

Beiträge zur Kenntnis der organischen Bestandteile des Serums.

Von

Eugen Letsche.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institute zu Tübingen.)

(Der Redaktion zugegangen am 22. Juli 1907.)

Schon lange ist bekannt, daß im Blut ein kleiner Teil des Gesamtstickstoffes in Form nicht eiweißartiger Stoffe sich findet. Unsere Kenntnis von der Natur der einzelnen Bestandteile, aus welchen dieses stickstoffhaltige Gemenge sich zusammensetzt, ist bis in die neueste Zeit eine recht lückenhafte geblieben. Von wohl charakterisierten stickstoffhaltigen Verbindungen haben im Menschenblut mit Sicherheit nur Harnstoff, Kreatin und Hippursäure sich nachweisen lassen; ob Harnsäure als normaler Bestandteil im Blut sich findet, ist nicht sicher erwiesen.

Durch den Nachweis dieser Stoffe war aber nur für einen kleinen Teil des Stickstoffes festgestellt, in welcher Form er im Blute kreist; der bei weitem größere Teil des Gemenges war einer weiteren Zerlegung in chemisch wohldefinierte Verbindungen unzugänglich. Wohl ist der Versuch¹⁾ gemacht worden, die stickstoffhaltigen Bestandteile auf Grund bestimmter Reaktionen in verschiedene Gruppen aufzuteilen und dadurch einen Einblick in die Zusammensetzung des Gemenges zu erhalten; ohne die Zweckmäßigkeit und Brauchbarkeit dieses Verfahrens für vergleichende Zwecke in Frage stellen zu wollen, bin ich doch der Ansicht, daß damit ein wesentlicher Fortschritt in der Erkenntnis der Natur dieser Stoffe nicht gegeben ist; und zwar vor allem aus folgendem Grunde. Es ist ja von vornherein nicht ausgeschlossen, daß im Blut Stoffe sich finden, die als Übergangsglieder von den Peptonen zu den krystallinischen Eiweiß-

¹⁾ Ascoli, Pflügers Archiv, Bd. LXXXVII, S. 103.

spaltungsprodukten anzusehen sind, Stoffe, wie sie von verschiedenen Forschern¹⁾ in den letzten Jahren aus Verdauungsgemischen isoliert wurden. Von diesen «Peptiden» sind die einen durch Phosphorwolframsäure fällbar, wie z. B. das von Fischer und Abderhalden bei der tryptischen Verdauung aus verschiedenen Eiweißstoffen²⁾ erhaltene Polypeptid; andere wie z. B. die von Zunz und die von Pfaundler, bei der peptischen Verdauung (von Serumalbumin, -globulin, Casein, Eieralbumin und Fibrin) erhaltenen Produkte geben mit diesem Reagens keine schwer löslichen Verbindungen.

Würde man auf ein Gemenge, das Stoffe aus diesen beiden Lösungen enthält, die Trennung mittels Phosphorwolframsäure anwenden, so müßte man nach unseren bisherigen Erfahrungen den durch dieses Reagens fällbaren Teil des Stickstoffs als «Diaminostickstoff» ansprechen. Dieser Schluß wäre aber, soweit damit ein Urteil über die Bindungsweise des Stickstoffs in dem durch Phosphorwolframsäure gefällten Teil abgegeben werden sollte, in unserem Beispiel vollständig verfehlt, da ja das von Fischer und Abderhalden isolierte Polypeptid bei der Säurespaltung sich als vollständig aus Monoaminosäuren aufgebaut erweist.

Mag dieses Beispiel vielleicht auch einen etwas extremen Fall, der in der Wirklichkeit ein Analogon nicht hat, darstellen, soviel ist jedenfalls zuzugeben, daß das angedeutete Verfahren sichere Schlüsse über das Wesen der einzelnen Bestandteile nicht zuläßt. Die einzige Möglichkeit, hierüber Klarheit zu erhalten, bleibt darum der Versuch, die einzelnen Bestandteile zu isolieren und näher zu charakterisieren.

In dem stickstoffhaltigen Gemenge findet sich Material aus 2 verschiedenen Quellen; wir müssen erwarten, Stoffe zu finden, die durch das Blut den Zellen zur Weiterverarbeitung erst zugeführt werden, wie auch Stoffe, welche Endprodukte des Zellstoffwechsels darstellen.

¹⁾ Fischer u. Abderhalden, Diese Zeitschrift, Bd. XXXIX, S. 83.

E. Zunz, Diese Zeitschrift, Bd. XXVIII, S. 132.

Pfaundler, Diese Zeitschrift, Bd. XXX, S. 90.

²⁾ Casein, Edestin, Hämoglobin, Eieralbumin, Fibrin, Serumglobulin.

In welcher Form stickstoffhaltiges Material durch das Blut den Zellen zugeführt wird, ist ungewiß. Erfahren die Endprodukte der Verdauung im Magendarmkanal vor ihrem Übertritt ins Blut eine Veränderung in der Weise, daß «Körpereiwweiß» gebildet wird, oder findet, soweit dies nicht schon im Darm geschieht, am Ende noch eine weitere Spaltung in die einfachsten Eiweißbausteine statt? Für die Frage nach dem Vorkommen von niederen Eiweißspaltprodukten im Blut kommen beide Möglichkeiten in gleicher Weise in Betracht, wofern man nicht den resorbierenden Organen die Fähigkeit zuschreiben will, aus dem Darm nur solche Bausteine aufzunehmen, die für die Bildung von Körpereiwweiß notwendig — und auch diese nur in den Verhältnissen, wie sie eben für den Aufbau dieser Eiweißmoleküle erforderlich sind. Die zahlreichen Arbeiten von E. Fischer und seinen Schülern haben ja gezeigt, daß die verschiedenen Eiweißkörper qualitativ im großen und ganzen aus denselben «Bausteinen» bestehen, daß aber in den Mengenverhältnissen, mit welchen die einzelnen Bausteine am Aufbau der verschiedenen Eiweißkörper sich beteiligen, nicht unerhebliche Unterschiede bestehen, und daß die Verschiedenheit der Eiweißstoffe ihren Grund hat zum Teil eben darin, zum Teil vielleicht auch in der Art, wie die einzelnen Bausteine untereinander verknüpft sind. Der Übergang von «Nahrungseiwweiß» in «Körpereiwweiß» könnte dann vielleicht in der Weise vor sich gehen, daß die im Magendarmkanal gebildeten Spaltprodukte in anderer Weise sich zusammenlegen oder aber, daß ein Teil eben dieser «Bausteine» zum Aufbau von Körpereiwweiß überhaupt keine Verwendung mehr findet — und eben diesen Teil hätten wir im Blut zu suchen.

Was die aus der zweiten Quelle stammenden stickstoffhaltigen Verbindungen anlangt, so sollte man erwarten, neben den bis jetzt mit Sicherheit im Blut nachgewiesenen Stoffwechselendprodukten — Harnstoff, Harnsäure(?), Hippursäure, Kreatin — auch deren Begleiter im Harn — vor allem die Purinbasen — im Blut nachweisen zu können. Bis jetzt hat sich jedoch im normalen Blut keine dieser Basen nachweisen lassen und ein erneuter Versuch schien darum nicht aussichtslos

und zwar umsomehr, als ja schon lange bekannt ist, daß aus dem Blut bei gewissen Krankheiten solche Verbindungen, vor allem Hypoxanthin,¹⁾ sich haben isolieren lassen, neben Stoffen, wie Leucin und Tyrosin,²⁾ die wir als einfachste Eiweißbausteine kennen gelernt haben.

Da nun die früheren Untersuchungen meist nur an verhältnismäßig kleinen Blut- bzw. Serummengen ausgeführt worden waren, lag die Vermutung nahe, daß diese unter bestimmten pathologischen Verhältnissen in größerer Menge im Blut sich findenden krystallinischen Spaltprodukte vielleicht auch im normalen Blute kreisen, nur in einer so kleinen Menge, daß sie sich bis jetzt dem Nachweis entzogen. Diese Annahme schien umsomehr berechtigt, als die Methoden, die zur Aufteilung eines aus so gleichartigen Stoffen bestehenden Gemenges Verwendung fanden, ihren Zweck nur teilweise erfüllten.

Die absolute Menge dieses «Reststickstoffs» im Blute kann ja infolge der raschen Erneuerung des Blutes in allen Organen natürlich nur eine sehr kleine sein;³⁾ sollte darum eine erneute Untersuchung des Blutes auf stickstoffhaltige nicht eiweißartige Stoffe vor allem eine definitive Klärung bringen, so war nur von der Aufarbeitung recht großer Blutquantitäten nach geeigneten Methoden ein Erfolg zu erhoffen.

Aus diesem Grunde konnte als Untersuchungsmaterial nur Blut unserer großen Haustiere in Betracht kommen; da Pferdeblut am leichtesten in großen Mengen sich beschaffen ließ, wählte ich dieses für meine Zwecke.

Aus dem Blut entfernt man durch Schlagen das Fibrin, läßt die Blutkörperchen sich senken und hebt das überstehende Serum ab. War das Serum stark rot gefärbt, so konnte es für

¹⁾ Scherer, Verh. d. med.-phys. Ges. zu Würzburg, 1851.

Salkowski, Virchows Archiv, Bd. L, S. 174.

Salomon, Diese Zeitschrift, Bd. II, S. 65.

²⁾ Neuberg u. Mitarbeiter, Deutsche med. Wochenschr., 1904, S. 14.
Berl. klin. Wochenschr., Bd. XLIII, S. 258/60.

v. Bergmann u. Langstein, Hofmeisters Beitr., 1905, S. 27.

³⁾ Siehe auch v. Bergmann und Langstein, Hofmeisters Beiträge, 1905.

meine Zwecke keine Verwendung finden; eine ganz schwache Rotfärbung glaubte ich jedoch in Kauf nehmen zu müssen, denn bei den großen Blutmengen — es wurde jedesmal alles Blut des geschlachteten Tieres aufgefangen — ist es so gut wie unmöglich, die Auflösung geringer Mengen Blutkörperchen zu verhindern. Nach dem Abheben filtriert man das Serum und versetzt mit dem 3fachen Volumen Alkohol (von 96⁰/₀), nachdem zuvor dem Serum etwas Essigsäure — auf je 3 l Serum 5 ccm 50⁰/₀ige Säure — zugesetzt worden war; der Essigsäurezusatz trägt, wie die untenstehenden Zahlen zeigen, sehr wesentlich zur möglichst vollständigen Fällung der im Serum vorhandenen Eiweißstoffe bei.

Von 2 im übrigen genau gleich behandelten Serumportionen wurde die eine, vor der Fällung mit Alkohol, mit soviel Essigsäure versetzt, daß die Reaktion der Lösung auf Lackmus eben nur ganz schwach sauer war; aus dem auf Alkoholzusatz entstehenden Niederschlag waren die im Alkohol, Äther und in Wasser löslichen Substanzen¹⁾ durch Waschen mit den betreffenden Lösungsmitteln entfernt und der Rückstand bei 105⁰ getrocknet worden.

Aus 40 ccm Serum wurden gefällt:

ohne Essigsäurezusatz	3,125 g,
mit	»
	3,641 g Eiweißstoffe.

Die Menge der ohne Essigsäurezusatz gefällten Eiweißstoffe beträgt also nur rund 86⁰/₀ des Niederschlags, der bei Essigsäurezusatz erhalten wird.

Die Menge des Alkohols — 3 Volumina auf 1 Volumen Serum — war groß genug, um die Fällung der Eiweißkörper so vollständig zu machen, als bei Anwendung dieses Verfahrens überhaupt möglich war:

40 ccm Serum geben mit 90 ccm Alkohol (96⁰/₀) eine reichliche Fällung, deren Filtrat selbst auf Zusatz von weiteren 90 ccm Alkohol und 24stündigem Stehen nicht einmal eine Trübung mehr gab.

Auch Hürthle²⁾ verwendet zur Ausfällung der Eiweiß-

¹⁾ Hoppe-Seyler-Thierfelder, 7. Aufl., S. 483.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXI, S. 331.

stoffe aus dem Serum das dreifache Volumen Alkohol und Grehant¹⁾ gibt an, daß zur vollständigen Fällung der Eiweißstoffe die doppelte Gewichtsmenge (entsprechend 2^{1/2} Vol.) Alkohol genüge.

Eine quantitative Fällung erreicht man jedoch auf diesem Wege nicht; bei der Aufarbeitung der «eiweißfreien» Lösungen wurden nämlich stets Stoffe erhalten, welche die gewöhnlichen Eiweißreaktionen (Millon-, Biuret-, Xanthoproteinsäure und Schwefelbleireaktion) mit aller Schärfe gaben.

Die alkoholisch-wässrige Flüssigkeit bleibt über dem Eiweißniederschlag unter wiederholtem Umschütteln 36—48 Stunden in der Kälte²⁾ stehen; dann trennt man durch Kolieren den Niederschlag von der Flüssigkeit, zerreibt den Niederschlag mit Alkohol (96^{0/0}) zu einem nicht zu dünnen Brei, erwärmt diesen unter Umrühren auf 30—35⁰ auf dem Wasserbad und saugt die Flüssigkeit noch warm auf der Nutsche ab; auf diesem Wege gelingt die Entfernung der letzten Flüssigkeitsreste aus dem Niederschlag sehr leicht und rasch.

Den noch feuchten³⁾ Niederschlag zerreibt man und extrahiert ihn dann mit Alkohol und schließlich mit Äther.⁴⁾ Diese beiden Auszüge vereinigt man mit der alkoholisch-wässrigen Hauptflüssigkeit.

In einigen Fällen schieden sich aus dem Ätherauszug, der natürlich stark alkoholhaltig war, feine Krystalle aus; durch Umkrystallisieren aus Alkohol gelang eine Zerlegung in zwei Frak-

¹⁾ Chemiker-Zeitung, 1903, S. 1077. Referat über die Sitzung der Acad. des Sciences vom 12./10. 03.

²⁾ Die Aufarbeitung von Blut geschah nur in den Monaten November bis März, weil gerade Pferdeblut sich außerordentlich leicht und rasch zersetzt.

³⁾ Die Masse darf beim Zerreiben an den Fingern nicht kleben; ist dies doch einmal der Fall, so empfiehlt es sich, den Eiweißniederschlag nochmals mit Alkohol zu erwärmen und auf der Nutsche wieder möglichst trocken zu saugen; andernfalls macht das Ausziehen des Niederschlags mit Alkohol ziemlich große Schwierigkeiten und wird unter Umständen ganz unmöglich.

⁴⁾ Wasserlösliche Substanzen finden sich in dem Eiweißniederschlag keine mehr; bei sechsmaligem Auskochen von 150 g des trockenen Niederschlags geht, wovon ich mich durch Verdunsten der Lösungen überzeugte, so gut wie nichts in das Wasser über.

tionen; die im Alkohol leichter lösliche ist bei gewöhnlicher Temperatur halbfest; sie stellt zweifelsohne den Cholesterinester einer höheren Fettsäure — wohl Ölsäure — dar, doch gelang es mir nicht, genügend große Mengen für eine nähere Untersuchung zu erhalten.

Die in Alkohol schwerer lösliche Fraktion ist rein weiß zu erhalten und schmilzt bei 76/77° (unkorr.); wiederholtes Umkrystallisieren aus Alkohol hat eine Erhöhung des Schmelzpunktes nicht zur Folge. Die Krystalle geben in trockenem Chloroform gelöst, mit Essigsäureanhydrid und konzentrierter Schwefelsäure, die Liebermann-Burchardsche Cholesterinprobe.¹⁾

0,1376 g (vak. getrocknet) geben 0,4165 g CO₂ und 0,1500 g H₂O.

Gefunden: C = 82,50%

H = 12,19%

Für Palmitinsäurecholesterinester²⁾ ist berechnet:

C₄₃H₇₄O₂:³⁾

C = 82,88%

H = 11,98%

C₄₃H₇₆O₂:³⁾

82,61%

12,26%

Die Verbrennung geschah im Bleichromatrohr im langsamen Sauerstoffstrom.

Bei den bis jetzt ausgeführten Blutuntersuchungen kam wohl meist die von Hoppe-Seyler⁴⁾ empfohlene Methode, die bei kleineren Flüssigkeitsmengen sich als ganz zweckmäßig erweist, zur Anwendung. Für meine Zwecke hielt ich es jedoch, trotz der an jener Stelle sich findenden Warnung für zweckmäßiger, die von Eiweiß befreite Flüssigkeit im Vakuum einzudampfen und den trockenen Rückstand der Reihe nach mit Äther, Alkohol und Wasser auszuziehen.

Die in Hoppe-Seylers Lehrbuch angedeuteten Übelstände habe ich, allerdings nur bei sehr vorsichtigem Arbeiten, wenigstens was das Trocknen, Pulverisieren und Extrahieren anlangt, nicht bestätigt gefunden. Ein Teil des Lecithins wird allerdings zersetzt, doch war dieser Umstand, da es mir zu-

¹⁾ Berichte, Bd. XVIII, S. 1804.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXI, S. 331.

³⁾ Bezüglich der Formeln siehe S. 47.

⁴⁾ Hoppe-Seyler-Thierfelder, 7. Aufl., S. 483 ff.

nächst auf die N-haltigen Bestandteile, welche neben Lecithin im Serum sich finden, ankam, weniger von Bedeutung, als die Möglichkeit, daß auch andere N-haltige Verbindungen sich zersetzen könnten.

Das Eindampfen im Vakuum der aus einer Serumportion erhaltenen Flüssigkeitsmenge — etwa 35 l bei 7 l Serum — nahm meist 2¹/₂—3 Tage in Anspruch. Die Temperatur der verdampfenden Flüssigkeit wurde ständig kontrolliert.¹⁾ Der beim Eindampfen bleibende Rückstand wird noch feucht auf Ton gebracht, in einzelne Stücke zerteilt und im Vakuum über H₂SO₄ getrocknet. Andern Tags ist die Masse in der Regel soweit trocken, daß sie sich zu einem groben Pulver zerreiben läßt. Nach weiterem 1—2tägigen Stehen über H₂SO₄ zerreibt man möglichst rasch zu einem staubfeinen Pulver, trocknet noch ein drittes Mal und füllt das Pulver dann in vollkommen trockene Gläser, die sofort mit Paraffin verschlossen werden.

Geschah das Eindampfen auch, wie aus der Anmerkung zu ersehen ist, bei sehr niedriger Temperatur, so war der Möglichkeit, daß infolge des Eindampfens N-haltige Verbindungen sich zersetzen könnten, doch Rechnung zu tragen. Es wurde deshalb eine Serumportion, bei der die Verhältnisse weniger günstig lagen — die Temperatur war zum Teil wenig über 50° gestiegen — als bei der in der Anmerkung erwähnten Portion, in folgender Weise verarbeitet.

¹⁾ Die beim Eindampfen einer Portion aus 7 Litern Serum abgelesenen Temperaturen sind folgende:

1. Tag		2. Tag		3. Tag	
Zeit	Temp.	Zeit	Temp.	Zeit	Temp.
11 ³⁰	23°	9 ⁰⁰	22°	9 ⁰⁰	22°
1 ⁵⁰	28°	10 ⁰⁰	25°	10 ³⁰	25°
3 ³⁰	25°	11 ³⁰	28°	12 ⁰⁰	29°
5 ⁰⁰	29°	1 ³⁰	29°	4 ⁰⁰	37°
6 ³⁰	37°	6 ³⁰	35°	6 ³⁰	43°

Die Flüssigkeit war nach dieser Zeit bis auf geringe Reste verdampft.

Die vom gefällten Eiweiß durch Kolieren und Filtrieren getrennte alkoholisch-wässrige Flüssigkeit wird mit dem Alkohol, der zum Entfernen der letzten Flüssigkeitsreste aus dem Eiweißniederschlag gedient hatte, vereinigt. Von je 1000 ccm dieser im Vakuum einzuengenden Flüssigkeit werden 50 ccm abgetrennt.

Eingedampft werden 23 845 ccm, je 100 ccm dieser Lösung entsprechen 25 ccm Serum. Das Eindampfen, die Entfernung des Rückstandes aus dem Kessel und seine weitere Behandlung (siehe oben) geschah unter möglicher Vermeidung von Verlusten; die Menge des vakuumtrockenen Rückstandes betrug 72,5 g; die Gesamtstickstoffbestimmung geschah nach Kjeldahl,¹⁾ die Ammoniakbestimmung nach Wurster;²⁾ bei der letzteren Bestimmung betrug die Temperatur des Wasserbades 42°; zur Zersetzung der Ammoniumsalze diente frisch bereitete Kalkmilch; die Resultate der Analysen finden sich in der umstehenden Tabelle I.

Vergleicht man die Zahlen für den Gesamtstickstoff im eingedampften und nicht eingedampften Teil der Lösung, so ergibt sich ein ziemlich großer Stickstoffverlust. Berücksichtigt man jedoch, daß das Verhältnis von Gesamtstickstoff zu Ammoniakstickstoff im nicht eingedampften Teil wie 6,5 : 1, im eingedampften Teil dagegen wie 68 : 1 ist, mit anderen Worten, daß ein sehr großer Teil des «Ammoniaks» in das Destillat übergegangen ist, so stellt sich der Verlust wesentlich niedriger. Die Menge des organisch gebundenen Stickstoffs beträgt im nicht eingedampften Teil 0,0308 g, im eingedampften Teil 0,0283 g je auf 100 ccm Serum bezogen.

Der Verlust an organisch gebundenem Stickstoff beträgt also etwa 8%. Diese Zahl stellt aber sicher das Maximum des Verlustes dar, da ja kleine Verluste an Serumtrockenrückstand bei der umständlichen Verarbeitung des eingedampften

¹⁾ Veraschung mit konzentrierter H₂SO₄ unter Zusatz von wenig Quecksilber; Erhitzen, bis die Lösung vollkommen farblos ist (Wilfahrt, Ch., Z. 3. F., Bd. XVI, S. 17).

²⁾ Modifiziert von Schittenhelm, Krüger und Reich, Diese Zeitschrift, Bd. XXXIX, S. 78, S. 173.

Teils bei aller Vorsicht sich nicht ganz vermeiden lassen und diese wegen des geringen Ammoniakstickstoffgehaltes im eingedampften Teil vor allem auf das Verhältnis des Gesamtstickstoffs einen Einfluß ausüben.

Tabelle I.

	Zur Analyse angewendet	Gesamtstickstoff		Ammoniakstickstoff	
		Gefunden ccm $n/10$ N	g N in 100 ccm Serum	Gefunden ccm $n/100$ N	g N in 100 ccm Serum
1. Nicht ein- gedampfter Teil	50 ccm	3,5	0,0392	—	—
	50 »	3,0	0,0336	—	—
		Mittel 0,0364			
	100 ccm			9,8	0,00550
	100 »	—	—	10,3	0,00578
				Mittel 0,00564	
2. Ein- gedampfter Teil	1,0054 g	17,21	0,0292	—	—
	1,9285 »	31,90	0,0281	—	—
		Mittel 0,0287			
	3,0473 g			7,5	0,00042
	2,9141 »	—	—	7,1	0,00041
				Mittel 0,00042	

Was für Verbindungen beim Eindampfen im Vakuum in die Brüche gehen, habe ich nicht untersucht; eine einwandfreie Feststellung dürfte vor allem der ganz geringen Mengen der betreffenden stickstoffhaltigen Verbindungen wegen mit sehr großen Schwierigkeiten verknüpft, wenn nicht ganz unmöglich sein. Man wird wohl mit einiger Wahrscheinlichkeit annehmen dürfen, daß neben anderen Verbindungen ein Teil des im Serum sich findenden Harnstoffs sich zersetzt. Allerdings ist, wie nachstehender Versuch zeigt, die Zersetzlichkeit des Harnstoffs unter den eingehaltenen Bedingungen eine außerordentlich geringe.

10 g Harnstoff (chem. rein) werden mit ca. 20 g Na_2SO_4 (ammonsalzfrei) und 5 ccm $n/10$ - H_2SO_4 in 2000 ccm destilliertem, ebenfalls ammoniakfreiem Wasser gelöst; diese Lösung wird

im Vakuum bei 35—40° bis auf 40 ccm eingengt; durch Einschalten einer kleinen, mit H_2SO_4 beschickten Kugelhöhre zwischen Saugpumpe und Vorlage war jeder Möglichkeit des Entweichens von NH_3 vorgebeugt; das Destillat engt man bei saurer Reaktion (H_2SO_4) ein und destilliert nach dem Zugeben von reiner Kalilauge etwa vorhandenes NH_3 in titrierte H_2SO_4 ab.

Vorgelegt waren 30,45 ccm $\text{n}/_{10}\text{-H}_2\text{SO}_4$.

Zurücktitrert wurden 29,60 ccm $\text{n}/_{10}\text{-H}_2\text{SO}_4$.

Also sind nur 0,85 ccm $\text{n}/_{10}\text{-H}_2\text{SO}_4$ an NH_3 gebunden; diese 0,85 ccm $\text{n}/_{10}\text{-H}_2\text{SO}_4$ entsprechen 0,0024 g Harnstoff; somit haben sich höchstens 2,4 Teile Harnstoff auf 10 000 Teile in der Lösung vorhandenen Harnstoff zersetzt. Daß die Menge des Ammoniakstickstoffs im eingedampften Teil kleiner sein werde, als im nicht eingedampften, war unter der Voraussetzung, daß NH_4 -Salze im Blut vorhanden sind, nach physikalisch-chemischen Gesetzen vorauszusehen; ob aber die ganze Menge oder auch nur ein Teil des beim Destillieren mit Kalkmilch im Vakuum erhaltenen Ammoniaks schon als solches im Serum enthalten ist, bleibt unentschieden, denn Verbindungen wie Carbaminsäure geben unter diesen Bedingungen ihren Stickstoff als Ammoniak ebenfalls vollständig ab. Vergleicht man die in Tabelle I für den Ammoniakgehalt des Pferdeserums gegebenen Zahlen — 0,0056 g N = 0,0068 g NH_3 in 100 ccm Serum — mit den Zahlen, die Nencki, Pawlow und Zaleski¹⁾ gegeben haben, 2,2 mg NH_3 in 100 ccm Serum, so ist die Berechtigung der Bedenken, welche diese Forscher gegen die Verwendung von Kalkmilch zur Ammoniakbestimmung erhoben haben, ohne weiteres zuzugeben. Aus diesem Vergleich läßt sich aber weiter der sichere Schluß ziehen, daß ein großer Teil des als «Ammoniak» bestimmten Stickstoffs nicht als solches im Blut sich findet, sondern erst sekundär durch die Wirkung der Kalkmilch aus organischen Stoffen gebildet wurde. Eine Andeutung, was für Stoffe dies sein könnten, geben diese Autoren vielleicht mit der Feststellung,²⁾ daß «auch Eiweißstoffe

¹⁾ Archiv für experim. Path. u. Pharm., Bd. XXXVII, S. 26.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXIII, S. 193.

in alkalischer Lösung bei Bruttemperatur unter Sauerstoffaufnahme NH_3 abspalten».

Was schließlich die Anwesenheit von Carbaminsäure bzw. Ammoniumcarbaminat, dessen Vorkommen im Blut Drechsel¹⁾ zuerst nachgewiesen hat, anlangt, so hält Nolf²⁾ eine speziell physiologische Herkunft dieses Salzes nicht für erwiesen. Er glaubt auf Grund seiner Versuche das Vorkommen dieser Verbindung im Blut durch die allgemeinen Gesetze der Gleichgewichtszustände erklären zu müssen, eine Annahme, die in einer neueren Arbeit von MacLeod und Haskins³⁾ eine weitere Stütze findet.

Die wie Seite 37 ff. beschrieben hergestellten Serumtrockenrückstände sind äußerst hygroskopisch; bei nur kurzem Liegen an der Luft ziehen sie soviel Feuchtigkeit an, daß ein Weiterverarbeiten ohne vorheriges wiederholtes Trocknen unmöglich wird. Man muß deshalb beim Einfüllen des trockenen Pulvers in die Soxhletapparate so rasch wie möglich verfahren und die eingefüllte Masse sofort mit dem Extraktionsmittel übergießen.

Im Soxhletapparat behandelt man die trockenen Massen der Reihe nach mit

1. Petroläther, zwischen 45 und 75° siedend,
1 a. Äther,
2. Alkohol (99%). Das Ausziehen mit
3. Wasser (bzw. Salzsäure) geschieht in der Kälte.

Das Extrahieren wurde jeweils solange fortgesetzt, bis die Extraktionsmittel vollständig farblos abliefen; durch Stichproben überzeugte ich mich bei einzelnen Verarbeitungen, daß die Extraktionsmittel dann so gut wie nichts mehr enthielten.

A. Auszug mit Petroläther.

In aliquoten Teilen der klaren, eventuell filtrierten Petrolätherauszüge wurden dann der Gesamtstickstoff und der Ge-

¹⁾ J. f. prakt. Chemie, Bd. XII, S. 417; Sächs. Akad. d. Wissensch., 1875, S. 172.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXIII, S. 505.

³⁾ Journ. of Biol. Chem., Bd. I, S. 319.

samtphosphorgehalt festgestellt; die Stickstoffbestimmung geschah nach Kjeldahl, zur Phosphorbestimmung diente das Verfahren von Neumann,¹⁾ jedoch mit der Abänderung, daß der gelbe Niederschlag von phosphormolybdänsaurem Ammonium in NH_3 gelöst, die Phosphorsäure durch Magnesiamischung ausgefällt und gewichtsanalytisch als $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$ bestimmt wurde; die hierbei erhaltenen Zahlen finden sich in Tabelle II übersichtlich zusammengestellt.

Während die absoluten Mengen von Stickstoff und Phosphor (in 1000 ccm Serum) in weiten Grenzen schwanken, ist das Verhältnis der Atomzahlen von P : N ein auffallend konstantes. Eine Ausnahme machen nur die Portionen 1/2 und 13/14; während für die verhältnismäßig geringe Abweichung bei den beiden letzteren Portionen ein Grund sich nicht angeben läßt, ist er bei der Portion 1/2 darin zu suchen, daß die ätherlöslichen Bestandteile in diesem Falle schon nach nur teilweisem Einengen der Wasser-Alkoholmutterlauge des Eiweißniederschlags durch Ausschütteln mit Äther wenigstens teilweise entfernt worden waren.

Dieses konstante Verhältnis von P : N ist wohl kaum zufällig; die Vermutung liegt nahe, daß Stickstoff und Phosphor einem größeren Komplex angehören, der vielleicht in näheren Beziehungen zu Drechsels «Jecorin»²⁾ steht.³⁾

Der beim Abdestillieren des Petroläthers bleibende Rückstand ist gelatineartig und fühlt sich fettig an; er enthält ziemlich viel Stickstoff, der beim Kochen mit Laugen nur teilweise und sehr schwer als NH_3 abgespalten wird.

Die Asche des Petrolätherauszugs reagiert stark alkalisch; sie enthält von Metallen Na und allerdings kaum nachweisbare Spuren von Cu;⁴⁾ von Säuren finden sich nur H_2SO_4 und H_3PO_4 .

Nach mannigfach variierten Versuchen erwies sich zur

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXVII, S. 129.

²⁾ Journ. f. pr. Ch., Bd. XXXIII, S. 425; Zeitschrift für Biologie, Bd. XXXIII, S. 86.

³⁾ Versuche, eine derartige Verbindung zu isolieren, s. S. 59 ff.

⁴⁾ Aus dem Vakuumkessel, dessen Verzinnung an einzelnen Stellen schadhafte geworden war, stammend.

Tabelle II.

Nr.	Liter Serum	ccm Auszug	ccm für Analyse	Gefunden $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$ g	Gesamt-P in g	mg P in 1000 ccm Serum	Gefunden ccm $\text{n}/_{10}\text{-NH}_3$	Gesamt-N in g	mg N in 1000 ccm Serum	P : N
1—2	14	600	40	0,0223	0,093	6,64	6,90	0,145	10,4	1 : 3,45
3—4—5	23,5	675	30	0,0486	0,305	13,0	23,30	0,738	31,4	1 : 5,35
6—7—8—9	29	1350	30	0,0877	1,099	34,8	42,60	2,690	92,5	1 : 5,42
10	9	650	30	0,0910	0,549	60,8	48,70	1,482	163,0	1 : 5,96
11	8	125	15	0,0633	0,147	18,4	34,60	0,404	50,5	1 : 6,07
12	?	150	15	0,0605	0,169	?	29,30	0,411	?	1 : 5,39
13	7	600	30	0,0861	0,479	68,2	35,20	0,990	142,0	1 : 4,55
14	9	410	30	0,0699	0,266	29,5	29,90	0,574	64,0	1 : 4,76
15	?	250	25	0,0339	0,094	?	18,40	0,259	?	1 : 6,05

Eugen Letsche,

Aufarbeitung des Petrolätherauszugs folgendes Verfahren als das zweckmäßigste.¹⁾

Man verseift den beim Abdestillieren des Petroläthers bleibenden Rückstand mit Natriumalkoholat in der Kälte, nach dem Verfahren von Kossel und Obermüller.²⁾ Die zur Verseifung nötige Menge Natrium wird durch einen kleinen Vorversuch festgestellt, indem man einen aliquoten Teil mit titrierter Natriumalkoholatlösung in der Wärme verseift, nach der Verseifung die festen Fettsäuren mittels BaCl_2 abscheidet und die überschüssige Lauge dann zurücktitriert.³⁾ Zur Verseifung des Hauptteils verwendet man zweckmäßig stets etwas mehr (5—10%) Natrium, als nach dem Vorversuch sich als notwendig erweist. Die Natriumalkoholatlösung (4—5%ig) wird erst nach vollständigem Erkalten zu dem eventuell in wenig Äther gelösten Petrolätherrückstand gegeben; dann läßt man das Gemenge unter häufigem Umschütteln mindestens 36 Stunden stehen.

In dieser Zeit werden auch die Cholesterinester der Fettsäuren verseift, wie ja Kossel und Obermüller — allerdings ohne Belege dafür zu erbringen — schon angegeben haben.

Reiner, nach den Angaben von Hürthle (Diese Zeitschrift, Bd. XXI, S. 331) synthetisch hergestellter Palmitinsäurecholesterinester wird in der eben nötigen Menge Äther gelöst und diese Lösung mit 10 ccm einer 5%igen Natriumäthylat-lösung gegen 48 Stunden stehen gelassen. Nach dieser Zeit wird die Masse mit viel Äther versetzt, der Seifenniederschlag abgesaugt und wiederholt mit Äther gewaschen; der Äther wird abdestilliert; der hierbei bleibende Rückstand bei 105° getrocknet und wieder mit Äther ausgezogen. Das gleiche Verfahren wiederholt man noch einmal und bringt den Äther in eine tarierte Schale; der beim Verdunsten des Äthers bleibende Rückstand wird bei 105° getrocknet.

¹⁾ Ein zweites Verfahren siehe S. 59 ff.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XIV, S. 599; Bd. XV, S. 321.

³⁾ Das Verfahren ist ja nicht ganz einwandfrei, denn hatte sich etwas Na_2CO_3 gebildet — Vorkehrungen, um die Aufnahme von CO_2 zu verhindern, waren nicht getroffen worden —, so mußte die verbrauchte Natriummenge größer sein, als die eben nur zur Verseifung erforderliche Quantität.

1,050 g Ester geben in der beschriebenen Weise behandelt 0,585 g Cholesterin = 90% der Theorie, der Rückstand ist schneeweiß; eine Probe schmilzt scharf bei 144,5/145,5°.

Zweifel an der Brauchbarkeit der Methode schienen mir berechtigt, weil ich in 2 Fällen die Beobachtung gemacht hatte, daß aus einem Sirup, aus dem auf gewöhnlichem Wege Cholesterin nicht mehr zu erhalten war, nach wiederholtem Kochen mit Natriumäthylatlösung, Cholesterin erhalten wurde. Dabei hatten die Proben zum Verseifen das erstemal schon 48 Stunden mit einer zur vollständigen Verseifung mehr als hinreichenden Menge Natriumäthylat gestanden.

Hat das Verseifungsgemenge (des Petrolätherauszugs) 36—48 Stunden gestanden, so übergießt man die meist gelatinöse Masse mit Äther, bis ein weiterer Zusatz in der über dem Niederschlag stehenden Flüssigkeit nach wiederholtem Umschütteln die Bildung einer Trübung nicht mehr zur Folge hat, und trennt dann die festen Anteile durch Zentrifugieren von der Flüssigkeit. Diese alkoholhaltige Ätherlösung wäscht man im Scheidetrichter wiederholt mit Wasser, mit der gewaschenen Ätherlösung vereinigt man den Ätherauszug aus den festen Anteilen, den man am besten durch wiederholtes Aufkochen der festen Anteile mit Äther herstellt; auch dieser Ätherauszug muß mit Wasser gewaschen werden, damit alle wasserlöslichen Bestandteile aus der Ätherlösung entfernt werden.

Die ätherlöslichen Bestandteile des verseiften Petrolätherauszugs.

Die Ätherlösungen werden über geglühtem Na_2SO_4 getrocknet. Hat man zur Verseifung genügend lange stehen lassen und die Auszüge sorgfältig mit Wasser gewaschen, so sind diese Ätherlösungen vollkommen frei von stickstoffhaltigen Bestandteilen.

Man destilliert die Hauptmenge des Äthers ab und läßt den Rest an der Luft freiwillig verdunsten; dabei scheidet sich Cholesterin ab, das nach dem Umkrystallisieren aus Alkohol leicht an seinen Schmelzpunkt (144/45°) und den ja recht

charakteristischen Farbreaktionen zu erkennen war. Die Analyse ergab folgende Zahlen:

I. 0,1456 g (bei 105° getrocknet) geben 0,4453 g CO₂ und 0,1525 g H₂O
 II. 0,1172 » (» 105° » ») » 0,3605 » » » 0,1262 » »

	Gefunden:		Berechnet:	
	I.	II.	C ₂₇ H ₄₆ O	C ₂₇ H ₄₄ O
% C =	83,41	83,89	83,86	84,30
% H =	11,71	12,04	12,00	11,53

Die Resultate der Elementaranalyse sprechen für die von Diels und Abderhalden und neuerdings auch von Windaus angenommene H-reichere Formel C₂₇H₄₆O; auch die für den Palmitinsäureester (s. S. 37) erhaltenen Zahlen stimmen eher auf ein Derivat der Formel C₂₇H₄₆O, als auf ein solches der Formel C₂₇H₄₄O.¹⁾ Die Verbrennung geschah mit Bleichromat im Sauerstoffstrom; alle Verbrennungen mit CuO ergaben wesentlich niedrige C-Werte und sehr stark voneinander abweichende H-Werte.²⁾

Das beim Verdunsten des Äthers zurückbleibende Cholesterin ist stets durch beigemengte fremde Stoffe gelb gefärbt. Die Beimengungen lassen sich sehr leicht durch kalten Alkohol entfernen. Läßt man den Alkohol verdunsten, so hinterbleibt ein gelbbrauner gelatineartiger Rückstand mit eigentümlichem undefinierbarem, aromatischem Geruch. Die Quantität aus allen

¹⁾ Bei dieser Gelegenheit mag auch erwähnt werden, daß die Analysen der von Obermüller (Diese Zeitschrift, Bd. XV, S. 371) dargestellten Derivate des Cholesterins durchweg recht gut auf die H-reichere Formel stimmen. Es dürfte somit wohl endgültig die Formel C₂₇H₄₆O als die richtige anzusehen sein.

²⁾ Vielleicht ist mit Rücksicht auf die Angaben verschiedener Autoren (Diels-Abderhalden, Ber., Bd. XXXVI, S. 3178; Windaus, Ber., Bd. XXXVI, S. 3752), daß bei der Verbrennung von Cholesterin sehr leicht flüchtige, schwer verbrennliche Kohlenwasserstoffe entstehen, die Beobachtung von Interesse, daß bei gleicher Verbrennungsgeschwindigkeit, wie man sie mit dem Preglschen Ofen (Ber., Bd. XXXVIII, S. 1434) erreicht, stets die gleichen zu niedrigen C- und H-Werte erhalten werden. Dieselbe Substanz, wie sie zu den obigen Analysen verwendet wurde, gab bei der Verbrennung im Preglschen Ofen

für C: 82,19%, 82,11%, 82,38%, 82,89%
 » H: 11,62%, 11,64%, 11,50%, 11,47%.

Serumportionen von Tabelle II zusammen ist außerordentlich gering, trotzdem erschien eine nähere Untersuchung des P-Gehaltes wegen nicht unangebracht.

Man schüttelt die gelatinöse Masse mit Wasser auf und setzt dieser Aufschwemmung einen Überschuß von Barytwasser zu; dabei entsteht eine ganz schwache Fällung, die zur Hauptsache aus Baryumphosphat besteht — eine geringfügige Beimengung einer cholesterinartigen Substanz läßt sich leicht mittels Äther abtrennen. Das Filtrat des durch Barytwasser gebildeten Niederschlags schüttelt man mit Äther aus. Man befreit dann die wässrige Lösung durch CO_2 von überschüssigem Baryt, dampft das Filtrat vom BaCO_3 zur Trockene ein und kocht den Rückstand mit 96^o/_oigem Alkohol aus, wobei geringe Spuren einer organischen Substanz in Lösung gehen. Den in Alkohol unlöslichen Rückstand löst man in wenig Wasser; diese Lösung gibt auf Zusatz von viel Alkohol eine weiße krümelige Fällung, die sich als glycerinphosphorsaurer Baryt erweist. Die Menge reichte zu einer quantitativen Untersuchung nicht mehr aus, ich mußte mich mit einer qualitativen Feststellung begnügen. Ba und H_3PO_4 lassen sich nach dem Kochen mit HCl sehr leicht in bekannter Weise nachweisen; der Beweis für die Gegenwart von Glycerin wurde in einer trockenen Probe durch die Akroleinreaktion (mit wasserfreier Borsäure) erbracht.

Das alkoholisch wässrige Filtrat des glycerinphosphorsauren Baryts enthielt nur noch Spuren organischen (stickstofffreien) Materials.

Die Ätherlösung¹⁾ läßt man an der Luft verdunsten; der Rückstand fühlt sich fettig an; er ist halb fest und krystallisiert nicht; da der Verdacht nahe lag, es könnten hier doch noch unverseifte Cholesterinester oder Fette vorliegen, wurde der ganze Rückstand mit einem großen Überschuß alkoholischer Kalilauge 8 Stunden am Rückflußkühler gekocht.²⁾ Die alkalische Lösung versetzt man mit BaCl_2 : dabei entsteht eine geringfügige Fällung, die auf Zusatz von Äther bis auf einen

¹⁾ Siehe oben.

²⁾ Eine zweite kleinere Probe wurde mit demselben negativen Erfolg 16 Stunden mit alkoholischer Kalilauge unter Druck auf 100^o erhitzt.

kleinen, aus Baryumphosphat bestehenden Rest sich spielend wieder löst; die alkalische wässrige Lösung enthält neben BaCl_2 , KCl und KOH nur eine geringe Menge organischer Substanz, darunter aber weder fettsaure Salze noch Glycerin. Die Ätherlösung, die durch wiederholtes Ausschütteln der mit Chlorbaryum versetzten Verseifungsflüssigkeit erhalten wurde, wird über Na_2SO_4 getrocknet. Übergießt man den beim Verdunsten dieser Lösung bleibenden Rückstand mit wenig Alkohol, so bleibt ein cholesterinartiger Körper ungelöst (s. S. 50).

Die alkoholische Lösung hinterläßt beim Verdunsten einen zähen braungelben Rückstand, den man im Wasserdampfstrom am absteigenden Kühler solange kocht, bis keine riechenden Anteile mehr in das Destillat übergehen.

a) Man schüttelt das Destillat mit Äther aus, trocknet die Ätherlösung und läßt den Äther langsam verdunsten. Als Rückstand bleibt hierbei eine geringe Menge eines gelblichen Öls, in dem einzelne Krystalle sich finden; diese letzteren sind in Alkohol ziemlich schwer löslich und lassen sich darum von dem Öl, das sich in Alkohol spielend löst, leicht abtrennen. Sie sind gelblichweiß und absolut geruchlos; saure oder basische Eigenschaften fehlen vollständig: weder konzentrierte Salzsäure noch Soda wirken — letztere selbst in der Hitze nicht — in erkennbarer Weise auf die Krystalle ein. Sie schmelzen scharf bei $120/21^\circ$.

Das neben den Krystallen sich findende Öl krystallisiert auch bei starker Kälte nicht; an ihm haftet der eingangs (S. 47) erwähnte aromatische Geruch. Beide Substanzen wurden trotz der großen Mengen Serum nur in kaum wägbaren Quantitäten erhalten.

b) Der Rückstand im Destillierkolben wird mit Äther ausgeschüttelt; die wässrige Lösung ist frei von organischen Bestandteilen. Die Ätherlösung trocknet man über Na_2SO_4 und läßt den Äther dann verdunsten. Übergießt man den hierbei bleibenden Rückstand mit Alkohol, so bleibt wiederum eine geringe Menge einer cholesterinartigen Verbindung ungelöst (s. S. 50). Die alkoholische Lösung hinterläßt beim Verdunsten ein auch bei längerem Stehen nicht fest werdendes Öl, in welchem

u. a. Phosphor — jedenfalls in organischer Bindung und nicht als H_3PO_4 — enthalten ist, denn auch bei sehr langdauernder Einwirkung von verdünnter H_2SO_4 (14stündiges Kochen) wird nicht die geringste Spur H_3PO_4 abgespalten, was doch sicher der Fall sein müßte, wenn eine der Glycerinphosphorsäure analog gebaute Verbindung vorliegen würde. Verbrennt man eine kleine Probe des Öls auf dem Platinblech, so wird ein an verbrennendes Fett erinnernder Geruch bemerkbar.

Die im vorhergehenden erwähnten cholesterinartigen Stoffe wurden als solche mit Hilfe der Liebermann-Burchardschen Probe erkannt. Sie sind schwach gelblich gefärbt und verlieren diese Färbung auch bei wiederholtem Umkrystallisieren aus Alkohol nicht. Nach dem Trocknen schmelzen sie nicht ganz scharf bei 131° . Eine deutlich ausgeprägte Krystallform ist auch unter dem Mikroskop nicht zu erkennen. Dieser Umstand und der unscharfe Schmelzpunkt sprechen dafür, daß ein Gemenge, nicht eine einheitliche Substanz vorliegt. Ob Cholesterin oder Isocholesterin gemengt mit einer fremden Substanz — oder ob vielleicht ein Gemenge der beiden ersteren (Isocholesterin schmilzt bei 138°) vorliegt, konnte ich nicht entscheiden, da die mir zur Verfügung stehende Quantität gar zu gering war.

Ätherunlösliche Bestandteile des verseiften Petrolätherauszugs.

Die beim Zentrifugieren sich absetzenden festen Substanzen schüttelt man nach der Entfernung der ätherlöslichen Bestandteile wiederholt mit kaltem Wasser, wobei alle stickstoffhaltigen Stoffe in Lösung gehen;¹⁾ mit dieser Lösung ver-

¹⁾ Ungelöst bleiben saure fettsaure Natriumsalze und eine kleine Menge (0,5 g aus 100 l Serum) einer neutralen Substanz von F. P. $32,5^\circ$, die erst für ein Fett angesehen wurde, da sie in unreinem Zustande etwas Glycerin und Ölsäure beigemengt enthielt. Schmelzpunkt und Eigenschaften deuten jedoch auf Stearinsäureäthylester; nach dem Verseifen mit Natronlauge läßt sich aus dem Natriumsalz eine Säure isolieren, die direkt den F. P. 68° zeigte und nach dem Umkrystallisieren bei 69° schmolz; das Natriumsalz, bei 105° getrocknet, gab folgende Zahlen:

einigt man die beim Waschen der Ätherlösungen (siehe S. 46) erhaltenen Ausschüttelungen.

Die wässrige Lösung wird mit verdünnter Salzsäure angesäuert und dann wiederholt mit Äther ausgeschüttelt.

1. Ätherausschüttelung.

Beim Verdunsten der Ätherlösung bleibt ein brauner, wachsähnlicher Rückstand, der neben geringen Mengen stickstoffhaltiger Verbindungen zur Hauptsache höhere Fettsäuren enthält.

Aus diesem Rückstand verjagt man im Dampfstrom die flüchtigen sauren Bestandteile. Das Destillat enthält dem Geruch nach zu schließen flüchtige Fettsäuren; ich suchte einmal durch Ausschütteln des Destillates mit Äther, ein andermal durch Sättigen der wässrigen Lösung mit Chlorcalcium flüchtige Fettsäuren zu isolieren — in beiden Fällen jedoch mit negativem Ergebnis.

Der Inhalt des Destillierkolbens wird mit Äther ausgeschüttelt; die wässrige Flüssigkeit enthält dann keine organischen Bestandteile mehr; die Ätherlösung wird getrocknet und der Äther abdestilliert; übergießt man den Rückstand mit wenig Alkohol, so geht der größere Teil in Lösung, ein kleiner Teil bleibt ungelöst.

a) Der in kaltem Alkohol unlösliche Teil ist indifferent gegen warme Soda oder Natronlauge und gegen konzentrierte Salzsäure. Er ist N-haltig und löst sich sehr leicht in Äther, Benzol und Chloroform und ist außer im Alkohol unlöslich auch in Aceton; man löst in heißem Benzol, versetzt diese Lösung mit soviel Aceton, als ohne Bildung einer bleibenden Trübung möglich ist, und läßt langsam abkühlen; dabei fällt eine gelbbraune stickstoffhaltige Substanz aus; die Mutterlauge ist stickstofffrei, enthält aber — abgesehen vom Lösungsmittel — noch

0,1587 g geben 0,0362 g Na_2SO_4 .

Für $\text{C}_{18}\text{H}_{35}\text{O}_2\text{Na}$ berechnet: 7,52% Na; gefunden: 7,40% Na.

Die Bildung dieses Esters beim Verseifen von Fetten mit Natriumalkoholatlösung haben auch Kossel und Krüger (Diese Zeitschrift, Bd. XV, S. 321) schon beobachtet.

geringe Quantitäten organischen Materials, das nicht weiter untersucht werden konnte.

Der stickstoffhaltige Niederschlag enthält noch anorganische Bestandteile, die weder durch Auskochen mit Wasser noch durch wiederholtes Umfällen der Substanz — aus Äther durch Alkohol, aus Benzol durch Aceton — sich entfernen ließen. Man löst die wie eben angedeutet wiederholt umgefällte Substanz in Äther, läßt den Äther verdunsten, und erhält als Rückstand eine gelblichweiße gelatinöse Masse, die beim Trocknen glasartig spröde wird. Aus allen in Arbeit genommenen Serumportionen waren nur 0,13 g «reines» Material zu erhalten. Die Analyse gab folgende Zahlen:

0,0826 g (vakuumtrocken) geben 2,1 ccm N bei 20,5°, 742 mm (H₂O)
 0,0562 » (» ») » 0,1294 g CO₂; 0,0611 g H₂O; 0,0082 g Asche.
 Gefunden: 62,79% C
 12,16% H
 2,82% N
 14,59% Asche.

Die Asche ist carbonatfrei; eine weitere quantitative Bestimmung war unmöglich; die qualitative Prüfung der Asche ergab das Vorhandensein von Ca; Schwefel und Phosphor ließen sich auch in der ursprünglichen Substanz nicht nachweisen.

b) Die alkoholische Lösung neutralisiert man in der Kälte mit Na₂CO₃, entfernt die gebildete Kohlensäure durch wiederholtes Evakuieren und Durchleiten von Luft durch die Lösung und fällt die neutrale Lösung schließlich mit Bleiacetat; die beiden ersten Fraktionen¹⁾ sind krümelig, weiß und stickstofffrei, die drei übrigen Fraktionen sind stickstoffhaltig, von harziger Beschaffenheit und brauner Farbe.

Man schwemmt die drei stickstoffhaltigen Fraktionen zusammen in Alkohol auf, entfernt das Blei durch Schwefelwasserstoff, aus dem Filtrat vom PbS den überschüssigen Schwefelwasserstoff durch Luft und gibt zu der Lösung der Säuren Natriumäthylatlösung bis zur neutralen Reaktion; aus

¹⁾ Sie enthalten neben PbCO₃ die Pb-Salze von Palmitin- und Stearinsäure.

dieser Lösung erhält man auf Zusatz von alkoholischer CuCl_2 -Lösung die Cu-Salze der stickstoffhaltigen Bestandteile als grünen Niederschlag, während beim Verdunsten der Mutterlauge neben CuCl_2 ein stickstofffreies, öliges Kupfersalz zurückbleibt, das sich bei der näheren Prüfung als ölsaures Kupfer erweist.

Aus der Aufschwemmung der Kupfersalze in Alkohol entfernt man das Cu durch Schwefelwasserstoff, engt das Filtrat vom CuS auf ein kleines Volumen ein, filtriert von einer geringen Quantität einer stickstofffreien Ausscheidung ab und versetzt das Filtrat mit Bleiacetat im Überschuß. Niederschlag und Lösung schüttelt man mit Äther aus, trocknet die Ätherlösung und läßt den Äther dann verdunsten. Den Rückstand übergießt man mit Alkohol, wodurch die stickstoffhaltigen Bleisalze in Lösung gehen, während ein kleiner stickstofffreier Rest, der nicht weiter geprüft werden konnte, ungelöst bleibt.

Die Analyse des beim Verdunsten des Alkohols nach vollständigem Trocknen im Vakuum als spröde braune Masse zurückbleibenden Bleisalzes gab folgende Zahlen:

0,1376 g geben 0,2650 g CO_2 und 0,0800 g H_2O
 0,1597 » » 1,95 ccm N bei 18° und 736 mm
 0,2236 » » 0,0765 g PbSO_4 .

Gefunden: 52,52% C
 6,50% H
 1,35% N
 23,48% Pb.

Für eine Verbindung von der Zusammensetzung $\text{C}_{39}\text{H}_{57}\text{NO}_9\text{Pb}$ ist berechnet:

C = 52,50%
 H = 6,40%
 N = 1,59%
 Pb = 23,2%

Das Pb-Salz schmilzt schon bei 70° ; aus dem Bleisalz entfernt man das Pb durch H_2S , kocht das Filtrat vom PbS nach Zugabe von Wasser zur Entfernung von überschüssigem Schwefelwasserstoff und schüttelt das Filtrat schließlich mit Äther aus. Beim Verdunsten der über Na_2SO_4 getrockneten Lösung erhält man die freie Säure als einen braungelben, auch in der Kälte nicht festwerdenden Sirup.

Über den chemischen Charakter der dem Pb-Salze zugrunde liegenden Säure ließ sich nur wenig Näheres feststellen; daß es sich um eine ungesättigte Säure handelt, geht ja schon aus dem Resultat der Analyse hervor und dieses Resultat wird gestützt durch die Tatsache, daß die Lösung der Säure in Äther reichlich Brom addiert.

Daß in dieser Säure eine Verbindung besonderer Art, daß nicht etwa ein Gemenge der bekannten höheren Fettsäuren mit einer stickstoffhaltigen Beimengung vorliegt, ergibt sich aus folgenden Überlegungen.

Zunächst ist festzustellen, daß keine der Mutterlaugen der verschiedenen Fällungen stickstoffhaltige Bestandteile enthält, was doch sicher der Fall sein müßte, wenn der Stickstoff nur Bestandteil einer zufälligen Verunreinigung wäre; weiter ist die Gegenwart von Gliedern der Palmitinsäurereihe ausgeschlossen, da die freie Säure nicht fest wird und das Bleisalz in Äther spielend sich löst.

Ölsäure, die in dem ursprünglichen Gemenge sicher enthalten war, wurde bei der Überführung der Natriumsalze in die Cu-Salze abgetrennt.

2. Saure wässerige Flüssigkeit.

Die von ätherlöslichen Bestandteilen befreite saure Lösung wird mit Na_2CO_3 annähernd neutralisiert und bei schwach saurer Reaktion auf dem Wasserbad (bei ca. 50°) eingeengt, bis sich an der Oberfläche der Flüssigkeit eine Krystallhaut bildet. Fügt man der eingeengten Lösung Alkohol zu, so erreicht man eine beinahe quantitative Abscheidung des Kochsalzes. Dem Kochsalz ist stets eine ganz geringe Menge einer braunen, wasserunlöslichen Substanz mit sauren Eigenschaften beigemischt; sie löst sich in verdünnter Sodalösung bis auf einen kleinen Rest. Man säuert die braune, alkalische Lösung mit HNO_3 an, löst eine hierbei entstehende schwache Trübung in wenig NH_3 , kocht den Ammoniaküberschuß weg und fällt die neutrale Lösung mit Silbernitrat. Das graubraune Silber-salz wird nochmals in wenig Ammoniak gelöst und durch vorsichtigen Zusatz von verdünnter Salpetersäure wieder gefällt.

Aus der Mutterlauge des Silbersalzes erhält man nach Entfernung des Silbers durch Schwefelwasserstoff eine geringe Menge eines braunen Bleisalzes. Das Filtrat dieser Bleifällung ist frei von organischen Substanzen.

Aus allen Serumportionen zusammen wurden nur 0,447 g des Silbersalzes erhalten. Zur Analyse wird im Vakuum über H_2SO_4 getrocknet.

0,1368 g	geben	0,0533 g	CO_2	und	0,0208 g	H_2O
0,1257 »	»	0,0785 »	Ag			
0,1742 »	»	3,95 ccm	N bei $7,5^\circ$	und	7,35 mm.	
Gefunden: C = 10,62%						
H = 1,70%						
N = 2,64%						
Ag = 62,45%						

Ob in diesem Ag-Salz eine einheitliche Verbindung vorliegt, erscheint sehr fraglich; die Formel, die sich aus obigen Zahlen berechnen läßt, weist denn auch eine zu unwahrscheinliche Zusammensetzung ($\text{C}_{19}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_{30}\text{Ag}_{12}$) auf. Der Stickstoff gehört bestimmt dem organischen Komplex als solchem an und ist nicht etwa in Form eines salpetersauren Salzes in dem analysierten Gemenge vorhanden.

Die annähernd kochsalzfreie alkoholisch-wässrige Lösung wird mit H_2PtCl_6 versetzt; dabei entsteht eine feine krystallinische Fällung, deren Mutterlauge bei weiterem Einengen im Vakuum bei gewöhnlicher Temperatur¹⁾ eine zweite mit der ersten in allen ihren Eigenschaften übereinstimmende Krystallfraktion ergibt. Die beiden Fällungen krystallisiert man erst aus Wasser und dann aus verdünntem Alkohol um. Aus Wasser erhält man die Platindoppelverbindung in gelbroten 6seitigen Tafeln, die auf Cholinplatinchlorid schließen lassen. Diese Vermutung wird durch die Analyse bestätigt; die vakuumtrockene Doppelverbindung verliert bei 105° nichts von ihrem Gewicht; bei langsamem Erhitzen tritt bei 220° Verfärbung, bei $222\text{—}23^\circ$ Zersetzung ein; bei raschem Erhitzen schmilzt die Doppelverbindung bei $227\text{—}229^\circ$.²⁾

¹⁾ In der Wärme wird ein Teil der H_2PtCl_6 durch den Alkohol reduziert.

²⁾ Nach Gulewitsch (Diese Zeitschrift, Bd. XXIV, S. 513) ist der

I.	0,3359 g ¹⁾	geben	0,2355 g CO ₂ ;	0,1331 g H ₂ O;	0,0990 g Pt ²⁾
II.	0,3219 »	»	0,2264 » »;	0,1302 » »;	0,1020 » »
III.	0,1673 »	»			0,0529 » »
IV.	0,0451 »	»			0,0141 » »

	C	H	Pt
Gefunden: I.	19,12 ^{0/0}	4,43 ^{0/0}	29,48 ^{0/0} ²⁾
II.	19,18 ^{0/0}	4,63 ^{0/0}	31,68 ^{0/0}
III.	—	—	31,62 ^{0/0}
IV.	—	—	31,20 ^{0/0}
Für (C ₅ H ₁₄ NOCl) ₂ PtCl ₄ berechnet:	19,48 ^{0/0}	4,58 ^{0/0}	31,64 ^{0/0} ³⁾

Aus der Mutterlauge der 2. Fraktion war auch bei vorsichtigem Einengen etwas Krystallisiertes direkt nicht mehr zu erhalten. Man entfernt das Pt mittels H₂S, filtriert vom PtS₂ ab und engt die H₂S-freie Mutterlauge ein. Auf Zusatz von Sublimatlösung zu dieser Mutterlauge erhält man, wenn die Lösung genügend konzentriert ist, sofort eine krystallinische Fällung, die nach einmaligem Umkrystallisieren aus Alkohol vollkommen rein ist; die Mutterlauge dieser Sublimatfällung ist — wenn auch die letzten Reste der Doppelverbindung ausgefällt sind — vollständig frei von organischen Bestandteilen.

Die HgCl₂-Doppelverbindung wird aus Alkohol-Wasser in würfelförmigen Kryställchen erhalten; die Krystalle lösen sich in kaltem Wasser schwer, in heißem etwas leichter; in Alkohol sind sie leichter löslich als in Wasser; in Äther sind sie unlöslich. Sie schmelzen bei 243°.

Zur Analyse wird bei 105° getrocknet.

0,5389 g geben 0,4258 g HgS

Gefunden: 68,18^{0/0} Hg

Für C₅H₁₄NOCl · 6 HgCl₂⁴⁾ ist berechnet: 67,99^{0/0} »

Das Filtrat vom HgS gibt beim Verdunsten im Vakuum als Rückstand an der Luft zerfließliche Nadeln (oder Prismen);

Zersetzungspunkt der Cholinplatinchloriddoppelverbindung für diese nicht charakteristisch; die verschiedenen in der Literatur sich findenden Angaben sind 225°, 233—34°, 240—41°, 213—16°, 209—211°. Nach Beilstein, Bd. I, S. 1171, ist der Zersetzungspunkt 232—41°.

¹⁾ Das zu den Analysen verwendete Material stammt aus verschiedenen Verarbeitungen.

²⁾ Beim Verbrennen verspritzte ein Teil der Substanz.

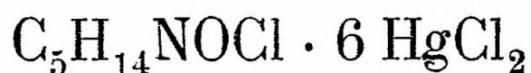
³⁾ Pt = 194,8.

⁴⁾ Gulewitsch, Diese Zeitschrift, Bd. XXIV, S. 513.

kocht man einige dieser Krystalle einige Zeit mit konzentrierter Natronlauge, so tritt der Geruch nach Trimethylamin auf. Diese Eigenschaften sowie das Verhalten der mit wenig HCl versetzten Lösung der Krystalle gegen Alkaloidreagentien¹⁾ lassen keinen Zweifel darüber, daß die oben beschriebene HgCl₂-Doppelverbindung die des Cholins ist.

In einer besonderen Portion war nach der Entfernung der ätherlöslichen Bestandteile die salzsaure Lösung mit Phosphorwolframsäurelösung versetzt worden, bis in einer Probe der über dem Niederschlag stehenden Flüssigkeit ein weiterer Zusatz keine Fällung mehr zur Folge hatte. Niederschlag und Filtrat werden in bekannter Weise vom Phosphorwolframsäureüberschuß befreit. In der aus dem Niederschlag erhaltenen Lösung sowohl wie in dem Filtrat²⁾ vom Phosphorwolframsäureniederschlag ließ sich je nur Cholin nachweisen.

Die Verarbeitung des Filtrats vom PWS³⁾-Niederschlag mag hier noch erwähnt sein, weil dabei 2 von der bis jetzt bekannten HgCl₂-Doppelverbindung des Cholins —



— verschiedene HgCl₂-Doppelverbindungen isoliert werden konnten.

Nach der Entfernung der PWS durch Baryt und der Ausfällung des Überschusses an letzterem durch H₂SO₄ wird die Hauptmenge der HCl durch frischgefälltes Bleihydroxyd entfernt; das überschüssige Blei entfernt man durch H₂S und fällt die bleifreie — ziemlich stark eingeengte — Lösung mit HgCl₂; dabei erhält man die schon oben beschriebene Doppelverbindung, die sich leicht auf Grund der Löslichkeitsverhältnisse, der Krystallform und des Schmelzpunktes identifizieren ließ.

Die Mutterlauge dieser ersten Verbindung gibt nach dem Einengen eine neue Krystallfraktion; die Löslichkeit dieser Verbindung in Wasser ist größer als die der ersten; die Löslichkeitsverhältnisse in Alkohol und Äther sind annähernd dieselben

¹⁾ Schulze, Diese Zeitschrift, Bd. XI, S. 369.

²⁾ Die Verbindung von Cholin mit PWS ist im Überschuß des Fällungsmittels sehr leicht löslich.

³⁾ Abkürzung für Phosphorwolframsäure.

wie bei der ersten Verbindung; die Krystalle sind lange feine Prismen;

0,2345 g (ohne Gewichtsabnahme bei 105°) geben 0,1248 g HgS
Gefunden: 45,86% Hg.

Das Filtrat vom HgS wird mit H_2PtCl_6 versetzt und diese Lösung im Vakuum über H_2SO_4 eingedunstet; den hierbei bleibenden Rückstand krystallisiert man erst aus verdünntem Alkohol und dann aus Wasser um; leider gelang es mir nicht, die Platindoppelverbindung quantitativ zu isolieren; es wäre dann wohl möglich gewesen, Schlüsse über die Zusammensetzung der HgCl_2 -Doppelverbindung zu ziehen; die aus der wässerigen Lösung erhaltenen Krystalle zeigen die Formen des Cholinplatinchlorids; die Analysenzahlen stimmen jedoch nur annähernd zu dieser Annahme:

0,1152 g (ohne Gewichtsabnahme bei 105°) geben 0,0802 g CO_2 ;
0,0553 g H_2O ; 0,0372 g Pt

	Gefunden:	Berechnet für $(\text{C}_5\text{H}_{14}\text{NOCl})_2\text{PtCl}_4$:
C =	18,99%	19,48%
H =	5,37%	4,58%
Pt =	32,29%	31,64%

Enthielt die analysierte Substanz eine kleine Verunreinigung (vielleicht H_2PtCl_6) und war der größte Teil wirklich Cholinplatinchlorid, so hätte die Quecksilberdoppelverbindung die Zusammensetzung $11 \text{HgCl}_2 \cdot 13 \text{C}_5\text{H}_{14}\text{NOCl}$; für eine Doppelverbindung dieser Art sind berechnet 45,9% Hg.

Aus der Mutterlauge dieser 2. Doppelverbindung konnte schließlich bei weiterem Einengen noch eine 3. Fraktion erhalten werden; der geringen Menge wegen konnte sie nicht direkt analysiert werden; sie bräunt sich bei vorsichtigem Erhitzen bei 264° und schmilzt ziemlich scharf bei 278° unter Zersetzung. In bekannter Weise stellt man aus der HgCl_2 -Verbindung die Platindoppelverbindung her und krystallisiert diese erst aus Alkohol und dann aus Wasser um; die aus Wasser erhaltenen, orangegelben Krystalle erinnern in ihrem Aussehen — dachziegelartig übereinander geschichtete 6seitige Täfelchen — an Cholinplatinchlorid; sie schmelzen ziemlich scharf bei 237°; die im Vakuum getrocknete Substanz gab folgenden Platinwert:

0,0470 g geben 0,0149 g Pt

Gefunden: 31,70⁰/₀. Berechnet für $(C_5H_{14}NOCl)_2PtCl_4$: 31,64⁰/₀.

Welche Zusammensetzung dieser 2. und 3. HgCl₂-Doppelverbindung zukommt, ist ungewiß; jedenfalls nicht die Zusammensetzung $C_5H_{14}NOCl \cdot 6 HgCl_2$; dies ergibt sich für die 2. Fraktion aus der Hg-Bestimmung; bei der 3. Fraktion spricht der hohe Schmelzpunkt (278⁰ statt 242/43⁰) gegen die Annahme, daß die schon längst bekannte HgCl₂-Doppelverbindung allein oder gemengt mit einer fremden Substanz vorliegt.

Die mittels des bisher beschriebenen Verfahrens im Serum nachgewiesenen Stoffe finden sich im ursprünglichen Serum wohl zweifellos als Bestandteile größerer Moleküle. Um womöglich die Natur dieser komplizierteren Stoffe, deren Kenntnis von wesentlich größerer Bedeutung ist, zu ergründen, schlug ich einen anderen Weg zur Verarbeitung des Auszugs ein: ich suchte durch neutrale Lösungsmittel eine Trennung der verschiedenen Bestandteile zu erreichen. Zu diesem Zweck ersetzte ich die Extraktion mit Petroläther durch eine solche mit Äther.

Vergleichende Versuche zeigten, daß die Extraktion mit Äther leichter vor sich geht und vollständiger ist, als diejenige mit Petroläther. Dabei ändert sich das Verhältnis von P : N im Ätherauszug nur unwesentlich im Vergleich zu dem Verhältnis derselben Elemente im Petrolätherauszug und zwar in der Weise, daß die absolute Menge des P und des N im Ätherauszug je etwas größer ist als im Petrolätherauszug, daß aber die Zunahme des Stickstoffs etwas zurückbleibt hinter der Zunahme des Phosphors.

Die nachstehende Tabelle III gibt die beim Vergleich der beiden Auszüge erhaltenen Zahlen.

Diese Zahlen gestatten zugleich auch die Menge des in ätherlöslicher Form im Serum enthaltenen Stickstoffs zu berechnen. Legt man der Berechnung ein spezifisches Gewicht des Serums von 1,030¹⁾ zugrunde, so erhält man für die Portion

¹⁾ Für das Serum des Menschenblutes wird als Mittelzahl 1,028 angenommen; Pferdeblutserum enthält nach den Analysen von Abderhalden (Diese Zeitschrift, Bd. XXIII und XXV) etwas mehr feste Bestandteile gelöst, somit muß auch die Dichte etwas größer sein.

vom 2. III. 06. einen Gehalt von 0,0069 ‰, vom 16. I. 06. einen Gehalt von 0,0072 ‰ ätherlöslichen «Stickstoff».

Tabelle III.

		Liter Serum	ccm Aus- zug	ccm für Analyse	Ge- funden mg $Mg_2P_2O_7$	Ge- samt-P mg	Ge- funden ccm $n/10-NH_3$	Ge- samt-N mg	P : N
2./3. 06	Äther- auszug	4,0	250	30	47,8	111,1	—	—	1 : 5,6
				15	—	—	12,31	283	
	Petrol- äther- auszug	4,0	275	30	36,2	92,4	—	—	1 : 6,2
				15	—	—	10,15	260	
16./1. 06	Äther- auszug	3,5	325	60	72,9	110	—	—	1 : 5,2
				30	—	—	16,90	257	
	Petrol- äther- auszug	3,5	375	60	58,6	102	—	—	1 : 5,5
				30	—	—	14,38	252	

Die Extraktion mit Äther hat außerdem noch den weiteren Vorzug, daß man, falls wie in meinem Fall die Isolierung der phosphor- und stickstoffhaltigen Substanz beabsichtigt ist, diese Auszüge sofort weiter verarbeiten kann. Ich verfuhr dabei, in Anlehnung an die von Zuelzer¹⁾ zur Isolierung des Lecithins und die von Drechsel²⁾ zur Isolierung des Jecorins gegebenen Vorschriften, folgendermaßen: Die etwas eingeeengte Ätherlösung wird mit Aceton vollständig ausgefällt; den Niederschlag löst man wieder in Äther und fällt die Lösung abermals mit Aceton. Dieses Lösen und Wiederfällen wurde 5mal wiederholt. Die verschiedenen Mutterlaugen werden vereinigt zur Ätheracetonlösung (siehe S. 65).

Der beim 6. Fällen durch Aceton erhaltene Niederschlag war gelbbraun, von wachsartiger Konsistenz und wurde auch bei längerem Stehen im Eis nicht fest. Man löst ihn wieder in Äther — der Niederschlag geht spielend in Lösung — und versetzt diese Lösung in der Kälte mit soviel absolutem Al-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXVII, S. 255.

²⁾ J. f. pr. Ch., Bd. XXXIII, S. 425.

kohol, bis ein weiterer Zusatz keine Fällung mehr zur Folge hat. Niederschlag und Lösung trennt man mit Hilfe der Zentrifuge. Der Zusatz von absolutem Alkohol zu der Ätherlösung hat eine offenbar tiefer gehende Veränderung der vorher in Äther leicht löslichen Substanz zur Folge,¹⁾ von dem hierbei erhaltenen Niederschlag löst sich auch feucht in Äther nichts mehr.

Die Äther-Alkoholmutterlauge wird für sich aufgearbeitet (siehe S. 67) und der in Äther unlösliche Niederschlag in wenig Wasser gelöst; zu dieser Lösung fügt man so lange Alkohol (absolut), als auf weiteren Zusatz noch eine Fällung entsteht. Die Mutterlauge des flockigen gelbbraunen Niederschlags ist gelb gefärbt, organische Bestandteile enthält sie nur noch in so geringer Menge, daß eine Weiterverarbeitung aussichtslos erscheint. Den Niederschlag löst man wieder in wenig Wasser. Fügt man Alkohol zu dieser Lösung, so erhält man eine wesentlich geringere Niederschlagsmenge und eine auch bei längerem Stehen (3 Tage) sich nicht klärende trübe Lösung (1).

Der Niederschlag sollte nochmals umgefällt werden. Auf Zusatz von Alkohol — wenig oder viel — zu der Lösung des Niederschlags in ganz wenig Wasser erhält man jedoch keine Fällung mehr, nur noch eine trübe Lösung (2). Aus beiden Lösungen erhält man jedoch sofort einen reichlichen flockigen Niederschlag auf Zusatz von Äther; die farblosen Mutterlaugen der beiden Niederschläge enthalten, abgesehen vom Lösungsmittel, nur kaum noch Spuren organischen Materials.

Beide Fällungen werden nochmals umgefällt, dann auf gehärteten Filtern abfiltriert und getrocknet. Niederschlag 1 ist grau, Niederschlag 2 ausgesprochen gelbbraun. Beide Fäl-

¹⁾ Henriques (Diese Zeitschrift, Bd. XXIII, S. 244) hat beobachtet, daß eine wasserhaltige alkoholische Lösung von Jecorin ohne Gefahr für das Jecorin auf dem kochenden Wasserbad abgedampft werden kann, daß aber absoluter Alkohol schon bei 45° Zucker aus dem Jecorin abzuspalten scheint. Sollte nicht vielleicht in unserem Falle das Unlöslichwerden der Fällung in Äther eben in der Abspaltung von Zucker oder — vorsichtiger ausgedrückt — einer reduzierenden Substanz ihren Grund haben? Die Vermutung gewinnt an Wahrscheinlichkeit durch die Tatsache, daß es gelang, aus dem Filtrat dieser Fällung eine N-haltige Substanz mit sehr starkem Reduktionsvermögen zu isolieren (siehe S. 67).

lungen stellen nach dem Trocknen (im Vakuum über H_2SO_4) feine leichte Pulver dar, die an der Luft allmählich zerfließen; beide lösen sich in Wasser spielend leicht, in wässrigem Alkohol ebenfalls, sind aber, auch in feuchtem Zustande, in Äther vollkommen unlöslich; die wässrigen Lösungen reagieren neutral; eine nähere chemische Charakterisierung war in beiden Fällen — die erhaltenen Quantitäten reichten eben nur zur Analyse noch aus — nicht möglich; nur ihr Verhalten gegen Fehlingsche Lösung wurde geprüft.

Niederschlag 1 reduziert in der Wärme ziemlich stark; die 2. Fällung jedoch ganz unbedeutend. Kocht man aber die Lösung der Fällung 2 nur ganz kurze Zeit (1 Minute nur) mit 2—3 Tropfen verdünnter Säure, so ist das Reduktionsvermögen sehr viel stärker; das gleiche gilt auch für die Fällung 1, nur ist in diesem Falle die Verschiedenheit in der Stärke des Reduktionsvermögens weniger deutlich; beim Erhitzen im Kapillarröhrchen bräunen sich die beiden Substanzen bei etwa 270° , um sich bei 280° zu zersetzen. Die Analyse der bei 105° ¹⁾ getrockneten Substanz ergab folgende Zahlen:

Fällung I, grau.

0,1073 g geben 0,1616 g CO_2 und 0,0579 g H_2O ²⁾
 0,1477 » » 10,9 ccm N bei $16,5^\circ$ und 748,5 mm (H_2O)
 0,1895 » » 0,0025 g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$ und 0,0131 g BaSO_4 .

Gefunden: C = 41,07%
 H = 6,03%
 N = 8,41%
 S = 1,10%
 P = 0,37%

Die Asche enthielt minimale Mengen Cu ³⁾ und etwas Na.

¹⁾ Ohne eine Veränderung befürchten zu müssen, kann man die Fällungen, wenn sie nur erst einige Zeit über H_2SO_4 gestanden haben, bis 105° erwärmen. Über H_2SO_4 bis zur Gewichtskonstanz getrocknete Präparate verloren bei dieser Temperatur nichts von ihrem Gewicht.

²⁾ Die Substanzen wurden wegen des Natriumgehaltes im Schiffchen mit $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ gemischt verbrannt.

³⁾ Aus dem Vakuumkessel stammend, in welchem das Eindampfen der alkoholisch-wässrigen, aus dem Serum stammenden Flüssigkeit vorgenommen wurde.

Fällung II.

0,1131 g geben 0,1847 g CO₂ und 0,0528 g H₂O
 0,1741 » » 13,4 ccm N bei 16° und 737,5 mm (H₂O)
 0,3633 » » 0,0072 g Mg₂P₂O₇ und 0,0290 g BaSO₄.

Gefunden: C = 44,61%

H = 5,22%

N = 8,66%

S = 0,95%

P = 0,56%

Auch in dieser Fällung fand sich eine Spur Cu und etwas Na.

Die quantitative Zusammensetzung dieser Fällungen ist — abgesehen vom Cu-Gehalt, der ja wie schon erwähnt zufällig und eben nur nachweisbar ist — die gleiche wie die von Drechsels Jecorin;¹⁾ die quantitative Zusammensetzung allerdings weicht sehr wesentlich ab, sowohl von dem Jecorin Drechsels, als auch von der nach dem gleichen Verfahren von Siegfried und Mark²⁾ isolierten Substanz.³⁾

Zum Vergleich seien die von Drechsel und die von Siegfried und Mark erhaltenen Zahlen hier angeführt:

	Drechsel	Siegfried und Mark
C =	51,5%	39,7%
H =	8,2%	6,4%
N =	2,9%	5,2%
S =	1,4%	2,2%
P =	3,4%	1,9%

Hatten schon Drechsel und Siegfried aus demselben Organ (Pferdeleber) unter Anwendung des gleichen Verfahrens Substanzen von so wesentlich verschiedener prozentischer Zusammensetzung erhalten, so war für die aus dem Blut zu isolierenden Substanzen von vornherein schon eine andere Zusammensetzung zu erwarten, zumal der Weg zur Isolierung der betreffenden Substanzen nicht unwesentlich von dem abwich, den diese beiden Autoren eingeschlagen hatten. Dies

¹⁾ J. f. pr. Ch., Bd. XXXIII, S. 425.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLVI, S. 492.

³⁾ Auch die Zahlen, die Baldi bei verschiedenen Analysen von Jecorin aus Hundeleber erhielt und die unter sich recht befriedigend übereinstimmen, weichen sowohl von den Zahlen Drechsels als auch von denen Siegfrieds ziemlich weit ab.

mag auch der Grund sein, weshalb die von mir isolierten Substanzen eine wesentliche andere quantitative Zusammensetzung aufweisen als die jecorinartigen Substanzen, die Baldi¹⁾ nach Drechsels Verfahren aus Blut isolierte. Er fand für P und S folgende Werte:

$$P = 1,88; 1,87\%$$

$$S = 1,86; 1,66\%$$

also wesentlich höhere Zahlen, als meine Substanzen sie gaben.

Ob die von mir isolierten Substanzen einheitlich sind oder nicht, konnte ich nicht entscheiden; ich habe versucht, nur durch Anwendung von «indifferenten»²⁾ Lösungsmitteln eine Zergliederung des Gemenges, das anfänglich sicher vorlag, zu erreichen, und habe diese Versuche solange wiederholt, als das beschränkte Quantum der mir zu Gebote stehenden Substanz es erlaubte. Es ist wohl denkbar, daß bei weiterem Fraktionieren tatsächlich reine, einheitliche Verbindungen erhalten worden wären, denn ich glaube, daß wir es im «Jecorin», wenn ich diese Bezeichnung für eine ganze Gruppe hochmolekularer N-, S- und P-haltiger Substanzen der Kürze halber benützen darf, nicht etwa mit einem Gemenge verschiedener Substanzen zu tun haben, die sich gegenseitig in Lösung halten, sondern daß bestimmte Komplexe — chemische Individuen — vorliegen, aus denen allerdings, zum Teil jedenfalls schon im tierischen Organismus, je nach Umständen bald die eine, bald die andere Gruppe, und zwar sehr leicht, abgespalten werden kann.

Eine dieser Gruppen ist zweifellos eine Zuckergruppe, und zwar dürfte nach den Angaben von Manasse,³⁾ der ein Osazon vom F. P. 203/4⁰ isolierte, und von Mayer⁴⁾ dieser Zucker Glukose sein; während die meisten Autoren, die sich mit dem Jecorin beschäftigt haben, annehmen, daß dieser Zucker ein wesentlicher Bestandteil des Jecorins sei, hält ihn Meinertz⁵⁾

¹⁾ Arch. f. Anat. u. Physiol., 1887, Suppl., S. 100.

²⁾ Daß jedenfalls eines der Lösungsmittel — Alkohol — eben doch nicht als indifferent anzusehen ist, zeigt die S. 61 angeführte Beobachtung.

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XX, S. 478.

⁴⁾ Bioch. Zeitschrift, Bd. I, S. 81.

⁵⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLVI, S. 376.

für eine zufällige Beimengung, da es ihm gelang, durch Dialyse ein Jecorin zu erhalten, das nicht mehr reduzierte. Meinertz hat sein Jecorin, bevor er es der Dialyse unterwarf, wiederholt mit schwach angesäuertem (HCl) Wasser zerrieben; alle Filtrate zeigten Reduktionsvermögen; der Filtrerrückstand reduziert nach dem Dialysieren nicht mehr.

Dieses Zerreiben mit schwach angesäuertem Wasser hat vielleicht den Anlaß zur Abspaltung der Zuckergruppe gegeben. Wenigstens konnte ich bei den beiden von mir isolierten Substanzen, die direkt schon Fehlingsche Lösung in der Wärme reduzierten, die Beobachtung machen, daß nur ganz kurzes Erwärmen mit 1—2 Tropfen verdünnter Säure das Reduktionsvermögen außerordentlich steigerte. Diese Beobachtung ist meines Erachtens nur so zu deuten, daß die Säure die hydrolytische Spaltung, die vorher schon bis zu einem gewissen Grade unter der Einwirkung des Wassers allein vor sich gegangen war, vervollständigte oder zum mindesten vergrößerte.

Die Äther-Acetonmutterlauge

ist frei von N-haltigen Substanzen; den Hauptbestandteil der gelösten Stoffe bilden Cholesterinester und freies Cholesterin, sofern das letztere im Serum sich überhaupt finden sollte. Die Untersuchungen von Hoppe-Seyler¹⁾ lassen, wie Hürthle²⁾ schon hervorgehoben hat, eine Entscheidung darüber, ob das im Blut sich findende Cholesterin als solches — frei — oder als Ester vorhanden ist, nicht zu. Hürthle hat nachgewiesen, daß zum mindesten der größere Teil, wenn nicht alles, in Form von Fettsäureestern im Blut sich findet; die Frage, ob freies Cholesterin vorhanden ist, hat er noch offen gelassen.

Bei seiner Untersuchung über den Cholesteringehalt der Blutkörperchen hat E. Hepner³⁾ auch das Plasma in den Kreis seiner Untersuchungen gezogen und kommt bezüglich des Gehaltes des Plasmas an freiem Cholesterin zu dem Schluß: «In dem Blutplasma ist also unter gewissen, noch näher festzu-

¹⁾ Med.-chem. Untersuchungen, Heft 1, Berlin 1866.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXI, S. 331.

³⁾ Pflügers Archiv, Bd. LXXIII, S. 595.

stellenden Bedingungen neben den Estern des Cholesterins auch freies Cholesterin vorhanden». Ob Hepner Cholesterin aus Plasma isoliert und durch Schmelzpunkt oder andere Eigenschaften charakterisiert hat, ist aus seiner Arbeit nicht zu ersehen. Er gibt darüber nur folgendes an: «Die (ätherischen) Mutterlaugen desselben (nämlich des Ölsäureesters) enthielten in einigen Versuchen auch freies Cholesterin.» .

Unter diesen Umständen schien es mir wohl angebracht, eine definitive Entscheidung dieser Frage zu versuchen. Die Äther-Acetonmutterlauge wird im Vakuum möglichst weit eingengt und der Rückstand zunächst durch Schütteln mit Wasser von eventuell vorhandenen wasserlöslichen Substanzen¹⁾ befreit. Sollten dabei die in Wasser unlöslichen Bestandteile sich nur schwer und langsam abscheiden, so kann man die Abscheidung durch Kochsalzzusatz erleichtern und beschleunigen. Man trennt die wässrige Flüssigkeit im Scheidetrichter ab; sie reagiert schwach sauer; Seifen, die Cholesterin in Lösung halten könnten, sind somit keine vorhanden. Man wäscht die wasserunlöslichen Bestandteile wiederholt mit Wasser (oder eventuell Kochsalzlösung) und nimmt sie dann in Äther auf; man trocknet diese Lösung über Na_2SO_4 und läßt dann das Lösungsmittel teilweise verdunsten. Durch vorsichtigen Zusatz von Alkohol zu der stark eingengten Lösung erreicht man die Abscheidung cholesterinartiger, fester Stoffe, aus deren Mutterlauge etwas Greifbares nicht mehr zu erhalten ist.

Die festen Abscheidungen trocknet man auf Ton über H_2SO_4 . Behandelt man die vollkommen wasserfreie, gelb gefärbte Masse mit wenig warmem Alkohol, so erreicht man die Abtrennung einer ohne weiteres Umkrystallisieren bei 76° schmelzenden Verbindung, die, nach ihren Eigenschaften zu schließen, den von Hürthle²⁾ beschriebenen Palmitinsäurecholesterinester darstellt. Die alkoholische Lösung läßt bei teilweisem Verdunsten etwa 0,2 g einer bei 138° schmelzenden

¹⁾ In dem Rückstand finden sich offenbar flüchtige Fettsäuren, deren Herkunft jedoch ungewiß ist; es ist wohl möglich, daß sie wenigstens zum Teil aus dem Aceton stammen.

²⁾ Hürthle, Diese Zeitschrift, Bd. XXI, S. 331.

Verbindung ausfallen; durch zweimaliges Umkrystallisieren aus Alkohol steigt der Schmelzpunkt auf $144/45^{\circ}$. Es liegt somit — Löslichkeitsverhältnisse und Farbreaktionen bestätigen diesen Schluß — in dieser Fraktion freies Cholesterin vor. Aus der Mutterlauge dieser Fraktion lassen sich noch weitere geringe Quantitäten freien Cholesterins isolieren. Die Menge des freien Cholesterins, die auf diese Weise aus 15 l Serum erhalten wurde, beträgt nur 0,30 g (Minimum) oder ca. 0,002 %.

Abderhalden¹⁾ fand Gesamtcholesterin im Pferdeblut: 0,3—0,5 auf 1000 Teile Serum. Legt man das Mittel dieser beiden Werte dem Vergleich zugrunde, so finden sich somit rund 5 % des Gesamtcholesterins als solches im Serum.

Der beim Abdestillieren²⁾ der Lösungsmittel aus der
Alkohol-Äthermutterlauge

bleibende Rückstand wird nicht fest. Er besteht zum größten Teil aus einer wachsartigen gelbbraunen Masse, in der sich einzelne feine Krystalle finden. Man behandelt den Rückstand in der Kälte mit Äther; dabei bleiben die Krystalle ungelöst; sie erweisen sich bei näherer Prüfung als essigsäures Natrium (FeCl_3 - und Essigesterreaktion) und als das Natriumsalz einer höheren Fettsäure, deren Natur jedoch der ganz geringen mir zu Gebote stehenden Menge wegen nicht festgestellt werden konnte. Die Ätherlösung versetzt man mit Alkohol, bis ein weiterer Zusatz keine Fällung mehr zur Folge hat; die Fällung löst sich auch feucht in Äther direkt nicht mehr; gibt man aber zu dem Äther nur eine Spur verdünnter Säure (HCl oder H_2SO_4), so geht die ganze Fällung leicht in Lösung. Man setzt zu dieser Lösung wieder Alkohol und wiederholt die ganze Operation schließlich noch ein drittes Mal.

Man erhält auf diese Weise eine graubraune Masse, die ziemlich N-reich ist. S und P ließen sich nicht nachweisen. Dagegen finden sich auch hier wieder geringe Mengen Cu. Eine einheitliche Substanz liegt hier zweifellos nicht vor — wenn auch weitere Trennungsversuche ergebnislos waren —, denn

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXIII, S. 521; Bd. XXV, S. 71.

²⁾ Geschieht im Vakuum.

die aus der untenstehenden Analyse berechneten Atomzahlen ergeben eine zu unwahrscheinliche Formel; die Substanz reduziert Fehlingsche Lösung beim Kochen außerordentlich stark; ob die reduzierende Substanz vielleicht eine glukosaminartige Substanz darstellt, ob nicht am Ende gar Glukosamin¹⁾ selbst vorliegt, habe ich mangels genügenden Materials nicht feststellen können; ob der Tatsache, daß das Verhältnis von N : C gerade 1 : 7 ist, irgend welche Bedeutung beizumessen ist, muß darum auch dahingestellt bleiben.

Die Analyse ergab folgende Zahlen:

0,1150 g geben 0,1766 g CO₂; 0,0564 g H₂O; 0,0037 g CuO

0,1265 » » 8,1 ccm N bei 18° und 732 mm (H₂O)

Gefunden: C = 41,88%

H = 5,48%

N = 7,08%

Cu = 2,27%

Die Mutterlaugen der 1. und der 2. und 3. Fällung (siehe vorhergehende Seite) versetzt man mit viel Wasser und schüttelt diese Lösungen mit Äther aus. Der wässrige Teil von 2—3 ist nach Entfernung ätherlöslicher Substanzen frei von organischem Material; der entsprechende Teil von 1 enthält noch geringe Mengen organischer Stoffe, doch hat sich etwas Positives nicht ermitteln lassen. Die Ätherlösung von 2—3 hinterläßt beim Verdunsten einen ganz minimalen, wachsartigen Rückstand, offenbar Teile des im Ätherauszug 1 in verhältnismäßig großer Menge sich findenden Stoffs. Der Rückstand der Ätherlösung 1 gibt beim Verdunsten einen wachsartigen gelben Rückstand; direkt — durch Lösungsmittel oder freiwilliges Kristallisieren — ist aus dieser Masse etwas Greifbares nicht zu erhalten; dagegen geben HgCl₂ und H₂PtCl₆ verhältnismäßig sehr reichliche Niederschläge in der mit wenig HCl versetzten alkoholischen Lösung des Rückstandes. Man setzt dieser Lösung soviel H₂PtCl₆-Lösung zu, bis ein weiterer Zusatz keine Fällung mehr zur Folge hat. Hat sich der Niederschlag vollkommen abgesetzt, so gießt man die Mutterlauge ab, dekantiert den Niederschlag einige Male mit verdünntem Alkohol und löst ihn

¹⁾ Mit einer kleinen fremden Beimengung.

schließlich, da er auch in der Kälte (-10°) nicht fest wird in Äther. Auf Zusatz von Alkohol zu der trockenen Ätherlösung erhält man einen krümeligen Niederschlag, den man nach wiederholtem Lösen und Wiederfällen abfiltriert und im Vakuum über H_2SO_4 trocknet. Man erhält auf diese Weise die Platindoppelverbindung als ein leichtes gelblichweißes Pulver; beim Trocknen bei 95° verändert es sich nicht; auch tritt ein Gewichtsverlust nicht ein. In der Kapillare beginnt die Doppelverbindung bei 125° zu erweichen und schmilzt bei 144° ; bei weiterem Erhitzen tritt Zersetzung ein.

Die Cl und Platinbestimmung¹⁾ gab folgende Zahlen:

0,3232 g geben 0,0322 g Pt und 0,1400 g AgCl.

Gefunden: 9,96% Pt

10,71% Cl

Diese Zahlen lassen auf die Pt-Doppelverbindung eines Lecithins schließen; für diese Annahme spricht auch das Aussehen und das Verhalten der ursprünglichen aus der Ätherlösung erhaltenen Masse und die Löslichkeit der Doppelverbindung in Äther. Allerdings gelang es mir nicht, durch eine Bestimmung von C und H diese Annahme sicher zu stellen. Ich erhielt selbst beim Verbrennen im Bleichchromatrohr wiederholt wesentlich zu niedrige Werte.²⁾ Zur Bestimmung von N und P, wozu der niedrigen Prozentzahlen wegen größere Substanzmengen nötig gewesen wären, reichte das mir zur Verfügung stehende Material nicht aus. Ob ein einheitliches Ölsäurelecithin oder ein gemischtes, neben Ölsäure noch Palmitinsäure oder Stearinsäure enthaltendes Lecithin vorliegt, oder ein Gemenge zweier nur je 1 Säure enthaltender Lecithine, wird sich übrigens auch auf Grund einer vollständigen Analyse wohl kaum mit Sicherheit entscheiden lassen. Qualitativ, durch die Fähigkeit Brom zu addieren, ließ sich in der Doppelverbindung Ölsäure nachweisen.

Aus der Mutterlauge der Lecithinplatinchloriddoppelverbindung läßt sich beim Einengen eine geringe Menge (etwa

¹⁾ Nach der Methode von Wallach mittels Natriumäthylats.

²⁾ Gefunden: C = 49,94; 49,48%

H = 7,69; 7,72%

Siehe auch Dennstedt, Diese Zeitschrift, Bd. LII, S. 181.

5 mg) einer in 6seitigen Täfelchen krystallisierenden Platinverbindung isolieren. Aussehen, Löslichkeitsverhältnisse und Schmelzpunkt (221°) deuten auf Cholinplatinchlorid. Dieses Cholin stammt zweifellos aus Lecithin, das beim Einengen der aus dem Serum erhaltenen Flüssigkeit im Vakuum in die Brüche ging.

B. Alkoholauszug.

Die Serumtrockenrückstände, die mit Petroläther ausgezogen waren, wurden daran anschließend noch mit Äther ausgezogen, weil es sich gezeigt hatte, daß in manchen Fällen der Petroläther die letzten Reste fettiger Bestandteile nicht mehr aufnimmt. Die Quantität der beim Verdunsten dieser Auszüge bleibenden Rückstände ist außerordentlich gering; die Aufarbeitung geschah zusammen mit den Rückständen aus den Petrolätherauszügen.

Die Alkoholauszüge stellt man am raschesten und sichersten in der Weise her, daß man die feingepulverten in Äther unlöslichen Teile der Serumtrockenrückstände direkt mit dem Lösungsmittel übergießt und unter öfterem Erneuern des Alkohols (99—99,5%) auskocht. Man erhält auf diese Weise eine dunkelbraune Lösung, die beim Abkühlen geringe Mengen fester Substanzen — in der Hauptsache essigsäures Natrium — ausfallen läßt.

Man läßt, ohne auf diese festen Anteile Rücksicht zu nehmen, den Alkohol bei niederer Temperatur ($35\text{—}40^{\circ}$) auf dem Wasserbade verdunsten. Den Rückstand löst man in wenig Wasser, säuert diese Lösung mit verdünnter H_2SO_4 an und bringt sie schließlich auf einen Gehalt von rund 5% freier Säure. Die saure Lösung schüttelt man mit Äther aus, bis dieser nichts mehr aufnimmt.

I. Ätherausschüttelung aus der Serumlösung.

Die Hauptmenge des Äthers destilliert man ab, die letzten Reste läßt man an der Luft verdunsten. Als Rückstand erhält man eine braune wachsartige Masse, aus der man durch Wasserdämpfe flüchtige Anteile abtreibt. Die flüchtigen Bestandteile

sind, dem Geruche nach zu schließen, flüchtige Fettsäuren. Versuche, aus dem Destillat durch Ausschütteln mit Äther oder durch Sättigen mit CaCl_2 diese Säuren zu isolieren, verliefen resultatlos.

Zum Rückstand im Destillierkolben setzt man so viel NaOH , bis das auf der wässerigen Flüssigkeit schwimmende Öl vollständig gelöst ist; diese Lösung fällt man mit essigsaurem Blei; Niederschlag und Lösung trennt man mit Hilfe der Zentrifuge.

1. Bleiacetatniederschlag.

Der Niederschlag wird durch Wasser von allen löslichen Bestandteilen befreit, auf Ton getrocknet und dann mit Äther extrahiert; wird die Extraktion mit Äther genügend lange fortgesetzt, so ist der ätherunlösliche Rückstand vollkommen frei von N-haltigen Bestandteilen und enthält neben etwas PbCO_3 nur noch die Bleisalze von Palmitinsäure und Stearinsäure.

Die Ätherlösung wird direkt durch H_2S entbleit; den H_2S -Überschuß entfernt man aus dem Filtrat vom PbS durch einen Stickstoffstrom, destilliert den Äther ab und löst den hierbei bleibenden Rückstand in Na_2CO_3 . Das Gemenge von Seifen und Na_2CO_3 bringt man auf dem Wasserbad zur Trockne, erhitzt den trockenen Rückstand einige Zeit auf 105° und zieht ihn dann mit absolutem Alkohol aus. Der alkoholunlösliche Teil ist frei von N-haltigen Bestandteilen, enthält aber neben Na_2CO_3 noch Natriumsalze höherer Fettsäuren. Die alkoholische Lösung bringt man wieder zur Trockene; nach dem Trocknen bei 105° ist der Rückstand spröde, zeigt braune Farbe und besitzt einen eigentümlichen erdbeerartigen Geruch. Dieser Rückstand wird nochmals mit absolutem Alkohol ausgekocht; dabei bleibt ein carbonatfreier, wasserlöslicher Rückstand von bräunlich gelber Farbe. Mit AgNO_3 erhält man aus der wässerigen Lösung ein in feuchtem Zustande blutrotes, trocken dunkelbraunes Silbersalz in allerdings nur ganz geringer Menge (0,05 g).

0,0467 g geben 0,0215 g Ag

Gefunden: 46,04% Ag.

Die absolut alkoholische Lösung wird wieder verdunstet, der hierbei bleibende Rückstand bei 105° getrocknet und dann

mit wenig absolutem Alkohol — so daß der Niederschlag eben bedeckt ist — gelinde erwärmt. (Lösung 1.)

Den in wenig Alkohol unlöslichen Rückstand erwärmt man wiederholt mit größeren Mengen absoluten Alkohols, bis dieser nichts mehr aufnimmt. (Lösung 2.)

Der auch in viel Alkohol unlösliche Rückstand ist carbonatfrei; er löst sich in Wasser sehr leicht, die wässrige Lösung gibt mit neutraler Silbernitratlösung einen grauen Niederschlag eines N-freien Silbersalzes, das bei der Analyse folgende Zahlen gab: 0,1292 g (vakuumtrocken) geben 0,2652 g CO₂; 0,0950 g H₂O; 0,0355 g Ag

$$\begin{aligned} \text{Gefunden: C} &= 55,98\% \\ \text{H} &= 8,22\% \\ \text{Ag} &= 25,93\% \end{aligned}$$

Für eine Verbindung von der Zusammensetzung C₃₉H₇₀O₅Ag₂ sind berechnet:

$$\begin{aligned} \text{C} &= 56,0\% \\ \text{H} &= 8,45\% \\ \text{Ag} &= 25,9\% \end{aligned}$$

Das in Lösung 1 sich findende Gemenge läßt sich durch Lösungsmittel nicht mehr weiter zerlegen; mit Hilfe von neutraler Silbernitratlösung lassen sich 2 Fraktionen isolieren.

Fraktion 1 ist zunächst eine halbfeste, zähe braune Masse, deren Äußeres auch beim Trocknen sich nicht ändert; durch gelindes Erwärmen mit absolutem Alkohol läßt sich aus dieser Masse eine ganz geringe Menge einer halbfesten Substanz, die nicht näher untersucht wurde, isolieren. Der in Alkohol unlösliche Teil ist nunmehr fest; er ist dunkelbraun¹⁾ gefärbt und enthält allerdings nur ganz geringe Mengen Stickstoff. Das zur Analyse verwendete Material wird im Vakuum über H₂SO₄ getrocknet.

0,1133 g geben 0,2210 g CO₂; 0,0725 g H₂O; 0,0335 g Ag

0,1849 » » 1,4 ccm N bei 17,5° und 732 mm

$$\begin{aligned} \text{Gefunden: C} &= 53,20\% \\ \text{H} &= 7,16\% \\ \text{N} &= 0,82\% \\ \text{Ag} &= 29,57\% \end{aligned}$$

¹⁾ Diese dunkle Färbung hat ihren Grund sicher nicht in einer durch die Einwirkung des Lichts veranlaßten Veränderung; denn bei allen Operationen mit den hier beschriebenen Silbersalzen wurde sorgfältig darauf geachtet, daß kein Licht zu den Niederschlägen zutreten konnte.

Diese Zahlen stimmen auf ein Ag-Salz von der Zusammensetzung $C_{81}H_{129}NO_{10}Ag_5$.

Die Theorie verlangt:

C	=	53,5%
H	=	7,19%
N	=	0,77%
Ag	=	29,7%

Die 2. Fraktion enthält kaum noch nachweisbare Spuren von N; eine einheitliche Substanz liegt hier also zweifellos nicht vor. Die Analyse gab folgende Zahlen:

0,1239 g geben 0,2515 g CO_2 ; 0,0868 g H_2O ; 0,0301 g Ag

Gefunden:

C	=	55,36%
H	=	7,83%
Ag	=	24,29%

Die Lösung 2 (S. 72) wurde ebenfalls mit $AgNO_3$ versetzt; das hierbei ausfallende Silbersalz wird, um geringfügige Beimengungen, die das Festwerden verhindern, zu entfernen, ebenfalls mit Alkohol gelinde erwärmt; die Analyse des alkoholunlöslichen Teils, der fast schwarzbraun gefärbt war, gab folgende Zahlen:

0,0861 g (vakuumtrocken) geben 0,1723 g CO_2 ; 0,0572 g H_2O ; 0,0249 g Ag
0,0952 » geben 0,85 ccm N bei 16,5° und 735 mm

Gefunden:

C	=	54,58%
H	=	7,43%
N	=	1,00%
Ag	=	28,92%

Für eine Verbindung von der Zusammensetzung $C_{68}H_{105}NO_8Ag_4$ verlangt die Theorie:

C	=	54,6%
H	=	7,04%
N	=	9,93%
Ag	=	28,9%

Die für diese Verbindungen aufgestellten Formeln sind als endgültige noch nicht anzusehen; da die aufgestellten Formeln sich auf die N-Bestimmung gründen und diese Bestimmung, bei der außerordentlich geringen N-Menge, unsicher sein muß, so sollte vor der Aufstellung einer definitiven Formel erst das Resultat einer Reihe von N-Bestimmungen abgewartet werden. Leider stand mir trotz der großen in Arbeit genommenen Blutmengen eben nur wenig mehr Material zur Verfügung, als zu den angeführten Analysen notwendig war, und so muß eine endgültige Festlegung späteren Untersuchungen überlassen bleiben.

2. Das Filtrat der Bleiacetatfällung

wird nach Zusatz von etwas verdünnter H_2SO_4 durch H_2S von Blei befreit; die Essigsäure entfernt man mit Wasserdämpfen, die H_2SO_4 durch Baryt und den Überschuß an letzterem durch CO_2 . Das Filtrat von BaCO_3 reduziert Fehlingsche Lösung in der Wärme, wenn auch nur ganz schwach. Da bei den ersten Verarbeitungen Versuche, aus der ziemlich stark verdünnten Lösung die reduzierende Substanz zu isolieren, fehlschlagen, engte ich bei der Nachprüfung die Lösung erst ein; dabei machte ich jedoch die bemerkenswerte Beobachtung, daß das Reduktionsvermögen der eingeengten Lösung nicht nur nicht gestiegen, sondern so gut wie vollständig verschwunden war. Es hat sich offenbar die Substanz, die anfänglich Fehlingsche Lösung reduziert hatte, oxydiert oder zersetzt und es liegt nahe den Grund für dieses auffällige Verhalten vielleicht in der Gegenwart von Glykuronsäure in dieser Lösung zu suchen; die Annahme, es sei vor dem Einengen eine mit Wasserdämpfen flüchtige reduzierende Substanz vorhanden gewesen, ist deshalb hinfällig, weil das bei 4stündigem Destillieren¹⁾ im Dampfstrom erhaltene Destillat nicht das geringste Reduktionsvermögen zeigte.

Aus der eingeengten Lösung fällt man durch Alkohol geringe Mengen anorganischer Salze; das Filtrat gibt auf Zusatz von H_2PtCl_6 ²⁾ einen reichlichen Niederschlag, der sich in Wasser zum größten Teil sehr leicht löst (der in Wasser schwer lösliche Teil ist K_2PtCl_6); beim Verdunsten der Lösung erhält man Krystalle, die bei 209° schmelzen. Es sind 6seitige Plättchen, die in Alkohol sehr schwer löslich sind; aus verdünntem Alkohol wurden Oktaeder von allerdings nur mikroskopischer Größe erhalten.

Die Analyse der vakuumtrockenen Substanz ergab:

0,1230 g geben ? g CO_2 ; 0,0520 g H_2O ; 0,0389 g Pt.

¹⁾ Zur Entfernung der Essigsäure.

²⁾ Ein andermal war durch Zugaben von HgCl_2 ein Niederschlag erhalten worden, der bei entsprechender Behandlung die gleiche Platindoppelverbindung lieferte.

Gefunden :	Für $(C_5H_{14}NOCl)_2PtCl_4$ berechnet:
C = — ¹⁾	19,48 %
H = 4,73 %	4,58 %
Pt = 31,63 %	31,64 %

Es liegt somit auch hier zweifellos Cholinplatinchlorid vor; diese Tatsache ist immerhin etwas auffällig; denn freies Cholin sowohl, als auch die salzsaure Verbindung sind in Äther unlöslich. Man wird deshalb annehmen müssen, entweder, daß die übrigen, in der Ätherausschüttelung enthaltenen Substanzen mit zur Lösung des Cholins in Äther beigetragen haben, oder aber, daß das Cholin anfänglich Bestandteil eines größeren Moleküls war und im Gange der Untersuchung, vielleicht während der Wasserdampfdestillation, abgespalten wurde.

Im alkoholisch-wässrigen Filtrat vom Cholinplatinchloridniederschlag finden sich noch ganz geringe Mengen organischen, N-haltigen Materials, dessen Isolierung mir jedoch nicht gelang.

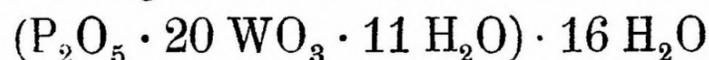
II. Saure, wässrige Flüssigkeit.

Aus der wässrigen Flüssigkeit entfernt man durch gelindes Erwärmen den Äther und versetzt die ätherfreie, klare Lösung mit einer Lösung von 50 g PWS²⁾ in 100 ccm 5%iger H_2SO_4 , solange als auf weiteren Zusatz zu einer Probe innerhalb einer Minute noch ein Niederschlag entsteht.

Man läßt die Mutterlauge unter öfterem Umschütteln über dem Niederschlag 24 Stunden stehen, filtriert den Niederschlag und wäscht ihn wiederholt mit 5%iger H_2SO_4 , der etwas PWS zugesetzt ist.

¹⁾ Ging wegen einer Undichtigkeit am Kaliapparat verloren.

²⁾ Für die Hauptfällung kam eine PWS von Merk, die nach Merk — Prüfung der Reagenzien 1905 — die Zusammensetzung



hat, zur Verwendung; sie ist gelblich gefärbt und löst sich in 5%iger H_2SO_4 , wie auch im reinen Wasser leicht und ohne Rückstand. — Die für die Fällung einer ersten Probeportion verwendete PWS stammte von Bonz-Böblingen und war nach Angabe des Lieferanten nach Drechsels Verfahren hergestellt. Es kommt ihr nach Phosphorsäure- und Wasserbestimmung — die Wolframbestimmung ging verloren — die Formel zu $(P_2O_5 \cdot 22 WO_3 \cdot 9 H_2O) \cdot 10 H_2O$; sie war weiß, mit einem Stich ins Bläuliche und löste sich in warmer 5%iger H_2SO_4 bis auf einen kleinen pulverigen, weißen Rückstand.

Da ich beobachtet hatte, daß Harnstoff schon in verhältnismäßig verdünnter Lösung ¹⁾²⁾ von PWS gefällt wird, hatte ich anfänglich den mit H_2SO_4 -haltigem Wasser ausgewaschenen Niederschlag noch ausgekocht, um die Verbindung von PWS und Harnstoff, die in heißem Wasser ziemlich leicht löslich ist, zu entfernen. Diese Vorsicht erwies sich jedoch als unnötig; denn auch ohne daß der Niederschlag ausgekocht wurde, war die aus dem Niederschlag nach der Entfernung der PWS resultierende Lösung frei von Substanzen, die mit Bromlauge N entwickeln.

Der durch PWS gebildete Niederschlag sowohl wie das Filtrat dieser Fällung werden in bekannter Weise von PWS, von H_2SO_4 und schließlich von Baryt befreit. Während aller

¹⁾ Entgegen z. B. der Angabe von Schöndorff (Pflügers Archiv, Bd. LXII, S. 1). Schon Schöndorff hat darauf hingewiesen, wie wichtig es ist, die PWS auf ihr Harnstofffällungsvermögen zu prüfen. Dieses Vermögen ist zunächst abhängig von der Konzentration der Harnstofflösung sowohl wie auch der PWS-Lösung; darin, daß dieser Umstand vielfach nicht genügend berücksichtigt wurde, liegt auch der Grund, daß die Angaben über die Fällbarkeit nicht bloß von Harnstoff, sondern auch von andern N-haltigen Verbindungen durch PWS, zum Teil sehr beträchtlich auseinandergehen. In vielleicht noch höherem Maße aber ist die Fällbarkeit bestimmter Verbindungen abhängig von der Natur der angewendeten PWS, eine Tatsache, für deren Richtigkeit am besten folgender Versuch spricht:

Chemisch reiner Harnstoff (Merk) gelöst in reinem Wasser; Konzentration der PWS-Lösungen wie oben angegeben: Je 5 ccm der Harnstofflösungen werden mit 1 ccm PWS-Lösung versetzt.

Konzentration + der U-Lösung	PWS Merk	PWS Bonz
4 ‰	Augenblickliche Fällung	
2 ‰	Fällung nach 20 Sek.	Fällung nach 2 Min.
1 ‰	» » 30 Min.	Nach 1 Stunde Lösung noch ganz klar; nach 24 Stunden hatte sich ein starker Krystallniederschlag gebildet.

²⁾ cf. auch B. Schöndorff, Pflügers Archiv, Bd. CXVII, S. 275 bis 290, welche Arbeit erst nach Niederschrift obiger Zeilen erschien.

hierbei nötigen Operationen ist vor allem bei dem Filtrat der PWS-Fällung ein zu starkes Erwärmen zu vermeiden, weil sonst ein großer Teil des Harnstoffs und vielleicht auch noch andere Verbindungen zerstört werden.

Die aus dem

Phosphorwolframsäureniederschlag

resultierende, schwach alkalische Lösung wird bei niedriger Temperatur (ca. 35—40°) auf dem Wasserbade eingeengt; die Lösung ist, wie oben erwähnt, frei von Substanzen, die mit Bromlauge N abspalten. Daraus ist das Fehlen von Harnstoff und Kreatin und die Abwesenheit von Guanin¹⁾ und Arginin²⁾ zu erschließen. Von den gewöhnlich angewandten Fällungsmitteln geben H_2PtCl_6 , $Hg(NO_3)_2$, Jodjodkalium und Pikrinsäure keine Niederschläge in dieser Lösung; auch Silbernitrat gibt weder in saurer noch in neutraler und in ammoniakalischer Lösung eine Fällung; hierdurch ist der Beweis für das Fehlen von Xanthinbasen (Xanthin, Guanin, Hypoxanthin und Adenin) in diesem Auszug erbracht. Auch Histidin kann in dem Auszug nicht enthalten sein, da die $AgNO_3$ -haltige Lösung auch auf vorsichtigen Zusatz von NH_3 keinen Niederschlag gab.

$HgCl_2$ und Kaliumwismutjodidlösung geben bei saurer Reaktion nur ganz geringfügige Niederschläge; eine wesentlich stärkere Abscheidung hat der Zusatz von Nessler's Reagens zur Folge; die schwarzgraue Fällung hielt ich anfänglich für metallisches Quecksilber, doch machte das Ausbleiben einer Reduktion von Fehlingscher Lösung und von ammoniakalischer $AgNO_3$ -Lösung diese Annahme unwahrscheinlich; eine nähere Untersuchung ergab dann auch, daß nicht Hg-Metall, sondern HgS vorlag.

¹⁾ Nach Hüfner (J. f. pr. Chem., Bd. III, S. 1) spalten bei der Behandlung mit Bromlauge ihren N ganz oder teilweise ab: Kreatin, Guanin und Hühnereiweiß; dagegen unterbleibt die Abspaltung u. a. bei Hippursäure, Taurin, Leucin, Tyrosin und Glykokoll.

²⁾ Stuhetz (M. f. Chem., Bd. XXVII, S. 601) zeigte, daß Glykokoll, Alanin, Leucin, Glutaminsäure, Tyrosin, Lysin und Histidin mit Bromlauge keinen N abspalten, daß aber Arginin einen Teil seines Stickstoffs abgibt.

Da alle übrigen Mittel, aus der Lösung etwas Greifbares zu erhalten, versagten, versetzte ich die ganze Lösung mit Nessler's Reagens, bis in einer Probe der über dem Niederschlag stehenden Lösung Hg mittels eines Cu-Blechstreifens nachzuweisen war. Säuert man das Filtrat vom HgS mit verdünnter H_2SO_4 an, so entsteht ein geringfügiger, ziemlich N-reicher Niederschlag von brauner Farbe. Der Niederschlag löst sich nach dem Trocknen teilweise in Alkohol; beide — der alkoholische sowohl wie der alkoholunlösliche Teil lösen sich schon in der Kälte leicht in Alkalien und werden aus diesen Lösungen durch Säuren wieder gefällt; die Ag-Salze sind in NH_3 und in HNO_3 leicht löslich; das Gesamtgewicht beider Salze zusammen betrug nur 0,080 g; somit war eine weitere Untersuchung unmöglich.

Die schwefelsaure Mutterlauge der braunen Fällung versetzt man vorsichtig mit Kaliumwismutjodidlösung, bis ein weiterer Zusatz keine Fällung mehr zur Folge hat. (Ein Überschuß des Fällungsmittels löst den Niederschlag ziemlich leicht wieder auf.)

Die Fällung ist zum größeren Teil anorganisch; der organische Teil besteht, wie unter dem Mikroskop zu erkennen ist, aus prächtig granatroten Kryställchen. Der Niederschlag wird abfiltriert, mit H_2SO_4 -haltigem Wasser gewaschen und dann mit frisch gefälltem $Pb(OH)_2$ zerrieben; die Entfernung des Jods und des Wismuts aus dem Niederschlag gelingt ziemlich leicht und rasch, für das Filtrat der Kaliumwismutjodidfällung jedoch sind sehr große Mengen $Pb(OH)_2$ nötig; die letzten Reste des Jods entfernt man daher aus dieser Lösung besser mit Ag_2O . Geringe Mengen Pb (bezw. Ag) gehen bei diesen Operationen stets in Lösung und sind vor der weiteren Verarbeitung der betreffenden Lösungen durch H_2S zu entfernen.

Die nach all diesen eben kurz skizzierten Operationen aus dem Niederschlag erhaltene Lösung engt man auf dem Wasserbad auf ein kleines Volumen ein und entfernt aus dieser Flüssigkeit mittels Alkohol ein kleines Quantum anorganischer Bestandteile (KNO_3 und K_2SO_4), die alkoholisch-wässrige Mutterlauge dieser anorganischen Stoffe gibt mit alkoholischer $HgCl_2$ -

Lösung sofort einen weißen krystallinen Niederschlag, dessen Menge sich beim Einengen noch etwas vermehrt. Die Krystalle zeigen unter dem Mikroskop würfelartige Formen; sie sind in Äther sehr schwer (oder gar nicht), in heißem Alkohol ziemlich leicht löslich. Nach dem Umkrystallisieren schmelzen sie bei 245° ; ¹⁾ aus der HgCl_2 -Doppelverbindung stellt man die Platinchloriddoppelverbindung her und erhält eine in Wasser sehr leicht, in Alkohol unlösliche gelbrote Verbindung vom Schmelzpunkt 243° .

Löslichkeitsverhältnisse der beiden Doppelverbindungen, ihr Aussehen und ihre Schmelzpunkte lassen das Vorhandensein von Cholin in diesen Verbindungen sicher erscheinen. Zur Analyse reichte das Material nicht aus.

Im Filtrat der HgCl_2 -Fällung ist nach Entfernung des Hg durch H_2S neben NH_4Cl noch eine Spur organischen Materials nachweisbar; mit ammoniakalischer AgNO_3 -Lösung erhält man, wie weiter oben schon angedeutet, auch in dieser konzentrierten Lösung nicht die geringste Trübung; es sind also Xanthinbasen, die durch Kaliumwismutjodid neben Cholin hätten gefällt werden müssen, sicher auch nicht in den geringsten Spuren vorhanden.

Aus dem Filtrat des Kaliumwismutjodidniederschlags wird Jod, Wismut und Silber in der oben angedeuteten Weise entfernt. Das Filtrat vom Ag_2S (und PbS) engte ich bis zur Bildung einer Krystallhaut auf der Oberfläche der Flüssigkeit ein. Aus dieser Lösung fällt nach dem Abkühlen auf Zusatz von Alkohol eine erhebliche Menge anorganischer Salze aus; durch Einengen des Filtrats dieses Niederschlags und nochmaligen Zusatz von Alkohol erreicht man eine annähernd quantitative Abscheidung des vorher in der Lösung vorhandenen anorganischen Materials; das alkoholische Filtrat gibt mit alkoholischer HgCl_2 -Lösung nochmals einen geringen Niederschlag. Die Mutterlauge dieser Fällung enthält nur noch anorganisches Material in allerdings nur geringer Menge. Der HgCl_2 -Niederschlag löste sich zum Teil in kochendem Alkohol; doch ließ sich aus dieser Lösung etwas Greifbares nicht mehr isolieren.

¹⁾ Die Verbindung $\text{C}_5\text{H}_{14}\text{NOCl} \cdot 6 \text{HgCl}_2$ schmilzt bei 243° (Gulewitsch, Diese Zeitschrift, Bd. XXIV, S. 513).

Der in absolutem Alkohol unlösliche Teil der HgCl_2 -Fällung ist rein anorganisch und enthält, wie eine qualitative Untersuchung ergab, eine Doppelverbindung von KCl und HgCl_2 . Verbindungen dieser Art sind in der Literatur einige beschrieben (z. B.

$2\text{HgCl}_2 \cdot \text{KCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $\text{HgCl}_2 \cdot \text{KCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$; $\text{HgCl}_2 \cdot 2\text{KCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$); alle sind in Wasser leicht, in Alkohol dagegen nur wenig löslich.

Das

Filtrat vom Phosphorwolframsäureniederschlag wird nach Entfernung der PWS und der H_2SO_4 durch Baryt und des Barytüberschusses durch CO_2 , bei niederer Temperatur (Max. 43°) auf dem Wasserbad eingeengt; NH_4 -Salze finden sich in dieser Lösung nicht (Probe mit Nessler's Reagens). Um zu prüfen, ob neben Harnstoff, der in dieser Lösung sich finden mußte, noch andere N-Verbindungen vorhanden seien, wurde in aliquoten Teilen der Lösung eine Gesamt-N-Bestimmung (nach Kjeldahl) und eine Harnstoffbestimmung nach Knop-Hüfner ausgeführt.

Gesamtvolumen der eingeengten Lösung: ¹⁾ 560 ccm.

Gesamt-N-Bestimmung:

a) 10 ccm Lösung geben 25,70 ccm $\frac{n}{10}$ - NH_3 = 0,0360 g N

b) 10 » » » 25,40 » » = 0,0356 » »

Also finden sich im Mittel in 100 ccm Lösung:

0,358 g N.

Harnstoffbestimmung:

4,77 ccm Lösung geben 12,75 ccm N bei $21,5^\circ$ und 723 mm.

Unter Zugrundelegung der Hüfnerschen Konstanten (1 g Harnstoff liefert 354,3 ccm N bei 0° und 760 mm gemessen) finden sich in 4,77 ccm 0,01442 g N in Form von Harnstoff; in 100 ccm somit

0,302 g N

entsprechend 85% des Gesamtstickstoffs.

Die eingeengte Lösung wird mit einer ziemlich konzentrierten Merkurinitratlösung versetzt, bis eine aus der Lösung genommene Probe mit NaHCO_3 -Brei sofort eine gelbe Fällung gibt. Dann gibt man zu der Lösung Baryt, bis die über dem

¹⁾ Der Alkoholauszug war gewonnen aus 45 Litern Serum; es sind also in 1000 ccm Serum 0,0445 g N in alkohollöslicher Form enthalten (rund 0,0043%).

Niederschlag stehende Lösung nur noch ganz schwach sauer reagiert, filtriert den Niederschlag nach mehrstündigem Stehen ab, wäscht ihn wiederholt mit Wasser, zerteilt ihn schließlich in Wasser und entfernt das Hg durch H_2S . Aus dem Filtrat vom HgS verjagt man den H_2S durch einen Luftstrom und schüttelt die klare Lösung mit geschlemmtem $BaCO_3$, bis kein Kohlendioxyd mehr entweicht und die Lösung neutral reagiert. Diese Lösung engt man — anfänglich auf dem Wasserbad bei niederer Temperatur, dann im Vakuum über H_2SO_4 — ein bis zum Sirup; dabei scheidet sich ein großer Teil des $Ba(NO_3)_2$ in feinen Krystallen, die sich leicht abtrennen lassen, aus; beigemischt ist ihnen eine geringfügige Quantität organischen Materials, das jedenfalls von Stoffen, die mit Bromlauge N entwickeln, nichts enthält: Den Sirup läßt man, um alkoholunlösliche Substanzen zu entfernen, in viel absoluten Alkohol einfließen, gießt die klare Lösung von dem Niederschlag ab, löst diesen in wenig Wasser und wiederholt das Einfließenlassen in Alkohol. Der Niederschlag fällt anfangs als eine zähe Masse aus, die sehr schwer trocken zu bekommen ist; wiederholt man jedoch das Umfällen 3—4 mal, so wird der Niederschlag allmählich krümelig und läßt sich sehr leicht und rasch trocknen.

Die verschiedenen Alkoholmutterlaugen engt man bei etwa 40° ein, übergießt den Rückstand mit Alkohol (absolut.) und bringt das eventuell Ungelöste zu dem in Alkohol unlöslichen Hauptteil (s. S. 84).

Die etwas eingeengte absolut alkoholische Lösung versetzt man mit soviel Essigäther, daß ein weiterer Zusatz keine Trübung mehr zur Folge hat; die Fällung trennt man ab und bringt sie ebenfalls zu dem in Alkohol Unlöslichen. Sollte die Alkohol-Essigesterlösung nach all diesen Operationen noch $Ba(NO_3)_2$ enthalten, so muß das Einengen zum Sirup, Lösen in Alkohol und Fällen mit Essigester wiederholt werden, bis alles $Ba(NO_3)_2$ entfernt ist.

Die Alkohol-Essigesterlösung bringt man zur Trockene und übergießt den Rückstand mit ganz wenig absolutem Alkohol; man entzieht dem Rückstand auf diese Weise neben ganz geringen Mengen Harnstoff eine gelbe ölige Substanz (s. S. 83),

während die Hauptmenge Harnstoff bei vorsichtigem Arbeiten ungelöst bleibt. Man gibt zum Rückstand viel Alkohol — ein kleiner anorganischer Rest bleibt ungelöst — und gibt zu dieser Lösung Äther, um die letzten Spuren von $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$ zu entfernen. Man filtriert, bringt das klare Filtrat zur Trockene, krystallisiert den Rückstand nochmals aus Alkohol um und löst die hierbei erhaltenen Krystalle nochmals in Wasser.¹⁾ Beim Verdunsten dieser wässerigen Lösung erhält man prismatische Krystalle, die nach dem Trocknen bei 105° bei 131° (unkorr.) schmelzen. Der bei vorsichtigem Schmelzen bleibende Rückstand gibt die Biuretreaktion; die wässerige Lösung der Krystalle gibt mit Bromlauge und mit HNO_2 ein farbloses Gas; mit Oxalsäure und konzentrierter HNO_3 erhält man die für oxalsauren bzw. salpetersauren Harnstoff charakteristischen Krystalle. Die ganze auf diesem Wege erhaltene Quantität betrug 1,2 g analysenreines Material: die N-Bestimmung einer bei 105° getrockneten Probe ergab auf reinen Harnstoff stimmende Zahlen:

0,1562 g geben 63,8 ccm N bei 15° , 739 mm (H_2O)
 Gefunden: 46,57% N; Berechnet für: $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 46,72% N.

Die Reindarstellung des Harnstoffs nach dem angegebenen Verfahren ist allerdings ziemlich umständlich und zeitraubend; doch gelang es mir nur auf diesem Wege, ein analysenreines Präparat zu erhalten; auch nach dem Verfahren von Gottlieb,²⁾ der den Harnstoff in Form der Oxalsäureverbindung aus Blut isolierte, erhielt ich keine vollkommen reine Substanz, erst nach mehrmaligem Umkrystallisieren erhält man bei der Analyse annähernd auf oxalsauren Harnstoff stimmende Zahlen:

0,1275 g geben 0,1081 g CO_2 und 0,0579 g H_2O
 Gefunden: Für $(\text{CO}(\text{NH}_2)_2)_2 \cdot (\text{COOH})_2$ berechnet:
 C = 23,12% 22,83%
 H = 5,06% 4,79%

Entfernt man die Oxalsäure durch BaCO_3 , engt das Filtrat bei niedrigerer Temperatur (etwa $35/40^\circ$) zur Trockene ein und

¹⁾ Hierbei bleibt als Rückstand eine ziemlich N-reiche organische Substanz neutraler Natur, deren weitere Untersuchung jedoch der geringen Menge wegen unmöglich war.

²⁾ Arch. f. exp. Path. u. Pharm., Bd. XLII, S. 238.

zieht den Rückstand mit absolutem Alkohol aus, so bleibt beim Verdunsten dieser Lösung neben Harnstoffkrystallen wieder eine allerdings nur geringe Menge des schon oben erwähnten gelben Öls zurück.

Über die Natur dieses gelben Öls habe ich nichts Näheres ermitteln können, da die mir zur Verfügung stehende Quantität eine Untersuchung ganz aussichtslos erscheinen ließ; die eben erwähnte Beobachtung, daß auch aus anscheinend vollkommen reinem oxalsauren Harnstoff dieses Öl erhalten wurde, läßt mich vermuten, daß wir es nicht mit einem ursprünglichen Bestandteil des Serums zu tun haben, sondern daß das Öl ein Umwandlungsprodukt des Harnstoffs — und vielleicht identisch ist mit dem «Urein» von Ovid Moore, für das man ja nach den Untersuchungen von Lippich¹⁾ eine Entstehung aus Harnstoff annehmen muß; für diese Annahme scheint mir auch die Tatsache zu sprechen, daß dieses Öl sich so außerordentlich schwer nur vom Harnstoff trennen läßt.

Was die Menge des im Blut enthaltenen Harnstoffs anlangt, so stellen natürlich die von mir isolierten 1,2 g nur einen Bruchteil der tatsächlich vorhandenen Quantität dar; eine quantitative Bestimmung ist auf dem von mir eingeschlagenen Wege nicht möglich; es war aber auch eine solche um so weniger notwendig, als schon seit längerer Zeit recht gut übereinstimmende Angaben verschiedener Forscher über den Harnstoffgehalt des Pferdeblutes vorliegen. Kaufmann²⁾ gibt den Gehalt des Pferdeblutes an Harnstoff auf 0,032—0,052^{0/0}; Schöndorff³⁾ auf 0,023—0,0505^{0/0} an. Sind diese Zahlen auch mittels indirekter Methoden erhalten worden, so spricht doch das übereinstimmende Resultat der nach 2 verschiedenen Methoden erhaltenen Werte für ihre Richtigkeit. Analysiert haben den aus Blut isolierten Harnstoff zum ersten Male Verdeuil und Dollfuß.⁴⁾

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLVIII, S. 160.

²⁾ Archive de Physiol., Bd. XXVI, S. 531.

³⁾ Pflügers Archiv, Bd. LXIII, S. 192.

⁴⁾ Annalen, Bd. LXXIV, S. 214. Eine sehr eingehende Zusammenstellung über das Vorkommen und den Nachweis von Harnstoff in Blut usw. findet sich bei Schöndorff, Pflügers Archiv, Bd. LXXIV, S. 307.

Die alkoholunlöslichen Anteile der $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ -Fällung (siehe S. 81) löst man in Wasser; organisches Material ist in geringer Menge noch vorhanden; ob auch organisch gebundener N in der Lösung sich findet, habe ich wegen der großen Menge $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$, die in der Lösung enthalten war, nicht entscheiden können.

Die Lösung gibt nur mit $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ eine Fällung; alle übrigen Fällungsmittel — Kaliumwismutjodid, Nessler's Reagens, Jodjodkalium, H_2PtCl_6 , HgCl_2 , Bleiacetat, Pikrinsäure — geben keine Niederschläge. Ich arbeitete die Lösung daher in folgender Weise auf.

Die heiße, vollkommen neutrale Lösung versetzt man vorsichtig mit heißer CuSO_4 -Lösung, bis eben kein Niederschlag mehr entsteht. Man läßt abkühlen, entfernt das BaSO_4 und kocht das Filtrat mit frisch gefälltem $\text{Cu}(\text{OH})_2$, wobei jedoch nur ganz geringe Mengen aufgenommen werden. Das Filtrat vom $\text{Cu}(\text{OH})_2$ ist, wenn man vorsichtig gearbeitet hat, frei von Ba und H_2SO_4 ; diese Lösung engt man auf dem Wasserbad ein; da auch bei längerem Stehen etwas Festes direkt nicht zu erhalten war, versuchte ich mit Hilfe verschiedener Lösungsmittel eine Zerlegung des Gemenges zu erreichen; die verschiedenen Fraktionen — die man mittels Alkohol¹⁾ erhält, sind zum größeren Teil anorganisch; nur 3 Fraktionen enthalten organische Substanz und gerade diese Fraktionen sind so klein, daß selbst die Untersuchung aller 3 zusammen aussichtslos erscheinen mußte.

Die Mutterlauge des Merkurinitratniederschlags befreit man durch H_2S vom Hg, entfernt aus dem Filtrat vom HgS den H_2S durch einen Luftstrom, neutralisiert die Lösung mit $\text{Ba}(\text{OH})_2$ und engt schließlich bei ca. 50° ein. Beginnt auf der Oberfläche der Flüssigkeit eine Krystallhaut sich zu bilden, so läßt man erkalten, entfernt die ausfallenden Krystalle und gibt zum Filtrat Alkohol, bis ein weiterer Zusatz keine Fällung mehr hervorruft; die Fällung ist rein anorganisch ($\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$); die Mutterlauge engt man auf dem Wasserbad bis zum Sirup

¹⁾ Nur Alkohol erwies sich — in verschiedener Verdünnung — für meine Zwecke brauchbar.

ein; dieser Sirup reduziert Fehlingsche Lösung direkt ziemlich schwach, kräftigt jedoch nach kurzem Kochen mit verdünnter H_2SO_4 . Der Sirup wird in wenig Wasser gelöst, diese Lösung mit CO_2 gesättigt und bei 0° mit $\text{Ba}(\text{OH})_2$ im Überschuß geschüttelt; die alkalische Lösung sättigt man bei 0° nochmals mit CO_2 , entfernt das Baryumcarbonat rasch und läßt das klare Filtrat für einige Tage im Eis stehen.

Nach diesem von Siegfried¹⁾ angegebenen Verfahren sollten unter weiterer Einhaltung der von Siegfried angegebenen Bedingungen die Baryumsalze der aus eventuell vorhandenen Aminosäuren durch CO_2 -Anlagerung entstehenden Carbaminoverbindungen isoliert werden.

Ich erhielt allerdings auf Zusatz von kaltem Alkohol zu der mit CO_2 gesättigten Lösung Niederschläge in ganz geringer Menge, die die Baryumsalze organischer Säuren darstellten. Kocht man jedoch die Niederschläge mit Wasser, entfernt das BaCO_3 , dampft das Filtrat zur Trockene ein und zieht den Rückstand mit Alkohol aus, so geht in den Alkohol nur eine ganz minimale Menge einer N-haltigen Substanz (Hippursäure?); die Quantität war jedoch so gering, daß, nachdem die N-Reaktion mit einem ganz kleinen Teil angestellt worden war, der Rest nicht einmal mehr zu einer Schmelzpunktbestimmung ausreichte. Der alkoholunlösliche Rückstand ist N-frei.

Das Filtrat der «Carbaminoverbindungen» engt man bis zum Sirup ein und entzieht diesem mittels Alkohol das organische Material; um diese Lösung von anorganischen Bestandteilen möglich zu befreien, empfiehlt es sich, diese alkoholische Lösung nochmals bis zum Sirup einzuengen und diesen wieder mit Alkohol aufzunehmen. Aus dieser Lösung ließ sich eine geringe Menge Cholin²⁾ in der schon S. 79 beschriebenen Weise mittels HgCl_2 isolieren. Aus dem Filtrat der HgCl_2 -Fällung war nach Entfernung des Quecksilbers und der Salzsäure (mittels Ag_2O)

¹⁾ Berichte, Bd. XXXIX, S. 397; Diese Zeitschrift, Bd. XLIV, S. 85; Bd. XLVI, S. 401.

²⁾ Das Auftreten von Cholin im Filtrat vom PWS-Niederschlag ist aus der Leichtlöslichkeit der PWS-Cholinverbindung in überschüssiger PWS zu erklären.

nichts mehr zu erhalten; organisches Material war nur noch ganz wenig vorhanden; N in organischer Bindung fehlte vollständig.

Auf Grund der bis jetzt beschriebenen Versuche sind in dem durch PWS nicht fällbaren Teil des Alkoholauszugs mit Sicherheit nur Harnstoff und Cholin nachgewiesen. Es scheinen jedoch einzelne Tatsachen, so vor allem das neben Harnstoff sich findende Öl¹⁾ für das Vorhandensein noch anderer N-haltiger Verbindungen zu sprechen; ich suchte daher auf einem etwas anderen Wege das Resultat der ersten Untersuchung sicher zu stellen und vor allem auf etwaige andere N-haltige Bestandteile zu fahnden.

Zu diesem Zwecke engte ich das Filtrat der PWS-Fällung, nachdem überschüssige PWS, H_2SO_4 und schließlich auch der Baryt entfernt waren, auf dem Wasserbad bei niederer Temperatur bis zum Sirup ein, diesen Sirup versetzte ich mit viel absolutem Alkohol, filtrierte das in Alkohol Unlösliche ab und kochte diesen ungelösten Teil nochmals mit absolutem Alkohol aus. Der alkoholunlösliche Teil besteht aus anorganischem und N-freiem organischen Material, wobei das letztere gegenüber dem ersten jedoch sehr zurücktritt.

Die alkoholische Lösung wird bei niederer Temperatur eingeeengt, bis auf der Oberfläche der Flüssigkeit eine Krystallhaut sich bildet; ich suchte dann aus dieser Lösung mittels Oxalsäure den Harnstoff auszufällen, doch mußte ich mich bald überzeugen, daß eine auch nur annähernd quantitative Fällung auch in alkoholischer Lösung nicht möglich ist. Aus dem Filtrat der Oxalsäurefällung entfernte ich die Oxalsäure mittels Kalkwasser. Ein Teil des überschüssigen $Ca(OH)_2$ läßt sich aus dem Filtrat von Calciumoxalat mittels CO_2 entfernen. Versuche aus dem Filtrat vom $CaCO_3$ durch Ausschütteln mit Essigester den in der Lösung noch vorhandenen Rest des Harnstoffs zu entfernen, schlugen fehl.

Ich engte daher die Lösung auf dem Wasserbad bei 35° möglichst weit ein, brachte den Syrup ins Vakuum über H_2SO_4 , bis der größte Teil der Feuchtigkeit entfernt war, und trock-

¹⁾ Sofern man es als primärer Natur betrachten will.

nete die Masse schließlich bei 80° . Trotzdem vorauszusehen war, daß der Harnstoff durch diese letztere Operation zerstört werden würde, und es nicht ausgeschlossen war, daß auch eventuell noch vorhandene andere Verbindungen dasselbe Schicksal erleiden würden, sah ich in diesem Verfahren die letzte Möglichkeit, den Harnstoff zu entfernen. Denn die Fällung mit $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$, die große Mengen der bei weiterem Aufarbeiten sehr lästigen Salpetersäure in die Lösung brachte, wollte ich eben aus diesem Grunde umgehen und bei der Zersetzung des Harnstoffs durch salpetrige Säure, das einzige Verfahren, das außerdem noch zur Entfernung des Harnstoffs hätte in Betracht kommen können, war mit der Gewißheit der Zersetzung auch anderer Substanzen zu rechnen.

Die bei 80° getrocknete Masse wurde wiederholt mit absolutem Alkohol ausgekocht; die Lösung hinterläßt beim Verdunsten einen gelben zähen Sirup, aus welchem nach etwa 1—2tägigem Stehen kleine Krystalle zum Vorschein kommen. Die Krystalle lassen sich verhältnismäßig leicht abtrennen, wenn man den Rückstand mit wenig Alkohol vorsichtig anrührt. Einmal isoliert, sind sie in Alkohol recht schwer löslich, während vor der Isolierung die fremden Beimengungen die Löslichkeit außerordentlich erhöhen; in Wasser sind sie ziemlich leicht, in Äther gar nicht löslich; nach dem Umkrystallisieren aus Wasser und Trocknen über H_2SO_4 im Vakuum schmelzen sie ziemlich scharf bei 99° . Erhitzt man eine kleine Probe für sich, so wird NH_3 ¹⁾ abgespalten; als Rückstand hinterbleibt reines Calciumoxyd.

Die vakuumtrockene Substanz gab bei der Analyse folgende Zahlen:

0,0879 g geben 0,0848 g CO_2 und 0,0477 g H_2O

0,0966 » » 8,7 ccm N bei 19° und 736 mm

0,0879 » » 0,0352 g CaSO_4

Gefunden: C = 26,31%

H = 6,07%

N = 10,11%

Ca = 11,50%

¹⁾ Eine wässrige Lösung der Krystalle bleibt auf Zusatz von Nessler's Reagens vollkommen klar.

Für eine Verbindung von der Zusammensetzung $C_{15}H_{39}N_5O_{20}Ca_2$ verlangt die Theorie:

C	=	26,1%
H	=	5,68%
N	=	10,15%
Ca	=	11,99%

Diese Formel kann einer einheitlichen Verbindung nur unter der Annahme, daß sie Krystallwasser enthält, zukommen. Für die Annahme, daß eine Verbindung mit hohem Krystallwassergehalt vorliegt, spricht die Beobachtung, daß die Substanz bei vorsichtigem Erhitzen erst «schmilzt» und dann wieder fest wird, um sich bei weiterem Erhitzen ohne nochmaliges Schmelzen vollständig zu zersetzen. Da im Vakuum über H_2SO_4 das Wasser nicht entfernt werden konnte, und selbst sehr vorsichtiges Erhitzen bis zum Schmelzpunkt, wie schon erwähnt, auch eine NH_3 -Abspaltung zur Folge hatte, mußte eine gesonderte Wasserbestimmung unterbleiben. Wie die oben aufgestellte Formel zu zerlegen ist, ist natürlich ungewiß; am wahrscheinlichsten dünkt mir folgende Formulierung.



Die Mutterlauge der eben beschriebenen Ca-Verbindung enthält nur wenig organisches Material mehr; N-haltige Bestandteile fehlen vollständig.

Die Aufarbeitung des in Alkohol unlöslichen Rückstandes (siehe S. 87) geschah in folgender Weise:

Ich löste den Rückstand in Wasser, entfernte mittels Ag_2O die Salzsäure, säuerte das Filtrat vom $AgCl$ mit verdünnter H_2SO_4 an, fällte durch H_2S das Ag und entfernte schließlich in bekannter Weise die H_2SO_4 . Das Filtrat vom $BaCO_3$ gibt mit keinem der gebräuchlichen Fällungsmittel einen Niederschlag; ich engte daher die Lösung vorsichtig bis zum Sirup ein und ließ diesen unter Umrühren in Alkohol einfließen; der Niederschlag wird nach dem Auswaschen mit Alkohol in wenig Wasser gelöst, durch vorsichtigen Zusatz von H_2SO_4 entfernte ich geringe Mengen Ba und suchte aus der eingengten Lösung das geringe Quantum N-haltiger Substanz, das sich hatte nachweisen lassen, zu isolieren — jedoch ohne Erfolg: die Menge war zu gering; nur soviel konnte ich feststellen, daß Substanzen, die mit Bromlauge N entwickeln, fehlen.

Die alkoholische Lösung wird eingeengt, als Rückstand bleibt eine anfänglich feste, weiße Masse, die jedoch an der Luft sehr rasch Feuchtigkeit anzieht, sich dabei gelb färbt und verschmiert. Stickstoff ist reichlich vorhanden, zum Teil, wenn nicht vollständig in einer Form, aus der er durch Bromlauge in elementarer Form abgespalten wird; NH_4 -Salze und Harnstoff lassen sich nicht nachweisen. Die Lösung (in Wasser) reduziert beim Kochen Fehlingsche Lösung; ebenso auch Quecksilberoxyd; diese Beobachtung ließ mich die Gegenwart von Kreatinin vermuten, doch gab die Lösung auch nach dem Kochen mit einigen Tropfen verdünnter H_2SO_4 keine Kreatininreaktionen; beim Kochen mit verdünnter H_2SO_4 wird eine geringe Menge einer braunen (humintartigen) Substanz abgeschieden, die jedoch nicht näher untersucht werden konnte. Aus dem Filtrat dieser Abscheidung erhält man nach Entfernung der H_2SO_4 durch BaCO_3 auf Zusatz von Alkohol eine anorganische Fällung. Im Filtrat dieser Fällung ist die N-haltige Substanz noch vorhanden, doch gelang es mir nicht, etwas Brauchbares zu isolieren, da direkt nichts Festes sich abschied, und auch die gebräuchlichen Fällungsmittel Niederschläge nicht gaben.

Durch die Extraktion mit Äther und mit Alkohol ist der weitaus größte Teil der organischen Bestandteile des eingedampften Serums entfernt.

1,9957 g des lufttrockenen Rückstandes hinterlassen beim Glühen über dem Gebläse 1,7895 g Asche; somit sind in dem durch Äther (Petroläther) und durch Alkohol erschöpften Rückstand noch rund etwa 10% organisches Material vorhanden.

Der Glührückstand enthält etwas Ca, hauptsächlich Na, wenig N und Spuren von Fe; von Säuren HCl , H_2SO_4 und H_3PO_4 .

C. Auszug mit Wasser.

An die Extraktion mit absolutem Alkohol sollte sich nach meinem ursprünglichen Plan die Extraktion mit Wasser anschließen. Doch wurde diese Absicht nur bei 4 Serumportionen vollständig durchgeführt und die Lösung in der unten beschrie-

benen Weise aufgearbeitet; denn die hierbei erhaltenen Resultate ermutigten nicht zu weiteren Versuchen in dieser Richtung.

Das zu extrahierende Material (aus 48 l Serum) wurde solange mit Wasser von Zimmertemperatur unter wiederholtem Erneuern des Wassers geschüttelt, bis nichts mehr in Lösung ging; die in kaltem Wasser unlöslichen Teile wurden durch Auskochen von den letzten Anteilen wasserlöslicher Substanzen befreit.

Beim Ansäuern dieser Auszüge (mit verdünnter H_2SO_4) schied sich in braunen Flocken eine Substanz ab, welche die Biuret-, Xanthoproteinsäure-, Millonsche- und Schwefelblei-reaktion gab und dadurch als Eiweißkörper sich charakterisierte. Aus dem Filtrat dieses Eiweißstoffs wurden, nachdem zuvor in einem aliquoten Teil der Gesamt-N bestimmt worden war (siehe Tabelle V), in der gleichen Weise wie beim Alkohol- auszug durch PWS die basischen Bestandteile ausgefällt.

Tabelle V.

Nr.		Gesamt- Volumen ccm	Zur Analyse verwendet ccm	Gefunden ccm n/10-N	Gesamt- N	Durch PWS gefällt %
1.	7 l Serum a)	450	30	5,3	in 420 ccm 0,104 g	53
	b)	850	50	2,05	in 850 ccm 0,049 g	
2.	23,5 l Serum a)	880	30	8,72	in 850 ccm 0,347 g	61
	b)	930	50	5,24	in 930 ccm 0,136 g	
3.	9 l Serum a)	515	30	6,47	in 485 ccm 0,146 g	50
	b)	530	50	4,92	in 530 ccm 0,073 g	
4.	8 l Serum a)	300	20	7,80	in 280 ccm 0,153 g	52
	b)	340	30	4,60	in 340 ccm 0,073 g	

Bemerkung zu Tab. V: a) bedeutet: Lösung vor der Fällung mit PWS;
b) » : » nach » » » »

Phosphorwolframsäureniederschlag.

Die Fällung¹⁾ wurde in bekannter Weise von PWS, H_2SO_4 und Baryt befreit, ein Überschuß von Baryt durch CO_2 aus der Lösung²⁾ entfernt. Das Filtrat vom $BaCO_3$ wurde stark eingeeengt und mit einigen Tropfen verdünnter HNO_3 bis zur schwach sauren Reaktion versetzt; aus der schwach salpetersauren Lösung hoffte ich mittels $AgNO_3$ von Xanthinbasen Xanthin, Guanin und Hypoxanthin ausfällen und deren Ag-Verbindungen durch kochende HNO_3 (D 1,1) vom beigemengten $AgCl$ abtrennen zu können, doch wurde durch die Salpetersäure absolut nichts aus dem Niederschlag herausgelöst; nach der Entfernung des Ag aus dem Niederschlag gab denn auch das Filtrat vom Ag_2S mit PWS kaum eine Trübung.

Das schwach saure Filtrat der $AgNO_3$ -Fällung wurde, nachdem ich mich überzeugt hatte, daß in einer Probe auf Zusatz von $Ba(OH)_2$ sofort ein graubrauner Niederschlag entsteht, mit (festem) Baryumhydroxyd im Überschuß versetzt. Die weitere Behandlung des hierbei entstehenden Niederschlags geschah nach den Angaben von Kossel und Kutscher;³⁾ Arginin und Histidin ließen sich nicht auch nur in Spuren nachweisen.

Das Filtrat der Silber-Barytfällung wird durch vorsichtigen Zusatz von H_2SO_4 von Baryt befreit, in neutraler Lösung eingeeengt, nach dem Abkühlen auf einen Gehalt von 5% H_2SO_4 gebracht und mit PWS versetzt. Aus der Fällung⁴⁾ wurden nach der bekannten Verarbeitungsweise minimale Mengen organischen Materials, das nicht weiter untergebracht werden konnte, erhalten. Das Filtrat war frei von organischen Stoffen.

¹⁾ Die Fällung enthielt stets verhältnismäßig viel Alkalien, vor allem Kalium.

²⁾ Die Niederschläge wurden jedesmal mindestens 5—6mal ausgekocht und die heiße Waschflüssigkeit sofort abgesaugt.

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXI, S. 165.

⁴⁾ Schon bei dieser Gelegenheit machte ich die beachtenswerte Beobachtung, daß ein großer Teil des N, der durch PWS gefällt worden war, in dem Gemenge von Baryumphosphorwolframat und -Sulfat in einer Form sich fand, die durch Wasser aus dem Niederschlag nicht ausgezogen werden konnte.

Wenn nun auch die Isolierung bestimmter Verbindungen aus dieser PWS-(Haupt-)fällung nicht gelangt, so kann man doch aus den angestellten Versuchen den sicheren Schluß ziehen, daß Xanthinbasen, ferner Arginin, Histidin und Lysin fehlen.

Auch die Aufarbeitung des

Filtrates vom Phosphorwolframsäureniederschlag gelang nicht in der gewünschten Weise. Die Entfernung der überschüssigen Fällungsmittel geschah hier genau in der gleichen Weise wie bei dem PWS-Niederschlag. Vor diesen Operationen fanden sich im Filtrat vom PWS-Niederschlag 0,331 g N (siehe Tabelle V, Summe b [1—5]). Nach Entfernung der PWS und der H_2SO_4 und des Barytüberschusses war das Gesamtvolumen 200 ccm.

Hiervon wurden 10 ccm nach Kjeldahl verascht.

Diese 10 ccm lieferten 5,13 ccm $n/10-NH_3$; somit sind in 200 ccm enthalten 0,144 g N; im Niederschlag von $BaSO_4$ und Baryumphosphorwolframat finden sich demnach 0,187 g N = 56% des durch PWS nicht fällbaren Stickstoffs.¹⁾ Schon beim 1. und 2. Auskochen des Barytniederschlags mit Wasser waren nur kaum noch Spuren von N, wovon ich mich durch Veraschen eines aliquoten Teils des Waschwassers überzeugte, in Lösung gegangen; bei weiterem Auskochen war überhaupt kein N mehr im Waschwasser nachzuweisen.

Die Menge des Barytniederschlags war ziemlich klein; denn es waren zur Fällung nur rund 25 ccm einer 33%igen PWS (in 5%iger H_2SO_4) verwendet worden; damit wäre dem Einwand, daß eben doch nicht genügend ausgewaschen worden sei, der nach den Angaben von E. Fischer,²⁾ daß «das Auswaschen der (PWS)-Niederschläge bei größeren Operationen nicht so leicht sei», nicht unberechtigt erscheinen könnte, wohl begegnet.

¹⁾ Es war beim Ausfällen der überschüssigen Säuren mit $Ba(OH)_2$ wiederholt geprüft worden, ob nicht vielleicht alkalisch reagierende Dämpfe entweichen; das gleiche geschah auch beim Auskochen (6 mal) der Niederschläge; in beiden Fällen jedoch mit negativem Resultat.

²⁾ Ber., Bd. XXXIX, S. 547 f.

Auch Kossel und Kutscher¹⁾ haben die Beobachtung gemacht, daß unter Umständen ein Teil des N in dem BaSO₄-Niederschlag in einer durch kochendes Wasser nicht extrahierbaren Form sich findet. Welcher Art dieser «Humin»-N, wie Kossel und Kutscher diesen Teil bezeichnen, ist, ob er vielleicht in Beziehung zu bringen ist mit den Stoffen, die Schmiedeberg²⁾ als «Melanoidinsäuren» bezeichnet, lassen diese Autoren unentschieden.

Da die Kenntnis auch dieser Stoffe von Wichtigkeit ist, ihre Isolierung aus dem BaSO₄- und Baryumphosphorwolframatgemenge vor allem ihrer geringen Menge wegen mit ziemlichen Schwierigkeiten verknüpft war, habe ich die weitere Prüfung dieser Frage zunächst unterlassen, vor allem auch weil ich auf anderem Wege leichter zum Ziel zu kommen hoffte. Hervorgehoben mag aber werden, daß diese Beobachtung die Verwendung von PWS, besonders bei Untersuchungen, wobei es auf die Isolierung sämtlicher N-haltiger Bestandteile ankommt, nicht geraten erscheinen läßt.

Die aus dem Filtrat vom PWS-Niederschlag resultierende Lösung, die nach Abzug der für die Analyse verbrauchten Quantität noch 0,1368 g N enthielt, wurde nach dem Verfahren von Fischer und Bergell³⁾ mit β -Naphtalinsulfochlorid geschüttelt. Ich fand es jedoch zweckmäßiger, statt nur zwei Moleküle Chlorid deren drei zu verwenden und nach der Kondensation die saure Lösung wiederholt (bis zu 10 mal) mit Äther auszuschütteln.⁴⁾

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXI, S. 165 f.

²⁾ Arch. f. experim. Path. u. Pharm., Bd. XXXIX, S. 65 f.

³⁾ Ber., Bd. XXXV, S. 3779.

⁴⁾ Von einer Lösung, die in 200 ccm je 1,5 g Glykokoll, Alanin, Leucin, Tyrosin, Asparaginsäure und Glutaminsäure enthielt, werden 20 ccm (= 0,1054 g N) mit soviel KOH versetzt, daß Lackmuspapier eben ganz schwach gebläut wird. Hierauf werden noch 5 ccm $n/1$ -KOH zugefügt, ferner 3,5 g β -Naphtalinsulfochlorid in Ätherlösung und dieses Gemenge geschüttelt; in Intervallen von 1 $\frac{1}{2}$ Stunden fügte ich noch dreimal je 11,1 ccm $n/1$ -Lauge zu, hob den Äther ab, fügte der alkalischen Lösung die der verbrauchten Kalilauge äquivalente Menge H₂SO₄ zu, ließ über Nacht in Eis stehen, filtrierte andern Tags den Niederschlag ab und

Nach der Kondensation mit β -Naphthalinsulfochlorid betrug das Volumen der Flüssigkeit noch 300 ccm (entsprechend 190 ccm vor der Kondensation).

20 ccm dieser Lösung geben 6,13 ccm n_{10} -NH₃, somit sind in 300 ccm enthalten 0,1294 g N; diese 300 ccm entsprechen 190 ccm der ursprünglichen Lösung, die enthalten 0,1368 g N; die Differenz — 0,0074 g N — ist, wenigstens zum Teil wohl auf Rechnung unvermeidlicher Verluste bei der Kondensation und bei dem dann folgenden Ausschütteln mit Äther zu setzen, denn die Anteile, in welchen die N-haltigen Kondensationsprodukte zu suchen waren, erwiesen sich bis auf einen minimalen Rest, der nicht weiter untersucht werden konnte, als N-frei.

In der sauren Lösung¹⁾ geben nur Tannin und Kaliumwismutjodid noch greifbare Fällungen, wegen der Schwierigkeiten, welche die Entfernung eines Tanninüberschusses aus der Lösung mit sich gebracht hätte, vermied ich die Anwendung dieses Fällungsmittels und griff darum zum Kaliumwismutjodid; der durch dieses Reagens gefällte Niederschlag ist so gut wie vollständig N-frei. Vor der Fällung fanden sich nach Abzug der für die Analyse verbrauchten Quantität in der Lösung 0,1209 g N; nach der Fällung waren noch 0,1178 g N vorhanden.

Eine Trennung von organischem und anorganischem Ma-

wusch ihn mit kaltem Wasser nach. Im Filtrat und Waschwasser wird der N-Gehalt bestimmt.

Gefunden: 44,9 ccm n_{10} -NH₃ = 0,0629 g N.

Also sind nur 40,4% des Gesamt-N in Reaktion getreten. In zwei anderen Proben verfuhr ich genau gleich, fügte jedoch statt 3,5 g Chlorid 5,2 g (= 3 Mol.) in Ätherlösung zu und schüttelte nach der Kondensation die saure Lösung 10mal mit Äther aus.

Es fanden sich in der sauren wässrigen Lösung

im 1. Fall noch 12,31 ccm n_{10} -NH₃ = 0,0172 g N

» 2. » » 12,51 » » = 0,0175 » »

Somit sind in Reaktion getreten 83,6 bzw. 82,4% des Gesamtstickstoffs.

¹⁾ Die Lösung gibt keine Biuretreaktion, also fehlen Albumosen und Peptone bestimmt.

terial war also mit den gewöhnlichen Hilfsmitteln nicht zu erreichen, und so gab ich denn, da die Lösung sehr große Mengen anorganischer Salze enthielt, weitere Versuche auf.

D. Salzsäureauszug.

Da sich die große Menge anorganischen Materials bei der Isolierung der für mich in Betracht kommenden organischen Substanzen als sehr störend erwiesen hatte, suchte ich die anorganischen Bestandteile erst zu entfernen. Zu diesem Zwecke schüttelte ich anfänglich die mit Äther und Alkohol erschöpften Rückstände solange mit konzentrierter HCl, bis diese nichts mehr aufnahm.¹⁾ Der Rückstand ist weiß und besteht aus beinahe vollständig reinem NaCl. Vergleicht man die Ergebnisse der Ausschüttelung mit konzentrierter HCl einerseits und mit reinem Wasser andererseits, so scheint zunächst alles zugunsten des ersteren Verfahrens zu sprechen.

Die mit Äther und Alkohol erschöpften Rückstände von 4 Serumpartien werden zerrieben und gut gemischt; von dieser Mischung werden genau 5 g mit Wasser und 5 g mit konzentrierter HCl geschüttelt, bis die Lösungsmittel nichts mehr aufnehmen; in den Lösungen wird der Gesamt-N-Gehalt nach Kjeldahl ermittelt, die Rückstände (in H₂O bzw. HCl Unlösliches) werden getrocknet und gewogen.

1,6395 g Substanz geben 9,40 ccm n_{10} -NH₃ = 0,01318 g N, somit enthalten 5 g Substanz 0,0402 g N.

Die Tabelle VI gibt die bei den beiden Analysen erhaltenen Zahlen wieder.

Tabelle VI.

	HCl-Auszug	H ₂ O-Auszug
ccm n_{10} -NH ₃	26,83	20,42
g N	0,0376	0,0286
In % des Gesamt-N	93	71
Gewicht des Rückstandes in g .	4,1	0,4
In %	82	8

¹⁾ «Direktes Verfahren».

Bei der Ausschüttelung mit konzentrierter HCl bleibt also der weitaus größte Teil der anorganischen Bestandteile (rund 82%) ungelöst, während gleichzeitig mehr N-haltige Bestandteile in Lösung gehen als mit reinem Wasser. Aber gerade dieser letzte Umstand ist einer der Gründe, die mich bewogen, von diesem Verfahren abzusehen; es zeigte sich nämlich, daß dieses Plus an N bedingt war dadurch, daß eiweißartige Substanzen, die beim Ausschütteln mit Wasser nicht gelöst wurden, bei Anwendung von konzentrierter HCl allmählich in Lösung gingen. Weiter hegte ich die Befürchtung, es könnte ein Teil eben dieser Eiweißkörper beim Stehen mit der konzentrierten HCl hydrolysiert werden. Mit dieser Möglichkeit mußte gerechnet werden, wenn auch zugegeben ist, daß die Wahrscheinlichkeit für die Hydrolyse nur gering war, sobald dafür gesorgt wurde, daß die Temperatur der Lösung möglichst nahe bei 0° lag.

Die Aufarbeitung geschah darum nach einem kombinierten Verfahren in folgender Weise.

Die mit Äther und Alkohol erschöpften Serumtrockenrückstände werden fein zerrieben und so lange mit stets wieder erneuertem kaltem Wasser geschüttelt, bis nichts mehr aufgenommen wird. Den in kaltem Wasser unlöslichen Teil — Eiweiß¹⁾ — kochte ich aus, bis auch heißes Wasser nichts mehr aufnahm. Dieser wässerige Auszug hat eine dunkelbraune Farbe;²⁾ er reagiert (gegen Lackmus) neutral; NH₄-Salze lassen sich mit Nessler's Reagens nicht nachweisen; Stoffe, die mit Bromlauge N entwickeln, sind nur in ganz geringer Menge vorhanden. Auf Zusatz von verdünnter HCl fällt aus der Lösung ein brauner flockiger Niederschlag, der wie der erste als Eiweißniederschlag sich charakterisieren ließ. Auch dieser Niederschlag wird durch Auskochen von wasserlöslichen Stoffen befreit. Filtrat und Waschflüssigkeit werden bei niedrigerer Temperatur (30°) auf dem Wasserbad eingeeengt, bis auf der Oberfläche der Flüssigkeit

¹⁾ Gibt die Biuret-, Xanthoproteinsäure-, Millon'sche und Schwefelbleireaktion.

²⁾ Die trockene Masse war vor dem Ausziehen mit Wasser von grauer Farbe mit einem Stich in Braun.

eine Krystallhaut sich bildet (Gesamtvolumen rund 1000 ccm); diese Lösung sättigt man mit gasförmigem Chlorwasserstoff, wobei man durch gute Kühlung (Kältemischung!) dafür sorgt; daß die Flüssigkeit sich nicht erwärmt. Die Temperatur war während der 4 Stunden, die diese Sättigung in Anspruch nahm, meist 6—8°; nur ein einzigesmal stieg die Temperatur — als der Gasstrom zu stark war und das Rühren unterbrochen wurde — für einen kurzen Augenblick auf 18°, um aber dann sofort eben so rasch wieder zu sinken. Der Niederschlag¹⁾ wird abgesaugt und das Filtrat (1100 ccm enthaltend 1,13 g N) sofort mit dem 4fachen Volumen Wasser verdünnt. Die Hauptmenge der HCl wird mittels frisch hergestellten Cu₂O²⁾ entfernt und das Gemenge von Cu₂Cl₂ und Cu₂O mit luftfreiem kochend heißen Wasser ausgewaschen, bis das Wasser vollkommen farblos abläuft.

I. Anorganischer Niederschlag.

Der beim Einleiten von Salzsäuregas in die wässrige Lösung entstehende Niederschlag ist bei Einhaltung des eben beschriebenen Verfahrens so gut wie vollkommen frei von organischen Bestandteilen. Arbeitet man jedoch nach dem weiter oben (S. 95) angedeuteten direkten Verfahren, so finden sich neben den anorganischen Bestandteilen (zur Hauptsache aus NaCl bestehend) geringe Mengen organische Substanz.

Diese organischen Stoffe (ihre Menge beträgt meist nur etwa 1 0/0) sind in kaltem Wasser zum größten Teil unlöslich

¹⁾ Ist vollkommen frei von organischen Substanzen.

²⁾ Zur Darstellung größerer Mengen Cu₂O erwies sich folgendes Verfahren als recht praktisch:

300 g CuSO₄ · 5 H₂O und 200 g Glukose werden in je 750 ccm Wasser gelöst. Man gießt die Lösungen zusammen und versetzt die Mischung in der Kälte solange mit verdünnter Natronlauge (D 1,04), bis die letzten Flocken Cu(OH)₂ sich eben lösen. Man stellt dann die Lösungen in größeren Rundkolben in Wasser von 65—70° (die Temperatur im Kolben stieg schließlich bis 42°). Nach etwa 2—3 Stunden ist die Reduktion beendet und hat sich der Niederschlag abgesetzt. Man gießt die braune Lösung ab, bringt den Niederschlag auf die Nutsche und wäscht ihn alkalifrei. In ganz kurzer Zeit lassen sich auf diesem Wege auch größere Mengen Cu₂O sehr leicht und sicher herstellen.

und lassen sich somit sehr leicht vom NaCl trennen. Die Hauptmenge besteht nach Aussehen, Löslichkeit und Reaktion zu schließen aus eiweißartigen Stoffen.

Nach den Angaben von Mittelbach¹⁾ läßt sich im Harn verschiedener Säugetiere (Pferd, Rind) Harnsäure nachweisen und es war deshalb das Vorkommen dieser Verbindung im Blut dieser Tiere wohl denkbar. Da Harnsäure in konzentrierter HCl vollkommen unlöslich ist, so mußte sie in unserem Falle, wenn sie nicht eben nur in Spuren vorhanden war und nicht vielleicht bei dem Vorhandensein größerer Quantitäten, die beigemengten organischen Stoffe ihre Löslichkeit außerordentlich erhöhten,²⁾ neben dem NaCl sich vorfinden. Untersucht wurde ein geringe Mengen (1,2%) organischer Stoffe enthaltender Niederschlag, der aus 30 l Serum stammte; das Volumen des HCl-Auszugs betrug 660 ccm — war also verhältnismäßig klein. Der Rückstand (NaCl + organischem Material) wird mit etwa einem Liter kaltem Wasser geschüttelt, die Lösung filtriert und das im Wasser Unlösliche auf Ton getrocknet; die Lösung bleibt auf Zusatz von Magnesia-Silbermischung (nach Salkowski-Ludwig) auch bei längerem Stehen vollkommen klar; der in Wasser unlösliche Teil gab die Murexidreaktion nicht; Harnsäure ist also in diesem Teil sicher nicht enthalten.

II. Kupferchlorürniederschlag.

Das Gemenge von Cu_2Cl_2 und Cu_2O enthält, gleichgültig, ob es aus einem nach dem direkten oder nach dem indirekten Verfahren hergestellten Auszug stammt, stets einen großen Teil des N in einer Form, die auch in heißem Wasser nicht oder jedenfalls nur sehr schwer löslich ist. Die nebenstehende kleine Tabelle VII gibt die bei 2 Aufarbeitungen erhaltenen Zahlen wieder.

Im ersten Falle finden sich somit 55,8%, im zweiten 51,2% des anfänglich in der Lösung vorhandenen N im Nieder-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XII, S. 463.

²⁾ Harnsäure löst sich nach His und Paul (Diese Zeitschrift, Bd. XXXI, S. 1) in reinem Wasser wie 1 : 39500; nach Taylor ist die Löslichkeit im Serum wie 1 : 1000 (Journal of Biol. Chem., Bd. I, S. 177).

schlag, aus welchem auch bei sorgfältigem Auswaschen nur geringe Mengen N-haltiger Substanzen sich abtrennen lassen; bei der zweiten auf Tabelle VII verzeichneten Aufarbeitung

Tabelle VII.

	Menge des Auszugs ccm	Zur Analyse verwendet ccm	Gefunden ccm $n/10\text{-NH}_3$	Ge- samt-N g	Serum- Menge l
a) Indirektes Verfahren					
Vor der Fällung .	600	30	34,36	0,915	25
Nach » » .	1000	30	8,70	0,405 ¹⁾	
b) Direktes Verfahren					
Vor der Fällung .	660	20	16,90	0,758	30
Nach » » .	550	25	12,00	0,370 ¹⁾	

wurden nach 10 maligem Auswaschen des Niederschlags mit je 100 ccm kochend heißem Wasser die letzten 500 ccm bei saurer Reaktion eingeeengt und in dieser Lösung der N bestimmt.

Es finden sich 2,40 ccm $n/10$ NH_3 0,00336 g N, d. h. nicht einmal der 100. Teil des im Niederschlag sich findenden Stickstoffs.

Die Aufarbeitung des Cu_2Cl_2 -Niederschlags zur Isolierung der N-haltigen Bestandteile geschah darum in folgender Weise.

In die Aufschwemmung des Cu_2Cl_2 in Wasser leitet man unter kräftigem Rühren einen Sauerstoffstrom und setzt von Zeit zu Zeit verdünnte HCl zu: allmählich geht der Niederschlag bis auf einen kleinen Rückstand in Lösung; dieser Rückstand ist saurer Natur; er löst sich in verdünnter Natronlauge spielend leicht; diese Lösung gibt eine allerdings schwache rotviolette Biuretreaktion; es liegt also wohl eine pepton- oder albumoseartige Substanz vor.

Die salzsaure Cu-Salzlösung gibt bei allmählichem Einengen bis zur Trockene 5 Krystallfraktionen; die erste wurde,

¹⁾ Berechnet für 1000 bzw. 550 ccm, während die oberen Zahlen für 570 bzw. 640 ccm berechnet sind.

da sie offenbar reines CuCl_2 war, nicht weiter untersucht; in Fraktion 2 und 3 wurde, ohne daß eine weitere Reinigung der Fraktionen vorgenommen worden war, das Verhältnis von $\text{Cu} : \text{Cl}$ bestimmt. Es ergab sich

für Fraktion 2 das Verhältnis 1 : 1,996
 » » 3 » » 1 : 2,020

Somit waren auch diese Fraktionen reines CuCl_2 ; die Fraktionen 4 und 5 wurden mit Alkohol ausgekocht; dabei bleibt eine geringe Quantität eines organischen N-freien Rückstandes; die Lösungen werden mit viel Wasser versetzt und die hierbei ausfallenden Niederschläge abfiltriert. (Aufarbeitung siehe folgende Seite.)

Nach Entfernung dieser Bestandteile wurde auch in diesen beiden Fraktionen das Verhältnis von $\text{Cu} : \text{Cl}$ bestimmt.

Für Fraktion 4 wurde gefunden: 1 : 2,008
 » » 5 » » : 1 : 2,067

Fraktion 4 war demnach reines CuCl_2 , während in Fraktion 5 sich noch fremde Beimengungen fanden. Man entfernt aus der Lösung das Cu durch H_2S und engt das Filtrat erst auf dem Wasserbad und dann im Vakuum über H_2SO_4 und festem Ätzkali bis zur Trockene ein; der Rückstand wird mit viel kaltem Alkohol ausgezogen; der weitaus größte Teil geht in Lösung; das in Alkohol Unlösliche besteht aus mindestens 2 Substanzen, von denen die eine, in Wasser sehr leicht lösliche, anorganisch ist; beide Teile konnten nicht näher untersucht werden.

Die alkoholische Lösung wird verdunstet, der Rückstand in wenig Wasser gelöst und diese Lösung mit frisch gefälltem sorgfältig ausgewaschenen $\text{Cu}(\text{OH})_2$ geschüttelt, bis nichts mehr aufgenommen wird. Dabei scheidet sich ein geringes Quantum organischer Substanz von brauner Farbe, mit Eiweißreaktionen ab.

Die grüne Cu -Salzlösung wird zur Trockene gebracht und der trockene Rückstand mit Alkohol ausgekocht, bis dieser nichts mehr aufnimmt; die Lösung enthält, wie eine Prüfung durch Verdunsten eines kleinen Teils der Lösung ergab, nur CuCl_2 ; der im Alkohol unlösliche Rückstand besteht aus einem organischen

N-haltigen Cu-Salz, das zusammen mit dem oben erwähnten und dem unten zu besprechenden Cu-Salz aufgearbeitet wird.

III. Filtrat vom Kupferchlorürniederschlag.

Das Filtrat vom Cu_2Cl_2 -Niederschlag wird samt den Waschwässern auf dem Wasserbad unter vermindertem Druck eingeeengt; dabei scheidet sich ein graugrünes Cu-Salzgemenge¹⁾ aus.²⁾

1. Die Kupferniederschläge sind in Wasser und organischen Lösungsmitteln (Alkohol, Äther, Aceton, Benzol) vollkommen unlöslich; dagegen lösen sie sich ziemlich leicht in NH_3 und in verdünnten Säuren. Man schwemmt in H_2O auf, entfernt das Cu durch H_2S und engt das Filtrat vom CuS erst auf dem Wasserbad und schließlich bei gewöhnlicher Temperatur im Vakuum über H_2SO_4 ein; man erhält so einen auch bei längerem Stehen nicht fest werdenden braungelben Sirup, aus dem weder durch

1) Bei einer zweiten Aufarbeitung waren Filtrat und Waschflüssigkeiten je für sich eingeeengt worden. Aus dem Filtrat schied sich das im folgenden zu beschreibende Cu-Salz ab, während aus dem Waschwasser beim Einengen eine braune Substanz saurer Natur erhalten wurde. Man löst in Natronlauge, säuert mit Essigsäure an, zersetzt die heiße Lösung mit Bleiacetat im Überschuß, filtriert den braunen Niederschlag ab, wäscht ihn aus und trocknet ihn im Vakuum über H_2SO_4 . Die Analyse ergab folgende Zahlen:

0,1408 g geben 0,0577 g CO_2 und 0,0225 g H_2O
 0,1639 » » 2,6 ccm N bei 14° und 742,5 mm
 0,1349 » » 0,1226 g PbSO_4

Gefunden: C = 11,17%
 H = 1,79%
 N = 1,81%
 Pb = 62,10%

Für eine Verbindung von Zusammensetzung

$\text{C}_{22}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_{33}\text{Pb}_7$ (?!) oder $\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_{28}\text{Pb}_7 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ (?)

verlangt die Theorie:

C = 11,37%
 H = 1,69%
 N = 1,82%
 Pb = 62,37%

2) Hierzu bringt man die beiden Cu-Salze von voriger Seite.

Lösungsmittel noch durch die gebräuchlichen Fällungsmittel etwas Greifbares zu erhalten ist. Dagegen ist bei Anwendung von Cu-Acetat eine Zerlegung des vorliegenden Gemenges möglich. Man fügt daher der Lösung des Sirups in wenig Wasser einige Kubikzentimeter einer kalt gesättigten mit etwas Essigsäure versetzten Cu-Acetatlösung zu; hierdurch erreicht man die Ausscheidung einer geringen Menge eines graubraunen N-haltigen Niederschlags, in welchem sich außerdem noch S, P und Fe nachweisen lassen; ob der Niederschlag einheitlich ist oder nicht, habe ich nicht entscheiden können, da im ganzen nur 0,35 g erhalten wurden.

Die vakuumtrockene Substanz gab bei der Analyse folgende Zahlen:

0,1016 g geben 0,0485 g CO_2 ; 0,0251 g H_2O ; 0,0606 g Rückstand
 0,1309 » » 1,95 ccm N bei $16,5^\circ$ und 721 mm

Gefunden: C = 13,02%
 H = 2,76%
 N = 1,63%
 Asche = 59,64%

Die Bestimmung der übrigen Bestandteile mußte, da mir für diesen Zweck nur noch 0,09 g zur Verfügung gewesen wären, unterbleiben.

Im Filtrat der eben beschriebenen Substanz entsteht auf Zusatz von wenig NaOH — die Lösung muß nach Zugabe der NaOH noch stark sauer reagieren — ein grüner Niederschlag, den ich durch wiederholtes Lösen in NH_3 und Ausfällen durch HCl zu reinigen suchte. Die Cu-Verbindung ist in reinem Wasser vollkommen unlöslich, löst sich dagegen ziemlich leicht in verdünnten Säuren und — auffallenderweise — auch in NaOH, ohne daß eine Abscheidung von $\text{Cu}(\text{OH})_2$ eintritt. Die Lösung in NaOH verändert sich auch beim Kochen nicht.

Der bei 105° getrocknete Niederschlag gibt folgende Analysenzahlen:

- I. 0,1403 g geben 0,0504 g CO_2 und 0,0275 g H_2O
- II. 0,0338 » » 0,0159 » CuO
- III. 0,1750 » » 3,15 ccm n_{10} - NH_3 ; 0,0441 g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$
- IV. 0,1790 » » 4,85 ccm N bei 18° und 732 mm

Gefunden:	I.	II.	III.	IV.
C =	7,79%	—	—	—
H =	2,19%	—	—	—
N =	—	—	2,53% (?)	2,98%
P =	—	—	7,17%	—
Cu =	—	37,58%	—	—

Die Cu-Verbindung enthielt außerdem noch Cl; leider aber reichte das mir zur Verfügung stehende Material zu weiteren Analysen nicht aus und der Versuch, eine Formel für die Verbindung — sofern das analysierte Material überhaupt einheitlich ist, wofür sichere Kriterien fehlen — muß sehr gewagt erscheinen. Unter der Annahme, daß eine CuCl_2 -Doppelverbindung vorliegt, würden die Zahlen für eine Verbindung $\text{C}_4\text{H}_{12}\text{NPO}_5\text{Cu} \cdot 2\text{CuCl}_2$ sprechen; für eine Verbindung dieser Zusammensetzung verlangt die Theorie.

C =	9,65%
H =	2,41%
N =	2,81%
P =	6,2%
Cu =	38,4%

Die für P und Cu gefundenen Werte weichen allerdings von den berechneten ziemlich erheblich ab; es konnten aber auch für die Bestimmung dieser Elemente nur ganz geringe Substanzmengen zur Verwendung kommen; der für P gefundene Wert ist sicher zu hoch, da das $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$, wie eine Prüfung nach der Wägung des Niederschlags ergab, noch etwas MoO_3 enthielt, das trotz sorgfältigen Auswaschens nicht hatte entfernt werden können.

Aus dem Filtrat dieser P-haltigen Substanz ist etwas Brauchbares nicht mehr zu erhalten; es finden sich in ihm noch geringe Mengen organischen Materials, das aber N-frei zu sein scheint.

2. Filtrat der Kuperverbindungen (S. 101).

Das Filtrat der oben beschriebenen Cu-Verbindungen wird zum Sirup eingeeengt; man übergießt diesen Sirup mit Alkohol und kocht die hierbei allmählich krümelig werdende Masse so oft mit Alkohol aus, bis dieser nichts mehr aufnimmt. Die vereinigten alkoholischen Lösungen läßt man über Nacht stehen

und bringt die hierbei sich bildende graugrüne Ausscheidung zu den in Alkohol unlöslichen Teilen. Diese letzteren kocht man dann mit Wasser aus, bis auch dieses nichts mehr löst, engt die hierbei erhaltene Lösung ein und bringt die Mutterlauge der beim allmählichen Einengen sich ausscheidenden 3 Fraktionen anorganischer Cu-Salze, da sich in ihr nur ganz geringe Mengen organischer Stoffe mehr fanden und eine getrennte Verarbeitung deshalb aussichtslos erschien, zu der alkoholischen Lösung. Die in Alkohol und in Wasser unlöslichen Rückstände, deren Menge allerdings ziemlich gering ist, lösen sich teilweise in NH_3 ; das in NH_3 Unlösliche ist anorganisch und besteht aus CuSO_4 . Die ammoniakalische Lösung versetzt man mit Bleiacetat, bis ein weiterer Zusatz keine sofortige Fällung mehr zur Folge hat; die Fällung, die alle organischen Bestandteile der ammoniakalischen Lösung enthält, wird nach dem Waschen in Wasser aufgeschwemmt und durch H_2S zersetzt, das PbS wird abfiltriert mit essigsäurehaltigem Wasser ausgewaschen; das Filtrat engt man ein; auf Zusatz von Bleiacetat zu dieser schwach essigsäuren Lösung entsteht eine geringfügige Fällung, die nicht mehr weiter untersucht werden konnte; das Filtrat dieser Fällung gibt nach Entfernung des Bleis beim Einengen geringe Mengen eines in Alkohol teilweise löslichen Rückstandes; der in Alkohol lösliche Teil ist organisch, aber N-frei; er scheidet sich beim Verdunsten des Alkohols in schwach bräunlich gefärbten Nadeln aus und schmilzt bei $92/93^\circ$; eine weitere Untersuchung war unmöglich, ebenso mußte auch eine nähere Prüfung des in Alkohol unlöslichen Teiles unterbleiben.

Aus der alkoholischen Lösung der Kupfersalze (S. 103) entfernt man durch H_2S das Cu, wäscht das CuS erst mit Alkohol und dann wiederholt mit heißem Wasser aus und engt schließlich Filtrat und Waschflüssigkeit ein. Die auf diesem Wege erhaltene Lösung besitzt einen charakteristischen, an Fleischextrakt erinnernden Geruch; sie gibt Fällungen mit PWS und $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$, mit Bleiessig (neutrales Bleiacetat gibt nur eine schwache Trübung) und mit Nessler's Reagens;¹⁾ der auf

¹⁾ Der auf Zugabe von Nessler's Reagens entstehende Niederschlag ist anfangs gelbrot, nimmt aber sehr rasch eine schmutzig graue Farbe an.

Zusatz von H_2PtCl_6 beim Stehen allmählich sich ausscheidende Niederschlag ist ein Gemenge von K_2PtCl_6 und $(\text{NH}_4)_2\text{PtCl}_6$,¹⁾ alle übrigen Fällungsmittel (Pikrinsäure, Phosphormolybdänsäure, Kaliumwismutjodid, Silbernitrat und Ammoniak, Sublimat und Jodjodkalium) geben keine Niederschläge. Vor der weiteren Verarbeitung empfiehlt es sich, die stark eingeengte Lösung in Alkohol einfließen zu lassen und den hierbei entstehenden Niederschlag, der in der Hauptsache anorganisch ist, aber auch organische, jedoch N-freie Anteile enthält, abzutrennen, den Alkohol auf dem Wasserbad bei niedrigerer Temperatur zu verjagen und den Rückstand wieder in Wasser aufzunehmen.

Diese Lösung versetzt man mit Bleiessig, bis ein weiterer Zusatz keine Fällung mehr zur Folge hat. Man läßt den Niederschlag absitzen, gießt die überstehende Flüssigkeit ab, dekantiert einige Male mit Wasser und wäscht den Niederschlag schließlich auf der Nutsche aus.²⁾ Hierauf schwemmt man den Niederschlag in Wasser auf, entfernt durch H_2S das Pb und engt das Filtrat vom PbS zusammen mit den Waschwässern bei niedrigerer Temperatur auf dem Wasserbad ein; die Flüssigkeit reduziert CuO in alkalischer Lösung, Nessler's Reagens gibt einen grauschwarzen, zum Teil jedenfalls aus Hg-Metall bestehenden Niederschlag; PWS gibt eine weiße Fällung, die im Überschuß des Fällungsmittels sich teilweise löst. Von den N-haltigen Bestandteilen der ursprünglichen Lösung geht in den Bleiessigniederschlag nur eine kleine Quantität ein; in einer

¹⁾ Bei aller Vorsicht ist eine teilweise Zerstörung N-haltiger Moleküle nie ganz zu vermeiden.

²⁾ In einzelnen Fällen ließ sich der Bleiessigniederschlag durch Schlämmen in einen spezifisch leichteren und einen spezifisch schwereren Anteil zerlegen; der letztere war gelbbraun gefärbt und erinnerte in seinem Aussehen unter dem Mikroskop an erstarrte Fetttröpfchen. Ob das Auftreten dieses schwereren Anteils an die Einhaltung bestimmter Bedingungen bei der Fällung geknüpft ist — unter anscheinend ganz gleichen Bedingungen war seine Menge das eine Mal verhältnismäßig sehr groß, das andere Mal sehr klein — oder ob, was wahrscheinlicher ist, seine Bildung von dem Vorhandensein einer bestimmten Verbindung in der zu fällenden Lösung abhängig ist, wurde nicht näher untersucht, da die mir zur Verfügung stehenden Quantitäten eine getrennte Verarbeitung nicht zweckmäßig erscheinen ließen.

Lösung, die aus 30 l Serum erhalten worden war (Tabelle 7, b), fanden sich vor der Fällung 0,370 g N; im Bleiessigniederschlag waren 0,061 g N enthalten.

Die Isolierung der durch Bleiessig gefällten Substanzen wurde auf verschiedenen Wegen versucht. Bei der Aufarbeitung mit PWS zeigte es sich, daß mindestens zwei N-haltige Bestandteile in der Lösung enthalten sein mußten; der eine, in den PWS-Niederschlag eingehende war NH_3 ; ob sich daneben noch anderes N-haltiges Material fand, habe ich nicht entscheiden können; der andere fand sich im Filtrat des PWS-Niederschlags; ich habe jedoch nur wenige Zentigramme einer braunen S- und N-haltigen Substanz mit sauren Eigenschaften erhalten, auf deren weitere Untersuchung ich der geringen Menge wegen verzichten mußte. Dieses negative Resultat ließ das eingeschlagene Verfahren als unzweckmäßig erscheinen und das um so mehr, als es sich zeigte, daß das Reduktionsvermögen der Lösung sehr stark zurückgegangen war, ohne daß jedoch Teile der reduzierenden Substanz in einem der Niederschläge sich hätten nachweisen lassen.

Bei einer späteren Aufarbeitung brachte ich die aus der Bleiessigfällung resultierende Lösung zur Trockene und suchte den Rückstand durch Anwendung geeigneter Lösungsmittel in seine einzelnen Bestandteile zu zerlegen; jedoch ohne praktischen Erfolg: ein Teil der reduzierenden Substanz löste sich zwar in Alkohol, aber auch der Rückstand zeigte noch deutliches Reduktionsvermögen und Lösung sowohl wie Ungelöstes ließen sich nicht mehr weiter zerlegen.

Ich verzichtete daher auf die Isolierung dieser durch Bleiessig fällbaren N-haltigen Bestandteile und suchte wenigstens die Natur der reduzierenden Substanz zu ergründen. Die Fällbarkeit durch Bleiessig und eine schwache Orcin- und Phloroglucinsalzsäurereaktion ließen auf das Vorhandensein von Glykuronsäure, deren Vorkommen im normalen Blut durch die Arbeiten von Mayer¹⁾ und von Lépine und Boulud²⁾ erwiesen

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXII, S. 518.

²⁾ C. r. de l'Acad. des Sc., Bd. CXXXIII, S. 138; Bd. CXXXVIII, S. 136; Bd. CXXLI, S. 175/77.

ist, schließen. Bei dem Versuch, ein Kondensationsprodukt mit Phenylhydrazin herzustellen, gelang denn auch die Isolierung einer geringen Menge, nach dem Umkrystallisieren aus Alkohol bei $159\text{--}60^\circ$ — bei raschem Erhitzen — schmelzenden Substanz; die als Glykuronsäurephenylhydrazon, das nach Mayer¹⁾ bei $159\text{--}64^\circ$, nach Giemsa²⁾ bei 160° schmilzt, anzusprechen sein dürfte.

Es wäre wohl zweckmäßiger gewesen, die Lösung erst einige Zeit mit Weinsäure auf 120° zu erhitzen,³⁾ um die Zerlegung einer eventuell vorhandenen gepaarten Glykuronsäure zu erreichen; ich hatte dies unterlassen, weil ich bei einer Probe, die mit wenig verdünnter Salzsäure gekocht worden war, eine Zunahme des Reduktionsvermögens gegenüber einer nicht mit HCl gekochten Probe nicht hatte feststellen können. Das Gleichbleiben des Reduktionsvermögens war vielleicht nur ein scheinbares; da Glykuronsäure, wovon ich mich erst nach Ausführung der hier beschriebenen Versuche hatte überzeugen können, gegen Mineralsäuren ziemlich empfindlich ist, ist es wohl denkbar, daß eine hydrolytische Spaltung und damit erst eine Vermehrung der freien Glykuronsäure eingetreten ist, daß aber im selben Maße auch eine Zersetzung stattgefunden hat.

Das Filtrat vom Bleiessigniederschlag zeigt nach der Entfernung des Pb durch H_2S ebenfalls Reduktionsvermögen; auch das Verhalten gegen Fällungsmittel ist das gleiche wie beim Bleiessigniederschlag. Die auf Zusatz von PWS zu der Lösung auftretende Fällung enthält neben den PWS-Verbindungen von K und NH_4 nur so geringe Mengen organischen Materials, daß der Versuch, mit Hilfe dieses Reagens eine Zerlegung des Gemenges zu erreichen, zwecklos erscheinen mußte. Die Anwendung von Nessler's Reagens für diesen Zweck war ausgeschlossen, weil die durch dieses Reagens in der Lösung bewirkten Veränderungen sich einer Kontrolle entzogen. Nach einer Reihe ziemlich ergebnisloser Versuche, aus denen u. a.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXII, S. 518.

²⁾ Ber., Bd. XXXIII, S. 2996.

³⁾ C. r., Bd. CXXXVI (Lépine u. Boulud).

auch die Unbrauchbarkeit von $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ ¹⁾ für meine Zwecke sich entnehmen ließ, fand ich es als das Zweckmäßigste, die stark eingeeengte Lösung in Alkohol einfließen zu lassen und die alkoholische Lösung — der Niederschlag enthält nur anorganisches und N-freies organisches Material — weiterzuverarbeiten. Verschiedene Anzeichen, N-Abspaltung durch Bromlauge, Reduktion von HgO , Bildung eines Niederschlags auf Zusatz von $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ zu der Lösung, die von anderen organischen Bestandteilen, so gut es ging, befreit war, deuteten auf das Vorhandensein von Kreatin oder Kreatinin; die alkoholisch-wässrige Lösung wird zur Entfernung des Alkohols eingeeengt und diese Lösung einige Zeit mit wenig verdünnter H_2SO_4 gekocht; das Filtrat vom BaSO_4 und BaCO_3 gab mit Nitroprussidnatrium die Reaktion auf Kreatinin: mit wenig NaOH entsteht eine rubinrote Färbung, die sehr rasch in gelb übergeht; auch gelang die Isolierung der für Kreatinin charakteristischen Chlorzinkdoppelverbindung; sie schied sich bei einigem Stehen der Lösung in Form strahliger Gruppen feiner Nadeln, allerdings in einer zur Analyse nicht hinreichenden Menge nur, ab.

Das Reduktionsvermögen des Filtrats vom Bleiessigniederschlag ist zum Teil bedingt durch die Gegenwart von Kreatin; es muß aber in der Lösung noch eine zweite reduzierende Substanz vorhanden sein, vielleicht Reste der Glykuronsäure oder auch Glukose, denn beim Erwärmen einer Probe mit Fehlingscher Lösung wird nach ganz kurzer Zeit Cu_2O abgeschieden; wäre nur Kreatin vorhanden, so dürfte diese Ausscheidung erst nach längerem Kochen eintreten.

Zusammenfassung.

Der Gang der Untersuchung ist in kurzen Zügen folgender:

Aus dem Serum werden durch Alkohol die Eiweißstoffe entfernt; der Eiweißniederschlag wird abfiltriert und mit Al-

¹⁾ Die Fällung mit $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ erschien unzweckmäßig, vor allem weil Niederschlag und Filtrat nach der Entfernung des Hg Nitrate enthielten, die nicht entfernt werden konnten, ohne daß gleichzeitig ein großer Teil des N-haltigen Materials unter NH_3 -Abspaltung verloren ging.

kohol und Äther ausgezogen. Filtrat und Waschflüssigkeiten werden zusammen im Vakuum zur Trockene eingedampft. Der Trockenrückstand wird der Reihe nach mit Petroläther (Äther), Alkohol und Wasser ausgezogen, wobei schließlich bis auf einen kleinen Eiweißrest alles wieder in Lösung geht.

Die Zerlegung des in Petroläther (oder Äther) löslichen Gemenges geschah nach 2 verschiedenen Methoden.

Verseift man den beim Verdunsten des Petroläthers bleibenden Rückstand und zieht man die Seifen mit Äther aus, so erhält man neben dem typischen Cholesterin, dessen Vorkommen im Blut ja schon lange bekannt ist und für das nun endgültig wohl die Formel $C_{27}H_{46}O$ anzunehmen sein dürfte, geringe Mengen anderer cholesterinartiger Stoffe.

In dem Seifengemenge finden sich neben Cholin, welches außer in Form von Cholinplatinchlorid und der schon lange bekannten $HgCl_2$ -Doppelverbindung $C_5H_{14}NOCl \cdot 6HgCl_2$ auch noch in Gestalt zweier weiterer $HgCl_2$ -Doppelverbindungen unbekannter Zusammensetzung erhalten werden konnte, und neben den Natriumsalzen der gewöhnlichen Fettsäuren, die wie das Cholin¹⁾ zum größten Teil aus verseiftem Lecithin stammen, noch die Natriumsalze zweier weiterer Säuren.

Die zweibasische Säure $C_{39}H_{59}NO_9$, die in Form ihres Bleisalzes isoliert werden konnte, ist bisher im Serum noch nicht nachgewiesen worden. Über ihre Konstitution und ihre Zugehörigkeit zu einer bestimmten Gruppe N-haltiger Verbindungen müssen spätere Untersuchungen Klarheit schaffen. Sie ist zweifellos als ein primärer Bestandteil des Serums aufzufassen, was ich von der zweiten Säure, für welche ich die Formel $C_{19}H_{36}N_4O_{30}Ag_{12}$ aufgestellt habe, ohne jedoch die Unwahrscheinlichkeit, ja geradezu Unmöglichkeit einer solchen Formel zu verkennen, nicht behaupten möchte.

Bei der zweiten Methode vermied ich das Verseifen und zerlegte das Gemenge durch sukzessive Behandlung mit verschiedenen Lösungsmitteln. Dabei konnte ich zunächst den

¹⁾ Ein Teil des Cholins stammt aus dem Jecorin; frei ist es im Serum sicher nicht enthalten.

Beweis erbringen, daß Cholesterin nicht nur in Form seiner Ester, sondern auch frei oder jedenfalls lockerer gebunden als in den Estern im Serum sich findet.

Weiter haben sich neben Lecithin noch 2 jecorinartige Substanzen, beide kräftiges Reduktionsvermögen aufweisend, für welche ich jedoch eine Formel noch nicht aufstellen möchte, nachweisen lassen.

Bemerkenswert ist vielleicht, das mag bei dieser Gelegenheit hervorgehoben werden, daß für das Vorkommen von echten Fetten, in wesentlichen Quantitäten wenigstens, neben diesen Stoffen, welche ja beide — Lecithin und Jecorin — die Bestandteile der Fette enthalten, Anzeichen sich nicht haben finden lassen.

Von reduzierenden Stoffen kohlehydratartiger Natur sind bis jetzt im Serum mit Sicherheit nur Glukose und Glykuronsäure — das Vorhandensein der letzteren habe ich im Wasserauszug auf Grund der Orcin- und Phloroglucin-HCl-Reaktion und der Isolierung eines Hydrazons feststellen können — nachgewiesen worden; der von mir isolierten N-haltigen reduzierenden Substanz liegt zweifellos auch ein kohlehydratartiger Komplex zugrunde.

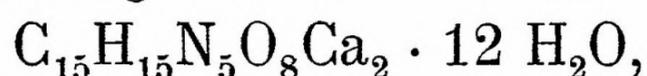
Die im Alkoholauszug enthaltenen Stoffe lassen sich durch Ansäuern des Auszugs und Ausschütteln dieser sauren Lösung mit Äther in 2 Gruppen teilen.

Aus der Ätherlösung haben sich 2 bisher unbekannte hochmolekulare stickstoffhaltige Säuren in Form ihrer Ag-Salze isolieren lassen. Die eine $C_{51}H_{129}NO_{10}H_5$ ist 5-basisch, die andere $C_{68}H_{105}NO_8H_4$ 4-basisch, wie aus der Untersuchung der Ag-Salze zu entnehmen ist. Als einheitlich sind diese Verbindungen wohl sicher aufzufassen, wenn vielleicht auch die von mir aufgestellten Formeln bei einer späteren Nachprüfung an wesentlich größeren Substanzmengen, als sie mir zur Verfügung standen, eine kleine Berichtigung erfahren dürften. Welcher größeren Gruppe N-haltiger Verbindungen sie angehören, muß dahingestellt bleiben; nur soviel ist gewiß — es folgte dies aus der Löslichkeit der Säuren in Äther —, daß sie peptonartiger Natur nicht sein können — man müßte denn

diesen Begriff weiter fassen, als dies bis jetzt der Fall ist. Neben diesen N-haltigen Säuren findet sich auch noch eine N-freie Säure unbekannter Zugehörigkeit, deren Silbersalz die Formel $C_{39}H_{70}O_5Ag_2$ zukommt.

Im sauren wässerigen Teil des Alkoholauszugs findet sich als wesentlichster Bestandteil der N-haltigen Substanzen Harnstoff — (gegen 85% des in diesem Teil sich findenden Stickstoffs sind in dieser Form vorhanden).

Daneben findet sich noch Cholin — das zweifellos aus Lecithin, das beim Eindampfen der Lösung sich zersetzte, stammt — und eine Verbindung von der Zusammensetzung



die besonderes Interesse deshalb beansprucht, weil sie trotz ihres Ca-Gehaltes durch Kochen mit Na_2CO_3 nicht verändert wird.

Die Zahl der im Äther und Alkoholauszug überhaupt vorhandenen Stoffe dürfte mit den aufgezählten Verbindungen erschöpft sein, soweit natürlich N-haltige Substanzen in Betracht kommen.

Anders liegen die Verhältnisse beim Wasser- (Salzsäure-)Auszug.

Von wohldefinierten N-haltigen Verbindungen habe ich nur Kreatin nachweisen können, ohne jedoch den qualitativen Befund durch eine Analyse stützen zu können. Ein Teil des N findet sich in dieser Lösung als Bestandteil von Verbindungen, die nicht mehr eiweißartiger Natur (Peptone oder Albumosen), aber auch noch nicht zu den einfachsten krystallisierten Eiweißbausteinen zu zählen sind. Die « $CuCl_2$ -Doppelverbindung» $C_4H_{12}NPO_5 \cdot 2 CuCl_2$ (?), ferner die «Verbindung», die dem Pb-Salz $C_{22}H_{39}N_3O_{28}Pb_7$ (!) zugrunde liegt, sind hierher zu rechnen und vielleicht auch die Substanz, in der sich neben N noch P, S und Fe haben nachweisen lassen.

Ganz kleine Mengen wohl ebenfalls hierher gehöriger Substanzen sind mir entgangen, da alle gebräuchlichen Isolierungsmethoden versagten.

Das eingehende Studium der beim Abbau von Eiweißstoffen durch Fermente entstehenden niedermolekularen N-halti-

gen Produkte wird uns wohl im Lauf der Zeit Methoden an die Hand geben, welche die Isolierung und Identifizierung auch dieser letzten nur geringfügigen Reste ermöglichen.

Neben diesen Resultaten ist weiter noch beachtenswert der Nachweis, daß die einfachsten Eiweißbausteine, Monoamino- und Diaminosäuren (Arginin, Lysin und Histidin), im Serum fehlen und daß auch die Begleiter der Harnsäure im Harn, die Xanthinbasen, sich so wenig als die Harnsäure selber im Serum finden.

