

Beiträge zur Kenntnis der Eiweißkörper

von

Docent Dr. **Adolf Jolles** in Wien.

(Vorgelegt in der Sitzung am 21. März 1901.)

Die wesentlichsten Spaltungsproducte des Eiweißes, deren Isolierung bis jetzt gelungen ist, waren: Amidosäuren (Glycocoll, Leucin, Monoamidovaleriansäure, Asparaginsäure und Glutaminsäure), aromatische Körper (Tyrosin, Indol, Skatol), Kohlehydrate, ein wenig erforschter schwefelhaltiger Complex und endlich die in jüngster Zeit aufgefundenen Hexonbasen (Lysin, Arginin, Histidin), welche in jedem Molecüle mehrere Amidogruppen enthalten. Die Reagentien, unter deren Einwirkung die Spaltungen vorgenommen wurden, waren im wesentlichen Säuren, Basen, Zinnchlorür und Salzsäure und Permanganat in alkalischer Lösung. Nach den Erfahrungen, die ich bei den Purinkörpern¹ gemacht habe, glaubte ich im Permanganat in schwefelsaurer Lösung ein Reagens zu haben, welches auch hier die Aussicht auf eine leicht zu verfolgende und glatte Spaltung bietet, und hiedurch wurde ich veranlasst, die verschiedenen Eiweißkörper analog zu behandeln. Der Vortheil dieser Methode besteht darin, dass gewisse Körper, wie Harnstoff, Mono- und Diamidosäuren unter den angegebenen Bedingungen nicht weiter verändert werden, was gegenüber den alkalischen Spaltungen, bei denen der Harnstoff zu Ammoniak zerfällt und auch Diamidosäuren nicht unangegriffen bleiben, ein wesentlicher Vortheil ist. Außerdem ermöglicht das Verschwinden der Permanganatlösung bei der Oxydation eine

¹ Über eine quantitative Reaction bei den Ureiden und Purinderivaten, von Adolf Jolles. Ber. der deutsch. chem. Ges., Bd. XXXIII, S. 1246 und 2120.

Fixierung des Endpunktes, wodurch die gleichmäßige Spaltung gesichert ist, sofern man sich an gleichbleibende Concentration und Temperatur hält.

Verfahren.

Nach erfolgter Oxydation wird alkalisch gemacht und folgendermaßen verfahren:

I. Der Stickstoff wird durch Bromlauge frei gemacht und gemessen.

II. Der Harnstoff wird als oxalsaurer Harnstoff bestimmt.

III. Der Rückstand der volumetrischen Stickstoffbestimmung (I) wird mit Phosphorwolframsäure gefällt und im Niederschlag der Stickstoff bestimmt.

IV. Im Filtrate von III wird der Stickstoff bestimmt.

Eintheilung der Spaltungsproducte des Eiweißes mit Bezug auf das angewendete Verfahren.

I. Die volumetrische Bestimmung ergibt nur den Stickstoff aus Ammoniak und Harnstoff.

II. Nachdem hier nur der Harnstoff bestimmt wird, so lässt sich aus der Differenz von I und II das bei der Differenz eventuell auftretende Ammoniak bestimmen.

III. In der Phosphorwolframsäurelösung können bei dem angegebenen Verfahren, wie ich mich durch einschlägige Versuche überzeugt habe, auftreten: Methylamin, Diamidosäuren und Glycocoll.¹

IV. Im Filtrate des Phosphorwolframsäure-Niederschlages findet sich bei einzelnen Eiweißkörpern ebenfalls ein Stickstoffgehalt. Welchen Verbindungen dieser Stickstoffgehalt zuzuschreiben ist, ist derzeit noch unentschieden. Man könnte hier beispielsweise an unvollständig ausgefällte Monoamidosäuren denken. Den Stickstoff dieser Verbindungen werde ich kurzweg Filtratstickstoff nennen.

An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass der auftretende Harnstoff nicht als Spaltungsproduct der Hexonbasen

¹ Notiz über Glycocoll, von Adolf Jolles. Zeitschrift für physiol. Chemie, Bd. XXXI, S. 389.

(Arginin, Histidin, Lysin etc.) aufzufassen ist, nachdem dieselben beim Kochen mit Permanganat in saurer Lösung unter den von mir angegebenen Bedingungen keinen Harnstoff liefern. Wenn einzelne Forscher aus Hexanbasen, wie Arginin, Lysin und Lysin, durch Sieden mit Barytwasser Harnstoff erhalten haben und diese Erscheinung auf den Organismus derart übertragen, dass sie eine rein hydrolytische Bildung des Harnstoffes aus dem Eiweiß, also ohne Oxydation annehmen, so erscheint diese Folgerung unzulässig, weil die Hexanbasen in den Eiweißkörpern in relativ geringen Mengen vorhanden sind und der Stickstoff der Hexanbasen nur zum Theile in Harnstoff umgewandelt wird, z. B. beim Arginin im Maximum die Hälfte.

Außerdem zeigen die Eigenschaft der Harnstoffbildung durch Barytlauge nur jene Hexonbasen, welche den Harnstoff- oder Guanidinrest bereits enthalten, somit nur ein Theil der Hexanbasen.

An dieser Stelle sei erwähnt, dass die Resultate Hoffmeisters,¹ der aus Eiweißkörpern durch Oxydation mit Permanganat in ammoniakalischer Lösung Harnstoff erhalten hat, von den hier angeführten principiell verschieden sind, indem bei der Hoffmeister'schen Versuchsanordnung nicht klargelegt ist, ob der Stickstoff des Harnstoffes aus den Eiweißkörpern oder dem im Überschusse vorhandenen Ammoniak stammt.

Ich habe den Phosphorwolframsäure-Niederschlag einer qualitativen Prüfung auf die Anwesenheit von Hexonbasen unterzogen. Der Phosphorwolframsäure-Niederschlag entspricht dem Stickstoffgehalte an Arginin, Lysin und Histidin und sonstigen durch Phosphorwolframsäure fällbaren Spaltungsproducten außer Harnstoff und Ammoniak. Dies gilt nur unter dem Vorbehalte, dass die Fällung mit Phosphorwolframsäure thatsächlich quantitativ erfolgt, was nach den bisherigen Resultaten zu erwarten ist. Im gegentheiligen Falle würde noch ein Theil dieser stickstoffhaltigen Körper im Filtrate sich vorfinden.

¹ Archiv für experim. Pathologie und Pharmakologie, Bd. XXXVII, S. 426.

Experimenteller Theil.

Die Untersuchungen erstrecken sich auf krystallisiertes Eialbumin, krystallisiertes Serumalbumin, krystallisiertes Serumglobulin (aus Pferdeblut), krystallisiertes Oxyhämoglobin (Pferd), Casein, Fibrin, Antipepton, Vitellin aus Eigelb, Vitellin aus Pflanzen.

Krystallisiertes Eialbumin.

Die Darstellung des krystallisierten Eialbumins geschah nach Hofmeister.¹

0·3642 g Substanz lieferten nach Kjeldahl 0·05455 g Stickstoff, entsprechend 14·98% Stickstoff. Zur Oxydation verwendete Menge 0·5030 g, das Oxydationsproduct wurde auf 500 cm^3 aufgefüllt.

1. Volumetrische Bestimmung.

100 cm^3 der Lösung = 0·1006 g der Substanz lieferten 10·7 cm^3 Stickstoff bei 24° und 748 mm B = 11·7807 mg Stickstoff = 11·71% Stickstoff.

2. Stickstoffbestimmung im oxalsauren Harnstoff nach Kjeldahl.

200 cm^3 der Lösung = 0·2012 g Substanz lieferten 0·0875 g oxalsauren Harnstoff. Die Stickstoffbestimmung ergab 0·0237 g Stickstoff, entsprechend 11·8% Stickstoff.

3. Stickstoffbestimmung im Phosphorwolframsäure-Niederschlag.

200 cm^3 der Lösung wurden nach vorschriftsmäßiger Entfernung des Harnstoffes durch Bromlauge und Austreibung des überschüssigen Broms durch Kochen mit Salzsäure mit Phosphorwolframsäure-Lösung gefällt. Der Niederschlag aus 200 cm^3 der Lösung = 0·2012 g Substanz gab 0·0068 g Stickstoff, entsprechend 3·12% Stickstoff.

¹ Fr. Hofmeister, Zeitschrift für phys. Chemie, Bd. XIV und XVI.

4. Zur genauen Identifizierung des durch Oxydation aus dem Eieralbumin gewonnenen Harnstoffes wurden wiederholt geringe Mengen des reinen Präparates nach obigem Verfahren oxydiert, die Niederschläge von oxalsaurem Harnstoff gesammelt und bis zum constanten Gewichte getrocknet.

Die Analyse des Oxalates ergab folgende Werte:

- a) 0·2184 g Substanz lieferten 0·1852 g CO₂ und 0·0964 g H₂O (CON₂H₄)₂ C₂O₄H₂.

In 100 Theilen:

	Berechnet für (CON ₂ H ₄) ₂ ·C ₂ O ₄ H ₂	Gefunden
C	22·86	23·12
H.....	4·76	4·90

- b) Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl: 0·0875 g Substanz gaben 0·0237 g Stickstoff.

Berechnet Stickstoff 26·66%, gefunden Stickstoff 27·08%.

- c) In 0·1501 g Substanz wurde die Oxalsäure mit Permanganatlösung titriert (1 cm³ KMnO₄ = 0·002257 g C₂H₂O₄). Verbraucht wurden 28·6 cm³ KMnO₄-Lösung = 0·0645 g C₂H₂O₄.

Berechnet C₂H₄O₂ 42·86%, gefunden 42·97%.

Es wurden in allen Fällen geringe Mengen der in Untersuchung gezogenen Substanzen oxydiert, der Harnstoff durch Schütteln mit Bromlauge vollkommen entfernt, das überschüssige Brom durch Kochen mit Salzsäure ausgetrieben, die durch Phosphorwolframsäure hervorgerufenen Niederschläge gesammelt, ausgewaschen und getrocknet.

Der auf diese Weise gewonnene Phosphorwolframsäure-Niederschlag des Eieralbumins wurde mit Ätzbaryt gekocht, Kohlensäure eingeleitet, heiß filtriert und mit Quecksilberchlorid im Überschusse bis zur sauren Reaction versetzt. Es resultierte ein geringer Niederschlag. Derselbe wurde in Wasser suspendiert, Schwefelwasserstoff eingeleitet, filtriert und eingedampft. In den in geringer Menge gewonnenen Krystallen von Histidinchlorid wurde eine Chlorbestimmung ausgeführt.

0·068 g Substanz, über Schwefelsäure getrocknet, gaben 0·0471 g AgCl.

In 100 Theilen:

	Berechnet für $C_6H_9N_3O_2HCl+H_2O$	Gefunden
Cl	16·90	17·9

Die Versuche nach Kossel und Hedin, Arginin als Silberdoppelsalz zu fällen, blieben resultatlos. Es wurde daher von neuem mit Phosphorwolframsäure gefällt, gekocht, der Baryt mit Schwefelsäure abgeschieden, die jetzt freie Basenlösung stark eingeeengt und alkoholische Pikrinsäurelösung zugesetzt. Nach einigem Stehen fallen feine Krystallnadeln aus, die später derberen Charakter annehmen. Die Krystalle wurden nach mehreren Tagen mit heißem Wasser umkrystallisiert. Hierauf wurden die Krystalle mit verdünnter Salzsäure und Äther geschüttelt; es bildet sich das Chlorhydrat der Basen, Pikrinsäure größtentheils in dem Äther. Die wässrige Lösung wurde abgedampft, mit Methylalkohol aufgenommen, filtriert, wieder aufgenommen, stark eingeeengt und mit concentrirter Platinchloridlösung und Alkohol versetzt. Nur Lysin fällt als Platinat. Es resultierten rothgelbe Prismen, welche mit einem als Vergleichsobject benützten Lysinplatinchloridpräparate nahezu gleichen Schmelzpunkt zeigten. Die Krystalle wurden bei circa 120° getrocknet und der Platingehalt bestimmt.

0·0644 g Substanz ergaben 0·0227 g Pt.

In 100 Theilen:

	Berechnet für $C_6H_{14}N_2O_2 \cdot 2HCl \cdot PtCl_4$	Gefunden
Pt.	35·05	35·25

Die Prüfung des Phosphorwolframsäure-Niederschlages mit Millon'schem Reagens ergibt ein negatives Resultat, was für die Abwesenheit der tyrosinbildenden Gruppe spricht.

Krystallisiertes Serumglobulin (aus Pferdeblut).

0·2648 g Substanz lieferten nach Kjeldahl 0·0422 g Stickstoff, entsprechend 15·94%. Zur Oxydation verwendete Menge 0·5028 g, das Oxydationsproduct wurde auf 500 cm^3 aufgefüllt.

1. Volumetrische Stickstoffbestimmung.

50 cm^3 der Lösung = 0.05028 g Substanz lieferten 5.40 cm^3 Stickstoff bei 20° C. und 748 mm B = 6.0637 mg Stickstoff = 12.06% Stickstoff.

2. Stickstoffbestimmung im oxalsauren Harnstoff nach Kjeldahl.

200 cm^3 der Lösung = 0.20112 g Substanz lieferten 0.0899 g oxalsauren Harnstoff. Die Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl ergab 0.02413 g Stickstoff, entsprechend 12.00% Stickstoff.

3. Stickstoffbestimmung im Phosphorwolframsäure-Niederschlage.

Der Niederschlag aus 200 cm^3 der Lösung = 0.20112 g Substanz lieferte 0.00790 g Stickstoff, entsprechend 3.93% Stickstoff.

4. Identifizierung des durch Oxydation aus dem Serumglobulin gewonnenen Harnstoffes.

Zu diesem Zwecke wurden wiederholt Mengen von circa 0.5 g Serumglobulin oxydiert, die Niederschläge von oxalsaurem Harnstoff gesammelt und einer Analyse unterzogen.

a) 0.1982 g Substanz lieferten 0.1679 g CO₂ und 0.0877 g H₂O.

In 100 Theilen:

	Berechnet für $(CON_2H_4)_2 \cdot C_2O_4H_2$	Gefunden
C	22.86	23.10
H	4.76	4.91

b) Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl: 0.0899 g Substanz lieferten 0.02413 g Stickstoff.

Berechnet Stickstoff 16.66%, gefunden 26.84%.

Nach dem bereits beim Eieralbumin beschriebenen Verfahren konnte in dem in größeren Mengen gesammelten Phosphorwolframsäure-Niederschlage Arginin, Histidin und

Lysin qualitativ nachgewiesen werden. Bezüglich der Identifizierung des Arginins habe ich das in Form des Nitrats erhaltene Arginin, welches sich nach dem Ergebnisse der Analyse als unrein erwiesen hat, in einer zweiten Probe in das Argininkupfernitrat übergeführt. Die Krystalle schmelzen bei circa 114° ; der Schmelzpunkt eines reinen Argininkupfernitrates liegt nach Schulze bei 112 bis 113° . Die Kupferbestimmung des über Chlorcalcium getrockneten Salzes ergab folgende Zahlen:

0.0781 g Substanz ergaben 0.01071 g CuO.

In 100 Theilen:

	Berechnet für	
	$(C_6H_{14}N_4O_2)_2 \cdot Cu(NO_3)_2 + 3H_2O$	Gefunden
Cu.....	10.77	11.04

Krystallisiertes Serumalbumin.

0.2546 g Substanz lieferten nach Kjeldahl 0.04084 g Stickstoff, entsprechend 16.04% Stickstoff.

Zur Oxydation verwendete Menge 0.5108 g; das Oxydationsproduct wurde auf 500 cm^3 aufgefüllt.

1. Volumetrische Stickstoffbestimmung.

50 cm^3 der Lösung = 0.05108 g Substanz lieferten 5.84 cm^3 N bei 18° C. und 750 mm B = 6.645 mg N = 13.01% N.

2. Stickstoffbestimmung im oxalsauren Harnstoffe nach Kjeldahl.

200 cm^3 der Lösung = 0.20432 g Substanz lieferten 0.0556 g oxalsauren Harnstoff. Die Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl ergab 0.0265 g N, entsprechend 12.97% N.

3. Stickstoffbestimmung im Phosphorwolframsäure-Niederschlag.

Der Niederschlag aus 200 cm^3 der Lösung = 0.20432 g Substanz lieferte 0.00649 g N = 3.18% N.

4. Identificierung des durch Oxydation aus dem Serumalbumin gewonnenen Harnstoffes.

Geringe Mengen von Serumalbumin wurden wiederholt in oxalsauren Harnstoff übergeführt, die Niederschläge gesammelt, im Exsiccator bis zum constanten Gewichte getrocknet und ein aliquoter Theil der Verbrennungsanalyse unterworfen.

0·2016 g gaben 0·1716 g CO₂ und 0·0896 g H₂O.

In 100 Theilen:

	Berechnet für $(\text{CON}_2\text{H}_4)_2 \cdot \text{C}_2\text{O}_4\text{H}_2$	Gefunden
C	22·86	23·23
H	4·76	4·95

Prüfung des Phosphorwolframsäure-Niederschlag auf Hexonbasen.

Nach dem bereits beim Eialbumin ausführlich beschriebenen Verfahren konnte Histidin in Form von Histidinchloridkrystallen abgeschieden werden.

0·071 g Substanz, über Schwefelsäure getrocknet, gaben 0·0490 g AgCl.

In 100 Theilen:

	Berechnet für $\text{C}_6\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2 \cdot \text{HCl} + \text{H}_2\text{O}$	Gefunden
Cl	16·90	17·7

Arginin konnte als Silberdoppelsalz nur in vereinzelt Krystallen erhalten werden, so dass eine nähere Identificierung nicht möglich war. Lysin wurde als Platinat gefällt. Die Krystalle wurden bei circa 120° C. getrocknet und der Platingehalt bestimmt.

0·0598 g Substanz ergaben 0·0213 g Pt.

In 100 Theilen:

	Berechnet für $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2 \cdot 2\text{HCl} \cdot \text{PtCl}_4$	Gefunden
Pt	35·05	35·74

Krystallisiertes Oxyhämoglobin (vom Pferde).

0·1423 g Substanz lieferten nach Kjeldahl 0·02406 g N, entsprechend 16·91%.

Zur Oxydation verwendete Menge 0·4911 g; das Oxydationsproduct wurde auf 500 cm³ aufgefüllt.

1. Volumetrische Stickstoffbestimmung.

50 cm³ der Lösung = 0·4911 g Substanz lieferten 6·60 cm³ N bei 18° und 758 mm B = 7·582 mg N = 15·44%.

2. Stickstoffbestimmung im oxalsauren Harnstoffe nach Kjeldahl.

200 cm³ der Lösung = 0·19644 g Substanz lieferten 0·0532 g oxalsauren Harnstoff. Die Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl ergab 0·03931 g N, entsprechend 15·43% N.

3. Stickstoffbestimmung im Phosphorwolframsäure-Niederschlag.

Der Niederschlag aus 200 cm³ der Lösung = 0·19644 g Substanz lieferte 0·00295 g N = 1·5% N.

4. Identificierung des durch Oxydation aus dem Oxyhämoglobin gewonnenen Harnstoffes.

0·1784 g gaben 0·1511 g CO₂ und 0·0787 g H₂O.

In 100 Theilen:

	Berechnet für (CON ₂ H ₄) ₂ C ₂ O ₄ H ₂	Gefunden
C	22·86	23·11
H	4·76	4·90

Casein (Merck).

Bereitet nach Hammersten.¹

0·2863 g Substanz lieferten nach Kjeldahl 0·0438 g N, entsprechend 15·3% N.

¹ O. Hammersten, Verhandlungen der königl. schwedischen Akademie der Wissenschaften. Upsala, 1877.

Zur Oxydation verwendete Menge 0·4866 g, das Oxydationsproduct wurde auf 500 cm^3 aufgefüllt.

1. Volumetrische Stickstoffbestimmung.

50 cm^3 der Lösung = 0·04866 g Substanz lieferten 4·74 cm^3 N bei 18° C. und 758 mm B = 5·4499 mg N = 11·20% N.

2. Stickstoffbestimmung im oxalsauren Harnstoffe nach Kjeldahl.

250 cm^3 der Lösung = 0·2433 g Substanz lieferten 0·1006 g oxalsauren Harnstoff. Die Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl ergab 0·0270 g N, entsprechend 11·12% N.

3. Stickstoffbestimmung im Phosphorwolframsäure-Niederschlage.

Der Niederschlag aus 200 cm^3 der Lösung = 0·19464 g Substanz lieferte 0·0061 g N, entsprechend 3·12% N.

4. Identificierung des durch Oxydation aus dem Casein gewonnenen Harnstoffes.

Die Analyse des aus einer Reihe von Versuchen gewonnenen Oxalates ergab folgende Werte:

a) 0·2284 g Substanz lieferten 0·1938 g CO_2 und 0·1009 g H_2O .

In 100 Theilen:

	Berechnet für $(CON_2H_4)_2 \cdot C_2O_4H_2$	Gefunden
C	22·86	23·13
H	4·76	4·90

b) Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl: 0·1006 g Substanz lieferten 0·0270 g N.

Berechnet N 26·66%, gefunden N 26·83%.

c) In 0·2016 g Substanz wurde die Oxalsäure mit Permanganat titriert (1 cm^3 $KMnO_4$ = 0·002257 g $C_2H_2O_4$); verbraucht wurden 38·74 cm^3 $KMnO_4$ -Lösung = 0·0874 g $C_2H_2O_4$.

Berechnet $C_2H_4O_2$ 42·86%, gefunden 43·35%.

Prüfung des Phosphorwolframsäure-Niederschlag auf Hexonbasen.

Zur Identifizierung der Hexonbasen wurde der Phosphorwolframsäure-Niederschlag in gleicher Weise behandelt, wie es bei dem Eialbumin eingehend angegeben wurde. Auch hier konnte Histidin und Lysin nachgewiesen werden. Was den Nachweis des Arginins betrifft, so wurde das Filtrat vom Quecksilberchloridniederschlag zunächst vom Quecksilber und von der Salzsäure befreit und hierauf behufs Ausfällung des Arginins Silbernitrat und Barytwasser hinzugefügt. Es resultierte ein minimaler Niederschlag; derselbe wurde durch Schwefelwasserstoff zerlegt, das Filtrat mit Salpetersäure neutralisiert und vorsichtig eingedampft. Nach einigem Stehen fielen einzelne feine Nadeln aus, die unter dem Mikroskope die gleiche Kristallisation erkennen ließen, wie ein zum Vergleiche herangezogenes Arginininitrat.

Mit Millon'schem Reagens gab der Phosphorwolframsäure-Niederschlag keine Reaction.

Fibrin (aus Ochsenblut).

0·2491 g Substanz lieferten nach Kjeldahl 0·04085 g N, entsprechend 16·64% N.

Zur Oxydation verwendete Menge 0·6028 g; das Oxydationsproduct wurde auf 500 cm^3 aufgefüllt.

1. Volumetrische Bestimmung.

50 cm^3 der Lösung = 0·06028 g Substanz lieferten 3·95 cm^3 N bei 18° und 758 mm B = 4·533 mg N = 7·52% N.

2. Stickstoffbestimmung im oxalsauren Harnstoffe nach Kjeldahl.

200 cm^3 der Lösung = 0·24112 g Substanz lieferten 0·0679 g oxalsauren Harnstoff. Die Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl ergab 0·01823 g N, entsprechend 7·50% N.

3. Stickstoffbestimmung im Phosphorwolframsäure- Niederschlag.

Der Niederschlag aus 200 cm^3 der Lösung = 0·24112 g Substanz lieferte 0·0986 g N, entsprechend 4·09% N.

4. Stickstoffbestimmung im Filtrate des Phosphorwolframsäure-Niederschlag.

Das Filtrat aus 200 cm^3 der Lösung = 0·24112 g Substanz lieferte 0·1178 g N, entsprechend 4·87% N.

5. Identifizierung des durch Oxydation aus dem Fibrin gewonnenen Harnstoffes.

Die Analyse des aus einer großen Reihe von Oxydationsversuchen gewonnenen Oxalates ergab folgende Werte:

0·2604 g Substanz lieferten 0·2214 g CO_2 und 0·1108 g H_2O .

In 100 Theilen:

	Berechnet für $(CON_2H_4)_2 \cdot C_2O_4H_2$	Gefunden
C	22·86	23·20
H	4·76	4·72

Prüfung des Phosphorwolframsäure-Niederschlag auf Hexonbasen.

Der aus zahlreichen Oxydationsversuchen gesammelte Niederschlag wurde mit 5% Schwefelsäure ausgewaschen, bis das Filtrat nur Spuren von Salzsäure enthielt. Hierauf wurde der Niederschlag mit reiner Kalkmilch unter Zusatz von etwas Barytwasser zerlegt, Kohlensäure eingeleitet, filtriert, das Filtrat mit Schwefelsäure neutralisiert und das Arginin nach der Methode von Hedin (Zeitschrift für physikal. Chemie, Bd. 21, S. 166 bis 168) mit Silbernitrat gefällt. Es resultierte ein geringer Niederschlag von 0·074 g basischem Argininsilbernitrat ($C_6H_{14}N_4O_2 \cdot AgNO_3 + \frac{1}{2} H_2O$).

Die quantitative Silberbestimmung ergab 0·0290 g Ag.

Berechnet 30·59%, gefunden 30·94%.

Zum Nachweise von Histidin und Lysin wurde eine frische Probe des Phosphorwolframsäure-Niederschlag mit fünfprocentiger Schwefelsäure ausgewaschen, mit Barythydrat zerlegt, Kohlensäure eingeleitet, filtriert und das Filtrat mit Quecksilberchloridlösung versetzt. Nach mehrtägigem Stehen wurde der geringe Niederschlag filtriert, ausgewaschen, in Wasser vertheilt und durch Schwefelwasserstoff zerlegt. Das Filtrat

vom Schwefelquecksilber wurde auf dem Wasserbade stark eingengt und längere Zeit stehen gelassen. Es schieden sich Krystalle von Histidinchlorid ab, jedoch reichte die Menge nur zu einer Chlorbestimmung aus.

0·052 g Substanz, über Schwefelsäure getrocknet, gaben 0·036 g AgCl.

In 100 Theilen:

	Berechnet für $C_6H_9N_3O_2 \cdot HCl + H_2O$	Gefunden
Cl.....	16·90	17·16

Das Filtrat vom Quecksilberchlorid-Niederschlage wurde zunächst durch Einleiten von Schwefelwasserstoff vom Quecksilber und durch Silbernitrat von der Salzsäure befreit und das Arginin nach Kossel durch Ausfällen mit Silberlösung und Barytwasser entfernt. Der durch diese Reagentien hervorgerufene geringe Niederschlag wurde abfiltriert und das Filtrat, mit Phosphorwolframsäure versetzt. Nach Zersetzung des Phosphorwolframsäure-Niederschlages durch Baryt und Entfernung des Baryts durch Kohlensäure wurde das Filtrat auf dem Wasserbade stark eingengt und hierauf mit alkoholischer Pikrinsäurelösung versetzt. Nach mehrstündigem Stehen fielen feine, gelbe Nadeln von Lysinpikrat aus. Dieselben wurden nach Kossels Vorschrift durch Schütteln mit wässriger Salzsäure und Äther in das Chlorhydrat übergeführt. Die wässrige Lösung wurde eingedunstet, der Verdampfungsrückstand mit Methylalkohol behandelt, filtriert, wieder abgedampft, der Rückstand in wenig Wasser gelöst und die Flüssigkeit mit einer concentrirten Platinchloridlösung versetzt. Nach mehrtägigem Stehen fielen gelbrothe Prismen aus. Die Krystalle wurden bei circa 120° C. getrocknet und eine quantitative Platinbestimmung durchgeführt.

0·0481 g Substanz gaben 0·0170 g Pt.

In 100 Theilen:

	Berechnet für $C_6H_{14}N_2O_2 \cdot 2HCl \cdot PtCl_4$	Gefunden
Pt.....	35·05	35·45

Vitellin aus Eigelb.

Dieses Albumin wurde aus Eigelb von Hühnereiern in der Weise dargestellt, dass der Eidotter zunächst mit Alkohol und Äther und hierauf mit Wasser extrahiert wurde. Der Rückstand stellt das Vitellin aus Eigelb dar.

0·2602 g Substanz lieferten nach Kjeldahl 0·03981 g N, entsprechend 15·30% N.

Zur Oxydation verwendete Menge 0·5864 g; das Oxydationsproduct wurde auf 500 cm^3 aufgefüllt.

1. Volumetrische Bestimmung.

50 cm^3 der Lösung = 0·05864 g Substanz lieferten 6·15 cm^3 N bei 18° und 756 mm B = 7·06 mg = 12·04% N.

2. Stickstoffbestimmung im oxalsauren Harnstoffe nach Kjeldahl.

200 cm^3 der Lösung = 0·23456 g Substanz lieferten 0·10498 g oxalsauren Harnstoff. Die Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl ergab 0·02805 g N, entsprechend 11·96% N.

3. Stickstoffbestimmung im Phosphorwolframsäure-Niederschlag.

Der Niederschlag aus 200 cm^3 der Lösung = 0·23456 g Substanz lieferte 0·00753 g N, entsprechend 3·21% N.

4. Identificierung des durch Oxydation aus dem Vitellin gewonnenen Harnstoffes.

Die Analyse des aus einer größeren Anzahl von Oxydationsversuchen gewonnenen Oxalates ergab folgende Resultate:

0·2369 g Substanz lieferten 0·2009 g CO_2 und 0·1056 g H_2O .

In 100 Theilen:

	Berechnet für $(CON_2H_4)_2 \cdot C_2O_4H_2$	Gefunden
C	22·86	23·27
H	4·76	4·95

Prüfung des Phosphorwolframsäure-Niederschlag
auf Hexonbasen.

Nach dem beim kristallisierten Eialbumin beschriebenen Verfahren gelang es, im Phosphorwolframsäure-Niederschlag Histidin in Form von Histidinchloridkristallen und Lysin als Lysinplatinchlorid abzuscheiden. Hingegen blieben die Versuche, Arginin nachzuweisen, vorderhand resultatlos.

Vitellin aus Pflanzen.

0·2008 g Substanz lieferten nach Kjeldahl 0·0355 g N, entsprechend 17·68% N.

Zur Oxydation verwendete Menge 0·6142 g Substanz; das Oxydationsproduct wurde auf 500 cm³ aufgefüllt.

1. Volumetrische Bestimmung.

50 cm³ der Lösung = 0·06142 g Substanz lieferten 4·46 cm³ N bei 20° und 749 mm B = 6·024 mg N = 8·18% N.

2. Stickstoffbestimmung im oxalsauren Harnstoffe
nach Kjeldahl.

200 cm³ der Lösung = 0·24568 g Substanz lieferten 0·0670 g oxalsauren Harnstoff. Die Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl ergab 0·02938 g N, entsprechend 11·96% N.

3. Stickstoffbestimmung im Phosphorwolframsäure-
Niederschlag.

Der Niederschlag aus 200 cm³ der Lösung = 0·24568 g Substanz lieferte 0·00793 g N, entsprechend 3·23% N.

4. Stickstoffbestimmung im Filtrate des Phosphor-
wolframsäure-Niederschlages.

Das Filtrat aus 200 cm³ der Lösung = 0·24568 g Substanz lieferte 0·01521 g N, entsprechend 6·19% N.

5. Identificierung des durch Oxydation aus dem
Vitellin aus Pflanzen gewonnenen Harnstoffes.

0·2514 g Substanz lieferten 0·2110 g CO₂ und 0·2110 g H₂O.

In 100 Theilen:

	Berechnet für $(\text{CON}_2\text{H}_4)_2 \cdot \text{C}_2\text{O}_4\text{H}_2$	Gefunden
C	22·86	23·27
H	4·76	4·94

Prüfung des Phosphorwolframsäure-Niederschleges auf Hexonbasen.

Es gelang, nach dem beim Fibrin ausführlich beschriebenen Verfahren Arginin als basisches Argininsilbernitrat, Histidin in Form von Histidinchloridkrystallen und Lysin als Lysinplatinchlorid abzuscheiden. Ich habe speciell beim Vitellin, welches mir in genügender Quantität zur Verfügung stand, das Auftreten der Hexonbasen nicht nur qualitativ, sondern auch quantitativ verfolgt und behalte mir vor, über diese Ergebnisse an anderer Stelle zu berichten.

Folgerungen aus den Resultaten.

Aus der nachstehenden Tabelle ergibt sich die Eintheilung der bis jetzt beobachteten Eiweißkörper in drei Typen.

I. Oxyhämoglobin. Harnstoff-N über 90% des Gesamtstickstoffes, der Rest im Phosphorwolframsäure-Niederschlage.

II. Eieralbumin, Serumalbumin, Serumglobulin, Casein, Vitellin aus Eigelb. Harnstoff-N 70 bis 81%, der Rest im Phosphorwolframsäure-Niederschlage.

III. Fibrin, Vitellin aus Pflanzen. Harnstoff-N 40 bis 50%, Filtratstickstoff circa 30%, der Rest im Phosphorwolframsäure-Niederschlage.

Mit Ausnahme der ersten Gruppe schwankt der Stickstoff im Phosphorwolframsäure-Niederschlage zwischen 18 bis 30%.

Aus diesen Zahlen ergeben sich erhebliche Unterschiede in der Zusammensetzung der Eiweißkörper. Die nächste Aufgabe ist nun die, durch Vervollständigung obiger Daten festzustellen, ob das Eintheilungsprincip noch einer Modification bedarf und inwieweit diese chemische Eintheilung mit den sonstigen chemischen und physiologischen Eigenschaften der Eiweißkörper in Beziehung zu bringen ist. Die geringe Differenz

Tabellarische Zusammenstellung der analytischen Daten.

	in Procenten					In Procenten des Gesamtstickstoffes				
	Gesamtstickstoff	Volumetrischer Stickstoff	Harnstoffstickstoff	Stickstoff im Phosphorwolframsäure-Niederschläge	Filtratstickstoff	Volumetrischer Stickstoff	Harnstoffstickstoff	Phosphorwolframsäurestickstoff	Filtratstickstoff	
Oxyhämoglobin	16.91	15.44	15.48	1.50	—	91.30	91.24	8.87	—	
Krysalisiertes Serumalbumin	16.04	13.01	12.97	3.18	—	81.10	80.86	19.82	—	
Krysalisiertes Eiteralbumin	14.98	11.86	11.80	3.12	—	79.17	78.77	20.82	—	
Vitellin aus Eigelb	15.30	12.04	11.96	3.21	—	78.69	78.16	20.98	—	
Krysalisiertes Serumglobulin	15.94	12.06	12.00	3.93	—	75.65	75.28	24.65	—	
Casein	15.30	11.20	11.12	3.90	—	73.20	72.67	25.49	—	
Vitellin aus Pflanzen	17.68	8.18	8.22	3.23	6.19	46.26	46.44	18.32	35.01	
Fibrin	16.64	7.52	7.56	4.09	4.87	45.19	45.48	24.57	24.62	

zwischen dem volumetrisch entwickelten Stickstoff (Harnstoff + Ammoniak) und dem nach der Oxalsäurefällung erhaltenen Stickstoff (nur Harnstoff) lässt ersehen, dass Ammoniak unter den eingehaltenen Oxydationsbedingungen nur spurenweise erhalten wird. Hiemit soll keineswegs behauptet werden, dass die harnstoffbildenden Gruppen nicht bei anderer Behandlung (Kochen mit Säuren oder Basen) ebenso quantitativ in Ammoniak übergeführt werden. Vorderhand sei nur auf die nahe Übereinstimmung des Harnstoffstickstoffes nach meinem Verfahren und der Summe des Amid- und Monamino-Stickstoffes nach Hausmann (*Z. f. phys. Chem.*, XXVII, S. 104) hingewiesen.

In allen Fällen konnte die Anwesenheit von Hexonbasen im Phosphorwolframsäure-Niederschlag constatirt werden. Hingegen ergab die Prüfung auf Tyrosin ein negatives Resultat.

Die Überführung der Eiweißkörper in Harnstoff.

Es ist in der beschriebenen Versuchsanordnung ein Weg gefunden, von den Eiweißkörpern zu demselben Endproducte zu gelangen, welches als Endglied der Umsetzungen im Organismus resultiert, zum Harnstoff. Hiemit soll durchaus nicht behauptet werden, dass in beiden Fällen die Zwischenstadien des Processes die nämlichen sind, wenn auch hier wie dort die Harnstoffbildung der Abschluss der Eiweißspaltung ist. Im Organismus können wir uns die Entstehung des Harnstoffes erklären, indem wir annehmen, dass er durch hydrolytische Spaltung aus ureidartigen Körpern gebildet wird, die ihrerseits bei der Oxydation des Eiweißes entstehen, oder wir können diese beiden Prozesse (Oxydation und Hydrolyse) uns gleichzeitig verlaufend vorstellen. Schließlich ist noch eine Erklärung zulässig, die zunächst eine Oxydation des Eiweißes zu Kohlensäure und Ammoniak annimmt, aus denen synthetisch Harnstoff entsteht. Zum mindesten erscheint der letztgenannte Weg bei der Oxydation mit Permanganat äußerst unwahrscheinlich, während über die größere Möglichkeit eines der anderen Wege keine Entscheidung getroffen werden kann.

Die Überführbarkeit eines großen Theiles des Stickstoffes in Harnstoff, während der Rest in Form von Verbindungen auftritt, welche durch Phosphorwolframsäure fällbar sind, ist

eine Eigenschaft, welche sämtliche Eiweißstoffe charakterisiert. Inwieweit die übrigen, am Stoffwechsel beteiligten Producte ein analoges Verhalten zeigen, bedarf noch der Untersuchung; vielleicht ist nach dieser Richtung hin eine Abgrenzung des Begriffes »Proteinkörper« möglich.

Über die Stickstoffbildung der Eiweißkörper.

Ausgehend von Versuchen in der Harnsäurereihe, die das Ergebnis geliefert haben, dass bei entsprechender Oxydation gewisser stickstoffhaltiger Körper der ganze Stickstoff oder ein von der Constitution abhängiger Bruchtheil desselben in Harnstoff übergeht, habe ich versucht, festzulegen, welches die Bedingungen für diese Reactionen sind. Als Ergebnis der zu diesem Zwecke unternommenen Arbeiten lassen sich bis jetzt folgende Regeln zur Harnstoffbildung aussprechen:

Der Harnstoff entsteht aus der CONH_2 -, respective CONH -Gruppe. Beispiele hiefür sind — abgesehen von dem ziemlich selbstverständlichen Verhalten der Ureide — die Purinbasen,¹ Hippursäure,² Asparagin,³ Lactamid, Succinamid, Benzoylasparaginsäure.⁴ Bei all diesen Körpern tritt ebensoviel Stickstoff in Form von Harnstoff aus, als CONH_2 -, respective CONH -Gruppen vorhanden sind. So geben z. B. die methylierten Purinkörper den Stickstoff der CONCH_3 -Gruppen nicht in Form von Harnstoff ab, ebensowenig wie die Amidosäuren, Glycocoll, Asparaginsäure Harnstoff liefern. Das Asparagin z. B., welches von zwei Stickstoffen einen in der Säure-Aminogruppe enthält, gibt genau die Hälfte des Stickstoffes als Ammoniak ab, die andere Hälfte als Harnstoff.

Ob eine CONH -Gruppe befähigt ist, Harnstoff zu liefern, hängt im wesentlichen von der leichten Oxydierbarkeit des

¹ Über eine quantitative Reaction bei den Ureiden und Purinderivaten, von Adolf Jolles. Ber. der deutsch. chem. Ges., Bd. XXXIII, S. 1246 und 2119.

² Über die Oxydation der Hippursäure zu Harnstoff, von Adolf Jolles. Ber. der deutsch. chem. Ges., Bd. XXXIII, S. 2834.

³ Zur Kenntnis des Asparagins und der Asparaginsäure, von Adolf Jolles. Ber. der deutsch. chem. Ges., Bd. XXXIV, S. 386.

⁴ Über den Harnstoff als Product der Oxydationsspaltung stickstoffhaltiger Körper, von Adolf Jolles. Journal für praktische Chemie, 1901.

Complexes ab, an dem sie hängt und ferner auch von der Structur dieses Restes.

Nachdem nun an dem vorliegenden Materiale festgestellt worden war, dass die CONH-Gruppe und keine andere befähigt sei, bei der Oxydation unter bestimmten Bedingungen Harnstoff zu liefern, habe ich eine Reihe von Eiweißkörpern derselben Behandlung unterzogen, um Analogieschlüsse auf die Stickstoffbindung im Eiweißmolecüle ziehen zu können. Die Untersuchungen, deren Einzelresultate im experimentellen Theile ausführlich wiedergegeben sind, haben ausnahmslos sehr bedeutende Bruchtheile des Eiweißstickstoffes in Form von Harnstoff ergeben, immer über 45%, bei gewissen Eiweißkörpern bis 90%. Aus diesen Untersuchungen geht hervor, dass im Eiweiß beträchtliche, ja selbst überwiegende Antheile des Stickstoffes in harnstoffbildenden Gruppen stehen. Nach den bisherigen Erfahrungen können wir nicht umhin, als diese Gruppen die CONH-Gruppen aufzufassen. Wir müssen somit in Eiweiß eine beträchtliche Zahl von CONH-Gruppen annehmen. Es fragt sich jetzt noch, womit diese Gruppen verbunden sind. Betrachtet man das Verhältnis von Stickstoff und Kohlenstoff im gesammten Eiweißmolecüle, so sieht man, dass auf 1 Atom Stickstoff circa 4 Atome Kohlenstoff entfallen, so dass nach Abspaltung von CONH-Gruppen ein kohlenstoffreicher Rest übrig bleiben wird. Inwieweit diese auf Phenole, Fettsäuren etc. entfällt, ist in quantitativer Weise noch nicht untersucht worden. Nachdem bisher die Harnstoffbildung nur bei jenen CONH-Gruppen constatirt werden konnte, deren Träger ein leicht oxydabler Complex ist, so müssen wir auch hier annehmen, dass der Rest, an dem die CONH-Gruppe stand, einer weiteren Oxydation anheimfällt. Inwieweit diese Oxydation mit Permanganat bei Eiweißkörpern zu Ende geführt wird, habe ich bis jetzt noch nicht untersucht.

Da bei der Oxydation der Eiweißkörper immer ein, wenn auch zuweilen geringer Antheil des Stickstoffes nicht als Harnstoff auftritt, und ferner für die von Kossel als Kern des Eiweißes angenommenen Hexonbasen, ebenso wie für die nicht mit dem Harnstoff identischen, stickstoffhaltigen Spaltungsproducte des Eiweißes die Fällbarkeit durch Phosphorwolfram-

säure nachgewiesen ist, können wir annehmen, dass der Eiweißstickstoff, soweit er nicht als Harnstoff auftritt, im wesentlichen in Form von Hexonbasen abgespalten wird. In dieser Beziehung bieten die Oxydationsversuche, wobei im Phosphorwolframsäure-Niederschlag die Hexonbasen allerdings nur qualitativ nachgewiesen wurden, eine Stütze für die Kossel'sche Theorie. Wenngleich aber nachgewiesen ist, dass dieser Hexonkern sämtlichen Eiweißkörpern gemeinsam ist, und selbst wenn zugegeben wird, dass der chemische Charakter des Eiweißes dadurch bedingt ist, so muss doch hervorgehoben werden, dass keineswegs dargethan ist, dass dieser Kern für die Ernährung ausschlaggebend ist. Es ist viel eher anzunehmen, dass die harnstoffbildende Gruppe, die allen Eiweißkörpern, und zwar in viel größeren Antheilen gemeinsam ist, für die Functionen des Eiweißes als Nahrungsstoff von größter Wichtigkeit ist.

Diese Fragen werden sich erst durch eine sehr ausgedehnte chemische und physiologische Vergleichung der Eiweißkörper untereinander beantworten lassen, und es sei zunächst nur nochmals darauf hingewiesen, dass sich unter den Eiweißkörpern erhebliche Differenzen bezüglich der gebildeten Harnstoffmengen gezeigt haben, was für die Charakterisierung der einzelnen Glieder dieser Körperreihe von großem Interesse ist. Die Analogie, welche sich in gewisser Beziehung zwischen der Permanganat-Oxydation und der physiologischen Verarbeitung der Eiweißkörper gezeigt hat, wird besonders durch diese Versuchsergebnisse bekräftigt, worüber nach Abschluss der bezüglichen Nährversuche berichtet werden soll.
