

Zur Kenntnis der Koagulosen.

Von
D. Lawrow.

(Der Redaktion zugegangen am 30. Juni 1907.)

In meiner Arbeit «Über die Wirkung des Pepsins resp. Labferments auf konzentrierte Lösungen der Produkte der peptischen Verdauung der Eiweißkörper (Reaktion von A. Danilewski)»¹⁾ kam ich auf Grund der angeführten Versuchsergebnisse unter anderem zum Schlusse, daß man zum mindesten zwei Haupttypen von koagulosogenen Substanzen, die bei der peptischen Verdauung der Eiweißstoffe erhalten werden, unterscheiden könne, und zwar koagulosogene Substanzen vom Typus der Albumosen resp. den bekannten Albumosen ähnlicher Produkte und koagulosogene Substanzen vom Typus der Monoamino-säuren resp. der Polypeptide von E. Fischer.

In meinem in der Jurjewer Naturforschergesellschaft am 29. März 1907 gehaltenen Vortrage führte ich ein Versuchsmaterial an, das sich auf Koagulosen bezog, die aus koagulosogenen Produkten vom Typus der Monoaminosäuren resp. Polypeptide entstehen. Die Koagulosen des genannten Typus waren bei diesem Versuche aus Produkten der peptischen Verdauung von einmal umkrystallisiertem Pferdehämoglobin gewonnen; sie gaben mit P.W.S. (Phosphorwolframsäure) bei Gegenwart von freier Schwefelsäure keinen, resp. einen unbedeutenden Niederschlag. Bei diesem Versuche wurde absichtlich eine nicht energische, ca. 4 Wochen dauernde Verdauung in Anwendung gezogen. Die Fällung der Verdauungsprodukte von basischem Charakter geschah bei Gegenwart von 0,5%iger Schwefelsäure. Das vom P.W.S.-Niederschlage erhaltene Filtrat

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. LI, S. 1—32.

wurde mit zwei Waschfiltraten vereinigt; die Mischung wurde vermittelst Ätzbaryts von der Schwefelsäure und der P. W. S. befreit und eingedampft. Die bei ca. 40° eingeeengte Lösung enthielt ca. 1% organischer Stoffe und wurde noch einmal mit P. W. S. bei Gegenwart von 0,5% iger Schwefelsäure gefällt, wobei der so erhaltene Niederschlag auf der Zentrifuge abgetrennt und weiter nicht gewaschen wurde. Das Filtrat von diesem Niederschlage, von H_2SO_4 und P. W. S. befreit, wurde bei $40-45^{\circ}$ eingeeengt; die eingedampfte Lösung enthielt in je 100 ccm 0,851 g Stickstoff, reagierte mit Lackmuspapier sauer, mit Kongopapier aber gar nicht und zeigte (bei der gegebenen Konzentration) folgende Eigenschaften:

1. Bei allmählichem Hinzufügen von 5% igem Kupfersulfat zu der mit Ätznatron stark alkalisch gemachten Lösung entsteht nacheinander eine kirschrote, rosaviolette, violette, violettblaue und endlich eine intensiv blaue Färbung.

2. Esbachsches Reagens, allmählich bis zum gleichen Volumen zu einer Lösung hinzugefügt, erzeugte nicht eine Spur von Trübung.

3. 2% ige Sublimatlösung, allmählich mit Vorsicht zu der Lösung hinzugesetzt, ruft höchstens eine unbedeutende Opaleszenz hervor.

4. Mit P. W. S. versetzt, gibt die durch H_2SO_4 angesäuerte Lösung einen sehr unbedeutenden, staubartigen, schnell sich absetzenden Niederschlag. Zur Fällung ist ein verhältnismäßig bedeutender Überschuß von P. W. S. erforderlich.

5. Weiterhin bei $35-40^{\circ}$ bis zur Sirupkonsistenz eingeeengt, schied die Lösung im Laufe von 10 Tagen bei Zimmertemperatur keine Krystalle ab.

6. Die Lösung löste in verhältnismäßig bedeutender Menge mit Leichtigkeit frisch gefälltes Kupferoxydhydrat; die erhaltene Lösung der Kupferverbindungen krystallisierte, zur Sirupkonsistenz eingeeengt, selbst in 10 Tagen nicht.

7. Die Lösung vermochte freie Mineralsäuren zu binden.

8. Mit 2—3 Volumen Wasser verdünnt, 2—3mal auf kochendem Wasserbade eingedampft und zur dünnen Sirupkonsistenz eingeeengt, krystallisierte die Lösung im Verlaufe

von 12—24 Stunden durchgängig und zwar bei Zimmertemperatur. Der krystallinische Niederschlag bestand hauptsächlich aus kleinen Nadeln, die entweder in mannigfaltigen Gruppen angeordnet waren oder einzeln lagen.

Wie aus Obengesagtem erhellt, sind die in Rede stehenden Verdauungsprodukte wahrscheinlich irgend welche Verbindungen von Monoaminosäuren resp. Polypeptide. Solche hydrolytischen Produkte der Eiweißkörper sind schon von mir¹⁾ und E. Swirlowski²⁾ beschrieben worden. Es ist möglich, daß die in Rede stehende Lösung auch Monoaminosäuren als solche enthält.

Zur Gewinnung der Koagulosen wurde die gegebene Lösung mit Schwefelsäure angesäuert (Spuren von Reaktion mit Kongopapier), zum dünnen Sirup eingedampft und sorgfältig mit Grüblerscher Pepsinlösung (verdaut und dialysiert) vermischt. Letztere Lösung wurde in einer Menge von $\frac{1}{20}$ Volumen der genommenen eingedampften Lösung der gegebenen Verdauungsprodukte hinzugefügt. Unter sorgfältigem häufigen Schütteln wurde die Mischung, mit einem Überschuß von Chloroform versehen, bei ca. 40° ca. 48 Stunden gehalten. Die erhaltene Koagulose wurde abgetrennt und sorgfältig mit kaltem destillierten Wasser ausgewaschen. Frisch ausgewaschen löste sie sich schlecht in 0,5%iger Salzsäure, verhältnismäßig schwierig sogar in 2—5%iger Ätznatriumlösung und gab Spuren von Liebermannscher, Millonscher und Xanthoproteinreaktion, während die Adamkiewiczsche Reaktion vollständig negativ ausfiel. Digestion mit 10% Ätznatriumlösung bei Gegenwart von schwefelsaurem Kupfer gab eine rosaviolette Färbung. Zum konstanten Gewicht bei 105—110° getrocknet (die Substanz trocknete sehr leicht), enthielt sie 11,56% Stickstoff (nach Kjeldahl). Die Frage nach der chemischen Individualität dieser Koagulose ist natürlich offen.

6 g dieser Koagulose (auf Trockensubstanz berechnet) wurden mit 25%iger Schwefelsäure bei Gegenwart von Zinn der Spaltung unterworfen und zwar anfangs durch Kochen auf dem Wasser-, hernach auf dem Sandbade. Die Operation wurde

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLIII, S. 447—463.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLVIII, S. 252—299.

in einem Kolben mit rundem Boden und Rückflußkühler, der an seiner oberen Öffnung ein langes offenes Kapillarrohr trug, vorgenommen. Es erwies sich, daß die Substanz sehr langsam bei der gegebenen Behandlung sich löste, sodaß die Zerlegung ca. 72 Stunden dauerte. Die erhaltene Lösung der Spaltungsprodukte wurde von Zinn und Schwefelsäure befreit und zur Sirupkonsistenz eingedampft; beim Stehen bei Zimmertemperatur verwandelte sich die Lösung nach 12—24 Stunden in eine breiartige krystallinische Masse. Diese Lösung enthielt gar keine resp. fast gar keine Basen. So reagierte die Lösung sogar bei einem Stickstoffgehalte von 0,25% fast garnicht mit P. W. S. 10 ccm dieser Lösung von angegebener Konzentration und einem Gehalte von 0,5% Schwefelsäure gaben mit P. W. S., die vorsichtig so lange hinzugefügt wurde, bis beim Stehen einer Probe eine Trübung entstand, einen staubartigen, schnell sich absetzenden Niederschlag in einer Menge von $\frac{1}{20}$ — $\frac{1}{10}$ ccm. Die gegebene Koagulose kann daher als eine Verbindung angesehen werden, in deren Bestand allem Anscheine nach Zerfallsprodukte der Eiweißkörper mit Basencharakter nicht gehören; sie ist eine Koagulose vom Typus der oben beschriebenen Verbindungen von Monoaminosäuren resp. der Polypeptide.

Parallel mit der Spaltung dieser Koagulose wurde die Spaltung einer Koagulose ausgeführt, die aus koagulosogenen Produkten vom Typus der Albumosen, gewonnen bei der peptischen Verdauung von Kuhcasein, erhalten war. Diese Produkte wurden von den Substanzen, die durch schwefelsaures Ammonium und P. W. S. nicht gefällt werden, gereinigt; überdies wurden aus dem Gemische dieser Produkte die Substanzen entfernt, welche in Alkoholäthermischung (75% Alkohol + 60% Äther) sich nicht lösen. Diese Koagulose gab eine ausgesprochene Biuretreaktion (kirschrote Färbung), wie auch die Millonsche, Adamkiewiczsche, Liebermannsche und die Xanthoproteinreaktion in scharfer Ausprägung. Bei 105—110° zum konstanten Gewicht getrocknet, enthielt sie 14,25% Stickstoff (nach Kjeldahl). Nach ihrer Zerlegung durch 25%ige Schwefelsäure in der oben angeführten Weise wurde eine Lösung erhalten, die durch P. W. S. bei Gegenwart von 0,5%iger

Schwefelsäure gefällt wurde. Der Niederschlag der basischen Zerfallsprodukte wurde mit 0,5%iger Schwefelsäure, die etwas P. W. S. enthielt, ausgewaschen (die Waschfiltrate reagierten mit P. W. S. nicht); die Waschfiltrate wurden mit dem ersten Filtrate vereinigt. Der Niederschlag enthielt 0,3245 g Stickstoff (= 24,6% Stickstoff der zersetzten Koagulose); die Filtrate enthielten 0,9171 g Stickstoff (= 75,4%). Die wässrige Lösung der Basen reagierte ziemlich stark alkalisch, gab einen verhältnismäßig geringen Niederschlag mit AgNO_3 bei Gegenwart von NH_4OH und einen ziemlich bedeutenden mit AgNO_3 bei Gegenwart von $\text{Ba}(\text{OH})_2$. Die Lösung der Zerfallsprodukte von saurem Charakter verwandelte sich, zum dünnen Sirup eingedampft, in einen krystallinischen Brei; der krystallinische Niederschlag bestand hauptsächlich aus langen dünnen Nadeln, die einzeln lagen oder sich zu Gruppen vereinigten. Es ist somit unzweifelhaft, daß in den Bestand der gegebenen Koagulose sowohl basische wie saure Zerfallsprodukte des Eiweißmoleküls gehören.

Die oben angeführten Angaben habe ich an einem anderen, schon früher gewonnenen Materiale geprüft und zwar an den hydrolytischen Produkten von einmal umkrystallisiertem Pferdehämoglobin, die durch Digestion des genannten Eiweißstoffes mit 0,5%iger Schwefelsäure erhalten waren. Zu diesem Zwecke wurde einmal umkrystallisiertes Hämoglobin bei $85-90^\circ$ zur Gerinnung gebracht und dreimal mit heißem destillierten Wasser ausgewaschen; bei jedem Auswaschen wurde der gewonnene Eiweißkörper 30—40 Minuten lang mit heißem Wasser (85 bis 90° C.) bei fortwährendem sorgfältigen Schütteln gehalten, worauf abfiltriert wurde. Die Digestion ging bei 40° C. und einem Überschusse vom Chloroform im Verlaufe von 7 Monaten vor sich. Die Lösung der Digestionsprodukte wurde durch P. W. S. gefällt, der erhaltene Niederschlag mit 0,5%iger Schwefelsäure, die P. W. S. enthielt, ausgewaschen und die Waschfiltrate mit dem ersten Filtrate vereinigt. Die vereinigten Filtrate wurden von Schwefelsäure und P. W. S. befreit (mit Ätzbaryt) und bei ca. 40° eingedampft; die erhaltene Lösung, die ca. 1% organische Substanzen enthielt, wurde noch einmal mit P. W. S. bei

Gegenwart von 0,5 %iger Schwefelsäure gefällt, wobei ein verhältnismäßig geringer Niederschlag resultierte. Das von diesem Niederschlage abgetrennte Filtrat wurde von Schwefelsäure und P. W. S. befreit. Die auf diese Weise erhaltenen Substanzen zeigten im allgemeinen die Eigenschaften, wie sie oben hinsichtlich der entsprechenden, bei der obenerwähnten peptischen Verdauung des Hämoglobins gewonnenen Produkte beschrieben wurden. Die Lösung der basischen Produkte enthielt 27,88 g Stickstoff; die Lösung der durch P. W. S. nicht fällbaren Produkte 9,75 g Stickstoff. Aus der Lösung der letztgenannten Produkte wurde eine Koagulose erhalten, die, bei 105—110° C. getrocknet, einen Stickstoffgehalt von 12,06 % aufwies. Die Koagulose wurde, wie oben beschrieben, durch 25 %ige Schwefelsäure zerlegt. Die Lösung der Spaltprodukte ließ sich sehr schlecht durch P. W. S. bei Gegenwart 0,5 %iger Schwefelsäure fällen. So gaben z. B. 10 ccm dieser Lösung, die 0,136 % Stickstoff enthielt, mit P. W. S., die allmählich zugesetzt wurde und zwar so lange, bis beim Stehen einer Probe noch eine Trübung auftrat, einen Niederschlag, der nach 24 Stunden 0,1—0,2 ccm betrug.

Aus denjenigen Digestionsprodukten des Hämoglobins, die durch P. W. S. gefällt wurden, ließ sich ganz in derselben Weise, wie sie oben für die Gewinnung der Koagulose des Caseins beschrieben wurde, eine Koagulose gewinnen — eine Koagulose vom Typus der Albumosen. Zum konstanten Gewicht bei 105—110° getrocknet, ergab sie einen Stickstoffgehalt von 14,25 % (nach Kjeldahl). Mit 25 %iger Schwefelsäure, bei Gegenwart von Zinn, wurde sie der Spaltung unterworfen und die erhaltenen Spaltungsprodukte in basische und saure gesondert und zwar durch P. W. S. (bei Gegenwart von 0,5 %iger Schwefelsäure). Es erwies sich, daß diese Koagulose Basen enthielt, deren Stickstoff 23,5 % des Gesamtstickstoffs der Koagulose ausmachte.

Auf Grund der oben angeführten Versuchsergebnisse kann man folgende Schlüsse ziehen:

1. Bei der peptischen Verdauung der Eiweißsubstanzen, wie auch bei der Digestion derselben mit verdünnten Mineral-säuren, entstehen irgend welche polypeptidartige Verbindungen

der Monoaminosäuren, die verhältnismäßig leicht in ihre Bestandteile — freie Monoaminosäuren — sich spalten lassen.

2. Man kann zum mindesten 2 Haupttypen von koagulosogenen Substanzen unterscheiden und zwar koagulosogene Substanzen vom Typus der Albumosen resp. den bekannten Albumosen ähnlicher Produkte und koagulosogene Substanzen vom Typus der polypeptidartigen Verbindungen.

3. Koagulosen, die aus koagulosogenen Produkten vom Typus der Albumosen hervorgegangen sind, liefern bei ihrer Spaltung sowohl basische stickstoffhaltige Spaltungsprodukte, wie auch stickstoffhaltige Spaltungsprodukte mit Säurecharakter. (Allem Anscheine nach Monoaminosäuren.) Koagulosen, die aus koagulosogenen Produkten vom Polypeptidentypus entstanden sind, liefern bei ihrer Spaltung, allem Anscheine nach nur Monoaminosäuren.

Zur Zeit ist von mir eine Untersuchung der Pepsin- resp. Labwirkung (verschiedene Pepsin- und Labpräparate) auf verschiedene Polypeptide E. Fischers in Angriff genommen.

Jurjew (Livland), 5. Juni 1907.
