

Über Hydrolyse des Serumglobulins durch Alkalien

von

H. Lampel und Zd. H. Skrap.

Aus dem II. chemischen Universitätslaboratorium in Wien.

(Vorgelegt in der Sitzung am 11. März 1909.)

Der eine von uns hat mit F. Hummelberger¹ die Hydrolyse des Eiereiweißes mit Natronlauge beschrieben.

Die vorliegende Arbeit, bei der ein aus Pferdeblut gewonnenes Serumglobulin den Gegenstand der Untersuchung bildete, führte im großen und ganzen zu ähnlichen Ergebnissen wie beim Ovalbumin. Durch Einwirkung von verdünntem Alkali in der Wärme, Neutralisation mit Schwefelsäure, Fällung der Mutterlauge des durch die Säure ausgeschiedenen Harzes mit Ammonsulfat und entsprechende Reinigung der gewonnenen Produkte wurden wie beim Eiereiweiß drei in ihren Eigenschaften ziemlich beträchtlich voneinander abweichende Körper erhalten, für welche die in der erwähnten Arbeit vorgeschlagenen Namen beibehalten seien, nämlich: Globulin Protalbinsäure für die Säurefällung, Globulin-Lysalbinsäure für die Ammonsulfatfällung und Globulin-Pepton für den aus der Mutterlauge der letzteren erhaltenen, in gesättigter Ammonsulfatlösung leicht löslichen Körper.

Was die Entstehung der drei Stoffe aus dem Eiweißmolekül betrifft, so erscheint auch hier die gleiche Vorstellung am Platze wie beim Eiereiweiß, nämlich daß ihre Bildung gleichzeitig und nebeneinander vor sich geht, indem die

¹ Monatshefte für Chemie, 1909.

spaltende Wirkung des Alkalis an verschiedenen Stellen des Moleküls, und zwar in verschiedener Stärke sich bemerkbar macht. Hiefür spricht die Tatsache, daß Protalbinsäure, in gleicher Weise wie das ursprüngliche Eiweiß mit Natronlauge behandelt und mit verdünnter Schwefelsäure ausgefällt, nicht viel mehr an Gewicht verliert, als wenn sie in der eben ausreichenden Menge verdünnten Ammoniaks gelöst und sofort wieder durch Schwefelsäure ausgefällt wird. Bei der nicht ganz unbedeutenden Löslichkeit der Protalbinsäure, selbst in verdünnten Säuren, dürfte die Lysalbinsäure ziemlich stark damit verunreinigt sein, zumal die erstere gleichfalls durch Sättigung mit Ammonsulfat sehr leicht ausgefällt wird. Dagegen kann man beim Pepton, das in gesättigter Ammonsulfatlösung sich sehr leicht auflöst, einen ziemlich hohen Grad von Reinheit annehmen, zum mindesten was Verunreinigung mit Albumosen oder einfachsten Spaltungsprodukten betrifft, von denen es wie die Lysalbinsäure durch Dialyse befreit wurde.

Aus 100 Gewichtsteilen Globulin wurden an Spaltungsprodukten erhalten:

Protalbinsäure.....	11
Lysalbinsäure	21
Pepton	6

Alle drei Spaltungsprodukte wurden hydrolysiert und bei der Analyse in ähnlicher Weise wie in der erwähnten Arbeit von Skraup und Hummelberger die Hexonbasen und einzelne Aminosäuren bestimmt. Auch beim Globulin selbst wurde (zur Feststellung möglichst genauer Werte) die von dem einen von uns bereits früher¹ durchgeführte Hexonbasenbestimmung (mehrmals mit übereinstimmenden Resultaten) wiederholt, wobei die Resultate teilweise von den in der angeführten Arbeit erhaltenen abwichen, und auch die Monaminosäuren in gleicher Weise wie bei den Spaltungsprodukten bestimmt. Nachstehend die Tabelle der erhaltenen Werte, in die zum

¹ Monatshefte für Chemie, 28, 625.

Vergleich die von Abderhalden¹ für die Monaminosäuren im Serumglobulin gefundenen Zahlen aufgenommen sind.

In 100 Teilen:

	Globulin		Globulin-		
	Lampel und Skraup	Abderhalden	Protalbin- säure	Lysalbin- säure	Pepton
Histidin.....	1·7		1·5	1·7	1·5
Arginin.....	3·7		0	0	0
Lysin.....	4·3		3·9	4·4	4·4
Tyrosin.....	3·1		4·4	2·5	1·2
Prolin.....	3·0	2·76	3·2	2·9	2·3
Phenylalanin.....	3·6	3·84	1·0	2·7	1·8
Glutaminsäure.....	4·4	2·20	—	1·9	0
Aminosäuren.....	18·5		20·4	21·2	13·5

Was die Differenzen in der Zusammensetzung der einzelnen Stoffe betrifft, so ist folgendes zu bemerken. Der Gehalt an Lysin und, entgegen den Beobachtungen beim Eialbumin, auch der an Histidin ist innerhalb der Fehlergrenzen überall der gleiche. Dagegen scheint das Arginin in den durch Alkaliwirkung gewonnenen Körpern so gut wie vollständig verschwunden zu sein, wie dies auch beim Eiereiweiß gefunden wurde. Im Gange der Hexonbasenbestimmung nach Kossel und Kutscher wurde an Stelle des Argininnitrats nur eine sehr geringe Menge organischer Substanz erhalten, die nicht krystallisierte und nicht mit Argininnitrat identifiziert werden konnte, daher auch nicht in Rechnung gezogen wurde. Was das Tyrosin betrifft, so enthält davon die Protalbinsäure am meisten, das Pepton am wenigsten; zwischen beiden stehen das Globulin und die Lysalbinsäure mit ungefähr gleichem Tyrosingehalt.

Gänzlich abweichend vom Eiereiweiß verhält sich aber das Globulin in bezug auf die Menge des Phenylalanins in seinen Spaltungsprodukten. Während die Eiprotalbinsäure fast die doppelte, die Eilysalbinsäure ungefähr die gleiche, das Eipepton weniger als die halbe Menge Phenylalanin enthält im Vergleich zum Eiereiweiß, ist hier bei allen Spaltungsprodukten

¹ Zeitschr. f. physiol. Chemie, 44, 17 (1905).

eine Abnahme zu beobachten, die stärkste aber gerade bei der Protalbinsäure, und es ist nicht anzunehmen, daß diese Abweichung nur in einer eben hier vorgenommenen Abänderung der Bestimmungsmethode des Phenylalanins ihren Grund hat, auf die im experimentellen Teile noch näher eingegangen werden wird. An Glutaminsäure wurde im Globulin erheblich mehr gefunden, als Abderhalden angibt, was wohl darauf zurückzuführen ist, daß Abderhalden sie nicht im Rückstande der Esterdestillation, sondern nur in den übergegangenen Estern bestimmt hat.

In der Protalbinsäure wurde sie infolge eines Versehens nicht genau bestimmt, sie scheint darin aber nur in sehr geringer Menge vorhanden zu sein. Im Globulinpepton ließ sich gar keine Glutaminsäure nachweisen. Bezüglich der unter dem Namen »Aminosäuren« zusammengefaßten Stoffe muß hier darauf hingewiesen werden, daß ihre Berechnung in anderer Weise erfolgte als in der mehrfach erwähnten Arbeit von Skraup und Hummelberger. Während dort nur die in Esterform bis 100° destillierten Aminosäuren mit Ausnahme des Prolins unter dieser Bezeichnung zusammengefaßt waren, rechnen wir dazu alles, was bei der Esterdestillation übergang und nicht besonders als Prolin, Phenylalanin und Glutaminsäure bestimmt wurde. Die beim Eiereiweiß beobachtete starke Anreicherung dieser »Aminosäuren« in der Protalbinsäure konnte hier, vielleicht nur infolge der anderen Berechnungsweise, nicht festgestellt werden, dagegen ist auch hier das Pepton an ihnen auffallend arm, was gleichfalls durch die mit Hilfe der Farbreaktionen nachgewiesene starke Vergrößerung des Gehaltes an Kohlehydrat erklärt werden kann.

Die gebräuchlichen Farbreaktionen wurden mit den durch Umfällung, beziehungsweise Dialyse von einfachsten Spaltungsprodukten befreiten Körpern angestellt. Die Reaktionen von Molisch, die bekanntlich über die Anwesenheit von Kohlehydraten Aufschluß geben, führten hier insofern zu ähnlichen Resultaten wie beim Eiereiweiß, als die Protalbinsäure auch hier nur außerordentlich schwache Reaktionen mit Thymol und α -Naphthol gab, die Intensität derselben beim Pepton aber vielleicht das Drei- bis Vierfache von jener beim Globulin

erreichte; in einem Punkte aber ergab sich eine Abweichung, nämlich darin, daß diese Reaktionen bei der Globulin-Lysalbinsäure etwas schwächer ausfielen als im Globulin, während sie die Ei-Lysalbinsäure stärker gibt als das Eiereiweiß. Die Schwefelbleireaktion, die im Globulin sehr intensiv ist, zeigte bei der Protalbinsäure einen äußerst geringen Schwefelgehalt an, bei den anderen Körpern war ein solcher überhaupt nicht nachzuweisen. Auffallend ist, daß Skraup und Hummelberger die Liebermann'sche Reaktion mit konzentrierter Salzsäure bei den Spaltungsprodukten des Albumins nicht erhalten konnten, während die des Globulins sie in gleicher Stärke geben wie das Ausgangsmaterial.

Was das Pepton betrifft, so sei noch erwähnt, daß Versuche, daraus mit Hilfe von Benzoylchlorid und α -Naphthylaminsulfochlorid definierbare Körper zu erhalten, zu keinem befriedigenden Ergebnis führten.

Experimenteller Teil.

Die Spaltung des Serumglobulins wurde in gleicher Weise ausgeführt wie die des Eiereiweißes, nämlich durch dreistündiges Erwärmen mit 6prozentiger Natronlauge auf dem Wasserbade. Die Ausfällung der Protalbinsäure wurde gleichfalls mit verdünnter Schwefelsäure vorgenommen.

Das Verfahren im einzelnen war folgendes. Da das verwendete Serumglobulin von wässrigen Flüssigkeiten nur schwer benetzt wird und, mit verdünnter Natronlauge übergossen, auch beim Durchschütteln in der Wärme eine klumpige Masse bildet, die sich äußerst langsam auflöst, wurden die zur Verarbeitung gelangenden 400 g Globulin (die 10·2% Feuchtigkeit und 0·5% Fett enthielten) mit 320 g 96prozentigem Alkohol angerieben, dann mit 1280 g Wasser übergossen und schließlich unter gutem Umschütteln 400 cm^3 30prozentiger Natronlauge zugefügt. Es bildete sich so eine homogene, halb feste Masse, die beim Erwärmen auf dem Wasserbad in kurzer Zeit in eine klare Lösung überging. Von diesem Zeitpunkt an wurde noch 3 Stunden lang erhitzt, wobei der verdampfende Alkohol durch das gleiche Gewicht

Wasser ersetzt wurde. Die stark nach Ammoniak riechende Flüssigkeit wurde noch heiß in einer Schale mit 25prozentiger H_2SO_4 neutralisiert, wobei sich viel H_2S entwickelte und ein braunes Harz ausfiel, dann noch weiter verdünnte H_2SO_4 zugegeben, bis sich die Fällung nicht mehr vermehrte, die durch beständiges Umrühren zu einer teigigen Masse zusammengeballt wurde, von der sich nach dem Erkalten leicht abgießen ließ. Das Harz wurde mit heißem Wasser mehrmals umgeschmolzen und so von der Hauptmenge der anhaftenden H_2SO_4 befreit, wobei mit dem Abgießen der Waschwässer zur Mutterlauge bis zum vollständigen Erkalten gewartet wurde, da heißes Wasser von der Säurefällung erheblich mehr löst als kaltes. Die auf diese Weise erhaltene rohe Globulin-Protalbinsäure, die noch viel Na_2SO_4 enthielt, wog lufttrocken 99 g.

Die Mutterlauge und die Waschwässer wurden genau mit Natronlauge neutralisiert, vereinigt auf 2·5 l eingedampft und in der Hitze 1250 g festes Ammonsulfat eingetragen; von der beim Erkalten erstarrenden harzigen Fällung wurde abgossen, dieselbe in möglichst wenig heißem Wasser gelöst und durch nochmalige Ganzsättigung mit Ammonsulfat wieder abgeschieden. Die erste Mutterlauge schied beim Eindampfen noch etwas organische Substanz aus, die ebenfalls umgefällt und mit der Hauptmenge vereinigt wurde. Die Menge der so erhaltenen, mit Ammonsulfat verunreinigten rohen Globulin-Lysalbinsäure betrug trocken 211 g.

Die Mutterlaugen aller durch Ammonsulfat erhaltenen Fällungen wurden bis zur Krystallisation eingedampft und dann, ohne das Ammonsulfat abzufiltrieren, mit ungefähr dem $1\frac{1}{2}$ fachen Volum Alkohol versetzt, dem ungefähr 5 Volumprozent Ammoniak zugefügt waren. Das ausgeschiedene Ammonsulfat ist mit zwei Flüssigkeitsschichten durchsetzt, einer wässrigen und einer alkoholischen. Es wurde scharf abgesaugt und mit etwas 50prozentigem Alkohol nachgewaschen. Die alkoholische, viel dunkler gefärbte Schicht wurde abgehoben. Die wässrige, spezifisch schwerere Schicht wurde weiter konzentriert, wieder mit Alkohol und Ammoniak versetzt und die gleichen Operationen wiederholt, wodurch die Hauptmasse des

Ammonsulfats abgeschieden wurde. Die gesamten alkoholischen Schichten sowie die letzte wässrige Mutterlauge wurden zur Darstellung des Peptons verwendet.

Globulin-Protalbinsäure.

Zur Reinigung der Protalbinsäure von dem anhaftenden Ammonsulfat wurde ein anderer Weg eingeschlagen als von Skraup und Hummelberger, die dazu die Dialyse benutzt hatten. Die mehrfach mit heißem Wasser durchgeknetete Substanz (99 g) wurde in der geringsten Menge Ammoniak gelöst, die H_2SO_4 durch Baryt und der Überschuß des letzteren durch CO_2 entfernt. Filtrat und Waschwässer wurden nun in der Hitze abermals mit verdünnter H_2SO_4 gefällt, nach dem Erkalten abgegossen, die Fällung wiederholt mit Wasser durchgeschmolzen, nochmals in Ammoniak gelöst und die H_2SO_4 wie vorhin entfernt. Das Filtrat vom BaSO_4 und BaCO_3 wurde im Vakuum zur Trockne eingedampft, wobei starkes Schäumen eintrat. Die so gereinigte Protalbinsäure wog 45 g und enthielt nach einer Probetrocknung bei 120° noch 7·0% Wasser. Ihre Löslichkeit in Wasser und verdünnten Säuren ist zwar gering, scheint aber doch größer zu sein als die der Ei-Protalbinsäure. Die Farbreaktionen sind mit denen des Globulins und der anderen Spaltungsprodukte am Ende des experimentellen Teiles in einer Übersicht zusammengestellt.

Um über die Widerstandsfähigkeit der Protalbinsäure gegen verdünnte Alkalien ein Urteil zu gewinnen, wurde ein besonderer Versuch angestellt. 50 g Globulin wurden genau nach der angegebenen Vorschrift mit 6prozentiger Natronlauge erwärmt, mit Schwefelsäure gefällt und die Fällung mit heißem Wasser wiederholt durchgekocht. Nach dem Trocknen betrug ihr Gewicht 7·8 g, also 15%. Wurde nun mit dieser Protalbinsäure das gleiche Verfahren wiederholt, so betrug das Gewicht der gewaschenen und trockenen Säurefällung 3·6 g, also 46% der ersten Fällung. Daraus geht hervor, daß die Protalbinsäure von verdünnten Alkalien jedenfalls viel schwerer angegriffen wird als das ursprüngliche Globulin.

Globulin-Lysalbinsäure.

Da die rohe Lysalbinsäure noch beträchtliche Mengen von Ammonsulfat enthielt, wurde zur Abkürzung der nachfolgenden Dialyse die Hauptmenge der Schwefelsäure durch Baryt entfernt, bis nur eine ganz schwache H_2SO_4 -Reaktion vorhanden war, dann stark eingedampft, um Ammoniak zu entfernen und die nun ganz schwach alkalisch reagierende Flüssigkeit zur Beseitigung des noch beigemengten Natriumsulfats sowie der dialysierbaren organischen Substanzen, auf 10% gebracht, der Dialyse unterworfen. Dieselbe wurde durch 7 Tage fortgesetzt, nach welcher Zeit in den Schläuchen keine Schwefelsäure mehr nachzuweisen war und sich das Gewicht der aus dem täglich erneuerten Dialysierwasser durch Eindampfen erhaltenen organischen Substanz nicht mehr wesentlich verminderte. Es dialysierten an den aufeinanderfolgenden Tagen: 14 g, 11 g, 7 g, 6 g, 4 g, 3 g, zusammen also 45 g. Der Inhalt der Dialysierschläuche wurde sodann zur Trockne eingedampft, wodurch nur mehr 85 g Lysalbinsäure erhalten wurden, die noch 16·8% Wasser enthielt. Sie löst sich in Wasser außerordentlich leicht auf und gibt mit verdünnter H_2SO_4 keine Fällung.

Globulin-Pepton.

Die wässrige, einen großen Teil des Peptons enthaltende Flüssigkeit wurde auf 3 l verdünnt, die in den Alkohol übergegangen, in konzentrierter Ammonsulfatlösung leicht löslichen Anteile darin aufgelöst und nun die H_2SO_4 mit einem sehr kleinen Überschuß von Baryt ausgefällt. Das Filtrat wurde im Vakuum konzentriert, mit H_2SO_4 genau neutralisiert, von BaSO_4 abfiltriert und eingedampft. Der Rückstand wog feucht 100 g. Von diesem wurde eine 10prozentige Lösung hergestellt und einer achttägigen Dialyse unterworfen, nach welcher im Schlauchinhalt keine H_2SO_4 mehr nachzuweisen war und die Menge der dialysierenden Substanz nicht mehr erheblich abnahm. Es dialysierten an den aufeinanderfolgenden Tagen: 19 g, 14 g, 8·6 g, 6·2 g, 4·2 g, 2·7 g, 2·2 g, 1·5 g, zusammen 58·4 g. Das durch Eindampfen der Schlauchinhalte

im Vakuum gewonnene Pepton wog nur 24 g und gab bei 120° noch 9·3% Feuchtigkeit ab. Es löst sich in Wasser, Säuren und gesättigter Ammonsulfatlösung sehr leicht auf.

Analyse des Globulins und der Spaltungsprodukte.

Der Gang der Analyse war im allgemeinen der gleiche, den Skraup und Hummelberger beim Eiereiweiß befolgten, weshalb hier wieder auf diese Arbeit verwiesen sei. Wegen einiger Abweichungen ist aber doch die angewendete Methode in Kürze hier wiedergegeben.

Nach der Hydrolyse mit 33prozentiger Schwefelsäure wurden die Diaminosäuren entweder direkt nach der Methode von Kossel und Kutscher bestimmt oder vorher erst (wie dies bei der Lysalbinsäure und dem Pepton geschah) durch Phosphorwolframsäure ausgefällt. Von letzterer wurden die Mutterlaugen in jedem Falle durch Baryt befreit und nach Entfernung eines Überschusses desselben durch CO₂ bis zur reichlichen Krystallisation eingedampft. Das ausgeschiedene Tyrosin wurde durch Waschen mit kaltem Wasser, dann durch Auskochen mit der 30fachen Menge Wasser vom Leucin getrennt, wobei die Mutterlaugen wieder auf Tyrosin verarbeitet wurden, die Gesamtmenge des letzteren dann in Ammoniak gelöst, mit Tierkohle entfärbt und von dieser und einer kleinen Menge BaCO₃ abfiltriert und eingedampft. Die erste Krystallisation bestand aus reinem Tyrosin, aus der Mutterlauge wurde ein ebenfalls nur wenig verunreinigtes Produkt erhalten. Auf die Isolierung der Glutaminsäure an dieser Stelle, durch Konzentrieren der tyrosinfreien Mutterlaugen und Sättigen mit Salzsäuregas wurde verzichtet, vielmehr sofort nach E. Fischer zweimal verestert, die Ester in der üblichen Weise in Freiheit gesetzt und im Vakuum destilliert. Da bis 80° nichts überging, wurden die Fraktionen bis 100°, von 100 bis 125° und von 125 bis 170° getrennt aufgefangen, beim Pepton, wo die Menge der Ester sehr gering war, nur die Fraktionen bis 100° und von 100° aufwärts. In dem von den Estern abdestillierten Äther war immer eine kleine Menge Glykokoll nachzuweisen. Die Fraktion bis 100°

wurde durch Kochen mit Wasser verseift, aus den beiden höheren der Phenylalaninester durch Ausschütteln mit Petroläther und Wasser abgetrennt und der wässrige Anteil mit Baryt verseift. Über die Bestimmung des Prolins, das auch immer in der zweiten Fraktion gefunden wurde, ist nichts besonderes zu bemerken. Die Lösung des Phenylalaninesters in Petroläther wurde mit konzentrierter HCl eingedampft, in Wasser gelöst, mit Ag_2O entchlort, durch H_2S von einem kleinen Überschuß des letzteren befreit, das kolloidale Ag_2S durch Eindampfen zur Trockne unlöslich gemacht, filtriert und das Phenylalanin durch Krystallisieren aus Wasser gereinigt. Es hatte den Schmelzpunkt ungefähr bei 275° . Wenn eine größere Menge des Chlorhydrates vorhanden war, wurde dasselbe auch durch konzentrierte HCl umkrystallisiert und dann die Krystallisation sowie die Mutterlauge getrennt verarbeitet. Auf die Bestimmung der Asparaginsäure wurde verzichtet. Aus der höchsten Esterfraktion wurde nach dem Verseifen mit Baryt, Ausfällen desselben mit H_2SO_4 , Eindampfen des Filtrats und Wägen des Rückstandes (eventuell auch nach Extraktion des Prolins mit absolutem Alkohol) das Glutaminsäurechlorhydrat in bekannter Weise gewonnen, desgleichen aus dem bis 170° nicht flüchtigen Anteile der Ester. Das so gewonnene rohe Chlorhydrat wurde in 10 bis 20 cm^3 Wasser gelöst und nochmals durch HCl ausgefällt.

Resultate der Analysen.

Globulin.

Um vergleichbare Resultate zu erhalten, wurde auch das Globulin selbst auf die vorhin beschriebene Weise analysiert und es wurden für die einzelnen Aminosäuren Werte gefunden, die im allgemeinen mit den Literaturangaben gut übereinstimmen.

Nachstehend die Analysenzahlen für das Serumglobulin. Das Gewicht der zur Analyse eingewogenen Substanz ist hier wie bei den Spaltungsprodukten nach den Resultaten einer Trockenbestimmung bei 120° auf trockene Substanz umgerechnet worden.

In 44·7 g trockenem und fettfreiem Globulin:

Histidindichlorid	1·13 g
Argininmononitrat	1·80
entsprechend 37·5 cm^3 $1/5$ n. HNO_3	
Lysinpicrat	4·92
Tyrosin	1·36
Prolin	1·35
Phenylalanin	1·62
Glutaminsäurechlorhydrat (Zers. P. = 193°) . . .	2·48
Aminosäuren	8·26

Globulin-Protalbinsäure.

Hydrolysiert wurden 27·9 g trockene Substanz. Die Analyse wurde hier in gleicher Weise durchgeführt wie beim Globulin, nur wurden durch ein Versehen die beiden höchsten Esterfraktionen vor der Ausätherung des Phenylalaninesters verseift. Die aus ihnen erhaltenen Aminosäuren wurden daher nach Entfernung des Prolins wieder verestert, die Lösung der Esterchlorhydrate in möglichst wenig kaltem Wasser mit überschüssigem festen Bariumhydroxyd versetzt und sofort mit Petroläther ausgeschüttelt, aus dem dann das Phenylalanin in der gewöhnlichen Weise gewonnen wurde.

In 27·9 g trockener Protalbinsäure:

Histidindichlorid	0·60 g
Argininmononitrat	0·0
Lysinpicrat	2·82
Tyrosin	1·22
Prolin	0·91
Phenylalanin	0·29
Glutaminsäurechlorhydrat	—
Aminosäuren	5·70

Globulin-Lysalbinsäure.

Die Hexonbasen wurden hier mit Phosphorwolframsäure ausgefällt, der Niederschlag in gewohnter Weise zersetzt und analysiert und die Mutterlauge der zweiten (Lysin-) Phosphorwolframatfällung mit der ersten vereinigt.

In 33·3 g trockener Lysalbinsäure:

Histidindichlorid	0·85 g
Argininmononitrat	0·0
Lysinpicrat	3·79
Tyrosin	0·84
Prolin	0·97
Phenylalanin	0·91
Glutaminsäurechlorhydrat	0·77
Amidosäuren	7·06

Globulin-Pepton.

Hier gilt für die Abscheidung der Hexonbasen das gleiche wie für die Lysalbinsäure. Von Glutaminsäurechlorhydrat konnte auch im Esterrückstand keine Spur erhalten werden; nach längerem Stehen im Eisschrank war nur zu bemerken, daß das eingepföte Chlorhydrat sich aufgelöst hatte.

In 18·3 g trockenem Pepton:

Histidindichlorid	0·40 g
Argininmononitrat	0·0
Lysinpicrat	2·06
Tyrosin	0·22
Prolin	0·43
Phenylalanin	0·32
Glutaminsäurechlorhydrat	0·00
Aminosäuren	2·47

Farbreaktionen.

Um zur Anstellung der Farbreaktionen geeignete Lösungen zu erhalten, wurden von den drei Spaltungsprodukten je 1·08 g (auf feuchte Substanz umgerechnet) abgewogen und in Wasser und je 2 cm^3 10prozentiger Kalilauge auf 25 cm^3 Volum gelöst. Für die Reaktionen wurden immer gleiche Volumina dieser Lösungen sowie der Reagenzien verwendet.

Die α -Naphthol- und die Thymolreaktion wurden in verschiedenen Verhältnissen von Lösung, Reagens und konzentrierter H_2SO_4 ausgeführt, doch immer zeigte sich die gleiche Abstufung der Farben.

	Globulin	Protalbumin- säure	Lysalbumin- säure	Pepton
Biuretreaktion: 1 cm^3 Lösung, 1 cm^3 10 pro- zentiger KOH	blauviolett	rotviolett	rotviolett	rotviolett
Millon'sche Reaktion: 2 cm^3 Lösung, 1 cm^3 Reagens	stark	stark	stark	weniger stark
α -Naphtholreaktion: $\frac{1}{2}\text{ cm}^3$ Lösung, 1 cm^3 H_2O , 5 Tropfen 10 pro- zentige α -Naphthol- lösung, dann $2\frac{1}{2}\text{ cm}^3$ konz. H_2SO_4	stark braunviolett	sehr schwache Gelb- färbung	braunviolett (etwas mehr braun und schwächer als im Globulin)	sehr stark blauviolett
Thymolreaktion: $\frac{1}{2}\text{ cm}^3$ Lösung, $1\text{ cm}^3\text{ H}_2\text{O}$, 5 Tropfen 10 prozentige Thymollösung, dann $2\frac{1}{2}\text{ cm}^3$ konz. H_2SO_4	rot	schwach gelb	rot (etwas schwächer als im Globulin)	purpurrot, äußerst intensiv
Tryptophanreaktion: 1 cm^3 Lösung, 3 Tropfen Glyoxylsäurelösung, dann 2 cm^3 konz. H_2SO_4	violett	violett	bräunlich- violett	braun
Reaktion mit alkalischer Bleilösung	starker schwarzer Nieder- schlag	sehr schwache Braun- färbung	keine Färbung	keine Färbung
Liebermann'sche Reaktion: Ungefähr gleiche Mengen fester Substanz mit konz. HCl auf dem Wasserbad erwärmt	dunkel- violett	dunkel- violett	dunkel- violett	dunkel- violett