

# **Untersuchungen über den Gehalt der Blutplasmaproteine an basischen Bestandteilen.<sup>1)</sup>**

Von

**Karl Lock und Karl Thomas.**

---

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen.)

(Der Redaktion zugegangen am 21. Juli 1913.)

---

Zu den wichtigsten tierischen Eiweißstoffen, deren Hexonbasen noch nicht bestimmt worden sind, gehören die Blutplasmaproteine, Serumalbumin und Fibrinogen (Fibrin). Für den dritten Plasmaeiweißstoff, das Serumglobulin, liegen Angaben vor und zwar aus dem Laboratorium von Skraup; doch stimmen die erhaltenen Werte nur für eine der Basen überein, für die beiden anderen weichen sie sehr voneinander ab. Für 100 g getrocknetes Globulin fand Lampel<sup>2)</sup> 3,4 g Histidin, 2,9 g Arginin, 4,2 g Lysin, während Lampel und Skraup<sup>3)</sup> für die gleiche Menge Globulin 1,7 g Histidin, 3,7 g Arginin, 4,3 g Lysin erhielten.<sup>4)</sup> Zudem findet sich in keiner der beiden Arbeiten eine Bemerkung darüber, wie das Globulin gewonnen worden ist, so daß man sich kein Urteil über die Reinheit des Materials bilden kann, besonders auch darüber

---

<sup>1)</sup> Ausführliche Darstellung mit genauer Angabe der einzelnen Untersuchungsergebnisse, s. Karl Lock, Diss. rer. nat., Tübingen 1913.

<sup>2)</sup> Monatsh. f. Chemie, Bd. 28, S. 625 (1907).

<sup>3)</sup> Monatsh. f. Chemie, Bd. 30, S. 363 (1909).

<sup>4)</sup> Lampel und Skraup geben an, daß mehrere Bestimmungen übereinstimmende Resultate ergeben hätten, doch teilen sie nur die Resultate einer Analyse mit.

nicht, inwieweit eine Verunreinigung mit Albumin auszuschließen ist.

Im folgenden teilen wir die Ergebnisse unserer Untersuchungen über den Gehalt der Bluteiweißstoffe des Pferdes an Diaminosäuren mit. Die Notwendigkeit, die Bestimmung auch auf das Serumglobulin trotz der schon vorliegenden Angaben auszudehnen, geht aus dem eben Gesagten hervor. Es kam aber noch ein anderes Moment hinzu, welches uns bestimmte, uns auch mit dem Globulin zu beschäftigen. Die Frage nach der Einheitlichkeit des Serumglobulins ist immer noch eine offene. Die Annahme, daß es sich um ein Gemenge handelt, gründet sich darauf, daß es durch Fällung mit Salzen in einzelne Teile zerlegt werden kann und daß diese wieder zum Teil in Wasser löslich, zum Teil in Wasser unlöslich sind. Andererseits aber zeigen die auf Grund verschiedener Fällbarkeit und verschiedener Löslichkeit erhaltenen Fraktionen dieselbe Zusammensetzung, dasselbe Lichtbrechungsvermögen, ungefähr dieselbe Gerinnungstemperatur und dieselbe spezifische Drehung. Bei dieser Sachlage schien es angezeigt zu versuchen, ob nicht vielleicht eine Hexonbasenbestimmung einen Unterschied offenbare. Wir haben deshalb das von Serumalbumin und Fibringlobulin, einem in geringer Menge im Blut vorkommenden Eiweißstoff, getrennte Serumglobulin durch Fällung mit Ammonsulfat in 2 Fraktionen geschieden und jede dieser beiden der Hexonbasenbestimmung unterworfen.

Das Serumalbumin wurde im wesentlichen nach den Angaben von Gürber,<sup>1)</sup> Pemsel<sup>2)</sup> und Moll<sup>3)</sup> dargestellt und solange umkrystallisiert, bis die mikroskopische Untersuchung die Abwesenheit jeglicher amorpher Beimengung ergab und die Abscheidung in Wasser völlig löslich war.

Zur Darstellung des Serumglobulins wurde das Pferdeblutserum zuerst durch 28%ige Sättigung mit Ammonsulfat

<sup>1)</sup> Sitzungsber. der phys.-med. Ges. zu Würzburg, 1894, S. 143. — Michel, Verh. der phys.-med. Ges. zu Würzburg, N. F., Bd. 29, S. 117 (1895).

<sup>2)</sup> Bei Krieger, Diss. Straßburg 1899.

<sup>3)</sup> Beitr. zur chem. Physiol. u. Pathol., Bd. 4, S. 567 (1904).

gereinigt und darauf durch 34%ige und 40%ige Sättigung fraktioniert gefällt. Die erhaltenen Niederschläge wurden solange umgefällt, bis sie frei von Eiweiß waren, das schon durch eine geringere oder noch nicht durch die benutzte Ammonsulfatsättigung niederschlagen war. Die so erhaltene Fraktion II war jedenfalls frei von Albumin, ob auch die Fraktion I von Fibringlobulin, muß dahingestellt bleiben; doch ist dieser Eiweißkörper von vornherein in nur geringer Menge im Blutserum vorhanden.

Das Fibrinogen kam als Fibrin zur Untersuchung, das durch Schlagen des Pferdeblutes gewonnen und mit Wasser bis zur Farblosigkeit behandelt worden war.

Bei der Hexonbasenbestimmung benutzten wir die von Kossel<sup>1)</sup> und von Steudel<sup>2)</sup> angegebenen Abänderungen der ursprünglichen Methode von Kossel und Kutscher<sup>3)</sup> und lehnten uns im einzelnen an die von Weiß<sup>4)</sup> und von Steudel<sup>5)</sup> gegebenen Vorschriften an. Wir führen nur die Punkte an, in denen wir von den Vorschriften abweichen.

Zur Ermittlung des vorhandenen Ammoniaks wurde  $\frac{1}{10}$  der Lösung mit Baryt neutralisiert, Baryumcarbonat im Überschuß zugefügt und der Wasserdampfdestillation unterworfen. Bei der Titration des Destillats diente Methylorange als Indikator.

Bei der Trennung des Histidins vom Arginin durch fraktionierte Fällung mit Silber und Baryt wurde das vermeintlich histidinfreie Filtrat mit dem Waschwasser nicht vereinigt, sondern beide für sich mittels der Paulyschen Diazoreaktion auf Histidin geprüft. Bei der außerordentlich großen Empfindlichkeit der Reaktion wurde ein schwacher Ausfall nicht berücksichtigt, da eine Wiederholung der Fällung in solchem Falle ergebnislos verläuft. Trat aber die Reaktion kräftig

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 49, S. 318 (1906).

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 37, S. 219 (1902/3); Bd. 44, S. 157 (1905).

<sup>3)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 31, S. 165 (1900).

<sup>4)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 52, S. 107 (1907); Bd. 68, S. 165 (1910).

<sup>5)</sup> Biochem. Arbeitsmethoden, herausgegeben von Abderhalden, Bd. 2. S. 498 (1910).



auf, so wurde die Flüssigkeit entweder bei niedriger Temperatur und unter Abhalten des Lichtes im Exsikkator eingeengt und etwa auftretende Abscheidungen dem Histidinniederschlag zugefügt, oder aber sie wurde zunächst weiter verarbeitet bis zur Argininstickstoffbestimmung und wieder dem Verfahren zur Trennung von Histidin und Arginin unterworfen.

Bei der Fällung von Histidin und Arginin mit Pikrolonsäure schied sich aus der Mutterlauge in manchen Fällen nach dem Eindampfen noch etwas Pikrolonat ab, es wurde ebenfalls abfiltriert, getrocknet und gewogen. Das Filtrat wurde bei schwefelsaurer Reaktion durch Äther von der Pikrolonsäure, durch Baryt von der Schwefelsäure, durch Kohlensäure vom überschüssigen Baryt befreit, und nach dem Eindampfen nochmals mit Pikrolonsäure gefällt. Das Verfahren wurde so oft wiederholt, als noch aufarbeitungsfähige Mengen Stickstoff gelöst waren.

Bei der Fällung des kohlensauren Lysins mit alkoholischer Pikrinsäure erscheint eine Kontrolle durch die Lackmustüpfelprobe zweckmäßiger als das vorgeschriebene Verfahren, nach dem man, um einen Überschuß von Pikrinsäure zu vermeiden, die Pikrinsäurelösung nach und nach in kleinsten Mengen solange zusetzen soll, als die Bildung eines Niederschlags zu beobachten ist. Die Mutterlauge wurde nach Vorschrift nochmals mit Phosphorwolframsäure gefällt, es entstand dabei zwar noch ein kleiner Niederschlag, aus dem aber in keinem Falle noch Lysinpikrat gewonnen werden konnte.

Histidin und Arginin gelangten als Pikrolonat, Lysin als Pikrat zur Wägung. Identifiziert wurde das Histidin als Dichlorid, das Arginin als Kupferniträt, das Lysin als Chlorid.

Die folgende Tabelle enthält die Resultate und zwar sind sowohl die aus den Ergebnissen der Wägung als auch die aus den nach Kjeldahl ermittelten Stickstoffwerten berechneten Mengen eingetragen, ferner die Ammoniakmengen.

Die durch die verschiedenen Kjeldahlbestimmungen verbrauchten Anteile der Ausgangssubstanz haben wir bei der Berechnung in Betracht gezogen.

Von 100 g N sind enthalten als										100 g trockenes aschefreies Eiweiß enthalten									
Am- moniak- N	durch Baryt und Silber- fäll- baren N	Histidin-N bestimmt durch		Arginin-N bestimmt durch		Lysin-N bestimmt durch		Histidin bestimmt durch		Arginin bestimmt durch		Lysin bestimmt durch							
		1. Kjehl- dahl	2. Wä- gung	1. Kjehl- dahl	2. Wä- gung	1. Kjehl- dahl	2. Wä- gung	1. Kjehl- dahl	2. Wä- gung	2. in % von 1.	1. Kjehl- dahl	2. Wä- gung	2. in % von 1.	1. Kjehl- dahl	2. Wä- gung	2. in % von 1.			
Serumalbumin { A B	— 5,18 <sup>1)</sup>	20,99	5,32	3,61	8,97	8,54	12,64	9,12	3,24	2,20	67,90	4,60	4,38	95,22	10,88	7,84	72,06		
		20,30	6,11	4,42	9,26	8,76	13,13	9,84	3,72	2,69	72,31	4,75	4,49	94,53	11,29	8,47	75,02		
Mittelwert . . . . .	5,18	20,645	5,71	4,01	9,11	8,65	12,88	9,48	3,48	2,44	70,12	4,67	4,43	94,86	11,08	8,15	73,56		
Serumglobulin I { A B	5,60 6,43	15,39	2,58	1,44	9,48	7,69	8,20	5,66	1,45	0,81	55,85	4,51	3,65	80,93	6,55	4,51	68,86		
		15,10	—	—	—	—	8,72	5,82	—	—	—	—	—	—	6,95	4,64	66,78		
Serumglobulin II { A B	4,98 6,13	16,06	3,11	2,29	8,43	7,13	7,74	5,62	1,81	1,33	73,48	4,13	3,50	84,75	6,36	4,62	72,64		
		14,86	2,87	2,11	8,18	6,81	8,61	6,13	1,67	1,23	73,65	4,01	3,34	83,29	7,08	5,04	71,19		
Mittelwert { Globulin I Globulin II	6,01 5,55	15,24	2,58	1,44	9,48	7,69	8,46	5,74	1,45	0,81	55,85	4,51	3,65	80,93	6,75	4,57	67,71		
		15,46	2,99	2,20	8,30	6,97	8,17	5,87	1,74	1,28	73,56	4,07	3,42	84,03	6,72	4,83	71,87		
Fibrin { A B C	6,80 6,72 —	18,93	3,98	3,17	10,52	8,98	9,86	6,36	2,38	1,90	79,83	5,29	4,52	85,44	8,32	5,37	64,53		
		21,77	5,36	—	11,43	9,36	7,97	5,92	3,20	—	—	5,75	4,71	81,90	6,73	4,99	74,14		
		20,75	4,97	3,69	—	—	8,47	6,13	2,97	2,20	74,07	—	—	—	7,15	5,17	72,31		
Mittelwert . . . . .	6,76	20,48	4,77	3,43	10,97	9,17	8,77	6,14	2,85	2,05	71,93	5,52	4,61	83,51	7,40	5,18	70,00		

<sup>1)</sup> Diese Zahl ist nicht ganz zuverlässig (vgl. S. 21 der Dissertation).



Die in der Literatur verzeichneten Zahlen für den Gehalt der Eiweißstoffe an Hexonbasen sind zum Teil aus den isolierten und gewogenen Verbindungen (Histidindichlorid, Histidin-pikrolonat, Argininnitrat, -kupferniträt, -pikrolonat, Lysin-pikrat) zum Teil nur aus dem Stickstoffgehalt der Lösungen, aus denen jene gewogenen Salze sich abgeschieden hatten, berechnet. Nur in wenigen Fällen sind beide Werte angegeben worden. Was die Übereinstimmung zwischen den gewogenen und den aus dem Stickstoff berechneten Werten betrifft, so wird sie von Weiß für das Histidin (als Pikrolonat gewogen) als zufriedenstellend, für das Arginin (ebenfalls als Pikrolonat gewogen) als sehr gut bezeichnet. Für das Lysin macht er keine Angaben. Nach der allgemeinen Erfahrung, die auch wir bestätigen können, ist sie hier am wenigsten befriedigend. Für das Arginin (als Nitrat gewogen) haben Kossel und Kutscher<sup>1)</sup> bei der Isolierung aus dem gespaltenen Histon aus Kabeljau-sperma, einem an dieser Base reichen Eiweiß, völlige Übereinstimmung gefunden. Mayeda<sup>2)</sup> konnte bei der Spaltung des Amyloids, eines nicht besonders basenreichen Proteins, in 6 Versuchen von dem Histidin 80, 100, 90, 100, 100 Prozent des aus dem Stickstoffgehalt berechneten als Pikrolonat zur Wägung bringen, von dem Arginin 80, 98, 90, 100, 100 Prozent ebenfalls als Pikrolonat, von dem Lysin 70, 60, 60, 60, 83 Prozent als Pikrat. Osborne<sup>3)</sup> fand bei der Spaltung pflanzlicher Eiweißstoffe unter Benützung eines etwas abgeänderten Trennungsvorgangs<sup>4)</sup> vom Histidin durch Wägung als analysenreines Dichlorid 75—80% des Kjeldahlwertes, vom Arginin durch Wägung als analysenreines Kupferniträt 85—90%. Über das Verhältnis des als Pikrat gewogenen Lysins zum Stickstoffgehalt der Lysinfraktion sagt er nichts. Das Verhältnis zwischen den von uns durch Wägung und durch Rechnung gefundenen Werten ist

<sup>1)</sup> A. a. O.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 58, S. 483 (1909).

<sup>3)</sup> Osborne, Leavenworth und Brautlecht, *Americ. Journ. of Physiol.*, Bd. 23, S. 182 und 196 (1908).

<sup>4)</sup> Er fällt zunächst nach Kossel und Patten (Diese Zeitschrift, Bd. 38, S. 39) den Hauptteil des Histidins mit Quecksilbersulfat aus.

nicht so gut wie bei Mayeda, es ist annähernd so wie das von Osborne erhaltene. Wir erhielten durch Wägung vom Histidin im Mittel (unter Weglassung einer ganz aus der Reihe fallenden Zahl) 72,6% des Kjeldahlwertes, vom Arginin im Mittel 86,6%, vom Lysin 70,9%,

Wie eingangs bemerkt, liegen schon einige Hexonbasenbestimmungen von Serumglobulin (aus Pferdeblut) vor. Die gefundenen Werte, welche sich ebenfalls auf 100 g trockene Substanz beziehen, stelle ich mit den von mir erhaltenen Mittelwerten zusammen.

	Lampel <sup>1)</sup>	Lampel und Skraup <sup>2)</sup>	Lock
Histidin (als Dichlorid gewogen)	3,4	1,7	1,04
Arginin ( • Nitrat        • )	2,9	3,7	3,52
Lysin ( • Pikrat        • )	4,2	4,3	4,7

Die Zahlen von Lampel für Histidin und Arginin sind offenbar nicht richtig.

Ein Blick auf die große Tabelle zeigt, daß die Analysen der beiden Globulinfractionen keine Unterschiede offenbarten, also auch zu keiner Beantwortung der Frage nach der Einheitlichkeit des Globulins geführt haben. Eine solche hätte natürlich nur die Feststellung einer quantitativ verschiedenen Beteiligung der Diaminosäuren an dem Aufbau der beiden Fraktionen bringen können. Immerhin hat die Wahrscheinlichkeit, daß in dem Globulin ein Gemenge wesentlich verschieden aufgebaute Eiweißstoffe vorliegt, durch diese Befunde weiterhin abgenommen.

Für das Fibrin (aus Rinderblut) hat Reinbold<sup>3)</sup> den Ammoniakstickstoff und den Hexonbasenstickstoff bestimmt und jenen zu 1,47%, diesen zu 3,39% gefunden. Die ent-

<sup>1)</sup> A. a. O.

<sup>2)</sup> A. a. O.

<sup>3)</sup> Zentralbl. f. d. ges. Physiol. u. Pathol. des Stoffwechsels, Bd. 10, S. 401 (1909).

sprechenden von mir erhaltenen Werte sind 1,10% und 3,97%.<sup>1)</sup>

Für das krystallisierte Serumalbumin liegen von Hausmann<sup>2)</sup> und von Gumbel<sup>3)</sup> Bestimmungen des Ammoniaks und des Hexonbasenstickstoffs vor. Gumbel fand für ersteren 0,95%, für letzteren 4,86% (Mittel aus 5,07% und 4,66%). Unsere entsprechenden Werte sind 0,85% und 4,4%.<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup> Durch Addition der für Histidin, Arginin und Lysin gewonnenen Werte erhalten.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 27, S. 95 (1899); Bd. 29, S. 136 (1900).

<sup>3)</sup> Beiträge zur chem. Physiol. u. Pathol., Bd. 5, S. 297 (1904).

<sup>4)</sup> Siehe Anm. 4, S. 33, unten.