

Untersuchungen über das Hautsekret der Fische.

Von

Johannes Müller.

I. Mitteilung:

Die Chemie des Aalschleims.

Von

Johannes Müller und Hans Reinbach.

(Aus dem biochemischen Institut der Düsseldorfer Akademie für praktische Medizin.)
(Der Redaktion zugegangen am 14. Juni 1914.)

Einleitung: Auf das vom Wege etwas abliegende Objekt der nachstehenden Untersuchungen wurde ich (Johs. Müller) durch besondere Umstände geführt, die ich kurz schildern will, einmal weil sich daraus der Gang der Arbeit erklärt, sodann weil ich damit Gelegenheit zu einigen Nachträgen zu früheren Mitteilungen finde.

Als ich ¹⁾ vor längerer Zeit die Konstitution des Scyllit festgelegt und gleichzeitig durch Untersuchung des nach Angabe der Zoologen in Betracht kommenden Nahrungsmaterials ²⁾ das isolierte Vorkommen dieses Körpers bei den Plagiostomen wahrscheinlich gemacht hatte, sprach ich den, inzwischen nur von zoologischer Seite gewürdigten, Gedanken aus, daß die Sonderstellung des Scyllit mit der Sonderstellung des Plagiostomen im zoologischen System in Zusammenhang stehen könnte. In diesem Gedanken wurde ich nur bestärkt, als kurz darauf mein Bruder Hugo Müller ³⁾ das ebenfalls isolierte Vorkommen eines Isomeren des Inosit im Pflanzenreiche, näm-

¹⁾ Johannes Müller, Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch., Bd. 40, S. 1821 (1907).

²⁾ Vgl. dazu auch Hugo Müller, Transact. Chem. Soc., 1912, Vol. 101, p. 2387: «A previous experiment, made on a somewhat larger scale, did not yield a trace of scyllitol. It was then discovered that, probably by inadvertance, instead of the organs of the plagiostomous fishes, those of ordinary food fishes had been used.

³⁾ Transact. Chem. Soc., 1907, Vol. 91, p. 1780.

lich des Cocosit¹⁾ bei *Cocos nucifera* und *Cocos plumosa* entdeckte. Ich stellte mir also vor, daß die in der Ordnung der Plagiostomen zusammengefaßten sonderbaren Fische, welche fast alle lebendige Junge gebären, teilweise eine Placenta ausbilden usw., gar keine wahren Verwandten oder Vorfahren der übrigen Fische seien, sondern daß sie das Endglied einer phylogenetischen Reihe darstellen, welche sich sehr viel weiter unten vom gemeinsamen Stamme abgetrennt hat, wenn man nicht — was ich vorziehe — einer streng polyphyletischen Anschauung folgend in ihnen die letzten Repräsentanten einer Entwicklungsreihe sehen will, welche von Uranfang an von der zu den übrigen Fischen und weiter führenden getrennt verlief. Es fragt sich, ob der Versuch berechtigt ist, eine Cyklose sozusagen als chemisches Leitfossil für phylogenetische Probleme zu benutzen. Pflüger z. B. hat ja noch zuletzt lebhaft den Satz verfochten, daß nur die Eiweißkörper spezifischer Natur sind. Meiner Meinung nach kann nur der Versuch entscheiden, ob eine Übereinstimmung zwischen morphologischer und chemischer Organisation besteht.²⁾ Deshalb habe ich seinerzeit systematische Untersuchungen an Fischen begonnen und zunächst die mir damals — in Rostock — relativ leicht zugänglichen Cyklostomen (*Petromyzon fluv.*) analysiert. Die Ausbeute an einem die Scherersche Reaktion gebenden Körper war aber leider so gering, daß nur auf Grund einer Bestimmung des Schmelzpunktes einer noch nicht absolut aschefreien Probe die Vermutung eines neuen Isomeren gemacht werden konnte. Bei dieser Gelegenheit nun war es, daß ich auf das Hautsekret der Cyklostomen aufmerksam

¹⁾ Inzwischen ist von Hugo Müller die chemische Identität von Scyllit, Cocosit und dem von Vincent und Delachanal (*Compt. rend.*, 1887, Bd. 104, S. 1855) beschriebenen Quercinit nachgewiesen worden.

²⁾ Zunächst erscheint es ja bedenklich, rein stereochemische Differenzen, hier speziell den Fall der cis-trans-Isomerie im angeführten Sinne zu verwenden, zumal seit Hugo Müller die wichtige Entdeckung gemacht hat, daß die Cyklohexanhexole in Form ihrer Hexaacetate durch Einwirkung von Halogenwasserstoff in die Pentacetate isomerer Monohalogenhydrine, ja direkt in zwei neue Isomere, Isoinosit und ψ -Inosit, übergehen. Aber man findet eben bei Plagiostomen z. B. keine Spur von Isomeren.

wurde. Dasselbe ist bekanntlich giftig und man befreit die Fische davon vor dem Genusse, indem man sie mit viel Kochsalz bestreut und gleichzeitig mit Reisigbosen umrührt. Ich hoffte, in diesem Schleim eine ergiebige Quelle für die Darstellung von Mucin gefunden zu haben; nach meiner Übersiedelung nach Düsseldorf mußte ich aber nach anderem Material fahnden, weil Neunaugen im Rhein nur selten gefangen werden. Als leicht in genügender Weise beschaffbar erwies sich der Schleim der Aale, von welchen in einer hiesigen Fischerei täglich etwa 10 Zentner verarbeitet werden. Sehr bald zeigte sich, daß die schleimige Natur des Sekrets der Aalhautdrüsen nicht durch die Anwesenheit von Mucin bedingt ist, da sich durch Hydrolyse kein Kohlenhydrat abspalten läßt. Da aber über das Hautsekret der Fische bislang absolut nichts bekannt ist, wurde das durch Extraktion usw. gewonnene Material verwendet, um diese Lücke in der vergleichenden Biochemie auszufüllen. Bei der beabsichtigten Fortsetzung der Untersuchung werden natürlich sowohl für die Darstellung des Eiweißes wie für die der Lipoide andere Methoden in Anwendung kommen. Bei der Beurteilung der zu beschreibenden Methoden bitte ich also zu berücksichtigen, daß ursprünglich eine systematische Untersuchung nicht beabsichtigt war.

Experimentelles.

Das Untersuchungsmaterial wurde in folgender Weise gesammelt: Das sich lebhaft windende Tier wurde einige Zeit am Kopfe festgehalten, bis die Oberfläche mit reichlichem Schleim bedeckt war; dieser wurde dann mit der Hand ohne zu starkes Drücken in ein reines Gefäß abgestreift und im Kühlraum der Fischerei auf Eis bei einer Lufttemperatur von $+ 2^{\circ}$ C. aufbewahrt, bis eine genügende Menge gesammelt war (durchschnittlich vier, in maximo 6 Tage). Niemals trat eine Spur von Fäulnis auf.

Um einen Einblick in die allgemeine Zusammensetzung des Schleims zu gewinnen, wurden 25 g (frisch abgestreift) mit einem Gemisch von Alkohol und Äther übergossen, einige

Zeit stehen gelassen und dann noch 3 Stunden am Rückflußkühler erwärmt. Nach Filtration und Nachwaschen mit Äther hinterließ das Extrakt 0,5 g (= 2% des angewandten Schleims) einer gelb-braunen halbfesten Masse. Eine P-Bestimmung nach Neumann ergibt hierin 1,58% P.

Der auf dem Filter verbliebene Eiweißrückstand wurde nochmals 2 Stunden mit Alkohol gekocht; dabei ging die schleimige, fadenziehende Beschaffenheit allmählich verloren, ohne daß bemerkenswerte Mengen alkohollöslicher Stoffe in den Alkohol übergingen. Nach Abtrennung des Alkohols wurde auf dem Wasserbade, schließlich im Vakuumexsikkator getrocknet und gepulvert. N-Bestimmung (Kjeldahl) an diesem Pulver: 0,4238 g Substanz enthalten 0,0578 g N. Entsprechend dem später gefundenen Quotienten 7,02 berechnen sich demnach 0,406 g Eiweiß = rund 90%. (Die Substanz war noch nicht absolut trocken.)

Aschenbestimmung des entfetteten und getrockneten Pulvers:

0,9867 g Substanz gaben 0,016 g Asche = 1,62%.

Phosphorbestimmung (Neumann) am gleichen Material:

0,6866 g Substanz verbrauchen 6,5 ccm $\frac{1}{2}$ -NaOH = 0,53% P.

Weiter wurden an frischem, nicht vorbehandeltem Schleim folgende Analysen durchgeführt:

1. Bestimmung des Gesamtstickstoffs (Kjeldahl): 3,10 g Schleim enthalten 1,25% N; hiervon kommt ein kleiner Teil auf die Phosphatide. Läßt man diesen unberücksichtigt, so berechnen sich $1,25 \times 7,02 = 8,78\%$ Eiweiß.
2. Wasserbestimmung: 6,11 g Schleim, bei 105° im Toluolschrank getrocknet, hinterlassen 0,727 g Trockenrückstand; demnach beträgt der Wassergehalt 5,383 g = 88,1%.
3. Phosphorbestimmung (Neumann): 2 g Schleim enthalten 2,41 mg P = 0,0121% P = 0,144% P der Trockensubstanz.

Aus allen diesen Daten ergibt sich die in der folgenden Tabelle wiedergegebene Zusammensetzung des frischen Aalschleims.

Eiweiß	8,78%
Ätherextrakt	2,00%
Wasser	88,10%
Asche	0,19%
	99,07%

Hierin ist der Aschegehalt wegen des S- und P-Gehaltes des Materials unsicher, die Menge des Ätherextrakts sicher zu niedrig. Wir werden weiter unten sehen, daß durch sehr energische Extraktion der P-Gehalt des Eiweißkörpers bis auf 0,33% sinkt, gegenüber 0,53 der ersten Analyse. Nach diesem Verhältnisse würde sich der Ätherextrakt auf 3,2% erhöhen und die Gesamtsumme ergibt 100,27. Jedenfalls ist es so gut wie sicher, daß die Aufteilung eine vollständige ist.

Das gesammelte Material wurde in 3 Portionen angeliefert; da die Aufarbeitung der einzelnen Portionen etwas voneinander abweicht, soll jede einzeln beschrieben werden.

Vorher mag bemerkt werden, daß der frische Schleim an verdünnte Alkalien, Kalkwasser, Barytwasser nur sehr geringe Mengen von Eiweiß abgab. Aus diesen sehr verdünnten Lösungen kann das Eiweiß sofort nach Einwirkung des alkalischen Lösungsmittels mit Essigsäure wenigstens teilweise gefällt werden; schon nach kurzer Zeit ist aber die Säurefällung nicht mehr möglich. Jedenfalls ist eine präparative Darstellung auf diesem Wege nicht möglich.

Aufarbeitung der I. Portion.

6200 g Aalschleim werden mit 2,5 l 1%iger Essigsäure tüchtig verrührt, nach längerem Rühren noch 60 ccm Essigsäure in 500 ccm Wasser eingetragen (insgesamt also sind 3 l etwa 3%iger Essigsäure zugegeben). Man läßt über Nacht stehen, trennt dann die saure wässerige Lösung A von dem noch stark schleimigen B durch Filtration und Abpressen und knetet B 2 Stunden lang mit 40%igem Alkohol durch, bis die Masse ihre schleimige Natur ziemlich verloren hat und besser filtrierbar und abpreßbar geworden ist. Der Alkohol wird abfiltriert und abgepreßt, der Rückstand mechanisch zerkleinert, mehrmals mit 90%igem Alkohol durchgeknetet, schließlich mit soviel Äther durchgerührt, daß die Masse damit bedeckt ist. Nach 36stündigem Stehen preßt man den Äther ab; der mechanisch fein zerkleinerte Rückstand wird in einzelnen Portionen je 5 Stunden im Heißextraktor mit Äther extrahiert. Das Eiweiß ist nunmehr gut pulverisierbar geworden.

Die alkoholischen und ätherischen Auszüge werden mit den entsprechenden Auszügen der späteren Verarbeitungen vereinigt.

Die Analyse des gewonnenen Eiweißkörpers lieferte folgende Resultate:

1. Verbrennung:

0,1795 g Subst. = 0,1108 g H₂O u. 0,3236 g CO₂ = 6,91% H u. 49,2% C.

2. N-Bestimmung (Kjeldahl):

0,394 g Substanz = 39,8 ccm n/10-H₂SO₄ = 0,0557 g N = 14,14% N.

3. Schwefelbestimmung (Pringsheim):

1,1957 g Substanz = 0,1032 g BaSO₄ = 1,19% S.

4. Phosphorbestimmung (Neumann):

0,6526 g Substanz = 5,8 ccm n/2-NaOH = 3,2132 mg P = 0,49% P.

Die essigsäure Lösung A wurde mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung im Verhältnis 1600 A : 2600 Ammoniumsulfatlösung versetzt, der ausgefällte Eiweißkörper nach 12 Stunden abfiltriert und bis zum Verschwinden der Reaktion auf H₂SO₄ dialysiert. Beim Erhitzen dieser praktisch salzfreien Lösung war Trübung zu beobachten. Durch viel Alkohol wurde der durch Alkohol sehr schwer fällbare Eiweißkörper gefällt, auf dem Filter mit Alkohol und Äther ausgewaschen, bei 105° C. getrocknet und analysiert. Die Ausbeute betrug 7 g.

Analyse des dialysierten Eiweißkörpers aus Lösung A:

1. Verbrennung:

0,2392 g Subst. = 0,1431 g H₂O u. 0,4200 g CO₂ = 6,7% H u. 47,89% C.

2. N-Bestimmung (Kjeldahl):

0,3597 g Substanz = 33,15 ccm n/10-H₂SO₄ = 0,0464 g N = 12,9% N.

3. Schwefelbestimmung (Pringsheim):

1,111 g Substanz = 0,1260 g BaSO₄ = 1,56% S.

1,2197 „ „ = 0,1371 „ „ = 1,54% „

4. Phosphorbestimmung (Neumann):

0,6647 g Substanz = 2,9 ccm n/2-NaOH = 1,607 mg P = 0,24% P.

Wie man sieht, enthält der Körper weniger P und N als das durch Ätherextraktion gereinigte Eiweiß: die Verminderung des Stickstoffgehaltes ist aber viel zu stark, als daß sie etwa auf eine einfache Loslösung von Phosphatid bzw. weitere Reinigung bezogen werden könnte. Vielmehr erscheint es wahrscheinlich, daß — wie schon O. Nasse beim Acidalbumin beobachtete — unter dem Einfluß der Säure eine Abspaltung von N aus dem Eiweißmolekül stattgefunden hat.

Übrigens trat in dem Filtrat von der Ammonsulfatfällung auf vorsichtigen Zusatz von KOH geringe Trübung ein, die Anwesenheit von etwas Acidalbumin anzeigend.

Verarbeitung der II. Portion.

6300 g Aalschleim werden mit 4 l 10% iger Essigsäure tüchtig verrührt; nach 15stündigem Stehen in der Kälte wird abgepreßt (Filtrat A). Der Eiweißrückstand wird mit 1500 ccm 90% igem Alkohol 1 1/2 Stunden lang verrührt und durchgeknetet, dann abgepreßt, mechanisch zerkleinert, nochmals in gleicher Weise mit 96% igem Alkohol behandelt, wieder abgepreßt und schließlich 3 Tage unter zweimal erneuertem Äther stehen gelassen. Die alkoholischen und ätherischen Auszüge werden mit den entsprechenden Extrakten der ersten Aufarbeitung vereinigt, das abgepreßte Eiweiß wird getrocknet.

Analyse des Eiweißes II:

1. Verbrennung:

0,1640 g Subst. = 0,0984 g H₂O u. 0,2975 g CO₂ = 6,71% H u. 49,47% C.

0,2234 „ „ = 0,1294 „ „ 0,4068 „ „ = 6,48% „ „ 49,66% „ „

2. N-Bestimmung (Kjeldahl):

0,4638 g Substanz = 46,3 ccm n/10-NaOH = 0,0648 g N = 13,98% N.

3. Schwefelbestimmung (Pringsheim):

1,2608 g Substanz = 0,1058 g BaSO₄ = 1,15% S.

1,2376 „ „ = 0,1064 „ „ = 1,18% „ „

4. Phosphorbestimmung (Neumann):

0,8116 g Substanz = 5,75 ccm n/2-NaOH = 3,18 mg P = 0,393% P.

Aus dem essigsauen Filtrat A wird der darin gelöste Eiweißkörper durch vorsichtigen Zusatz von NaOH ausgefällt abfiltriert, dialysiert, aus der salzfreien Lösung mit Alkohol ausgefällt, mit Alkohol und Äther gewaschen, bei 105° C. getrocknet.

Analyse des Eiweißkörpers aus Filtrat A:

1. Verbrennung:

0,1866 g Subst. = 0,1092 g H₂O u. 0,3312 g CO₂ = 6,55% H u. 48,41% C.

2. N-Bestimmung (Kjeldahl):

0,3365 g Substanz = 34,25 ccm n/10-H₂SO₄ = 14,20% N.

3. Phosphorbestimmung (Neumann):

0,5658 g Substanz = 2,95 ccm n/2-NaOH = 0,29% P.

4. Schwefelbestimmung (Pringsheim):

0,8542 g Substanz = 0,0625 g BaSO₄ = 1,01% S.

Verarbeitung der III. Portion.

9000 g Aalschleim werden mit 3—4 Litern Wasser durchgeknetet, dann mit 2 Litern 10%iger Essigsäure erneut mehrere Stunden durchgerührt, wodurch die Masse filtrierbar wird. Der Rückstand bleibt 12 Stunden mit 40%igem Alkohol stehen, nach Filtration wird er mehrere Stunden mit 90%igem Alkohol durchgerührt, abgepreßt, mechanisch zerkleinert, nochmals mit 96%igem Alkohol behandelt, wieder abgepreßt und schließlich portionenweise erschöpfend im Heißextraktor mit Äther extrahiert und getrocknet.

Analyse des Eiweiß III:

1. Verbrennung:

0,2637 g Subst. = 0,1574 g H₂O u. 0,4714 g CO₂ = 6,68% H u. 48,75% C.
 0,085 „ „ = 0,0514 „ „ „ 0,1501 „ „ = 6,77% „ „ 48,16% „ „
 (Die zweite Verbrennung hinterließ einen minimalen Kohlenrückstand).

2. N-Bestimmung (Kjeldahl):

0,5507 g Substanz = 56,55 ccm $\frac{n}{10}$ -H₂SO₄ = 14,37% N.

3. Schwefelbestimmung: (Pringsheim):

0,7292 g Substanz = 0,0688 g BaSO₄ = 1,29% S.

4. Phosphorbestimmung (Neumann):

0,7499 g Substanz = 4,4 ccm $\frac{n}{2}$ -NaOH = 0,33% P.
 1,0124 „ „ = 6,05 „ „ = 0,331% P.

Eine Probe der Substanz wurde nochmals mit Alkohol 1 Stunde erhitzt, dann im Heißextraktor 4 Stunden mit Äther extrahiert. An dieser Probe wurde die Bestimmung von N und P wiederholt. Es ergibt sich 0,355% P und 14,50% N, also keine bemerkenswerte Änderung.

Die folgende Tabelle veranschaulicht die elementare Zusammensetzung der in den 3 Verarbeitungen gewonnenen Eiweißportionen:

	I.	II.	III.
C	49,2	49,56	48,75
H	6,91	6,59	6,68
N	14,14	13,98	14,37
S	1,19	1,16	1,29
P	0,49	0,393	0,33
O	28,07	28,32	28,57

An der elementaren Zusammensetzung fällt zunächst der niedrige N-Gehalt auf, wie man ihn von ähnlicher Größenord-

nung bei den Mucinen, Mukoiden, einigen mucinähnlichen Nucleoalbuminen, und auch bei den sogenannten Ichthulinen findet; mit diesen Gruppen hat unser Eiweißkörper auch die schleimige Natur und andere physikalische Eigenschaften; mit einigen auch den Phosphorgehalt gemeinsam, während er von den Mucinen, den Mukoiden und den meisten Ichthulinen durch das Fehlen abspaltbaren Kohlenhydrats sich unterscheidet.

Am weitesten geht die Ähnlichkeit mit dem Ichthulin aus Barscheiern,¹⁾ dem aus Kabeljaueiern²⁾ und dem Nucleoalbumin der Schneckenleber.³⁾

Wie bei diesen Körpern ist es die dringlichste Aufgabe der weiteren Forschung, zu entscheiden, ob der gefundene Phosphor ein essentieller Bestandteil des Eiweißmoleküls ist, ob er einem in wahrer chemischer Bindung angelagerten Phosphatid zugehört oder ob er endlich einfach aus einer Verunreinigung mit Phosphatid stammt. Wie bei den genannten Substanzen reicht auch bei dem neuen Körper das experimentelle Material noch nicht aus, um eine Diskussion dieser Frage zu ermöglichen. Wir möchten aber mit der nötigen Reserve auf Grund des analytischen Eindrucks eine Verunreinigung als unwahrscheinlich ablehnen. Die beiden aus den essigsäuren Filtraten gewonnenen Eiweißkörper sind ohne Zweifel chemisch verändert; über das Wesen dieser Veränderung sind genauere Untersuchungen nötig, weshalb wir uns mit der Nebeneinanderstellung der Analysen beider auf verschiedene Weise gewonnenen Produkte begnügen:

	I.	II.
C	47,9	48,41
H	6,7	6,55
N	12,9 (!)	14,20 (!)
S	1,55	1,01 (!)
P	0,24	0,29
O	30,71	29,54

Um einen Einblick in den Aufbau des neuen Eiweißkörpers zu gewinnen, wurde eine Bestimmung nach D. van Slyke vor-

¹⁾ Hammarsten, Skand. Arch. f. Physiol., Bd. 17, S. 113 (1905).

²⁾ Levene, Diese Zeitschrift, Bd. 32, S. 281 (1901).

³⁾ Hammarsten, Arch. f. d. ges. Physiol., Bd. 36, S. 373 (1885).

genommen. Das Prinzip dieser Methode darf als bekannt vorausgesetzt werden. Für die gasometrische Bestimmung des primären aliphatischen Aminostickstoffs mittels salpetriger Säure hat sich die neue Apparatur nach van Slyke mit Schütteleinrichtung vortrefflich bewährt.

Durch Vorversuche wurde festgestellt, daß nach 25 stündigem Kochen mit 20 Teilen 20%iger HCl vollständige Hydrolyse eintritt. Es wurden 3 Proben der II. Verarbeitung (2,7338 g; 2,8948 g; 2,9969 g) untersucht. Die Abweichungen waren so gering, daß wir uns mit der Angabe des Mittels begnügen können.

Aufteilung des Eiweißkörpers nach van Slyke.

	% des Eiweißes	% des Gesamt-N	
Gesamt-N	13,9	100	
Ammoniak-N	1,37	9,86	
Melanin-N	0,51	3,67	
Cystin-N	0,16	1,15	} 24,89 %
Arginin-N	1,56	11,22	
Hystidin-N	0,84	6,04	
Lysin-N	0,90	6,48	
Amino-N des Filtrats	7,65	55,04	} 59,93 %
Nicht-Amino-N im Filtrat	0,68	4,89	
	<hr style="width: 50%; margin: 0 auto;"/> 13,67%	<hr style="width: 50%; margin: 0 auto;"/> 98,35%	

Die Aufteilung ist eine ziemlich befriedigende. Es berechnet sich aus ihr für 100 g Eiweiß:

Cystin	1,37 %
Arginin	4,85 %
Histidin	3,10 %
Lysin	4,70 %

Eine weitere Aufteilung nach den Methoden von A. Kossel und E. Fischer wird nachgeholt werden.

Aufarbeitung der Extrakte.

Die bei der geschilderten Reinigung des Aalschleims jeweils erhaltenen alkoholischen, bzw. ätherischen Auszüge wurden miteinander vereinigt (I. Alkoholauszug und I. Ätherauszug). Beide wurden dann gesondert im Vakuum zur Trockne gebracht; dabei hinterließen sowohl der I. alkoholische wie der I. ätherische Auszug dickflüssige, noch etwas wasserhaltige

Massen, die im Falle des alkoholischen Auszuges noch etwas Eiweiß einschlossen.

Die beiden Rückstände wurden nun mit Äther erschöpfend ausgeschüttelt, und die Lösungen sowohl des I. alkoholischen wie des I. ätherischen Rückstands zum II. ätherischen Extrakt vereinigt.

Der in Äther unlösliche Anteil wird mit Alkohol in der Wärme mehrmals mehrere Stunden am Rückflußkühler behandelt, die heißen alkoholischen Extrakte ebenfalls vereinigt zum II. alkoholischen Auszug.

Der weder in Alkohol noch in Äther lösliche Rückstand gab bei mehrwöchentlichem Stehen mit Petroläther an dieses Lösungsmittel auch nicht Spuren ab. Nach Entfernung des Petroläthers wird mit Wasser behandelt, wodurch fast alles gelöst wird; nur etwas Eiweiß bleibt ungelöst.

Aufteilung des II. Ätherauszugs.

Die vereinigten braunefärbten Ätherauszüge wurden mit entwässertem Natriumsulfat getrocknet; nach Verdunsten des Äthers hinterblieb ein Rückstand von 170 g, welcher eine halb-feste, hellbraune, in Äther und Petroläther ohne Rückstand lösliche Masse darstellte.

Zur Aufteilung dieser Masse wurde auf Grund von Vorversuchen folgender Kunstgriff angewandt: Man versetzte zunächst allmählich mit mehr und mehr Essigester, wodurch die Konsistenz sich bis zur völligen Verflüssigung änderte; bei weiterem Zusatz (insgesamt 1,2 Liter Essigester) trat Trübung auf und ein gelblich-weißer Körper (A) fiel aus, der nach einiger Zeit abgesaugt und mit Essigäther gründlich gewaschen wurde.

Aus dem Filtrat wurde im Vakuum der Essigäther entfernt, wobei zum Schluß lebhaftes Schäumen auftrat, und der Rückstand mit 1 Liter Alkohol absol. verrührt. Dabei blieb ein halbfester, gelbbrauner Körper (B) ungelöst. Seine Menge betrug etwa 5 g, er enthielt N und P, wurde aber vorläufig nicht weiter untersucht.

Das alkoholische Filtrat vom Körper B wurde wieder

im Vakuum eingeengt; sobald auf der Oberfläche der Lösung die Abscheidung von Krystallen zu beobachten war, wurde das Vakuum abgestellt, die Lösung erkalten lassen, die Krystalle abgesaugt, mit Alkohol gewaschen und sodann im Vakuum weiter eingedampft. Neue Krystallabscheidungen wurden in gleicher Weise gewonnen.

Die gewonnenen Krystallmassen wogen rein 12 g. Sie zeigten unter dem Mikroskop die Krystallform des Cholesterins, gaben die Reaktionen von Salkowski und von Liebermann. Fp. 139/141° C.

Der Rückstand des eingedampften alkoholischen Filtrats wurde nun mit Methylalkohol versetzt, wobei die gleiche Erscheinung auftrat, die oben bei Gewinnung des Körpers A mittels Essigäther geschildert wurde: Erst glatte Lösung, dann Auftreten einer Trübung. So wurde eine braune, halb feste Masse (C) gewonnen, die von vereinzelt Krystallen durchsetzt war.

Das nach Absaugen von C erhaltene methylalkoholische Filtrat wird wieder im Vakuum eingedampft; der Rückstand (etwa 90 g) stellt eine halb feste, braune, in Äther, Alkohol, Toluol völlig lösliche Masse dar. Sie wird in wenig Äther gelöst und die Lösung mit Aceton versetzt, solange Trübung entsteht. Es fällt ein in Aceton unlöslicher Körper aus (D₁, 20 g). Nach Entfernung von Äther und Aceton aus dem Filtrat blieben 70 g eines in Aceton löslichen Rückstandes (D₂).

Körper A.

Dieser wie gesagt durch Essigäther aus dem Rückstand des Ätherextrakts gefällte Körper betrug 5,7 g. Es wurde gefunden, daß er sich aus heißem Essigäther umkrystallisieren läßt, wodurch er als rein weißes, undeutlich krystallinisches Pulver gewonnen wird. Bei 120° C. fängt die Substanz an, zusammenzusintern, färbt sich langsam etwas bräunlich und schmilzt schließlich bei 177/179° C. zu einer braunen Flüssigkeit. Dieser Fp. wurde auch nach mehrfachem Umkrystallisieren wieder erhalten.

Zur Elementaranalyse des neuen Phosphatids wurde ein vielfach aus Essigäther umkrystallisiertes Produkt verwendet:

Phosphorbestimmung (Neumann):

0,4102 g Substanz = 23,55 ccm $n/2$ -NaOH = 3,18% P.

Stickstoffbestimmung (Kjeldahl):

0,5246 g Substanz = 12,8 ccm $n/10$ -H₂SO₄ = 3,42% N.

Verbrennung:

0,1357 g Subst. = 0,1108 g H₂O u. 0,3131 g CO₂ = 11,04% H; 62,92% C.

0,1523 „ „ = 0,1464 „ „ = 10,76% „ 62,86% „

Die prozentische Zusammensetzung ist also:

62,89% C, 10,90% H, 3,42% N, 3,18% P, 19,61% O.

Daraus läßt sich unter Vorbehalt folgende empirische Formel ableiten: C₅₁H₁₀₆N₂PO₁₂. Es handelt sich also wahrscheinlich um ein Diaminomonophosphatid.¹⁾ Die chemischen Eigenschaften der Substanz laden zu einer eingehenden Untersuchung ein.

Fällung C.

Die durch Methylalkohol erzielte Fällung C wog etwa 35 g; sie stellte eine braune, halbfeste, mit Krystallen durchsetzte Masse dar. Durch Behandlung mit Aceton bei gewöhnlicher Temperatur konnten diese Krystalle isoliert, gelöst und nach einigen Reinigungsprozeduren aus heißem Alkohol rein gewonnen werden. Sie zeigten alle Eigenschaften des Cholesterins.

Die vom Cholesterin befreite Fällung wurde nunmehr in heißem Aceton gelöst und in der Kälte wieder ausfallen gelassen, dann mehrmals in Äther gelöst und mit Aceton gefällt, bis schließlich eine braune Masse resultierte, die im Vakuum-exsikkator fest und spröde wurde. In dieser pulverisierten Form erhielten wir schließlich nur 2,5 g.

Analyse:

1. Phosphorbestimmung (Neumann):

0,1430 g Substanz = 7,85 ccm $n/2$ -NaOH = 3,04% P.

0,1716 „ „ = 9,60 „ „ = 3,09% „

2. Stickstoffbestimmung (Kjeldahl):

0,2571 g Substanz = 5,35 ccm $n/10$ -H₂SO₄ = 2,91% N.

3. Verbrennung:

0,1657 g Subst. = 0,1356 g H₂O und 0,3763 g CO₂ = 9,16% H, 61,94% C.

Die prozentische Zusammensetzung ist also:

C = 61,49%, H = 9,16%, N = 2,91%, P = 3,07%, O = 22,92%.

¹⁾ Anm. bei der Korrektur: Ganz überraschend würde für die Analyse auch die Formel C₁₀₄H₂₂₀N₅P₂O₂₅ stimmen, welche 62,4% C, 11% H, 3,5% N, 3,1% P und 20% O verlangt.

Daraus würde sich die empirische Formel eines zweiten Diaminomonophosphatids berechnen: $C_{52}H_{92}N_2PO_{14}$. Die ziemlich weitgehende Ähnlichkeit mit der oben abgeleiteten Formel des krystallisierten Diaminomonophosphatids A legt aber die Möglichkeit nahe, daß es sich um ein Oxydationsprodukt des Phosphatids A handelt.

Acetonfällung D_1 .

Die in ätherischer Lösung mit Aceton erzielte Fällung D_1 (s. o.) im Gewichte von 20 g wurde mit wenig Äther gelöst, von einer kleinen Menge eines weißen Körpers abfiltriert, der Äther verdunstet, Rückstand in ziemlich viel Alkohol gelöst, von sehr geringer Trübung nach Absitzen abgossen, das alkoholische Filtrat im Vakuum eingedampft und im Vakuum-exsikkator getrocknet. Beim Trocknen wurde eine geringe Gewichtszunahme, wohl als Folge von Autoxydation, beobachtet.

Analyse von D_1 :

1. Phosphorbestimmung (Neumann):

0,3162 g Substanz = 17,85 ccm $n/2$ -NaOH = 3,13% P

0,3166 „ „ = 17,85 „ „ = 3,12% „

2. Stickstoffbestimmung (Kjeldahl):

0,5605 g Substanz = 9,3 ccm $n/10$ - H_2SO_4 = 2,32% N

0,6425 „ „ = 10,5 „ „ = 2,27% „

3. Verbrennung:

0,1753 g Subst. = 0,1575 g H_2O u. 0,4215 g CO_2 = 10,06% H. 65,58% C.

Die prozentische Zusammensetzung des Phosphatids ist demnach:

C = 65,58%, H = 10,06%, N % 2,30%, P = 3,125%, O = 18,9%.

Das Verhältnis N : P berechnet sich auf 1,64 : 1. Diese Relation zeigt, daß der analysierte Körper nicht einheitlich war. Tatsächlich zeigte sich bei der Verseifung, daß in dem Unverseifbaren eine nicht unbeträchtliche Menge Cholesterin enthalten war, welche natürlich die Zahlen für den Kohlenstoff erhöhte, während die Zahlen für N und P etwas zu niedrig sind.

Verseifung von D_1 : 4 g wurden in 150 ccm gesättigter Barytlösung suspendiert und mehrere Stunden am Rückflußkühler gekocht. In die heiße Lösung wurde CO_2 eingeleitet und nach dem Erkalten filtriert. Das Filtrat wurde auf dem Wasserbade zur Trockene gebracht, der Rückstand mit abso-

litem Alkohol ausgezogen und die alkoholische Lösung verdunstet. Es blieben 0,6258 g eines gelb-braunen, basisch riechenden, dicken Öles zurück. Ein aus diesem Öl erhaltenes Platindoppelsalz enthielt 30,3% Pt (Cholin fordert 31,63%). In dem alkoholunlöslichen Teil des Rückstandes wurde nach vorangehender Oxydation Phosphorsäure mit Ammoniummolybdat nachgewiesen; ferner trat beim Erhitzen mit geschmolzenem NaHSO_4 deutlicher Geruch nach Acrolein auf, die Dämpfe schwärzten mit Ammon-Silbernitrat getränktes Papier und färbten mit fuchsinschwefliger Säure getränktes Papier schön blauviolett.

Damit ist der Nachweis von Glycerinphosphorsäure erbracht.

Der Barytniederschlag wurde in einem Kolben gespült, angesäuert und mit Äther erschöpft. Der gesamte Ätherextrakt wog 2,5492 g. Er wurde wieder in Äther gelöst und mit verdünnter Natronlauge geschüttelt. So ließen sich 0,2993 g Cholesterin gewinnen, während aus der Seifenlösung nach Ansäuern mit Äther 2,2265 g Fettsäuren ausgezogen wurden.

Die Trennung der Fettsäuren erfolgte über die Bleisalze mit Hilfe von Benzol nach der üblichen Methode. Aus 2,0275 g Fettsäuren wurden erhalten:

1. gesättigte Fettsäuren 0,461 = 22,7%, Fp. 55°, was einem Gemisch aus 30% Stearinsäure und 70% Palmitinsäure entspricht;

2. an ungesättigten Säuren 1,566 g = 77,2%. Dunkles, ziemlich leicht flüssiges Öl. Jodzahl 97 (Oleinsäure 89,96). Mit Rohrzucker und H_2SO_4 rot-violette Färbung.

Es sind also bei der Verseifung in 3,7 g (nach Abzug des Cholesterins) gefunden: 0,6258 g Base (Cholin?); 2,2265 g Fettsäuren, 0,84 g Glycerinphosphorsäure.

Der in Aceton unlösliche Rückstand D_2 .

Diese 70 g betragende Masse (s. o.) war in Alkohol, Ather, Methylalkohol, Benzol glatt löslich. Bei längerem Stehen schieden sich aus der Lösung der dickflüssigen braunen Masse einige wenige Krystalle ab (Cholesterin).

Da eine befriedigende weitere Reinigung des Edukts nicht

durchgeführt werden konnte, begnügten wir uns einstweilen mit der Verseifung:

6,5 g wurden in 40 ccm 90%igem Alkohol gelöst, mit 8 g $\text{Ba}(\text{OH})_2$ in 100 ccm Wasser versetzt und 9 Stunden am Rückflußkühler gekocht. Dann wird mit heißem Wasser verdünnt, CO_2 eingeleitet, vom Barytniederschlag abfiltriert.

Das wässrig-alkoholische Filtrat wird zur Trockne gebracht und mit absolutem Alkohol ausgezogen. Es hinterblieben nach Verdunsten des Alkohols 0,7 g eines bräunlichen Öles. Daraus dargestelltes Platindoppelsalz enthält 31,27% Pt (Cholin 31,63%), es ist in Wasser leicht löslich. — Im Rückstand des Alkoholauszuges konnten mit den gleichen Methoden wie oben Phosphorsäure und Glycerin nachgewiesen werden. — Der auf dem Filter befindliche Barytniederschlag wurde in einen Kolben gespritzt, angesäuert und mit Äther extrahiert. Gewicht dieses Ätherextrakts 0,8286 g.

Da im Verseifungskolben braune, anscheinend unverseifte Massen zurückgeblieben waren, wurden dieselben im gleichen Kolben in alkoholische Lösung gebracht und mit überschüssigem Na-Äthylat 2 Stunden gekocht. Dann wird auch hier wie oben verfahren und so noch 4,4022 g Ätherextrakt gewonnen.

Beide Ätherextrakte (5,2308 g) werden vereinigt in ätherischer Lösung mit 40 ccm N-NaOH und Wasser geschüttelt, die alkalisch-wässrige Lösung abgetrennt, angesäuert und mit Äther extrahiert. Es resultieren 3,3570 g eines braun gefärbten halbfesten Edukts.

Im Äther waren enthalten 1,7872 g einer halbfesten gelblichen Masse. Sie erschien noch nicht völlig verseift und wurde deshalb nochmals mit Na-Äthylat gekocht.

Schließlich blieben 0,8437 g unverseift; überwiegend drusenförmig gruppierte Krystalle neben etwas hellgelber halbfester Masse. Die Krystalle erwiesen sich als Cholesterin.

Die außerordentlich schwere Verseifbarkeit wie der Umstand, daß das Ausgangsmaterial in kaltem Alkohol löslich war, machen es wahrscheinlich, daß das Cholesterin in Form von Estern vorhanden war. Die Frage soll später mit der Digitoninmethode von Windaus genauer geprüft werden.

Das Gesamtätherextrakt (5,2308 g) enthielt demnach:

$(0,8575 + 3,3570) = 4,2145$ g Fettsäuren und 0,8437 g Unverseifbares. Die Trennung der Fettsäuren in gesättigte und ungesättigte erfolgte auch hier über die Bleisalze mittels Benzol.

Es wurden in 4,21 g gefunden:

0,68 g gesättigte Fettsäuren. Fp. 55° C.; also auch hier 30% Stearinsäure und 70% Palmitinsäure;

3,5 g ungesättigte Fettsäuren, Jodzahl 84,1 (Ölsäure 89,96).

Mit Rohrzucker und H_2SO_4 rot-violette Färbung.

Insgesamt ergab der Ätherextrakt 16,6% Unverseifbares und 83,4% Fettsäuren, und zwar 83,3% ungesättigte neben 16,7% gesättigten.

Der II. alkoholische Auszug.

Über diesen ist vorläufig leider nur wenig zu berichten, weil es — mit einer Ausnahme — nicht gelang, aus ihm genügend definierte Körper darzustellen.

Aus den heißen alkoholischen Auszügen, die aus den in Äther unlöslichen Rückständen des I. alkoholischen und des I. ätherischen Auszuges hergestellt wurden, schied sich beim Erkalten eine bräunliche feste Substanz (A) ab, von der abfiltriert wurde (alkohol. Filtrat B). Beim Einengen des letzteren im Vakuum bei $50-60^{\circ}$ fielen drusenförmig gruppierte feine Krystallnadeln aus (Körper C), von denen wieder abfiltriert wurde (alkohol. Filtrat C).

Die feste Substanz A ging beim Kochen mit 80%igem Alkohol zum größten Teil in Lösung; von dem dunkelbraunen dickflüssigen Rückstand wurde abfiltriert. Aus der 80%igen alkoholischen Lösung fällt beim Erkalten ein bräunlich gefärbter fester Körper ohne erkennbare Krystallform aus (1,3 g). Er enthält 10,67% N und gibt beim Erhitzen mit NaOH deutlichen Geruch nach Aminbasen. Die alkoholische Mutterlauge enthielt noch 1,5 g eines teils festen, teils halbfesten Rückstandes. Der Körper C, 1,2 g, ist schwer löslich in Aceton, Essigester, Alkohol, leichter in Methylalkohol, leicht in Wasser. Aus 80%igem Alkohol umkrystallisiert präsentiert es sich als rein weiße, fein krystallinische Drusen. Er ist P-frei (Veraschung

nach Neumann), aber N-haltig (Lassaigne). Die wässrige Lösung reagiert gegen Lackmoid schwach basisch.

Zur Molekulargewichtsbestimmung wurden 0,0538 g in 4,1686 g Wasser gelöst. Δ : 1. — 0,255° C.; 2. — 0,260° C.; 3. — 0,260° C.

$$M = 18,5 \cdot \frac{0,0538 \cdot 100}{0,26 \cdot 4,1686} = 92.$$

Verbrennung:

0,070 g Subst. = 0,1256 g CO₂; 0,0523 g H₂O = 48,93% C, 8,36% H.

N-Bestimmung (Kjeldahl):

0,1579 g = 11,00 ccm $\frac{n}{10}$ -H₂SO₄ = 10,3% N.

Demnach: C = 48,93%, H = 8,36%, N = 10,3%, O = 32,41%.

Die Analyse stimmt annähernd zu der empirischen Formel C₅H₁₁NO₂ oder C₅H₁₂NO₃. Die Base soll an neuem Material genauer untersucht werden. Betain scheint es nicht zu sein. Das alkoholische Filtrat C konnte durch Äther in mehrere Fraktionen aufgeteilt werden, welche stark phosphorhaltige, N-haltige, nach Fleischextrakt riechende Substanzen enthielten.

Der nach Herstellung des II. ätherischen und II. alkoholischen Auszuges verbleibende Rückstand war, wie oben schon gesagt, mit Ausnahme von etwas darin enthaltenem Eiweiß, in Wasser glatt löslich. Die braune, zuerst fadenziehende, allmählich spröde werdende Masse gibt beim trocknen Erhitzen Pyrrolreaktion, enthält 7,48% N und 1,47% P. Mit Alkali erhitzt gibt sie NH₃ ab; Amingeruch. Beim Ansäuern der alkalischen Lösung Geruch nach H₂S.

Durch sehr viel Methylalkohol ließ sich eine Substanz ausziehen, die nach mehrfachem Lösen in heißem Methylalkohol und Ausfällen in der Kälte sich als ein hellgelber, erst zäher, dann fest und pulverisierter werdender Körper darstellte. Das Pulver ist leicht löslich in Wasser, ziemlich schwer in Methylalkohol, fast unlöslich in Äthylalkohol und Aceton. Die Elementaranalyse ergab: 9,94% N; 0,95% P; 38,77% C; 6,58% H. Der Schwefel wurde nicht bestimmt. Einige Gramm des wasserlöslichen Rohprodukts wurden dialysiert. Nach 48 Stunden waren in das mehrfach erneuerte Wasser 40% durchdialysiert; der Rückstand dieses Dialysats war reicher an Phosphor (1,67%) und ärmer an Stickstoff (6,95) als das dialysierte Rohprodukt.

So unvollständig die vorliegende Untersuchung naturgemäß noch ist, so wird doch durch sie die in der Einleitung erwähnte Lücke in der vergleichenden Biochemie einstweilen befriedigend ausgefüllt. Es ergibt sich, daß der Aalschleim etwa 12% Trockensubstanz enthält, wovon etwa 9% (also der Hauptanteil) auf einen dem Nucleoalbumin der Schneckenleber ähnlichen Eiweißkörper entfallen. Der Rest an organischer Substanz stellt wesentlich ein Gemisch von Lipoiden dar, unter denen nachgewiesen wurden: 1. Cholesterin, wahrscheinlich als Ester an Fettsäuren gebunden, 2. ein kristallisierendes Diaminomonophosphatid $C_{51}H_{106}N_2PO_{12}$, 3. ein festes Diaminophosphatid $C_{52}H_{92}N_2PO_{14}$, 4. dem Typus der Lecithine entsprechende Phosphatide. Ferner fand sich eine betainähnliche Base neben phosphorhaltigen Abbauprodukten des Eiweißes.

Die Untersuchung wird fortgesetzt.
