

Über Deuterokeratose, welche aus Horn durch Laugen- einwirkung gewonnen ist.

Von

Assistent cand. med. Hedwig Langecker.

(Aus dem med.-chem. Institut der deutschen Prager Universität.)

(Der Redaktion zugegangen am 20. Oktober 1919.)

Die Anregung zu diesen Versuchen gab die in den ersten Kriegsjahren gebotene Kriegsseuchenbekämpfung. H. Lüdke¹⁾ grundlegende Untersuchungen über die Wirkung intravenöser Injektionen von Albumosen machten vergleichende Studien mit den verschiedensten Eiweißabbauprodukten wünschenswert, und es schien von Interesse zu sein, auch die Abbauprodukte von möglichst körperfremden bzw. serumfremden Eiweißsubstanzen zu erproben.

Hier haben insbesondere R. Schmidt²⁾ und seine Schule die parenterale Proteinkörpertherapie mit günstigem Erfolge verwendet.

Bei unseren Darstellungsversuchen gelang es, durch Laugenaufspaltung von Horn eine Substanz, welche die Reaktionen der Deuteroalbumosen gab, leicht und in größerer Menge zu gewinnen; es sei mir gestattet, über die Darstellung und über die Eigenschaften einer solchen Deuterokeratose zu berichten.

Zur partiellen Aufspaltung von Horn haben Krukenberg und R. Bauer³⁾ gespannten Wasserdampf verwendet, die Spaltung verlief unter Merkaptanbildung und Entwicklung von

¹⁾ H. Lüdke, Die Behandlung des Abdominaltyphus mit intravenösen Injektionen von Albumosen. Münchn. med. Wochenschr 1915, S. 321.

²⁾ R. Schmidt, Med. Klinik 1916, Nr. 7; P. Kaznelson, Zeitschr. f. klin. Medicin. Bd. 83, Heft 3 (1917); siehe auch E. Starkenstein, Proteinkörpertherapie und Entzündungshemmung, Münchn. med. Wochenschr. 1918, S. 205.

³⁾ R. Bauer, Diese Zeitschr. Bd. 35, S. 352 (1902).

großen Mengen von Schwefelwasserstoff. Es wurde eine Atmidkeratose, die in Bezug auf ihre Fällbarkeit durch Chlor-natrium plus Salzsäure den Deuterokeratosen glich, isoliert. Sie enthielt 1,55% Schwefel.

E. Strauß¹⁾ hat die Hydrolyse von Ochsenhorn glatter durch 6stündiges schwaches Kochen mit 1–2%iger wäßriger Schwefelsäure durchgeführt. Seine Deuterokeratosen enthalten etwa 3% Schwefel.

Nach dem Verfahren von E. Strauß habe ich 200 g gereinigte Hornspäne mit 3 Litern einer 2%igen Schwefelsäure gekocht. Das Kochen wurde, da nach 6^h relativ wenig in Lösung gegangen war, 14 Stunden lang fortgesetzt, aber auch nach dieser Zeit waren, wie eine Stickstoffbestimmung ergab, erst 20% des Keratins gelöst worden. Der ungelöste Rückstand wurde mit erneuter Schwefelsäure der gleichen Konzentration gekocht, und dieses Verfahren wurde mehrmals wiederholt. Nach 100stündiger Kochdauer waren noch 30% des Keratins ungelöst geblieben, und der ungelöste Rückstand zeigte im mikroskopischen Bilde, daß die Struktur des Ausgangsmaterials erhalten war. Bei der Verarbeitung des gelösten Anteils wurde nur relativ wenig Deuterokeratose erhalten, als Hauptprodukt war, ebenso wie es Strauß gefunden hatte, Heterokeratose vorhanden.

Da diese beiden Verfahren durchaus nicht befriedigten, das erste wegen der reichlichen Bildung von Produktion einer weitergehenden Zersetzung, das zweite wegen der geringen Ausbeute, wurde hierauf die Einwirkung von verdünnter Natronlauge studiert.

300 g Hornspäne²⁾ wurden in 3 Litern halbnormaler Natronlauge suspendiert und im Brutofen bei 40° durch 14 Tage belassen. In dieser Zeit waren die Hornspäne vollkommen zerfallen, in der Flüssigkeit hatte sich eine kleine Menge eines schwarzgrauen Schlammes abgesetzt. Ohne von ihm abzufil-

¹⁾ E. Strauß, Studien über die Albuminoide. Heidelberg, Winters Verlag, 1904, S. 99.

²⁾ Die Hornspäne enthielten 0,66% Aschenbestandteile und verloren bei 110° getrocknet 9,56% ihres Gewichts.

trieren, wurde die alkalische Flüssigkeit durch die berechnete Salzsäuremenge neutralisiert.

Es trat dabei eine starke Schwefelwasserstoffentwicklung auf, gleichzeitig entstand ein gallertiger Niederschlag, dessen Abfiltrieren umständlich war. Der abfiltrierte gallertige Niederschlag war eisenhaltig und schwefelreich. Schon während des Filtrierens trat, wie der Schwefelwasserstoff sich verflüchtigte, ein angenehmer, etwa cumarinartiger Geruch der Flüssigkeit auf.

Das erhaltene, hellgelbe, neutral reagierende Filtrat wurde mit Steinsalz übersättigt, um die Protalbumosen zu fällen. Das Filtrat von diesem Niederschlag wurde mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert, wobei ein reichlicher hellgelber Niederschlag ausfiel, der als rohe Deuteroalbumose aufgefaßt wurde. Dieser Niederschlag wurde in heißem Wasser gelöst, die Lösung wurde neutralisiert. Dadurch entstand in ihr noch ein spärlicher Niederschlag, welcher in Wasser unlöslich, in 1%iger Salzsäure wie in 1%iger Natronlauge leicht löslich war. Die filtrierte klare Lösung ergab bei nochmaligem Füllen und Wiederlösen keine anderen Eiweißkörper als solche von den Löslichkeitsverhältnissen einer Deutero-keratose. Die Lösung wurde nun gegen fließendes Wasser chlorfrei dialysiert, sie nahm aber dabei etwas Kalk auf. Nach der Dialyse wurde eingedampft und der Rückstand wurde gepulvert.

Eine analoge Aufspaltung von Hornspänen wurde mit Normalnatronlauge im Brutofen bei 40° durchgeführt. Die Dauer der Laugeneinwirkung bis zur Lösung des Keratins betrug in diesem Falle 5 Tage.

Die Ausbeute bei beiden Darstellungen ergibt sich aus der folgenden Zusammenstellung der Stickstoffwerte, ausgedrückt in Prozenten des Gesamtstickstoffs.

Nach der 14 tägigen Einwirkung von halbnormaler Lauge wurden 2,4% Ammoniakstickstoff, 13,6% Protokeratosenstickstoff, 44,2% Deutero-keratosenstickstoff gefunden. Nach der 5 tägigen Einwirkung von Normallauge wurden 2,8% Ammoniakstickstoff, 7,5% Protokeratosenstickstoff, 41% Deutero-keratosenstickstoff gefunden.

Betrachtet man vergleichsweise die Einwirkung von Säure mit jener von Lauge auf das Keratin, so ergibt sich zweifellos, daß die beiden Prozesse ganz verschiedenartig sind; die Vermutung ist nicht von der Hand zu weisen, daß die reichlichere Bildung von Deuteroalbumose aus Horn von einer Abspaltung von Schwefelwasserstoff abhängig ist.

Die Menge des als Sulfid abgespaltenen Schwefels habe ich in einem Falle, in welchem 27 g Horn mit 270 ccm Normallauge durch 5 Tage bei 40° gelöst worden waren, bestimmt. Die auf 500 ccm verdünnte Lösung wurde durch ein trockenes Filter filtriert; 50 ccm des Filtrats wurden in einen Kolben gebracht, der durch einen dreifach durchbohrten Stöpsel verschlossen war. Durch die eine Bohrung reichte ein Rohr bis zum Boden, durch die zweite führte ein Ableitungsrohr für den freigemachten Schwefelwasserstoff, in der dritten Bohrung steckte ein mit Salzsäure gefüllter Scheidetrichter. Als Vorlage dienten zwei hintereinandergeschaltete U-Röhren mit $n/_{10}$ -Jodlösung.

Zunächst wurde aus dem Apparat die Luft durch reinen Wasserstoff verdrängt, hierauf wurde durch allmählichen Salzsäurezusatz der Schwefelwasserstoff freigemacht, schließlich durch Erhitzen der Flüssigkeit bis zum Sieden im Wasserstoffstrom vollständig übergetrieben.

In zwei solchen Parallelversuchen wurden a) 21,7, b) 20,7 ccm der $n/_{10}$ -Jodlösung verbraucht, entsprechend im Mittel 1,26% als Schwefelwasserstoff vorhandenem Schwefel.

Wird der Schwefelgehalt¹⁾ des Horns zu 3,2% angenommen, so wäre demnach mehr als ein Drittel des Gesamtschwefels als Schwefelwasserstoff abgespalten worden. Die gefundene Menge stellt einen Minimalwert dar, da während der 5tägigen Behandlung des Horns mit Lauge bei 40° doch etwas Luftsauerstoff absorbiert werden konnte, aber auch ohne diesen Verlust erschien die Menge des gefundenen Sulfids unerwartet hoch. Auf die Abspaltung von Schwefel als Alkalisulfid bei der Einwirkung von Laugen weist allerdings Hammarsten (l. c. S. 106) hin. Die bekannten maßgebenden Versuche K. A. H. Mörners²⁾ über die Schwefelabspaltung aus Horn sind ausschließlich mit heißer Lauge und bei Gegenwart von Bleisalzen ausgeführt.

Zur Orientierung, inwieweit das Cystin selbst bei 40° gegen Lauge empfindlich ist, wurden 10 g Cystin mit 130 ccm Normallauge durch 5 Tage bei einer Temperatur von 40° gehalten, hierauf wurde die Lösung auf 200 ccm gestellt, aus je 20 ccm dieser Lösung wurde in der oben beschriebenen Weise der etwa entstandene Schwefelwasserstoff durch Jodlösung absorbiert. Verbraucht wurden a) 3,0, b) 3,2 ccm $n/_{10}$ -Jodlösung

¹⁾ Hammarsten, Lehrbuch, 8. Aufl., S. 105.

²⁾ K. A. H. Mörner, Diese Zeitschr. Bd. 34, S. 207 (1901).

entsprechend a) 0,0048, b) 0,0051 g Schwefel, also sind aus etwa 2% des Gesamtschwefels vom Cystin als Sulfid abgespalten worden.

Bei diesen Versuchen drängte sich die Vermutung auf, ob nicht vielleicht in länger gelagerten Hornpräparaten sich größere Mengen von freiem Schwefel vorfinden, da bei Keratinen, welche im geschlossenen Gefäß nicht vollkommen trocken aufbewahrt werden, gelegentlich ein Geruch nach Schwefelwasserstoff beobachtet wurde. Diese Vermutung bestätigte sich bei dem uns vorliegenden Hornmaterial nicht. 11,045 g gut getrocknete, feine Hornspäne wurden mit frisch destilliertem Schwefelkohlenstoff anhaltend extrahiert, sie gaben einen minimalen Rückstand, der nur 0,0007 g (0,006%) Schwefel enthielt.

Die erhaltenen Deuterokeratosen stellen hellgelbe, wenig hygroskopische Pulver dar, sie haben keinen auffallenden Geschmack.

Die mit Halbnormallauge hergestellte Deuterokeratose enthielt 12,79% Stickstoff, 1,98% Schwefel. Die mit Normallauge hergestellte Deuterokeratose enthielt 12,36% Stickstoff, 1,96% Schwefel.

Die Stickstoffbestimmung wurde nach Kjeldahl vorgenommen, die Zersetzung erfolgte bei allen Stickstoffbestimmungen in dieser Studie mit Schwefelsäure, welcher 0,5 g kristallisiertes Kupfervitriol und 2,5 g Kaliumsulfat zugefügt waren.

Die Schwefelbestimmungen wurden nach der Methode von Denis¹⁾ durchgeführt, bei welcher die Oxydation unter Verwendung einer Lösung von Kupferniträt, Ammonniträt und Chlornatrium erfolgt.

Stickstoffbestimmungen: 0,3200 g bzw. 0,2965 g Keratose durch Halbnormallauge brauchten 29,3 ccm bzw. 27,0 ccm n_{10} -Säure. 0,2771 g bzw. 0,3088 g Keratose durch Normallauge brauchten 24,4 ccm bzw. 27,3 ccm n_{10} -Säure.

Schwefelbestimmungen: 0,2102 g bzw. 0,1982 g der mit Halbnormallauge erhaltenen Deuterokeratose wurden in wenig Lauge gelöst mit 10 ccm einer Lösung, welche in 100 ccm 25 g kristallisiertes Kupferniträt, 10 g Ammoniumniträt, 25 g Chlornatrium enthält, versetzt und zur Trockne gebracht, bei gesteigerter Hitze schließlich 10 Minuten zur Rotglut erhitzt. Der Rückstand wurde in Salzsäure gelöst, mit Wasser entsprechend verdünnt, und die Schwefelsäure wurde mit Chlorbaryum in der üblichen Weise gefällt. Die Reagentien der Denisschen Mischung

¹⁾ W. Denis, Journ. of biol. Chem. VIII, 401 (1910).

waren durch Umkristallisieren sulfatfrei erhalten worden. Beim Veraschen und Glühen hatte ich anfangs einige Mißerfolge durch die Verwendung von zu großen und starkwandigen Porzellanschalen. Erhalten wurde an Baryumsulfat: 0,0306 g bzw. 0,0285 g entsprechend 1,998% bzw. 1,974% Schwefel.

0,2034 g bzw. 0,1943 g der mit Normallauge erhaltenen Deuterokeratose gaben nach obiger Methode 0,0292 g bzw. 0,0277 g Baryumsulfat entsprechend 1,971% bzw. 1,957% Schwefel.

Beide Deuterokeratosen waren optisch aktiv, und zwar linksdrehend.

Eine 2,05%ige Lösung der mit Halbnormallauge dargestellten Deuterokeratose gab im Zweidezimeterrohr bei ca. 15° C. $\alpha = -1,42^\circ$, $[\alpha]_D = -34,7^\circ$, eine 2,03%ige Lösung der mit Normallauge dargestellten Deuterokeratose, analog geprüft, gab $\alpha = -1,58^\circ$, $[\alpha]_D = -39^\circ$. Die Lösungen reagierten neutral. Bei einem anderen Präparat von Deuterokeratose, welche durch Normallauge erhalten war, wurde $[\alpha]_D = -35,2^\circ$ gefunden.

Zur Orientierung wurde die optische Aktivität einer Deuterokeratose, welche aus den gleichen Hornspänen durch 48stündiges Kochen am Rückflußkühler mit 2%iger Schwefelsäure gewonnen worden war, bestimmt. Eine 0,413%ige Lösung derselben gab im Zweidezimeterrohr bei ca. 15° C. den Drehungswinkel $\alpha = -0,436^\circ$, woraus sich $[\alpha]_D$ zu $-50,9^\circ$ ergibt.

Nach den grundlegenden Untersuchungen von A. Kossel¹⁾ und F. Weiß über die Alkalieinwirkung auf Proteinstoffe hatten wir eine größere Differenz in den gefundenen Werten vermutet. Diese beiden Autoren haben z. B. bei einer im Brutofen durch 14 Tage mit $n/2$ -Natronlauge digerierten Leimlösung eine Abnahme der optischen Aktivität auf etwa ein Zehntel des ursprünglichen Wertes gefunden und haben bei verschiedenem Untersuchungsmaterial sowohl eine partielle Racemisierung wie Desamidierung (durch Argininspaltung) nachgewiesen. Ob in unserem Falle die größere Resistenz der untersuchten Keratosen auf eine gegen Umlagerungen be-

¹⁾ A. Kossel und F. Weiß, Diese Zeitschr. Bd. 59, S. 492 (1909); Bd. 60, S. 311 (1909); Bd. 68, S. 165 (1910).

sonders resistente „intraproteine“ Bindung der Aminosäuren zurückzuführen ist, muß späteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

Cystin, welches durch 5 Tage mit Normallauge auf 40° erwärmt war, zeigte nach der Ausfällung, bei welcher 80% des verwendeten Cystins wiedergewonnen wurden, in Normalsalzsäure gelöst eine Linksdrehung $[\alpha]_D = -158^\circ$.

Zur näheren Charakterisierung der Alkalikeratosen wurde die Stickstoffverteilung in denselben nach der Methode von van Slyke¹⁾ unter genauer Einhaltung aller von diesem Autor angegebenen Details ermittelt, wenn es nicht ausdrücklich anders bemerkt ist.

12 g der mit Halbnormallauge dargestellten Deutero-keratose wurden mit 120 ccm einer 20%igen Salzsäure am Rückflußkühler gekocht. Die Verbindung des Kühlers mit dem Kolben bestand aus einem gut passenden Glasschliff. Das Ende der Hydrolyse wurde dadurch ermittelt, daß jeweils nach mehreren Stunden der Aminostickstoff in je 1 ccm bestimmt wurde. Das Kochen wurde bis zur Konstanz dieses Wertes fortgesetzt. Diese Konstanz war nach 35 Stunden erreicht.

Hierauf wurde die Salzsäure im Vakuum bei 40° und bei 15 mm Quecksilberdruck weitgehend entfernt, sodann wurde der Rückstand mit destilliertem Wasser auf 300 ccm verdünnt. In je 5 ccm dieser Flüssigkeit wurde der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt. Es wurden verbraucht a) 17,9 ccm, b) 18,1 ccm $\frac{N}{10}$ -Säure, entsprechend 0,02522 g Stickstoff.

Dieser Wert mal 60 = 1,5132 (g N) wurde = 100 gesetzt.

100 ccm derselben Flüssigkeit wurden zur Bestimmung von Ammoniak in einen Claisenschen Destillationskolben gebracht. Nach Zusatz von Äthylalkohol zur Verminderung des Schäumens wurde entsprechend der van Slykeschen Versuchsanordnung mit Kalkmilch bis zur stark alkalischen Reaktion versetzt, in einem verdünnten Luftstrom, bei einem Quecksilberdruck von etwa 30 mm und bei einer Temperatur von 40° wurde das Ammoniak abdestilliert. Als Vorlage diente

¹⁾ Donald D. van Slyke, Journ. of biol. Chem. X, 14 (1911); XII, 275 (1912). Berl. Ber. Bd. 44, S. 1688 (1911).

ein Literkolben, welcher mit $\frac{n}{10}$ -Schwefelsäure beschickt war, außerdem war vor die Pumpe noch ein Sicherheitskolben mit der gleichen Säure vorgelegt. Das abdestillierte Ammoniak verbrauchte 8,2 ccm $\frac{n}{10}$ -Säure, entsprechend 0,01149 g N, für die Gesamtflüssigkeit 0,0345 g Stickstoff.

Hierauf wurde vom Kalk, welcher durch die gefällten Melanine dunkelgefärbt war, abfiltriert, der Niederschlag wurde chlorfrei gewaschen. Leider mißlang die Bestimmung des Melaninstickstoffs jedesmal, vielleicht deshalb, da ich nur derbe Filtrierpapiersorten zur Verfügung hatte. Daher wurde nochmals eine Stickstoffbestimmung im melaninfreien Filtrat vom Kalkniederschlag ausgeführt. Dieses Filtrat wurde genau neutralisiert, im Vakuum eingeeengt und dann auf 100 ccm gestellt. 5 ccm davon brauchten bei der Stickstoffbestimmung 16,9 ccm $\frac{n}{10}$ -Säure entsprechend 0,02368 g N; bezogen auf die Gesamtflüssigkeit waren 1,4206 g Stickstoff vorhanden. Die Menge des Melanin-(Humin-)stickstoffs beträgt demnach 0,0581 g.

Die letzterhaltene Flüssigkeit wurde in dem in der zweiten zitierten Arbeit van Slykes (Journ. biol. Chem. XII, 278) beschriebenen modifizierten Apparat²⁾ auf Aminostickstoff geprüft. 5 ccm der Flüssigkeit gaben $v = 31$ ccm, $b = 739$ mm, $t = 20,0^\circ$, daher wurden gefunden 0,01723 g, bezogen auf die Gesamtflüssigkeit 1,0338 g Aminostickstoff.

70 g der gleichen Flüssigkeit wurden hierauf mit Phosphorwolframsäure gefällt, indem 62 ccm einer Lösung, welche 20% Phosphorwolframsäure und 3,5% Chlorwasserstoff enthielt, zugefügt wurden, sodann wurde mit destilliertem Wasser auf 200 ccm verdünnt, bis zur Lösung des Niederschlags auf dem Wasserbade erwärmt und abkühlen gelassen. Nach 48 Stunden wurde vom kristallinen Niederschlag auf einem gehärteten Filter abfiltriert, der möglichst abgesaugte Niederschlag wurde mit einer Lösung, die 2,5% Phosphorwolframsäure und 3,5% Salzsäure enthielt, gewaschen, indem er mit einer geringen Menge dieser Lösung auf dem Filter sorgsam verrührt und dann abgesaugt wurde. Dieses Waschverfahren wurde wiederholt, bis 1 ccm der Waschflüssigkeit mit einer

²⁾ Von R. Goetze in Leipzig bezogen.

Lösung von Oxalsäure in 3%iger Natronlauge auch nach mehreren Minuten keine Trübung gab.

Der gewaschene Niederschlag, welcher die Basen und einen Teil des Cystins¹⁾ enthalten soll, wurde vom Filter teils mechanisch, teils durch Auflösen in einem möglichst geringen Überschuß von Natronlauge entfernt, unter gutem Verrühren mit Lauge versetzt bis zur dauernden Rotfärbung von Phenolphthalein, die Lösung wurde auf 800 ccm verdünnt, mit Chlorbaryum unter Vermeidung eines großen Überschusses des letzteren und mit einigen Tropfen Lauge gefällt. Der entstandene Niederschlag wurde durch dasselbe gehärtete Filter, welches vordem verwendet worden war, filtriert, abgesaugt und gewaschen, bis das Waschwasser chlorfrei war. Die Lösung wurde im Vakuum auf 50 ccm eingeeengt, abermals filtriert, das Filtrat wurde auf 100 ccm gestellt.

10 ccm dieser Lösung enthielten 0,01058 g Stickstoff (beim Kjeldahl verbrauchten sie 7,55 ccm $n/_{10}$ -Säure); berechnet auf die Gesamtmenge waren 0,4533 g Stickstoff vorhanden. 25 ccm dieser Lösung wurden zur Argininbestimmung mit 12,5 g Kaliumcarbonat und einem Stück porösen Porzellans durch 6 Stunden in dem von van Slyke angegebenen Apparate (l. c. X, 26), in welchem beide Verbindungen durch gute Glaschliffe hergestellt waren, gekocht. Dabei sollen 50% des Argininstickstoffs abgegeben werden. Doppelbestimmungen ergaben mir aber so verschiedene Werte, daß von ihrer Mitteilung abgesehen wird. Die Ursache dieser Differenzen aufzuklären gelang mir nicht; möglicherweise sind sie auf die partielle Racemisierung oder auf andere Umlagerungen des nach den Untersuchungen von A. Kossel und F. Weiß gegen Alkalien besonders empfindlichen Arginins zurückzuführen.

Als Aminostickstoff der Basen wurden in 10 ccm obiger Lösung bei $1/2$ stündiger Versuchsdauer gefunden: $v = 9,2$ ccm, $b = 739$ mm, $t = 15,5^{\circ}$, entsprechend 0,00522 g N, für die Gesamtmenge: 0,2238 g Stickstoff.

Das Filtrat von der Phosphorwolframsäurefällung, das die

¹⁾ Vgl. Berl. Ber. Bd. 44, S. 1691 (1911).

Monaminsäuren (und den gelösten Basenanteil) enthält, wurde nach genauer Neutralisation im Vakuum eingeengt, dann auf 200 ccm gestellt. 10 ccm davon enthielten 0,0109 g Stickstoff (für Kjeldahl verbraucht 7,8 ccm $n_{/10}$ -Säure); daher in der Gesamtmenge enthalten 0,9367 g Stickstoff.

Die Aminostickstoffbestimmung ergab in 10 ccm: $v = 15,1$ ccm, $b = 739$ mm, $t = 18,5^\circ$, demnach 0,00845 g Stickstoff, woraus sich für die Gesamtmenge 0,7246 g Stickstoff ergibt.

Als Cystinstickstoffwert wurde die Stickstoffmenge angenommen, welche sich aus der Gesamtschwefelbestimmung berechnet, unter der Annahme, daß alle labileren Schwefelverbindungen durch die Laugenbehandlung abgespalten worden wären.

Die Differenz zwischen der direkten Bestimmung des Gesamtstickstoffs und der Summe der Einzelbestimmungen beträgt etwa 2%, zwischen der direkten Aminostickstoffbestimmung und den Einzelbestimmungen beträgt die Differenz 8,3%. Bei größerer Erfahrung wird sich voraussichtlich eine größere Genauigkeit erzielen lassen. Auf die Trennung der Basenfraction wurde gegenwärtig verzichtet.

Die Untersuchung der mit Normalnatronlauge hergestellten Deuterokeratose wurde in ganz analoger Weise durchgeführt.

12 g Keratose wurden mit 120 ccm einer 20%igen Salzsäure am Rückflußkühler bis zur Konstanz des Aminostickstoffs, die gleichfalls in 35 Stunden erreicht war, gekocht. Nach Entfernung der Salzsäure wurde auf 300 ccm gestellt, 5 ccm der Lösung gaben nach Kjeldahl einen Verbrauch von a) 17,8, b) 17,6 ccm $n_{/10}$ -Säure, entsprechend 0,0248 g Stickstoff; in der Gesamtmenge 1,4879 g Stickstoff.

90 ccm verbrauchten für Ammoniakstickstoff 8,71 ccm $n_{/10}$ -Säure, entsprechend 0,0407 g Ammoniakstickstoff in der Gesamtmenge. Das Filtrat vom Melaninstickstoff wurde auf 200 ccm gestellt, 10 ccm davon verbrauchten für Kjeldahl 15,1 ccm $n_{/10}$ -Säure, entsprechend 0,02115 g Stickstoff; in der Gesamtmenge: 1,4103 g Stickstoff. Daher Melaninstickstoff = 0,0369 g.

Zur Basenfällung wurden 150 ccm des Filtrats vom Melaninstickstoffkalk verwendet. Die Lösung der Basenfällung wurde auf 100 ccm gestellt, 20 ccm davon verbrauchten für Kjeldahl 14,1 ccm $n_{/10}$ -Säure, entsprechend 0,01975 g Stickstoff; in der Gesamtmenge: 0,4390 g Stickstoff.

Der Basenaminostickstoff in 10 ccm obiger Lösung gab $v = 7,1$ ccm, $b = 739$ ccm, $t = 21^\circ$, demnach 0,00393 g N, für die Gesamtmenge 0,1744 g Stickstoff.

Das Filtrat der Phosphorwolframsäurefällung, auf 200 ccm gestellt, gab in 10 ccm nach Kjeldahl einen Verbrauch von 7,48 ccm n_{10} -Säure, entsprechend 0,01048 g Stickstoff, in weiteren 10 ccm 0,00843 g Aminostickstoff ($v = 15,3$ ccm, $b = 731,5$ mm, $t = 19,5^\circ$); demnach für die Gesamtmenge: 0,9316 g Stickstoff, davon 0,7493 g Aminostickstoff.

Die Argininbestimmung gab bei zwei Versuchen ganz differente Werte.

Wegen der Löslichkeit der Phosphorwolframate und wegen der Mitfällung von Cystin mit der Basenfraktion bedürfen die gefundenen Stickstoffwerte einer Korrektur, deren Größe wohl noch nicht endgültig feststeht. Nach den Erfahrungen von Slykes (Berl. Ber. Bd. 44, S. 1691) wären 50% des Cystinstickstoffs vom Basenaminostickstoff abzuziehen, 0,0052 g (entsprechend der Löslichkeit) zuzuzählen, für den Basen-Nichtaminostickstoff 0,0049 g zuzuzählen. Letztere beiden Werte wären wieder von den für die Monaminosäuren erhaltenen Stickstoffwerte abzuziehen und vom Aminostickstoff der Aminosäuren überdies 50% des Cystinstickstoffs. Die unkorrigierten und die korrigierten Werte sind in folgender Tabelle zusammengestellt.

Stickstoffwerte der Deuterokeratosen, dargestellt mit

| | Halbnormallauge | | Normallauge | | |
|-----------------------------|-----------------|-------------------|-----------------|-------------------|--------------|
| | Gramme | Stickstoffprozent | Gramme | Stickstoffprozent | |
| Gesamt-N | 1,5132 | 100 | 1,4879 | 100 | |
| Ammoniak-N | 0,0345 | 2,280 | 0,0407 | 2,735 | |
| Humin-N | 0,0581 | 3,840 | 0,0369 | 2,480 | |
| Cystin ¹⁾ -N | 0,1024 | 6,765 | 0,1031 | 6,930 | |
| Phosphorwolframsäurefällung | Amino-N | 0,2238 | 14,790 | 0,1744 | 11,721 |
| | | korr. 0,1778 | korr. 11,750 | korr. 0,1280 | korr. 8,603 |
| | Nicht-amino-N | 0,2295 | 15,166 | 0,2646 | 17,784 |
| | korr. 0,2344 | korr. 15,490 | korr. 0,2695 | korr. 18,113 | |
| Monaminosäuren | Amino-N | 0,7246 | 47,886 | 0,7493 | 50,360 |
| | | korr. 0,6682 | korr. 44,158 | korr. 0,6926 | korr. 46,549 |
| | Nicht-amino-N | 0,2121 | 14,016 | 0,1823 | 12,252 |
| | | korr. 0,2072 | korr. 13,693 | korr. 0,1774 | korr. 11,923 |
| | | gefunden 97,98% | gefunden 97,33% | | |

¹⁾ Berechnet aus dem Schwefelgehalt der Keratosen. Für die durch n_{10} -Lauge hergestellte Keratose berechnet sich der Cystinstickstoff zu

Über die Verdauung von Keratosen durch Pepsin und durch Trypsin hat R. Bauer¹⁾ mitgeteilt, daß eine deutliche, wenn auch sehr langsame Verdauung derselben durch beide Enzyme zu beobachten war.

Es schien mir von Interesse zu sein, zu prüfen, ob die von mir dargestellten Keratosen, deren hoher Gehalt an Mon-aminosäuren auffällt, der Einwirkung von Verdauungsenzymen einen gleichen Widerstand entgegensetzen; auch die unter schonenden Versuchsbedingungen erfolgte, reichliche Abspaltung von Sulfid ließ solche Versuche nicht von vornherein aussichtslos erscheinen, unter der Vorstellung, daß der Cystin-schwefel in seiner Brückenbindung (—S—S—) die Einwirkung von Enzymen erschweren möge.

Es hat sich jedoch herausgestellt, daß die Resistenz der vorliegenden Deuterokeratosen gegen eiweißverdauende Fermente eine recht große ist.

Die Versuche wurden nach der Methode von Sørensen²⁾ (Titration nach Formolzusatz) ausgeführt, in sterilen Gefäßen, überdies unter Zusatz von einigen Tropfen Toluol.

Die Zahlenangaben für Stickstoff bedeuten Prozente des Gesamtstickstoffs.

Pepsin und Papayotin gaben keine Zunahme des formol-titrierbaren Stickstoffs.

Trypsin gab bei einem Anfangswert von 12,4% an formol-titrierbarem Stickstoff nach 17^h eine Zunahme desselben um 0,6%, nach 30^h um 2,1%, nach 57^h um 3,5%, nach 71^h um 4,8%.

Erepsin gab bei einem Anfangswert von 11% an formol-titrierbarem Stickstoff nach 9^h eine Zunahme desselben um 1,4%, nach 23^h um 3,5%, nach 37^h um 4,2%, nach 64^h um 5,5%.

0,865%, bezogen auf 100% Stickstoff zu 6,765, für die durch Normal-lauge hergestellte Keratose zu 0,857%, bezogen auf 100% Stickstoff zu 6,930.

¹⁾ R. Bauer, Diese Zeitschr. Bd. 35, S. 354 (1902).

²⁾ S. P. L. Sørensen, Bioch. Zeitschr. Bd. 7, S. 45 (1907); V. Henriques und J. K. Gjaldbaeck, Diese Zeitschr. Bd. 75, S. 363 (1911).

Zum Vergleich wurde die Caseinverdauung durch Erepsin geprüft. Bei einem Anfangswert von 12,5% an formoltitrierbarem Stickstoff trat in 10 h eine Zunahme desselben um 11,4%, in 23 h um 21,6%, in 36 h um 32,7%, in 50 h um 44,3%, in 64 h um 50% ein.

Wegen des Verdachts, daß etwa die Racemisierung durch Laugenwirkung die Resistenz der Keratosen gegen die Enzyme bedingen könne, wurde das Verhalten einer Deuteroalbumose, welche mittels Halbnormal-Natronlauge aus Fibrin dargestellt war, gegen Trypsin untersucht.

Der Anfangswert war 12,6% an formoltitrierbarem Stickstoff, die Zunahme desselben betrug nach 31 h um 5,2%, nach 70 h um 6,8%, nach 77 h um 10%.

Die Pepsinverdauung der gleichen Albumose gab bei einem Anfangswert von 12,6% an formoltitrierbarem Stickstoff nach 30 h eine Zunahme um 0,4%, nach 55 h um 1,9%, nach 70 h um 3,6%.

Nach diesen Erfahrungen wurden Deuteroalbumosen durch 6tägige Einwirkung von $\frac{n}{2}$ -Natronlauge auf Casein (Merck) sowie auf käufliches Weizeneiweiß hergestellt. Sie erwiesen sich gegen Trypsin wie gegen Pepsin als vollkommen resistent, d. h. es war bei einer 70stündigen Versuchsdauer keine Zunahme des formoltitrierbaren Stickstoffs zu beobachten.

Es ist hervorzuheben, daß O. Maas¹⁾ für eine aus Eieralbumin hergestellte Alkalialbumose angibt, daß sie für Trypsin nicht angreifbar zu sein scheint.

Auffallend erscheint, daß die Keratosen im Gegensatz zu den letztgenannten Albumosen doch positiv reagieren, wenn sie auch nur langsam angegriffen werden. Jedoch ist durch diese Verdauungsversuche die Frage nicht zu entscheiden, ob eine besondere Bindungsart der Komponenten die Resistenz des Keratins gegen verdauende Fermente bedinge.

¹⁾ Diese Zeitschr. Bd. 30, S. 72 (1900).
