

# Über Benzoylverbindungen von Eiweißkörpern.

Von

F. Blum und Th. Umbach.<sup>1)</sup>

(Der Redaktion zugegangen am 3. Oktober 1913.)

Drei Wege gibt es zur Erreichung des Hauptzieles der Eiweißchemie, der Erkennung der chemischen Beschaffenheit der Molekel: die Spaltung des Moleküls und Erforschung der Einzelbestandteile; der synthetische Aufbau und endlich die Einführung wohldefinierter Radikale und Feststellung der Zusammensetzung der erhaltenen Verbindungen. Dieser dritte Weg ist in gewissem Sinne eine Kombination des ersten und zweiten Verfahrens. Ihn ist der eine von uns (F. Blum) bereits in mehreren früheren Arbeiten gegangen. Es sei hier nur auf die Darstellung von Methyleneiweißkörpern<sup>2)</sup> und namentlich auf diejenige von Jodeiweißkörpern und die Aufstellung charakteristischer Jodzahlen für die einzelnen Eiweißkörper hingewiesen.<sup>3)</sup> Vor mehreren Jahren machte der gleiche Autor die Entdeckung, daß unter anderen Säurechloriden namentlich Benzoylchlorid mit Eiweiß in wässriger Lösung in Reaktion tritt und, wofern nur die Versuchsbedingungen zweckentsprechend gestaltet werden, wohldefinierte Verbindungen — Benzoyleiweißkörper — liefert, die sogar krystallisiert in Form von Globuliten sich abscheiden. Bei der Durchsicht der Literatur sahen wir, daß schon Schrötter<sup>4)</sup> Benzoylalbumosen dar-

<sup>1)</sup> Anmerkung: Aus äußeren Gründen blieb diese Arbeit nach ihrer Niederschrift 10 Jahre unveröffentlicht. Nachdem nunmehr im biologischen Institut zu Frankfurt a. M. die vorliegenden Fragen neuerlich in Angriff genommen wurden, mögen auch diese Ausgangstudien ihre Wiedergabe finden.

F. Blum.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 22, 1896/97, S. 127.

<sup>3)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 27, 1899, S. 288.

<sup>4)</sup> B. B., Bd. 22, S. 1950, 1889.

gestellt hat; er kam aber nicht zu einheitlichen Verbindungen. Unsere Untersuchungen waren, nachdem wir mit der üblichen Benzoylierung mittels Benzoylchlorid und Lauge nicht überall zu konstanten Verbindungen gelangt waren, vornehmlich auf die Auffindung einer für Eiweißkörper geeigneten Benzoylierung gerichtet. Die besten Resultate lieferte die Benzoylierung in  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung, sowie diejenige bei Zusatz von  $\text{MgO}$  zum Erhalten der alkalischen Reaktion. Diese Methode hat gegenüber der Benzoylierung in Natronlauge den Vorzug, daß das Bicarbonat das Eiweißmolekül nicht oder nur in ganz unbedeutendem Maße angreift, während die Lauge eine tiefergehende Spaltung zu verursachen vermag, wie dies schon Blum und Vaubel<sup>1)</sup> in ihrer Arbeit über Halogeneiweißderivate gefunden hatten. Die Einführung des Benzoylrestes in das Eiweiß, eventuell in Verbindung mit der Jodzahl des Eiweißkörpers versprach einen Schritt in der Erschließung der Eiweißgröße und -struktur vorwärts zu führen. Die Ausgangsmaterialien Globuline, Albumine usw. stellten wir uns dar durch Fällen derselben mit gesättigter  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung aus den betreffenden klaren Serumflüssigkeiten. Die Reinigung erfolgte durch Lösen in Wasser und 3 mal wiederholtes Fällen. Die Globuline wurden durch 1 : 1 gefällt; die Albumine erhielten wir aus dem ersten Filtrat entweder durch weiteres Versetzen der Lösung mit  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  oder durch Niederschlagen mit Essigsäure oder verdünnter Schwefelsäure, Lösen des Niederschlages in verdünnter Bicarbonatlösung, Halbsättigen mit  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , Filtrieren und Versetzen mit Säure.

### Methoden der Benzoylierung.

#### a) Bicarbonatmethode.

Die Benzoylierung in  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung wurde folgendermaßen ausgeführt: Das Eiweiß wurde in Wasser zur Lösung gebracht; Globulin direkt, Albumin unter Neutralisieren mit  $\text{NaHCO}_3$  und zur Entfernung von  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  mehrere Tage lang an fließendem Wasser dialysiert. Hierdurch wurde zwar

<sup>1)</sup> Journ. f. pr. Chem., Bd. 57, 1898.

der größte Teil des Sulfates entfernt, jedoch gelang es uns selbst durch 8tägiges Dialysieren nicht, die letzten Spuren davon fortzubekommen. Nach Zusatz von  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung in beliebig großer Menge wurde langsam, tropfenweise Benzoylchlorid zugesetzt und tüchtig umgeschüttelt. Am besten arbeitet man mit einer größeren Flasche, da sich über der Flüssigkeit oftmals reichlich Schaum bildet. Schon nach kurzem Schütteln der Mischung setzen sich fast weiße Körner zu Boden, die meist die Form von Kugeln oder Bruchteilen solcher aufweisen. Aber auch der Schaum enthält häufig größere Mengen der Körner. Der Geruch nach Benzoylchlorid verschwindet in dieser Lösung bedeutend langsamer als in Lauge. Die Reaktion der Flüssigkeit soll stets alkalisch bleiben, weshalb beim  $\text{NaHCO}_3$ -Verfahren der Zusatz eines Überschusses dieses Salzes zu empfehlen ist. Um zu sehen, wann die Reaktion beendet ist, wird eine Probe filtriert, das Filtrat mit  $\text{H}_2\text{SO}_4$  angesäuert und mit Äther ausgeschüttelt. Die Mineralsäure fällt sowohl Benzoesäure wie Eiweiß; erstere aber wird vom Äther wieder gelöst. Bleibt bei der Prüfung keine oder nur noch eine ganz schwache Färbung zurück, so ist kein Eiweiß mehr in Lösung gewesen; andernfalls wird fortgefahren mit dem Zusatz von Benzoylchlorid. Die Reaktion verläuft am Eiweiß völlig oder fast völlig quantitativ. Das Abfiltrieren des gebildeten Benzoyleiweißes erheischt besondere Vorsicht, da dabei das Präparat, das sich fest ins Filter setzt, leicht durch Fasern verunreinigt wird. Am besten bewährte sich gepreßtes Filterpapier oder Seide, die vorher zur Reinigung mit Lauge oder  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung behandelt worden waren. Da die Reaktion noch längere Zeit weiter wirkt, so geschieht es leicht, daß der Niederschlag auf dem Filter sauer wird. Dann setzt sich die Benzoesäure in harten Klumpen zu Boden und haftet mit dem dargestellten Produkt zusammen am Filter. Hat man genügende Mengen Eiweiß zur Verfügung, so gibt man am besten einen kleinen Teil preis, d. h. man arbeitet in einem Überschuß von Eiweiß, läßt die sich bildenden Körner sich absetzen und dekantiert, wodurch die Verunreinigungen vermieden werden können.

Auf die Reinigung des abfiltrierten oder dekantierten Teiles werden wir später eingehen. Die Flüssigkeit zeigt stets hellgelbe Farbe und riecht nach bitteren Mandeln, ähnlich dem Geruch des Bittermandelöls — ein Umstand, der sich durch die Bildung von Benzamid erklärt aus Benzoylchlorid und Ammoniak, welches letzteres sowohl durch Lauge als durch Bicarbonat aus den noch anhaftenden Resten von schwefelsaurem Ammonium freigemacht wird. Schon von Beginn der Benzoylierung an fällt beim Ansäuern Benzoessäure aus.

### b) Laugenmethode.

Die dialysierte Eiweißlösung wurde jeweils nur mit einigen Tropfen NaOH versetzt, so daß eben deutliche alkalische Reaktion vorhanden war. Der Geruch nach Benzoylchlorid verschwindet beim Schütteln sehr bald und wieder setzen sich Körner zu Boden, die den Produkten des vorigen Verfahrens ähnlich sind. Es ist notwendig, daß in kurzen Zeitintervallen die Reaktion geprüft wird, weil hier die Benzoylierung und somit auch die Neutralisierung der Base sehr viel rascher vonstatten geht als bei dem  $\text{NaHCO}_3$ -Verfahren und anderseits ein größerer Überschuß an Lauge peinlich zu vermeiden ist. Die zugegebene Menge Benzoylchlorid darf niemals so groß sein, daß sich die Flüssigkeit erwärmt, da sonst Spaltung des Eiweißes eintritt. Ein zu Beginn unserer Arbeit zu rasch benzoyliertes Präparat von Pferdeserumglobulin zeigte gelbe Farbe und eine aufgelockerte Außenschicht. Die Benzoylierung in NaOH ist in längstens 4 Stunden beendet; läßt man die Lauge länger einwirken, so bildet sich neben den weißen Körnern eine beträchtliche Menge einer weißen, schleimigen Masse, die bei der nachfolgenden Reinigung zum Teil in Alkohol löslich ist, zum Teil koaguliert wird. Das Filterpapier imprägniert sich beim Filtrieren der alkalischen Flüssigkeit noch leichter als bei den  $\text{NaHCO}_3$ -Mischungen, sodaß man hier völlig auf das Dekantieren angewiesen ist. Die Benzoylierung unter Anwendung von MgO wird bei Präparat 20 näher angeführt werden.

## Reinigung.

Zur Reinigung der Präparate wurde der Rückstand auf dem Filter oder im Dekantierungsverfahren mehrmals mit Wasser übergossen, dem anfangs etwas  $\text{NaHCO}_3$  resp.  $\text{NaOH}$  zugesetzt war. Die ablaufende Flüssigkeit darf zuletzt, mit  $\text{AgNO}_3$  oder mit  $\text{BaCl}_2$  versetzt, keine Trübung mehr ergeben. Vorher fällt Silberchlorid durch das bei der Reaktion entstandene  $\text{NaCl}$  aus,  $\text{BaSO}_4$  durch noch anhaftendes  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Das Produkt wurde nach dem Waschen mit Wasser stets mit verdünnter Essigsäure behandelt, damit die Säuregruppen des Eiweißmoleküls frei werden und noch anhaftendes Bicarbonat zersetzt und gewaschen wird. Da wir sahen, daß verdünnte  $\text{H}_2\text{SO}_4$  keine Zersetzung hervorbringt, so ließen wir später immer verdünnte  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , dann  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung und zuletzt  $\text{CH}_3\text{COOH}$  einwirken. Die ersten Präparate wurden hier nach in Alkohol mehrmals aufgekocht und der Alkohol heiß abfiltriert. Der Alkohol löst sämtliche Verunreinigungen, wobei die Masse der Körner sich erheblich verringert.

Verdünnt man den abfiltrierten Alkohol mit Wasser, so trübt er sich milchig, und bald setzen sich an den Wänden kleine, weiße Tröpfchen ab. Um zu erfahren, welcher Stoff diese Erscheinung verursache, wurde eine größere Menge des Alkohols eingeeengt, verdünnt und mit Äther ausgezogen. Nach dem Verdampfen desselben blieb ein gelbes Öl zurück, das bald erstarrte und aus Wasser umkrystallisiert werden konnte. Die feinen Blättchen hatten den Schmelzpunkt der Benzoesäure ( $120^\circ\text{C}$ .) und stimmten auch ihren Reaktionen nach mit dieser Verbindung überein: mit  $\text{FeCl}_3$  fleischfarbiger Niederschlag; in  $\text{HCl}$  löslich; mit  $\text{AgNO}_3$  weißer Niederschlag; in heißem Wasser löslich. — Die Anwesenheit von freier Benzoesäure noch in diesem Stadium ist recht bemerkenswert, da doch immer in alkalischer Lösung gearbeitet, mit Lauge gereinigt und das Benzoyleiweiß mehrmals mit Wasser gekocht worden war.

Als Alkohol benützten wir, so lange derselbe nach dem Kochen noch Benzoesäure gelöst enthielt, den 96%igen; um

das Eiweiß auch noch vom letzten Rest Wasser zu befreien, wurde zweimal mit absolutem Alkohol ausgekocht. Zur schnelleren Trocknung ist es ratsam, den Niederschlag auf dem Filter, auf welchen er von dem Alkohol getrennt worden war, mit Äther zu übergießen. Einige Male wurde auch noch mit Äther gekocht, jedoch erwies sich das als unnötig, da nichts mehr in den Äther ging.

#### Eigenschaften.

Die bemerkenswertesten Eigenschaften der Benzoyleiweißkörper sind ihre krystallinische Beschaffenheit und ihre völlige Unlöslichkeit in allen Lösungsmitteln, selbst in starken Laugen. Die Benzoyleiweißkörper sind weiße bis gelblich-weiße körnige Pulver. Frisch bereitet und bis zu ihrer Behandlung mit Alkohol oder siedendem Wasser stellen sie wohlausgebildete Globuliten dar, meist — bei mäßiger Vergrößerung — halbkugelige Schalen und Bruchstücke solcher; zuweilen lassen sich auch nadelförmige Bildungen erkennen. Im allgemeinen sind die Präparate der  $\text{NaHCO}_3$ -Methode grobkörniger als diejenigen der Laugenmethode. Alle zeichnen sich von vornherein, d. h. auch schon vor ihrer Reinigung und Trocknung, durch Unlöslichkeit in sämtlichen Lösungsmitteln aus, weshalb eben bei der Darstellung größte Reinlichkeit notwendig ist. Beim Erwärmen mit Eisessig lösen sich die Körner größtenteils und scheiden sich beim Erkalten als Flocken wieder aus, jedoch läßt Form und Farbe derselben auf eine Zersetzung schließen. Beim Erwärmen im Schmelzpunktröhrchen zeigen die benzoylierten Eiweiße keinen festen Schmelzpunkt, sondern es tritt ganz langsam eine Zersetzung ein: zuerst bei ca.  $115^\circ$  eine Braunfärbung; später werden die Substanzen weich und schäumen bei noch höherem Erhitzen auf.

Die Farbenreaktion der gewöhnlichen Eiweißkörper, auf die bei der Unlöslichkeit der Präparate kaum Wert zu legen ist, fallen, so lange keine Spaltung eingetreten ist, fast alle negativ aus. Biuretreaktion, Xanthoproteinreaktion, diejenigen von Molisch und Adamkiewitz verlaufen negativ. Die Millon'sche Reaktion bleibt zweifelhaft, da einige Präparate eine braune Färbung annehmen.

## Analysen.

Die Eigenschaften der Schwerverbrennlichkeit teilen diese Verbindungen mit ihrer Muttersubstanz, dem Eiweiß. Beim Verbrennen im Analysenrohr blähen sie sich stark auf und hinterlassen Kohle in Form eines schwarzen dichten Überzuges über dem Verbrennungsschiffchen und der inneren Glaswandung des Rohres. Ob wir die Substanz lose im Schiffchen oder mit feinem  $\text{CuO}_2$  vermischt verbrannten, nie kamen wir zu konstanten Zahlen; selbst nach heftigstem Glühen war noch Kohle zu sehen. Erst als wir die feine Substanz im freien Rohr verbreiteten, so daß nirgends größere Mengen zusammen zu liegen kamen, verbrannte sie vollständig. Oxydiert wurde stets mit Bleichromat und Luft. Die Präparate wurden bei 100 bis  $105^\circ$  bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Der Stickstoff wurde nach Kjeldahl bestimmt; Jod wurde durch Zersetzung der organischen Verbindung mit chemisch reinem  $\text{NaOH}$  und  $\text{KNO}_3$  an Alkali gebunden, durch  $\text{H}_2\text{SO}_4$  in der Lösung der Schmelze freigemacht, in gereinigtem Schwefelkohlenstoff aufgenommen und nach Überschichten mit  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung (nach Fresenius) mit Thiosulfat titriert.

Der Schwefel wurde nach Carius bestimmt und zwar, handelte es sich um jodierte Eiweißkörper, gleichzeitig mit Jod, indem dann zuerst das  $\text{AgJ}$  abfiltriert, im Filtrat das überschüssige  $\text{AgNO}_3$  mit  $\text{HCl}$  gefällt und die verbliebene  $\text{H}_2\text{SO}_4$  mit  $\text{BaCl}_2$  zur Ausscheidung gebracht wurde. Ist das Jod auf diese Weise, also als  $\text{AgJ}$  bestimmt worden, so wurde zur Trennung von eventuell mit anwesendem  $\text{AgCl}$  mit verdünntem  $\text{NH}_3$  übergossen.

### I. Benzoyleiweißkörper.

#### Pferdeserumglobulin.

##### a) Laugenpräparate.

Präparat 1. Die Benzoylierung war hier sehr vorsichtig ausgeführt worden.

#### Verbrennungen.

1. 0,1248 g Substanz = 0,0764 g  $\text{H}_2\text{O}$  und 0,2712 g  $\text{CO}_2$ ,  
gefunden: 59,27% C und 6,80% H.

2. 0,2212 g Substanz = 0,1346 g H<sub>2</sub>O und 0,4856 g CO<sub>2</sub>,  
gefunden: 59,86% C und 6,75% H.

#### N-Bestimmung.

0,3580 g Substanz = 31,65 ccm  $\frac{1}{10}$ -n-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, gefunden: 12,38% N  
0,5906 „ „ = 53,4 „ „ „ 12,65% „  
0,4760 „ „ = 41,8 „ „ „ 12,30% „

#### Schwefelbestimmung nach Carius.

0,2530 g Substanz = 0,0120 g BaSO<sub>4</sub>, gefunden: 0,65% S  
0,1657 „ „ = 0,0103 „ „ „ 0,84% „

#### Aschebestimmung.

Die Substanz wurde mit roter rauchender Salpetersäure angefeuchtet und vorsichtig erwärmt. Anfangs war starkes Aufblähen zu bemerken; zum Schluß mußte dann tüchtig geglüht werden, bis der Rückstand weiß aussah.

0,2440 g Substanz ergab 0,001 g Asche, entsprechend 0,41%.

#### Präparat 1, Mittel:

C = 59,56% N = 12,44%; S = 0,74%; Asche = 0,41%.  
H = 6,77%

#### Präparat 2.

#### Verbrennung.

0,2068 g Substanz = 0,1270 g H<sub>2</sub>O und 0,4478 g CO<sub>2</sub>,  
gefunden darnach: 59,06% C und 6,48% H.

#### N-Bestimmung.

0,1804 g Substanz = 15,8 ccm  $\frac{1}{10}$ -n-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, entsprechend 12,26% N  
0,2750 „ „ = 24,3 „ „ „ 12,37% „

#### Präparat 2, Mittel:

C = 59,06% N = 12,31%.  
H = 6,48%

Präparat 3. Dargestellt aus Pferdeserumglobulin, welches im Verhältnis 1 : 2 durch (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung ausgefallen war.

#### Verbrennungen.

1. 0,1024 g Substanz = 0,0684 g H<sub>2</sub>O und 0,2220 g CO<sub>2</sub>,  
entsprechend C = 59,12% und H = 7,42%.

2. 0,0784 g Substanz = 0,0490 g H<sub>2</sub>O und 0,1702 g CO<sub>2</sub>,  
also C = 59,19% und H = 6,94%.

Präparat 3, Mittel: C = 59,15% und H = 7,18%.

Präparat 4. Benzoylierung und Ausgangsmaterial wie vorher.

#### Verbrennung.

0,2502 g Substanz = 0,1404 g H<sub>2</sub>O und 0,5449 g CO<sub>2</sub>,  
gefunden: C = 59,39% und H = 6,22%.

## Stickstoffbestimmung.

0,9822 g Substanz	= 74,1 ccm $\frac{1}{10}$ -n- $H_2SO_4$ ,	entspr. 12,83% N
0,3268 »	= 24,3 »	» 12,64% »
0,3136 »	= 23,4 »	» 12,67% »
0,7584 »	= 68,55 »	» 12,65% »

Präparat 4, Mittel:

$$C = 59,39\% \quad N = 12,70\% \\ N = 6,22\%$$

Präparat 5. Viermal gefälltes (1 : 1) Pferdeserumglobulin wurde dialysiert und benzoyliert. Nach dem Trocknen wurde das Reaktionsprodukt mechanisch von kleinen Verunreinigungen (Papierfasern) getrennt, so daß immer noch kleine Fremdkörperchen darin vorhanden gewesen sein könnten. Der gefundene Kohlenstoffgehalt wurde hier höher gefunden als bei den andern Proben.

## Verbrennung.

0,2140 g Substanz = 0,1230 g  $H_2O$  und 0,4738 g  $CO_2$ ,  
gefunden: C = 60,38% und H = 6,38%.

## Stickstoffbestimmung.

0,1756 g Substanz	= 15,5 ccm $\frac{1}{10}$ -n- $H_2SO_4$ ,	entspr. 12,35%
0,2106 »	= 18,8 »	» 12,43%.

## Schwefel (Carius).

0,1422 g Substanz = 0,0085 g  $BaSO_4$ , entspr. 0,82% S.

Chlor (Carius) wurde neben S bestimmt, indem in das Rohr rauchende  $HNO_3$  und  $AgNO_3$  gegeben wurde. Obige

0,1422 g Substanz lieferten 0,0030 g  $AgCl$ , folglich gefunden: Cl = 0,52%.

Präparat 5, Mittel:

$$C = 60,38\% \quad N = 12,39\% \quad S = 0,82\% \quad Cl = 0,52\% \\ H = 6,38\%$$

Aus obigen Zahlen ist ersichtlich, daß bei der Benzoylierung in Lauge keine völlig einheitlichen Verbindungen erhalten wurden. Die Prozentzahlen für den Kohlenstoff bei den vorsichtig behandelten Präparaten schwanken von 59,06% bis 59,56%, also Differenzen von 0,5%, jedoch wurden, allerdings nur bei weniger vorsichtigem Verfahren, auch Präparate mit 61% C und solche unter oben genannten Zahlen erhalten. Durchaus einheitliche Produkte lieferte uns die für die Zersetzung weniger gefährliche Natriumbicarbonicum-Methode.

## b) Bicarbonatpräparate.

Präparat 6. Das Pferdeserumglobulin war 26 Stunden dialysiert worden. Die Benzoylierung verlief fast quantitativ, sodaß in der filtrierten Flüssigkeit nur noch Spuren von Globulin vorhanden waren. Der entstandene Niederschlag bestand, wie stets, aus grobkörnigen kugligen Gebilden.

## Verbrennung.

0,1616 g Substanz = 0,0984 g H<sub>2</sub>O und 0,3376 g CO<sub>2</sub>.  
 gefunden: C = 56,97% und H = 6,76%.

## Stickstoffbestimmung.

Die ersten Analysen ergaben ziemlich hohe Werte für N. Man mußte unter diesen Umständen an N-haltige Einschlüsse — (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> — denken und es wurde deshalb das Präparat 5 Stunden lang mit sehr verdünnter Schwefelsäure kalt behandelt, dann mit verdünnter KOH, CH<sub>3</sub>COOH, Alkohol und Äther ausgewaschen. Die Prozentzahlen fielen zwar etwas, ohne daß eine Spaltung eingetreten zu sein schien, jedoch blieben sie gegenüber allen anderen Eiweißkörpern dieser Gruppe um ca.  $\frac{2}{3}$ % höher.

0,4112 g Substanz = 40,7 ccm  $\frac{1}{10}$ -n-Säure, entspr. 13,85% N

0,3359 » » = 33,55 » » » 13,98% »

0,3788 » » = 38,15 » » » 14,10% »

Nach einstündigem Erwärmen mit 1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> bis 70° fanden wir

0,1542 g Substanz = 15,35 ccm  $\frac{1}{10}$ -n-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, folgt: 13,93% N

0,1650 » » = 16,60 » » » 14,08% »

Dieser letzte Versuch wurde ausgeführt, um etwa an das Eiweiß angelagertes oder gebundenes Ammoniak wegzuschaffen, jedoch zeigen die Analysen äußerst deutlich, daß der Stickstoff nicht in so leicht eliminierbarer Form im Eiweiß vorhanden, sondern fest gebunden ist. Der höhere Stickstoffgehalt bei dieser Probe gegenüber den noch zu besprechenden Präparaten läßt sich am wahrscheinlichsten dadurch erklären, daß noch etwas unangegriffenes, d. h. nicht benzoyliertes, aber koagulierte Globulin als Verunreinigung eingeschlossen war.

## Präparat 6, Mittel;

C = 56,87% N = 13,99%.

H = 6,76%

## Präparat 7.

## Verbrennungen.

1. 0,2434 g Substanz = 0,1432 g H<sub>2</sub>O und 0,5116 g CO<sub>2</sub>,  
 entsprechend C = 57,32% und H = 6,53%.

2. 0,3540 g Substanz = 0,2252 g H<sub>2</sub>O und 0,7420 g CO<sub>2</sub>,  
entsprechend C = 57,16% und H = 7,06%.

## Stickstoffbestimmung.

1. 0,6446 g Substanz = 61,0 ccm  $\frac{1}{10}$ -n-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = 13,25% N

2. 0,7342 „ „ = 69,9 „ „ = 13,32% „

Schwefel: 0,2154 g Substanz = 0,0114 g BaSO<sub>4</sub>, entspricht 0,73% S

0,1716 „ „ = 0,0092 „ „ 0,74% „

Asche: 0,4780 „ „ = 0,0006 „ Asche = 0,13%.

## Präparat 7, Mittel:

C = 57,24% N = 13,28%, S = 0,73%, Asche = 0,13%.

H = 6,79%

Zur Feststellung, ob NaOH nach der Bildung und dem Ausfallen der Bicarbonatpräparate nachträglich noch Veränderungen am Molekül hervorruft — etwa durch Abspaltung einer bestimmten Gruppe —, wurde eine größere Probe dieses Globulins in NaHCO<sub>3</sub> benzoiliert, filtriert und in zwei Teile geteilt. Der eine Teil wurde weiter mit NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (Präparat 8), der andere mit verdünnter Natronlauge gewaschen (Präparat 9).

Präparat 8. Präparat mit NaHCO<sub>3</sub> gewaschen, dann mit kalter verdünnter Säure behandelt.

## Verbrennung.

0,1770 g Substanz = 0,1062 g H<sub>2</sub>O und 0,3714 g CO<sub>2</sub>,  
gefunden: C = 57,23% und H = 6,66%.

## Stickstoffbestimmung.

0,2785 g Substanz = 26,7 ccm  $\frac{1}{10}$ -n-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = 13,42% N

0,2560 „ „ = 24,5 „ „ = 13,40% „

0,3598 „ „ = 34,2 „ „ = 13,30% „

0,3176 „ „ = 30,35 „ „ = 13,37% „

Asche: 0,2930 g Substanz = 0,0018 g Asche = 0,61%.

## Präparat 8, Mittel:

C = 57,23% N = 13,37%, Asche = 0,61%.

H = 6,66%

Präparat 9. Zweiter Teil der Benzoilierung mit NaOH (verdünnt) gewaschen. Nachher ließen wir wie bei Präparat 5 verdünnte H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wieder etwa 1 Stunde einwirken und verdrängten diese durch NaOH, CH<sub>3</sub>COOH und Wasser.

## Verbrennung.

0,2142 g Substanz = 0,1286 g H<sub>2</sub>O und 0,4486 g CO<sub>2</sub>,  
gefunden: C = 57,11% und H = 6,67%.

## Stickstoffbestimmung.

0,1804 g Substanz = 17,4 ccm  $\frac{1}{10}$ -n- $H_2SO_4$  = 13,50% N

0,1550 „ „ = 14,9 „ „ = 13,45% „

Die Übereinstimmung der Analyse der beiden Präparate 8 und 9 zeigt, daß die Natronlauge bei dieser kurzen Wirkungs-dauer des Auswaschens keine Veränderung hervorzubringen imstande ist, während bei der Einwirkung im Entstehen ganz von diesem mit Lauge gereinigten Bicarbonatpräparat verschiedene Verbindungen erhalten wurden.

Präparat 9, Mittel:

C = 57,11% N = 13,48%

H = 6,67%

Präparat 10. Benzoylierung wie üblich. Das fertige Pulver wurde nach dem Waschen mit kaltem und warmem Alkohol mit warmem Benzol behandelt.

## Verbrennungen.

1. 0,2234 g Substanz = 0,1363 g  $H_2O$  und 0,4663 g  $CO_2$ .

gefunden: C = 56,92% und H = 6,78%.

2. 0,2154 g Substanz = 0,1282 g  $H_2O$  und 0,4498 g  $CO_2$ .

gefunden: C = 56,95% und H = 6,61%.

## Stickstoffbestimmung.

0,1124 g Substanz = 10,6 ccm  $\frac{1}{10}$ -n- $H_2SO_4$  = 13,20% N

0,1552 „ „ = 14,7 „ „ = 13,26% „

Präparat 10, Mittel:

C = 56,93% N = 13,23%

H = 6,69%

Präparat 11. Dargestellt wie die andern Präparate, aber ohne die bei Präparat 10 eingeschaltete Benzolbehandlung.

## Verbrennung.

0,3388 g Substanz = 0,2098 g  $H_2O$  und 0,7122 g  $CO_2$ ,

gefunden: C = 57,33% und H = 6,88%.

Bei den eben besprochenen Eiweißkörpern sehen wir, daß der Kohlenstoffgehalt schwankt zwischen den Werten 56,92% und 57,33%, Differenzen von 0,4%, die bei der Schwerverbrennlichkeit dieser Körper sehr wohl in die Fehlergrenze fallen. Kein einziges nach dieser Methode dargestelltes Präparat ergab andere Zahlen, so daß wir also sagen können, diese Benzoyleiweiße sind einheitlich und von konstanter Zusammensetzung.

Natürlich interessierte uns hiernach das Verhalten anderer Eiweißarten gegenüber der Benzoylierung. Bei einem vorläufigen Versuch mit Pferdeserumalbumin schien es, als ob sich dieser Körper nicht benzoylieren lasse; der Niederschlag ging beim Behandeln mit warmem Alkohol zum größten Teil in Lösung. Wahrscheinlich war aber die Flüssigkeit sauer geworden und Benzoesäure war ausgefallen. Später ging die Reaktion bei der Wahrnehmung der schon besprochenen Vorsichtsmaßregeln glatt vonstatten.

### Pferdeserumalbumin.

#### a) Benzoylierung in $\text{NaHCO}_3$ .

Präparat 12. Das Ausgangsmaterial wurde dargestellt aus Pferdeserum, das, wie nachträglich bemerkt wurde, schon etwas in Verwesung übergegangen war, durch zweimaliges Füllen mit  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (1 : 1) und  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Das Aussehen der Benzoylalbumine ist dem der entsprechenden Globuline gleich.

#### Verbrennungen.

1. 0,2776 g Substanz = 0,1588 g  $\text{H}_2\text{O}$  und 0,5956 g  $\text{CO}_2$ ,  
gefunden: C = 58,51% und H = 6,35%.
2. 0,1644 g Substanz = 0,1026 g  $\text{H}_2\text{O}$  und 0,3562 g  $\text{CO}_2$ ,  
gefunden: C = 59,08% und H = 6,93%.
3. 0,1598 g Substanz = 0,0926 g  $\text{H}_2\text{O}$  und 0,3466 g  $\text{CO}_2$ ,  
gefunden: C = 59,15% und H = 6,44%.

#### Stickstoffbestimmung.

1. 0,4262 g Substanz = 42,1 ccm  $\frac{1}{10}$ -n- $\text{H}_2\text{SO}_4$  = 13,83% N
2. 0,4044 g Substanz = 40,1 ccm  $\frac{1}{10}$ -n- $\text{H}_2\text{SO}_4$  = 13,88% N

#### Mittel aus Präparat 12:

$$\begin{aligned} \text{C} &= 58,91\% & \text{N} &= 13,85\% \\ \text{H} &= 6,57\% \end{aligned}$$

Präparat 13. Das Albumin wurde erhalten aus frischem Serum durch Aussalzen mit festem, chemisch reinem  $\text{MgSO}_4$ . Die Lösung wurde zur teilweisen Entfernung des Salzes dialysiert.

#### Verbrennungen.

1. 0,3756 g Substanz = 0,2138 g  $\text{H}_2\text{O}$  und 0,7990 g  $\text{CO}_2$ ,  
gefunden: C = 58,01% und H = 6,32%.
2. 0,1837 g Substanz = 0,1090 g  $\text{H}_2\text{O}$  und 0,3942 g  $\text{CO}_2$ ,  
gefunden: C = 58,52% und H = 6,59%.
3. 0,3774 g Substanz = 0,2188 g  $\text{CO}_2$  und 0,8036 g  $\text{CO}_2$ ,  
gefunden: C = 58,07% und H = 6,44%.

## Stickstoffbestimmungen.

Teil a) N = 13,44% (0,2000 g = 0,02688 g N)

» » N = 13,06% (0,2262 » = 0,02954 » »)

» b) N = 13,08% (0,3028 » = 0,03962 » »).

Asche in Präparat 13: 0,6132 g Substanz = 0,0014 g Asche = 0,23%.

Präparat 13, Mittel:

C = 58,20% N = 13,19%, Asche = 0,23%.

H = 6,45%

Präparat 14. Kontrolldarstellung zu obigem Präparat.13.

Verbrennung.

0,3266 g Substanz = 0,1890 g H<sub>2</sub>O und 0,6990 g CO<sub>2</sub>,

gefunden: C = 58,36% und H = 6,43%.

Stickstoffbestimmung.

0,1644 g Substanz = 0,0215 g N, entsprechend 13,11% N.

Präparat 14, Mittel:

C = 58,36% N = 13,11%.

H = 6,43%

b) Benzoylierung in NaOH.

Präparat 15. Hier wirkte bei dem Teil «a» die Lauge nur kurze Zeit ein, während der Teil «b» länger mit NaOH zusammen war.

Teil «a».

Verbrennungen.

1. 0,2872 g Substanz = 0,1668 g H<sub>2</sub>O und 0,6284 g CO<sub>2</sub>,  
gefunden: C = 59,67% und H = 6,45%.

2. 0,2344 g Substanz = 0,1330 g H<sub>2</sub>O und 0,5136 g CO<sub>2</sub>,  
gefunden: C = 59,76% und H = 6,30%.

Stickstoffbestimmung.

0,2920 g Substanz = 27,95 ccm  $\frac{1}{10}$ -n-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = 13,40% N

0,2724 » » = 26,35 » » = 13,54% »

Schwefel: Präparat 15.

0,1086 g Substanz = 0,0082 g BaSO<sub>4</sub> = 1,03%.

Mittel aus Präparat 15 «a»:

C = 59,71% N = 13,47%, S = 1,03%.

H = 6,37%

Teil «b». Darstellung wie oben angegeben.

Verbrennung.

0,1570 g Substanz = 0,0952 g H<sub>2</sub>O und 0,3350 g CO<sub>2</sub>,

gefunden: C = 58,19% und H = 6,73%.

Gerade die Verschiedenheit der ersten und zweiten Darstellung im Kohlenstoffgehalt (59,71% und 58,2% C) zeigen wieder aufs deutlichste, wie unbrauchbar die Laugenmethode ist, wenn konstante Verbindungen erzielt werden sollen.

## Rinderserumglobulin.

a) Benzoylierung in  $\text{NaHCO}_3$ .

Dieses Benzoylglobulin gleicht in Form und Farbe und in den äußeren Eigenschaften ganz dem benzoylierten Pferdeserumglobulin. Den folgenden Analysen nach scheint aber doch die molekulare Struktur nachweisbar verschieden zu sein.

## Präparat 16.

## Verbrennung.

- 0,1752 g Substanz = 0,1096 g  $\text{H}_2\text{O}$  und 0,3634 g  $\text{CO}_2$ ,  
gefunden: C = 56,57% und H = 6,95%.
- 0,2190 g Substanz = 0,1364 g  $\text{H}_2\text{O}$  und 0,4532 g  $\text{CO}_2$ ,  
gefunden: C = 56,44% und H = 6,92%.

## Stickstoffbestimmung.

- 0,2862 g Substanz = 29,7 ccm  $\frac{1}{10}$ -n- $\text{H}_2\text{SO}_4$  = 14,53% N
  - 0,3138 „ „ = 31,95 „ „ = 14,25% „
  - 0,3092 „ „ = 31,45 „ „ = 14,23% „
  - 0,2642 „ „ = 27,0 „ „ = 14,22% „
- Asche: 0,3618 g Substanz = 0,0016 g Asche = 0,44%.
- Schwefel: 0,4040 „ „ = 0,0170 „  $\text{BaSO}_4$  = 0,58% S.

## Präparat 16, Mittel:

C = 56,51% N = 14,31%, S = 0,58%, Asche = 0,44%  
H = 6,93%

## Präparat 17. Kontrolldarstellung zu Präparat 16.

## Verbrennung.

- 0,2501 g Substanz = 0,1440 g  $\text{H}_2\text{O}$  und 0,5198 g  $\text{CO}_2$ ,  
gefunden: C = 56,68% und H = 6,40%.

## Stickstoffbestimmung.

- 0,2198 g Substanz = 21,6 ccm  $\frac{1}{10}$ -n- $\text{H}_2\text{SO}_4$  = 13,76% N
- 0,0636 „ „ = 6,3 „ „ = 13,87% „

## Präparat 17, Mittel:

C = 56,68% N = 13,81%  
H = 6,40%

b) Benzoylierung in  $\text{NaOH}$ .

Das Ausgangsmaterial war fibrinogenfrei (siehe Kapitel analytische Daten des Ausgangsmaterials).

## Präparat 18.

## Verbrennung.

- 0,1356 g Substanz = 0,0850 g  $\text{H}_2\text{O}$  und 0,2816 g  $\text{CO}_2$ ,  
gefunden: C = 56,64% und H = 6,96%.

## Stickstoffbestimmung.

0,1174 g Substanz = 11,1 ccm  $\frac{1}{10}$ -N-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = 13,24% N

0,0792 g Substanz = 7,6 ccm  $\frac{1}{10}$ -N-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = 13,44% N

Präparat 18, Mittel:

C = 56,64% N = 13,34%

H = 6,96%

Die Analysen dieses Produktes schienen das merkwürdige Resultat zu liefern, daß die erhaltenen Verbindungen in NaOH identisch sind mit den Bicarbonatprodukten. Dieser Befund fesselte uns natürlich in hohem Maße, da solches beim Pferdeserumglobulin niemals beobachtet worden war und diese Eigenschaft für das Rinderserumglobulin charakteristisch gewesen wäre. Aber schon die zweite Darstellung dieser Verbindung belehrte uns, daß auch höherwertige Körper erhältlich sind. So ist also Rinderserumglobulin kein Eiweiß, welches vom Lösungsmittel unabhängige Benzoylprodukte liefert; wohl bleibt aber bestehen, daß in Lauge auch Verbindungen von Bicarbonatcharakter darstellbar sind. Die Bedingungen, wann erstere oder letztere Körper entstehen, sind nicht ermittelt worden.<sup>1)</sup>

Präparat 19 «a». Die Benzoylierung verlief unter äußerlich gleichen Bedingungen wie bei Präparat 18.

## Verbrennungen.

1. 0,1752 g Substanz = 0,0970 g H<sub>2</sub>O und 0,3738 g CO<sub>2</sub>,  
gefunden: C = 58,20% und H = 6,15%

2. 0,1034 g Substanz = 0,0594 g H<sub>2</sub>O und 0,2226 g CO<sub>2</sub>,  
gefunden: C = 58,71% und H = 6,38%

Der Stickstoff konnte nicht ermittelt werden, da nicht mehr genügend Substanz für eine Bestimmung vorhanden war.

Mittel der Analysenzahlen: C = 58,46% und H = 6,26%

Präparat 19 «b» (2. Darstellung). Um sicher zu sein, daß die große Schwankung im C-Gehalt keine zufällige einmalige war, stellten wir das Benzoylprodukt des Rinderserumglobulins unter gleichen Umständen nochmals dar. (Präp. 19b).

<sup>1)</sup> Es erscheint mir nach Erfahrungen im Biologischen Institut nicht ausgeschlossen, daß der scheinbare Widerspruch sich dadurch erklärt, daß jenes Serumglobulin noch viel (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> enthielt, aus dem dann die Lauge Ammoniak freigemacht hat, während sie selbst an die Schwefelsäure sich band. Die Benzoylierung spielte sich dann im wesentlichen in ammoniakalischer Lösung ab.

## Verbrennung.

0,2742 g Substanz = 0,1484 g H<sub>2</sub>O und 0,5720 g CO<sub>2</sub>.  
 gefunden: C = 56,88% und H = 6,01%.

## Stickstoffbestimmung.

0,5000 g Substanz = 46,3 ccm <sup>1</sup>/<sub>10</sub>-n-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = 12,96% N  
 0,4372 g Substanz = 39,9 ccm <sup>1</sup>/<sub>10</sub>-n-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = 12,78% N

Mittel aus Präparat 19 «b»:

C = 56,88% N = 12,87%  
 H = 6,01%

Präparat 19 «c». 3. Darstellung. Um das lange Einwirken von Lauge zu vermeiden, wurde die Flüssigkeit rasch benzoyliert. Dann wurde sofort angesäuert (durch H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), um die Lauge unschädlich zu machen, und filtriert. Jedoch mußte nochmals alkalisch gemacht werden, wobei dann die Lauge doch einige Zeit einwirken konnte, bis der Niederschlag filtriert war.

## Verbrennung.

0,1718 g Substanz = 0,0998 g H<sub>2</sub>O und 0,3690 g CO<sub>2</sub>.  
 gefunden: C = 58,57% und H = 6,45%.

Präparat 20. Das Ausgangsmaterial wurde dargestellt durch 4 maliges Fällen mit (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> im Verhältnis von 1 : 1. Das Benzoylglobulin wurde zuletzt nach der üblichen Reinigung noch mit Benzol ausgekocht und im Vakuum getrocknet.

## Verbrennungen.

- 0,3870 g Substanz = 0,2276 g H<sub>2</sub>O und 0,7950 g CO<sub>2</sub>.  
 gefunden: C = 56,02% und H = 6,53%.
- 0,2140 g Substanz = 0,1257 g H<sub>2</sub>O und 0,4408 g CO<sub>2</sub>.  
 gefunden: C = 56,18% und H = 6,53%.

## Stickstoffbestimmung.

0,1952 g Substanz = 19,7 ccm <sup>1</sup>/<sub>10</sub>-n-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = 14,12% N  
 0,1772 g Substanz = 17,6 ccm <sup>1</sup>/<sub>10</sub>-n-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = 13,90% N

Hierzu ist zu bemerken, daß die Substanz für die Stickstoffbestimmung durch Hitze beim Trocknen etwas gelb gefärbt war, sodaß der gefundene N-Gehalt nicht absolut sicher ist.

Präparat 20, Mittel:

C = 56,10% N = 14,01%  
 H = 6,53%

## Benzoylierung bei Anwesenheit von MgO.

Präparat 21. Die dialysierte Globulinlösung wurde mit festem pulverförmigem MgO versetzt, wobei wohl ein kleiner

Teil als  $\text{Mg}(\text{OH})_2$  in Lösung ging und der Flüssigkeit alkalische Reaktion verlieh. Benzoylchlorid setzten wir wieder nur äußerst vorsichtig zu. Beim Absitzenlassen beobachtete man die größeren Körner am Boden des Gefäßes. Neben diesen bildeten sich dann noch größere harte Klumpen, die wahrscheinlich ein Gemenge sind von  $\text{MgO}$  und Globulin, das sich durch lokale saure Reaktion ausscheidet. Nach dem Filtrieren wurde das überschüssige  $\text{MgO}$  durch verdünnte Säure entfernt, welcher Prozeß mehrmals wiederholt wurde. Die übrige Reinigung geschah in derselben Weise wie sonst.  $\text{MgO}$  verhält sich dem Eiweiß gegenüber wie  $\text{NaHCO}_3$ , was die Analysenzahlen beweisen, sodaß auf diese Art ebenfalls konstant zusammengesetzte Verbindungen erhältlich sind.

#### Verbrennung.

0,1464 g Substanz = 0,0898 g  $\text{H}_2\text{O}$  und 0,3034 g  $\text{CO}_2$ .  
 gefunden: C = 56,52% und H = 6,67%.

#### Stickstoffbestimmung.

Die Temperatur ist beim Trocknen auf  $115^\circ$  gestiegen, wobei die Substanz etwas bräunlich verfärbt wurde.

0,3004 g Substanz = 31,2 ccm  $\frac{1}{10}$ -n- $\text{H}_2\text{SO}_4$  = 14,54% N  
 0,2316 „ „ = 23,55 „ „ = 14,24% „

#### Präparat 21, Mittel:

C = 56,52% N = 14,39%  
 H = 6,67%

#### Rinderserumalbumin.

##### a) Benzoylierung in $\text{NaOH}$ .

Präparat 22. Das Albumin läßt sich wie dasjenige aus Pferdeserum mit dem Radikal  $\text{C}_6\text{H}_5\text{CO}$  vereinigen; der Niederschlag besitzt dieselben Eigenschaften wie die andern beschriebenen Körper dieser Art. Das schwankende konstitutionelle Verhalten bei Einwirkung von Lauge zeigen hier die Analysen des verschieden verarbeiteten, aber gleich benzoylierten Ausgangsmaterials deutlich.

#### 1. Darstellung.

0,1794 g Substanz = 0,1046 g  $\text{H}_2\text{O}$  und 0,3940 g  $\text{CO}_2$ ,  
 gefunden: C = 59,89% und H = 6,48%.

## Stickstoffbestimmung.

0,1310 g Substanz = 12,0 ccm  $\frac{1}{10}$ -n- $H_2SO_4$  = 12,83% N.

2. Darstellung: Verdünnte Lauge hat etwa eine Stunde eingewirkt.

Teil « $\alpha$ ». 0,1570 g Substanz = 0,0980 g  $H_2O$  und 0,3376 g  $CO_2$ ,  
gefunden: C = 58,64% und H = 6,93%.

0,1962 g Substanz = 0,1112 g  $H_2O$  und 0,4162 g  $CO_2$ ,  
gefunden: C = 57,85% und H = 6,30%.

## Stickstoffbestimmung.

0,1058 g Substanz = 10,9 ccm  $\frac{1}{10}$ -n- $H_2SO_4$  = 14,42% N

0,2026 » » = 20,45 » » = 14,13% »

Teil « $\beta$ ». 0,2636 g Substanz = 0,1542 g  $H_2O$  und 0,5592 g  $CO_2$ ,  
gefunden: C = 57,75% und H = 6,49%.

## Stickstoffbestimmung.

0,2008 g Substanz = 19,3 ccm  $\frac{1}{10}$ -n- $H_2SO_4$  = 13,45% N

0,1137 » » = 11,2 » » = 13,79% »

## 3. Darstellung.

C = 58,08% N = 14,20%  
H = 6,57%

b) Benzoylierung in  $NaHCO_3$ .

## Präparat 23.

1. 0,1960 g Substanz = 0,1148 g  $H_2O$  und 0,4170 g  $CO_2$ ,  
gefunden: C = 58,03% und H = 6,50%.

2. 0,1474 g Substanz = 0,0898 g  $H_2O$  und 0,3128 g  $CO_2$ ,  
gefunden: C = 57,78% und H = 6,76%.

## Stickstoffbestimmung,

0,1244 g Substanz = 12,1 ccm  $\frac{1}{10}$ -n- $H_2SO_4$  = 13,62% N

0,2112 » » = 20,4 » » = 13,51% »

## Präparat 23, Mittel:

C = 57,91% N = 13,56%  
H = 6,63%

## Präparat 24.

1. 0,0886 g Substanz = 0,1882 g  $CO_2$  und 0,0544 g  $H_2O$ ,  
gefunden: C = 57,87% und H = 6,82%.

2. 0,0948 g Substanz = 0,0520 g  $H_2O$  und 0,2014 g  $CO_2$ ,  
gefunden: C = 57,84% und H = 6,09%.

3. 0,1100 g Substanz = 0,0624 g  $H_2O$  und 0,2324 g  $CO_2$ ,  
gefunden: C = 57,62% und H = 6,34%.

4. 0,0700 g Substanz = 0,0376 g  $H_2O$  und 0,1496 g  $CO_2$ ,  
gefunden: C = 58,28% und H = 5,97%.

## Stickstoffbestimmung.

0,0438 g Substanz = 4,3 ccm  $\frac{1}{10}$ -n-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = 13,74% N.

Präparat 24, Mittel:

C = 57,90% N = 13,74%

H = 6,30%

Auch von diesem Eiweiß sind bei der Benzoylierung in NaHCO<sub>3</sub>-Lösung konstante Verbindungen darstellbar. Auf die Unterschiede der Proteinstoffe verschiedener Tiere werden wir weiter unten zu sprechen kommen.

### Zusammenstellung der Analysenzahlen der benzoylierten Eiweißkörper.

#### 1. Pferdeserumglobulin, benzoyliert in NaHCO<sub>3</sub>.

Präparat	% C	% H	% N	% S	% Asche
6.	56,97	6,76	13,99	—	—
7.	57,24	6,79	13,28	0,73	0,13
8.	57,23	6,66	13,37	—	0,61
9.	57,11	6,67	13,47	—	—
10.	56,93	6,69	13,23	—	—
11.	57,33	6,88	—	—	—
Mittel:	57,13	6,74	13,47	—	0,38

#### 2. Pferdeserumglobulin, benzoyliert in NaOH.

Präparat	% C	% H	% N	% S	% Asche
1.	59,56	6,77	12,44	0,75	0,41
2.	59,06	6,48	12,32	—	—
3.	59,15	7,18	—	—	—
4.	59,39	6,23	12,70	—	—
5.	60,38	6,38	12,39	—	—
Mittel:	59,51	6,61	12,46	—	—

#### Pferdeserumalbumin, benzoyliert in NaHCO<sub>3</sub>.

Präparat	% C	% H	% N	% S	% Asche
12.	58,79	6,64	13,86	—	—
13.	58,20	6,44	13,19	—	0,23
14.	58,36	6,43	12,11	—	—
Mittel:	58,44	6,50	13,39	—	—

## Pferdeserumalbumin, benzoyliert in NaOH.

Präparat	% C	% H	% N	% S	% Asche
15 a.	59,72	6,37	13,47	1,03	—
15 b.	58,19	6,73	—	—	—

Rinderserumglobulin, benzoyliert in NaHCO<sub>3</sub>.

Präparat	% C	% H	% N	% S	% Asche
16.	56,50	6,93	14,31	0,58	0,44
17.	56,68	6,40	13,82	—	—
Mittel:	56,59	6,66	14,06	—	—

## Rinderserumglobulin, benzoyliert in NaOH.

Präparat	% C	% H	% N
18.	56,64	6,96	13,34
19. «a»	58,45	6,26	—
19. «b»	56,88	6,01	12,87
19. «c»	58,57	6,45	—
20.	56,10	6,53	14,01

## Rinderserumglobulin, benzoyliert mit MgO.

Präparat	% C	% H	% N
21.	56,52	6,67	14,39

Rinderserumalbumin, benzoyliert in NaHCO<sub>3</sub>.

Präparat	% C	% H	% N	% S	% Asche
23.	57,95	6,63	13,56	—	—
24.	57,90	6,31	13,74	—	—
Mittel:	57,92	6,47	13,65	—	—

## Rinderserumalbumin, benzoyliert in NaOH.

Präparat	% C	% H	% N	% S	% Asche
22.	59,89	6,48	12,83	—	—
II. {	58,64	6,93	14,27	—	—
	57,85	6,30	—	—	—
b)	57,75	6,49	13,62	—	—

Der Kohlenstoffgehalt des gewöhnlichen Serumalbumins und Serumglobulins liegt ca. 0,3% auseinander (Gürber und Michel<sup>1)</sup> fanden 53,08% C, 7,1% H; Schulz<sup>2)</sup> fand 52,95% C, 6,96% H und Hammarsten<sup>3)</sup> 52,71% C, 7,01% H).

Nach der Benzoylierung in Bicarbonatlösung ist der Abstand rund 1,3% und zwar ist beim Rind und Pferd trotz der Verschiedenheit der Grundzahlen diese Differenz die nämliche.

Daß aber die Zahlen so erheblich auseinander liegen, ist eine besonders wichtige und interessante Erscheinung. Beweist es doch, daß darstellungsmäßig gleiche Eiweißkörper aus dem Blute verschiedener Tierarten bei der Benzoylierung in ihrer Konstitution nachweisbar sich unterscheidende Substanzen liefern.

Gemäß den obigen Tabellen hat das benzoylierte Pferdeserumglobulin einen C-Gehalt von 57,13% — wir betrachten nur die Bicarbonatpräparate —, das benzoylierte Rinderserumglobulin einen solchen von 56,59% im Durchschnitt. Die hier angegebenen Zahlen sind, wie im Texte zu ersehen ist, keine zufälligen Resultate, sondern sie sind, wie das Pferdeserumglobulin, das Mittel aus 8 Verbrennungen 6 verschiedener Präparate, die alle nur um 0,4% differieren. Das Präparat 10 weist die niedrigste Zahl mit C = 56,93% auf. Andererseits ist die C-Zahl für das Rinderserumglobulin mit 56,59% das Mittel aus 3 Verbrennungen von 2 Darstellungen, wovon die höchste Zahl 56,68% betrug. Die Albumine des Blutserums von Pferd und Rind zeigen bei der Benzoylierung ganz ähnliche Verhältnisse; aber nur der Durchschnitt, nicht schon die einzelnen Analysenwerte liefern so eindeutige Ergebnisse wie die Globuline.

Nach dem Ausfall der bekannten biologischen Reaktionen — Präcipitinbildung usw. — hat man bereits mit großer Wahrscheinlichkeit annehmen dürfen, daß die bis dahin als identisch angesehenen Eiweißkörper der einzelnen Tierspezies von ein-

<sup>1)</sup> A. Michel, Sitzungsberichte der Würzburger Phys. Med. Ges., N. F., Bd. 29, S. 117 (1895).

<sup>2)</sup> F. N. Schulz, Diese Zeitschrift, Bd. 25, S. 16 (1898).

<sup>3)</sup> O. Hammarsten, Über das Fibrinogen. Pflügers Archiv f. d. ges. Physiol., Bd. 22, S. 431 (1880).

ander konstitutionell verschieden sind; hier aber liegt der zahlenmäßige, chemische Beweis des Unterschiedes der Zusammensetzung vor. Es ist diese chemisch nachweisbare Differenz im Bau z. B. des Serumglobulins ein äußerst wichtiger Umstand, der auch in Zukunft bei der vergleichenden Bearbeitung der einzelnen Eiweißkörper nicht mehr außer Beachtung bleiben möge.

### Quantitative Bestimmung des eingetretenen Benzoyls.

Um zu erfahren, wieviel Benzoyl in das Eiweißmolekül eingetreten sei, wurde der Benzoyleiweißkörper zerlegt. Es wurde zu diesem Zweck zunächst mit 5%iger Lauge längere Zeit über kleiner Flamme erwärmt. Die Lösung nahm bald eine gelbe Färbung an; das Pulver verschwand und nur noch Flocken schwammen in kleiner Menge suspendiert in der Flüssigkeit herum. Nach etwa 2 Stunden wurde erkalten gelassen und dann verdünnte  $H_2SO_4$  zugegeben bis zur schwach sauren Reaktion. Hierbei war ein Geruch nach  $H_2S$  erkennbar. Die Lösung trübte sich durch ausgeschiedenes Eiweiß und freie Benzoesäure, welche dann mit Äther extrahiert wurde. Die ätherische Lösung wurde mehrmals mit Wasser gewaschen, um etwa mitgerissene Schwefelsäure zu entfernen. Da die Lösung noch schwach gelbe Farbe zeigte und sich diese beim Verdunsten des Äthers noch verstärkte, so wurde die  $C_6H_5COOH$  nochmals mit  $NaOH$  aufgenommen, wie oben frei gemacht und gesammelt.

Für 0,8320 g Substanz wurden gebraucht beim Titrieren mit  $\frac{1}{10}$ -n-NaOH 12,7 ccm. Das entspricht 16,02%  $C_6H_5CO$ .

2. Bestimmung: 0,3666 g Substanz liefern Benzoesäure = 5,75 ccm  $\frac{1}{10}$ -n-NaOH entsprechend 16,46%  $C_6H_5CO$ .

Bei der zweiten Bestimmung war eine Wiederaufnahme der Benzoesäure in Lauge nicht nötig, da die ätherische Lösung wasserhell aussah.

Um zu ermitteln, ob bei dieser Operation auch aus gewöhnlichem Globulin in Äther lösliche Säuren abgespalten würden, wurde Pferdeserumglobulin ebenso mit 5%iger Natron-

lauge behandelt, wobei sich ergab, daß dies tatsächlich in geringem Umfang der Fall ist; denn Lackmuspapier wurde schwach rötlich gefärbt. Wir würden, trotz der Geringfügigkeit dieser Säurekomponente, deshalb die Bestimmungen der Benzoesäure nicht weiter bewertet haben, wenn nicht die direkt gefundenen Zahlen mit den aus der Kohlenstoffabnahme berechneten genau übereinstimmten. Wir werden darauf später näher eingehen.

Weil das Laugenverfahren andere Verbindungen lieferte, als die Eiweißlösung in  $\text{NaHCO}_3$ , so war es denkbar, daß einmal nur die  $\text{NH}_2$ -Gruppen, das andere Mal diese und die OH- resp. COOH-Gruppen benzyliert werden. Um uns darüber Aufschluß zu verschaffen, ließen wir unter ganz denselben Bedingungen Benzoylchlorid einmal auf  $\text{p-C}_6\text{H}_4\begin{matrix} \text{OH} \\ \text{NH}_2 \end{matrix}$  in NaOH und  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung einwirken, wobei wir 2 Präparate erhielten mit genau demselben Schmelzpunkt (nach UmkrySTALLISIEREN in Wasser), sodaß also die beiden Darstellungen identisch sind. Denselben Versuch wollten wir mit Tyrosin ausführen, jedoch fiel das Benzoyltyrosin nur in ganz geringer Menge aus, wahrscheinlich ist dasselbe in Wasser etwas löslich. Jedenfalls macht es der erste Versuch unwahrscheinlich, daß einmal nur die OH-Gruppe, ein anderes Mal diese und die Aminogruppe Benzoyl aufnehmen; jedoch können wir auf Grund dieses einen Versuches hierüber nichts Abschließendes aussagen. Auch mit Amidoessigsäure stellten wir einen vergleichenden Versuch der Benzoylierung an; die Benzoylierung in  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung lieferte ebenso wie das Laugeverfahren Hippursäure.

Es drängte sich die Frage auf, ob fertige Bicarbonatpräparate beim Aufschwemmen in verdünnter NaOH und neuerlichem Zugeben von  $\text{C}_6\text{H}_5\text{COOH}$  verwandelt werden in Körper mit höherem C-Gehalt, also in Laugenpräparate? Von vornherein konnte vermutet werden, daß dies nicht der Fall sei, denn wenn einmal die Vereinigung stattgefunden hat und das Reaktionsprodukt unlöslich geworden ist, dann kann kaum mehr eine Umsetzung vor sich gehen. Das Experiment be-

stätigte die Vermutung, indem die Lauge nur spaltend einwirkte, sodaß der C-Gehalt zwar etwas stieg, jedoch in inkonstanter Weise.

### Umrechnungen.

Behufs quantitativer Bestimmung der in die Eiweißmolekel eintretenden Benzoylreste führten wir die oben angegebene Abspaltung der Benzoesäure mittels NaOH aus; fernerhin versuchten wir die quantitative Benzoylierung einer Eiweißlösung von bekanntem Gehalt. Das letztere Verfahren ergab trotz vorsichtiger Arbeitsweise keine zuverlässigen Werte. — Es läßt sich aber die Menge des Radikals  $C_6H_5CO$  unter der Voraussetzung, daß das Eiweißmolekül bei der Benzoylierung im übrigen unversehrt geblieben ist, durch Rechnung aus der Kohlenstoffveränderung ermitteln.

Diese rechnerische Ermittlung geschieht nach dem System der sogenannten Mischungsrechnungen. Gefragt ist: «Wie viel Gramm Benzoyl sind in 100 g Benzoyleiweiß enthalten?» Die Gleichung für den Kohlenstoffgehalt ist folgende:

$$\begin{array}{l} x \text{ g Benzoyl enthalten } 0,8 \times x \text{ g C} \\ (100-x) \text{ g Eiweiß } \quad \quad \quad 0,527 \cdot (100-x) \text{ g C} \\ \text{ausgehend davon, daß} \end{array}$$

1 g  $C_6H_5CO$  enthält 0,8 g C und 1 g Globulin enthält 0,527 g C.  
(Hammarsten C = 52,7%).

Die bei der Reaktion erhaltenen 100 g Benzoylglobulin (Pferd) enthalten 57,1 g C. Die Gleichung lautet also:

$$\begin{aligned} (100-x) \cdot 0,527 \text{ g} + 0,8 x &= 57,1 \\ 52,7 - 0,527 x + 0,8 x &= 57,1 \\ 0,273 x &= 4,4 \\ x &= \frac{4,4}{0,273} = 16,11 \text{ g } C_6H_5CO. \end{aligned}$$

In 100 g Benzoylglobulin sind also 16,11 g Benzoyl enthalten (direkt bestimmt 16,02% und 16,46%). Um aus der Zunahme des Kohlenstoffes die Abnahme des Stickstoffgehaltes berechnen zu können, müssen wir erst erfahren, wie viel von dem Radikal  $C_6H_5CO$  zu 100 g gewöhnlichem Pferdeserumglobulin in Verbindung treten.

Es verbinden sich:

$$83,89 \text{ g Eiweiß mit } 16,11 \text{ g } \text{C}_6\text{H}_5\text{CO};$$

$$\text{mit } 100 \text{ g E. also } \frac{16,11 \times 100}{83,89} = 19,20 \text{ g.}$$

Zu dieser Zahl gelangen wir auch direkt als Lösung der Gleichung

$$52,7 + 0,8 x = (100 + x) \cdot 0,571$$

$$x = 19,20 \text{ g.}$$

Wenn in 100 g gewöhnlichem Eiweiß nun 15,83 g N enthalten sind (Zahl nach Hammarsten, Blum, Hausmann)

$$\begin{array}{l} \text{und in } 19,2 \text{ g } \text{C}_6\text{H}_5\text{CO} \quad = \quad 0,0 \text{ g N,} \\ \text{so sind in } 119,2 \text{ g Benzoylglobulin auch } 15,83 \text{ g N} \\ \text{in } 100,0 \text{ g aber} \quad \quad \quad 13,28 \text{ g N} \\ \text{also } 13,28\% \text{ N.} \end{array}$$

Diese durch Rechnung ermittelte Zahl stimmt mit dem Mittel aus den gefundenen Zahlen für N = 13,34% (ohne Einreihung von Präparat 6) sehr gut und 13,47% bei Einschluß dieses Präparates immer noch genügend überein.

#### Molekulargewicht.

$$\begin{array}{l} \text{Zu } 16,11 \text{ g } \text{C}_6\text{H}_5\text{CO} \text{ gehören } 83,89 \text{ g Eiweiß;} \\ \text{zur Molekularzahl } 105 \quad \frac{83,89 \cdot 105}{16,11} = 546,8. \end{array}$$

Bei der Annahme, daß eine Benzoylgruppe in die Eiweißmolekel eintrete, ergibt sich als Molekulargewicht des Globulins die Zahl 547 als Mindestgröße. Wahrscheinlich treten jedoch mindestens 5 Benzoylgruppen ein; damit wäre dann das Molekulargewicht auf 2735 zu setzen (Rinders.-Alb. 2774: siehe bei den Benzoyljodeiweißkörpern).

Aus der Abnahme des Stickstoffgehaltes läßt sich umgekehrt auch die Kohlenstoffzunahme berechnen. In 100 g gewöhnlichem Pferdeserumglobulin sind  $100 \cdot 0,1583$  g N enthalten. Tritt noch N-freies Benzoyl hinzu (x g), so haben wir  $(100 + x)$  g Benzoylprodukt, das nach den Analysenzahlen  $(100 + x) \times 0,1334$  g N enthält; folglich gilt wieder die Gleichung:  $100 \cdot 0,1583 + 0 \cdot x = (100 + x) 0,1334$ , woraus  $x = 18,67$  die Anzahl Gramm Benzoyl angibt, die sich mit 100 g Eiweiß verbinden. Diese 18,67 g  $\text{C}_6\text{H}_5\text{CO}$  enthalten 14,94 g Kohlenstoff.

100,00 g Pferdeserumglobulin enthalten	52,71 g C
18,67 > Benzoyl, die hinzutreten	14,94 > C
<hr/>	
118,67 g Benzoylprodukt enthält	67,65 g C
100 g also: 57,00 g,	

eine Zahl, die mit dem Mittel 57,13% übereinstimmt. Auch durch andere Überlegung noch gelangt man zu derselben Zahl: 15,83 g N sind in 100 g Pferdeserumglobulin; 13,34 g sind in 84,27 g Globulin. Es sind also in 84,27 g Globulin gleichviel Gramm Stickstoff wie in 100 g Benzoylglobulin; der Rest also von 84,27 auf 100 g sind N-freie Substanz, also in 100 g Benzoylglobulin sind 15,73 g Benzoyl. Durch Zweisatzrechnung erhalten wir die Menge Benzoyl, die zu 100 g Globulin treten mit 18,66 g.

$$\text{In 100 g also } \frac{67,64 \cdot 100}{118,66} = 57,03 \text{ g (gefunden 57,13\%)}.$$

Wie oben ergibt sich dann wieder die Zahl 57,0% C.

#### Berechnung des Wasserstoffgehalts.

100,00 g Globulin	enthalten	7,01 g H
18,66 > Benzoyl (s. o.)	>	0,89 > H
<hr/>		
118,66 g Benzoylglobulin		7,90 g H.
100 g	$\frac{7,9 \cdot 100}{118,66}$	= 6,66 g (gefunden 6,74% H).

Umgekehrt erhält man bei Zugrundelegung der Zahl N = 13,34 für das Ausgangsmaterial die Stickstoffzahl 15,90%; denn 100 g Benzoylglobulin setzen sich zusammen aus Globulin (83,89 g) und N-freier Substanz (Benzoyl) 16,11 g, wiederum abgeleitet aus der C-Veränderung. Die in 100 g Benzoylglobulin enthaltenen 13,34 g N sind also allein in jenen 83,89 g des N-haltigen Teiles (unverändertes Globulin). 100 g dieses Anteils d. i. des unveränderten Globulins würden also enthalten:

$$\frac{13,34 \cdot 100}{83,89} = 15,90 \text{ g.}$$

#### Analytische Daten der Ausgangsmaterialien.

Zur Analysierung der Eiweißkörper wurden die wässrigen ammoniumsulfathaltigen Lösungen mit Essigsäure angesäuert und

gekocht, wobei das Eiweiß koaguliert und ausfällt. Das vollständige Befreien von den letzten Spuren des Ammoniumsulfates brauchte stets längere Zeit, oft mehrtägige Behandlung mit kochendem Wasser. Erst wenn selbst in größeren Mengen des Filtrates beim Zusatz von  $\text{BaCl}_2$  keine Spur einer Trübung oder einer Opaleszenz nach ca. 10 Minuten mehr sichtbar war, wurde mit dem Waschen aufgehört. Nachher wurde bei  $105^\circ$  bis zur Konstanz getrocknet. Einige der koagulierten Eiweißkörper wurden im feuchten Zustande mit Alkohol gekocht, damit das Trocknen rascher vonstatten gehe.

Der Stickstoffgehalt betrug nun bei

Pferdeserumglobulin:	14,64 % N	
»	14,71 % »	
Rinderserumglobulin:	15,12 % »	
»	15,33 % »	
»	15,35 % »	
»	15,36 % »	
»	15,45 % »	
»	15,49 % »	
»	15,19 % »	
»	15,12 % »	
Pferdeserumalbumin:	15,49 % N	15,30 % N
»	15,83 % »	15,30 % »
Rinderserumalbumin:	15,05 % »	15,12 % N
»	15,29 % »	

Mittel:

Pferdeserumglobulin:	14,67 % N
Rinderserumglobulin:	15,30 % »
Pferdeserumalbumin:	15,37 % »
Rinderserumalbumin:	15,13 % »

Die Zahlen liegen gegenüber denjenigen der Literatur alle etwas niedrig. Wir stellten deshalb, weil wir die Anwesenheit von Fibrinogen bei den Globulinen und Mucoïd bei den Albuminen für möglich hielten, davon befreite Eiweißkörper dar. Das Fibrinogen wurde zu beseitigen gesucht durch Verwendung möglichst klaren Serums als Ausgangsmaterial und durch langes Dialysieren der Eiweißlösungen,

wobei eventuell noch vorhandenes Fibrinogen zur Ausscheidung gelangen soll. Nachher wurde das Globulin mit weniger als dem gleichen Volumen  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung ausgesalzen. Mucoidfreies Pferdeserumalbumin stellten wir dar durch 4tägiges Dialysieren und Koagulieren mit  $\text{CH}_3\text{COOH}$ . Jedoch ist hier die völlige Abwesenheit von Mucoid fraglich. Beim Rinder-serumalbumin fällten wir mit  $\text{HCl}$ . Gewöhnliches Rinder-serumalbumin wurde gelöst, 8 Tage lang dialysiert und mit  $\text{HCl}$  gefällt. Der Niederschlag wurde in  $\text{NaHCO}_3$  aufgenommen und nun mit Essigsäure gefällt. Nun wurden folgende Zahlen gefunden:

Fibrinogenfreies Pferdeserumglobulin:

14,61 % N      14,75 % N.

Mucoidfreies Pferdeserumalbumin:

15,57 % N      15,65 % N      15,55 % N.

Rinder-serumalbumin:

15,16 % N      15,29 % N      15,13 % N.

Da sowohl Blum durch Umrechnung der nach der Blum-Vaubelschen Methode dargestellten Jod-Eiweißkörper, wie wir hier bei den benzoylierten Eiweißen auf die Zahl  $N = 15,8$  für gewöhnliches Globulin kamen, so müssen wir annehmen, daß beim Koagulieren und besonders bei dem langen Auskochen mit Wasser Stickstoff abgespalten wird, während dies beim Benzoylieren in  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung in der Kälte und der nachträglichen Reinigung der Benzoyleiweißkörper nicht stattfindet.

Bei der Wichtigkeit der Klarstellung dieses Punktes haben wir das Ausgangsmaterial noch auf eine weniger eingreifende Weise von dem beigemengten Ammonsulfat befreit und zur Analyse gebracht. Es wurde die jeweilige Eiweißlösung zuerst längere Zeit — bis zu 10 Tagen — gegen fließendes Wasser dialysiert und die klare Lösung alsdann mit einigen Tropfen Essigsäure und einem gleichen Volumen von Aceton versetzt und kurz im Wasserbad erhitzt, bis eine ausgiebige Koagulation eingetreten war. Hierauf wurde mit Wasser von  $60^\circ \text{C}$ . aus dem Niederschlag alles Ammonsulfat gewegewaschen; dann nochmals mit Aceton oder Alkohol entwässert und nunmehr

getrocknet. Die in dieser Weise behandelten Eiweißkörper ergaben folgenden N-Gehalt:

#### Pferdserumglobulin.

Präparat a: 14,85—15,02—15,13% N. Mittel: 15,00% N (Asche 0,57%).

› b: 15,15% N.

› c: 15,14—14,97%. Mittel: 15,06% N.

Mittel der 3 Darstellungen: 15,07% N.

#### Rinderserumglobulin.

Präparat a: 15,52—15,76—15,64% N. Mittel: 15,64% N (Asche 0,8%).

› b: 15,62—15,66% N. › : 15,64% N.

› c: 15,74—15,52% › › : 15,63% ›

› d: 15,83% N.

› e: 15,88% ›

Mittel der 5 Darstellungen: 15,72% N.

#### Pferdeserumalbumin.

Präparat a: 15,85—15,97—15,94% N. Mittel: 15,92% N (Asche 0,64%).

› b: 15,72—16,04—15,82% › › : 15,86% ›

› c: 15,70% N.

Mittel der 3 Darstellungen: 15,82% N.

#### Rinderserumalbumin.

Präparat a: 15,93% N (Asche 0,51%).

› b: 15,92% › ( › 0,58%).

Mittel: 15,93% N.

Es war also tatsächlich durch die lange Behandlung mit siedendem Wasser eine Abspaltung von Stickstoff — wohl eine Desamidierung — eingetreten; die mildere Art der Reinigung hat zu Präparaten geführt, die in ihrem N-Gehalt den aus den Berechnungen hergeleiteten Erwartungen wesentlich mehr entsprechen.

## 2. Teil.

### Benzoyleiweißkörper.

#### A. Jodalbumine.

Die Umrechnung der Zahlen bei den benzoylierten Albuminen und Globulinen in benzoylfreies Eiweiß ergab uns wohl einen Mindestwert für die Molekelgröße, jedoch ist auf Grund der bisherigen Zahlen noch nicht abzuleiten, ob eine oder mehrere Benzoylgruppen eintreten. Je nachdem wäre

dann jener Mindestwert zu vervielfachen, also z. B. beim Pferdeserumglobulin  $x \times 547$ . Die Einfügung von Jod und Benzoyl in das gleiche Molekül ließ eine weitere Aufklärung dieser Frage erwarten. Da die Benzoyleiweiße unlöslich sind, so mußte das Jod zuerst eingeführt werden.

Nach der Blum-Vaubelschen Methode<sup>1)</sup> jodiert, ergeben nur die Albumine lösliche Verbindungen; die Globuline fallen aus und eignen sich deshalb für die nachherige Benzoylierung nicht mehr. Interessant ist die Tatsache, daß die Jodalbumine andere Fällungserscheinungen zeigen als ihre Muttersubstanzen. Während nämlich die Lösung letzterer, mit  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  im Verhältnis von 1:1 versetzt, noch nicht ausfallen und erst zu diesem Behuf angesäuert werden müssen, genügt schon bei den jodierten Albuminen der Zusatz des halben Volumens  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung, also eine Drittelsättigung. Die jodierten Eiweißverbindungen wurden stets zuerst mit NaOH auf ganz kurze Zeit alkalisch gemacht und hiernach mit Essigsäure ausgefällt. Dadurch wird das notwendig im Überschuß anwesende Jod gebunden. Dieser Prozeß wurde in der Mehrzahl der Fälle wiederholt, weil beim Ansäuern immer wieder etwas Jod freigemacht wurde und den Eiweißniederschlag verunreinigte. Nachdem jedes freie Jod beseitigt war, wurde in Wasser gelöst und mit der Hälfte des Volumens  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung versetzt, wodurch das Jodalbumin fast quantitativ ausfällt. Vor dem Benzoylieren nach unserer oben besprochenen Methode wurde jeweils dialysiert. Die Reaktion zwischen Benzoylchlorid und Jodalbumin bei Gegenwart von  $\text{NaHCO}_3$  verläuft viel langsamer und durchaus nicht so quantitativ wie bei den genuinen Albuminen. Die zu Beginn der Benzoylierung gelbe Farbe wird allmählich heller und heller, bis sie fast farblos ist, und wieder ist der charakteristische Mandelgeruch bemerkbar. Die gereinigten und getrockneten Präparate haben aber alle ein gelbes Aussehen. Unter dem Mikroskop ist das Bild dasselbe wie bei den schon besprochenen Benzoyleiweißkörpern; jedoch sind die Globuliten selten so wohl ausgebildet wie dort.

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 28, S. 291.

## 1. Benzoyl-Jod-Pferdeserumalbumin.

Ausgangsmaterial: Maximal jodiertes Pferdeserumalbumin. Hiervon wurde keine Analyse gemacht; dagegen wurden zwei andere Proben desselben Pferdeserumalbumins maximal jodiert und diese analysiert.

## Präparat 25a (Jodalbumin).

Jodbestimmung (Carius).

0,3540 g Substanz = 0,0620 g AgJ = 9,46% Jod.

Stickstoffbestimmung.

0,3798 g Substanz = 36,8 ccm  $\frac{1}{10}$ -n-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = 13,56% N.

Das Präparat gleicher Darstellung lieferte die Analysen:

## Präparat 25b:

0,9316 g Substanz lieferten 0,0907125 g J = 9,73% J

0,9090 » » » 0,0892692 » » = 9,71% »

0,5070 » » » 0,06972 » N = 13,75% N

0,4246 » » » 0,05852 » » = 13,78% »

Mittel aus Präparat 25b: N = 13,76%, J = 9,72%.

Mittel aus a und b: N = 13,66%, J = 9,59%.

## Präparat 26 (benzoyliertes Jodalbumin):

1. 0,1610 g Substanz = 0,3048 g CO<sub>2</sub> und 0,0872 g H<sub>2</sub>O.

C = 51,64% und H = 6,02%.

2. 0,2078 g Substanz = 0,3976 g CO<sub>2</sub> und 0,1218 g H<sub>2</sub>O.

C = 52,18% und H = 6,51%.

3. 0,0628 g Substanz = 0,1186 g CO<sub>2</sub> und 0,0286 g H<sub>2</sub>O.

C = 51,50% und H = 5,06%.

Stickstoffbestimmung.

0,2076 g Substanz = 20,0 ccm  $\frac{1}{10}$ -n-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = 13,51% N

0,2020 » » = 19,7 » » = 13,65% »

0,1828 » » = 17,6 » » = 13,48% »

Jodbestimmung.

Carius: 0,1602 g = 0,0246 g AgJ entsprechend 8,29% J

Schmelze: 0,1648 » = 0,01366735 g Jod » 8,29% »

Schwefelbestimmung.

0,1602 Substanz (Cariusbestimmung des Schwefels neben dem Jod)

= 0,0092 g BaSO<sub>4</sub> = 0,79% S.

Mittel aus Präparat 26.

C = 51,77% N = 13,55%

H = 5,86% J = 8,29% S = 0,79%.

Präparat 27. Ausgangsmaterial hierzu war Pferdeserumalbumin. Von der Lösung des jodierten Pferdeserumalbumins wurde eine kleine Probe entnommen und mit (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

und Essigsäure koaguliert. Der Niederschlag wurde solange mit heißem Wasser ausgewaschen, bis im Filtrat mit  $\text{BaCl}_2$  keine Trübung mehr entstand. Dann wurde bei  $100^\circ$  bis zur Konstanz getrocknet.

## Ausgangsmaterial.

0,4214 g Substanz lieferten 0,0428714 g Jod (Schmelze) entspr. 10,17% Jod.  
0,2594 » » brauchten 26,2 ccm  $\frac{1}{10}$ -n- $\text{H}_2\text{SO}_4$  = 14,14% N.

## Benzoylprodukt.

0,0810 g Substanz = 0,1508 g  $\text{CO}_2$  und 0,0432 g  $\text{H}_2\text{O}$ .

C = 50,77% und H = 5,93%.

0,0842 g Substanz = 8,4 ccm  $\frac{1}{10}$ -n- $\text{H}_2\text{SO}_4$  = 13,96% N.

Jodbestimmung verloren gegangen.

Präparat 28. Gewöhnliches Pferdeserumalbumin in  $\text{NaHCO}_3$  maximal jodiert.

## Jodbestimmung.

0,3456 g Substanz liefern 0,0299728 g Jod = 8,67% J

0,3616 » » » 0,03048 » » = 8,43% »

## Stickstoffbestimmung.

0,1870 g Substanz = 18,7 ccm  $\frac{1}{10}$ -n-Säure = 14,00% N

0,2328 » » » = 24,0 » » = 14,43% »

Mittel: N = 14,21% und J = 8,55%.

Benzoylprodukt hiervon:

## Verbrennung.

0,0484 g Substanz = 0,0916 g  $\text{CO}_2$  und 0,0280 g  $\text{H}_2\text{O}$ .

C = 51,62% und H = 6,43%.

## 2. Benzoyl-Jod-Rinderserumalbumin.

Präparat 29. a) Ausgangsmaterial:

0,5000 g Substanz lieferten 0,04623 g Jod, entsprechend 9,24% Jod.

Die Substanz zu dieser Analyse wurde aus ihrer Lösung mittels Essigsäure zur Ausscheidung gebracht. Um einen eventuellen Unterschied zu konstatieren zwischen dem Produkt, das aus saurer Lösung ausfällt, und dem durch Drittelsättigung mit  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  erhaltenen, wurde ein anderer Teil nach dieser Weise gefällt und analysiert. Hiervon lieferten 0,4036 g Substanz 0,03848 g Jod, das sind 9,53% Jod. Die Substanzen dürften hiernach einheitlich sein.

0,3652 g Substanz = 36,8 ccm  $\frac{n}{10}$ -Säure; folglich 14,11% N.

Mittel der Zahlen: J = 9,38% und N = 14,11%.

## b) Benzoylprodukt:

## Verbrennung.

0,0790 g Substanz = 0,1494 CO<sub>2</sub> und 0,0432 g H<sub>2</sub>O.

C = 51,57% und H 6,08%.

## Stickstoffbestimmung.

0,1020 g Substanz = 9,8 ccm  $\frac{1}{10}$ -n-Säure = 13,45% N.

## Jodbestimmung.

Carius: 0,1048 g Substanz 0,0150 g AgJ, daraus berechnet 7,73% J

Schmelze: 0,0968 g Substanz 0,0074529 g J, daraus berechnet 7,70% J

## Schwefelbestimmung.

0,1048 g Substanz = 0,0026 g BaSO<sub>4</sub>, entsprechend 0,34% S.

## Präparat 29 (Benzoylprodukt), Mittel:

C = 51,57% J = 7,71% S = 0,34%.

H = 6,08% N = 13,45%.

## Präparat 30. a) Ausgangsmaterial:

1. Säurefällung: 0,2578 g Substanz = 0,0252 g J = 9,79% J

2. Drittelsättigung: 0,2040 g Substanz = 0,018644 g J = 9,14% J

## Stickstoffbestimmung.

0,0970 g Substanz = 10,0 ccm  $\frac{1}{10}$ -n-Säure = 14,43% N.

Mittel: J = 9,46% und N = 14,43%.

## b) Benzoylprodukt:

## Verbrennung.

0,0598 g Substanz = 0,1128 g CO<sub>2</sub> und 0,0354 g H<sub>2</sub>O.

C = 51,44% und H = 6,58%.

## Stickstoffbestimmung.

0,1254 g Substanz = 12,2 ccm  $\frac{1}{10}$ -n-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = 13,62 N.

## Jodbestimmung.

Carius: 0,1010 g Substanz = 0,0140 g AgJ = 7,49% J.

## Zusammenstellung.

## Benzoyl-Jod-Pferdeserumalbumin.

Präparat	C	H	N	J	S	Bemerkung
Ausgangsmaterial zu 25.	—	—	13,66	9,59	—	Nicht benzoiliertes Jodalbumin.
27.	—	—	14,14	10,17	—	
28.	—	—	14,21	8,55	—	
26.	51,77	5,86	13,55	8,29	0,79	
27.	50,77	5,93	13,96	—	—	
28.	51,62	6,43	—	—	—	

## Benzoyl-Jod-Rinderserumalbumin.

Präparat	C	H	N	J	S
Ausgangsmaterial zu 29.	—	—	14,11	9,38	—
„ „ 30.	—	—	14,43	9,42	—
29.	51,57	6,08	13,45	7,71	—
30.	51,44	6,58	13,62	7,49	—
Mittel:	51,51	6,33	13,53	7,61	—

## Umrechnungen und Mindestgröße des Eiweißmoleküls.

100g jodiertes und benzoyliertes Rinderserumalbumin enthalten 51,51g C und 13,53g N neben 7,61g Jod. Denkt man sich von diesen 100g das Jod herausgenommen (7,61g), so bleiben 92,39g jodfreies Benzoylalbumin mit ebenfalls 51,51g C und 13,53g N.

100g solchen jodfreien Benzoylalbumins enthalten dann:

$$\frac{51,51 \cdot 100}{92,39} = 55,75 \text{ g C und } \frac{13,53 \cdot 100}{92,39} = 14,64 \text{ g N.}$$

Bezeichnen wir wieder die Menge Benzoyl, die zu 100g Eiweiß hinzutritt und berechnet werden soll mit  $x$ , so treten zu  $100 \cdot 0,5304$ g C des Ausgangseiweißes (siehe Cohnheim) noch  $0,8 \cdot x$ g C (Kohlenstoffgehalt von  $x$  Gramm)  $C_6H_5CO$ .  $(100 + x)$ g jodfrei gedachten benzoylierten Albumins ihrerseits enthalten  $(100 + x) \cdot 0,5575$ g C; woraus sich für die Berechnung folgende Gleichung ergibt:

$$100 \cdot 0,5304 + 0,8 x = (100 + x) \cdot 0,5575$$

$$\text{also } x = 11,17 \text{ g.}$$

11,17g  $C_6H_5CO$  treten demnach zu 100g Eiweiß.

Wenn in 100g jodfrei angesetzttem Benzoyleiweiß 14,64g N enthalten sind (siehe oben), so sind in 111,17g ebensolchem

$$\frac{14,64 \cdot 111,17 \text{ g}}{100} = 16,27 \text{ g N.}$$

Diese 111,17g benzoyliertes Albumin setzen sich nun aber nach Obigem zusammen aus 100g gewöhnlichem Albumin und 11,17g N-freiem Benzoyl. Folglich enthalten 100g Rinderserumalbumin hiernach 16,27g, also 16,27% N.

16,18 und 16,33% N-Gehalt für Rinderserumalbumin ist früher von dem einen von uns (Blum) veröffentlicht worden. Neuerdings fanden wir (s. o.) den N-Gehalt bei 15,93%. Für Albumine ohne Benennung der Abstammung des Blutserums haben Schulz, Hofmeister und Michel Werte von 15,71 bis 16,04% N angegeben. Wenn, wie oben berechnet, in 111,17 g jodfreiem Benzoylprodukt 11,17 g Benzoyl enthalten sind, so sind in

$$92,39 \text{ g} = \frac{11,17 \cdot 92,39}{111,17} = 9,28 \text{ g Benzoyl.}$$

100 g Benzoyl-Jod-Rinderserumalbumin enthalten also 7,61 g Jod und 9,28 g Benzoyl.

Umgekehrt läßt sich der Kohlenstoffgehalt des gewöhnlichen Rinderserumalbumins berechnen zu 53,16%, wenn der Stickstoffgehalt zu 16,2% angenommen wird.

16,2 g N sind in 100 g E.: 14,64 g N (s. o. die Zahlen für das jodfrei berechnete Benzoylalbumin) sind demnach in 90,37 g enthalten. Der Rest bis 100 g ist also N-freies Benzoyl; nämlich 9,63 g. Diese sind neben den 90,37 g Eiweiß in 100 g jodfreiem Benzoylprodukt enthalten. Zu 100 g treten folglich 10,65 g Benzoyl. Bezeichnen wir die gesuchte Anzahl von Grammen Kohlenstoff, die in 100 g gewöhnlichem Rinderserumalbumin enthalten sind, mit x, so hat die Gleichung zu lauten:  $100 \cdot 0,01 x + 0,8 \cdot 10,65 = 110,65 x 0,5575$ ; woraus  $x = 53,16\%$  C resultiert. Diese Zahl stimmt mit dem Analysenwert fast genau.

## Berechnung des Molekulargewichts.

### a) aus dem Jodgehalt:

x bedeutet das gesuchte Molekulargewicht.

#### 1. Benzoyl-Rinderserumalbumin.

$7,61 : 92,39 = 127 : x$ , woraus x sich berechnet zu 1542 Mindestgröße.

#### 2. Rinderserumalbumin.

$7,61 : (100 - 7,61 - 9,28) = 127 : x$ , daraus  $x = 1387$  Mindestgröße, woraus für Benzoyl — 155 verbleibt.

Diese Zahl sagt uns, daß für je 127 g Jod, 155 g  $C_6H_5CO$ , für 1 Atom J —  $1\frac{1}{2}$  Radikale  $C_6H_5CO$  oder auf 2 Atome Jod — 3 Atome Benzoyl kommen.

b) aus dem eingetretenen Benzoyl.

Für das Rinderserumalbumin gilt gemäß Obigem:

$$9,28 : 83,11 = 105 : x.$$

$$x = 940.$$

Wenn «1387» die aus dem Jodgehalt berechnete Mindestgröße darstellt, so liegt dem zugrunde der Eintritt von 1 Atom Jod in das Eiweißmolekül. Da nun auf je 1 Atom Jod  $1\frac{1}{2}$  Benzoylradikale berechnet sind, so muß, da auch das Radikal Benzoyl nicht geteilt eintreten kann, die Formel «1387» mindestens verdoppelt werden. «2774» bedeutet also die 2 Atomen Jod und 3 Benzoyl entsprechende geringstmögliche Molekulargröße für das Rinderserumalbumin.

Da bei dem Pferdeserumalbumin die gefundenen Werte nicht einheitlich gewesen sind und bei dem einen Präparat nicht das Ausgangsmaterial selbst, sondern nur eine Schwester-substanz geprüft werden konnte und im anderen Falle die Jodzahl für eine noch nicht maximale Jodierung spricht, so müssen hier die Berechnungen einstweilen unterbleiben.

## II. Einwirkung von Chlorkohlensäureester und Benzolsulfochlorid auf Rinderserumglobulin.

Um zu zeigen, daß die Reaktion zwischen Eiweißstoffen und Benzoylchlorid nicht nur mit diesem, sondern auch mit andern Säurechloriden vor sich geht, machten wir einen Versuch mit Chlorkohlensäure, die wir in der Form des Äthyl-esters anwandten. Die beiden Stoffe reagieren ziemlich langsam auf einander und das resultierende Produkt bildet nicht so schöne Kugeln, sondern ist in Flockenform in der Flüssigkeit verteilt. Erst beim Kochen mit Alkohol wird die Substanz pulverförmig. Die Farbe gleicht derjenigen der Benzoyleiweißkörper, vielleicht ist sie noch etwas weißer. Gereinigt wurde die Verbindung wie die ersteren. Das Auskochen in Alkohol war wieder am wirksamsten.

### Präparat I.

#### Verbrennungen.

0,3132 g Substanz = 0,1954 g H<sub>2</sub>O und 0,6078 g CO<sub>2</sub>.

C = 52,92% und H = 6,93%.

0,2596 g Substanz = 0,1630 g H<sub>2</sub>O und 0,5074 g CO<sub>2</sub>.

C = 53,30% und H = 6,96%.

## Stickstoffbestimmung.

0,3472 g Substanz = 33,2 ccm  $\frac{1}{10}$ -n-Säure = 15,40 % N

0,4090 „ „ = 45,1 „  $\frac{1}{10}$ -n- $H_2SO_4$  = 15,43 % „

Schwefel (Carius): 0,4918 g Substanz = 0,0262 g  $BaSO_4$  = 0,73 % S.

Asche: 0,4322 g Substanz = 0,0006 g = 0,14 % Asche.

Mittel: C = 53,11, H = 6,95, N = 15,42, S = 0,73; Asche = 0,14 %.

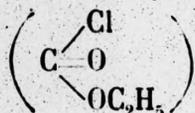
Um die Zahlen zu kontrollieren, stellten wir diese Verbindung nochmals dar aus vorher fibrinogenfrei gemachtem Rinderserumglobulin (siehe hierzu Kapitel: Analytische Daten der Ausgangsmaterialien). Da jedoch die Ausbeute gering ausfiel, reichte die Substanz nur zu einer Verbrennung, die etwas höhere Zahlen lieferte als diejenigen von I.

## Präparat II.

0,1474 g Substanz = 0,0960 g  $H_2O$  und 0,2900 g  $CO_2$ .

C = 53,65 % und H = 7,24 %.

Der eintretende Teil  $COOC_2H_5$  des Chlorkohlensäureesters



hat einen Kohlenstoffgehalt von 49,32 %; es ist also sowohl durch Überlegung als Umrechnung leicht zu zeigen, daß durch Eintritt desselben der C-Gehalt des Eiweißes nicht steigen darf, wie dies geschehen ist, sondern daß das Produkt weniger Kohlenstoff enthalten muß als das Ausgangsmaterial, natürlich prozentual gedacht. Aus der Stickstoffabnahme ergibt sich, daß die Prozentzahl für C etwa 52,6 sein sollte. Es läßt sich deshalb mit Sicherheit sagen, daß der vermutete Körper entweder noch unrein oder schon gespalten war.

Auch Benzolsulfochlorid tritt mit Rinderserumglobulin bei Gegenwart von  $NaHCO_3$  in Reaktion; es resultiert ein amorpher unlöslicher Körper. Seine Analysierung ergab:

1. 0,3700 g Substanz = 0,7062 g  $CO_2$  und 0,2212 g  $H_2O$ .

C = 52,05 % und H = 6,64 %.

2. 0,2700 g Substanz = 0,5202 g  $CO_2$  und 0,1620 g  $H_2O$ .

C = 52,55 % und H = 6,67 %.

Mittel: C = 52,30 % und H = 6,66 %.

## Stickstoffbestimmung.

1. N = 14,25 %. 0,4600 g Substanz mit 0,06552 g N.

2. N = 14,17 %. 0,4358 „ „ „ 0,06174 „ „

Mittel: 14,21 %.

## Schwefelbestimmung (Carius).

S = 3,70%. 0,2466 g Substanz mit 0,0666 BaSO<sub>4</sub>.

Dem Absinken des Stickstoffs von 15,8% auf 14,21% entspricht der Eintritt von 10,12% C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>SO<sub>2</sub> in das Molekül. Hieraus würde bei der Annahme, das mit NaHCO<sub>3</sub> behandelte Rinderserumglobulin enthalte 0,7% Schwefel, ein Anstieg des Schwefelgehalts auf 2,93% resultieren; bei Zugrundelegung des Schwefelgehalts von 1,38% (Schulz) wäre der entsprechende Wert 3,53% S. Gefunden wurde 3,70% S. Der Kohlenstoffgehalt berechnet sich auf 52,54%. Gefunden wurde als Mittelwert 52,30% — eine Zahl, die der rechnerisch erschlossenen nahe liegt. Eine wesentliche Spaltung dürfte also hier neben der Substitution nicht eingetreten sein.