

Über die Abspaltung von Kohlensäure aus Eiweißkörpern.

Von

Privatdozent Dr. Fritz Lippich.

(Aus dem medizinisch-chemischen Institute der Prager deutschen Universität.)

(Der Redaktion zugegangen am 23. März 1914.)

Die alte Theorie Schützenbergers nimmt bekanntlich an, daß die Verknüpfung der einzelnen Aminosäuren im Eiweißmolekül durch die Vermittlung von Harnstoffresten erfolgt, daß also das Eiweiß nichts anderes darstellt als ein komplexes Ureid. In dieser Fassung konnte die Theorie, ganz abgesehen von der Unexaktheit der Grundlagen, die von Habermann und Ehrenfeld¹⁾ entsprechend beleuchtet wurden, den modernen Errungenschaften nicht standhalten; andererseits haben aber wieder gerade diese insofern eine Bestätigung in gewissem Sinne gebracht, als die hydrolytische Abspaltung von Harnstoff aus Eiweiß durch sie zur Tatsache geworden ist.

Gerade nun die Bindung, die diesem harnstoffliefernden Körper, dem Arginin, zugrunde liegt, läßt im Verein mit anderen Umständen den Gedanken wieder auftauchen, es möchte im Eiweißmolekül auch die ganz analoge Bindung, wie sie in den Uramidosäuren oder den Diureiden vorliegt, vorhanden sein; keineswegs in dem Umfange, wie es der Schützenbergerschen Theorie entspricht, sondern in dem Ausmaße etwa, wie die Argininbindung auftritt.

Nun wird zwar heute wohl allgemein angenommen, daß die genannten Bindungsformen für das Eiweiß nicht in Betracht kommen, doch liegt meines Wissens ein wirklich zwingender Grund für diese Annahme nicht vor, es sei denn, daß die Regel gilt, es könne ein Körper, der als Stoffwechselprodukt nor-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 30, S. 453, 1900.

malerweise auftritt, nicht als solcher in dem Ausgangssubstrat vorhanden sein. Die unbedingte Gültigkeit einer solchen Regel dürfte wohl kaum nachweisbar sein. Hingegen gibt es eine ganze Reihe von Tatsachen, die im Zusammenhalt mit Beobachtungen an Uramidosäuren, wenn auch gewiß in anderem Sinne, so doch ebensogut im Sinne der in Rede stehenden Annahme gedeutet werden können.

Die Uramidosäuren können nach mehreren einfachen Bildungsweisen, die gerade für eine physiologische Entstehung in Betracht kommen, leicht erhalten werden; es liegen also die chemischen Analogien gerade für die Möglichkeit einer normalerweise eintretenden Bildung vor. Die Uramidosäuren anhydrieren sich sehr leicht unter der Wirkung relativ geringer Säurekonzentrationen; einer Zersetzung derselben durch Säuren geht daher stets eine Anhydrierung voraus; die Anhydride sind selbst gegen hohe Säurekonzentrationen sehr resistent. Bei der Einwirkung von Alkali wird hingegen aus den Säuren leicht Kohlensäure und Ammoniak abgespalten. In der leichten Anhydrierbarkeit und der leichten Alkalispaltbarkeit kann man chemische Analogien zur Hitzekoagulation des Eiweißes bei Gegenwart von Säure, und zum Ausbleiben der Gerinnung in alkalischer Lösung sehen. Dazu kommt die auffallende Resistenz, welche bestimmte Aminosäuregruppierungen bei Eiweißspaltungen zeigen und die sich sowohl gegen Säuren als auch gegen Fermente in ähnlicher Weise geltend macht; sie hat bekanntlich zur Aufstellung einer Anti- und Hemigruppe geführt. Hierzu könnte einerseits eine chemische Analogie in der Resistenz der Anhydride gegen Säuren erblickt werden, wobei auch besonders jene, selbst langdauernder Säurewirkung widerstehenden abiureten Spaltungsprodukte zu berücksichtigen wären; andererseits kann geltend gemacht werden, daß Uramidosäuren und besonders Diureide der Spaltung durch Fermente widerstehen.¹⁾

Diureide, in denen also die noch freie NH_2 -Gruppe der Uramidosäuren gleichfalls mit einer Aminosäure in Verbindung

¹⁾ Compt. rend., Bd. 143, S. 119, 1906.

getreten ist, sind von Hugouneq und Morel¹⁾ dargestellt worden; es ist von vornherein wohl denkbar, daß der Organismus diese Synthese zustande bringt, sodaß auch diese Körper in den Kreis der Betrachtungen gezogen werden könnten. Über ihr Verhalten gegen Säuren und Alkalien liegen allerdings keine Erfahrungen vor.

Als ein sehr wichtiger Punkt für unsere Frage ist nach wie vor die Abspaltbarkeit von Kohlensäure und Ammoniak zu betrachten, die besonders bei der Alkalisplaltung der Eiweißkörper so leicht eintritt. Seit der schon zitierten Arbeit von Habermann und Ehrenfeld ist es bekannt, daß diese beiden Spaltungsprodukte keineswegs, wie Schützenberger gefunden haben wollte, in dem Verhältnisse auftreten, wie es der ausschließlichen Entstehung aus Harnstoff entsprechen würde; es zeigt sich ein bedeutendes Überwiegen des Ammoniaks. Wenn uns also der Vergleich der Ammoniak- und Kohlensäurezahlen ein Kriterium nicht abgeben kann, so ist doch zu bedenken, daß trotzdem in ihnen auch die Mengen der beiden Substanzen enthalten sein müssen, die dem durch Hydrolyse des Arginins entstandenen Harnstoff entsprechen. Es können also auch daneben noch Kohlensäure und Ammoniakmengen vorhanden sein, die Harnstoffgruppen in der angenommenen Bindung ihren Ursprung verdanken. Es fragt sich nun, ob es von vornherein möglich erscheint, einen der Gesamtwerte für Kohlensäure oder Ammoniak in seine Summanden aufzulösen. Kaum aussichtsvoll dürfte dies vorläufig wenigstens für den Ammoniakwert sein; seine Quellen sind zahlreicher, wie dies das Überwiegen bei der Alkalisplaltung und das reichliche Auftreten bei der Säurespaltung zeigt, und einer Aufklärung schwerer zugänglich. Eher einen Erfolg versprach hingegen die Auflösung des Kohlensäurewertes in seine Bestandteile. Der dem Arginin entsprechende Anteil kann, da der Gehalt an Arginin in vielen Fällen genügend genau bekannt ist, mit entsprechender Sicherheit festgestellt werden. Aus schon angeführten Gründen, besonders aber wegen des bedeutenden Überschusses des Ammoniakwertes über den Kohlensäurewert folgt, daß die

¹⁾ Compt. rend., Bd. 140, S. 859, 1905.

Ursprungsquellen der Kohlensäure nicht so verschiedener Art sein können wie die des Ammoniaks. Es kommt nun darauf an, ob es gelingt, einen Standpunkt zu gewinnen, von dem aus es möglich ist, zu beurteilen, ob die nach Abzug der Argininkohlensäure verbleibende Kohlensäuremenge einheitlichen Ursprungs ist, wieweit sie also auf die angenommene Bindungsweise allein zurückgeführt werden kann, resp. ob eventuell noch andere Quellen aufgefunden werden können.

Der Lösung dieses Problems konnte am ehesten ein Vergleich zwischen der bei Alkalieinwirkung und Säureeinwirkung abgespalteten Kohlensäure dienen, vorausgesetzt, daß bei Säurespaltung von Eiweiß überhaupt Kohlensäure auftritt, was noch nachzuweisen war. Angenommen nun, es tritt bei der Säurespaltung Kohlensäure auf und sie stammt allein aus der gedachten Quelle, so wird infolge der eintretenden Anhydrierung der präsumptiven Uramidosäuren ihre Menge eine relativ geringe sein, doch wird sie mit der Zeit langsam, aber stetig zunehmen. Bestimmt man ferner an reinen Uramidosäuren die in einer bestimmten Zeit durch Säurewirkung abgespaltene Kohlensäuremenge, so kann man umgekehrt aus einer in derselben Zeit abgespaltenen Kohlensäurequantität auf die Gesamtmenge der entsprechenden Uramidosäure schließen, weil von deren Gesamtkohlensäurewert die gefundene Menge einen bestimmten Teil ausmachen muß. Da nun durch Alkalieinwirkung die Uramidosäure fast völlig gespalten wird, so muß der in diesem Falle gefundene Kohlensäurewert mit dem im Falle der Säurespaltung berechneten Gesamtkohlensäurewert nahe übereinstimmen. Kann man auf dieser Grundlage aus der bei der Säurespaltung eines Eiweißkörpers gefundenen Kohlensäure die Gesamturamidokohlensäure berechnen, so muß, falls der Schluß auf ein Vorhandensein von Uramidosäure gewagt werden kann, diese mit jener Kohlensäuremenge annähernd übereinstimmen, die erhalten wird, wenn man von der bei Alkalisspaltung desselben Eiweißkörpers gefundenen Kohlensäure die Argininkohlensäure abzieht.

Es setzt dies natürlich voraus, daß das Arginin bei der Alkalisspaltung völlig zerlegt wird. Wie leicht und vollständig dies geschieht, zeigen unter anderem die Arbeiten von Lampel

und Skraup¹⁾ und Skraup und Hummelberger.²⁾ Nach dreistündigem Erhitzen mit 6%iger Natronlauge auf dem Wasserbade konnte in den zum Teil noch mit Ammonsulfat fällbaren, also noch relativ hochmolekularen Spaltprodukten, wie auch in den mit demselben Salz nicht mehr fällbaren Spaltprodukten des Serumglobulins Arginin nach Kossel und Kutscher nicht mehr nachgewiesen werden. In den entsprechenden Spaltprodukten des Eieralbumins waren nurmehr ganz kleine Mengen dieses Körpers aufzufinden.

Der Vergleich zwischen der abgespaltenen Kohlensäure- und Ammoniakmenge wurde also als aussichtslos, sowohl bei der Alkalispaltung als auch bei der Säurespaltung betrachtet und daher nur die abgespaltene Kohlensäure in Untersuchung gezogen.

Die Verhältnisse, wie sie bei den Eiweißkörpern vorliegen, lassen einen direkten Nachweis der im Eiweißmolekül angenommenen Uramidogruppe von vornherein fast aussichtslos erscheinen. Es muß daher der indirekte Weg zunächst beschritten werden, welcher durch die oben auseinandergesetzten Gründe resp. Einschränkungen nicht wenig erschwert wird. Unter welchen Umständen — doch eventuell ein direkter Nachweis zu führen wäre, wird sich im Verlauf dieser Untersuchungen ergeben, aus denen auch hervorgehen wird, wie weit sich die entwickelten hypothetischen Vorstellungen, zu denen ich auf Grund meiner Studien über Uramidosäuren gelangt bin und auf die schon einmal³⁾ kurz hingewiesen wurde, durch tatsächliche Befunde stützen lassen.

Was die Abspaltung von Kohlensäure bei der Säurespaltung von Eiweißkörpern anlangt, so liegt diesbezüglich meines Wissens nur eine ganz kurze Bemerkung von K. A. H. Mörner⁴⁾ das Horn betreffend vor. Beim Erhitzen von Rinderhorn (welches mit verdünnter Salzsäure gereinigt worden war) auf 92° am Wasserbad mit Salzsäure von 1,124 spezifischem Gewicht wurde

¹⁾ Monatshefte für Chemie, Bd. 30, S. 363, 1909.

²⁾ Ebenda, S. 125.

³⁾ B. B., 41. Jahrg., S. 2953, 1908.

⁴⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 34, S. 207, 1901.

im Verlauf des Erhitzens etwas Kohlensäure abgespalten, die mittels Barytwasser nachgewiesen werden konnte.

Es war also zunächst zu untersuchen, ob die Abspaltung von Kohlensäure nur ausnahmsweise eintritt, oder ob sie eine bei der Säurespaltung der Eiweißkörper regelmäßig auftretende Erscheinung darstellt.

Diese qualitativen Vorversuche wurden in folgender Weise ausgeführt. Ein Kolben aus schwer schmelzbarem Glase von etwa 500 ccm Fassungsraum wurde mit Hilfe eines doppelt durchbohrten Gummistöpsels mit einem bis zum Boden reichenden Einleitungsrohr und mit einem Rückflußkühler versehen. Der Rückflußkühler trug an seinem oberen Ende gasdicht angesetzt ein mit Barytwasser beschicktes Peligot-Röhrchen, dem sich ein mit Kalilauge in Substanz versehenes Schutzröhrchen anschloß. In den Kolben wurden 250 ccm 33%ige Schwefelsäure gegeben und durch mehrere Stunden in der Kälte elektrolytischer Wasserstoff, der eine Kalilaugewaschflasche passierte, hindurchgeleitet, wobei der Rückflußkühler nur das Schutzröhrchen, nicht aber das Peligot-Röhrchen trug. Hierauf wurde das letztere eingeschaltet und unter weiterem Durchleiten von Wasserstoff die Säure zum Sieden erhitzt; während einer Kochdauer von fünf Stunden bildete sich im Peligot-Röhrchen ein kaum merklicher Niederschlag. Hierauf wurde im Wasserstoffstrom erkalten gelassen.

Nun wurden etwa 20 g nicht weiter gereinigter Hornspäne in die Säure eingetragen und zunächst wieder bei ausgeschalteten Peligot-Röhrchen mehrere Stunden Wasserstoff durch die Flüssigkeit geleitet. Hierauf wurde das Peligot-Röhrchen mit Barytwasser beschickt, der Kolben in ein Wasserbad eingesenkt und durch dreistündiges Erhitzen in demselben bei kontinuierlichem Durchleiten von Wasserstoff das Horn in Lösung gebracht; inzwischen entstand im Peligot-Röhrchen ein relativ reichlicher Niederschlag. Nach dem Erkalten im Wasserstoffstrom wurde das Peligot-Röhrchen rasch gewechselt, die Flüssigkeit über freier Flamme zum Sieden erhitzt und etwa zehn Stunden darin erhalten; während dieser Zeit zeigte das Barytwasser des Peligot-Röhrchens zunehmende Niederschlagsbildung.

Das Röhrchen wurde nun in der schon angegebenen Weise nochmals gewechselt; während einer weiteren Kochdauer von zehn Stunden war eine weitere kontinuierlich zunehmende Niederschlagsbildung im Inhalte des Röhrchens zu bemerken. Daneben zeigte dieser auch eine deutliche Gelbfärbung, und nach Abnahme des Röhrchens und Entleerung einen unangenehmen, charakteristischen, lauchartigen Geruch. Der Niederschlag in den Peligot-Röhrchen bestand aus kohlen-saurem Baryt.

Ist man schon geneigt, in diesem Falle die während des Lösens aufgetretene Kohlensäurebildung auf Aschebestandteile der nicht weiter gereinigten Hornsubstanz zu beziehen, so kann im weiteren Verlaufe des Versuches diese Quelle nicht mehr angenommen werden; der Versuch zeigt auch deutlich, wie die Abspaltung der Kohlensäure relativ schwierig, langsam und kontinuierlich erfolgt.

Ein weiterer Versuch wurde in ganz ähnlicher Weise mit käuflichem Enteneiereiweiß durchgeführt. Die Versuchsanordnung war die frühere. Etwa 30 g des Eiweißpräparates wurden mit 250 ccm 33%iger Schwefelsäure übergossen und mehrere Stunden mit kohlen-säurefreiem, elektrolytischem Wasserstoff durchlüftet; nun wurde das bisher leere Peligot-Röhrchen mit klarem Barytwasser beschickt und die Lösung des Eiweißkörpers durch vierstündiges Erhitzen im Wasserbade herbeigeführt; wie beim Horn trat während dieser Zeit schon ein relativ reichlicher Niederschlag von kohlen-saurem Baryt auf; nach dem Erkaltenlassen, Wechsel des Peligot-Röhrchens und Erhitzen über freier Flamme zum Sieden war schon im Verlaufe der ersten Stunden deutliche Niederschlagsbildung zu bemerken, die nun im weiteren Verlaufe des Versuches langsam, aber kontinuierlich zunahm, wobei auch hier in den späteren Stadien Gelbfärbung und lauchartiger Geruch auftraten. Das Kochen über freier Flamme wurde durch zwölf Stunden fortgesetzt; während der ganzen Versuchsdauer wurde, wie schon im ersten und ebenso in den folgenden Versuchen der kohlen-säurefreie Wasserstoffstrom nicht unterbrochen. Das Resultat dieses Versuches war also das gleiche wie beim Horn.

Ein dritter Versuch wurde mit krystallisiertem Eialbumin

ausgeführt, wobei ca. 28 g desselben und 250 ccm 33%ige Schwefelsäure zur Verwendung kamen. Auch hier zeigte sich deutlich Kohlensäureabspaltung während 5stündigen Erhitzens im Wasserbade, also während des In-lösung-gehens. Bei der nun folgenden 24stündigen Kochdauer über freier Flamme erfolgte 4maliger Wechsel des Peligot-Röhrchens. Jedes der 4 Röhrchen zeigte relativ reichliche Niederschlagsbildung; die beiden letzten Gelbfärbung und lachartigen Geruch.

Ganz konform verlief ein weiterer Versuch mit etwa 5 g Parhämoglobin und 100 ccm 33%iger Schwefelsäure bei 1stündigem Erhitzen im Wasserbad und 11stündigem Kochen über freier Flamme.

Schließlich wurde noch ein letzter Versuch mit ca. 20 g Gelatine (Goldmarke) und 250 ccm 33%iger Schwefelsäure ausgeführt. Während des Erhitzens im Wasserbade (5 St.) trat auch hier, wie fernerhin beim Kochen über freier Flamme (18 St.), Kohlensäureentwicklung auf, doch war dieselbe ersichtlich viel geringer als bei den anderen untersuchten Eiweißkörpern; das gleiche gilt auch von der in den späteren Stadien des Versuches beobachteten Gelbfärbung und Bildung eines lachartig riechenden Stoffes.

Diese Versuche erbringen also den Beweis, daß wenigstens für die hier angeführten Eiweißkörper zu den regelmäßig bei der Säurespaltung auftretenden Spaltungsprodukten auch die Kohlensäure gehört. Die dabei verwendeten Eiweißpräparate waren zum Teil wenigstens älterer Provenienz. Es war daher in Erwägung zu ziehen, ob nicht bei langem Aufbewahren auch im trockenen Zustande in den Eiweißkörpern Zersetzungen eintreten können, die für die Bildung wenigstens eines Teiles der Kohlensäure bei der Säurespaltung verantwortlich zu machen wären. Für die nunmehr in Betracht zu ziehenden quantitativen Bestimmungen wurden daher die einzelnen Eiweißkörper frisch dargestellt.

Zur Darstellung kamen Parhämoglobin, Eieralbumin, Serumglobulin, Elastin und Keratin.

Das Parhämoglobin wurde wiederholt mit Wasser gewaschen, hierauf mit Alkohol extrahiert und diese Behandlung

mit Wasser und Alkohol wiederholt. Nach der letzten Alkohol-extraktion wurde an der Luft getrocknet, in der Achatreibschale zerrieben, durch ganz feinmaschige Müllergaze gesiebt und sodann mit Äther erschöpft; es resultierte ein feinkörniges dunkelrotes Pulver; sein Wassergehalt durch Trocknen bei 100° bestimmt, betrug 11,06%.

Ein zweites Parhämoglobinpräparat wurde in ganz ähnlicher Weise gewonnen, nur wurde bei den Waschungen und Extraktionen jede Berührung mit Filtrierpapier und jedes Eintrocknen vermieden; nach der letzten Extraktion mit Alkohol wurde der Alkohol durch Äther verdrängt, und sodann die Ätherextraktion angeschlossen. So resultierte unmittelbar ein ungemein feines, ganz leichtes, hell ziegelrotes Pulver. Durch Trocknen bei 100° wurde sein Wassergehalt ermittelt zu 11,13%.

Das Eieralbumin wurde in der üblichen Weise nach Hofmeister aus Hühnereiweiß dargestellt und dreimal umkristallisiert, sodann wurde dialysiert, die Flüssigkeit im Vakuum über konzentrierter Schwefelsäure eingeeengt, die stark eingeeengte Lösung in Alkohol gegossen, das Koagulum mit Wasser anhaltend gewaschen, sodann mit Alkohol und Äther erschöpft, nach dem Trocknen an der Luft gepulvert und gesiebt. Der Wasserverlust des so gewonnenen lufttrockenen Präparats entsprach einem Wassergehalt von 10,67%.

Bei der Reinigung des aus Pferdeserum durch Halbsättigung mit Ammonsulfat gewonnenen Serumglobulins wurden die Erfahrungen von Wiener¹⁾ insofern verwertet, als das Umfällen aus stark verdünnter Lösung vorgenommen wurde. In dieser Weise erfolgte eine dreimalige Umfällung. Die letzte Fällung erfuhr eine mehrmalige Behandlung mit Alkohol und wurde hierauf mit Wasser wiederholt ausgeschüttelt; nach anhaltendem Dialysieren gegen Chloroformwasser folgte eine neuerliche Behandlung mit Alkohol und schließlich die Extraktion mit Äther. Es wurde so ein im lufttrockenen Zustande ganz schwach gelblichweißes, feinstes staubendes Pulver erhalten. Der Gewichtsverlust bei 100° zeigte einen Wassergehalt von 10,47% an.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 74, S. 29, 1911.

Das Elastin wurde nach Richards und Gies¹⁾ aus dem Ligamentum nuchae des Rindes dargestellt. Die zerkleinerten durch Präparation möglichst gereinigten Nackenbänder wurden 3 mal mit Wasser ausgekocht, 6 mal mit halbgesättigtem Kalkwasser in der Kälte behandelt (Wechsel alle 2—3 Tage, Schütteln in der Maschine), 3 mal mit 10%iger Essigsäure ausgekocht, nach dem Wegwaschen derselben 3 mal mit 5%iger Salzsäure in der Kälte maceriert (Schütteln in der Maschine), die Behandlung mit Essigsäure und Salzsäure wiederholt, säurefrei gewaschen, mehrmals mit Alkohol ausgekocht und mit Äther erschöpft. Der Wassergehalt der bei 100° getrockneten Substanz betrug 11,81%; nach den Bestimmungen von Ameseder²⁾ enthielt sie 0,54% Schwefel und 0,60% Asche.

Zur Darstellung gereinigten Keratins wurden möglichst reine Hornhobelspäne weitgehend zerkleinert und wiederholt mit Wasser ausgekocht. Hierauf folgte eine mehrfache Behandlung mit 5%iger Salzsäure in der Kälte (Schütteln in der Maschine), woran sich nach gründlichem Waschen eine 8tägige Verdauung mit Pepsinsalzsäure und eine ebensolange mit Trypsinsoda bei 35° anschloß. Nach neuerlichem gründlichen Waschen wurde mehrmals mit Alkohol ausgekocht und sodann mit Äther erschöpft. Nach dem Trocknen bei 100° ergab sich ein Wassergehalt von 11,45%.

Diese Eiweißkörper wurden zu den im folgenden beschriebenen quantitativen Bestimmungen der bei der Säurespaltung auftretenden Kohlensäure verwendet. Diese quantitativen Bestimmungen lassen sich infolge einer Reihe von Gründen nicht ohne weiteres in der üblichen Weise ausführen. Da die Kohlensäurespaltung, wie die qualitativen Vorversuche zeigen, langsam und allmählich erfolgt, so müssen die Versuche über lange Zeiträume, 12—24 Stunden, ausgedehnt werden.

Dieser Umstand und die notwendige Anwendung relativ großer Flüssigkeitsmengen resp. Säuremengen und Zersetzungsgefäße bedingen die Verwendung größer dimensionierter Trocken-

¹⁾ Amer. Journ. of Physiol., Bd. 7, S. 93, 1902.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 85, S. 324, 1913.

gefäße, eventuell auch eine größere Zahl derselben. Abgesehen von der Vergrößerung der Gefäße, welche eine entsprechende Vergrößerung des schädlichen Raumes bedingt, war eine solche noch weiterhin gegeben durch die unvermeidliche Verwendung eines Rückflußkühlers, da ja die Spaltungsflüssigkeit während der ganzen Versuchsdauer im Sieden erhalten werden mußte, und fernerhin durch Einschaltung besonderer Waschgefäße, die mit Rücksicht auf andere gasförmige Spaltungsprodukte vorgesehen werden mußten. Sollte ein Kaliapparat zum Auffangen der Kohlensäure verwendet werden, so mußte derselbe bedeutend größere Dimensionen aufweisen als sonst üblich, um bei den großen Gasquantitäten ohne Schaffung größerer Druckdifferenzen eine entsprechende Gasmenge auf einmal und doch im normalen Tempo durchtreten lassen zu können, welche letztere Forderung in Anbetracht der starken Verdünnung der Kohlensäure wichtig erschien.

Infolge dieser und noch anderer Umstände, die im Laufe der Beschreibung der Versuche ihre Erwähnung finden werden, war bis zur definitiven Ausführung der Versuche resp. zur zweckmäßigsten Zusammenstellung der Apparatur eine Reihe von Vorversuchen notwendig, deren Beschreibung ich hier übergehe. Im folgenden sei nur die definitive Ausführung der Versuche beschrieben. Gelegentlich im Verlauf der zahlreichen Versuche angebrachte Modifikationen werden bei den einzelnen Versuchen angeführt werden.

[Jedem Versuch ging das Auskochen der für den Versuch bestimmten Säuremenge voraus, das in jedem Falle immer in der gleichen Weise und zwar wie folgt vorgenommen wurde. Die Säure befand sich in einem langhalsigen Rundkolben aus böhmischem Hartglas von ca. 600 ccm Fassungsraum; der Kolben war mit einem doppelt durchbohrten Gummistopfen versehen; die eine Bohrung diente zur Aufnahme eines Einleitungsrohres, welches bis zum Boden des Kolbens reichte und dessen oberes Ende mittels eines Hahnstückes mit 2—3 Kalilaugewaschflaschen in Verbindung stand. Die andere Bohrung des Kolbenstopfens diente zur Aufnahme eines Rückflußkühlers, dessen oberes rechtwinklig abgebogenes Ende mit dem oberen rechtwinklig abgebogenen Ende eines entsprechend langen Rohres in Ver-

bindung stand; das untere gleichfalls rechtwinklig abgebogene Ende dieses Rohres war mit einer Kalilaugewaschflasche in Verbindung, deren oberer Teil auf diese Weise in der Höhe des Kolbenbodens zu liegen kam. An die Waschflasche schloß sich ein Dreiweghahn, der die Verbindung zur Luftpumpe bei entsprechender Stellung herstellte. Die Verbindung der einzelnen Teile erfolgte hier wie auch später durch Stücke gasdichten Schlauches. Der Dreiweghahn wurde nun so gestellt, daß eine Kommunikation mit der Außenluft möglich war, der andere Hahn wurde geschlossen und die Säure allmählich zum Sieden erhitzt; nachdem Druckausgleich eingetreten war, wurde bei entsprechender Stellung des Dreiweghahnes und bei offenem zweiten Hahn ein langsamer Luftstrom durch die kochende Flüssigkeit gesaugt: nach 2—3 stündigem Sieden wurde langsam im Luftstrom erkalten gelassen.

In einen Kolben von gleicher Art wie der zum Auskochen der Säure bestimmte wurde sodann die zu untersuchende Substanz resp. der Eiweißkörper eingewogen; mittels eines doppelt durchbohrten Gummistöpsels wurde wiederum ein bis nahe zum Boden reichendes Einleitungsrohr und ein an seinem oberen Ende rechtwinklig abgebogener Rückflußkühler luftdicht angeschlossen. Das Einleitungsrohr stand in Verbindung mit einem zweimal rechtwinklig gebogenen Hahnstück, welches zunächst die Verbindung zu dem Kolben mit der ausgekochten Säure herzustellen hatte; der Anschluß des Rückflußkühlers an das System von Waschflaschen und Trockenapparaten erfolgte wieder mittels eines langen, an beiden Enden rechtwinklig abgebogenen Glasrohres, wodurch es möglich wurde, alle Teile des Systems nebeneinander etwa in der Höhe des Kolbenbauches anzuordnen.

Von Gasen resp. flüchtigen Substanzen, welche bei der Säurespaltung von Eiweiß auftreten und die Kohlensäurebestimmungen störend beeinflussen konnten, kamen in Betracht: Blausäure, Schwefelwasserstoff, Merkaptan und Äthylsulfid. Das empfindlichste Reagens auf Merkaptan ist bekanntlich Quecksilbercyanid; zur Zurückhaltung von Blausäure und Schwefelwasserstoff zu gleicher Zeit kam Silbernitrat in Frage;

da Quecksilbercyanid und Silbernitrat sich gegenseitig nicht umsetzten, sondern zu einer Doppelverbindung zusammentreten, so erschien eine Mischung dieser beiden Substanzen für den vorliegenden Zweck umso geeigneter, als dadurch bei dem ohnehin schon großen schädlichen Raum eine Waschflasche erspart werden konnte. Je 5%ige Lösungen von Quecksilbercyanid und Silbernitrat wurden zu gleichen Volumina mit einander gemischt; von den nach längerem Stehen abgeschiedenen Krystallen wurde abgossen und die Flüssigkeit ein wenig verdünnt; diese Lösung diente zur Füllung der dem Zersetzungskolben zunächstliegenden Waschflasche. Auf die Waschflasche folgten die Trockenapparate in Form entsprechend großer unmittelbar aneinanderschließender U-Röhren, von denen die eine mit Schwefelsäure benetzten Glasperlen, die andere mit Schwefelsäure getränktem Bimsstein beschickt war. Anschließend daran folgte eine zweite mit konzentrierter Schwefelsäure gefüllte Waschflasche; sie sollte zur Zurückhaltung des Äthylsulfides dienen und wurde deshalb nach den Trockenapparaten angeordnet, weil das Äthylsulfid schon durch einen geringen Wassergehalt in seiner Löslichkeit beeinflusst wird. An diese zweite Waschflasche schloß sich noch ein kleines mit Glaswolle gefülltes U-Röhrchen.

Von dem die ausgekochte Säure enthaltenden Kolben wurde der Gummistopfen samt Einleitungsrohr und Rückflüßkühler entfernt und rasch durch einen anderen, doppelt durchbohrten Gummistopfen ersetzt, der zwei gleich lange Einleitungsrohre trug, von denen das eine bis auf den Boden des Kolbens reichte, das andere zunächst so weit hinaufgezogen war, daß sein Ende oberhalb des Flüssigkeitspiegels zu liegen kam. Dieses Rohr wurde mittels des schon erwähnten Hahnstückes mit dem Einleitungsrohr des Zersetzungskolbens verbunden, das andere Rohr wurde mit den Kalilaugeflaschen in Verbindung gesetzt. Nachdem noch der Dreiweghahn an das Glaswollröhrchen angeschlossen worden war, wurde ein mäßiger kohlenstofffreier Luftstrom mehrere Stunden lang durch das ganze System gesaugt.

Inzwischen erfolgte die Wägung des Kaliapparates. Der-

selbe war, wie schon auseinandergesetzt, von bedeutend größeren Dimensionen als die gebräuchlichen, d. h. etwa dreimal so groß. Zum Teil wurden Apparate nach eigener Angabe, meist aber ein bei Elementaranalysen häufig gebrauchter, entsprechend vergrößerter Patentapparat benützt. Demselben war noch ein horizontal liegendes Schutzröhrchen eingerieben, welches eine Füllung aus Ätzkali- und Chlorcalciumstückchen erhielt.

Nach Unterbrechung der Durchlüftung wurde der Dreiweghahn entfernt und der Kaliapparat an das Glaswollröhrchen angeschlossen; an das Schutzröhrchen des Kaliapparates schloß sich noch ein U-Röhrchen an, dessen einer Schenkel mit Ätzkali in Substanz, dessen anderer Schenkel mit Chlorcalcium gefüllt war; auf dieses folgte der Dreiweghahn.

Nun wurde das über dem Flüssigkeitsspiegel stehende Rohr des Säurekolbens langsam bis zum Boden des Kolbens hinabgeschoben, der Dreiweghahn zur Pumpe gestellt und die Säure in den Zersetzungskolben vorsichtig hinübergesaugt. Nach Schluß des Verbindungshahnes zwischen den beiden Kolben wurde der leere Säurekolben entfernt und die Kalilaugewaschflaschen mit dem geschlossenen Hahnstück verbunden. Bei entsprechender Stellung des Dreiweghahnes erfolgte nun das langsame Anheizen des Zersetzungskolbens bis zum Sieden des Inhaltes; bei Eiweißkörpern wurde anfangs bis zur erfolgten Lösung im Wasserbade, hierauf erst über freier Flamme zum Sieden erhitzt; später wurde das Wasserbad weggelassen und direkt über freier Flamme langsam und allmählich erwärmt, wobei bis zum Sieden in allen Fällen glatte Lösung erfolgte, ohne daß störendes Schäumen oder Stoßen aufgetreten wäre. Nachdem bei gleichmäßigem und nicht zu raschem Tempo der ausgetriebenen Luft Druckausgleich eingetreten war, wurde der Dreiweghahn gegen die Pumpe gestellt und bei geöffnetem Hahn zwischen Zersetzungskolben und Kalilaugenwaschflaschen ein mäßiger Luftstrom durch den ganzen Apparat gesaugt. In einigen Fällen wurde statt kohlenstofffreier Luft kohlenstofffreier Wasserstoff verwendet.

Vor Anstellung der eigentlichen Versuche erfolgte eine Prüfung der ganzen Versuchsanordnung und Durchführung in

bezug auf die quantitative Brauchbarkeit und die Bestimmung der eventuellen Fehlergröße. Hierzu dienten einerseits Bestimmungen des Kohlensäuregehaltes in reinem Natriumcarbonat, anderseits Blindversuche.

A. Carbonatversuche.

Reines, ausgeglühtes Natriumcarbonat wurde in den Zersetzungskolben eingewogen; an Stelle der 33%igen Schwefelsäure kamen 200 ccm $n/4$ -Schwefelsäure zur Verwendung; im übrigen wurden die Versuche genau in der beschriebenen Weise durchgeführt. Nach dem Herübersaugen der Säure erforderte das langsame Erhitzen bis zum Sieden etwa 1–2 Stunden; durch die kochende Flüssigkeit wurde ca. drei Stunden Luft gesaugt; dann wurde langsam im Luftstrom erkalten gelassen.

1. 1,0042 g Na_2CO_3 , 0,4136 g CO_2 ; 2. 0,7956 g Na_2CO_3 , 0,3263 g CO_2 .

Ber. CO_2 41,38%; Gef. 41,19%, 41,02%.

Bei einem dritten Natriumcarbonatversuch waren die beiden Schwefelsäuretrockenröhren und die Schwefelsäurewaschflasche durch drei gleich große, mit Chlorcalcium beschickte U-Rohre ersetzt.

3. 1,3406 g Na_2CO_3 , 0,5552 g CO_2 ;

Ber. CO_2 41,38%; Gef. 41,41%.

B. Blindversuche.

Der Säurekolben enthält 200 ccm 33%iger Schwefelsäure; der Zersetzungskolben war leer; im übrigen wurde genau der Beschreibung entsprechend vorgegangen.

1. Blindversuch. Nach dem langsamen Erhitzen bis zum Sieden betrug die Dauer des Kochens unter Luftdurchsaugen 23 Stunden ohne Unterbrechung; der Kaliapparat zeigte nach dieser Zeit eine Gewichtszunahme von 0,001 g.

2. Blindversuch. Während der erste Blindversuch vor Beginn der eigentlichen Versuche durchgeführt wurde, erfolgte die Einschaltung dieses Blindversuches nach Absolvierung einer größeren Versuchsserie. Bei diesem Versuch befand sich zwischen der Waschflasche, welche die Quecksilbercyanid-Silbernitratmischung

enthielt, und der darauf folgenden Trockenröhre ein mit Glaswolle gefülltes U-Röhrchen, welchem gegen die Trockenröhre zu ein Hahn angeschmolzen war. Dieses sollte verhindern, daß bei der langen Versuchsdauer doch eventuell etwas von der Mischung durch Verspritzen usw. in die Trockenröhre gelange; der Hahn diene Absperrungs- und Regulierungszwecken. Die Kochdauer betrug auch in diesem Falle 24 Stunden. Der Kaliapparat zeigte eine Gewichtszunahme von 0,0028 g.

Aus diesen beiden Versuchen ergibt sich somit ein mittlerer Fehler von 0,0019 g für eine Versuchsdauer von 24 Stunden.

Es war nun zunächst notwendig, besonders auch im Sinne der einleitenden Auseinandersetzung, sich darüber zu orientieren, wie sich reine Uramidosäuren in quantitativer Beziehung beim Kochen mit Säuren bezüglich der Kohlensäureabspaltung verhalten. Solche Versuche wurden mit Leucinursäure und mit Alanursäure ausgeführt.

a) Die Leucinursäure wurde direkt aus Horn dargestellt, indem Hornspäne mit 33%iger Schwefelsäure hydrolysiert, die Schwefelsäure mittels Baryumhydroxyd entfernt und das Spaltungsgemisch direkt mit Harnstoff und Barytwasser gekocht wurde. Nach Entfernung des überschüssigen Baryts mit Kohlensäure wurde das Filtrat mit Schwefelsäure gefällt, der Niederschlag abgesaugt und die darin enthaltene Leucinursäure durch Auskochen mit Alkohol gewonnen. Der Rückstand vom Alkohol wurde aus Wasser mit etwas Tierkohle umkrystallisiert. Er war rein weiß; sein Stickstoffgehalt betrug gegen den berechneten von 16,09% nach Kjeldahl 15,91% (0,2425 g Substanz banden 27,56 ccm n_{10} -H₂SO₄).

b) Ein zweites, ebenfalls hier verwendetes Präparat wurde in ähnlicher Weise gewonnen; in diesem Falle wurde jedoch das Spaltungsgemisch mit Harnstoff und reinem Wasser gekocht. Der durch Ansäuern mit Schwefelsäure erhaltene Niederschlag gab nach zweimaligem Umkrystallisieren aus Wasser, das zweite Mal mit etwas Tierkohle, einen Stickstoffgehalt von 15,82%, nach Kjeldahl (0,3752 g Substanz banden 42,39 ccm n_{10} -H₂SO₄).

Die Alanursäure wurde durch Kochen von käuflichem Alanin mit Harnstoff und Barytwasser in der schon früher beschriebenen

Weise erhalten. 0,4050 g Substanz banden 60,78 ccm n_{10} -H₂SO₄; ber. N 21,22; gef. N 21,01%.

A. Spaltung von Leucinursäure.

Die Spaltung wurde mit 33%iger Schwefelsäure vorgenommen; die Säuremenge betrug in allen Fällen 200 ccm. Im übrigen wurde genau in der beschriebenen Weise verfahren.

1. 1,1467 g von Präparat a) gaben nach achtstündiger Kochdauer eine Kohlensäuremenge im Gewichte von 0,0688 g. Bei vollständiger Spaltung der Uramidosäure hätten 0,2898 g Kohlensäure oder 25,27% gefunden werden sollen, während nur 6,00% erhalten wurden. Es waren also nur 0,2723 g oder 23,75% der Leucinursäure gespalten worden. Dieses überraschende Resultat ließ sich sehr einfach in folgender Weise kontrollieren. Da ja der Rest der unzersetzten Uramidosäure anhydriert sein mußte, so brauchte nur eine Isolierung des Anhydrids ausgeführt zu werden, um die Richtigkeit des Kohlensäurewertes wenigstens annähernd zu bestätigen. Zu dem Zwecke wurde die Zersetzungsflüssigkeit stark verdünnt, die Schwefelsäure mit Baryt, der Baryt mit Kohlensäure entfernt und die Niederschläge abzentrifugiert. Die vereinigten Flüssigkeiten wurden sodann am Wasserbade zur Trockene verdunstet und der Rückstand mit Äther extrahiert. Der Ätherrückstand wog 0,7609 g. Zieht man die aus der abgespaltenen Kohlensäuremenge berechnete Leucinursäure von der zum Versuch verwendeten Menge ab und berechnet aus dem Rest die noch unzersetzte Menge Anhydrid, so beträgt dieselbe 0,7839 g. Es wurden also 96,84% der berechneten Menge wiedergefunden.

2. 1,4188 g von Präparat a) gaben nach achtstündiger Kochdauer eine Kohlensäuremenge im Gewichte von 0,0754 g. Dies entspricht 5,31% der angewendeten Substanz. Gespalten wurden also 0,2984 g oder 21,03% der Leucinursäure. Nach dem Erkalten schied die Zersetzungsflüssigkeit reichlich Krystalle von Anhydrid ab. Sie wurde in einen Scheidetrichter überfüllt und achtmal mit Äther ausgeschüttelt. Der Ätherrückstand wog 0,9636 g; es entspricht dies 95,93% der wie unter 1. berechneten Anhydridmenge.

3. 1,3006 g von Präparat a) sollten einer Einwirkung der Schwefelsäure von 24 Stunden Dauer unterworfen werden. Nach ca. 8 stündigem Kochen trat ein Sprung des Schliffes am Schutzröhrchen des Kaliapparates ein. Eine Wägung der in dieser Zeit abgespaltenen Kohlensäure konnte also nicht vorgenommen werden. Wohl aber konnte die noch vorhandene Anhydridmenge bestimmt und daraus die abgespaltene Kohlensäure berechnet werden. Aus der Zersetzungsflüssigkeit waren wieder reichlich Krystalle von Leucinurid ausgefallen. Sie wurde wie vorher 8 mal mit Äther ausgeschüttelt. Gefunden wurden 0,8781 g Leucinurid. Da die Ausführung dieses Versuches ganz konform jener des 2. Versuches war, so darf man annehmen, daß die jetzt gefundene Leucinuridmenge gleichfalls etwa 96% der vorhandenen ausmacht, wie dort sich ergab. Auf Grund dieser Annahme berechnen sich für die gespaltene Leucinursäuremenge 21,55% und die abgespaltene Kohlensäure würde 5,45% des Ausgangsmateriales ausmachen, in bester Übereinstimmung mit den entsprechenden Werten des zweiten Versuches.

4. 1,7716 g Substanz (Präparat b) gaben nach 24 stündigem Kochen mit 33%iger Schwefelsäure 0,2282 g Kohlensäure. Statt der bei vollständiger Spaltung zu erwartenden 25,27% waren selbst nach so langer Kochdauer nur 12,88% gefunden worden. Es wurde demnach nur etwa die Hälfte der vorhandenen Leucinursäure, d. h. 0,9031 g oder 50,98% gespalten. Zur Kontrolle wurde wieder die Zersetzungsflüssigkeit mit Äther 8 mal ausgeschüttelt; gefunden wurden 0,7543 g Leucinurid; dies entspricht 96,87% der wie früher berechneten Menge von 0,7787 g.

B. Spaltung von Alanursäure.

Wie bei A wurden in jedem Falle 200 ccm 33%ige Schwefelsäure verwendet. Im übrigen wurde genau in der beschriebenen Weise verfahren.

1. 1,8538 g Substanz gaben nach 8 stündigem Kochen 0,1783 g Kohlensäure, dies entspricht 9,62% der verwendeten Alanursäure, während bei völliger Spaltung 33,31% hätten

gefunden werden müssen. Demnach wurde wieder nur ein Bruchteil der Säure gespalten und zwar 0,5352 g oder 28,87%.

2. 2,1362 g Alanursäure gaben nach 24 stündigem Kochen 0,4210 g Kohlensäure, was 19,71% der verwendeten Substanz entspricht. Es betrug daher die Menge der zersetzten Säure 1,2638 g oder 59,16%. Zur Kontrolle wurde die Zersetzungsflüssigkeit mit Baryumhydroxyd von der Schwefelsäure, mit Kohlensäure vom Baryt befreit. Die Niederschläge wurden abzentrifugiert, mit Wasser gewaschen und die vereinigten Flüssigkeiten am Wasserbade zur Trockne verdampft. Der Rückstand wurde mit Äther extrahiert und der Äther im gewogenen Wägegläschen verdunstet. Gefunden wurden 0,7189 g Alanurid, also 95,40% der wie früher berechneten Menge von 0,7536 g.

Die Versuche zeigen aufs deutlichste, wie langsam und schwierig die Anhydride selbst von starken Säuren gespalten werden, worauf schon früher¹⁾ in anderem Zusammenhange hingewiesen wurde. Man sieht ferner, daß die Spaltung keineswegs proportional der Zeit erfolgt, so daß nach 24 Stunden nicht der dreifache Betrag der nach 8 Stunden abgespaltenen Kohlensäuremenge, sondern nur etwa die Hälfte der berechneten, d. h. theoretischen Menge erhalten wird. Offenbar ist dies der Ausdruck einer Gleichgewichtsreaktion und die Anhäufung freier Aminosäure scheint das Gleichgewicht nach der Seite des Anhydrids zu verschieben. Diese Beobachtung ist besonders für ein eventuelles Auftreten von Uramidosäure unter den Eiweißspaltungsprodukten von Bedeutung. Der Betrag der in einer bestimmten Zeit abgespaltenen Kohlensäure ist für die einzelnen Uramidosäuren, wie ersichtlich, verschieden und scheint für jene der Glykokoll- resp. Glykollursäurereihe mit dem Molekulargewicht parallel dem entsprechenden Gesamtwert anzusteigen. Doch ist anderseits aus den mitgeteilten Beispielen, welche zwei genügend weit abstehende Glieder der Reihe betreffen, zu entnehmen, daß die korrespondierenden Zahlen nicht allzuweit voneinander entfernt sind, sodaß besonders dort, wo

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 90, S. 124, 1914.

es sich um kleine Mengen von Uramidosäuren handelt, also auch um kleine Kohlensäuremengen, die darauf bezüglichen Differenzen nicht sehr merklich sein werden. Man wird also unter Berücksichtigung dieser Umstände annehmen dürfen, daß selbst bei großem Überschuß der spaltenden 33%igen Schwefelsäure im Mittel 50% einer Uramidosäure bei 24stündiger Kochdauer gespalten werden, daß also auch nur die Hälfte der theoretisch zu erwartenden Kohlensäuremenge in dieser Zeit auftreten wird.

Von dieser Annahme ausgehend läßt sich also mit Hilfe einer in 24 Stunden erhaltenen Kohlensäurezahl annähernd die Menge der zugehörigen Uramidosäure berechnen.

Zur übersichtlichen Erläuterung des Gesagten seien die in Betracht kommenden Zahlen nochmals zusammengestellt:

	Sub- stanz g	8 Stunden. Spaltung			Sub- stanz g	24 Stunden. Spaltung		
		g CO ₂	% der Sub- stanz	% der theoret. Menge		g CO ₂	% der Sub- stanz	% der theoret. Menge
Leucinsäure	1,1467	0,0688	6,00	23,75	—	—	—	—
	1,4188	0,0754	5,31	21,03	—	—	—	—
	1,3006	0,0774	5,45	21,55	1,7716	0,2282	12,88	50,98
Alanursäure	1,8538	0,1783	9,62	28,87	2,1362	0,4210	19,71	59,16

Schließlich sei noch darauf hingewiesen, daß die mitgeteilten Untersuchungen einen weiteren Beitrag liefern, bezüglich der Anwendungen der Uramidosäurereaktion. Einmal was die rasche Darstellung von Leucinursäure direkt aus den Eiweißspaltungsgemischen anlangt, worüber noch ausführlicher zu berichten sein wird, und andererseits, was die analytische Verwertbarkeit auch in quantitativer Beziehung betrifft.

Nunmehr seien die Resultate mitgeteilt, die bei der Säurespaltung jener Eiweißkörper, deren Darstellung oben kurz mitgeteilt wurde, resultierten. Auch hier wurden in jedem Falle 200 ccm 33%ige Schwefelsäure zur Spaltung verwendet. Im allgemeinen wurde in der oben beschriebenen Weise verfahren. Die Eiweißkörper kamen lufttrocken zur Wägung.

A. Parhämoglobin.

1. Es wurde zwei Stunden im Wasserbade erhitzt, sodann 9 Stunden über freier Flamme im Sieden erhalten. Die erste, mit der Quecksilbercyanid-Silbernitratmischung beschickte Waschflasche zeigte eine geringe schwarze Abscheidung; dieselbe trat in allen Säurespaltungsversuchen auf, war jedoch in keinem Falle irgend bedeutend, sodaß zunächst auf deren weitere Untersuchung verzichtet wurde. Äthylsulfid ließ sich nicht nachweisen. Zur Verwendung kam das erste Parhämoglobinpräparat. 9,5115 g Substanz gaben 0,0151 g Kohlensäure; dies entspricht 0,159% des lufttrockenen Ausgangsmateriales oder 0,179% der wasserfreien Substanz.

2. Dasselbe Präparat wie vorher. Der ganze Versuch wurde unter Durchsaugen von kohlenstofffreiem Wasserstoff durchgeführt. Das Erhitzen im Wasserbad fiel weg; es wurde sogleich vorsichtig über freier Flamme erwärmt; die Lösung erfolgte glatt; nach 1½ Stunden war Sieden unter gleichzeitigem Druckausgleich eingetreten; von da ab wurde 8 Stunden im Sieden erhalten. 14,6385 g Substanz gaben 0,0228 g Kohlensäure; dies entspricht 0,156% des lufttrockenen oder 0,175% des bei 100° getrockneten Ausgangsmaterials.

3. Präparat wie vorher. Dieser und die folgenden Versuche erfolgten wieder unter Durchsaugen von kohlenstofffreier Luft. Bei diesem Versuch war zwischen die erste Waschflasche und das erste Trockenrohr das schon beim zweiten Blindversuch beschriebene Glaswollröhrchen mit Hahn eingeschaltet. Erhitzt wurde direkt über freier Flamme eine Stunde bis zum Sieden; sodann wurde ununterbrochen 24 Stunden im Sieden erhalten. 15,8389 g Substanz gaben 0,0496 g Kohlensäure; es entspricht dies 0,313% der lufttrockenen oder 0,352% der wasserfreien Substanz.

4. Bei den vorhergehenden Versuchen und auch bei dazwischenliegenden mit anderen Eiweißkörpern wurde beobachtet, daß die Schwefelsäure in dem einen Schenkel des ersten Trockenrohres an der Eintrittsstelle des Gasstromes sich bräunlich färbte. Die Füllung dieses Rohres wurde deshalb des

öfteren erneuert. Um zu beurteilen, ob im Zusammenhang mit dieser Färbung nicht vielleicht eine wesentliche Fehlerquelle zu suchen sei, wurden die beiden Schwefelsäuretrockenrohre durch gleichgroße, mit Chlorcalcium gefüllte U-Rohre ersetzt. Im übrigen war die Versuchsanordnung die gleiche wie früher. Zu diesem und dem folgenden Versuch wurde das zweite Parhämoglobinpräparat verwendet. Das Erwärmen bis zum Sieden beanspruchte eine Stunde; hierauf wurde 24 Stunden gekocht. 8,4512 g Substanz gaben 0,0249 g Kohlensäure, was 0,295% der lufttrockenen oder 0,332% der wasserfreien Substanz entspricht. Im Verlauf dieses Versuches färbte sich die Schwefelsäure der hinter den Chlorcalcium-U-Rohren befindlichen Waschflasche gelblich. Wurde die Schwefelsäure entleert und mit Wasser verdünnt, so entwickelte sich in geringem Maße ein eigentümlicher, nicht näher definierbarer Geruch, der jenem ähnlich war, den die Zersetzungsflüssigkeit selbst zeigte.

5. Bei diesem Versuche wurde auch die Schwefelsäurewaschflasche durch ein mit Chlorcalcium gefülltes U-Rohr ersetzt, so daß nunmehr der Gasstrom keine konzentrierte Schwefelsäure mehr zu passieren hatte (vgl. den dritten Carbonatversuch). Das Erhitzen bis zum Sieden dauerte in diesem Falle 2 Stunden, worauf wieder eine Kochdauer von 24 Stunden folgte. 11,7431 g Substanz gaben 0,0386 g Kohlensäure, entsprechend 0,329% der lufttrockenen oder 0,370% der wasserfreien Substanz. Es konnte also die flüchtige, die Schwefelsäure färbende Substanz keinen merklichen Einfluß auf das Resultat der Kohlensäurebestimmungen ausüben.

B. Eieralbumin.

1. Die Versuchsanordnung entsprach genau der früher beschriebenen; es wurde zunächst 2 Stunden im Wasserbad erhitzt und sodann 9 Stunden über freier Flamme gekocht. 5,9124 g Substanz gaben 0,008 g Kohlensäure, entsprechend 0,135% der lufttrockenen oder 0,152% der wasserfreien Substanz.

2. In diesem Falle wurde direkt über freier Flamme in 2 Stunden langsam bis zum Sieden erhitzt und sodann das-

selbe durch 27 Stunden erhalten. 10,9274 g Substanz gaben 0,0328 g Kohlensäure; dies entspricht 0,300% der lufttrockenen oder 0,336% der wasserfreien Substanz.

C. Serumglobulin.

Bei diesem Versuch befanden sich wie beim fünften Parhämoglobinversuch an Stelle der Schwefelsäuretrockenröhren und der Schwefelsäure-Waschflasche drei Chlorcalcium-U-Rohre. 9,2928 g Substanz gaben 0,0303 g Kohlensäure. Es entspricht dies 0,327% der lufttrockenen resp. 0,364% der wasserfreien Substanz. 2 Stunden Anheizen bis zum Sieden; 24 Stunden Kochdauer.

D. Elastin.

1. Dieser Versuch sowie der folgende wurden unter Durchsaugen von kohlenstofffreiem Wasserstoff durchgeführt. Im übrigen die früher beschriebene Versuchsanordnung. Das In-Lösung-gehen über freier Flamme erfolgte hier besonders leicht und glatt. Es entstand eine klare gelbe Lösung, die beim Kochen nur wenig dunkler wurde. Die Kochdauer betrug 11 Stunden. 10,1173 g Substanz gaben 0,0100 g Kohlensäure, entsprechend 0,099% der lufttrockenen oder 0,112% der wasserfreien Substanz.

2. Vor Anstellung des eigentlichen Versuches wurde die abgewogene Substanz mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe unter stark verminderten Druck gesetzt und durch 2 Stunden entsprechend verdünnter Wasserstoff durch das Gefäß gesaugt. Bei diesem Versuch war ferner wie beim zweiten Blindversuch und beim dritten, vierten und fünften Parhämoglobinversuch hinter die erste Waschflasche das Glaswollröhrchen mit Hahn eingeschaltet. Sonst wie früher beschrieben. Lösungsdauer bis zum Kochen 1 Stunde, Kochdauer 24 Stunden. 21,8052 g Substanz gaben 0,0250 g Kohlensäure, entsprechend 0,115% der lufttrockenen oder 0,130% der wasserfreien Substanz.

E. Keratin.

1. Die Versuche mit Keratin wurden wieder unter Durchsaugen kohlenstofffreier Luft ausgeführt. Vor Anstellung der

Spaltungsversuche wurde wie beim zweiten Elastinversuch mehrere Stunden evakuiert. Glaswollröhrchen mit Hahn hinter der ersten Waschflasche, sonst wie früher beschrieben. 10,5751 g Substanz gaben 0,0197 g Kohlensäure, entsprechend 0,186% der lufttrockenen oder 0,210% der wasserfreien Substanz. Erhitzen bis zum Kochen 1½ Stunden, Kochdauer 8 Stunden.

2. Ausführung wie beim ersten Versuch. 15,3275 g Substanz gaben 0,0505 g Kohlensäure, entsprechend 0,330% der lufttrockenen oder 0,372% der wasserfreien Substanz. Erhitzen bis zum Sieden 1½ Stunden, Kochdauer 24 Stunden.

Im folgenden seien die gewonnenen Resultate und die auf das wasserfreie Ausgangsmaterial bezogenen Prozentzahlen übersichtlich zusammengestellt.

	Substanz wasser- frei	8—11 Stunden Spaltung		Substanz wasser- frei	24—27 Stunden Spaltung	
		g CO ₂	% CO ₂		g CO ₂	% CO ₂
Parhämoglobin	8,4591	0,0151	0,179	14,0865	0,0496	0,352
	13,0188	0,0228	0,175	7,5102	0,0249	0,332
	—	—	—	10,4356	0,0386	0,370
		Mittel . .	0,177		Mittel . .	0,351
Eieralbumin .	5,2815	0,0080	0,152	9,7614	0,0328	0,336
Serumglobulin	—	—	—	8,3198	0,0303	0,364
Elastin	8,9228	0,0100	0,112	19,2310	0,0250	0,130
Keratin	9,3461	0,0197	0,210	13,5730	0,0505	0,372

Vergleichen wir nun die hier zusammengestellten Resultate mit jenen, die bei den Uramidosäuren gewonnen wurden, so ergibt sich in fast allen Punkten eine auffallende Übereinstimmung. Zunächst zeigt sich, daß der Typus der Kohlensäureabspaltung in beiden Fällen der gleiche ist. Die Abspaltung erfolgt ganz allmählich, ist selbst nach langer Zeit nicht vollständig, nimmt aber mit der Dauer der Spaltwirkung an Intensität ab, ist also der Zeit nicht proportional, sondern strebt einem gewissen Grenzwert zu. Die nach 8—11 Stunden Spaltung erhaltenen Kohlensäurewerte sind ungefähr die Hälfte der 24 Stundenwerte; man vergleiche damit die betreffenden Befunde bei den Uramidosäuren. Es ist nun besonders be-

merkwürdig, daß bei Eiweißkörpern so verschiedener Art wie den hier untersuchten der Typus der Kohlensäureabspaltung der gleiche ist. Dies deutet darauf hin, daß in allen Fällen die gleichen oder mindestens ähnlich gebaute Substanzen zu dieser Abspaltung in Beziehung stehen. Nicht minder charakteristisch ist ferner, vom Elastin sei zunächst abgesehen, daß die Grenzwerte, denen die Kohlensäureabspaltung bei den untersuchten Eiweißkörpern zustrebt, augenscheinlich von einem bestimmten Mittelwert nicht weit verschieden sein können, wie dies auch für die Uramidosäuren gefunden wurde. Im vorliegenden Falle deutet, wieder vom Elastin zunächst abgesehen, die Ähnlichkeit der nach 24 Stunden erhaltenen Werte außerdem darauf hin, daß die Kohlensäure liefernden Substanzen in den untersuchten Eiweißkörpern in nicht sehr von einander verschiedenen Mengen vorhanden sind. Es ist dies nicht allzu auffällig, da z. B. auch die Ammoniakwerte bei Säurespaltung für dieselben Eiweißkörper nicht allzu verschieden zu sein scheinen, soweit die vorliegenden Bestimmungen ein Urteil zulassen. Die entsprechenden Werte sind für Hämoglobin, Eieralbumin, Serumglobulin und Keratin: 1,07%; 1,50%; 1,75%; 1,42%; oder mit Benutzung der von Skraup und Hardt-Stremayr¹⁾ angegebenen Werte: 1,07; 1,1; 1,0; 1,42. Lassen auch, wie schon einleitend hervorgehoben, die Ammoniak- und Kohlensäurewerte einen Vergleich nicht zu, so liegt doch vielleicht in der Gleichförmigkeit der Werte innerhalb beider Reihen ein gewisser Zusammenhang. Die trotz der Gleichförmigkeit im allgemeinen bei den genannten Eiweißkörpern in den 24 Stundenwerten vorhandenen geringen Differenzen können nicht ohne weiteres auf Analysefehler zurückgeführt werden, weil sie in den 8 Stundenwerten und hier noch deutlicher in demselben Sinne zum Ausdruck kommen. Mit Rücksicht auf die bei der Uramidosäureabspaltung gemachten Beobachtungen könnte dies als Ausdruck einer gewissen Verschiedenheit des Ausgangsmateriales insofern gedeutet werden, als den Kohlensäure liefernden Körpern verschiedene Amino-

¹⁾ Monatshefte f. Chemie, Bd. 29, S. 225, 1908.

säuren zugrunde liegen. Um Wiederholungen zu vermeiden, sei auf das bei Besprechung der Uramidosäurespaltung Gesagte verwiesen.

Einer gesonderten Betrachtung bedarf der auffallend niedrige Wert des Elastins. Dies könnte der Ausdruck einer besonderen Eigenart dieses Eiweißkörpers insofern sein, als die Kohlensäure liefernden Substanzen in sehr viel geringerer Menge vorhanden wären. Dem würde auch der sehr geringe Ammoniakgehalt des Elastins entsprechen. In Analogie hiezu stünde das Verhalten des Glutins, welches sehr wenig Ammoniak und nach der hier mitgeteilten Vorprobe auch wenig Kohlensäure liefert. Nun muß aber die Darstellung des Elastins beachtet werden. Skraup¹⁾ hat gezeigt, daß ein Teil des Amidstickstoffes der Eiweißkörper schon beim Kochen mit relativ verdünnten Säuren rasch abgespalten wird. Ungleich stärker und schon in der Kälte wirkt Alkali auch bei stärkerer Verdünnung. Beides kommt bei der Darstellung des Elastins in Frage, und der letztere Umstand wäre auch besonders rücksichtlich der Spaltung von eventuellen Harnstoffgruppen zu beachten. Übrigens ist es keineswegs von vornherein sicher, daß auch das Kollagen einen ebenso geringen Ammoniakgehalt besitzt wie der Leim, dem Skraup¹⁾ überhaupt jeden Amidstickstoff abspricht.

Angenommen nun, es lassen sich die erörterten Umstände in dem Sinne deuten, daß die bei der Säurespaltung gebildete Kohlensäure Harnstoffresten im Eiweißmolekül ihren Ursprung verdankt, so läßt sich aus den 24 stündigen Kohlensäurewerten mit Rücksicht auf die bei der Uramidosäurespaltung gefundenen Tatsachen annähernd die Gesamturamidosauremenge berechnen. Nimmt man das Mittel aus sämtlichen theoretischen Kohlensäurezahlen, welche den Monaminursäuren einschließlich der Cystinursäure entsprechen, so erhält man eine Zahl, die jener für die Leucinursäure entspricht, nämlich 25,3%. Gemäß dem Umstande, daß bei den Uramidosäuren in 24 Stunden etwa die halbe theoretische Kohlensäuremenge abgespalten wird, sind die für diese Zeit gefundenen Kohlensäurezahlen bei den

¹⁾ loco cit.

einzelnen Eiweißkörpern zu verdoppeln, um den Gesamturamidokohlensäurewert zu erhalten. Mit Hilfe der Zahl 25,3 berechnen sich sodann die mittleren Gesamturamidosaurewerte für die untersuchten Eiweißkörper wie folgt: Parhämoglobin 2,8%; Eialbumin 2,7%; Serumglobulin 2,9%; Elastin 1,0%; Horn 3,0%.

Es sei auch noch an das Folgende erinnert: Henderson ¹⁾ hat gezeigt, daß vergleichbare Ammoniakwerte bei der Säurespaltung nur bei gleicher Säurekonzentration und bei gleich langer Kochdauer erhalten werden können; es beruht dies, wie aus den Untersuchungen von Skraup und Hardt-Stremayr ²⁾ hervorgeht, darauf, daß ein erheblicher Teil «zwei Drittel und darüber» des Ammoniaks sehr rasch abgespalten werden, während der Rest erst bei energischer Einwirkung und nur allmählich auftritt. Hier könnte sehr wohl die Beziehung zu der in ganz ähnlicher Weise abgespaltenen Kohlensäure liegen. Den mitgeteilten Kohlensäurewerten würde etwa $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{5}$ der angeführten Ammoniakwerte entsprechen. Möglicherweise ist hier der Weg vorgezeichnet, um das Problem der Harnstoffreste im Eiweißmolekül auch von der Seite der Ammoniakwerte her in Angriff zu nehmen.

Bevor ich zur Mitteilung der Resultate übergehe, die bei der Alkalisplaltung der Eiweißkörper erhalten wurden, seien noch Versuche angeführt, die auf anderem Wege Material zu der hier behandelten Frage herbeischaffen sollten.

Auf Grund der Ätherlöslichkeit einer Anzahl von Anhydriden der Uramidosäuren ist die eventuelle Möglichkeit gegeben, einen direkten Nachweis von Harnstoffresten im Eiweißmolekül durch die Isolierung solcher Anhydride aus einem Spaltungsgemisch zu führen. Dabei ist jedoch folgendes zu bedenken. Einmal müssen nicht unbedingt ätherlösliche Anhydride vorhanden sein; zweitens kann die Harnstoffgruppe an verschiedenen Aminosäuren sitzen; sind die ätherlöslichen Anhydride in diesem Gemisch in untergeordneter Menge vorhanden, so bedarf es der Verarbeitung sehr großer Material-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 29, S. 47, 1899.

²⁾ loco cit.

mengen, um zum Ziele zu gelangen; sind eventuell drittens Diureide vorhanden, dann fällt vielleicht die Möglichkeit der Anhydridbildung ganz weg. Aus diesen Gründen ist der negative Ausfall eines Isolierungsversuches von Anhydrid mittels Äthers keineswegs ein Gegenargument gegen das Vorhandensein von Harnstoffresten im Eiweißmolekül.

Nachdem Ausschüttelungen von Spaltungsgemischen einiger Eiweißkörper, allerdings bei nur kleineren Mengen derselben, es nicht unmöglich erscheinen ließen, daß die gesuchten Substanzen vorhanden seien, wurde ein Versuch in größerem Stile mit Horn ausgeführt. 500 g Hornspäne wurden mit 2 l 33%iger Schwefelsäure 24 Stunden im Wasserbade, sodann 12 Stunden über freier Flamme erhitzt. Die Hydrolysenflüssigkeit wurde portionenweise in großen Schütteltrichtern direkt und wiederholt mit Äther ausgeschüttelt. Der Rückstand der vereinigten Ätherextrakte wurde nach wiederholter Behandlung mit Petroläther, da er sich in Wasser nicht löste, mit Barytwasser aufgenommen. Nach Neutralisation mit Schwefelsäure wurde mit Tierkohle entfärbt und am Wasserbade verdunstet. Es hinterblieb ein schwach gelblicher nicht krystallisierender, gut trocknender, wasserlöslicher Rückstand. Die wässerige Lösung reagierte neutral; sie gab starke Baryumreaktion (beim Einäschern auf dem Platinblech trat Verkohlung ohne Schmelzen ein; die Asche bestand aus Baryumcarbonat); ferner entstanden flockige Niederschläge mit salpetersaurem Quecksilberoxyd und mit Silbernitrat, die sich beide zunächst in überschüssiger Salpetersäure lösten; alsbald jedoch entstanden krystallinische Niederschläge. Beim Kochen der wässerigen Lösung mit Lauge wurde Ammoniak abgespalten. Weitere Untersuchungen müssen die Entscheidung bringen, ob hier ein Körper der gesuchten Art vorliegt.

Versuche in ganz anderer Richtung wurden durch die folgenden Umstände veranlaßt. Die seit den Untersuchungen von Béchamps wiederholt experimentell studierte und vielumstrittene Frage nach der direkten Entstehung von Harnstoff aus Eiweiß durch Oxydation schien bis vor kurzem im negativen Sinne erledigt zu sein, insbesondere seitdem Hof-

meister¹⁾ gezeigt hatte, daß zur Bildung größerer Mengen dieses Körpers die Gegenwart von Ammoniak notwendig ist. Nun konnte aber Fosse²⁾ vor kurzem mit Hilfe seiner Xanthydrolreaktion zeigen, daß die Beobachtung Béchamps zu Recht besteht und daß bei der direkten Oxydation von Eiweiß mit Permanganat Harnstoff, wenn auch in kleineren Mengen, gebildet wird.

Dieser Befund läßt sich nun sehr wohl mit der Vorstellung in Zusammenhang bringen, daß im Eiweißmolekül Harnstoffreste vorhanden sind, vorausgesetzt, daß bei der Oxydation der Harnstoff als solcher abgespalten wird, also eine Desureirung erfolgt. Dies legte den Gedanken nahe, Oxydationsversuche mit Uramidosäuren auszuführen.

Zunächst wurde ein solcher Versuch mit Kaliumpermanganat unternommen. 1,1333 g aus Wasser umkrystallisierter Leucinursäure wurden in 100 ccm Wasser suspendiert und am Wasserbad erwärmt. Hierauf wurde gepulvertes Kaliumpermanganat in kleinen Portionen eingetragen; nach 3 stündigem Erhitzen am Wasserbad wurde die alkalische Reaktion der Flüssigkeit mittels Schwefelsäure abgestumpft, hierauf noch Permanganat zugefügt und 48 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Sodann erfolgte die Zerstörung des überschüssigen Permanganats in der Siedehitze unter Zufügen einiger Tropfen Oxalsäure. Im ganzen wurden 7,7 g Kaliumpermanganat verbraucht. Nach Abfiltrieren des Braunsteins wurde das Filtrat mit Schwefelsäure angesäuert und wiederholt mit Äther ausgeschüttelt. Hierauf wurde mit Kalilauge neutralisiert und die Flüssigkeit unter steter Kontrolle der neutralen Reaktion im Vakuum zur Trockne verdunstet. Die hinterbleibende Salzmasse wurde mit Alkohol extrahiert, der Rückstand vom Alkohol mit Alkoholäther zu gleichen Teilen erschöpft und der nach Abdestillieren der Flüssigkeit bleibende Rückstand wiederholt mit warmem Amylalkohol digeriert. Nach dem Erkalten und Filtrieren wurde der Amylalkohol mit gepulverter krySTALLISIERTER Oxalsäure gesättigt. Die so erhaltene reichliche

¹⁾ Arch. f. exp. Path. u. Pharm., Bd. 37, S. 426, 1896.

²⁾ Compt. rend., Bd. 154, S. 1187, 1912.

weiße Fällung wurde abfiltriert und am Filter anhaltend mit Äther gewaschen. Nachdem durch Schütteln mit Calciumcarbonat die Zerlegung des Oxalsäureniederschlages herbeigeführt worden war, wurde das Filtrat im Vakuum verdunstet und der Rückstand mit Alkohol aufgenommen. Nach dem Verdunsten des Alkohols hinterblieb ein aus langen farblosen Nadeln bestehender Rückstand im Gewichte von 0,1760 g.

Die Krystalle gaben alle Harnstoffreaktionen, d. h. die Biuretreaktion, die charakteristischen Krystallisationen mit Salpetersäure und Oxalsäure, die Luedysche Reaktion mit Orthonitrobenzaldehyd und die Schiffsche Furfurolreaktion in typischer Weise.

Bei dieser Gelegenheit sei erwähnt, daß die Uramidosäuren im allgemeinen die gebräuchlichsten Harnstoffreaktionen nicht geben. Daß und wie sie mit salpetersaurem Quecksilberoxyd reagieren und ebenso bezüglich der Biuretreaktion der Glykollursäure ist das Nötige schon früher¹⁾ mitgeteilt worden; hier sei noch hinzugefügt, daß sie die Schiffsche Furfurolreaktion geben, die schwerlöslichen schwächer, die löslichen mit nahezu derselben Intensität wie der Harnstoff.

Darnach wurde ein zweiter Versuch mit Baryumpermanganat ausgeführt. 1,7896 g Leucinursäure wurden wie früher in 100 ccm Wasser suspendiert, am Wasserbad erwärmt und portionenweise gepulvertes Baryumpermanganat in die Flüssigkeit eingetragen. Die Oxydation wurde viele Stunden hindurch unter ständigem Erwärmen am Wasserbade fortgesetzt; zweimal wurde während dieser Zeit die alkalische Reaktion mit Schwefelsäure abgestumpft. Zum Schlusse wurde zur Zerstörung des überschüssigen Permanganats über freier Flamme erhitzt. Das Filtrat vom Braunstein wurde neutralisiert und im Vakuum verdunstet. Der Rückstand wurde mit Alkoholäther zu gleichen Teilen extrahiert, der vom Alkoholäther hinterlassene Rückstand in Amylalkohol gelöst und der letztere mit Oxalsäure gesättigt. Der daraufhin erhaltene Niederschlag wurde abfiltriert, mit Äther gewaschen und sodann mittels Calciumcarbonat zerlegt; das Filtrat vom Calciumcarbonat wurde wieder im Vakuum

¹⁾ loco cit.

verdunstet und der Rückstand mit Alkoholäther zu gleichen Teilen aufgenommen. Nach dem Verdunsten desselben hinterblieben schöne lange farblose Nadeln im Gewichte von 0,1370 g.

Die Krystallnadeln erwiesen sich durch die charakteristischen Reaktionen, durch Schmelzpunkt und Stickstoffgehalt als Harnstoffkrystalle.

Zur Kontrolle wurde Leucin in der gleichen Weise, wie früher beschrieben, mit Kaliumpermanganat oxydiert. Harnstoff konnte nicht nachgewiesen werden.

Die Versuche zeigen also, daß bei der direkten Oxydation von Uramidosäure mit Permanganat Harnstoff leicht entsteht, daß somit in der Tat eine Desureirung eintritt; während der Oxydation ist deutlich der Geruch nach Isovaleraldehyd wahrzunehmen; der Rückstand nach Ausschüttelung der sauren Flüssigkeit mit Äther zeigte den Geruch nach Isovaleriansäure.

Trotz der wenig vorsichtigen Oxydation und der nicht entfernt quantitativen Isolierung des Harnstoffes betrug im ersten Versuche die gewonnene Menge desselben 45% (also etwa die Hälfte) der berechneten. Beim zweiten Versuch wurden allerdings nur 22% der berechneten Menge erhalten, doch muß die lange Erhitzungsdauer in Betracht gezogen werden und es spricht gerade der Vergleich des ersten und des zweiten Versuches dafür, daß der Harnstoff zu Beginn der Oxydation rasch und wahrscheinlich ziemlich vollständig abgespalten und dann weiterhin erst durch sekundäre Einflüsse zerstört wird. Bei der Leucinursäure muß auch deren Schwerlöslichkeit in Betracht gezogen werden, welche bewirkt, daß deren Oxydation nach Maßgabe des In-Lösung-Gehens erfolgt, wodurch dann die eventuellen zerstörenden Einflüsse auf den anfänglich rasch abgespaltenen Harnstoff um so länger einwirken.

Mit diesen Versuchen ist die oxydative Abspaltung von Harnstoff aus Uramidosäure bewiesen. Dadurch und durch die Annahme, daß das Eiweiß Harnstoffreste in uramidosäureartiger Bindung enthält, wird die direkte oxydative Harnstoffbildung aus Eiweiß verständlich. Die Stichhaltigkeit jener Annahme und die annähernde Richtigkeit des daraufhin berechneten Gehaltes an Uramidosäure vorausgesetzt, erklärt, daß nur eine relativ

geringe Menge Harnstoff oxydativ gebildet werden kann, wodurch bei der Schwierigkeit der Isolierung die bisherigen widersprechenden resp. meist negativen Resultate begreiflich werden, während die Methode Fosses bei genügender Empfindlichkeit ohne vorhergehende Isolierung arbeitet.

Die oxydative Abspaltung von Harnstoff aus Uramidosäuren ist noch anderweitig chemisch und physiologisch von nicht geringem Interesse, doch gehören diese Erörterungen nicht hierher; hier wurde sie nur von dem Standpunkte aus betrachtet, von welchem aus sie der hier gemachten Annahme zur nicht unwesentlichen Stütze dient.

Nunmehr gehen wir zu den Versuchen über, welche die Abspaltung von Kohlensäure aus den Eiweißkörpern bei Einwirkung von Alkali zum Gegenstande haben. Diese Versuche waren dadurch etwas kompliziert, daß das Alkali dem Zersetzungskolben unter Luft, d. h. Kohlensäureabschluß zugeführt und unter denselben Bedingungen mit Säure übersättigt werden mußte. Das Alkali befand sich in einer größeren Vorratsflasche; letztere wurde mittels eines zweimal rechtwinklig gebogenen Hahnstückes mit dem einen Einleitungsrohr des Zersetzungskolbens in Verbindung gesetzt. Letzterer bestand aus einem Jenaer Kolben von 1000 ccm Fassungsraum. Die dreifache Bohrung seines Gummistopfens diente einem Rückflußkühler und zwei Einleitungsrohren zur Aufnahme, von denen das eine, wie schon erwähnt, die Verbindung zur Vorratsflasche, das andere die Verbindung zum Säurekolben herstellte, gleichfalls mittels eines Hahnstückes von schon beschriebener Form.

Zunächst wurde wieder die zur Übersättigung dienende Säure in der früher beschriebenen Weise ausgekocht; darnach wurde der Säurekolben mit den beiden Einleitungsrohren in der früher beschriebenen Weise versehen und mittels des einen Hahnstückes mit dem entsprechenden Einleitungsrohr des Zersetzungskolbens verbunden. In diesem befand sich die gewogene Substanz; nachdem das zweite Einleitungsrohr mit der Vorratsflasche, der Rückflußkühler mittels des schon bekannten zweifach abgebogenen Rohres mit einer Kalilaugewaschflasche verbunden war, wurde an letztere ein Dreiweghahn angeschlossen

und bei geschlossenem Hahn zur Vorratsflasche, bei offenem Hahn zum Säurekolben ein kohlensäurefreier Luftstrom ein bis zwei Stunden durch den Apparat gesaugt. Schließung des Hahnes zum Säurekolben, Öffnung des Hahnes zur Vorratsflasche und Hinübersaugen eines bestimmten Volumens Alkali, Schluß des Hahnes. Hierauf bei entsprechender Stellung des Dreiweghahnes Erhitzen des Kolbeninhaltes evtl. zunächst im Wasserbad, dann über freier Flamme. Nach Sieden und Druckausgleich Umstellung des Dreiweghahnes, Öffnung des Hahnes zum Säurekolben und Durchsaugen von kohlensäurefreier Luft während der ganzen Dauer des Kochens. Nach Unterbrechung desselben und Abkühlen Abklemmen des Schlauchstückes zur Kalilaugewaschflasche; die letztere wird samt dem Dreiweghahn entfernt. An ihre Stelle kommen zwei Waschflaschen, die eine mit 20%iger, die andere mit verdünnter Silbernitratlösung zur Zurückhaltung der zu erwartenden großen Schwefelwasserstoffmengen; an diese schließt sich das schon bei der Säurespaltung beschriebene System, in welchem die Trockenapparate aus drei Chlorcalcium-U-Rohren bestehen. Vor dem Ansetzen der Absorptionsapparate wird wieder ein kohlensäurefreier Luftstrom durch das ganze System gesaugt (2—3 Std.). Nach Ansetzen der Absorptionsapparate (an Stelle des Kaliapparates werden bei diesen Versuchen auch Natronkalkröhrchen verwendet) und Plazierung des Dreiweghahnes an das Ende der Reihe wird wie früher das eine Einleitungsrohr des Säurekolbens hinabgeschoben und die Säure langsam in das Alkali hinübersaugt. Der Zersetzungskolben befindet sich dabei in kaltem Wasser. Nach Entfernung des Säurekolbens usw. wie früher wird der nunmehr saure Inhalt des Zersetzungskolbens zum Sieden erhitzt (evtl. im Wasserbade erwärmt) und nach Druckausgleich kohlensäurefreie Luft durchgesaugt. Wegen der großen schädlichen Räume wird das Austreiben der Kohlensäure über viele, 8—12 Stunden ausgedehnt.

Das zur Spaltung verwendete Alkali bestand in einigen Fällen aus kalt gesättigtem Barytwasser, hauptsächlich aber aus carbonatfreier Kalilauge. Diese wurde in folgender Weise bereitet. Ein Liter 70%ige Kalilauge (Merck pro analysi)

wurde mit dem gleichen Volumen kalt gesättigten Barytwassers gemischt und das Baryumcarbonat durch Glaswolle abfiltriert. Zum klaren Filtrat wurde noch so viel Wasser hinzugefügt, daß schließlich eine Lauge von ca. 28% resultierte. Sie war mit Baryt gesättigt und setzte beim Stehen Krystalle von Baryumhydroxyd ab.

Durch Marken am Zersetzungskolben wurden für jeden Versuch immer die gleichen Mengen Alkali entnommen, von Barytwasser 500 ccm, von der Kalilauge 300 ccm; die zur Übersättigung verwendeten Säuremengen betragen im ersten Fall 150 ccm, im zweiten Fall 350 ccm 33%ige Schwefelsäure.

Vor Anstellung der eigentlichen Versuche wurde zunächst wieder ein Blindversuch und zwar mit Kalilauge durchgeführt. Die Versuchsanordnung und Durchführung war genau die beschriebene. Die in den leeren Zersetzungskolben hinübergesaugte Lauge wurde 24 Stunden gekocht; die Austreibungsdauer nach dem Ansäuern betrug 14 Stunden. Darnach zeigte der Kaliapparat eine Gewichtszunahme von 0,0026 g; die Lauge erwies sich also als wirklich kohlenstofffrei; der Fehler ist nicht höher als bei den Säurespaltungsversuchen.

Sodann wurde ein Spaltungsversuch mit Uramidosäure angestellt. Hierzu diente eine Leucinursäure, die direkt aus einem Hornschwefelsäurespaltungsgemisch in ähnlicher Weise, wie dies bei den Säurespaltungsversuchen angegeben wurde, gewonnen war. Jedoch war in diesem Falle das Spaltungsgemisch vor der Darstellung der Uramidosäure mit Phosphorwolframsäure gefällt worden. Der Stickstoffgehalt nach Dumas dieses Präparates betrug 16,39% gegen den berechneten von 16,02%.

Die Spaltung erfolgte mit Kalilauge genau in der beschriebenen Weise; die Kochdauer mit der Lauge betrug 20 Stunden; die Austreibungsdauer der Kohlensäure 8 Stunden. 1,5549 g Substanz gaben 0,3673 g Kohlensäure. Dies entspricht 23,62% der angewandten Substanz, während 25,27% hätten erhalten werden sollen. Demnach ist auch hier die Spaltung keine ganz vollständige, doch ist das Gleichgewicht weitgehend nach der Seite der Aminosäure verschoben. Der Versuch zeigt

meiner Meinung nach auch gleichzeitig, daß wenigstens aus dem Leucin durch das langdauernde Kochen mit einem großen Überschusse starker Lauge Kohlensäure in irgend erheblicher Menge nicht abgespalten wird.

Zu den Eiweißversuchen wurden dieselben Eiweißpräparate verwendet, die schon zu den Säurespaltungsversuchen gedient hatten. Die Eiweißkörper kamen lufttrocken zur Wägung. Die Versuchsanordnung entsprach der Beschreibung.

A. Versuche mit Barytwasser.

1. Parhämoglobin.

a) Die Substanz wird mit dem Barytwasser 6 Stunden im Wasserbad erhitzt; nach Entfernung des letzteren wird über freier Flamme 8 Stunden gekocht; nach dem Ansäuern wird im Wasserbade zur Austreibung der Kohlensäure 4 Stunden erhitzt. 9,2811 g Substanz gaben 0,0960 g Kohlensäure, entsprechend 1,04% der lufttrockenen oder 1,16% der wasserfreien Substanz.

b) Die Substanz wird wieder zunächst 6 Stunden im Wasserbad, dann aber 24 Stunden über freier Flamme gekocht. Das Austreiben der Kohlensäure bei Erhitzen im Wasserbad dauerte 11 Stunden. 12,9874 g Substanz gaben 0,1923 g Kohlensäure, entsprechend 1,48% der lufttrockenen oder 1,67% der wasserfreien Substanz.

2. Elastin.

Erhitzen im Wasserbad 6 Stunden; Kochen über freier Flamme 9 Stunden; Austreiben der Kohlensäure bei Erhitzen im Wasserbad 7 Stunden. 10,6050 g Substanz gaben 0,0482 g Kohlensäure entsprechend 0,45% der lufttrockenen oder 0,52% der wasserfreien Substanz.

B. Versuche mit Kalilauge.

1. Parhämoglobin.

Die Substanz wurde mit der Kalilauge sofort über freier Flamme erhitzt, ohne daß bei allmählicher Steigerung der Temperatur bis zum Sieden im Beginn des letzteren stärkeres Schäumen aufgetreten wäre. Die Kochdauer betrug 24 Stunden. Die Dauer des Austreibens der Kohlensäure wurde auf 12

Stunden ausgedehnt. 9,7492 g Substanz gaben 0,1808 g Kohlensäure, entsprechend 1,85% der lufttrockenen oder 2,09% der wasserfreien Substanz.

Schon bei den Versuchen mit Barytwasser, in noch stärkerem Maße aber bei diesen und den folgenden Versuchen zeigte die zwischen Zersetzungskolben und Dreiweghahn eingeschaltete Kalilaugewaschflasche eine mit der Kochdauer der alkalischen Lösung zunehmende Gelbfärbung. Die Lauge der Waschflasche wies einen unangenehm charakteristischen, am ehesten noch mit Aldehydharz zu vergleichenden Geruch auf. Diese Gelbfärbung war merkwürdigerweise sehr viel geringer, wenn statt Luft Wasserstoff durch die kochende alkalische Lösung geleitet wurde. Auf die Menge der abgespaltenen Kohlensäure hatte jedoch die Verwendung von Wasserstoff statt Luft keinen Einfluß. Eine oxydative Abspaltung von Kohlensäure tritt also unter diesen Verhältnissen nicht ein.

2. Eieralbumin.

In diesem und den folgenden Versuchen wurde stets wie beim Parhämoglobin direkt über freier Flamme erwärmt und nach Eintreten des Siedens 24 Stunden gekocht. Die Kochdauer nach dem Ansäuern resp. die Austreibungsdauer betrug gleichfalls hier und in den folgenden Versuchen 12 Stunden. 6,7964 g Substanz gaben 0,1682 g Kohlensäure, entsprechend 2,48% der lufttrockenen oder 2,77% der wasserfreien Substanz.

3. Serumglobulin.

9,1456 g Substanz gaben 0,1972 g Kohlensäure, entsprechend 2,16% der lufttrockenen oder 2,41% der wasserfreien Substanz.

4. Elastin.

21,8690 g Substanz gaben 0,1315 g Kohlensäure, entsprechend 0,60% der lufttrockenen oder 0,68% der wasserfreien Substanz.

5. Keratin.

a) Statt des Kaliapparates dienten zwei Natronkalkröhrchen zur Absorption der Kohlensäure. 9,9309 g Substanz gaben 0,4073 g Kohlensäure, entsprechend 4,10% der lufttrockenen oder 4,63% der wasserfreien Substanz.

b) Natronkalkröhrchen; 11,1495 g Substanz gaben 0,4934 g Kohlensäure, entsprechend 4,43% resp. 5,00%.

c) Kali-Apparat; 12,7109 g Substanz gaben 0,5874 g Kohlensäure, entsprechend 4,62% resp. 5,23%.

d) Kali-Apparat; 17,0179 g Substanz gaben 0,8486 g Kohlensäure, entsprechend 4,99% resp. 5,63%.

e) Natronkalkröhrchen; 19,7550 g Substanz gaben 0,9753 g Kohlensäure, entsprechend 4,94% resp. 5,58%.

Abgesehen von der Menge der abgespaltenen Kohlensäure, die jene der übrigen Eiweißkörper bedeutend übertrifft, fällt beim Keratin noch besonders auf, daß mit der Substanzmenge die prozentische Kohlensäuremenge ansteigt, jedoch, wie es scheint, unter sonst gleichbleibenden Umständen nur bis zu einem gewissen Grade. Es fragt sich nun, welche Substanz diese eigentümliche Erscheinung hervorzurufen vermag. Nun existiert eine Angabe von Baumann,¹⁾ nach welcher Cystin beim Kochen mit Alkalien und Barytwasser, neben Sulfid, Ammoniak, Oxalsäure und Uvitinsäure, auch Kohlensäure liefert. Darnach erschien es geboten, einen Versuch mit Cystin auszuführen, um seinen Einfluß auf die Kohlensäurezahl kennen zu lernen. Das zu diesem Versuche verwendete Cystin war aus Keratin dargestellt und zeigte einen Stickstoffgehalt von 11,41% nach Kjeldahl (0,3532 g Substanz banden 28,78 ccm n_{10} -H₂SO₄) gegen den berechneten von 11,66%. Der Versuch wurde in genau derselben Weise ausgeführt wie die Eiweißversuche, auch was die Menge der Lauge und die Kochdauer anlangt. 0,6553 g Substanz gaben 0,0098 g Kohlensäure. Die hier verwendete Menge Cystin würde etwa 10 g Keratin entsprechen; von der gefundenen Gesamtkohlensäuremenge kann also die vom Cystin gelieferte nur einen kleinen Bruchteil ausmachen. Berechnet man auf Grund der gefundenen Kohlensäurezahl und unter der Annahme, daß der Cystingehalt des Rinderhorns rund 7% beträgt, diese Bruchteile für die fünf mitgeteilten Hornspaltungsversuche und subtrahiert sie von den gefundenen Kohlensäurezahlen, so resultieren für die letzteren die Werte in Grammen 0,3981; 0,4831; 0,5756; 0,8328; 0,9570;

¹⁾ B. B., Bd. 15, S. 1731, 1882.

und in Prozenten der wasserfreien Substanz 4,53%; 4,89%; 5,12%; 5,53%; 5,47%. Es ergibt sich ferner, daß das Cystin, wenngleich bei der komplizierten Spaltung desselben ein Ansteigen der abgespaltenen Kohlensäure mit der Konzentration wohl denkbar wäre, für die hier gefundenen Unterschiede nicht verantwortlich gemacht werden kann, denn vergleicht man z. B. den ersten und fünften der mitgeteilten Keratinversuche und verdoppelt, da sich die Keratinmengen fast genau wie 1:2 verhalten, den im ersten Falle gefundenen Kohlensäurewert, so ergibt sich gegen den gefundenen Wert des zweiten Falles eine Differenz von 0,1607 g; man müßte also sehr unwahrscheinlicherweise bei einer Steigerung der Cystinkonzentration auf das Doppelte eine Steigerung der Kohlensäureabspaltung auf etwa das 20fache annehmen.

Es müssen also wohl noch andere Quellen für die Abspaltung der Kohlensäure vorhanden sein. Nun hat vor kurzem Maillard¹⁾ angegeben, daß Aminosäuren und Kohlenhydrat in wässriger Lösung beim Erwärmen auf dem Wasserbade unter Braun- bis Schwarzfärbung und unter Abspaltung von Kohlensäure miteinander reagieren. Da nach den Mitteilungen Maillards Alanin am wirksamsten ist und da andererseits Glukosamin das einzige in tierischen Eiweißkörpern sicher nachgewiesene Kohlenhydrat ist, so schien es interessant zu versuchen, ob Alanin auch mit Glukosamin in stark alkalischer Lösung in der von Maillard angegebenen Weise reagiert. Als günstigstes Verhältnis zum Eintreten der Reaktion gibt Maillard jenes von 1 Teil Aminosäure zu 4 Teilen Kohlenhydrat an. Demnach wurde der erste Versuch so ausgeführt, daß 5 g salzsaures Glukosamin (= 4,2 g freiem Kohlenhydrat) mit 1 g Alanin zusammen in den Zersetzungskolben gebracht wurden. Die Versuchsanordnung und Durchführung war genau die gleiche wie bei den Eiweißversuchen. Zur Absorption der Kohlensäure dienten Natronkalkröhrchen. Es wurden nach 24stündigem Kochen 0,1059 g Kohlensäure erhalten.

Ein zweiter Versuch wurde zu dem Zwecke ausgeführt, um zu konstatieren, ob eine Vermehrung der Aminosäuremenge

¹⁾ Compt. rend., Bd. 154, S. 66, 1912.

zu einer Vermehrung der Kohlensäureabspaltung führt. Der Versuch wurde in derselben Weise ausgeführt wie der vorhergehende, jedoch kamen auf 5 g Glukosaminchlorhydrat 2 g Alanin. Erhalten wurden 0,1232 g Kohlensäure. Es war somit eine Erhöhung der Kohlensäureabspaltung eingetreten.

Um nun einigermaßen von dieser Wechselwirkung zwischen Aminosäuren und Kohlenhydrat ein Bild zu bekommen, wurden noch die beiden folgenden Versuche angestellt, bei welchen Keratinspaltungen in der bisherigen Weise, jedoch unter Zusatz von gewogenen Glukosaminmengen durchgeführt wurden. Das eine Mal wurden 11,4494 g Keratin mit 6,4831 g salzsaurem Glukosamin (= 5,385 g freiem Glukosamin), das zweite Mal wurden 17,7155 g Keratin mit 6,5809 salzsaurem Glukosamin (= 5,466 g freiem Glukosamin) zusammengebracht. Nach Durchführung der Spaltung resp. Kohlensäurebestimmung genau in der bisherigen Weise wurden im ersten Falle 0,9139 g Kohlensäure, im zweiten Falle 1,2959 g Kohlensäure erhalten. Berechnet man nun auf Grund der beiden Keratinversuche b) und d) die in den beiden vorliegenden Versuchen zu erwartenden, d. h. dem Keratin allein entsprechenden Kohlensäuremengen (man kann dies ohne merklichen Fehler tun, da in den korrespondierenden Versuchen die Keratingewichte nur um wenig differieren), so erhält man im ersten Falle 0,5066 g, im zweiten Falle 0,8834 g. Durch Subtraktion von den gefundenen Werten ergibt sich dann die dem Glukosamin entsprechende Menge zu 0,4073, resp. zu 0,4125 g Kohlensäure. Gegen die beiden ersten Glukosaminversuche zeigt sich also eine bedeutende Steigerung der Kohlensäureentwicklung, gleichzeitig ist auch das Erreichen eines Grenzwertes für die gewählten Versuchsbedingungen bemerkbar. Es liegt also hier eine Reaktion vor, bei welcher offenbar die Kohlensäureentwicklung, immer vom Standpunkte der Gleichgewichtsreaktion betrachtet, mit der Konzentration der Aminosäure, aber auch gleichzeitig mit jener des Kohlenhydrates steigt. Ob hier die optimale Konzentration getroffen wurde, d. h. dasjenige Verhältnis zwischen Aminosäure und Kohlenhydrat, bei welchem die maximale Kohlensäuremenge entwickelt wird, geht aus den Versuchen nicht hervor. Die Ähnlichkeit des Verlaufes dieser Re-

aktion mit den bei der Keratinspaltung beobachteten Erscheinungen ist in die Augen springend.

Bevor wir dazu übergehen, die bei der Alkalisspaltung und Säurespaltung gewonnenen Resultate miteinander zu vergleichen, seien die bei der ersteren erhaltenen Werte nochmals übersichtlich zusammengestellt. Bei 24stündiger Spaltung mit 28%iger Lauge wurden an Kohlensäure erhalten:

	Aus g Trockensubstanz	CO ₂ in g	CO ₂ in % der Trockensubstanz
Parhämoglobin . . .	8,6637	0,1808	2,09
Eieralbumin	6,0712	0,1682	2,77
Serumglobulin . . .	8,1881	0,1972 (0,1947)	2,41 (2,38)
Elastin	19,2870	0,1315	0,68
Keratin	8,7942	0,4073 (0,3981)	4,63 (4,53)

Die eingeklammerten Zahlen nach Abzug der Cystinkohlensäure.

Die Spaltungen mit Barytwasser wurden nicht weiter berücksichtigt. Sie zeigen, wie dies auch schon aus den Untersuchungen von Habermann und Ehrenfeld hervorgeht, daß die Spaltung von Kohlensäure bei ihnen nicht so vollständig ist wie bei der Alkalisspaltung. Es ist dies insofern im Sinne der hier gemachten Annahmen, als Uramidosäure gegen Barytwasser relativ resistent ist, wie schon der Umstand beweist, daß die Anhydride beim Kochen mit Barytwasser in die entsprechenden Uramidosäuren zurückverwandelt werden, ohne daß die betreffende Säure sofort weiter zerfällt.

Vom Keratin wurden nur die Werte des Versuches a) in der Tabelle wiedergegeben, nicht etwa weil sie als die sichersten angesehen werden, sondern weil die späteren Berechnungen sich darauf beziehen.

Daß die bei der Alkalisspaltung erhaltenen Kohlensäurewerte sehr viel höher sind als die bei der Säurespaltung gefundenen, entspricht durchaus den Erwartungen. Sie müssen sich ja aus einer Reihe von Summanden zusammensetzen, von denen einer bereits in der geringen, vom Cystin herrührenden Kohlensäuremenge abgetrennt wurde. Er kommt einigermaßen merklich nur beim Keratin in Frage, für welches die betreffen-

den Zahlen bereits gegeben wurden, und höchstens noch beim Serumglobulin, dessen Cystingehalt mit 1,51% angegeben ist. Selbst wenn man denselben auf 2% nach oben hin abrundet, so erhält man statt der in der Tabelle wiedergegebenen Werte für die Kohlensäure in Grammen 0,1947, für die Procente der Trockensubstanz 2,38. Wird also schon hier der Kohlensäurewert sehr wenig beeinflusst, so kann dieser Einfluß ganz vernachlässigt werden beim Hämoglobin mit 0,3%, beim Eieralbumin mit 0,29% Cystin.

Einen wesentlichen Teil der gefundenen Kohlensäure muß dagegen das Arginin liefern. Das Hämoglobin enthält hiervon 5,2%, das Eieralbumin 2,39%, das Keratin 2,25%. Für das Serumglobulin wurde der Arginingehalt von Lampel und Skraup¹⁾ bestimmt zu 3,7%. Für das Elastin muß die eigentlich für die alkoholfällbaren Elastinalbumosen angegebene Zahl von 1,86% angenommen werden.

Aus diesen Argininwerten berechnen sich, bezogen auf die bei 100° getrocknete Substanz, die folgenden Kohlensäurewerte:

Parhämoglobin 8,6637 g enthalten 0,4505 g Arginin, dies entspricht Kohlensäure 0,1138 g oder 1,31% der Trockensubstanz.

Eieralbumin 6,0712 g enthalten 0,1451 g Arginin; entsprechend 0,0367 g oder 0,60% Kohlensäure.

Serumglobulin 8,1881 g enthalten 0,3029 g Arginin; entsprechend 0,0765 g oder 0,94% Kohlensäure.

Elastin 19,2870 g enthalten 0,3587 g Arginin, entsprechend 0,0906 g oder 0,47% Kohlensäure.

Keratin 8,7942 g enthalten 0,1979 g Arginin; entsprechend 0,0500 g oder 0,57%.

Nach den bei der Säurespaltung gemachten Erfahrungen wurde für jeden der hier untersuchten Eiweißkörper ein bestimmter Gehalt an Uramidosäure in Form der Leucinursäure berechnet. Ist die Annahme solcher Uramidosäuren im Eiweißmolekül berechtigt, dann muß ein Teil der bei der Alkalisplaltung auftretenden Kohlensäure von diesen herkommen. Dieser Teil

¹⁾ loco cit.

läßt sich nun auf Grund der berechneten Prozentzahlen bestimmen unter der Voraussetzung, daß die Uramidosäure bei der Alkalisplaltung völlig zersetzt wird, was ja dem mitgeteilten Versuche nach nahezu der Fall ist. Es ergeben die auf dieser Grundlage ausgeführten Berechnungen die folgenden Werte:

Parhämoglobin berechnet 2,8% Uramidosäure als Leucinursäure; 8,6637 g enthalten 0,2426 g Uramidosäure; entsprechend 0,0613 g oder 0,71% Kohlensäure.

Eieralbumin berechnet 2,7% Uramidosäure; 6,0712 g enthalten 0,1639 g Uramidosäure; entsprechend 0,0414 g oder 0,68% Kohlensäure.

Serumglobulin berechnet 2,9% Uramidosäure; 8,1881 g enthalten 0,2374 g Uramidosäure; entsprechend 0,0600 g oder 0,73% Kohlensäure.

Elastin berechnet 1% Uramidosäure; 19,2870 g enthalten 0,1929 g Uramidosäure, entsprechend 0,0487 g oder 0,25% Kohlensäure.

Keratin berechnet 3% Uramidosäure; 8,7942 g enthalten 0,2638 g Uramidosäure, entsprechend 0,0667 g oder 0,76% Kohlensäure.

Es handelt sich nun darum, ob für die Kohlensäureabspaltung noch andere Substanzen in Betracht kommen als die bis jetzt herangezogenen. Ist dies nicht der Fall und entspricht den Berechnungen eine tatsächliche Grundlage, dann müssen die Summen der errechneten Kohlensäurewerte den gefundenen Kohlensäurewerten bei der Alkalisplaltung gleich sein. Dies trifft nun in der Tat für das Parhämoglobin und für das Elastin in befriedigender Weise zu:

	g	% der Trockensubstanz	
Parhämoglobin:	Arginin-CO ₂ . . .	0,1138	1,31
	Uramido-CO ₂ . . .	0,0613	0,71
	Summe . . .	0,1751	2,02
	Gefunden . . .	0,1808	2,09
Elastin:	Arginin-CO ₂ . . .	0,0906	0,47
	Uramido-CO ₂ . . .	0,0487	0,25
	Summe . . .	0,1393	0,72
	Gefunden . . .	0,1315	0,68

oder aber, wenn man die Argininkohlensäurewerte von den gefundenen abzieht, so muß der Rest dem Uramidokohlensäurewert entsprechen:

	g	% der Trockensubstanz
Parhämoglobin: Gefunden CO ₂ . .	0,1808	2,09
Arginin-CO ₂ . .	0,1138	1,31
Differenz . .	0,0670	0,78
Berechnet . .	0,0613	0,71
Elastin: Gefunden CO ₂ . .	0,1315	0,68
Arginin-CO ₂ . .	0,0906	0,47
Differenz . .	0,0409	0,21
Berechnet . .	0,0487	0,25

Die Übereinstimmung muß auch besonders aus dem Grunde eine gute genannt werden, weil die Zahlen, wie es in der Tat auch wohl der Wirklichkeit entspricht, deutlich erkennen lassen, daß der Argininwert für das Parhämoglobin etwas zu klein, für das Elastin zu groß erscheint. Für diese beiden Eiweißkörper existieren also augenscheinlich nur zwei Kategorien kohlenensäureabspaltender Substanzen.

Anders hingegen bei den drei anderen Eiweißkörpern, dem Eieralbumin, dem Serumglobulin und dem Keratin. Summiert man hier den Arginin- und den Uramidosäurewert, so ergibt sich gegen die gefundenen Werte eine erhebliche Differenz, die insbesondere beim Keratin sehr bedeutend ist. In diesen drei Fällen müssen also noch andere kohlenensäureabspaltende Substanzen vorhanden sein. Unter den bekannten Eiweißspaltungsprodukten, d. h. den Aminosäuren, sind dieselben wohl nicht zu suchen, denn sonst hätten auch beim Hämoglobin und Elastin erheblichere Differenzen auftreten müssen. Nun geben uns aber die Glukosaminversuche, besonders in ihrer Beziehung zur Kohlensäureabspaltung beim Keratin, einen Fingerzeig. Für das Eieralbumin ist ja wohl bewiesen, daß es eine erhebliche Menge Glukosamin enthält. Nun wurde bei den Keratin-Glukosaminversuchen gefunden, daß 5,466 g Glukosamin 0,4125 g Kohlensäure liefern; mit Hilfe dieser Zahl und unter der Annahme, daß der nach Abzug der Arginin-+Uramidokohlensäure verbleibende Rest nur vom Glukosamin

herstammt, kann die Menge des letzteren im Eieralbumin berechnet werden.

	g	% der Trockensubstanz
Eieralbumin: Arginin-CO ₂ . .	0,0367	0,60
Uramido-CO ₂ . .	0,0414	0,68
Summe . . .	0,0781	1,28
Gefunden . .	0,1682	2,77
Differenz . .	0,0901	1,49

Diesen 0,0901 g Kohlensäure entsprechen nun nach der angedeuteten Berechnung bestimmt 1,19 g oder 19,6 % Glukosamin. Die gefundene Zahl liegt durchaus im Bereich der Möglichkeit. Von Langstein wird der Gehalt des Eieralbumins an Glukosamin mit 10—11 % angegeben; Hofmeister schätzt ihn jedoch auf 15 %. Die zur Berechnung dienende Kohlensäurezahl des Glukosamins wurde als Maximalkohlensäurewert angenommen; es ist dies jedoch wahrscheinlich nicht der Fall und unter Versuchsbedingungen, die den natürlichen noch näher stehen als die gewählten, dürfte ein wenn auch nicht allzuviel höherer Kohlensäurewert erhalten werden; dementsprechend würde sich dann der Glukosaminwert verringern. Noch wahrscheinlicher wird der Wert, wenn man für den Argininwert die von Skraup und Hummelberger¹⁾ bestimmte Zahl von 2,9 % in Rechnung setzt. Der Kohlensäurerest des Eieralbumins beträgt dann 0,0823 g und der Glukosamingehalt 17,9 %.

Verfährt man in gleicher Weise beim Serumglobulin, so bekommt man die folgenden Zahlen:

	g	% der Trockensubstanz
Serumglobulin: Arginin-CO ₂ . .	0,0765	0,94
Uramido-CO ₂ . .	0,0600	0,73
Summe . . .	0,1365	1,67
Gefunden . .	0,1947	2,38
Differenz . .	0,0582	0,71

Die Berechnung des Kohlensäurerestes als Glukosamin ergibt 0,77 oder 9,4 %. Nun wird zwar noch vielfach bestritten, daß das Serumglobulin Kohlenhydrate enthält, doch scheint die vorliegende Literatur eher das Gegenteil zu beweisen. Die hier

¹⁾ loco cit.

gefundene Zahl erscheint durchaus nicht unwahrscheinlich, umsoweniger als die Kohlensäurebestimmung über die Art des vorhandenen Kohlenhydrats oder der kohlenhydratartigen Substanz nichts aussagt und mit der Berechnung als Glukosamin nicht die Behauptung aufgestellt ist, daß dieses Kohlenhydrat auch wirklich vorhanden sein muß. Anders natürlich beim Eialbumin, wo diese Substanz direkt nachgewiesen ist. [Lampel und Skraup¹⁾ fanden, daß bei vorsichtiger Alkalisplaltung von Serumglobulin ein Pepton erhalten wird, welches die Reaktion von Molisch in viel stärkerem Maße gibt als das Ausgangsmaterial; einen definierbaren Körper daraus zu gewinnen, gelang jedoch nicht.]

Es erübrigt nun noch, die für Eialbumin und Serumglobulin ausgeführten Berechnungen auch für Keratin durchzuführen.

	g	% der Trockensubstanz
Horn: Arginin-CO ₂ . .	0,0500	0,57
Uramido-CO ₂ . .	0,0667	0,76
Summe . . .	0,1167	1,33
Gefunden . .	0,3981	4,53
. Differenz . .	0,2814	3,20

Der Kohlensäurerest als Glukosamin berechnet gibt 3,7 g oder 42,4%. Auch diese im ersten Moment unwahrscheinlich hohe Zahl rückt durchaus in das Bereich der Möglichkeit wenn man folgendes überlegt. Zunächst sei nochmals daran erinnert, daß die Berechnung als Glukosamin keineswegs das Vorhandensein dieser Substanz postuliert. Was die Höhe des Prozentgehaltes anlangt, so ist dieselbe durchaus nicht ohne Beispiel, denn die Glukoproteide enthalten durchwegs sehr hohe Mengen saccharoider Substanz, so z. B. das Mucin der Respirationsschleimhaut nach Müller 36,9% Glukosamin. Nun wird zwar angegeben, daß aus dem Keratin keine reduzierende Substanz zu erhalten sei; doch muß die leichte Zersetzlichkeit dieser Substanzen einerseits und die anderen Eiweißkörpern gegenüber viel schwierigere Spaltbarkeit des Keratins andererseits in Betracht gezogen werden. Dabei kommt es sehr

¹⁾ loco cit.

darauf an, welche Art von saccharoider Substanz vorhanden ist: Glukuronsäureartige Verbindungen, wie sie z. B. in der Chondroitinschwefelsäure vermutet werden, würden noch weit- aus leichter zerstört werden als das so empfindliche Glukosamin. Addiert man die Prozentzahlen der bisher bekannt gewordenen Keratinspaltungsprodukte, so ergibt sich eine Gesamtmenge von etwa 63^o/_o; diese Zahl ist der Wirklichkeit gegenüber sicher zu klein; andererseits ist aber die Zahl von 42^o/_o sicher aus schon angeführten Gründen zu hoch, so daß die fast genaue Ergänzung zu 100^o/_o, die diese beiden Zahlen geben, vielleicht doch nicht nur Zufall ist, sondern innerlich begründet.

Die Frage, ob die Kohlensäureabspaltung nicht auf bereits bekannte Körper zurückgeführt werden kann, wurde schon einmal gestreift. Hier sei noch das Folgende ergänzend hinzugefügt. Die Melaninbildung bei der Zersetzung durch Alkali scheint mit jener bei Säurespaltung nicht ohne weiteres vergleichbar zu sein. Sind Kohlenhydrate oder saccharoide Körper vorhanden, so werden diese bei der Alkalisplaltung Braun- oder Schwarzfärbung bedingen müssen. Dabei bedingt gleichzeitig, wie die Versuche zeigen, die Gegenwart von Aminosäure eine erhebliche Kohlensäureabspaltung, so daß in diesem Falle ein gewisser Zusammenhang zwischen der Intensität der Färbung und der Kohlensäureproduktion besteht. Die Körper, welche bei der Säurespaltung die oft so rasche und intensive Melaninbildung bedingen, scheinen bei der Alkalisplaltung nicht in derselben Weise zu wirken. Das Casein z. B., welches diese Substanzen in größerer Menge enthält und mit Säuren rasch eine intensive Färbung gibt, zeigt mit starker Lauge unter sonst gleichen Verhältnissen eine sehr viel weniger intensive Färbung als Eieralbumin. Nach den Bestimmungen von Habermann und Ehrenfeld¹⁾ spaltet das Casein beim 12stündigen Erhitzen mit 50^o/_oiger Kalilauge auf dem Wasserbade im Mittel 1,05^o/_o Kohlensäure ab. Aus dem Arginingehalt des Caseins berechnen sich 1,21^o/_o Kohlensäure. Für diesen Eiweißkörper scheint also nur diese Kohlensäurequelle in Betracht zu kommen. Es ist dies um so wichtiger, als man gerade die melaninbildenden

¹⁾ loco cit.

Substanzen, wozu eventuell auch das Tyrosin und Tryptophan zu rechnen sind, mit der Kohlensäureabspaltung in Beziehung bringen könnte. Auch die Glutaminsäure, die eventuell in Erwägung zu ziehen wäre, ist im Casein gerade in größerer Menge vorhanden; diese Substanzen können aber nicht in Betracht kommen. Es würde also daraus hervorgehen, daß stärkere Braunfärbung mit gleichzeitiger stärkerer Kohlensäureabspaltung bei der Alkalisplaltung direkt auf eine kohlenhydratartige Substanz hinweist. Beide Umstände treffen nun bei dem Eieralbumin, für welches dieser Zusammenhang wohl nicht bestritten werden kann, zusammen, zeigen sich beim Serumglobulin und in besonders ausgeprägtem Maße beim Keratin. Es wäre nun sehr verlockend, das gewonnene Ergebnis physiologisch sowohl als auch biologisch zu verfolgen, doch sei zunächst nur auf das eine hingewiesen, daß, wie im Pflanzen- so auch im Tierreich, bei den Stütz- und Decksstoffen Kohlenhydrate eine wichtige Rolle spielen. Können diese Argumente die Frage keineswegs völlig entscheiden, folgt so doch zum mindesten aus den hier mitgeteilten Untersuchungen, daß das Keratin in größerer Menge eine noch unbekannte, leicht in alkalischer Lösung kohlenensäureabspaltende Substanz enthält, die, da ja einer vielfach geäußerten Ansicht zufolge die Auffindung neuer Substanzen aus der Klasse der Amidosäuren kaum zu erwarten ist und solche, wie dargetan, zu einer so reichlichen Kohlensäureabspaltung kaum in Beziehung zu bringen wären, einer anderen Körperklasse, als jener der Amidosäuren angehört. Unter der, wie ich glaube, begründeten Annahme, daß dieser Körper zur Gruppe der Kohlenhydrate gehört, wie auch natürlich in den Fällen, wo die Existenz eines solchen im Molekül der betreffenden Eiweißsubstanz direkt nachgewiesen ist, kann man in der hier durchgeführten Weise den Gehalt eines Eiweißkörpers an saccharoider Substanz mit einem nicht geringen Grad von Wahrscheinlichkeit, als Glukosamin berechnen.

Zum Schlusse mögen noch einige Hinweise, die sich auf den Hauptgegenstand dieser Untersuchungen beziehen, Platz finden. Der Vergleich der bei der Säuresplaltung und Alkali-

spaltung gewonnenen Ergebnisse zeigt, daß in zwei Fällen, beim Parhämoglobin und Elastin, die ersteren durch die letzteren befriedigend gestützt werden. Eine besondere Beachtung verdient auch der Umstand, daß der bei der Säurespaltung des Elastins sich ergebende geringe Gehalt an kohlenensäureabspaltender Substanz bei der Alkalisspaltung in gleicher Richtung zutage tritt. Dies ist besonders geeignet, die Annahme des Vorhandenseins einer Substanz zu stützen, die sowohl mit Säuren als auch mit Laugen Kohlensäure entwickelt, mit letzteren in höherem Maße. Aber auch die drei anderen Fälle stützen insofern die bei der Säurespaltung gezogenen Schlüsse, als sich zum Teil mit Hilfe der letzteren eine nicht unwahrscheinliche Auflösung des bei der Alkalisspaltung gefundenen Kohlensäurewertes in seine Summanden hat durchführen lassen. Zum mindesten ergeben sich aus den Alkalisspaltungsversuchen keine Gegenargumente gegen die Resultate der Säurespaltungsversuche. Kann auch das Ergebnis dieser Versuche noch nicht als endgültiger Beweis für die Existenz der Harnstoffgruppe im Eiweißmolekül neben dem Arginin angesehen werden, so ist doch durch sie eine um so bemerkenswertere Grundlage gewonnen, als alle aufgefundenen Tatsachen und Analogien zwanglos im Sinne der genannten Annahme gedeutet und kein zwingender Gegen Grund daraus abgeleitet werden konnte. Daß diese Untersuchungen nach jeder Richtung hin fortgesetzt werden, braucht wohl kaum besonderer Hervorhebung.

f