

## Mitteilungen.

222. Donald D. van Slyke:

**Nachtrag zu meiner Mitteilung<sup>1)</sup> über die Bestimmung von Aminogruppen in Aminoverbindungen und im Harn, sowie über eine Methode zur Analyse von Proteinen.**

[Aus dem Laborat. des Rockefeller Institute for Medical Research, New York.]

(Eingegangen am 17. Mai 1911.)

### I.

Meine vor einigen Monaten publizierte Abhandlung, in der ich mich mit der Reaktion zwischen natürlich vorkommenden Aminosäuren und salpetriger Säure beschäftigte, möchte ich durch die nachträgliche Angabe der folgenden Einzelheiten ergänzen. Die Umsetzung verläuft bei allen natürlich vorkommenden Aminosäuren, mit Ausnahme des Glykokolls und des Cystins, absolut quantitativ. Das Glykokoll entwickelt neben Stickstoff regelmäßig Spuren eines Gases, das von Permanganatlösung nicht absorbiert wird. Die Resultate stellen sich demgemäß gewöhnlich auf 103% des theoretisch zu erwartenden Betrages, so daß man z. B. bei der Analyse des Glykokolls 19.2% Stickstoff statt 18.69% findet. Beim Cystin entsprach das gemessene Gasvolumen sogar 107% der Theorie, d. h. statt 11.66% Stickstoff wurden 12.5% beobachtet. Diese Überschüsse waren nicht durch irgendwelche Verunreinigungen der Analysenmaterialien bedingt, denn aus verschiedenen Quellen stammende Substanzproben gaben bei sorgfältigst durchgeführten Bestimmungen stets die gleichen Resultate. Das Lysin unterscheidet sich von anderen Aminosäuren dadurch, daß die Reaktion zu ihrer Vollendung hier  $\frac{1}{2}$  Stunde erfordert, während der Zeitbedarf sonst nur 5 Min. beträgt.

Purin- und Pyrimidin-Riboside<sup>2)</sup> sind bezgl. ihrer Brauchbarkeit für diese Methode ebenfalls geprüft worden. Cytidin und Adenosin gaben genau 1 Molekül Stickstoff ab, während das Guanosin ungefähr  $1\frac{1}{4}$  Moleküle lieferte, also ein ähnlich anomales Verhalten wie das Cystin aufwies. Guanin selbst ist in schwach sauren Flüssigkeiten so schwer löslich, daß es nur sehr langsam reagiert und sogar im Verlauf von mehreren Stunden nur einen Teil

<sup>1)</sup> B. 43, 3170 [1910].

<sup>2)</sup> Levene und Jacobs, B. 43, 3150 [1910]; Levene und La Forge, B. 43, 3164 [1910].

seines Amino-Stickstoffs abspaltet<sup>1)</sup>. Beim Methylamin sind ebenso, wie beim Ammoniak und den Purinen, ungefähr 2 Stunden erforderlich, bis die Reaktion vollständig zu Ende gegangen ist. Es scheint demnach, als ob die Fähigkeit der Aminogruppe, unter den bei meiner Methode einzuhaltenden Versuchsbedingungen innerhalb der kurzen Zeit von 5 Minuten mit salpetriger Säure quantitativ zu reagieren, eine spezielle Eigentümlichkeit solcher Aminogruppen darstellt, die in  $\alpha$ -Stellung zu einem Carboxyl stehen.

Bei der Ausführung der Bestimmung ist es nicht erforderlich, die Lösung während der ganzen Dauer der Umsetzung zu schütteln. Hat man die für die Reaktion bestimmten Flüssigkeiten mit einander gemischt, so läßt man das Gemisch 5 Minuten bezw. eine je nach der Natur der zu analysierenden Verbindung entsprechend längere Zeit stehen und schüttelt dann erst nach beendeter Umsetzung durch, damit auch die in der Flüssigkeit noch gelösten Gase entweichen.

Da die Reagenzien oft Verunreinigungen enthalten, die ihrerseits 0.2–0.4 ccm von Permanganatlösung nicht absorbierter Gase entwickeln, so ist es notwendig, zur Kontrolle auch einige blinde Versuche anzustellen und dann entsprechende Korrekturen in den Analysenergebnissen anzubringen.

## II.

In der vorausgegangenen Mitteilung war u. a. ein Verfahren beschrieben, mit dessen Hilfe es möglich ist, den gesamten Aminosäuren-Stickstoff im Harn zu ermitteln. Die Methode umfaßte die Hydrolyse der Proteine und Peptide, sowie der Hippursäure und anderer, von den Aminosäuren sich ableitender gepaarter Verbindungen, so daß alle diese Stoffe bestimmt werden konnten. Da der Harnstoff jedoch ganz besonders langsam reagiert, so mußte, worauf mich Hr. Dr. Levene aufmerksam machte, hiermit die Möglichkeit gegeben sein, die gleichzeitig mit Harnstoff vorhandenen freien Aminosäuren zu bestimmen und so eine voraufgehende Hydrolyse zu vermeiden. Der Harnstoff erfordert unter den gewöhnlichen Bedingungen für die vollständige Umsetzung mit der salpetrigen Säure eine Zeit von 8 Stunden; in den ersten 5 Minuten gibt er nur ungefähr 3% seines gesamten Stickstoff-Gehaltes ab, und die Reaktion geht dann ohne merkliche Änderungen in ihrer Geschwindigkeit eine Zeitlang weiter, ohne daß ihr Tempo durch die Gegenwart leichter reagierender Aminosäuren beeinflußt wird.

<sup>1)</sup> In der 1. Mitteilung ist auf S. 3173, 144 mm v. o. »Guanosin« statt »Guanin« zu lesen.

Hieraus ergibt sich folgende Arbeitsweise: Der Harn wird mit Natronlauge bis zu einem Gehalt von 4 % NaOH versetzt und das hierdurch in Freiheit gesetzte Ammoniak bei Zimmertemperatur durch einen Luftstrom ausgetrieben. Hiernach säuert man mit Essigsäure an und dampft die Flüssigkeit bis auf die Hälfte ihres Volumens ein. Da man in der Regel von 100 ccm Harn ausgeht, hat man hiernach noch 50 ccm Flüssigkeit zur Verfügung. Mit zweimal je 40 ccm der letzteren führt man nunmehr zwei Aminostickstoff-Bestimmungen aus. Die eine von diesen läßt man — von dem Zeitpunkt des Vermischens mit den Reagenzien ab gerechnet — genau 6 Minuten gehen, während man die andere 12 Minuten im Gang erhält, und zwar läßt man die Gemische hierbei 5 bzw. 11 Minuten ruhig stehen und schüttelt dann noch 1 Minute. Die Differenz zwischen den beiden so erhaltenen Resultaten stellt diejenige Menge Stickstoff dar, die aus dem Harnstoff innerhalb 6 Minuten entwickelt wird, und muß von dem Resultat des 6 Minuten im Gang erhaltenen Versuchs abgezogen werden. Die gefundene Differenz ist dann gleich derjenigen Menge Stickstoff, welche die Aminosäuren während jener 6 Minuten entwickelt haben. Wichtig hinsichtlich der bei diesem Verfahren zu erzielenden Genauigkeit ist es, immer ganz die gleichen Volumina sämtlicher Lösungen zu benutzen und die beiden Bestimmungen bei derselben Temperatur vorzunehmen. Ganz besonders muß aber darauf geachtet werden, daß bei jeder Bestimmung genau die gleiche Menge der Salpetrigsäure-Lösung in der Flasche zurückbleibt. Arbeitet man bei einer unterhalb 19° liegenden Temperatur, so muß man die Reaktionsdauer auf 7 bzw. 14 Minuten verlängern und, falls die Zimmertemperatur unterhalb 15° liegen sollte, den Versuch sogar 8 bzw. 16 Minuten im Gang erhalten. Das Verfahren ist selbstverständlich nicht so genau, wie die Methode, bei welcher man den Harnstoff zuvor vollständig entfernt; sie genügt aber durchaus, wenn es sich nur darum handelt, eine erheblichere Vergrößerung im Gehalt eines Harns an Aminosäuren festzustellen. Der normale Harn des Menschen enthält gewöhnlich weniger als 1% seines Stickstoffs in Form von freien Aminosäuren.

### III.

In meiner vorjährigen Mitteilung habe ich ein Schema für die Analyse von Proteinen auseinandergesetzt, das von der bekannten Fällung der Basen mit Phosphorwolframsäure ausging, an welche sich dann als Ergänzung spezielle Methoden zur Bestimmung der einzelnen »Basen«: Arginin, Lysin, Histidin und Cystin, sowie zur Trennung der Monoaminosäuren in drei Fraktionen: 1. die Monoamino-monocarbonsäuren, 2. die Monoamino-dicarbonsäuren und 3. die Nicht-

aminostickstoff enthaltende Säuren, anschlossen. Im laufenden Arbeitsjahr ist diese Methode nunmehr in ihren Einzelheiten einer gründlichen Revision unterzogen und auf eine ganze Anzahl von Proteinen übertragen worden. Das Verfahren stellt sich jetzt im Vergleich zu dem ursprünglichen in einer weit handlicheren Form dar und ist auch genauer geworden als das frühere. Auf die Titration der Dicarbonsäuren wurde verzichtet. Wenn sie auch gewöhnlich zu guten Resultaten führt, so schlugen doch, selbst bei Anwendung äußerster Sorgfalt und Benutzung reiner Reagenzien, so viele Bestimmungen fehl, daß es nicht mehr angängig erscheint, die Titration als allgemeine Methode im Zusammenhang mit dem in Rede stehenden Schema für die Analyse zu empfehlen. Wir haben ferner gefunden, daß Cystin beim Kochen mit 20-prozentiger Salzsäure langsam in ein Produkt bzw. in Produkte verwandelt wird, die sich mittels Phosphorwolframsäure nicht ausfällen lassen<sup>1)</sup>. Diese Veränderung tritt allerdings nur so allmählich ein, daß innerhalb 24 Stunden nur ungefähr 50% in dieser Weise umgewandelt werden; sie ist aber andererseits genügend groß, um den für das Cystin erhaltenen Zahlen nur noch die Bedeutung von Minimalwerten zu lassen. Die hohen Ziffern, zu denen ich anfangs beim Casein kam, habe ich bei Benutzung der genaueren Arbeitsweise nicht mehr wiedererhalten können.

Die im Folgenden beschriebene Hydrolyse des Fibrins veranschaulicht das Verfahren, nach welchem die Analyse jetzt durchgeführt wird:

10 g Fibrin — für eine Bestimmung sind nur 3 g erforderlich, die Anwendung 10 g ist von jedoch wegen der Möglichkeit, Doppelbestimmungen vorzunehmen, empfehlenswerter — wurden mit 100 ccm 20-prozentiger Salzsäure hydrolysiert. In Zwischenräumen von einigen Stunden entnimmt man Proben von je 1 ccm, verdünnt sie auf je 10 ccm und verwendet sie zur Ermittlung des Amino-Stickstoffs. Nach Verlauf von 26 Stunden war hierbei in den für den Amino-Stickstoff gefundenen Werten keine weitere Zunahme mehr festzustellen und die Hydrolyse demnach als beendet anzusehen. Die Fortführung der Hydrolyse, bis dieser Punkt erreicht wird, ist äußerst wichtig. Die Reaktion soll bei jeder Aminostickstoff-Bestimmung genaue 5 Minuten dauern. In dieser Zeit werden von dem vorhandenen Ammoniak bei 20° etwa 15%, bei 30° 30% zersetzt. Daher müssen vergleichende Bestimmungen bei annähernd derselben Temperatur ausgeführt werden (vergl. B. 43, 3181 [1910]).

Nunmehr wurde die Salzsäure so vollständig wie möglich durch Einengen im Vakuum entfernt und die Lösung auf 250 ccm verdünnt. In 10 ccm dieser Flüssigkeit wurde dann der Gesamtstickstoff-Gehalt ermittelt, und zwar als Kontrolle für die sich hieran anschließenden Bestimmungen. Diese wurden

<sup>1)</sup> Mörner (H. 34, 207) hat bemerkt, daß die Drehung von Cystin abnimmt, wenn letzteres in Chlorwasserstofflösung gekocht wird.

als Doppelanalysen durchgeführt, von welchen jede einzelne 75 ccm der Lösung (mit 0.4415 g N) erforderte.

**Amid-Stickstoff.** — Die Lösungen wurden jede auf 150 ccm verdünnt, dann mit einem kleinen Überschuß an Kalkmilch behandelt und mit 50—100 ccm Alkohol vermischt, der das Schäumen verhindern sollte. Das entstandene Ammoniak wurde durch  $\frac{1}{2}$ -stündiges Abdestillieren unter 20 mm Druck übergetrieben. Bei der Doppelanalyse waren zum Neutralisieren des Destillats 26.0 bzw. 26.4 ccm  $\frac{1}{10}$ -Schwefelsäure erforderlich.

**Melanin.** — Der Kalk wurde auf einem Faltenfilter abfiltriert; der Niederschlag, der die sämtlichen schwarz färbenden Produkte zurückhielt, die ursprünglich in der Flüssigkeit vorhanden gewesen waren, wurde ausgewaschen, bis er sich chlorfrei erwies, und dann der Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl unterworfen. Für die Neutralisation des Destillats waren bei der Doppelanalyse 10.8 resp. 9.08 ccm  $\frac{1}{10}$ -Säure erforderlich.

**Fällen und Wiederauflösen der Basen.** — Das Filtrat vom Kalkniederschlag wurde mit Salzsäure neutralisiert und dann konzentriert. Das Ausfällen der Hexonbasen wurde genau so, wie in der früheren Mitteilung beschrieben, vorgenommen; die einzige Abweichung bestand nur darin, daß die Fällung in Gegenwart von 3.5-proz. Salzsäure, statt 5-proz. Schwefelsäure, vor sich ging. Das Auswaschen des Niederschlags geschah im wesentlichen auch jetzt so wie früher, nur enthielt die 2.5-prozentige Phosphorwolframsäurelösung zum Auswaschen statt 5% Schwefelsäure ebenfalls 3.5% Salzsäure, und das Auswaschen wurde so lange fortgesetzt, bis sich die Abläufe als frei von Calcium erwiesen. Der Niederschlag wurde hiernach vom Filter abgelöst und in Wasser suspendiert. Zu der Suspension wurden einige Tropfen Phenolphthaleinlösung hinzugegeben und dann unter Rühren 50-prozentige Natronlauge eintropfen gelassen, bis sich der Niederschlag vollständig gelöst hatte. Hierzu ist nur ein Überschuß von höchstens 4 Tropfen der Lauge über die zur Neutralisation der Flüssigkeit erforderliche Menge notwendig. Die Lösung, die schwach, aber deutlich alkalisch sein soll, wird dann bis auf 800 ccm verdünnt und hiernach die Phosphorwolframsäure durch Zufügen eines kleinen Überschusses von 20-prozentiger Bariumchloridlösung ausgefällt. Der Niederschlag wird in derselben Weise, wie die ursprüngliche Hexonbasen-Fällung mit Wasser ausgewaschen, bis er chlorfrei ist. Schließlich wird das Filtrat unter vermindertem Druck bis auf ungefähr 50 ccm eingeengt, von geringen Mengen Bariumphosphorwolframat, die sich noch während des Einengens abgeschieden hatten, durch Filtrieren befreit, dann in einem kleinen doppelhalsigen Kölbchen von neuem konzentriert und auf ein Volumen von 50 ccm gebracht. Die folgenden Bestimmungen wurden dann mit aliquoten Teilen dieser Lösung bei jeder der beiden vorgenommen.

**Amino-Stickstoff der Basen.** — Für die Bestimmung, die  $\frac{1}{2}$  Stunde im Gang erhalten wurde, damit das Lysin sich vollständig umsetzen konnte, wurden 10 ccm der Lösung verwendet. Bei der Doppelanalyse wurden so 24.1 und 25.0 ccm N (21°, 772 mm) erhalten, entspr. 0.0693 und 0.0719 g Amino-Stickstoff in der gesamten, in der Lösung vorhandenen Basenmenge.

**Arginin.** — Je 25 ccm Lösung wurden mit 12.5 g reinem KOH versetzt und 6 Stunden in der in der früheren Mitteilung beschriebenen Weise gekocht.

Hiernach waren zur Neutralisation erforderlich 10.72 bzw. 9.83 ccm  $\frac{1}{10}$ -Säure, denen 0.060 bzw. 0.0551 g Arginin-Stickstoff in der gesamten Lösung entsprechen.

**Gesamtstickstoff der Basen.** — Jede der Lösungen, die für die Arginin-Bestimmung benutzt worden waren, wurde mit 35 ccm konzentrierter Schwefelsäure und  $\frac{1}{4}$  g Kupfersulfat versetzt und dann in der bei Kjeldahl-Bestimmungen üblichen Weise weiter behandelt. Das Destillat neutralisierte 34.3 bzw. 36.0 ccm  $\frac{1}{10}$ -Normalschwefelsäure. Addiert man hierzu die Anzahl von ccm Säure, die zur Neutralisation des bei der vorausgegangenen Arginin-Bestimmung entwickelten Ammoniaks erforderlich waren, so kommt man auf 45.0 und 45.8 ccm 0.1-n. Säure, die einer Gesamtmenge von 0.1261 bzw. 0.1284 g oder 28.55 bzw. 29.10 % Gesamtbasen-Stickstoff äquivalent sind.

**Cystin-Schwefel.** — Für die Bestimmung des organischen Schwefels nach der ausgezeichneten Methode von Benedict und Denis<sup>1)</sup> wurden wiederum je 10 ccm Lösung benutzt. Das gleichzeitig vorhandene Bariumchlorid brauchte vor dem Veraschen nicht entfernt zu werden. Die Ausbeute an Bariumsulfat betrug 0.0059 bzw. 0.0070 g, die 0.0018 bzw. 0.0021 g Cystin-Stickstoff entsprechen. Im Fibrin, wie auch in den meisten anderen Proteinen mit Ausnahme der Keratine ist der Gehalt an Cystin übrigens so gering, daß er die Amino-Stickstoff- und selbst die Arginin-Bestimmungen nicht in irgendwie ins Gewicht fallender Weise beeinflusst.

**Gesamtstickstoff im Filtrat von den Basen.** — Zu dem Filtrat und den Waschwässern wurde soviel 50-prozentige Natronlauge hinzugefügt, daß sich die Lösungen schwach trübten. Sie wurden dann mit Hilfe von etwas Essigsäure wieder geklärt, unter vermindertem Druck eingeeengt und auf je 150 ccm gebracht. Für die Kjeldahl-Bestimmungen dienten je 25 ccm, die mit 15 g Kaliumsulfat, 35 ccm konzentrierter Schwefelsäure und  $\frac{1}{4}$  g Kupfersulfat versetzt wurden. Für die Neutralisation der Destillate waren 31.3—31.5 bzw. 30.9—31.0 ccm  $\frac{1}{10}$ -Säure erforderlich, entspr. 0.2638 bzw. 0.2597 g oder 59.7 bzw. 58.8 % Stickstoff in dem gesamten Filtrat.

**Amino-Stickstoff im Filtrat von den Basen.** — Unter Anwendung von je 10 ccm Lösung für die Aminobestimmung wurden folgende Beträge an Stickstoff gefunden:

I. 28.2—28.1 ccm N (17°, 760 mm), entspr. 0.244 g N in der gesamten Lösung.

II. 27.7—27.9 ccm N (13°, 768 mm), entspr. 0.2452 g N in der gesamten Lösung.

Die Gesamtergebnisse der voranstehend geschilderten Analysen sind in den beiden Tabellen auf S. 1690 zusammengestellt, zu denen noch bemerkt sei, daß Histidin und Lysin in der in der vorausgegangenen Mitteilung auseinander gesetzten Weise berechnet worden sind. Die Zahlen bedeuten Prozente des gesamten Stickstoffs, der in dem zur Untersuchung verwendeten Protein in Form der einzelnen

<sup>1)</sup> Journ. of Biol. Chem. 6, 363 [1909]; 8, 401 [1910]; C. 1911, I, 348.

Aminosäuren oder Aminogruppen vorhanden ist<sup>1)</sup>. Die Korrekturen für die Löslichkeit wurden in der Weise angebracht, daß die nachstehend bezeichneten Mengen Stickstoff zu den für jede einzelne,

Tabelle I.

	I	II	Mittel
Ammoniak-Stickstoff . . . . .	8.25	8.38	8.32
Melanin- » . . . . .	3.43	2.87	3.17
Cystin- » . . . . .	0.41	0.45	0.43
Arginin- » . . . . .	13.60	12.48	13.14
Histidin- » . . . . .	3.78	4.14	3.96
Lysin- » . . . . .	10.78	12.01	11.40
Amino- » des Filtrats . . . . .	55.3	55.5	55.4
Nichtamino- » » » (Prolin, Oxy- prolin, 1/2 Tryptophan) . . . . .	4.4	3.3	3.85
Summe	99.95	99.13	99.67

Tabelle II.

	Gliadin	Edestin	Haare (Hund)	Gelatine	Fibrin	Hämo- cyanin	Hämo- globin (Rind)
Ammoniak-Stickstoff . . . . .	25.52	9.99	10.05	2.25	8.32	5.95	5.24
Melanin- » . . . . .	0.86	1.98	7.42	0.07	3.17	1.65	3.6
Cystin- » . . . . .	1.25	1.49	6.60	0.00	0.99	0.80	0.0
Arginin- » . . . . .	5.71	27.05	15.33	14.70	13.86	15.75	7.7
Histidin- » . . . . .	5.20	5.75	3.48	4.48	4.83	13.23	12.7
Lysin- » . . . . .	0.75	3.86	5.37	6.32	11.51	8.49	10.9
Amino- » des Filtrats . . . . .	51.98	47.55	47.5	56.3	54.2	51.3	57.0
Nichtamino- » » » . . . . .	8.50	1.7	3.1	14.9	2.7	3.8	2.9
Summe	99.77	99.37	98.85	99.02	99.58	100.95	(100.0)

durch Phosphorwolframsäure gefällte Aminosäure gefundenen Werten hinzugerechnet wurden; diese Zahlen sind auf den Stickstoff umgerechnet und drücken die Löslichkeit der einzelnen Basen in 200 ccm der Lösung aus, aus welcher sie gefällt wurden: Arginin 0.0032 g, Histidin 0.0038 g, Lysin 0.0005 g, Cystin 0.0026 g. Die Löslichkeit des Lysins ist in der älteren Abhandlung irrtümlicherweise zu 0.4 mg

<sup>1)</sup> Zur Umrechnung der oben gegebenen Prozente des Gesamtstickstoffes in Gramme der einzelnen Basen selbst pro 100 g Protein kann man die folgenden Durchschnittsfaktoren benutzen, welche auf einem 17-prozentigen Stickstoffgehalt der Proteine begründet sind: Arginin 0.528, Histidin 0.626, Lysin 0.883, Cystin 1.46.

(bezogen auf den Lysin-Stickstoff) angegeben worden, während die richtige Zahl 0.24 mg pro 100 ccm der Lösung lautet. Das Cystin ist in der jetzt benutzten salzsauren Flüssigkeit augenscheinlich etwas weniger löslich, als in der früher verwendeten schwefelsäurehaltigen Flüssigkeit, in welcher sich die Löslichkeit zu 1.8 mg (bezogen auf den Cystin-Stickstoff) ergeben hatte. Diejenigen Quantitäten Stickstoff, die aus dem Niederschlag herausgelöst werden, wenn man ihn in der oben beschriebenen Weise auswäscht, sind, wie Kontrollversuche zeigten, so unbedeutend, daß sie vernachlässigt werden können. Die infolge der Löslichkeit notwendig werdenden Korrekturen bedingen auch eine Veränderung der Zahlen für die Filtrate von den Basen: es wurden abgerechnet 0.0052 g für den Amino-Stickstoff und 0.0049 g für den Nichtamino-Stickstoff. Die in der Tabelle I zusammengestellten Zahlen sind direkt aus den analytischen Daten berechnet, ohne daß Korrekturen für die Löslichkeit angebracht wurden. Die korrigierten Werte finden sich in der Tabelle II, die auch die umgerechneten Werte aus den Analysen einer Reihe von anderen Proteinen bringt. Das Hämocyanin ist das im Blute des Limulus (Riesen-Molukkenkrebs) enthaltene Protein, das dem Hämoglobin der Säugtiere entspricht; es wurde mir in liebenswürdiger Weise von Hrn. Dr. C. L. Alsberg (Washington) zur Verfügung gestellt. Das krystallisierte Hämoglobin ist von Hrn. Dr. Butterfield im hiesigen Institut aus Rinderblut dargestellt worden.

Die bei der Gelatine und dem Hämoglobin hinsichtlich des Cystins negativ ausgefallenen Resultate bedeuten, daß in den betr. Basenniederschlägen kein Cystin nachgewiesen werden konnte, obwohl ungefähr 0.5 % in unveränderter Form im Filtrat vorhanden gewesen sein mögen. Die anderen Zahlen für das Cystin dürften ungefähr 50 % des Gesamtbetrages, der in den betr. Proteinen tatsächlich vorhanden gewesen war, darstellen und mit Rücksicht auf die bei den Analysen innegehaltenen Bedingungen praktisch der Gesamtmenge des vorhandenen Schwefels entsprechen. Sämtliche in den Tabellen aufgeführten Resultate sind Durchschnittswerte aus Doppelanalysen, mit Ausnahme der Zahlen für das Hämoglobin, mit welchem aus Mangel an Material nur eine Analyse durchgeführt werden konnte. Der Wert für den Gesamtstickstoff, der als Basis für die Berechnung der beim Hämoglobin angegebenen Zahlen diente, wurde durch Addieren der übrigen Zahlen erhalten und nicht durch selbständige Analysen festgestellt, so daß die (deshalb in Parenthese gesetzte) Zahl für die Summe notwendigerweise 100 % sein mußte. Die Menge des Lysins, die bei der Analyse von Weizen-Gliadin gefunden wurde, dürfte die Fehlergrenze der Methode nicht überschreiten und kann deshalb nicht

in einen Gegensatz zu den früheren negativen Zahlen anderer Autoren<sup>1)</sup> gebracht werden.

Hinsichtlich der Genauigkeit der Analysen mag hervorgehoben werden, daß die bei Doppelbestimmungen für den Ammoniak- und Cystin-Stickstoff gefundenen Zahlen unter einander im Maximum nur eine Abweichung von 0.3 bzw. 0.1% aufweisen; beim Arginin und Lysin beträgt die Differenz 1.2%, beim Melanin 0.5% und bei den übrigen Bestimmungen höchstens 1.5%. Bei den Doppelanalysen erreichte die durchschnittliche Abweichung nur ungefähr die Hälfte dieser Maximalwerte.

Vergleicht man die Resultate von Protein-Analysen nach der oben beschriebenen, sich auf die charakteristischen chemischen Gruppen der verschiedenen Aminosäuren gründenden Methode mit den Ergebnissen der bekannten Verfahren, deren Ziel die Isolierung der einzelnen Aminosäuren ist, so macht man die Beobachtung, daß bei der letzteren Art von Analysen die hauptsächlichsten Verluste auf die Fraktion der primären Monoaminosäuren (»Aminostickstoff des Filtrats«, Leucin, Alanin usw.) entfallen. Denn selbst, wenn bei solchen Analysen die Hydrolyse sehr gut gelungen ist, findet man von den erwähnten Aminosäuren doch meist nur die Hälfte derjenigen Mengen, die auf Grund des vorhandenen Amino-Stickstoffs zu erwarten wären. Andererseits ist es Tatsache, daß bei gewissen Proteinen durch die Isolierung der einzelnen Aminosäuren ein verhältnismäßig vollständiges Bild bezüglich des Ursprungs des Basen- und des Nicht-amino-Stickstoffs gewonnen worden ist<sup>2)</sup>.

<sup>1)</sup> Kossel und Kutscher, H. 31, 201; Abderhalden und Samuely, H. 44, 282; Osborne und Clapp, Amer. Journ. of Physiol. 17, 23.

<sup>2)</sup> Vergl. Anm. 1 (Gliadin); Abderhalden (Edestin), H. 37, 499; Levene und Beatty (Gelatine), H. 49, 261; Fischer und Boehner (Gelatine), H. 65, 108; Brunner (Fibrin), Dissertation, Berlin; Osborne und Guest (Casein), Journ. of Biolog. Chem. 9, 333.