angeführten Benzoylierungsversuche schließen, daß die Lösung M kein Glykokoll, als solches, enthielt, und somit annehmen, daß bei der obigen Hydrolyse kein Glykokoll, und höchstwahrscheinlich auch keine anderen Monoaminosäuren entstehen. Die Resultate der vorhergehenden Versuche zur Abscheidung der Monoaminosäuren bestätigen den eben ausgesprochenen Schluß.

Es wäre nicht allzu gewagt, die Vermutung auszusprechen,

daß in der Lösung M stickstoffhaltige Produkte sich befinden, die als irgend welche Kombinationen der Monoaminosäuren anzusehen wären und bis zu einem gewissen Grade den von E. Fischer und Abderhalden¹⁾ bei der fermentativen Verdauung der Eiweißstoffe erhaltenen polypeptidartigen Stoffen ähneln. Von diesem Standpunkte ausgehend, versuchte ich die Produkte der Lösung M durch 20%ige Salzsäure zu spalten. Die Spaltung (einer bestimmten Menge der Lösung) geschah nach der üblichen Art in einem Kolben, welcher mit Rückflußkühler in Verbindung gebracht und auf dem Sandbade bis zum Sieden des Inhaltes erhitzt wurde, und zwar wurde in gegebenem Falle das Sieden der Flüssigkeit 35 Stunden lang fortgesetzt.²⁾ Hiernach wurde der Inhalt des Kolbens heiß filtriert, die Salzsäure durch Silberoxyd in Gegenwart von Schwefelsäure entfernt, das überschüssige gelöste Silber durch Schwefelwasserstoff und die Schwefelsäure durch Baryumhydrat entfernt. Die von den Niederschlägen durch Filtration befreite, klare Lösung wurde bis auf 1 l eingengt und als «Lösung R» bezeichnet. Letztere enthielt 0,5% Stickstoff.

250 ccm der Lösung R wurden bis zur Sirupkonsistenz eingengt. Nach etwa 15 stündigem Stehenlassen schieden sich in der Kälte aus der Lösung Krystalle in Form von leucinähnlichen Kugeln und vereinzelt, dünnen Nadeln aus.

Auch bei der Verarbeitung der Lösung nach dem oben beschriebenen Verfahren mit Kupferoxydhydrat und bei entsprechendem Einengen des Filtrates entstand ein krystallinischer Niederschlag, aus kleinen Kugeln und einzelnen Nadeln bestehend.

Nachdem ich mich über die Anwesenheit von krystallisierbaren Produkten in der Lösung R überzeugt hatte, unterwarf ich einen Teil der Lösung — genau 250 ccm, welche auf ca. $\frac{1}{5}$

¹⁾ E. Fischer etc., Diese Zeitschrift, Bd. XXXIX, S. 81 und Bd. XL, S. 215.

²⁾ Wie die nachfolgenden Versuche der Zersetzung ähnlicher Produkte der Albumosen und des Hämoglobins mit 20% H_2SO_4 zeigten, war das Sieden in gegebenem Falle — 35 Stunden — ein viel zu andauerndes. Es ist sehr wahrscheinlich, daß ein kurzandauerndes Sieden — 3—5 Stunden — vollständig genügt hätte, um die Zersetzung der Hydratationsprodukte der Gelatine zu bemerken.

Volumen eingedampft wurden — der Benzoylierung nach dem oben beschriebenen Verfahren von Ch. Fischer. Es wurden 38 ccm Benzoylchlorid verbraucht. Die nach dem Abdestillieren des Essigäthers erhaltene Masse der Benzoylprodukte wurde, ohne die Benzoessäure durch Petroläther zu entfernen, in Chloroform gelöst, wobei ein Teil derselben leicht in Lösung überging, ein anderer, geringerer Teil als weißes Pulver ungelöst an der Oberfläche des Chloroforms sich ansammelte — aller Wahrscheinlichkeit nach Hippursäure. Nach 15 stündigem Stehenlassen der Chloroformlösung im Kalten wurde der ungelöste Teil auf Filter gesammelt, sorgfältig mit Chloroform ausgewaschen und im Vakuumexsikkator bei Zimmertemperatur getrocknet. Es wurden 3,65 g Substanz vom Schmelzpunkt 182° C. erhalten. Die Substanz wurde aus einer heißen wässrigen Lösung unter Zusatz von Kohle umkrystallisiert und im Vakuumexsikkator getrocknet. Der Schmelzpunkt dieser getrockneten Krystalle — es wurden 3 Bestimmungen vorgenommen — schwankte zwischen $186,5$ — $187,5^{\circ}$ C., was mit dem Schmelzpunkt der Hippursäure übereinstimmt. Zur vollen Identifizierung der in Rede stehenden Substanz mit der Hippursäure wurde erstere auf ihren Stickstoffgehalt geprüft.

1. Bestimmung. 0,682 g der Substanz.

Gefunden: Berechnet für $C_9H_9NO_4$:

7,69 % N. 7,82 % N.

2. Bestimmung. 0,5315 g der Substanz.

Gefunden: 7,67 % N.

Aus den Resultaten der Schmelzpunkt- und Stickstoffbestimmungen geht hervor, daß die genannte Substanz, in ihrer gereinigten Form, als Hippursäure aufzufassen ist.

In der Probe der Lösung R, welche der Benzoylierung unterworfen worden war, wurde der Stickstoff der in die Essigauszüge nicht übergegangenen Produkte bestimmt. Es erwies sich, daß die Menge des Stickstoffs 0,07 g betrug.

Die die Benzoessäure und die Benzoylprodukte enthaltende Chloroformlösung wurde nach der Entfernung der Hippursäure durch Hinzufügen von Chloroform auf 245 ccm gebracht und in ihr der Stickstoff bestimmt. Die Menge des letzteren betrug 0,9187 g in 245 ccm der Lösung.

Da das zur Benzoylierung genommene Volumen — 250 ccm — der Lösung R 1,25 g Stickstoff enthielt, so folgt aus den oben angeführten analytischen Daten der Stickstoffbestimmung, daß auf den Anteil des Glykokolls $1,25 - (0,918 + 0,07) = 0,262$ g Stickstoff kommt, was der Berechnung nach 1,4 g Glykokoll, oder 3,34 g Hippursäure entspricht. Wie aus dem bereits oben Gesagten ersichtlich ist, wurden von mir 3,65 g Rohprodukt der Hippursäure ausgeschieden, was der theoretischen Berechnung sehr nahe kommt (3,34), wenn man noch in Betracht zieht, daß man hier mit einem Rohprodukt zu tun hat.

Nach Hausmann¹⁾ kommen auf den Anteil des Monoaminostickstoffs 62,5% der Gesamtstickstoffmenge des Moleküls der Gelatine. Weiter enthält die Gelatine 18% Gesamtstickstoff und nach E. Fischer höchstens 16,5% Glykokoll. Es folgt hieraus, daß auf je 100 g Monoaminostickstoff 27,2 g Stickstoff des Glykokolls gerechnet werden müssen. Aus meinen analytischen Daten ist zu ersehen, daß dem Benzoylierungsprozeß $1,25 \text{ g} - 0,07 \text{ g} = 1,18 \text{ g}$ Stickstoff zufällt, aus welchen 0,262 g Stickstoff in Form von Hippursäure ausgeschieden wurde. Folglich enthielt die Lösung M solche Spaltungsprodukte, deren Stickstoffmenge ca. 22% Glykokollstickstoff enthält. Daraus ist zu schließen, daß die Spaltungsprodukte der Lösung M hauptsächlich resp. fast ausschließlich aus den in der Gelatine vorkommenden Monoaminverbindungen bestanden.

Aus den Versuchen mit der Lösung M kann man folgende Schlüsse ziehen:

1. Das Glykokoll, als solches, und höchstwahrscheinlich auch andere Monoaminosäuren, als solche, befanden sich nicht in der Lösung M.

2. Diese Lösung enthält Produkte, welche sich durch folgende Eigenschaften charakterisieren:

a) Durch die Phosphorwolframsäure werden sie nur in mehr oder weniger unverdünnten Lösungen (1 : 75) in der Form eines eigenartigen, bei der Beschreibung der Reaktion der Lösung angeführten Niederschlages gefällt; — in verdünnteren Lösungen

¹⁾ Hausmann, Diese Zeitschrift, Bd. XXVII, S. 95.

(1 : 300) erzeugt das genannte Reagens nur eine schwache Opaleszenz,

- b) die genannten Produkte geben die Biuretreaktion,
- c) werden durch Esbachs Reagens und Sublimatlösung nicht gefällt,
- d) lösen Kupferoxydhydrat,
- e) geben β -Naphthalinsulfoprodukte und Benzoylprodukte mit den oben beschriebenen Eigenschaften und
- f) reagieren sauer auf Lackmus.

3. Aller Wahrscheinlichkeit nach enthält die Lösung M Produkte des Eiweißzerfalls vom Typus der Monoaminosäuren; es ist sehr möglich, daß die Monoaminosäuren in der besprechenden Lösung als irgendwelche Kombinationen vertreten waren, bis zu einem gewissen Grade analog den polypeptidartigen Stoffen E. Fischers und E. Abderhaldens (l. c.). Diese Kombinationen können verhältnismäßig leicht durch 20%ige Salzsäure gespalten werden und geben bei solcher Spaltung beinahe die theoretische Ausbeute an Glykokoll, was darauf hinweisen könnte, daß die genannte Lösung fast ausschließlich aus Kombinationen verschiedener Monoaminosäuren besteht.

4. Die Gelatine erleidet bei der in Rede stehenden Hydrolyse somit eine Spaltung bis zur Bildung der Produkte der Lösung M.

Eiweißstoffe des Pferdeblutserums.

A. Feuchte, koagulierte Eiweißstoffe des Pferdeblutserums.

Zur Darstellung dieses Präparates wurden 15 l frisches, defibriniertes Pferdeblut für 2 mal 24 Stunden an einem kühlen Ort abstehen gelassen, wonach das so geklärte Serum mit Hilfe eines Hebers von der unteren Blutkörperchenschicht abgetrennt, mit 5 Teilen Wasser gemischt und bei schwachem Ansäuern mit Essigsäure auf dem Wasserbade bis 75—80° C. erhitzt und 15 Minuten lang bei dieser Temperatur gehalten wurde. Die erhaltene Masse der koagulierten Eiweißstoffe wurde auf ein Seihtuch gebracht, mehrmals mit größeren Mengen kochenden, gewöhnlichen Wassers, zuletzt 2 mal mit kochendem destilliertem Wasser gewaschen und wiederum auf ein Seihtuch

gebracht. Die so erhaltenen koagulierten Eiweißstoffe wurden im Mörser mit 12 l 0,5%iger Salzsäure verrieben, die Mischung in eine geräumige Flasche gebracht und unter Zusatz von Chloroform den 26. X. 1904 im Thermostaten bei 36—38° C. zur Digestion hingestellt. Hierbei muß bemerkt werden, daß vom 20. XII. 1904 bis zum 10. I. 1905 und vom 27. IV. 1905 bis zum 3. IX. 1905 die Mischung bei Zimmertemperatur gestanden hat. Außerdem muß hinzugefügt werden, daß den 12. XII. 1904 10 l der erwähnten Mischung mit 5 l 0,5%iger Salzsäure gemischt wurden und diese Mischung zur weiteren Digestion bei 36—38° C. in den Thermostaten gestellt wurde.

Tabelle 4.

	Menge des zur N-Bestimmung genommenen Filtrates ccm	Menge der an NH ₃ gebundenen $\frac{n}{10}$ -H ₂ SO ₄ in der Vorlage ccm	Menge des Stickstoffs in 100 Teilen Filtrat g
26. X. 1904	50	2,6	= 0,0076
	20	1	= 0,0073
5. XI. 1904	50	15,7	= 0,046
	50	15,6	
18. XI. 1904	25	18	= 0,105
	25	18	
30. XI. 1904	20	21	= 0,15
	10	10,3	
14. XII. 1904	10	11,4	= 0,167
	10	11,5	
14. I. 1905	10	18,2	= 0,265
29. I. 1905	10	18,2	= 0,265
18. II. 1905	10	18,2	= 0,265
16. III. 1905	10	18,3	= 0,266
27. IV. 1905	10	18,2	= 0,265

Anmerkung: Der Titer von 1 ccm n_{10} -H₂SO₄ bis zum 18. XI. 1904 entspricht 0,00147 g Stickstoff; der Titer von 1 ccm dieser Säure in den übrigen Proben entspricht 0,00146 g N. Dieselben Daten haben auch für die Tabelle 5 Gültigkeit.

Aus der Tabelle 4 ist zu ersehen, daß feuchte koagulierte Eiweißkörper des Pferdeblutserums beim andauernden Digerieren mit 0,5%iger Salzsäure bei 36—38° C., in Gegenwart von Chloroform, allmählich in Lösung übergehen und nach ca. 54 Tagen vollständig gelöst sind.

Von Zeit zu Zeit wurden der Mischung einzelne Proben entnommen, filtriert und das erhaltene Filtrat nach dem bei der Gelatine angegebenen Verfahren auf den Gehalt an Gesamt- und Monoaminostickstoff quantitativ geprüft. Die Resultate dieser Bestimmungen sind aus den Tabellen 4 und 5 zu ersehen, wobei die erste Tabelle den Gehalt an Gesamt-, die zweite an Monoaminostickstoff angibt.

Tabelle 5.

	Proben	Menge der an NH ₃ gebundenen n_{10} -H ₂ SO ₄ in der Vorlage	Menge des Monoaminostickstoffs in 100 ccm der Gelatinelösung
27. X. 1904	1. Probe: 200—250 ccm. Zur N-Bestimm. 50 ccm genommen.	—	—
	2. Probe: 200—250 ccm. Zur N-Bestimm. 100 ccm genommen.	—	—
15. I. 1905	1. Probe: 50—500 ccm. Zur N-Bestimmung 150 ccm genommen.	1,7 ccm	0,016 g = 6% des Gesamtstickstoffs.
	2. Probe: 100—500 ccm. Zur N-Bestimm. 150 ccm genommen.	2,8 >	0,013 g = 4,9% des Gesamtstickstoffs.
29. I. 1905	50—500 ccm. Zur N-Bestimmung 150 ccm genommen.	2,9 ccm	0,028 g = 10,5% des Gesamtstickstoffs.
18. II. 1905	50—500 ccm. Zur N-Bestimmung 150 ccm genommen.	3,4 ccm	0,033 g = 12,45% des Gesamtstickstoffs.
16. III. 05	50—500 ccm. Zur N-Bestimmung 150 ccm genommen.	4,2 ccm	0,04 g = 15% des Gesamtstickstoffs.
27. IV. 05	25—250 ccm. Zur N-Bestimmung 150 ccm genommen.	5,5 ccm	0,053 g = 20% des Gesamtstickstoffs.

Die Tabelle 5 zeigt, daß bei der erwähnten Digestion die koagulierten Eiweißkörper des Pferdeblutserums eine allmähliche Spaltung unter Entstehung von durch Phosphorwolframsäure nicht fällbaren, stickstoffhaltigen Substanzen vor sich geht; im Verlauf von ca. 160 Tagen hat die betreffende Spaltung einen solchen Grad erreicht, daß die Stickstoffmenge der genannten Produkte ca. 20% der Menge des Gesamtstickstoffs dieser Eiweißkörper darstellt.

Den 8. II. 1905 und 26. IV. 1905 wurde die Lösung quantitativ nach der bei Gelatine besprochenen Methode auf freie Salzsäure geprüft. Im ersten Fall betrug die Menge der freien Säure 0,27%, im zweiten 0,23%.

Auf Anwesenheit von proteolytischem Ferment wurde die Mischung nach Mett, und zwar mit negativem Resultat, geprüft: der Inhalt der Mettschen Zylinder blieb 44 Tage unverändert (15. I. 1905 bis 1. III. 1905).

Nach ca. 160 Tagen wurde die Digestion der bereits schon gelösten Eiweißsubstanzen unterbrochen. Die aus dem Thermostaten genommene, deutlich nach Chloroform riechende Lösung wurde filtriert, 10 l des Filtrats mit gleichen Teilen Wasser gemischt und in Gegenwart von 0,5% iger Schwefelsäure mit Phosphorwolframsäure gefällt. Der entstandene Niederschlag wurde alsdann mit Wasser gewaschen, mit Baryumhydrat bei ca. 40° C. zersetzt, der dadurch entstandene Niederschlag abfiltriert, das Filtrat mit Kohlensäure gesättigt, auf die Hälfte eingedampft, das Baryum durch Schwefelsäure genau entfernt, abfiltriert und bei 40° C. auf 3,4 l eingengt — Lösung B.

Diese Lösung enthielt:

Stickstoff	0,372%	= 12,65 g in 3,4 l der Lösung
Trockensubstanz	2,48%	= 84,32 » » 3,4 l » »
Asche	0,032%	= 1,088 » » 3,4 l » »
Organ. Substanz	2,448%	= 83,232 » » 3,4 l » »

In der Lösung B wurden die durch schwefelsaures Ammon nicht fällbaren Produkte nach Kühne quantitativ bestimmt, und zwar auf folgende Weise: 2043 ccm der Lösung B, mit einem Gehalt von 7,5 g Stickstoff, wurden auf $\frac{1}{5}$ ihres Volumens eingengt, die eingengte Lösung beim Erhitzen auf 102° C.

mit Ammoniumsulfat gesättigt, die dabei ausgesalzenen Albumosen durch Filtration der heißen Mischung getrennt, in heißem Wasser gelöst, nach der obigen Art bei 102° C. ausgesalzen und wieder heiß filtriert. Die auf dem Filter gebliebene Masse — Albumosen — wurde in eine entsprechende Menge Wasser gelöst, die erhaltene Lösung durch Baryumhydrat von schwefelsaurem Ammonium befreit und der dabei sich entwickelnde Ammoniak durch Eindampfen der Lösung vollständig verjagt. Nach dem Abfiltrieren des Baryumsulfats wurde die Lösung bis auf 500 ccm eingeeengt. Nach der Stickstoffbestimmung erwies es sich, daß die Lösung — 500 ccm — 4,95 g Stickstoff enthält, was 34% der Gesamtstickstoffmenge der zum Versuch genommenen Lösung beträgt.

Es ist aus diesem Versuch ersichtlich, daß bei andauernder Digestion der betreffenden Eiweißstoffe mit 0,5%iger Salzsäure unter obigen Bedingungen nicht nur Albumosen, sondern auch Amphopepton Kühne gebildet wird.

Die durch Phosphorwolframsäure nicht fällbaren Produkte.

Die Filtrate von dem durch Fällung mit Phosphorwolframsäure erhaltenen Niederschlag wurden, wie bei der Gelatine erwähnt, auf folgende Weise behandelt: die freie Salz- und Schwefelsäure wurde durch Baryumhydrat in geringem Überschuß gebunden, der Überschuß des letzteren durch Kohlensäure entfernt und die Mischung bis auf 3 l eingedampft. Der Baryt wurde aus der eingeengten Lösung durch Schwefelsäure, die Salzsäure durch Silberoxyd in Gegenwart von Schwefelsäure und letztere durch Baryumhydrat entfernt. Das schwefelsaure Baryum wurde abfiltriert, das erhaltene Filtrat bei 40—45° C. auf 2,26 l eingeeengt und als «Lösung M» bezeichnet. Die Lösung M enthielt:

Stickstoff	0,2%	=	4,52 g	in	2,26 l	Lösung
Trockensubstanz	1,5%	=	33,9	>	>	2,26 l >
Asche	0,07%	=	1,58	>	>	2,26 l >
Organ. Substanz	1,43%	=	32,32	>	>	2,26 l >

Mit den Lösungen B und M wurden unter den bei der Gelatine beschriebenen Bedingungen folgende Reaktionen ausgeführt:

Lösung B'.

Lösung M.

Reagens: 10%ige Phosphorwolframsäurelösung.

10 ccm der Lösung + 1 ccm 20% H_2SO_4 + 3 ccm des Reagens, tropfenweise hinzugefügt — reichlicher, flockiger Niederschlag. Beim Verdünnen der Mischung mit Wasser bis zu 50 ccm nahm der Niederschlag nach 24stündigem Stehen ein Volumen von ca. 11 ccm ein.

10 ccm der Lösung + 1 ccm 20% H_2SO_4 + 3 ccm des Reagens, tropfenweise hinzugefügt — entsteht ein schwerer, feiner Niederschlag. Beim Verdünnen der Mischung mit Wasser bis 50 ccm nahm der Niederschlag nach 24stündigem Stehen ein Volumen von ca. 0,5 ccm ein.

Die Biuretreaktion.

10 ccm der Lösung + 1,5 ccm 10% $NaOH$ + 5% $CuSO_4$, tropfenweise hinzugefügt — rosenrote Färbung, welche, als solche, beim Hinzufügen von $CuSO_4$ in unbedeutendem Überschuß unverändert bleibt.

10 ccm der Lösung + 1,5 ccm 10% $NaOH$ + 5% $CuSO_4$, tropfenweise hinzugefügt — rosenrote Färbung, welche beim weiteren Hinzufügen von $CuSO_4$ in eine blaue übergeht.

Millons Reagens.

10 ccm der Lösung + 5 Tropfen des Reagens — es entsteht ein Niederschlag, welcher beim Erwärmen eine ziegelrote Färbung annimmt.

10 ccm der Lösung + 5 Tropfen des Reagens gibt leichte Trübung. Beim Erwärmen bildet sich ein ziegelroter Niederschlag.

Schwefelsaures Ammonium in Substanz.

Reagens im Überschuß — reichlicher, flockiger Niederschlag.

Reagens im Überschuß — sehr schwache Trübung; durch Hinzufügen von Essigsäure keine Veränderung merkbar, auch beim Kochen der Lösung nicht.

Esbachs Reagens.

Die Lösung zu gleichen Teilen mit dem Reagens — reichlicher Niederschlag.

Die Lösung zu gleichen Teilen mit dem Reagens vermischt — keine Veränderung bemerkbar.

5%ige wässrige Sublimatlösung.

Das zu der Lösung tropfenweise hinzugefügte Reagens ruft einen reichlichen, flockigen Niederschlag hervor.

Das zu der Lösung tropfenweise hinzugefügte Reagens ruft in ersterer keine Veränderung hervor. Fügt man zu der Mischung vorsichtig einige Tropfen 10% NaOH hinzu, so entsteht ein flockiger Niederschlag.

Rotes und blaues Lackmuspapier.

Deutlich alkalische Reaktion.

Schwach saure Reaktion.

Ausscheidung der Monoaminosäuren durch Einengen der Lösung M. Der Versuch, die krystallisierbaren Produkte durch Einengen der Lösung M auszuscheiden, blieb resultatlos. Selbst nach monatlichem Stehenlassen der eingeengten Lösung (unter Vorbeugung des Austrocknens) sowie unter Beihilfe von Alkohol wurde keine Krystallisation beobachtet. Die eingeengte Lösung reagierte mit Lackmus sauer, gab aber keine Reaktion mit Kongo.

Ausscheidung der Monoaminosäuren in Form ihrer Kupfersalze. Zu diesem Zweck wurden 500 ccm der Lösung auf ca. 50 ccm eingeengt und, wie bei Gelatine erwähnt, mit frischgefälltem Kupferoxydhydrat im Überschuß behandelt. Die vereinigten, intensiv blau gefärbten Filtrate wurden bis $\frac{1}{3}$ des Volumens bei ca. 50° C. eingeengt. Nach 5 tägigem Stehenlassen der eingeengten Flüssigkeit schieden sich aus derselben lange, fadenförmige Krystalle aus. Der krystallinische Niederschlag wurde abfiltriert, mit kaltem Wasser gewaschen und portionsweise in ca. 200 ccm kochendes Wasser bis auf einen äußerst schwer in kochendem Wasser löslichen Rückstand gelöst; letzterer bestand fast ausschließlich aus Kugeln, welche scheinbar aus radial gruppierten Nadeln gebildet waren. Die beim Kochen erhaltene Lösung der Kupferverbindungen wurde heiß filtriert; es schied sich schon aus der warmen Lösung ein krystallinischer Niederschlag aus, welcher nach 24 stündigem Stehenlassen in der Kälte abfiltriert und mit kaltem Wasser gewaschen wurde. Dieser Niederschlag bestand aus langen, dünnen Nadeln, einzelnen oder in Büscheln gruppierten kürzeren Nadeln und kugel-

förmigen Krystallgebilden. Der genannte Niederschlag wurde anfangs im Vakuumexsikkator, nachher bis zum konstanten Gewicht bei 110—115° C. getrocknet, wobei ein Verlust des Gewichts von ca. 17% zu verzeichnen war — wie zu ersehen, enthielt das Objekt Krystallisationswasser. In der genannten Kupferverbindung wurde Stickstoff und Kupfer bestimmt. Zur ersteren Bestimmung wurden 0,216 g Substanz genommen.

Gefunden: 6,82% N.

Zur Kupferbestimmung wurden 0,2205 g Substanz genommen.

Gefunden: 29,3% Cu.

Die eben angeführten analytischen Daten kommen denen des wasserfreien Kupfersalzes der Glutaminsäure sehr nahe:

Gefunden:	Berechnet für $\text{CuC}_5\text{H}_7\text{NO}_4$:
6,82% N	6,7% N
29,3% Cu.	30,4% Cu.

Der niedrige Kupfer- und der erhöhte Stickstoffgehalt sprechen dafür, daß die von mir isolierte Kupferverbindung nicht chemisch reines Kupfersalz der Glutaminsäure vorstellt, sondern daß letztere mit kleinen Mengen einer Kupferverbindung anderer Monoaminosäuren — höchst wahrscheinlich Leucin — verunreinigt ist.

Da die erhaltene Menge der Kupferverbindung sich als ungenügend erwies, um eine Kontrollanalyse auszuführen, so wurde aus einem anderen Teile der Lösung M, nämlich aus 800 ccm derselben, nach dem beschriebenen Verfahren eine neue Menge des Kupfersalzes ausgeschieden und bei 110—115° C. bis zum konstanten Gewicht getrocknet, wobei ein Verlust von ca. 16% des ursprünglichen Gewichtes zu verzeichnen war. Es wurden 0,267 g der getrockneten Kupferverbindung zur Stickstoffbestimmung und 0,306 g zur Bestimmung des Kupfergehaltes benutzt.

Gefunden: 6,94% N
29,7% Cu.

Abgesehen von den geringen Beimengungen anderer Monoaminosäuren muß die isolierte Kupferverbindung laut den analytischen Daten als die der Glutaminsäure angesprochen wer-

den, woraus zu schließen ist, daß die Lösung M Glutaminsäure, als solche, enthielt. Es folgt somit, daß die Eiweißstoffe des Pferdeblutserums bei andauernder Hydrolyse derselben mit 0,5% HCl bei 36—38° C. eine Spaltung erleiden, wobei die Bildung der Monoaminosäuren, wenigstens der Glutaminsäure, als solcher, zu konstatieren ist.

Spaltung der Lösung M durch 20%ige H_2SO_4 . Die Mutterlauge von der zur Analyse isolierten Kupferverbindung wurde zur weiteren Krystallisation stehen gelassen, wobei jedoch nach einem zweiwöchentlichem Stehenlassen keine Krystallisation erfolgte. Die durch Schwefelsäure angesäuerte Lösung wurde durch H_2S zersetzt, von dem entstandenen Schwefelkupfer abfiltriert und von H_2S durch Erwärmen befreit. Es wurden 200 ccm strohgelben Filtrats erhalten, welches eine deutliche, rosenrote Biuretreaktion gab. Das erhaltene Filtrat wurde auf dem Sandbade in einem mit Rückflußkühler versehenen Kolben mit 20%iger Schwefelsäure 3 Stunden lang gekocht, wonach die Schwefelsäure durch Baryumhydrat genau entfernt, und das entstandene Sulfat abfiltriert wurde. Das Filtrat gab keine Biuretreaktion. Beim Einengen des Filtrates schieden sich größere und kleinere leucinähnliche Kugeln und dem Tyrosin gleiche Büschel aus. Daraus ist zu ersehen, daß die Lösung M, außer den Monoaminosäuren, als solchen, noch, und zwar hauptsächlich, solche stickstoffhaltigen Spaltungsprodukte der Eiweißkörper enthielt, welche sehr leicht beim Kochen derselben mit 20%iger Schwefelsäure in freie Monoaminosäuren sich spalten: ein 3ständiges Sieden der Lösung genügte, um die Biuretreaktion derselben zum Verschwinden zu bringen und die genannten Produkte in krystallisierbare Verbindungen — Monoaminosäuren — zu spalten. Bei der oben beschriebenen Hydrolyse der in Rede stehenden Eiweißkörper entstehen also Monoaminosäurekomplexe, welche sehr leicht durch 20%ige H_2SO_4 in ihre Bestandteile — freie Monoaminosäuren — sich spalten zu lassen.

B. Getrocknete, koagulierte Eiweißstoffe des Pferdeblutserums.

Um bis zu einem gewissen Grade die Frage aufzuklären, wie sich getrocknete Eiweißkörper zur Wirkung von 0,5%iger Salzsäure bei 36—38° C. verhalten, wurden mit solchen Eiweißkörpern des Pferdeblutserums einige Versuche ausgeführt, wobei parallel mit diesen Versuchen auch solche mit feuchten Eiweißkörpern des betreffenden Serums geführt wurden.

Zu diesen Versuchen wurden 2 l frischen Pferdeblutserums, welche mit der zweifachen Menge Wasser verdünnt, bis 70° C. erwärmt und $\frac{1}{2}$ Stunde bei 70—90° C. gehalten wurden, verwandt. 150 g der vorher mehrmals mit heißem destillierten Wasser durchgewaschenen feuchten Eiweißkörper wurden mit 1,5 l 0,5%iger Salzsäure verrieben und bei 36—38° C. im Thermostaten zur Digestion aufgestellt. Ein anderer Teil solcher, mehrmals durchgewaschener, Eiweißkörper wurde anfangs auf dem Wasserbade, nachher 12 Stunden bei 103—105° C. getrocknet. 40 g der getrockneten, feingepulverten Eiweißkörper wurden gleichfalls mit 2 l 0,5%iger Salzsäure verrieben und bei 36—38° C. digeriert. Während nach zirka einmonatlichem Stehenlassen der feuchten Eiweißkörper das Filtrat derselben eine sehr schwache Biuretreaktion gab, zeigte das Filtrat der zur Digestion aufgestellten, getrockneten Eiweißkörper im Verlauf dieser Zeit eine intensive rotviolette Biuretreaktion an. Nach zweimonatlichem Stehenlassen der feuchten und getrockneten Eiweißkörper war die betreffende Reaktion der ersteren Eiweißkörper deutlich violettrot, wogegen die Reaktion der letzteren eine intensiv himbeerrote Färbung zeigte. Nach zirka dreimonatlicher Digestion gingen sowohl die feuchten, als auch die getrockneten Eiweißkörper in Lösung über, wobei die Lösung der ersteren eine dunkel strohgelbe Färbung, die Lösung der letzteren dunkelbraune Färbung zeigte. In beiden Lösungen wurde sowohl der Gesamt-, wie auch der Monoaminostickstoff bestimmt. In der Lösung der feuchten Eiweißkörper wurde 0,23% Gesamtstickstoff und 0,023% Monoaminostickstoff gefunden — also betrug die Menge des Monoaminostickstoffs etwa 10% der Menge des Gesamtstickstoffs.

Die Lösung der betreffenden getrockneten Eiweißkörper enthielt: 0,369% Gesamtstickstoff und 0,038% Monoaminostickstoff, — also betrug die Menge des letzteren etwa 10,2% der Gesamtstickstoffmenge der betreffenden Lösung.

Aus den eben angeführten parallelen Versuchen mit feuchten und getrockneten koagulierten Eiweißkörpern des Pferdeblutserums ist zu schließen, daß:

1. Die bei 103—105° C. getrockneten, vorher koagulierten Eiweißkörper des Pferdeblutserums bei andauerndem Digerieren derselben mit 0,5% iger Salzsäure bei 36—38° C. vollständig in Lösung übergehen und einer allmählichen Spaltung anheimfallen, wobei stickstoffhaltige, durch Phosphorwolframsäure nicht fällbare Produkte gebildet werden. Solche Spaltung unter Bildung der eben erwähnten Produkte scheint bei den betreffenden getrockneten Eiweißkörpern nicht energischer vor sich zu gehen, als das bei den feuchten Eiweißkörpern zu beobachten ist — wenigstens kann man dies aus der Menge der Spaltungsprodukte vom Typus der Monoaminosäuren schließen.

2. Die Lösung der koagulierten Eiweißkörper des Pferdeblutserums in 0,5% iger Salzsäure bei 36—38° C. geht, wie es scheint, leichter dann von statten, wenn sie einem vorhergehenden Trocknen unterworfen, als wenn sie feucht mit der betreffenden Säurelösung digeriert werden.

3. Die Bemerkung L. Langsteins:¹⁾ «1% ige Schwefelsäure vermag, bei einer Temperatur von 37°, fein gepulvertes, bei 100° getrocknetes krystallinisches Eieralbumin auch in Monaten nicht zu lösen» dürfte nach diesen meinen Versuchen skeptisch aufzufassen sein und müßte einem kritischen Kontrollversuch unterworfen werden.

Casein.

Die Darstellung dieses Präparats wurde folgenderweise vorgenommen. Zentrifugierte Kuhmilch wurde mit gleichen Teilen Wasser verdünnt und das Casein durch schwache Essigsäure ausgefällt. Die erhaltenen Niederschläge wurden mit Wasser sorgfältig gewaschen, durch ein Tuch geseiht und zuletzt

¹⁾ L. Langstein, Diese Zeitschrift, Bd. XXXIX, S. 208—209.

mit Wasser angerührt, auf dem Wasserbade koaguliert und bei Koagulationstemperatur 15—20 Minuten lang erwärmt. Das Casein wurde alsdann mit 0,2%iger Natronlauge verrieben, darin gelöst und die erhaltene Lösung filtriert. Aus dem Filtrate wurde das Casein mit Salzsäure ausgeschieden, mit destilliertem Wasser sorgfältig gewaschen und der Niederschlag auf Seihtuch abgepreßt. 1500 g des feuchten Caseins wurden mit 12 l 0,5%iger Salzsäure verrieben und in einer geräumigen, gut verschließbaren Flasche mit Chloroform den 1. X. 1904 im Thermostaten bei 36—38° C. digeriert.

Gleichzeitig wurde die Mischung auf ihre proteolytische Verdauungsfähigkeit nach Meth geprüft. Die mit der Mischung aufgestellten Eiweißzylinder blieben nach zirka einmonatlichem Einwirken ungelöst.

Von Zeit zu Zeit wurde in dem Filtrate der zum Versuche entnommenen Proben der digerierenden Caseinmischung der Gesamtstickstoff (Tabelle 6) und der Monoaminostickstoff (Tabelle 7) bestimmt.

Es muß bemerkt werden, daß die Caseinmischung vom 20. XII. 1904 bis zum 14. I. 1905 bei Zimmertemperatur stand.

Aus den in den Tabellen 6 und 7 angeführten Daten folgt, daß:

1. Das Casein der Kuhmilch bei Digestion desselben mit mit 0,5%iger Salzsäure bei 36—38° allmählich in Lösung übergeht.

2. Außerdem zeigt die Tabelle 7, daß es bei der erwähnten Digestion eine Spaltung unter Bildung von durch Phosphorwolframsäure nicht fällbaren, stickstoffhaltigen Produkte erleidet; die relative Stickstoffmenge solcher Produkte erreichte nach ca. 95 tägiger Digestion etwa 37% der Gesamtstickstoffmenge des Filtrats.

Den 20. I. 1905 wurde in dem Filtrate der Caseinmischung die freie Salzsäure nach der oben erwähnten Methode bestimmt, wobei 0,3% der freien Säure gefunden wurde. Zur Wiederherstellung der anfänglichen freien Salzsäuremenge (0,5%) wurde der Mischung den 21. I. 1905 die dazu nötige Menge der genannten Säure hinzugefügt.

Den 7. II. 1905 wurde die Hydrolyse des Caseins unter-

brochen. Ein Teil des Caseins war bis zu dieser Zeit ungelöst geblieben. Aus unvorhergesehenen Gründen, welche zum Verlust der Caseinmischung führten, konnten weitere Versuche mit derselben nicht ausgeführt werden.

Tabelle 6.

	Menge des zur N-Bestimmung genommenen Filtrates ccm	Menge der an NH_3 gebundenen $\frac{n}{10}\text{-H}_2\text{SO}_4$ in der Vorlage ccm	Menge des Stickstoffs in 100 Teilen des Filtrates g
16. X. 1904	50	30,3	0,089
	50	30,2	
22. X. 1904	50	35,3	0,103
	50		
6. XI. 1904	50	37,3	0,110
	25	18,3	
18. XI. 1904	25	19,2	0,115
	25		
1. XII. 1904	20	16,7	0,124
	20	16,5	
14. XII. 1904	10	8,6	0,126
	10		
1. I. 1905	10	9	0,131
	10	9,1	
1. II. 1905	10	9,2	0,134

Anmerkung: Der Titer von 1 ccm $\frac{n}{10}\text{-H}_2\text{SO}_4$ bis zum 18. XI. 1904 entspricht 0,00147 g N; der Titer von 1 ccm dieser Säure in den übrigen Proben = 0,00146 g N. Dieselben Daten haben auch für die Tabelle 7 Gültigkeit.

Tabelle 7.

	Proben	Menge der an NH_3 gebundenen $\frac{n}{10}\text{-H}_2\text{SO}_4$ in der Vorlage	Menge des Monoaminostickstoffs in 100 ccm des Filtrates
15. I. 1905	1. Probe: 35—250 ccm. Zur N-Bestimmung 100 ccm genommen.	4,3 ccm	0,045 g = 34,6% Gesamtstickstoff in dem Filtrat
	2. Probe: 35—250 ccm. Zur N-Bestimmung 100 ccm genommen.	4,2 "	
1. II. 1905	50—250 ccm. Zur N-Bestimmung 100 ccm genommen.	6,9 ccm	0,05 g = 37,3% Gesamtstickstoff in dem Filtrat

Hämoglobin.

Zu meinem Versuch diente zweimal umkrystallisiertes, aus Pferdeblut nach der üblichen Art mit Zusatz von Spiritus in der Kälte gewonnenes Hämoglobin. Solches Hämoglobin wurde bei 35° in 10 l Wasser gelöst und der erhaltenen filtrierten Lösung 2 l Wasser, welches mit solcher Menge Salzsäure (134 ccm HCl, sp. Gew. 1,19) versetzt war, daß die Mischung — 12 l — 0,5% HCl enthielt, hinzugefügt. Diese 0,5% Salzsäure enthaltende Lösung des Hämoglobins wurde den 28. I. 1905 mit einem Überschuß an Chloroform versetzt und im Thermostaten bei $36\text{—}38^\circ$ C. digeriert. Es ist nötig zu vermerken, daß die betreffende Lösung vom 1. V. 1905 bis zum 20. VIII. 1905 bei Zimmertemperatur stand. Die anfänglich durchsichtige, leichtflüssige Lösung fing allmählich an sich zu verdichten, wobei ein brauner Niederschlag gebildet wurde.

Die in Rede stehende Lösung wurde gleich nach dem Aufstellen zur Digestion nach Mett geprüft, und zwar mit negativem Resultat: der Inhalt der Zylinder blieb ca. 34 Tage unverändert.

In der Hämoglobinlösung wurde den 5. V. 1905 und 2. X. 1905 die Menge der freien Salzsäure nach der oben erwähnten Art bestimmt. Im ersteren Fall enthielt die Lösung 0,27%, im zweiten 0,23% der freien Säure. Die Hälfte der freien Salz-

säure war also während der Digestion gebunden worden. Von Zeit zu Zeit wurde in einzelnen, der Hämoglobinlösung entnommenen, filtrierten Proben die Menge des Gesamt- (Tabelle 8) und des Monoaminostickstoffs (Tabelle 9) bestimmt.

Tabelle 8.

	Menge der filtrierten Probe ccm	Menge der an NH_3 gebundenen $\text{n}/_{10}\text{-H}_2\text{SO}_4$ in der Vorlage ccm	Menge des Stickstoffs in 100 Teilen der filtrierten Probe g
28. I. 1905	10	20,5	0,3
10. III. 1905	10	17,7	0,258
13. IV. 1905	10	12,8	0,186
1. X. 1905	10	13,7	0,2
1. XI. 1905	10	5,1	0,074
	10	5,3	0,077

Anmerkung. Der Titer von 1 ccm $\text{n}/_{10}\text{-H}_2\text{SO}_4$ entspricht sowohl in dieser, als auch in der folgenden Tabelle (Tabelle 9) 0,00146 g Stickstoff. Die Proben vom 1. XI. 1905 beziehen sich auf das verdünnte Filtrat der Hämoglobinmischung: das Filtrat wurde zur Fällung durch Phosphorwolframsäure verdünnt.

Die progressiv abnehmende Gesamtstickstoffmenge in der Tabelle 8 könnte mit dem ausfallenden Niederschlag in Zusammenhang gebracht werden: es haben sich N-haltige Produkte aus der betreffenden Lösung ausgeschieden, welche bei der Filtration derselben abgeschieden werden und dadurch die Stickstoffmenge des Filtrates verringern. Die in der Tabelle 9 angeführten Daten zeigen, daß das Hämoglobin bei der oben angeführten Digestion eine Spaltung unter Bildung von stickstoffhaltigen Produkten, welche durch Phosphorwolframsäure nicht fällbar sind, erleidet. Nach einer ca. 160-tägigen Digestion betrug die Stickstoffmenge solcher Produkte ca. 35% der Gesamtstickstoffmenge der Lösung.

Tabelle 9.

	Proben	Menge der an NH_3 gebundenen $\frac{n}{10}\text{-H}_2\text{SO}_4$ in der Vorlage	Menge des Monoaminostickstoffs in 100 ccm des Filtrates
10. III. 05	50—500 ccm. Zur N-Bestimmung 150 ccm genommen.	2,5 ccm	0,024 g = 9,3% des Gesamtstickstoffs in dem Filtrate.
13. IV. 05	25—250 ccm. Zur N-Bestimmung 150 ccm genommen.	4,1 ccm	0,04 g = 21,6% des Gesamtstickstoffs im Filtrat.
1. X. 05	25—250 ccm. Zur N-Bestimmung 150 ccm genommen.	6,0 ccm	0,058 g = 29% des Gesamtstickstoffs im Filtrat.
1. XI. 05	1. Probe: 200—500 ccm. Zur N-Bestimm. 150 ccm genommen.	10,7 ccm	0,026 g = 35% des Gesamtstickstoffs im Filtrat.
	2. Probe: 200—500 ccm. Zur N-Bestimm. 150 ccm genommen.	10,8 ccm	0,026 g = 35% des Gesamtstickstoffs im Filtrat.

Nach ca. 160 tägigem Stehenlassen der Hämoglobinlösung im Thermostaten wurde die Digestion derselben den 1. XI. 1905 unterbrochen und die stark nach Chloroform riechende Lösung mit der gleichen Menge Wasser verdünnt und von dem braunen Niederschlag abfiltriert. In einer besonderen Probe des Filtrats wurde sowohl der Gesamt-, wie auch der Monoaminostickstoff bestimmt. Die Resultate dieser Bestimmungen sind aus den Tabellen 8 und 9 zu ersehen — Proben vom 1. XI. 1905. 19 l des Filtrates wurden in Gegenwart von 0,5%iger Schwefelsäure durch Phosphorwolframsäure, wie es bei Gelatine beschrieben, gefällt und der dadurch entstandene Niederschlag durch Baryumhydrat bei 40—45° C. zerlegt, der Niederschlag von Baryumphosphorwolframat abfiltriert, das Filtrat mit Kohlensäure gesättigt und auf dem Wasserbade bis $\frac{1}{3}$ Volumen eingengt. Das Baryum wurde aus der Lösung durch Schwefelsäure genau, ohne Überschuß der letzteren, gefällt, das BaSO_4 abfiltriert und das Filtrat bei 40° C. bis 1,5 l eingengt und mit «Lösung B» bezeichnet. Letztere enthielt:

Stickstoff	0,48% = 7,32 g in 1,5 l der Lösung
Trockensubstanz	2,93% = 43,95 > > 1,5 > > >
Asche	Spuren
Organ. Substanz	2,93% = 43,9 > > 1,5 > > >

Die Lösung B.

In der Lösung B wurden die durch schwefelsaures Ammonium nicht fällbaren Stoffe nach Kühne, wie bei den analogen Produkten der Serumeiweißkörper beschrieben, quantitativ bestimmt. Dazu wurde 346,5 ccm der Lösung B mit einem Gehalt von 1,69 g N verwandt. Die von dem Albumosenniederschlag erhaltenen Filtrate wurden vereinigt und mit Wasser bis auf 500 ccm verdünnt — Lösung P. 250 ccm der Lösung P wurden mit Baryumhydrat und zuletzt mit Baryumkarbonat in geringem Überschuß behandelt; das dadurch verdrängte Ammoniak wurde durch Einengen der Lösung auf dem Wasserbade entfernt, der Niederschlag abfiltriert, mehrmals gewaschen, die erhaltenen Filtrate vereinigt und bis 500 ccm mit Wasser verdünnt — Lösung R. Die Lösung R enthielt 0,335 g Stickstoff. Da die 500 ccm der Lösung R nur 250 ccm Lösung P entsprechen, so enthalten 500 ccm der letzteren $0,335 \times 2 = 0,67$ g N. Weiter, 346,5 ccm der zum Versuch genommenen Lösung enthielten 1,69 g Gesamtstickstoff. Es folgt daraus, daß 0,67 g — 39,6% der Gesamtstickstoffmenge ausmacht, d. h. 39,6% Stickstoff kommen auf die durch $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ nach Kühne nicht fällbaren Produkte.

Hieraus ist ersichtlich, daß das Hämoglobin, einer Einwirkung 0,5%iger HCl ca. 160 Tage lang bei 36—38° C. unterworfen, eine Spaltung erleidet, wobei durch $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ nach Kühne nicht fällbare Produkte entstehen, deren Stickstoffmenge 39,6% der Gesamtstickstoffmenge der Lösung B beträgt.

Die durch Phosphorwolframsäure nicht fällbaren Produkte.

Das erste, sowie die folgenden Filtrate des aus der Hämoglobininlösung durch Phosphorwolframsäure erhaltenen Niederschlags wurden vereinigt und, wie bei Gelatine beschrieben, behandelt: zur Bindung der freien Salz- und Schwefelsäure

wurde der Lösung Baryumhydrat in geringem Überschuß hinzugefügt, der Überschuß des letzteren an CO_2 gebunden und die Mischung auf dem Wasserbade, und zwar bei $40\text{--}45^\circ \text{C.}$, bis 5 l eingedampft. Nach der Entfernung des Baryums durch Schwefelsäure, Entfernung der Salzsäure durch Silberoxyd in Gegenwart freier Schwefelsäure, letzterer durch genaues Hinzufügen von Baryumhydrat und des schwefelsauren Baryums durch Filtration, wurde die so erhaltene Lösung bei ca. 40°C. bis 1,5 l eingengt und mit «Lösung M» bezeichnet. Die Lösung M enthielt:

Stickstoff	0,193%	=	2,895 g	in 1,5 l der Lösung
Trockensubstanz	1,425%	=	21,325 g	> 1,5 > > >
Asche	0,045%	=	0,675 >	> 1,5 > > >
Organ. Substanz	1,38%	=	20,65 >	> 1,5 > > >

Mit den Lösungen B und M wurden folgende Reaktionen ausgeführt. Da die Lösung B eine größere Menge organischer Substanz enthielt, als die Lösung M, so wurde die erstere, um einen gleichen Gehalt an organischer Substanz beider Lösungen zu erreichen, mit einer entsprechenden Menge Wasser verdünnt — Lösung B'.

Lösung B'.

Reagens: 10%ige wässrige Lösung der Phosphorwolframsäure.

5 ccm der Lösung + 10 ccm Wasser + 1 ccm 20% H_2SO_4 + 2 ccm des Reagens, tropfenweise hinzugefügt, ruft einen sehr starken, flockigen Niederschlag hervor.

Lösung M.

5 ccm der Lösung + 10 ccm Wasser + 1 ccm 20% H_2SO_4 + 2 ccm Reagens, tropfenweise hinzugefügt, ruft einen sehr geringen, rasch sich zu Boden setzenden Niederschlag hervor.

Die Biuretreaktion.

5 ccm der Lösung + 1 ccm 10% NaOH + 2 Tropfen 5% CuSO_4 — entsteht eine rosenrote Färbung. Bei weiterem Zusatz von CuSO_4 wird die Färbung violettrot.

5 ccm der Lösung + 1 ccm 10% NaOH + 2 Tropfen 5% CuSO_4 — entsteht eine rosenrote Färbung, welche durch Zusatz von CuSO_4 (einige Tropfen) in eine intensiv blaue übergeht.

Die Millonsche Reaktion.

5 ccm der Lösung + 5 Tropfen des Reagens — es wird ein reichlicher Niederschlag gebildet, welcher sich beim Erwärmen ziegelrot färbt.

5 ccm der Lösung + 5 Tropfen des Reagens — entsteht eine schwache Opalescenz; beim Erwärmen wird ein ziegelroter Niederschlag gebildet.

Esbachs Reagens.

5 ccm der Lösung + 5 ccm des Reagens — entsteht ein reichlicher Niederschlag.

5 ccm der Lösung + 5 ccm des Reagens — die Lösung bleibt unverändert.

Schwefelsaures Ammonium in Substanz.

Reagens im Überschuß zu der Lösung hinzugefügt — bildet einen reichlichen Niederschlag.

Reagens zu der Lösung im Überschuß hinzugefügt verursacht bloß eine schwache Opalescenz derselben.

5%ige wässerige Sublimatlösung.

Bei tropfenweisem Zusatz des Reagens zu der Lösung entsteht ein reichlicher Niederschlag.

Bei tropfenweisem Zusatz des Reagens zu der Lösung verbleibt letztere unverändert. Bei vorsichtigem, tropfenweisem Zusatz von NaOH zu der Mischung entsteht ein sehr geringer Niederschlag.

Rotes und blaues Lackmuspapier.

Alkalische Reaktion.

Schwach saure Reaktion.

Aus den eben angeführten, für die nativen Eiweißstoffe, Albumosen, Peptone so charakteristischen Reaktionen ist zu ersehen, daß die Lösung B alle diese Reaktionen gibt, die Lösung M dagegen entweder garnicht mit denselben reagiert, oder die Reaktion ist mit dieser Lösung eine sehr schwach ausgeprägte. Es folgt daraus, daß die Lösung M solche Spaltungsprodukte des Hämoglobins enthält, welche durch ihr Verhalten zu den oben genannten Reaktionen sehr nahe den Monoaminosäuren resp. zu dem Typus solcher Säuren zu rechnen sind.

Die Lösung M.

Um die krystallisierbaren Produkte zu isolieren, wurden 342 ccm der Lösung M zuerst auf dem Wasserbade, nachher im Vakuumexsikkator bis zur Sirupkonsistenz eingeengt. Nach 7tägigem Stehenlassen der Lösung bei Zimmertemperatur schieden sich aus derselben Krystalle in Form von kleinen, und eine größere Menge großen, leucinähnlichen Kugeln mit konzentrischer Schichtung aus. Es mußte angenommen werden, daß man hier, aller Wahrscheinlichkeit nach, mit Monoaminosäuren zu tun hat. Um solche Säuren am günstigsten zu isolieren, beschloß ich, sie in ihre schwerlöslichen Kupfersalze zu verwandeln und sie

in dieser Form zu analysieren. Es wurden zu diesem Zwecke 1027 ccm der Lösung M, welche ca. 14 g organische Substanz enthielten, auf dem Wasserbade eingengt und mit frischgefälltem Kupferoxydhydrat im Überschuß nach dem bei der Gelatine beschriebenen Verfahren behandelt. Die von dem Hydratüberschuß erhaltenen Filtrate wurden bis zur Hälfte eingedampft und der Kälte ausgesetzt. Am anderen Tage hatte sich ein reichlicher krystallinischer Niederschlag gebildet, welcher sich unter dem Mikroskop als aus kleinen Kugeln und aus büschelförmig zusammengesetzten Nadeln zusammengesetzt erwies. Der krystallinische Niederschlag wurde auf dem Filter gesammelt, mehrmals mit kaltem Wasser gewaschen und im Vakuumexsikkator getrocknet. Der getrocknete Niederschlag wog 3 g; er wurde in kochendem Wasser bis auf einen Rest, der scheinbar sehr schwer in Wasser löslich war, gelöst und filtriert. Schon aus der warmen Lösung fiel ein krystallinischer Niederschlag aus, welcher am folgenden Tage abfiltriert, mit kaltem Wasser gewaschen, umkrystallisiert und zuerst im Vakuumexsikkator, nachher bei 110—115° C. bis zum konstanten Gewicht getrocknet wurde, wobei 20% Gewichtsverlust zu verzeichnen war. Zur Kupferbestimmung wurden 0,2355 g der Substanz verwandt:

Gefunden: 29,95% Cu.

Die Stickstoffbestimmung wurde mit 0,203 g der Kupferverbindung ausgeführt.

Gefunden: 6,83% N.

Der bei dem Lösen in kochendem Wasser ungelöst gebliebene Rest der Kupferverbindung wurde in Wasser, welches mit Schwefelsäure angesäuert war, gelöst und durch Schwefelwasserstoff zersetzt. Nach der Filtration des Schwefelkupfers wurde das Filtrat stark eingengt. Beim Erkalten der Lösung schied sich am folgenden Tage ein weißer, aus dünnen Krystallschüppchen bestehender Niederschlag aus. Letzterer wurde in heißem Wasser gelöst, in die Kupferverbindung zurückverwandelt, die letztere bei 110—115° bis zum konstanten Gewicht getrocknet und auf den Gehalt an Kupfer und Stickstoff geprüft.

Gefunden: 30,1% Cu

6,84% N.

Aus den oben angeführten analytischen Daten der Kupferverbindung ist zu ersehen, daß diese Daten mit den Daten solcher Verbindung der Glutaminsäure fast völlig übereinstimmen:

Gefunden:	Berechnet für $\text{CuC}_6\text{H}_7\text{NO}_4$:
30,1% Cu	30,4% Cu
6,84% N.	6,7% N.

Demnach erweist es sich, daß die Lösung M Glutaminsäure, als solche, enthielt. Aller Wahrscheinlichkeit nach enthielt die genannte Lösung noch andere Monoaminosäuren, als solche: der durch Eindampfen der Lösung M erhaltene krystallinische Niederschlag bestand unter anderem aus solchen Kugeln, in welchen gewöhnlich Leucin krystallisiert.

Die Spaltung der Lösung M durch 20%ige Schwefelsäure.

Die von den krystallisierbaren Kupfersalzen befreite Mutterlauge wurde bis zur Sirupkonsistenz eingengt und der Kälte ausgesetzt. Nach Verlauf von ca. $1\frac{1}{2}$ Wochen war kein krystallinischer Niederschlag bemerkbar. Danach wurde die eingengte Lösung mit Wasser verdünnt und beim Ansäuern mit Schwefelsäure durch H_2S zersetzt. Das von dem abgeschiedenen Schwefelkupfer erhaltene, die Biuretreaktion deutlich gebende Filtrat wurde mit 20%iger Schwefelsäure 6 Stunden lang bis zum Sieden erhitzt und nach dem beendeten Kochen von der Schwefelsäure mit Baryumhydrat befreit. Das von dem schwefelsauren Baryum erhaltene Filtrat gab keine Biuretreaktion. Beim Einengen des Filtrates schied sich aus letzterem ein krystallinischer Niederschlag aus, welcher aus einer Menge großer, leucinähnlicher Kugeln bestand.

Es folgt aus dem eben angeführten Versuch, daß bei der in Rede stehenden Digestion des Hämoglobins außer den freien Monoaminosäuren (wenigstens der Glutaminsäure) Verbindungen bzw. Kombinationen von Monoaminosäuren entstehen, welche sich durch 20%ige Schwefelsäure leicht in freie Monoaminosäuren spalten.

Albumosen.

Die zu meinen Versuchen verwandten Albumosen wurden aus dem Pepton Witte folgenderweise gewonnen: das betreffende Pepton, aus welchem vorher für besondere Zwecke Heteroalbumose durch Dialyse ausgeschieden war, wurde bei 75—80° C. in Wasser gelöst, die Lösung, um die in dem Pepton Witte befindlichen, durch Phosphorwolframsäure nicht fällbaren, stickstoffhaltigen Produkte abzuschneiden, bis zu 10 l mit 0,5%iger Schwefelsäure verdünnt und mit Phosphorwolframsäure behandelt. Der entstandene Niederschlag wurde mehrmals mit größeren Mengen Wasser gewaschen und mit Baryumhydrat zersetzt. Das Baryumphosphorwolframat wurde abfiltriert, das Filtrat bis ca. 2,5 l eingeeengt und mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bei 75—80° C. gesättigt. Die ausgeschiedenen Albumosen wurden abfiltriert, in heißem Wasser gelöst und wiederum durch $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ausgesalzen und gelöst. Nach Entfernung des schwefelsauren Ammons durch Baryumhydrat und des Ammoniaks durch Abdampfen der Flüssigkeit wurde letztere von dem Baryumniederschlag befreit und dem Filtrate solange Salzsäure hinzugefügt, bis eine demselben entnommene Probe mit Phloroglucin-Vanillin zu reagieren anfing. In dem so behandelten Filtrate wurde der Gesamt- und der Monoaminostickstoff bestimmt; die Resultate dieser Bestimmungen sind aus den Proben vom 29. XI. 1904 der Tabellen 10 und 11 zu ersehen. Das eben erwähnte Filtrat wurde alsdann mit 10 l Wasser verdünnt, der verdünnten Lösung 0,5%ige HCl hinzugefügt und in Gegenwart von Chloroform den 1. XII. 1904 im Thermostaten bei 36—38° C. zur Digestion gestellt.

Es muß bemerkt werden, daß vom 20. XII. 1904 bis zum 15. I. 1905 und vom 1. V. 1905 bis zum 20. VIII. 1905 die Lösung der Albumosen bei Zimmertemperatur stand.

Von Zeit zu Zeit wurde in einzelnen, der Lösung entnommenen Proben die Menge des Gesamt- (Tabelle 10) und des Monoaminostickstoffs (Tabelle 11) bestimmt. Die Resultate dieser Bestimmungen sind aus den betreffenden Tabellen zu ersehen. Bei den den 11. II. 1905 und 23. IX. 1905 mit der Albumosenlösung ausgeführten Bestimmungen der freien Salz-

säure erwies es sich, daß in ersterem Fall die Lösung 0,41 ‰, in letzterem 0,3 ‰ freie Salzsäure enthält.

Tabelle 10.

	Menge der zur N-Bestimmung genommenen Lösung ccm	Menge der an NH_3 gebundenen $\frac{n}{10}\text{-H}_2\text{SO}_4$ ccm	Menge des Stickstoffs in 100 Teilen der Lösung g
29. XI. 1904	10	45,9	0,68
	10	46,2	
20. I. 1905	10	17,6	0,256
20. II. 1905	10	17,4	0,254
27. IV. 1905	10	17,6	0,256
23. IX. 1905	10	17,6	0,256

Tabelle 11.

	Proben	Menge der an NH_3 gebundenen $\frac{n}{10}\text{-H}_2\text{SO}_4$ in der Vorlage	Menge des Monoaminostickstoffs in 100 ccm der Lösung
29. XI. 904	1. Probe: 20—151,5 ccm. Zur N-Bestimm. 100 ccm genommen.	1,9 ccm	= 0,022 g = 3,2 ‰ des Gesamtstickstoffs.
	2. Probe: 25—300 ccm. Zur N-Bestimmung 100 ccm genommen.	1,6 ccm	= 0,027 g = 3,9 ‰ des Gesamtstickstoffs.
20. I. 905	100—500 ccm. Zur N-Bestimm. 150 ccm genommen.	9,9 ccm	= 0,048 g = 18,8 ‰ des Gesamtstickstoffs.
22. II. 905	100—500 ccm. Zur N-Bestimm. 150 ccm genommen.	13,5 ccm	= 0,065 g = 25,5 ‰ des Gesamtstickstoffs.
27. IV. 905	40—200 ccm. Zur N-Bestimmung 150 ccm genommen.	18,7 ccm	= 0,09 g = 35,1 ‰ des Gesamtstickstoffs.
23. IX. 905	50—250 ccm. Zur N-Bestimmung 150 ccm genommen.	18,8 ccm	= 0,09 g = 35,1 ‰ des Gesamtstickstoffs.

Anmerkung: Der Titer 1 ccm n_{10} -H₂SO₄ in den Tabellen 10 und 11 entspricht 0,00146 g N.

Aus der Tabelle 11 ist, wie aus den vorigen Tabellen der Monoaminostickstoffbestimmungen, zu ersehen, daß auch bei der in Rede stehenden Hydrolyse der Albumosen stickstoffhaltige, durch Phosphorwolframsäure nicht fällbare Produkte entstehen.

Nach ca. 150tägiger Digestion der Albumosen bei 36—38° C. wurde die deutlich nach Chloroform riechende Lösung derselben filtriert; 8,5 l des Filtrats wurden mit 1,5 l Wasser verdünnt, und in Gegenwart von 0,5% iger Schwefelsäure mit Phosphorwolframsäure gefällt. Der entstandene Niederschlag wurde mit destilliertem Wasser gewaschen und mit Baryumhydrat zerlegt, wonach der Niederschlag abfiltriert, das Filtrat mit Kohlensäure gesättigt und auf dem Wasserbade bis zu 3 l eingeengt; das Baryum wurde aus der Lösung durch Schwefelsäure entfernt und das vom schwefelsauren Baryum erhaltene Filtrat bei 40° C. bis zu 1 l eingeengt. Diese die basischen Spaltungsprodukte der Albumosen enthaltende Lösung wurde mit «Lösung B» bezeichnet. Diese Lösung enthielt:

Stickstoff	0,95% = 9,5 g in 1 l der Lösung
Trockensubstanz	5,76% = 57,6 » » 1 l » »
Asche	0,02% = 0,2 » » 1 l » »
Organ. Substanz	5,74% = 57,4 » » 1 l » »

Die Lösung B wurde nach dem Verfahren von Kossel und Kutscher auf Hexonbasen untersucht. Zu diesem Zweck wurden 800 ccm der betreffenden Lösung verwandt und nach der Art des genannten Verfahrens in Histidin-, Arginin- und Lysinfraktion zerlegt.

Histidinfraktion. Um die gegebene Silberverbindung dieser Fraktion zu zerlegen, wurde der gut ausgewaschene Niederschlag genau mit Salzsäure zersetzt, die Mischung filtriert, aus dem so erhaltenen Filtrate die Reste des Baryums mit Schwefelsäure entfernt und das Filtrat von schwefelsaurem Baryum anfangs auf dem Wasserbade, nachher im Vakuumexsikkator bis zur Sirupkonsistenz eingeengt. Die eingeengte Lösung gab eine deutliche Biuretreaktion und reagierte stark alkalisch. Letztere Eigenschaft weist darauf hin, daß die Lösung, außer in ihr befindlichem Histidin (wässerige Histidinösung rea-

giert neutral resp. schwach alkalisch) noch andere, alkalisch reagierende Spaltungsprodukte enthielt. Der Versuch, das Histidin durch Einengen der Lösung zur Krystallisation zu bringen, sowie in Form von Dichlorid abzuscheiden, führte zu keinem Erfolg. Durch Benzoylieren der eingeeengten Lösung erhielt man ein amorphes, in heißem Wasser nur teilweise sich lösendes, in Äthyläther fast unlösliches Benzoylprodukt; in verdünnter Natronlaugelösung löste es sich leicht. Alle Bemühungen, ein krystallinisches Benzoylprodukt zu erhalten, blieben unbelohnt. Da es überhaupt sehr schwer, ja oft unmöglich ist, kleine Quantitäten von reinem Histidin in Mischungen von mehr oder weniger beträchtlichen Quantitäten anderer basischen Spaltungsprodukte der Eiweißkörper zu isolieren, so muß ich die Frage über die Bildung von Histidin aus Albumosen bei der betreffenden Hydrolyse durch 0,5%ige Salzsäure als eine offene bekennen.

Argininfraktion. Der durch Sättigung mit Baryumhydrat erhaltene, gut ausgewaschene Niederschlag der Argininfraktion wurde mit Schwefelsäure zerlegt, filtriert, das Filtrat (es gab die Biuretreaktion) mit Schwefelwasserstoff behandelt, das Schwefelsilber durch Filtration, die Schwefelsäure durch Baryumhydrat, das dadurch gebildete schwefelsaure Baryum durch abermalige Filtration entfernt und das Filtrat stark eingeeengt. Das eingeeengte Filtrat reagierte stark alkalisch und zeigte keine Neigung zur Krystallisation. Die Krystallisation war auch durch Hinzufügen von Salzsäure nicht zu erreichen. Nach der Entfernung der Salzsäure durch Silberoxyd wurde die Lösung mit Salpetersäure neutralisiert und beim Erwärmen mit $\text{Cu}(\text{OH})_2$ im Überschuß behandelt; letzterer wurde abfiltriert und das Filtrat bei 45°C . stark eingeeengt. Nach Verlauf von 5 Tagen erfolgte keine Krystallisation. Alsdann wurde das Filtrat durch Schwefelwasserstoff zerlegt und benzoyliert. Die erhaltenen Benzoylprodukte stimmten in allen Eigenschaften mit denjenigen bei Histidin erhaltenen vollkommen überein — es gelang mir nicht, krystallinische Benzoylprodukte zu isolieren. Auch hier, wie bei der vorhergehenden Fraktion, muß man die Frage über die Anwesenheit der betreffenden Hexonbase in der Lösung B als eine offene betrachten.

Lysinfraktion. Das Filtrat von der Argininfraktion, sowie die Waschwasser derselben wurden vereinigt und mit Phosphorwolframsäure gefällt. Der gut mit Wasser gewaschene Niederschlag wurde nach dem üblichen Verfahren mit Baryumhydrat zerlegt und nach der Entfernung des Baryumphosphorwolframats bei ca. 50 ccm eingeeengt. Die erhaltene Lösung gab deutliche Biurettreaktion und reagierte stark alkalisch. Zu der eingeeengten Lösung wurde eine alkoholische Pikrinsäurelösung hinzugefügt und die Mischung auf dem Wasserbade erwärmt. Am folgenden Tage wurde in der Lösung ein geringer feiner Niederschlag bemerkbar, welcher unterm Mikroskop aus stumpfen Stäbchen bestand. Nach 4 tägigem Stehenlassen wurde der geringe Niederschlag abfiltriert, mit kaltem Wasser gewaschen und in geringer Menge kochenden Wassers gelöst. Nach dem Erkalten der Lösung schied sich ein gelber, aus sternförmigen und aus kurzen Nadeln fächerförmig zusammengesetzten Krystallen bestehender Niederschlag aus, welcher in mit Schwefelsäure angesäuertem Wasser gelöst und zur Entfernung der Pikrinsäure mit Äther geschüttelt wurde. Die erhaltene, farblose Lösung gab deutliche Biurettreaktion und einen Niederschlag mit Phosphorwolframsäure. Weitere Untersuchungen konnten wegen der geringen Menge des Pikrates nicht ausgeführt werden und ich mußte somit auch die Frage über die Bildung des Lysins bei der erwähnten Hydrolyse der Albumosen offen lassen.

Nach der Untersuchung der Lösung B auf Hexonbasen muß man zu folgendem Schluß kommen: Die Hexonbasen befanden sich in der Lösung B entweder garnicht, oder — was natürlich einen direkten Beweis erfordert — sie fanden sich in äußerst geringen Quantitäten mit anderen basischen Spaltungsprodukten der Albumosen gemengt.

Die durch Phosphorwolframsäure nicht fällbaren Spaltungsprodukte der Albumosen wurden, wie bei den vorhergehenden Präparaten besprochen, in folgender Weise gewonnen: Die von dem Phosphorwolframsäureniederschlag gewonnenen Filtrate wurden mit Baryumhydrat behandelt, mit Kohlensäure gesättigt und bis auf 4 l eingedampft. Nach dem Entfernen des Baryums

durch Schwefelsäure und Filtration, der Salzsäure in Gegenwart von freier Schwefelsäure mit Silberoxyd, der Schwefelsäure mit Baryumhydrat, wurde das von dem BaSO_4 erhaltene Filtrat bei 40°C . bis zu 1 l eingeeengt und als «Lösung M» benannt. Diese Lösung enthielt:

Stickstoff	0,457%	=	4,57 g	in 1 l	der Lösung
Trockensubstanz	3,45%	=	34,5	> > 1 l	> >
Asche	0,1%	=	1	> > 1 l	> >
Organ. Substanz	3,35%	=	33,5	> > 1 l	> >

Mit den Lösungen B und M wurden folgende Reaktionen ausgeführt. Da die Lösung B eine größere Menge organischer Substanz enthielt, als die Lösung M, so wurde die erstere, um einen gleichen Gehalt an organischer Substanz beider Lösungen zu erreichen, mit einer entsprechenden Menge Wasser verdünnt — Lösung B'.

Lösung B'.

Lösung M.

Reagens: 10%ige wässrige Phosphorwolframsäurelösung.

5 ccm der Lösung + 10 ccm Wasser + 1 ccm 20% H_2SO_4 + 2 ccm Reagens — es entsteht ein reichlicher Niederschlag.

5 ccm der Lösung + 10 ccm Wasser + 1 ccm 20% H_2SO_4 + 2 ccm Reagens — Spuren eines Niederschlages, welcher sich als harzige, dünne Schicht am Boden ansammelt.

Die Biuretreaktion.

5 ccm der Lösung + 1 ccm 10% NaOH + 2 Tropfen 5% CuSO_4 — rosenrote Färbung, welche beim Überschuß von CuSO_4 in violettrote übergeht.

5 ccm der Lösung + 1 ccm 10% NaOH + 2 Tropfen 5% CuSO_4 — violettrote Färbung, welche bei weiterem Zusatz von CuSO_4 in blaue übergeht.

Millons Reagens.

Das Hinzufügen einiger Tropfen Reagens zu der Lösung verursacht einen reichlichen Niederschlag, welcher beim Erwärmen eine ziegelrote Färbung annimmt.

Das Hinzufügen von einigen Tropfen Reagens zu der Lösung verursacht eine Trübung; beim Kochen des Gemisches wird ein geringer, ziegelroter Niederschlag gebildet.

Esbachs Reagens.

Die Lösung, zu gleichen Teilen mit dem Reagens gemischt, bildet einen reichlichen, flockigen Niederschlag.

Die Lösung, zu gleichen Teilen mit dem Reagens gemischt, bleibt unverändert.

5%ige wässrige Sublimatlösung.

Das tropfenweise Hinzufügen des Reagens zu der Lösung ruft einen reichlichen, flockigen Niederschlag hervor.

Bei tropfenweisem Hinzufügen des Reagens zu der Lösung bleibt letztere unverändert. Durch Zusatz von 10% NaOH zu der Mischung entsteht ein geringer Niederschlag.

Rotes und blaues Lackmuspapier.

Alkalische Reaktion.

Schwach saure Reaktion.

Die Lösung M.

Ausscheidung der krystallisierbaren Produkte durch Einengen der Lösung. Ein Teil der Lösung M wurde, anfangs auf dem Dampfapparate, nachher im Vakuumexsikkator bis zur Sirupkonsistenz eingeeengt. Nach Verlauf von einer Woche verwandelte sich die Lösung zu dicker Gallerte. Unter dem Mikroskop bemerkte man eine Menge leucinähnlicher Kugeln und aus feinen, dünnen Nadeln gebildete Büschel. Beim Lösen des Niederschlages in Wasser von 60° C. blieb ein Teil desselben ungelöst. Er bestand aus tyrosinähnlichen Bündeln, war schwer in heißem Wasser löslich und gab eine sehr intensive Millonsche Reaktion. Weitere Untersuchung, wegen der geringen Menge des Restes, mußte unterbleiben.

Ausscheidung der krystallisierbaren Produkte in Form ihrer Kupferverbindungen. 200 ccm der Lösung M wurden bis ca. 50 ccm eingeeengt und nach dem beim Hämoglobin beschriebenen Verfahren mit Kupferoxydhydrat im Überschuß behandelt, vom letzteren heiß abfiltriert und das Filtrat bei ca. 60° C. bis zur Hälfte seines Volumens eingeeengt. Am folgenden Tage fiel aus der Lösung ein krystallinischer Niederschlag aus, welcher aus gesonderten und zu Büscheln vereinigten Nadeln und radial gestreiften Kugeln bestand. Nach Verlauf von zwei Tagen nahm das Filtrat gallertartige Konsistenz an; es wurde mit kaltem Wasser verdünnt und filtriert, wobei der auf dem Filter gebliebene Niederschlag mit kaltem Wasser mehrmals gewaschen

und in siedendem Wasser bis auf einen geringen Rest gelöst und heiß filtriert wurde. Aus dieser Lösung fiel ein krystallinischer Niederschlag aus, welcher aus einzelnen oder in Büscheln vereinigten Nadeln bestand. Der Niederschlag wurde auf dem Filter gesammelt, gewaschen und anfangs im Vakuumexsikkator, nachher bis zum konstanten Gewicht bei 110—115° C. getrocknet, wobei ein Gewichtsverlust zu verzeichnen war. Von der getrockneten Kupferverbindung wurden zur Analyse 2 Proben genommen, wobei in der ersten Probe Stickstoff und Kupfer, in der zweiten Kupfer bestimmt wurde.

1. Probe. 0,2692 g der Substanz wurden in mit Schwefelsäure angesäuertem Wasser gelöst und mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Nach dem Abfiltrieren und sorgfältigem Auswaschen des Schwefelkupfers mit H₂S-Wasser wurden die dabei erhaltenen Filtrate vereinigt, eingedampft und auf Stickstoff untersucht:

Gefunden: 6,72% N.

Das Filter mit dem Schwefelkupferniederschlag wurde im Porzellantiegel geglüht, in Salpetersäure gelöst, die Lösung mit Wasser verdünnt und beim Erwärmen mit Natronlauge behandelt. Das Kupferoxyd wurde abfiltriert, sorgfältig mit Wasser gewaschen und nach dem Trocknen im Tiegel samt dem Filter geglüht, der Rückstand in Salpetersäure gelöst, wieder geglüht und gewogen:

Gefunden: 28,4% Cu.

2. Probe. 0,0935 g Substanz in gleicher Weise behandelt.

Gefunden: 28,5% Cu.

Der geringen Menge der Kupferverbindung wegen mußte ich von dem Umkrystallisieren, sowie einer Kontrollanalyse derselben absehen. Um dieses zu erreichen, wurde von mir eine neue Menge der Kupferverbindung isoliert, zweimal aus heißem Wasser umkrystallisiert und bei 110—115° C. bis zum konstanten Gewicht getrocknet. Es wurden aus der Substanz:

a) Zur Stickstoffbestimmung 0,2495 g genommen.

Gefunden: 6,65% N.

b) Zur Bestimmung des Kupfers wurden 0,247 g Substanz verwandt.

Gefunden: 30,1% Cu.

Aus den eben angeführten analytischen Resultaten des zweimal umkrystallisierten Kupfersalzes folgt, daß es das Kupfersalz der Glutaminsäure vorstellt, nämlich:

Gefunden:	30,1% Cu und 6,65% N
Berechnet für $\text{CuC}_6\text{H}_7\text{NO}_4$:	30,4% > > 6,7% >

Es folgt hieraus, daß die Albumosen bei mehr oder weniger langandauernder Hydrolyse mit 0,5%iger Salzsäure bei 36 bis 38° C. einer tiefgreifenden Spaltung anheimfallen, wobei freie Monoaminosäuren — wenigstens Glutaminsäure und, aller Wahrscheinlichkeit nach, Tyrosin — entstehen.

Die Spaltung der Lösung M mit 20%iger Schwefelsäure wurde, wie es oben beschrieben, ausgeführt. Nach gewissen Zeiträumen wurden der siedenden Lösung einzelne Proben entnommen, mit welchen die Biuretreaktion ausgeführt wurde. Dieser Versuch gab folgende Resultate:

Die nach						
15 Minuten langem Sieden entnommene Probe	gab	deutliche	Biuretreaktion			
30 >	>	>	>	>	>	>
1 stündigem	>	>	>	>	sehr schwache	>
2 >	>	>	>	>	Spuren einer	>
3 >	>	>	>	>	keine	>

Nach Verlauf von 3 Stunden wurde das Sieden der Mischung unterbrochen und letztere nach dem Entfernen der Schwefelsäure durch Baryum bis zur Sirupkonsistenz eingedampft. Aus dieser Lösung schieden sich ausschließlich tyrosinähnliche Krystallbündel aus, welche abfiltriert wurden und, in heißem Wasser gelöst, eine intensive Millonsche Reaktion gaben. Nach weiterem Einengen des Filtrates schieden sich hauptsächlich leucinähnliche, homogene Kugeln und vereinzelte nadelförmige Krystalle aus.

Somit ist zu ersehen, daß die Lösung M, außer den Monoaminosäuren als solchen, Verbindungen resp. Kombinationen der Monoaminosäuren, welche sehr leicht durch 20%ige siedende Schwefelsäure in freie Monoaminosäuren zerfallen, enthält.

Aus den Resultaten der oben angeführten Versuche über die andauernde Einwirkung von 0,5%iger Salzsäure bei 36—38° C. auf die zu diesen Versuchen verwandten Eiweißstoffe muß man folgenden Schluß ziehen:

1. Bei der genannten Einwirkung der betreffenden Säure, unter Verhinderung von Fäulnis und Ausschließung von irgendwelchem proteolytischen Fermente, welches seine spezifische Wirkung in Gegenwart von Salzsäure auf die Eiweißkörper ausüben könnte, erleiden die in Rede stehenden Eiweißkörper eine ebensolche hydrolytische Spaltung, wie sie in den Hauptzügen bei der Hydrolyse mit Pepsin in Gegenwart von 0,5% iger Salzsäure zu konstatieren ist.

2. Die durch 0,5% ige Salzsäure hervorgerufene hydrolytische Spaltung der Eiweißkörper verläuft unvergleichlich rascher in dem Fall, wenn die Spaltung in Gegenwart von Pepsin vor sich geht.

3. Besondere Aufmerksamkeit bei der besprochenen Einwirkung der 0,5% igen Salzsäure verdient die Tatsache, daß bei der genannten Hydrolyse Verbindungen, bzw. Kombinationen der Monoaminosäuren entstehen, welche durch Phosphorwolframsäure nicht, respektive sehr schwer gefällt und sehr leicht durch siedende 20% ige Salz- oder Schwefelsäure in freie Monoaminosäuren gespalten werden.

4. Die hydrolytische Wirkung der 0,5% igen Salzsäure ist ihrer Intensität nach auf verschiedene Eiweißkörper verschieden: z. B. die oben besprochene, 150 Tage andauernde Hydrolyse der Gelatine führte zu keiner Bildung der freien Monoaminosäuren, während die Bildung solcher Säuren bei der Hydrolyse der übrigen genannten Eiweißkörper zu konstatieren war.

5. Das Austrocknen von Eiweißkörpern — wenigstens ist dieses bei den koagulierten Eiweißstoffen des Pferdeblutserums der Fall — führt zur schnelleren Lösung derselben in 0,5% ige Salzsäure; ihre weitere Hydrolyse verläuft quantitativ scheinbar nicht rascher, wie es bei den ungetrockneten koagulierten Eiweißstoffen zu bemerken ist.

6. Bei der peptischen Verdauung der Eiweißkörper in Gegenwart von Salzsäure erscheint letztere als selbständiges hydrolytisches Agens, wobei die hydrolytische Wirkung derselben in dem genannten fermentativen Prozeß durch den Katalysator — Ferment — beschleunigt wird.
