

HOPPE-SEYLER/THIERFELDER

HANDBUCH  
DER  
PHYSIOLOGISCH- UND PATHOLOGISCH-  
CHEMISCHEN ANALYSE  
FÜR ÄRZTE UND STUDIERENDE

BEARBEITET VON

P. BRIGL-TÜBINGEN · S. EDLBACHER-HEIDELBERG  
K. FELIX-HEIDELBERG · R. E. GROSS-HEIDELBERG  
G. HOPPE-SEYLER-KIEL · H. STEUDEL-BERLIN  
H. THIERFELDER-TÜBINGEN · K. THOMAS-LEIPZIG  
F. WREDE-GREIFSWALD

HERAUSGEGEBEN VON

DR. H. THIERFELDER

PROFESSOR DER PHYSIOLOGISCHEN CHEMIE  
AN DER UNIVERSITÄT TÜBINGEN

NEUNTE AUFLAGE

MIT 39 ABBILDUNGEN UND 1 SPEKTRALTAFEL



1924

VERLAG VON JULIUS SPRINGER IN BERLIN

**ALLE RECHTE, INSBESONDERE DAS DER ÜBERSETZUNG IN FREMDE  
SPRACHEN, VORBEHALTEN.  
COPYRIGHT 1924 BY JULIUS SPRINGER IN BERLIN.**

Softcover reprint of the hardcover 9th edition 1924

ISBN-13: 978-3-642-89135-9 e-ISBN-13: 978-3-642-90991-7  
DOI: 10.1007/978-3-642-90991-7



ALBRECHT KOSSEL  
IN HEIDELBERG  
ZUGEEIGNET

## Vorwort zur 9. Auflage.

Die schon vor Jahren an mich ergangene Aufforderung des Verlages, das zuletzt 1909 erschienene Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse von Felix Hoppe - Seyler in neuer Bearbeitung herauszugeben, glaubte ich im Hinblick auf das in den Jahren 1910 bis 1919 erschienene Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden von Emil Abderhalden ablehnen zu sollen. Nachdem nun aber dieses Werk in seiner neuen Auflage unter dem Namen Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden eine ganz außerordentliche Vermehrung und Erweiterung seines Inhalts und seiner Bändezahl erfahren hat, schien mir das Bedürfnis nach einem kürzeren Buche wieder vorzuliegen. So habe ich mich, als der Verlag vor etwa 2 Jahren seine Aufforderung wiederholte, entschlossen, eine neue Auflage zu besorgen, nachdem einige Fachgenossen ihre Mithilfe zugesagt hatten.

Wenn auch in den Überschriften der nicht von mir behandelten Abschnitte der Bearbeiter genannt ist, so erscheint es doch richtig, an dieser Stelle eine Übersicht darüber zu geben, welche Kapitel von den Mitarbeitern herrühren und wie sie sich auf die einzelnen verteilen.

Es sind bearbeitet von:

**P. Brigl:**

Pyrrolderivate S. 270—277 (§§ 187—197) — Tierfarbstoffe S. 397—445 (§§ 285—322) — Blutfarbstoffe und ihre nächsten Derivate S. 519—533 (§§ 424—435) — Tierfermente S. 600 bis 648 (§§ 501—523);

**S. Edlbacher:**

Die wichtigsten Mikromethoden zur Untersuchung von Blutplasma und Serum S. 825—850 (§§ 688—708);

**K. Felix und R. E. Groß:**

Untersuchung des Harns S. 677—768 (§§ 560—629);

**G. Hoppe - Seyler:**

Untersuchung der Sekrete (Speichel, Tränen, Sputa, Magensaft und Mageninhalt, Pankreassaft, Darmsaft, Galle, Schweiß) S. 893—918 (§§ 763—801) — Untersuchung des Darminhaltes S. 932—944 (§§ 817—831);

**H. Steudel:**

Chondroitin- und Mucoitinschwefelsäure S. 356—358 (§§ 257—258) — Nucleinsäuren S. 375 bis 390 (§§ 271—281) — Nucleoproteide, Phosphorproteide, Glucoproteide S. 533—559 (§§ 436 bis 474) — Bestimmung der beim Kochen mit verdünnten Säuren aus Organen erhaltenen Nucleinbasen S. 875—876 (§ 741);

**K. Thomas:**

Proteine S. 445—518 (§§ 323—423) — Isolierung von Monamino- und Hexonbasen aus der hydrolytischen Zersetzungsflüssigkeit der Proteinstoffe, Isolierung einzelner Aminosäuren, Analytische Bestimmung einzelner reaktiver Gruppen und Bausteine von Eiweiß, Colorimetrische und titrimetrische Bestimmung einzelner Aminosäuren, Gehalt einiger Proteine an Mono- und Diaminosäuren S. 560—599 (§§ 475—500) — Untersuchung von serösen Flüssigkeiten, Cystenflüssigkeiten, Synovia usw. S. 768—797 (§§ 630—663) — Untersuchung des Blutes S. 797—825 (§§ 664—687);

**F. Wrede:**

Tierische Basen S. 187—218 (§§ 147—165) — Sterine, Gallensäuren, gepaarte Schwefel- und Glucuronsäuren S. 323—356 (§§ 232—256).

Ich möchte auch hier den Herren Mitarbeitern besten Dank sagen, ebenso Herrn Kollegen Gulewitsch in Moskau, welcher mir seine neuen Erfahrungen über die von ihm herrührende Methode der Isolierung von Carnosin, Methylguanidin und Carnitin aus Muskeln (§ 722) zur Verfügung gestellt hat.

Neu aufgenommen sind in diese Auflage die Methoden der Colorimetrie, Nephelometrie und Refraktometrie sowie ein Abschnitt über die wichtigsten Mikromethoden zur Untersuchung von Blut, Plasma und Serum. Im übrigen ist die Umgrenzung des Stoffes die gleiche geblieben, die Gruppierung hat an manchen Stellen eine erhebliche Veränderung erfahren.

Die vorliegende Auflage erscheint im Verlage von Julius Springer in Berlin, in dessen Besitz die Hirschwaldsche Buchhandlung, welche alle früheren Auflagen herausgebracht hat, übergegangen ist. Ich gedenke bei dieser Gelegenheit dankbar des lebhaften Interesses, das die Hirschwaldsche Buchhandlung, insbesondere die Herren Eduard und Albert Aber, durch einen Zeitraum von über 60 Jahren dem Buche entgegengebracht hat, und freue mich, das gleiche verständnisvolle Entgegenkommen für alle meine Wünsche auch bei dem neuen Verlage gefunden zu haben.

Schließlich ist es mir ein lebhaftes Bedürfnis, meinem Mitarbeiter am physiologisch-chemischen Institut, Herrn Prof. Dr. Brigl, herzlich zu danken für seine wertvollen Ratschläge und die große Hilfe, die er mir bei der Durchsicht der Korrekturbogen geleistet hat.

Tübingen, 27. Juli 1924.

H. Thierfelder.

## Aus dem Vorwort zur 7. Auflage.

Die erste Auflage des Handbuches der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse ließ F. Hoppe - Seyler im Jahre 1858 erscheinen. Es war ein kleines Buch in Taschenformat vom kaum 300 Seiten. Die weiteren Auflagen folgten in den Jahren 1865, 1870, 1875, 1883 und 1893, jede neue die vorangehende an Inhalt und Umfang übertreffend.

Wohl wissend, daß der Fortschritt der Wissenschaft in erster Linie auf zuverlässigen und genauen Arbeitsmethoden beruht, hat Hoppe - Seyler der Ausbildung und Verbesserung dieser Methoden stets sein besonderes Interesse zugewendet. Eine große Anzahl von Untersuchungsverfahren sind von ihm ausgearbeitet worden, die von anderen empfohlenen hat er kritisch geprüft. Jede neue Auflage seines Handbuches brachte das von ihm auf Grund sorgfältiger experimenteller Untersuchung zur Zeit als das beste Erkannte. So bietet das Buch in seinen einzelnen Auflagen ein Bild der Entwicklung der physiologisch-chemischen Methodik während eines Menschenalters.

Zwei Generationen haben an der Hand des Hoppe - Seylerschen Buches physiologisch-chemisch arbeiten gelernt, für viele ist es ein sicherer Ratgeber bei eigenen Untersuchungen gewesen. Indem es so belehrend und fördernd wirkte, hat es nicht nur der Verbreitung wissenschaftlicher Kenntnisse, sondern auch in reichem Maße dem Fortschritt der Wissenschaft selbst gedient.

Als nach dem Tode von F. Hoppe - Seyler das Werk nahezu vergriffen war, forderte die Verlagsbuchhandlung mich auf, eine Neubearbeitung zu übernehmen. Sie wandte sich an mich, weil ich schon bei der Herausgabe der letzten Auflage beteiligt war. Im Einverständnis mit der Familie Hoppe - Seyler habe ich der Aufforderung Folge geleistet. Was mich bestimmte, eine so große und verantwortungsvolle Aufgabe zu übernehmen, war einmal der begreifliche Wunsch, den Namen Hoppe - Seylers auch durch dieses Werk lebendig zu erhalten, und dann die Befürchtung, daß mit dem Verschwinden des Handbuches aus dem Buchhandel eine Summe von Erfahrungen und Beobachtungen, die von dem großen Forscher während eines langen Lebens gesammelt und zum Teil nur an dieser Stelle veröffentlicht worden waren, für die Wissenschaft verlorengehen könne.

Die Erinnerung an Felix Hoppe - Seyler hat mich bei der Arbeit begleitet. Möchte es mir gelungen sein, diese Arbeit im Sinne meines Lehrers und väterlichen Freundes ausgeführt zu haben.

Berlin, Oktober 1902.

**H. Thierfelder.**

# Inhaltsübersicht.

## Erste Abteilung.

### Wichtigere chemische und physikalische Methoden.

- |   |   |
|---|---|
| <p><b>Allgemeine chemische Operationen.</b><br/>Kochen und Abdampfen von Flüssigkeiten (§ 2).<br/>Trennungsmethoden (§§ 3—7).<br/>  Destillieren (§ 3) — Extrahieren (§ 4) —<br/>  Dialysieren (§ 5) — Zentrifugieren (§ 6) —<br/>  Filtrieren (§ 7).<br/>Auswaschen der Niederschläge (§ 8).<br/>Trocknen (§ 9).<br/>Glühen (§ 10).</p> <p><b>Quantitative Methoden.</b><br/>Über Gewichtsanalyse (§§ 11 u. 12).<br/>Über Maßanalyse (§§ 13—20).<br/>  Acidimetrie und Alkalimetrie (§§ 15—17) —<br/>  Fällungsanalysen (§ 18) — Oxydimetrie mit-<br/>  tels Permanganat (§ 19) — Jodometrie (§ 20).</p> <p><b>Einige physikalische Methoden.</b><br/>Untersuchung von Krystallen (§ 21).<br/>Bestimmung d. spez. Gewichtes (§§ 22 u. 23).</p> | <p>Bestimmung des Schmelz-, Koagulations-<br/>und Siedepunkts (§ 24).<br/>Bestimmung der Löslichkeit (§ 25).</p> <p><b>Optische Methoden.</b><br/>Spektraluntersuchungen (§§ 26—28).<br/>  Spektralapparate (§ 26) — Untersuchung der<br/>  Aschen (§ 27) — Untersuchung von Farb-<br/>  stoffen (§ 28).<br/>Colorimetrie (§ 29).<br/>Nephelometrie (§ 30).<br/>Untersuchung der Zirkumpolarisation<br/>  (§§ 31—34).<br/>  Allgemeines (§ 31) — Polaristrobometer nach<br/>  Wild (§ 32) — Bestimmung der spezifischen<br/>  Drehung (§ 32) — Bestimmung des Gehaltes<br/>  der Flüssigkeit an aktiver Substanz (§ 32) —<br/>  Halbschattenapparat nach Lippich-Landolt<br/>  (§ 33) — Saccharimeter nach Schmidt-<br/>  Haensch (§ 34).<br/>Refraktometrie (§ 35).<br/>Untersuchung der Fluorescenz (§ 36).</p> |
|---|---|

## Zweite Abteilung.

### Vorkommen, Darstellung, Eigenschaften und Nachweis der bis jetzt aus dem Tierkörper gewonnenen Stoffe.

- |   |   |
|---|---|
| <p><b>Anorganische Stoffe.</b><br/>Allgemeines.<br/>Alkalimetalle (§§ 37 u. 38).<br/>  Kalium (§ 37) — Natrium, Lithium (§ 38).<br/>Erdalkalimetalle, Magnesium, Zink (§§ 39<br/>  bis 41).<br/>  Calcium (§ 39) — Magnesium (§ 40) — Zink<br/>  (§ 41).<br/>Schwermetalle (§§ 42—44).<br/>  Eisen, Mangan (§ 42) — Kupfer (§ 43) —<br/>  Blei (§ 44).<br/>Vanadin, Arsen (§ 44).</p> | <p>Säuren (§§ 45—50).<br/>  Chlorwasserstoff, Jodwasserstoff, Bromwasser-<br/>  stoff (§ 45) — Fluorwasserstoff (§ 46) —<br/>  Schwefelwasserstoff (§ 47) — Schwefelsäure,<br/>  unterschweflige Säure (§ 48) — Phosphor-<br/>  säure, Pyrophosphorsäure, Borsäure (§ 49) —<br/>  Kieselsäure (§ 50).<br/>Ammoniak (§ 51).</p> <p><b>Organische Stoffe.</b><br/>Allgemeines (§§ 52—57).<br/>  Untersuchung auf Stickstoff (§ 52) — auf<br/>  Schwefel (§ 53) — auf Phosphor (§ 54) —<br/>  auf Eisen (§ 55) — auf Halogene (§ 56) — auf<br/>  Jod (§ 57).</p> |
|---|---|

**Alkohole (§§ 58 u. 59).**

Äthylalkohol, Cetylalkohol, Oktadekylalkohol, Eikosylalkohol, Carnaubyl-, Ceryl-, Myricylalkohol, Psyllaalkohol, Oleinalkohol (§ 58) — Glycerin, Batylalkohol, Selachylalkohol (§ 59).

**Thioalkohole und Thioäther (§§ 60 u. 61).**

Methylmercaptan, Butylmercaptan (§ 60) — Äthylsulfid (§ 61).

**Aldehyde und Ketone (§§ 62 u. 63).**

Acetaldehyd (§ 62) — Aceton (§ 63).

**Einbasische gesättigte und ungesättigte Fettsäuren (§§ 64—81).**

Spezifische Gewichte, Siedepunkte, Schmelzpunkte (§ 64).

Säuren der Reihe  $C_nH_{2n}O_2$ :

Ameisensäure (§ 65) — Essigsäure (§ 66) — Propionsäure (§ 67) — Buttersäuren (§ 68) — Valeriansäuren (§ 69) — Capronsäuren (§ 70) — Caprylsäure (§ 71) — Caprinsäure (§ 72) — Laurinsäure, Myristinsäure (§ 73) — Palmitinsäure, Stearinsäure, Heptadekansäure, Arachinsäure (§ 74) — Lignocerinsäure, Carnaubasäure, Hyacinasäure, Cerotinsäure, Psyllostearylsäure (§ 75).

Säuren der Reihe  $C_nH_{2n-2}O_2$ :

Säure  $C_{14}H_{26}O_2$ , Säure  $C_{16}H_{30}O_2$ , Oleinsäure, Gadoleinsäure, Erucasäure (§ 76).

Säuren der Reihen  $C_nH_{2n-4}O_2$  usw. bis  $C_nH_{2n-10}O_2$ :

Linolsäure (§ 77) — Linolensäuren, Clupanodonsäure (§ 78) — Arachidonsäure u. a. (§ 79).

Abscheidung und Trennung der niederen Fettsäuren bis zur Caprinsäure (§ 80).

Abscheidung und Trennung der höheren Fettsäuren:

Trennung der gesättigten und ungesättigten Säuren — Trennung der gesättigten Säuren voneinander, Trennung der ungesättigten Säuren voneinander (§ 81).

**Oxyfettsäuren (§§ 82—84).**

Milchsäure (§ 82) — Oxybuttersäure, Lanopalminsäure u. a. (§ 83) — Cerebronsäure, Lanocerinsäure (§ 84).

**Ketofettsäuren (§§ 85—87).**

Brenztraubensäure (§ 85) — Acetessigsäure (§ 86) — Lävulinsäure (§ 87).

**Mehrbasische Säuren der Fettreihe (§§ 88 bis 90).**

Oxalsäure (§ 88) — Bernsteinsäure, Fumarsäure, Glutarsäure (§ 89) — Citronensäure (§ 90).

**Fette (§§ 91—95).**

Allgemeines, Isolierung, Eigenschaften (§ 91) — Isolierung einzelner Glyceride aus Fett, Palmitin, Stearin, Olein u. a. (§ 92) — Ermittlung der Säurezahl und anderer „Zahlen“ (§ 93) — Verseifung des Fettes und Isolierung der Spaltungsprodukte (§ 94) — Bestimmung des Glycerins im Fett (§ 95).

**Tierische Wachse (§ 96).****Kohlenhydrate (§§ 97—116).**

Reaktionen, Nachweise (§§ 97—101).

**Pentosen:**

Arabinose (§ 102) — Ribose (§ 103) — Xylose, Rhamnose (§ 104).

**Hexosen:**

Glucose (§ 105) — Fructose (§ 106) — Galaktose (§ 107).

Disaccharide  $C_{12}H_{22}O_{11}$ :

Saccharose, Maltose (§ 108) — Isomaltose (§ 109) — Lactose (§ 110).

Polysaccharide  $(C_6H_{10}O_5)_n$ :

Amylum (§ 111) — Glykogen (§ 112) — Dextrine, Polyamylosen, tierisches Dextran, tierisches Sinistrin, Cellulose (§ 113).

Glucuronsäure (§ 114).

**Hexosamine:**

Glucosamin, Galaktosamin (§ 115) — Chondrosamin (§ 116).

**Chitin, Chitosan, Lycoperdin (§§ 117 bis 119).****Tierisches Gummi und Hyaloidine (§§ 120 u. 121).****Rhodanwasserstoff (§ 122).****Kohlensäure und Kohlensäurederivate (§§ 123—130).**

Kohlendioxyd (§ 123) — Carbaminsäure (§ 124) — Harnstoff (§ 125) — Oxalursäure (§ 126) — Allantoin (§ 127) — Guanidin (§ 128) — Kreatin (§ 129) — Kreatinin (§ 130).

**Pyrimidinderivate (§§ 131—134).**

Allgemeines (§ 131) — Thymin (§ 132) — Cytosin (§ 133) — Uracil, Orotsäure (§ 134).

**Purinderivate (§§ 135—146).**

Harnsäure (§ 135).

Nucleinbasen (Purinbasen):

Allgemeines (§ 136) — Xanthin (§ 137) — Guanin (§ 138) — Hypoxanthin (§ 139) — Adenin (§ 140).

Methyl-derivate des Xanthins und Guanins:

Methylxanthin (§ 141) — Heteroxanthin (§ 142) — Paraxanthin (§ 143) — Epiguanin, Episarkin (§ 144).

Carnin (§ 145).

Darstellung von Purinbasen aus Harn (§ 146).

**Tierische Basen (§§ 146—165).**

Allgemeines (§ 146).

Alkylamine:

Methylamin, Dimethylamin, Trimethylamin, Trimethylaminoxid, Diäthylamin usw. (§ 147) — Aminoäthylalkohol, Äthanolmethylamin (§ 148) —  $\beta$ -Aminopropionsäure,  $\gamma$ -Aminobuttersäure,  $\delta$ -Aminovaleriansäure (§ 149) — Sphingosin (§ 150).

Derivate des Ammoniumhydroxyds:

Tetramin, Cholin, Neurin, Muscarin (§ 151) — Betain, Homobetain, Butyrobetain, Carnitin, Oblitin, Myokynin (§ 152).

Diamine:

Putrescin, Cadaverin, Hexamethyldiamin (§ 153).

- Guanidinderivate:**  
Methylguanidin, Dimethylguanidin, Agmatin, Vitiatin, Methylguanidinpropylamin, sym. Dimethylguanidin (§ 154) — Darstellung und Trennung der Guanidinbasen (§ 155).
- Aromatische und heterocyclische Amine:**  
Phenyläthylamin, Tyramin (§ 156) — Adrenalin (§ 157) — Darstellung und Nachweis der Phenylalkylamine (§ 158) — Histamin (§ 159) — Carnosin (§ 160) — Darstellung, Trennung und Nachweis der Imidazolderivate (§ 161) — Picolin, Methylpyridiniumhydroxyd (§ 162) — Indoläthylamin, Methylechinolin (§ 163).
- Basen mit unbekannter Konstitution (§ 164).**
- Allgemeine Methodik zur Isolierung von Basen (§ 165).**
- $\alpha$ -Aminosäuren (§§ 166—184).**
- Allgemeines (§ 166).**
- Monamminosäuren:**  
Glykokoll (§ 167) — Alanin (§ 168) — Serin (§ 169) — Aminobuttersäure (§ 170) — Valin (§ 171) — Leucin, Leucinimid (§ 172) — Isoleucin (§ 173) — Norleucin (§ 174) — Asparaginsäure (§ 175) — Glutaminsäure (§ 176) — Oxyglutaminsäure (§ 177) — Glutamin (§ 178) — Säure  $C_{12}H_{26}N_2O_5$ , Tetraoxyaminocapronsäure, andere Oxysäuren (§ 178).
- Schwefelhaltige Aminosäuren:**  
Taurin, Taurocarbaminsäure (§ 179) — Cystein (§ 180) — Cystin, Aminosäure  $C_5H_{11}SNO_2$  (§ 181).
- Diaminosäuren:**  
Säure  $C_2H_6N_2O_2$ , Ornithin (§ 182) — Arginin (§ 183) — Lysin (§ 184).
- Imidazolderivate (§§ 185 u. 186).**  
Histidin (§ 185) — Urocaninsäure (§ 186).
- Pyrrolderivate (§§ 187—197).**  
Imid der dreibasischen Hämatinsäure (§ 187) — Imid der zweibasischen Hämatinsäure (§ 188) — Anhydrid der dreibasischen Hämatinsäure (§ 189).
- Hämopyrrole und Hämopyrrolcarbonsäuren:**  
Allgemeines (§ 190) — Hämopyrrol (§ 191) — Kryptopyrrol (§ 192) — Phyllopyrrol (§ 193) — Methyläthylpyrrol (§ 194) — Phonopyrrolcarbonsäure, Isophonopyrrolcarbonsäure (§ 195) — Phyllopyrrolcarbonsäure (§ 196) — Chitopyrrol (§ 197).
- Pyrrolidinderivate (§§ 198 u. 199).**  
Prolin (§ 198) — Oxyprolin (§ 199).
- Benzolderivate (§§ 200—218).**
- Phenole:**  
Phenol und Kresole (§ 200) — Brenzcatechin (§ 201) — Hydrochinon (§ 202) — Inosit (§ 203) — Scyllit, Mytilit (§ 204).
- Aromatische Säuren:**  
Benzoessäure (§ 205) — Hippursäure (§ 206) — Ornithursäure (§ 207) — Phenyllessigsäure, Phenylpropionsäure (§ 208) — Phenacetursäure (§ 209) — Phenylalanin (§ 210) — Oxyphenyllessigsäure (§ 211) — Hydroparacumarsäure, Oxyphenylmilchsäure (§ 212) — Tyrosin (§ 213) — Jodgorgosäure (§ 214) — Bromgorgosäure (§ 215) — Homogentisinsäure, Uro-leucinsäure (§ 216) — Dioxyphenylalanin (§ 217) — Gallussäure (§ 218).
- Indol und Indolderivate (§§ 219—229).**  
Indol (§ 219) — Skatol (§ 220) — Indoxyl (§ 221) — Indoleessigsäure (§ 222) — Indolpropionsäure (§ 223) — Thyroxin (§ 224) — Tryptophan (§ 225) — Oxytryptophan (§ 226) — Indigblau (§ 227) — Indirubin (§ 228) — Isolierung von Fäulnisprodukten (§ 229).
- Chinolinderivate (§ 230).**  
Kynurensäure (§ 230).
- Spinacen, Squalen (§ 231).**
- Sterine (§§ 232—236).**  
Cholesterin (§ 232) — Cholesterinester (§ 233) — Oxycholesterin, Metacholesterin (§ 234) — Koprosterin, Hippokoprosterin (§ 235) — Isocholesterin, Spongosterin u. a. (§ 236).
- Gallensäuren (§§ 237—240).**  
Cholsäure (§ 237) — Desoxycholsäure (§ 238) — Lithocholsäure (§ 239) — Phocaecholalsäuren, Hyocholsäuren, Chenocholsäure, Ursocholsäure, Lithofellinsäure, Lithobilinsäure, Fellinsäure (§ 240).
- Scymnole (§ 241).**
- Bufotalin, Bufotalidin, Bufagin (§ 242).**
- Gepaarte Gallensäuren (§§ 243—248).**
- Glykokollderivate:**  
Glykocholsäure, Paraglykocholsäure (§ 243) — Glykocholeinsäure, Hyoglykocholsäuren (§ 244).
- Taurinderivate:**  
Taurcholsäure (§ 245) — Isolierung von Gallensäuren (§ 246) — Taurocholeinsäure, Taurochenocholsäure, Phocaetaurocholsäuren (§ 247).
- Schwefelsäurederivate:**  
Scymnolschwefelsäuren (§ 248).
- Gepaarte Schwefelsäuren (§§ 249—253).**  
Allgemeines (§ 249) — Phenolschwefelsäure (§ 250) — Kresolschwefelsäuren (§ 251) — Brenzcatechinschwefelsäuren, Hydrochinonschwefelsäure (§ 252) — Indoxylschwefelsäure, Skatoxylschwefelsäure (§ 253).
- Gepaarte Glucuronsäuren (§§ 254—256).**  
Allgemeines (§ 254) — Phenolglucuronsäure, Euxanthinsäure (§ 255) — Mentholglucuronsäure, Campher-glucuronsäure, Urochloralsäure, Benzoessäureglucuronsäure, Dimethylaminobenzoessäureglucuronsäure (§ 256).
- Chondroitin- und Mucoitinschwefelsäure (§§ 257 u. 258).**
- Lactacidogen (§ 259).**
- Glycerinphosphorsäure (§ 260).**
- Phosphatide (§§ 261—269).**
- Allgemeines (§ 261).**
- Monaminomonophosphatide:**  
Allgemeines (§ 262) — Darstellung von Lecithinen und Kephallinen (§ 263) — Lecithine (§ 264) — Kephaline (§ 265).
- Diaminomonophosphatide:**  
Sphingomyelin (§ 266).

- Weitere Phosphatide (§ 267).  
 Phosphorsulfatide und Sulfatide (§ 268).  
 Jecorin (§ 269).  
 Phosphatide aus Pflanzen (§ 269).  
 Protagon (§ 270).  
 Nucleinsäuren (§§ 271—281).  
 Allgemeines (§ 271).  
 Einfache Nucleinsäuren:  
 Inosinsäure (§ 272) — Guanylsäure (§ 273).  
 Zusammengesetzte Nucleinsäuren:  
 Thymonucleinsäure (§ 274) — Thymosinsäure (§ 275) — Isolierung der Purin- und Pyrimidinkörper aus der Thymonucleinsäure (§ 276) — Hefenucleinsäure (§ 277—280).  
 Gekoppelte Nucleinsäuren (§ 281).  
 Cerebroside (§§ 282—284).  
 Cerebron (§§ 282 u. 283) — Kerasin (§ 284).  
 Tierfarbstoffe (§§ 285—322).  
 Farbstoffgruppen der Blutfarbstoffe:  
 Hämochromogen (§ 285) — Hämatin (§ 286) — Hämin (§ 287) — Hämatoporphyrin (§ 288) — Leukobase des Hämatoporphyrins (§ 289) — Mesoporphyrin (§ 290) — Hämaporphyrin (§ 291) — Ätioporphyrin (§ 292) — Uroporphyrin (§ 293) — Koproporphyrin (§ 294).  
 Gallenfarbstoffe:  
 Bilirubin (§ 295) — Bilirubinsäure, Mesobilirubin (§ 296) — Mesobilirubinogen (§ 297) — Biliverdin (§ 298) — Gallenfarbstoffen nahestehende Farbstoffe (§ 299) — Phylloerythrin (§ 300).  
 Harnfarbstoffe:  
 Urochrom (§ 301) — Urochromogen (§ 302) — Urobilin (§ 303) — Uroerythrin (§ 304) — Urorosein (§ 305) — Nephrorosein (§ 306) — Skatolrot (§ 307).  
 Braune und schwarze Pigmente:  
 Melanine (§ 308) — Melanoidine (§ 309) — Anorganische Ablagerungen (§ 318).  
 Lipochrome:  
 Allgemeines (§ 311) — Lutein aus Eigelb (§ 312) — Carotin (§ 313) — Tetronerythrin, Crustaceorubin (§ 314).  
 Andere Farbstoffe:  
 Schneckenpurpur (§ 315) — Antiker Purpur (§ 316) — Farbstoffe der Schildläuse (§ 317) — Carminsäure (§ 318) — Kermessäure, Laccainsäure (§ 319) — Schpurpur (§ 320) — Turacin (§ 321) — Pyocyanin (§ 322).  
 Eigentliche Eiweißstoffe (§§ 323—372).  
 Albumine und Globuline:  
 Zersetzungen (§ 324) — Reaktionen (§ 325) — Abscheidung aus Flüssigkeiten (§ 326) — Allgemeines über Albumine (§ 327) — Serumalbumin (§ 328) — Ovalbumin (§ 329) — Conalbumin (§ 330) — Lactalbumin (§ 331) — Myogen (§ 332) — Allgemeines über Globuline (§ 333) — Myosin (§ 334) — Fibrinogen (§ 335) — Fibringlobulin (§ 336) — Serumglobulin, Glutolin (§ 337) — Percaglobulin (§ 338) — Ovoglobulin, Lactoglobulin (§ 339) — Krystallisierendes Globulins aus Harn (§ 340) — Globuline der Krystallinse (§ 341) — Thyreoglobulin (§ 342) — Eiweißkörper von Bence Jones (§ 343).  
 Koagulierte Eiweißstoffe:  
 Fibrin (§ 344) — Andere koagulierte Eiweißstoffe (§ 345).  
 Prolamine (§ 346).  
 Histone:  
 Allgemeines (§ 347) — Histon aus Vogelblutkörperchen (§ 348) — Histon aus Nucleohiston (§ 349) — Gadushiston (§ 350) — Lotahiston (§ 351) — Centrophorushiston (§ 352) — Scomberhiston, Weitere Histone (§ 353) — Histozepton (§ 354).  
 Globin, Arbacin, Parahiston (§§ 355 bis 357).  
 Protamine:  
 Allgemeines (§§ 358 u. 359) — Salmin (§ 360) — Percin (§ 361) — Esocin (§ 362) — Coregonin (§ 363) — Salvelin (§ 364) — Clupein (§ 365) — Scombrien (§ 366) — Thynnin (§ 367) — Cyprinin (§ 368) — Crenilabrin (§ 369) — Cyclopterin (§ 370) — Sturin (§ 371) — Protone (§ 372).  
 Albuminoide (§§ 373—391).  
 Allgemeines (§ 373) — Keratine (§ 374) — Neurokeratin (§ 375) — Substanz der Hühnerhäute (§ 376) — Koilin (§ 377) — Elastin, Ichthylepidin (§ 378) — Kollagen und Glutin, Reticulin (§ 379) — Chondrin (§ 380) — Albumoid der Linse (§ 381) — Albumoid des Knorpels (§ 382) — Albumoid des Knochens (§ 383) — Tierische Membranine (§ 384) — Fibroin (§ 385) — Spinnenseide (§ 386) — Byssus (§ 387) — Sericin (§ 388) — Conchiolin (§ 389) — Cornein, Pennatulin (§ 390) — Spongine (§ 391).  
 Umwandlungsprodukte einfacher Proteine (§§ 392—423).  
 Acidalbumine und Alkalialbuminate:  
 Acidalbumine (§ 392) — Albuminate (§ 393).  
 Intermediäre Spaltungsprodukte der Eiweißstoffe und ihrer Umwandlungsprodukte:  
 Allgemeines (§ 394) — Darstellung der Albumosen nach Kühne, Pick und Haslam (§ 396 bis 398) — Allg. Eigenschaften der Albumosen (§ 399) — Einzelne Albumosen (§ 400) — Darstellung der Peptone nach Siegfried und einzelne Peptone, Fleischsäure (§ 401) — Darstellung der Peptone nach Hofmeister (§ 402) — Plasteine (§ 403) — Protokyrine (§ 404) — Allgemeine Eigenschaften der Polypeptide (§ 405) — Darstellung der Polypeptide (§§ 406 bis 410) — Naphthalinsulfoglycylalanin, Glycylalanin-anhydrid, Glycylvalin-anhydrid, Glycylleucin, Glycylleucin-anhydrid, Glycylprolin-anhydrid, Glycylphenylalanin, Glycylphenylalanin-anhydrid, Glycyltyrosin, Naphthalinsulfoglycyltyrosin, Glycyltyrosin-anhydrid, Alanyl-glycin, Alanin-anhydrid, Alanylalanin, Alanyl-leucin, Alanyl-leucin-anhydrid, Alanylprolin-anhydrid, Leucyl-glycin, Leucylvalin-anhydrid, Leucin-anhydrid, Leucylglutaminsäure, Phenylalanylalanin-anhydrid, Dipeptid aus Tryptophan und Glutaminsäure, Prolylleucin-anhydrid, Prolylphenylalanin, Gluthathion (§ 411) — Alanyl-glycyltyrosin und andere Tripeptide (§ 412) — Tetrapeptid (§ 413).



- Oxydations- und Substitutionsprodukt der Proteine:
- Oxyprotsulfosäure (§ 414) — Peroxyprotsäure (§ 415) — Oxyprotein (§ 416) — Xanthoproteinsäure (§ 417) — Andere nitrierte Proteine (§ 418) — Desaminoproteine (§ 419) — Methylierte Proteine (§ 420) — Acylierte Proteine (§ 421) — Halogensubstituierte Proteine (§ 422) — Oxyproteinsäure, Antoxyprotein-säure, Alloxyproteinsäure (§ 423).
- Blutfarbstoffe und ihre nächsten Derivate (§§ 424—435).
- Oxyhämoglobin (§ 424) — Hämoglobin (§ 425) — Optisches Verhalten und spektroskopischer Nachweis (§ 426) — Kohlenoxydhämoglobin (§ 427) — Stickoxydhämoglobin (§ 428) — Methämoglobin (§ 429) — Cyanhämoglobin (§ 430) — Acidhämoglobin (§ 431) — Kathämoglobin (§ 432) — Sulfhämoglobin, Schwefelmethämoglobin (§ 433) — Die roten Farbstoffe der Vanessen (§ 434) — Hämocyandin, Oxyhämocyandin (§ 435).
- Nucleoproteide (§§ 436—443).
- Allgemeines (§ 436) — Nucleoprotamine (§ 437) — Nucleoproteide der Thymusdrüse (§ 438) — Nucleoproteide der Pankreasdrüse (§ 439) — Nucleoproteid aus Milz (§ 440) — Nucleoproteid aus Gänseblutkörperchen (§ 441) — Nucleoproteide aus anderen Organen (§ 442) — Nucleine (§ 443).
- Phosphorproteide (§§ 444—454).
- Allgemeines (§ 444) — Casein, Opalisin (§ 445) — Vitellin (§ 446) — Hämatogen (§ 447) — Ichthulin aus Barscheiern (§ 448) — Ichthulin aus Lachseiern (§ 449) — Ichthulin aus Kabeljau-eiern (§ 450) — Ichthulin aus Karpfen-eiern (§ 451) — Ichthulin aus Heringseiern, aus Eiern von *Torpedo marmorata* (§ 452) — Nucleoalbumin aus Rindergalle (§ 453) — Nucleone (§ 454).
- Glucoproteide (§§ 455—474).
- Allgemeines (§ 455) — Mucin der Submaxillardrüse (§ 456) — Mucin der Schleimhaut der Luftwege, des Magens, Mucin des Nabelstrangs (§ 457) — Pseudomucin (§ 458) — Paramucin (§ 459) — Ovomuroid (§ 460) — Muroid aus Blutserum (§ 461) — Corneamuroid (§ 462) — Hyalomuroid (§ 463) — Chondromuroid (§ 464) — Tendomuroid (§ 465) — Ligamentomuroid (§ 466) — Coriomuroid (§ 467) — Osseomuroid (§ 468) — Serosamucin (§ 469) — Mucin der Schnecken (§ 470) — Mucin der Barscheier (§ 471) — Harnmuroid (§ 472) — Amyloid (§ 473) — Helicoproteid (§ 474).
- Isolierung von Monaminosäuren aus der hydrolytischen Zersetzungsflüssigkeit der Proteine (§§ 475—482).
- Hydrolyse (§ 475).
- Verarbeitung der butylalkoholischen Lösung (§ 476).
- Verarbeitung des aus dem Butylalkohol abgetrennten Krystallgemisches.
- Herstellung der Esterchlorhydrate (§ 477 a) — Herstellung der Ester (§ 477 b) — Herstellung der Esterchlorhydrate und Ester nach Foreman (§ 477 c) — Fraktionierte Destillation der Ester (§ 478) — Verarbeitung der einzelnen Fraktionen (§ 479) — Isolierung von Oxyprolin und Serin (§§ 480 u. 481) — Der von den Aminosäureestern durch Äther möglichst befreite Rückstand (§ 481 a).
- Verarbeitung der extrahierten Stammlösung.
- Isolierung der Dicarbonsäuren und des Glykoll (§ 482).
- Isolierung der Hexonbasen aus der hydrolytischen Zersetzungsflüssigkeit der Proteine (§ 483).
- Isolierung einzelner Aminosäuren aus der hydrolytischen Zersetzungsflüssigkeit der Proteine (§§ 484—488).
- Isolierung von Glutaminsäure (§ 484), von Tyrosin (§ 485), von Cystin (§ 486), von Tryptophan (§ 487), von Histidin (§ 488).
- Analytische Bestimmung einzelner reaktiver Gruppen und Bausteine der Proteine (§§ 489—494).
- Alkalimetrische Bestimmung von Aminosäuren und Peptiden (§ 489) — Formoltitration (§ 490) — Formoltitration in Stadien (§ 491) — Aminostickstoffbestimmung (§ 492) — Bestimmung der Stickstoffverteilung (§§ 493 u. 494).
- Colorimetrische und titrimetrische Bestimmung einzelner Aminosäuren (§§ 495—499).
- Colorimetrische Bestimmung von Cystin, Tyrosin, Tryptophan, Histidin (§§ 495—498) — Titrimetrische Bestimmung von Histidin (§ 499).
- Gehalt einiger Proteine an Mono- und Diaminosäuren in Prozenten (§ 500).
- Tierfermente (§§ 501—523).
- Allgemeines (§ 501) — Das Arbeiten mit Fermenten (§ 502) — Pepsin (§§ 503—505) — Trypsin (§§ 506 u. 507) — Erepsin (§ 508) — Proteolytische und peptolytische Fermente der Gewebe (§ 509) — Labfermente (§§ 510 u. 511) — Lipase (§§ 512 u. 513) — Diastatisches Ferment (§§ 514 u. 515) — Fermente der übrigen Polysaccharide (§ 516) — Fermente der Disaccharide (§ 517) — Arginase (§ 518) — Phosphatasen (§ 519) — Fermente der Nucleinsäuren (§ 520) — Fermente der Purinkörper (§ 521) — Oxydations- und Reduktionsfermente (§ 522) — Fermente der Melaninbildung (§ 523).

## Dritte Abteilung.

**Untersuchung tierischer Flüssigkeiten, Gewebe und Konkretionen.****Untersuchung der Aschen.**

Herstellung der Aschen (§§ 524—530).

Veraschung auf trockenem Wege (§§ 525—527)  
— Veraschung auf nassem Wege nach A. Neumann (§§ 528—530).

Qualitative Untersuchung der Asche (§§ 531 u. 532).

Untersuchung des wässerigen Auszugs (§ 531), des salzsauren Auszugs (§ 532).

Quantitative Bestimmungen einzelner Aschebestandteile (§§ 533—556)

Natrium und Kalium (§§ 533—535) — Calcium und Magnesium (§§ 536—540) — Eisen (§§ 541 bis 544) — Salzsäure (§§ 545—548) — Jod (§ 549) — Gesamtschwefel (§ 550) — Schwefelsäure (§ 551) — Bleischwärzender Schwefel (§ 552) — Phosphorsäure (§§ 553 u. 554) — Kieselsäure (§ 555) — Kohlensäure (§ 556).

Bestimmung der Gesamtasche (§ 557).

Bestimmung des Gesamtstickstoffs nach Kjeldahl (§ 558).

Bestimmung des Kohlenstoffs nach Messinger (§ 559).

**Untersuchung des Harns.**

Allgemeines (§§ 560—567).

Bestandteile, Geruch (§ 560) — Menge, spezifisches Gewicht, Gefrierpunkt, Konsistenz (§ 561) — Klarheit (§ 562) — Linksdrehung, Fluorescenz (§ 563) — Farbe (§ 564) — Reaktion (§ 565) — Diazoreaktionen (§ 566) — Entfernung von Eiweiß aus eiweißhaltigem Harn (§ 567).

Normale Bestandteile (§§ 568—596).

Nachweise:

Natrium, Kalium, Calcium, Magnesium, Eisen, Salzsäure, Schwefelsäure, gepaarte Schwefelsäure, Phosphorsäure, Salpetersäure, salpetrige Säure, Kieselsäure, Wasserstoffsperoxyd (§ 568) — Ammoniak (§ 578) — Harnstoff (§ 580) — Oxalursäure (§ 126) — Allantoin (§ 127) — Kreatinin (§ 130) — Harnsäure (§ 135) — Organische Basen (§ 586) — Rhodanwasserstoff (§ 587) — Fettsäuren (§ 588) — Oxalsäure (§ 590) — Phenol, Kresol, Brenzcatechin, Indoxyl (§ 591) — Hippursäure (§ 206) — Inosit (§ 594) — Kynurensäure (§ 230) — Chondroitinschwefelsäure (§ 596).

Bestimmungen:

Titrationssacidität (§ 565) — Gesamtasche, Trockenrückstand (§ 569) — Natrium, Kalium (§§ 570 u. 573) — Calcium (§§ 571 u. 573) — Magnesium (§§ 572 u. 573) — Eisen (§ 573) — Salzsäure (§ 574) — Schwefelsäure, gepaarte Schwefelsäure, Gesamtschwefelsäure, Gesamtschwefel (§ 575) — Phosphorsäure (§§ 576 u. 695) — Salpetersäure (§ 577) — Ammoniak (§ 578) — Gesamtstickstoff (§ 579) — Harnstoff (§ 580) — Kreatinin (§ 581) — Kreatin (§ 582) — Harnsäure (§§ 583 u. 584) — Purinbasen (§§ 584

u. 585) — Rhodanwasserstoff (§ 587) — Fettsäuren (§ 588) — Ameisensäure (§ 589) — Oxalsäure (§ 590) — Gepaarte Schwefelsäure, Phenol, Kresol, Brenzcatechin, Indoxyl (§ 591) — Hippursäure (§ 592) — Kynurensäure (§ 595) — Reduzierende Substanzen (§ 606).

Vorwiegend pathologische Bestandteile (§§ 597—624).

Nachweise:

Traubenzucker (§ 597) — Fruchtzucker (§ 602) — Milchzucker (§ 603) — Pentosen (§ 604) — Gepaarte Glucuronsäuren (§ 605) — Saccharose (§ 605) — Aceton, Acetessigsäure (§ 607) — Oxybuttersäure (§ 609) — Acetaldehyd (610a) — Milchsäure (§ 611) — Fett (§ 612) — Eiweiß (§ 613) — Albumosen (§ 615) — Aminosäuren (§ 616) — Fermente (§ 620) — Farbstoffe (§ 621) — Gallensäuren (§ 622) — Homogentisinsäure (§ 623) — Eiter (§ 624).

Bestimmungen:

Traubenzucker (§§ 597—601) — Arabinose (§ 604) — Gepaarte Glucuronsäuren (§ 605) — Gesamtkohlenhydrate (§ 606) — Aceton, Acetessigsäure (§§ 607 u. 608, 610, 610a) — Oxybuttersäure (§§ 609, 610, 610a) — Milchsäure (§ 611) — Eiweiß (§ 614) — Cystin (§ 617) — Aminosäurestickstoff (§ 618) — Aminosäure- und peptidgebundener Stickstoff (§ 619) — Fermente (§ 620) — Gallensäuren (§ 622) — Homogentisinsäure (§ 623).

Harnsedimente, Harnsteine, Nierensteine (§§ 625—629).

Allgemeines (§ 625) — Mikroskopische Untersuchung der Harnsedimente (§ 626) — Kurze Charakterisierung der in Sedimenten und Steinen gefundenen Verbindungen (§ 627) — Qualitative Analyse (§ 628) — Quantitative Analyse (§ 629).

**Untersuchung von serösen Flüssigkeiten, Cystenflüssigkeiten, Synovia usw.**

Allgemeines (§ 630).

Bestandteile, spezifisches Gewicht, Drehungsvermögen, Reaktion, Farbe, Konsistenz, Klarheit (§ 630).

Untersuchung (§§ 631—663).

Nachweise:

Anorganische Salze (§ 632) — Glucoproteide, phosphorhaltige Proteide (§ 634) — Serumalbumin, Serumglobulin, Fibrinogen (§ 635) — Albumosen (§ 636) — Ammoniak (§ 642) — Harnstoff (§ 643) — Allantoin (§ 644) — Harnsäure (§ 647) — Amino- und Diaminosäuren (§ 650) — Zucker (§§ 652 u. 653) — Acetaldehyd (§ 655) — Ameisensäure (§ 656) — Ätherlösliche Substanzen (Fett, Phosphatide, Cholesterin) (§ 660) — Farbstoffe (§ 661) — Verschiedene Stoffe (§ 662).

Bestimmungen:

Trockenrückstand (§ 631) — Anorganische Salze (§ 632) — Albumine, Globuline (§§ 637 638) — Fibrinogen (§ 639) — Refraktometrische Bestimmung der Serumproteine (§ 640)

— Gesamtstickstoff, Reststickstoff (§ 641) — Ammoniak (§ 642) — Harnstoff (§ 643) — Allantoin (§ 644) — Kreatinin, Kreatin (§§ 645 u. 646) — Harnsäure (§ 742) — Gebundene Purine (§ 649) — Amino- und Peptidstickstoff (§ 651) — Zucker (§§ 652 u. 653) — Alkohol (§ 654) — Äthyläther (§ 654) — Glycerin (§ 656) — Ameisensäure (§ 656) — Milchsäure (§§ 657 u. 658) — Aceton, Acetessigsäure, Oxybuttersäure (§§ 745 u. 706) — Eiweißfäulnisprodukte (§ 659) — Ätherlösliche Substanzen (Fett, Phosphatide, Cholesterin) (§ 660) — Farbstoff (§ 661) — Quantitative Analyse (§ 663).

#### Untersuchung des Blutes.

##### Allgemeines (§§ 664—667).

Bestandteile, spezifisches Gewicht, Farbe (§ 664) — Verhalten zu Salzlösungen (§ 665) — Hämolyse (§ 666) — Reaktion (§ 667).

##### Gerinnung (§§ 668 u. 669).

##### Trennung und Untersuchung von Plasma (oder Serum) und Blutkörperchen (§§ 670—674).

Trennung, Isolierung von Plasma (§ 670) — Isolierung von Serum (§ 671) — Isolierung der roten Blutkörperchen (§ 672) — Untersuchung der roten Blutkörperchen (§ 673) — Isolierung und Untersuchung der weißen Blutkörperchen, Isolierung der Blutplättchen (§ 674).

##### Untersuchung des Blutes (§§ 675—685).

###### Nachweise:

Einzelne Bestandteile (§ 675) — Blutfarbstoff (§ 676).

###### Bestimmungen:

Einzelne Bestandteile (§ 675) — Blutfarbstoff (§§ 677 u. 678) — Sauerstoffbindungsvermögen (§ 679) — Fibrin (§ 680) — Fibrinogen (§ 681) — Plasma, Serum, Blutkörperchen (§ 682) — Einzelne Bestandteile des Blutes in ihrer Verteilung auf Serum und Körperchen (§ 683) — Gesamtblut- und Gesamtblutfarbstoffmenge eines Tieres (§ 684) — Gesamtblutmenge beim Lebenden (§ 685).

#### Untersuchung des Eiters.

##### Allgemeines und Untersuchung (§§ 686 bis 687).

Bestandteile (§ 686) — Trennung von Eiterserum und Eiterkörperchen, Untersuchung des Eiterserums, Untersuchung der Eiterkörperchen (§ 687).

##### Die wichtigsten Mikromethoden zur Untersuchung von Blut, Plasma und Serum.

###### Bestimmungen:

Kalium, Natrium, Calcium, Magnesium (§ 688) — Magnesium (colorimetrisch) (§ 689) — Calcium (§ 690) — Alkalireserve (§ 691) — Eisen (colorimetrisch) (§ 692) — Sulfate (§ 693) — Chloride (§ 694) — Phosphorsäure (colorimetrisch) (§§ 695 u. 696) — Phosphorsäure (gravimetrisch) (§ 697) — Stickstoff (§ 698) — Ammoniak (§ 699) — Reststickstoff (§ 700) — Eiweißkörper (§ 701) — Harnstoff (§ 702) —

Kreatinin, Kreatin (§ 703) — Harnsäure (§ 704) — Zucker (§ 705) — Acetonkörper (§ 706) — Fettsäuren, Cholesterin (§ 707) — Milchsäure (§ 708).

#### Untersuchung der Stützgewebe.

##### Untersuchung der Knochen, Zahnsubstanzen und Verkalkungen.

##### Bestandteile (§ 709).

##### Untersuchungen (§§ 710—714).

###### Nachweise:

Einzelne anorganische und organische Bestandteile (§ 710).

###### Bestimmungen:

Gesamtstickstoff, einzelne Aschebestandteile, Gesamtasche (§ 711) — Quantitative Analyse der Asche (§ 712) — Kollagen (§ 713).

##### Untersuchung des Knochenmarks (§ 714).

#### Untersuchung des Knorpelgewebes.

##### Bestandteile, Untersuchung (§ 715).

#### Untersuchung des Bindegewebes.

##### Bestandteile, Untersuchung (§ 716).

#### Untersuchung der Muskeln und drüsigen Organe.

##### Allgemeines (§§ 717 u. 718).

Reinigen, Zerkleinern (§ 717) — Bestandteile (§ 718).

##### Untersuchung (§§ 719—755).

###### Nachweise und Isolierungen:

Anorganische Salze (§ 719) — Proteinstoffe (§ 720) — Harnstoff (§ 643) — Milchsäure (§ 82) — Oxalsäure (§ 88) — Flüchtige Fettsäuren (§ 80) — Inosit (§ 203) — Kreatin, Kreatinin, Nucleinbasen, Milchsäure, Taurin, Inosit (§ 721) — Carnosin, Methylguanidin, Carnitin (§ 722) — Basen (§§ 723 u. 724) — Aminosäuren (§ 725) — Alkohol (§ 726) — Zucker (§ 727) — Gebundene Pentose (§ 728) — Phosphatide (§§ 261 u. 263ff.).

###### Bestimmungen:

Trockenrückstand, Gesamtstickstoff, einzelne anorganische Bestandteile (§ 730) — Gesamtposphorsäure (§ 731) — Phosphorsäure in verschiedenen Formen ihrer Bindung (§ 732) — Lactacidogenphosphorsäure (§ 733) — Organische lösliche Nichtlactacidogenphosphorsäure (§ 734) — Phosphatidphosphorsäure (§ 735) — Kollagen (§ 736) — Ammoniak (§ 737) — Harnstoff (§ 738) — Gesamtkreatin (§ 739) — Kreatinin (§ 740) — Beim Kochen mit Säuren entstehende Nucleinbasen (§ 741) — Harnsäure (§ 742) — Carnosin (§ 743) — Aminosäuren (§ 744) — Gesamtaceton, Acetessigsäure, Aceton (§ 745) — Adrenalin (§ 746) — Alkohol (§ 747) — Milchsäure (§§ 748 u. 749) — Gebundene Pentose (§ 750) — Glykogen (§ 751) — Ätherlösliche Substanzen (§ 752) — Höhere Fettsäuren (§ 753) — Cholesterin, Cholesterinester (§§ 754 u. 755).

**Untersuchung des Gehirns, des Rückenmarks und der Nerven.**  
 Bestandteile (§ 756).  
 Untersuchung (§§ 757—761).  
 Isolierungen und Nachweise:  
 Anorganische Salze (§ 757) — Proteine (§ 758)  
 — Trennung einzelner Gruppen organischer  
 Gehirnstoffe voneinander (§ 759).  
 Bestimmungen:  
 Cerebroside (§ 760) — Cholesterin (§ 761).

**Untersuchung von Hornhaut, Linse,  
 Glaskörper, Humor aqueus.**  
 Bestandteile und Untersuchung (§ 762).

**Untersuchung der Sekrete.**  
**Untersuchung des Speichels.**  
 Allgemeines (§§ 763 u. 764).  
 Bestandteile, Spezifisches Gewicht, Reaktion,  
 Klarheit, Pathologische Veränderungen (§ 763)  
 — Sekrete der einzelnen Speicheldrüsen (§ 764).  
 Untersuchung (§§ 765—769).  
 Nachweise:  
 Proteinstoffe (§ 765) — Fermente (§ 766) —  
 Rhodanwasserstoff (§ 767) — Salpetrige Säure,  
 andere Stoffe (§ 768).  
 Bestimmungen:  
 Rhodanwasserstoff (767).  
 Speichelsteine, Zahnstein (§ 769).  
 Qualitative Analyse, quantitative Analyse  
 (§ 769).

**Untersuchung des Nasensekretes.**  
 Allgemeines und Untersuchung (§ 770).  
 Bestandteile, Nachweis und Bestimmung der  
 einzelnen Bestandteile, Nasensteine (§ 770).

**Untersuchung der Tränen.**  
 Allgemeines und Untersuchung (§ 771).

**Untersuchung der Sputa.**  
 Allgemeines (§ 772).  
 Bestandteile, Reaktion, spezifisches Gewicht  
 (§ 772).  
 Untersuchung (§§ 773—774).

**Untersuchung des Magensaftes und des  
 Mageninhaltes.**  
 Magensaft (§ 775).  
 Untersuchung des Mageninhaltes (§§ 776  
 bis 785).  
 Nachweise:  
 Freie Salzsäure (§ 777) — Milchsäure (§ 778) —  
 Flüchtige Fettsäuren, saure Phosphate (§ 779)  
 — Pepsin, Labferment, Lipase (§ 784) —  
 Galle, Blut, Eiweiß, Gase (§ 785).  
 Bestimmungen:  
 Gesamtcacidität (§ 780) — Gesamtsäure (§ 781)  
 — Gesamtsalzsäure (§ 782) — Freie Salzsäure  
 (§ 783).

**Untersuchung des Pankreassaftes.**  
 Allgemeines (§ 786).  
 Bestandteile (§ 786).  
 Untersuchung (§ 787).  
 Pankreassteine (§ 788).

**Untersuchung des Darmsaftes.**  
 Allgemeines und Untersuchung (§ 789).

**Untersuchung der Galle.**  
 Allgemeines (§§ 790—792).  
 Bestandteile (§ 791) — Verhalten verschiede-  
 nen Einwirkungen gegenüber (§ 792).  
 Untersuchung (§§ 793—799).  
 Nachweise:  
 Anorganische Bestandteile, Gallenschleim  
 (§ 793) — Gallensäuren (§ 794) — Cholesterin,  
 Phosphatide, Fett, Harnstoff (§ 795) —  
 Gallenfarbstoff, Urobilin (§ 796) — Eiweiß,  
 Zucker, Aminosäuren, Blut (§ 797).  
 Bestimmungen:  
 Trockenrückstand, Gallensäuren, Gesamt-  
 stickstoff, Ammoniak, einzelne Aschebestand-  
 teile (§ 798).  
 Quantitative Analyse (§ 799).  
 Gallensteine, Gallensedimente (§ 800).  
 Einteilung, qualitative Untersuchung, quan-  
 titative Untersuchung (§ 800).

**Untersuchung des Schweißes.**  
 Allgemeines und Untersuchung (§ 801).

**Untersuchung der Milch.**  
 Allgemeines (§§ 802 u. 803).  
 Bestandteile, spezifisches Gewicht, Reaktion  
 (§ 802) — Verhalten verschiedenen Ein-  
 wirkungen gegenüber (§ 803).  
 Gerinnung (§ 804).  
 Untersuchung (§§ 805—814).  
 Nachweise:  
 Casein, Albumin + Globulin, Fett, Phospha-  
 tide, Cholesterin, Milchzucker, Salze (§ 805).  
 Bestimmungen:  
 Trockenrückstand, Gesamtstickstoff, einzelne  
 anorganische Bestandteile (§ 806) — Gesamt-  
 proteinstickstoff (§ 807) — Casein, Albumin  
 + Globulin, Milchzucker, Fett (§ 808) —  
 Casein, Summe der übrigen Proteinstoffe,  
 Fett (§ 809) — Casein (+ Globulin), Albumin  
 (§ 810) — Fett (§ 811) — Milchzucker (§ 812)  
 — Stickstoff der Extraktivstoffe (§ 813) —  
 Citronensäure (§ 814).

**Untersuchung des Sekretes der Talgdrüsen  
 und ähnlicher Sekrete.**  
 Bestandteile und Untersuchung (§ 815).

**Untersuchung des Spermas.**  
 Allgemeines und Untersuchung (§ 816).  
 Bestandteile, Trennung in Zwischenzellen-  
 flüssigkeit und Spermatozoen, Trennung der  
 Spermatozoen in Köpfe und Schwänze, Unter-  
 suchung (§ 816).

**Untersuchung des Darminhaltes.**  
**Untersuchung des Dünndarminhaltes.**  
 Bestandteile und Untersuchung (§ 817).

**Untersuchung der Faeces.**  
 Allgemeines (§ 818).  
 Bestandteile, Konsistenz, Farbe, Reaktion,  
 Geruch (§ 818).  
 Untersuchung (§§ 819—835).  
 Nachweise:  
 Anorganische Salze (§ 819) — Fermente (§ 820)  
 — Proteinstoffe (§ 821) — Nucleinbasen (§ 822)  
 — Aromatische Substanzen, Koprosterin, Fett,  
 Fettsäuren, Kohlenhydrate (§ 823) — Gallen-  
 säuren (§ 824) — Urobilin, Urobilinogen, Bili-  
 rubin (§ 825) — Blutfarbstoff, Koproporphyrin

(§ 826) — Milchsäure, Leucin und Tyrosin,  
 Phosphatide, Koprosterin, Cadaverin und  
 Putrescin, Ammoniak, Schwefelwasserstoff  
 (§ 827) — Darmgase (§ 828).

Herstellung lufttrockener Faeces  
 (§ 829).

Bestimmungen:

Trockenrückstand (§ 830) — Gesamtstickstoff,  
 einzelne Aschebestandteile (§ 831) — Nuclein-  
 basenstickstoff (§ 832) — Fett, Fett + Fett-  
 säuren, flüchtige Fettsäuren (§ 833) — Amylum  
 (§ 834) — Urobilinogen (§ 835).

Darmkonkremente, Darmsteine (§ 836).

**Untersuchung des Meconiums.**  
 Allgemeines und Untersuchung (§ 837).

## Anhang.

Einige Reagenzien.

Alménische Lösung — Brückes Reagens —  
 Ehrlichs Aldehydreagens — Glyoxylsäure-  
 lösung — Magnesiamischung — Millons Re-  
 agens — Molybdänsaures Ammoniak — Ness-  
 lers Reagens — Phosphorwolframsäure —  
 Stokessche Lösung.

Tabelle der Atomgewichte.

Tabelle der spezifischen Gewichte.

Ammoniak — Kalilauge — Natronlauge —  
 Salzsäure — Salpetersäure — Alkohol.

Tabelle des Volumens und der Dichte des  
 Wassers.

Tabelle zur Traubenzuckerbestimmung  
 nach Pflüger.

Tabelle zur Fettbestimmung nach Soxhlet.

## Alphabetisches Inhaltsverzeichnis.

---

### Berichtigungen.

Auf S. 735 gehört die Fußnote 1 zu Voit, die Fußnote 2 zu Malfatti.

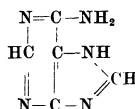
Auf S. 929. Bei der Beschreibung der Methode von Denigès-Beau muß es auf Zeile 4/5  
 statt „im Harn“ heißen „in ihm“.

# Berichtigungen

## zu Hoppe - Seyler—Thierfelder, Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse.

### 9. Auflage (1924).

- S. 86 Zeile 9 von oben: „deren“ (statt „dessen“).  
 S. 150 Zeile 15 von oben:  $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$  (statt  $\text{C}_4\text{HN}_2\text{O}$ ).  
 S. 180 Die Formel für das Adenin ist zu schreiben:



- S. 213 Zeile 20 von oben:  $2 \text{H}_2\text{O}$  (statt  $2 \text{H}_2\text{O}_2$ ).  
 Zeile 23 von oben:  $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_4\text{O}_6$  (statt  $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_6$ ).  
 Zeile 24 von oben:  $\text{C}_{10}\text{H}_{26}\text{N}_4$  (statt  $\text{C}_{10}\text{H}_{28}\text{N}_4$ ).  
 S. 215 Zeile 25 von oben:  $\text{C}_{10}\text{H}_{26}\text{N}_4$  (statt  $\text{C}_{10}\text{H}_{28}\text{N}_4$ ).  
 S. 277 Die Formel für Prolin muß heißen:  $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_2$  (statt  $\text{C}_5\text{N}_9\text{NO}_2$ ).  
 S. 561 Zeile 4 von unten: hinter „Butylalkohol“ ist einzuschalten: „und zuletzt mit trockenem Äther“.  
 Zeile 3 von unten: „gilt die Extraktion als beendet“ (statt „ist die Extraktion beendet“).  
 S. 575 Zeile 17 von unten: „diente“ fällt fort.  
 S. 582 \*) Fußnote Zeile 3 von oben: Der mit „Das“ beginnende Satz ist durch folgende beiden Sätze zu ersetzen: Andererseits stellt man  $\text{m}/_{15}$ -Lösungen von sekundärem und primärem Natriumphosphat her. Das Papier muß in einem Gemisch von 3 Teilen der sekundären und 7 Teilen der primären Phosphatlösung eine schwach saure, in einem Gemisch gleicher Teile beider Phosphatlösungen eine neutrale und in einem Gemisch von 7 Teilen der sekundären und 3 Teilen der primären Phosphatlösung eine schwach alkalische Reaktion zeigen.  
 S. 712 Zeile 10 von unten: „und erforderliche Lösungen“ fällt fort. Hinter § 704, 1 ist zu setzen: Erforderliche Lösungen:  
 1. Eine Lösung, welche 5% milchsaures Silber und 5% Milchsäure enthält,  
 2. 5 proz. Lösung von Natriumcyanid,  
 3. 10 proz. Lösung von Natriumsulfit,  
 4. Harnsäurelösung: 1 g Harnsäure wird in 150 ccm einer 0,4 proz. Lithiumcarbonatlösung gelöst und die Lösung auf 500 ccm aufgefüllt. Von dieser werden 50 ccm mit 300 ccm Wasser und 500 ccm einer klaren 20 proz. Natriumsulfitlösung versetzt und auf 1000 ccm verdünnt.  
 5. 20 proz. Sodalösung,  
 6. Harnsäurereagenz nach Folin und Denis siehe § 704, 1, e.  
 S. 831 Zeile 8 von unten: vor „BaCl<sub>2</sub>-Lösung“ ist einzuschalten „der salzsäurehaltigen“.  
 Zeile 7 von unten: statt „dieser“ muß es heißen: „der von 10 cc auf 1000 cc verdünnten“.  
 S. 834 Zeile 14 von unten: „conc. Salpetersäure“ (statt „conc. Salzsäure“).  
 S. 842 § 704, b:  $\text{}^n/_{10} \text{HCl}$  (statt  $\text{}^n/_{10} \text{NaOH}$ ).

## Wichtigere chemische und physikalische Methoden.

### Allgemeine chemische Operationen.

1. Die am häufigsten bei physiologisch-chemischen Untersuchungen zur Anwendung kommenden Operationen sind Kochen und Abdampfen, Trennung der Substanzen, Auswaschen von Niederschlägen, Trocknen und Glühen. Auch diese einfachen Prozeduren erfordern Übung und Aufmerksamkeit, und es ist von der richtigen Ausführung derselben das Gelingen selbst einfacher Untersuchungen abhängig. Es mögen daher zunächst über diese Operationen einige praktische Bemerkungen hier Platz finden, die besonders das Verhalten der tierischen Stoffe bei denselben betreffen.

### Kochen und Abdampfen von Flüssigkeiten.

2. Das Kochen der Flüssigkeiten geschieht in Reagensgläsern, Kolben, Kochflaschen, Porzellan- oder Glasschalen, das Abdampfen wässriger Flüssigkeiten nur in Schalen. Alkoholische Flüssigkeiten können in hinreichend hochwandigen Schalen oder besser in Bechergläsern, ätherische oder Chloroformlösungen nur in letzteren ohne Verlust verdunstet werden. Zum Abdampfen kleiner Mengen wässriger Flüssigkeiten sind Uhrschaalen sehr geeignet. Alkoholische Lösungen dürfen nur auf dem Wasser- oder Dampfbade, nie direkt über der Flamme, ätherische nur auf dem vorher erwärmten Wasserbade nach Löschen der Flamme oder auf dem Dampfbade verdunstet werden, da sich ihr Dampf an der Flamme leicht entzündet.

Ziemlich verdünnte Flüssigkeiten, z. B. Harne, verdampft man am besten zunächst über freiem Feuer bei mäßigem Sieden und setzt, wenn sie konzentrierter geworden sind, das Abdampfen auf dem Wasserbade fort. Viele Flüssigkeiten, besonders zuckerhaltige, bräunen sich beim Kochen und Abdampfen bei hoher Temperatur, besonders über freiem Feuer. Man dampft sie zweckmäßig bei einer Temperatur von 70—80°, entweder direkt über kleiner Flamme oder im Wasserbade ein und beschleunigt durch Umrühren oder einen über der Flüssigkeit angebrachten Flügelventilator die Verdunstung. In vielen Fällen ist das Eindampfen im Vakuum vorteilhaft.

Durch gutes Umrühren vermeidet man möglichst das heftige Stoßen und Spritzen, welches leicht eintritt, wenn sich schwere Niederschläge aus den kochenden Flüssigkeiten absetzen, z. B. beim Eindampfen bereits konzentrierter Harne oder Salzlösungen über freiem Feuer.

Infolge von Siedeverzug nicht gleichmäßig, sondern stoßweise siedende Flüssigkeiten kann man in der Regel durch Einbringen von einigen wenigen ganz kleinen Stückchen von unglasiertem gebranntem Ton zu ruhigem Kochen bringen. Glasperlen oder Glascapillaren oder über die Oberfläche der Flüssigkeit hervorragende Holzstäbchen dienen demselben Zwecke.

Eiweißhaltige Flüssigkeiten sind langsam unter gutem Umschütteln oder Umrühren mit einem Glasstabe zum Kochen zu erhitzen. Selbst im Probierröhrchen tritt wegen schlechter Wärmeleitung der Eiweißkoagula leicht Bräunung eiweißreicher Flüssigkeiten ein, wenn man nicht durch Umdrehen und Schütteln die Erhitzung möglichst gleichmäßig auf die ganze Flüssigkeit wirken läßt.

Zu heftige plötzliche Erhitzung durch eine heiße Flamme an einer Stelle zersprengt nicht allein fast immer die Gefäße, sondern verdirbt auch sicher die ganze Flüssigkeit, wenn sie eiweißreich ist. Will man die Braunfärbung beim Kochen eiweißreicher Flüssigkeiten sicher vermeiden, so trägt man diese in kleinen Portionen unter gutem Umrühren in bereits siedendes Wasser ein.

### Trennungsmethoden.

Die Trennung der Substanzen kann man bewirken durch Destillieren, Extrahieren, Dialysieren, Zentrifugieren und Filtrieren. Die letztere Art der Trennung ist die am häufigsten benutzte.

**Destillieren.** 3. **Destillieren.** Die Destillation dient dazu, flüchtige Stoffe von nicht flüchtigen zu trennen. Nach ihrer Verdichtung in dem mit dem Destillierkolben verbundenen Liebig'schen Kühler sammeln sich die flüchtigen Substanzen in der Vorlage, während die nicht flüchtigen im Destillierkolben zurückbleiben. Um bei stoßweise siedenden Flüssigkeiten ein gleichmäßiges Kochen zu bewirken, verfährt man in der in § 2 angegebenen Weise. Körper, die bei ihrer Siedetemperatur oder schon unterhalb derselben sich zersetzen, destilliert man unter vermindertem Druck oder im Vakuum. Die Destillation wird wesentlich erleichtert und beschleunigt durch Einleiten von Wasserdampf in die zu destillierende Flüssigkeit. Viele Substanzen, deren Siedepunkt weit über 100° liegt, gehen unter diesen Umständen auch schon beim Destillieren ihrer wässerigen Lösungen leicht mit den Wasserdämpfen über, z. B. Fettsäuren, Phenole, Indol.

**Extrahieren.** 4. **Extrahieren.** Das Extrahieren einer festen Masse durch eine Flüssigkeit gelingt nur dann schnell und vollständig, wenn die Masse in hinreichend fein verteiltem Zustande der extrahierenden Flüssigkeit dargeboten wird. Sind die zu extrahierenden Körper pulverisierbar, so verwandelt man sie vor dem Aufgießen der Flüssigkeit in ein möglichst feines Pulver; sind sie nicht pulverisierbar, so bringt man sie, wenn sie breiige, schleimige oder harzige Konsistenz haben, wenn möglich erst in konzentrierte, wässerige oder alkoholische Lösung, übergießt nun unter gutem Umrühren mit der extrahierenden Flüssigkeit und verwandelt somit die Extraktion in eine Fällung der nichtlöslichen Substanzen. Um tierische Organe zu extrahieren, z. B. Muskeln, zerkleinert man sie vorher durch Zerreiben mit Glasstücken oder durch eine Fleischhackmaschine. Alle eiweißhaltigen Substanzen extrahiert man mit Wasser am besten unter der Koagulationstemperatur der Proteine und entfernt dann im Extrakte das Eiweiß durch Aufkochen.

Zur Trennung der Fette usw. von anderen Stoffen durch Extraktion ersterer mittels Äther oder Chloroform eignen sich im ganzen wässerige Lösungen oder Emulsionen besser als die festen Verdampfungsrückstände dieser Flüssigkeiten. Man schüttelt die Lösungen mit Äther oder Chloroform, läßt dann einige Zeit stehen und trennt die Flüssigkeiten durch Abgießen. Ist die Äther- oder Chloroformlösung dann noch trübe, schleimig, und trennen sich die Flüssigkeiten schlecht, so fügt man Alkohol unter Umschütteln hinzu, bis die Flüssigkeiten sich trennen und klären, scheidet sie im Scheidetrichter und wäscht mehrmals die Äther- oder Chloroformlösung mit Wasser zur Entfernung des Alkohols. Schneller und bequemer und mit weniger Extraktionsmittel erreicht man den Zweck mit Hilfe eines der vielen kontinuierlich wirkenden Apparate,



welche zur Extraktion wässriger Flüssigkeiten mit Äther, Ligroin, Chloroform und anderen mit Wasser nicht mischbaren Flüssigkeiten angegeben worden sind. Von Apparaten für spezifisch leichtere (als Wasser) Extraktionsmittel, z. B. Äther, seien besonders der von Lind<sup>1)</sup>, von Apparaten für spezifisch schwerere (als Wasser) Extraktionsmittel, z. B. Chloroform, die von Hagemann<sup>2)</sup> (auch für spezifisch leichtere Extraktionsmittel brauchbar) und von Stephani und Böcker<sup>3)</sup> erwähnt. Zur Extraktion von Fett usw. aus pulverigen Substanzen mit Äther oder Chloroform benutzt man den Soxhlet'schen Extraktionsapparat, welcher eine völlige Erschöpfung der Masse unter Benutzung von kleinen Äther- oder Chloroformmengen gestattet und ebenfalls kontinuierlich arbeitet. Für Substanzen, welche kein Erwärmen vertragen, ist eine Modifikation des Apparates von Pinkus<sup>4)</sup> angegeben.

**5. Dialysieren.** Seitdem man in dem vegetabilischen Pergament einen der Dialysieren. Fäulnis und der Veränderung durch die gewöhnlichsten Agenzien nicht ausgesetzten zu endosmotischen Versuchen sehr gut geeigneten Stoff besitzt, hat man die endosmotischen Vorgänge zur Trennung von Substanzen empfohlen, welche mit verschiedener Geschwindigkeit oder gar nicht durch die Poren dieses Pergamentes wandern (diffundieren) können. Einige Stoffe wie arabisches Gummi und Proteine sind der Diffusion kaum fähig; bringt man sie in konzentrierter Lösung in eine Flasche, deren Boden abgesprengt und durch ein wasserdicht übergebundenes Stück vegetabilisches Pergament ersetzt ist, und setzt die so gefüllte Flasche in eine Schale mit destilliertem Wasser, so gehen kaum bemerkbare Spuren dieser Stoffe durch die Membran in das Wasser über. Enthält die Eiweiß- oder Gummilösung dagegen Salze oder im allgemeinen der Diffusion fähige Substanzen, so treten diese, falls sie nicht von Gummi oder Eiweiß durch chemische Affinität festgehalten sind, solange in das Wasser über, bis die Konzentration der äußeren wässrigen Lösung der inneren für diese Substanzen nahezu gleich geworden ist. Wenn man nun sonach imstande ist, diffusible Körper (Krystalloide nach Graham) von nichtdiffusiblen (Kolloide nach Graham) zu trennen, indem man die Mischungen beider in obiger Weise mit Wasser diffundieren läßt, nach einigen Stunden das Wasser außen in der Schale durch neues ersetzt, nach wieder einigen Stunden abermals wechselt, so können bedeutende Quantitäten der diffusiblen Substanzen aus der ursprünglichen Mischung entfernt und durch Verdunsten usw. der äußeren wässrigen Lösungen für sich gewonnen werden. Man gelangt nun zwar auch bei möglichster Begünstigung schneller Diffusion nie dahin, die Salze usw. völlig von Gummi, Proteinen u. dgl. zu trennen, doch werden sie wesentlich gereinigt und die Salze so wie andere diffusible Körper frei von Gummi, Eiweiß usw. erhalten. Graham, welcher diese Scheidungs-methode zuerst in umfassender Weise angewendet hat, nennt sie Scheidung durch Dialyse<sup>5)</sup>. Um recht schnelle Diffusion zu bewirken, ist es zweckmäßig, 1. die Diffusionsfläche, d. h. die Membran, durch welche die Diffusion stattfindet, recht groß zu nehmen, 2. die Temperatur etwas zu erhöhen, 3. die Flüssigkeit in der Flasche öfters mäßig zu schütteln und 4. das Außenwasser häufig zu erneuern, evtl. wenn es nur darauf ankommt, die diffusiblen Stoffe zu entfernen, es sich beständig erneuern zu lassen. Da der Strom sich immer mehr verlangsamt, je mehr die diffusiblen Substanzen in der Flasche abnehmen, tut man gut, nach einiger Zeit den Inhalt der Flasche etwas einzudampfen und nun weiter der Dialyse zu unterwerfen.

<sup>1)</sup> Embden u. Schmitz: Handbuch der biochem. Arbeitsmethoden. Herausgegeben von Abderhalden, Bd. 3, S. 931. 1910.

<sup>2)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 26, 2, S. 1975. 1893.    <sup>3)</sup> ebenda Bd. 35, 3, S. 2698. 1902.

<sup>4)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 60, S. 311. 1914.    <sup>5)</sup> Lieb. Ann. d. Chem. Bd. 121, S. 1. 1862.

Sehr zweckmäßig sind die von Kühne empfohlenen Pergamentschläuche, welche mit der zu dialysierenden Flüssigkeit gefüllt, in Höhe, mit Wasser, evtl. mit fließendem Wasser gefüllte Zylinder U-förmig aufgehängt werden. Die Diffusionsfläche wird auf diese Weise sehr vergrößert. Für kleinere Flüssigkeitsmengen sind auch die von Schleicher u. Schüll in Düren hergestellten Diffusionshülsen aus Pergamentpapier zu verwenden, oder auch aus Kollodium hergestellte Säcke. Unter Umständen kann man sich mit Vorteil der von Philippson<sup>1)</sup> und von anderen empfohlenen Schilfschläuche bedienen. In ihnen verläuft die Diffusion rascher. Der Fassungsraum eines Schilfschlauchs beträgt allerdings nur 8—10 ccm.

Ein Apparat, bei dem die Dialyse durch ein fortwährendes Mischen der zu dialysierenden Flüssigkeit mittels eines Rührers begünstigt wird, ist von Siegfried<sup>2)</sup> und Hüfner-Gutbier<sup>3)</sup> angegeben.

**Zentrifugieren.** 6. **Zentrifugieren.** Die Trennung von körperlichen Elementen, z. B. Niederschlägen, Blutkörperchen, im Harn suspendierten Bestandteilen usw., geschieht oft sehr zweckmäßig mit Hilfe der Zentrifuge. An Stelle der zylindrischen Zentrifugiergefäße sind von A. Kossel<sup>4)</sup> flache, in der Nähe der Peripherie angeordnete Gefäße empfohlen, die z. B. für die Abtrennung roter Blutkörperchen große Vorteile gewähren.

**Filtrieren.** 7. **Filtrieren.** Die Trennung der Flüssigkeiten von Niederschlägen erfolgt meist mittels Filtration durch ungeleimtes Papier. Will man letzteres als leicht zerstörbaren organischen Körper vermeiden, so bringt man fein zerteilten und mit Wasser geschlämten Asbest (nachdem er vorher mit Salzsäure ausgekocht, mit Wasser ausgewaschen und gegläht ist) oder Glaswolle in die Spitze eines Glastrichters und stopft sie hier nicht zu fest vor die Öffnung der Röhre des Trichters. Das Filtrieren durch Leinwand (Kolieren) dient entweder zur ersten gröberen Scheidung massiger, schwerer, grobkörniger Niederschläge von den Flüssigkeiten, oder man zieht es in Anwendung bei Filtration schleimiger Flüssigkeiten, welche Papierfilter schnell verstopfen würden (z. B. Trennung des geschlagenen Faserstoffs vom Blute). Dem Filtrieren durch Leinwand kann man fast stets ein Auspressen des Niederschlags im Leinwandbeutel mit der Hand oder einer Presse folgen lassen. Um starkes Pressen anwenden zu können, bedient man sich als Einhüllung des zu pressenden Breies am besten des aus Wolle gewebten Ölpreßtuches. Zum Auspressen von gehacktem Fleisch eignet sich besonders ein sehr starkes Netz oder Gewebe aus Hanffäden.

Die Papierfilter sollen ein wenig kleiner sein als die Glastrichter, für welche sie bestimmt sind; nie darf das Filter über den Rand des Trichters herausragen, da sonst völliges Auswaschen unmöglich wird. Es ist meist zweckmäßig, das Filter zu befeuchten und an die Wandung des Trichters überall anzulegen, ehe man die zu filtrierende Flüssigkeit aufgießt. Sehr große Filter, durch welche wässrige Flüssigkeiten filtriert werden sollen, unterstützt man dadurch, daß man die Spitze derselben in ein zweites kleineres Filter stellt. Braucht man nur das Filtrat, so wendet man mit Vorteil Faltenfilter an, durch die die Flüssigkeit sehr viel schneller hindurchläuft. Auch die Benutzung von Rippen-trichtern ist bei schlecht filtrierenden Flüssigkeiten oft sehr empfehlenswert.

Das Aufgießen der Flüssigkeiten ist behutsam auszuführen, damit kein Verlust durch Spritzen entsteht und nicht durch den plötzlichen Stoß das Filter zerrissen wird. Man gießt an einem senkrecht angelegten Glasstabe aus nicht zu gefülltem Gefäße hinab, so daß die Flüssigkeit am Glasstabe hinabrieselnd

<sup>1)</sup> Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 1, S. 80. 1902; ferner Bd. 9, S. 389 u. 394. 1907.

<sup>2)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 31, 2, S. 1825. 1898. <sup>3)</sup> desgl. Bd. 55, 2, S. 1518. 1922.

<sup>4)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 33, S. 1. 1901.

unter sehr stumpfem Winkel etwa die Mitte der Seitenwand des Filters trifft. Um beim Aufgießen ein Herablaufen von Flüssigkeit an der Außenwand des Gefäßes zu vermeiden, ist es zweckmäßig, an die untere Seite des umgebogenen Randes, und zwar an die Stelle, an der man ausgießen will, eine Spur Fett zu bringen. Hat das Gefäß eine Schnauze, so gießt man aus dieser, wobei die Benutzung von Fett unnötig ist.

Bedeutende Beschleunigung der Filtration erreicht man durch Anwendung der Wasserstrahlpumpe; um das Zerreißen des Filters zu vermeiden, muß es durch einen in den Trichter eingesetzten Platinkonus gestützt werden. Auch die Wittschen Filterplatten sowie die Büchnerschen Nutschen in Verbindung mit der Wasserstrahlpumpe empfehlen sich zur Trennung von Flüssigkeiten und Niederschlägen und sind in vielen Fällen unentbehrlich. Schleimige und sehr fein verteilte Niederschläge eignen sich nicht zur Filtration unter vermindertem Druck.

Lassen bei schwer filtrierbaren Flüssigkeiten die gewöhnlichen Filter im Stich, so kann man sich der Ultrafiltration bedienen. Sie kommt vor allem auch in Betracht für die Abscheidung von Kolloiden aus kolloidalen Lösungen, und wird statt der Dialyse mit Vorteil dann gebraucht, wenn man nicht das Kolloid, sondern die Flüssigkeit, das sog. Dispersionsmittel, gewinnen will. Für die Ultrafiltration sind verschiedene Vorrichtungen angegeben, z. B. die Pukallfilter<sup>1)</sup> aus hartgebranntem Ton von Flaschenkürbisform, welche in die zu filtrierende Flüssigkeit hineingestellt werden und mittels eines Glasrohres in Verbindung stehen mit einer Saugflasche, die ihrerseits an die Wasserstrahlpumpe angefügt ist und das Filtrat aufnimmt, ferner die mit Eisessig-Kollodium imprägnierten Filter verschiedenster Porenweite nach Bechhold, die von Schleicher u. Schüll in den Handel gebracht werden, sowie die Membranfilter nach Zsigmondy und Bachmann<sup>2)</sup>). Diese letzteren aus Nitrocellulose hergestellten Filter werden in eine Art Nutsche eingefügt, welche auf einer Saugflasche sitzt. Sie haben verschiedene Porenweite und dienen je nach der Feinheit der Poren zur Filtration von Flüssigkeiten mit feinen Niederschlägen, von Flüssigkeiten mit kolloidaler Trübung und von echten kolloidalen Lösungen.

#### Auswaschen der Niederschläge.

8. Beim Auswaschen der Niederschläge auf dem Filter ist besonders darauf zu achten, daß der Strahl der Waschflüssigkeit weder zu heftig stoßend wirkt, noch die Filterwand oder den Niederschlag senkrecht trifft, da sonst das Papier zerreißen oder Verspritzen der Niederschläge stattfinden kann. Man darf auch die Filter nicht zu hoch mit Flüssigkeit füllen, insbesondere ist es ratsam, genügenden Raum im Filter leer zu lassen, wenn sehr feinkörnige Niederschläge abzufiltrieren sind. Im ganzen gilt die Regel, Niederschläge zunächst absetzen zu lassen (was oft in der Wärme sehr viel schneller geschieht), sodann zuerst die Flüssigkeit zu filtrieren und endlich den Niederschlag selbst aufs Filter zu bringen, indem man ihn mit der erforderlichen Waschflüssigkeit (meist also Wasser) oder mit etwas bereits filtrierter Flüssigkeit, die man zurückgießt, allmählich völlig auf dem Filter sammelt. In den meisten Fällen ist es zweckmäßig, erst dann von neuem Waschflüssigkeit auf das Filter zu bringen, wenn die vorhergehende Portion bereits das Filter passiert hat, doch ist es in einzelnen Fällen besser, das Filter stets voll Flüssigkeit zu erhalten. Um das

\*) Zu beziehen von E. de Haën, chemische Fabrik „List“, Seelze bei Hannover.

<sup>1)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 26, 1, S. 1159. 1893.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. anorg. u. allg. Chem. Bd. 103, S. 119. 1918. Über die Verwendbarkeit dieser Membranfilter s. auch Zsigmondy u. Jander: Die chemische Analyse mit Membranfiltern. Hannover, Wilh. Riemschneider 1919.

Hineinfallen von Staub und die Verdunstung im Filterrand zu verhüten, bedeckt man den Trichter mit einer Glasplatte.

Dekantieren. Sehr massige feinkörnige oder gelatinöse Niederschläge werden auf dem Filter nur sehr schwer vollkommen ausgewaschen. Hier ist es zweckmäßiger, durch Dekantieren, d. h. durch Abgießen der Flüssigkeit vom Niederschlage so gut es geht, Aufgießen einer Portion Waschflüssigkeit auf denselben, Umrühren, Absitzenlassen, Abgießen dieser Flüssigkeit und Wiederholung der Prozedur, die Niederschläge von gelösten Substanzen allmählich zu befreien. Man filtriert dann die abgegossenen Flüssigkeiten und bringt nach völligem Auswaschen endlich den ganzen Niederschlag aufs Filter.

#### Trocknen \*).

9. Nicht leicht zersetzliche Substanzen trocknet man im sog. Trockenschranke oder auf dem Wasserbade oder im kleinen Luftbade bei 100—120°; viele Substanzen können, ohne Zersetzung zu erleiden, selbst bei 130—140° getrocknet werden. In manchen Fällen ist es zweckmäßig, die Substanzen in einer Röhre im langsamen Luftstrom, der vorher durch ein mit Chlorcalciumstücken gefülltes Rohr oder eine konzentrierte Schwefelsäure enthaltende Waschflasche seines Wasserdampfes beraubt ist, zu trocknen, indem man die Röhre, welche die Substanz enthält, in ein Luftbad oder Wasserbad einlegt. Den Luftstrom erzeugt und reguliert man durch einen Aspirator.

Die Kugel des Thermometers, welches die Temperatur im Luftbade anzeigt, soll ebensowenig wie das Gefäß, in welchem sich der zu trocknende Körper befindet, irgendwo die Wandung des Luftbades direkt berühren; beide sollen in etwa gleicher Höhe mindestens 2—3 cm hoch über dem Boden des Luftbades stehen. Die Luftbäder haben gewöhnlich zu dem Zweck, das Gefäß mit der Substanz aufzunehmen, einen metallenen Träger in der angegebenen Höhe über dem Boden. Ist das Gefäß, in dem sich die zu trocknende Substanz befindet, ein metallenes, so stellt man es am besten auf ein Dreieck aus feinem Draht oder auf ein Stück Papier, damit nicht durch metallene Leitung das Gefäß und somit der zu trocknende Körper eine höhere Temperatur erlangt, als das Thermometer des Luftbades anzeigt. Man heizt das Luftbad langsam durch eine kleine Flamme bis auf die erforderliche Temperatur.

Filtrierpapier und andere hygroskopische Substanzen, somit auch alle pulverförmigen Körper, trocknet man in Gefäßen, welche man noch heiß gut verschließen kann. Insbesondere empfiehlt sich hierzu der allgemein gebrauchte Apparat, bestehend aus 2 gut aufeinanderpassenden Uhrgläsern und einem metallenen Halter, welcher die Ränder der Uhrgläser dicht aufeinandergedrückt hält. Man bringt die zu trocknenden Substanzen oder Filter in das eine der Uhrgläser, legt das andere umgekehrt lose darauf, so daß es jedoch nicht schließt, erhält die Substanz in den Uhrgläsern etwa  $\frac{1}{4}$  Stunde im Luftbade bei der erforderlichen Temperatur (Filter dürfen nicht wohl über 130° erhitzt werden), öffnet dann das Luftbad, schiebt das obere Glas über das untere, so daß sie gut schließen, schiebt auch den Halter über und läßt den Apparat mit der Substanz unter einer Glasglocke über einer Schale, welche mit konzentrierter Schwefelsäure oder Natronkalk halb gefüllt ist (Exsiccator), erkalten. Ebenfalls sehr zweckmäßig sind die sog. Trockengläschen mit eingeschliffenem Deckel.

Vakuum-  
trocknung.

Substanzen, welche hohe Temperatur nicht ohne Zersetzung ertragen, trocknet man entweder im Vakuumtrockenschrank oder bei gewöhnlicher Temperatur über konzentrierter Schwefelsäure im luftverdünnten Raume. Im

\*) Die Verfahren zum Trocknen von Organen und tierischen Flüssigkeiten werden an anderen Stellen behandelt.

letzteren Falle erfordert das Trocknen, selbst wenn die Substanzen relativ große Oberfläche haben, meist mehrere Tage; insbesondere trocknen unkoagulierte Eiweißstoffe schwer vollständig aus. Sind die Substanzen noch sehr naß, wenn man sie der Luftverdünnung aussetzen will, so vermeide man beim Evakuieren den Siedepunkt der benetzenden Flüssigkeit zu erreichen, da beim plötzlichen, meist stoßweisen Sieden leicht durch Verspritzen Verluste entstehen.

Zum Trocknen kleiner Substanzmengen, z. B. für die Elementaranalyse, empfiehlt sich sehr ein Vakuumtrockenapparat<sup>1)</sup>, welcher zugleich durch Benutzung von Flüssigkeiten bestimmter Siedepunkte auf konstante Temperatur gebracht werden kann, z. B. auf 56° bei Verwendung von Aceton, auf 80° bei Verwendung von Benzol usw.

Sicherheit über völlig vollendetes Austrocknen gibt nur Wägen der Substanz, Wiederholung des Trocknens und Wiederwägen. Ist das Gewicht beim zweiten Wägen gleich dem früher gefundenen (Gewichtskonstanz), so ist die mögliche Trockenheit erreicht.

### Glühen.

10. Substanzen, die man hohen Hitzegraden aussetzen will, sind meist vorher hinreichend zu trocknen. Man glüht sie im Porzellan- oder Platintiegel, kleine Proben auch auf einem Stück Platinblech oder im Platinlöffel; enthalten jedoch die zu glühenden Substanzen leicht reduzierbare Metalle wie Kupfer, Blei, Silber, Gold, Zinn, oder enthalten sie Jod, Brom, Phosphor, so sind alle Platingefäße zu vermeiden. Hat man auf dem Filter gesammelte Niederschläge zu glühen\*), so setzt man den Tiegel auf ein Stück Glanzpapier, öffnet vorsichtig das mit dem Niederschlage vorher gut getrocknete Filter, schüttet den Inhalt möglichst vollständig auf ein zweites Stück Glanzpapier, bringt das zusammengefaltete Filter in den Tiegel, verbrennt es, bringt darauf den Niederschlag vom Glanzpapier ebenfalls vollständig, die letzten Spuren mit Hilfe einer Federfahne in den Tiegel, desgleichen etwa neben den Tiegel gefallene Stäubchen und erhitzt abermals. Zu dem Zwecke stellt man den Tiegel auf oder richtiger in ein Dreieck von nicht zu schwachem Eisendraht oder besser Platindraht (nie auf einen Messing- oder Kupferträger); sehr zweckmäßig ist es, in einem Dreieck von Eisendraht ein kleineres Dreieck von Platindraht auszuspannen und dieses als Träger für den Tiegel zu benutzen, oder auch ein Dreieck aus Eisendraht, dessen Drähte in Tonröhren stecken. Die Erhitzung des Tiegels darf nur allmählich höher und höher durch die Flamme gesteigert werden, und man hat um so sorgfältiger die heftige Erhitzung zu vermeiden, je lebhafter Gas- und Rauchentwicklung sich zeigt. Ein Auflegen des Deckels ist im Anfang zweckmäßig, ebenso auch bei Veraschungen am Ende, um durch möglichste Steigerung der Hitze die letzten Spuren von Kohle, die die Wandungen des Tiegels nicht unmittelbar berühren, zu entfernen. Das Auflegen des Deckels im Anfange ist besonders wichtig, um Verluste durch Zerplatzen von Krystallen (Decrepitieren) oder trockener amorpher Stoffe, Eiweiß, Leim usw., zu vermeiden. Durch zu schnelles Erhitzen erhält man leicht Verluste an feuerbeständigen Substanzen durch die heftig entweichenden Gase; Eisenoxyd und Platin können beim schnellen Erhitzen von Hämatin und Platinsalmiak reichlich durch die Gase fortgerissen werden; Auflegen des Deckels wirkt hierfür eher schädlich als nützlich. Nach beendetem Glühen läßt man den Tiegel auf dem Dreieck ein wenig erkalten, bringt ihn aber, falls man die geglühte Masse wägen will, noch heiß in den Exsiccator und läßt hier völlig erkalten, ehe man zum Wägen schreitet.

\*) Es wird hier beschrieben, wie man bei quantitativen Arbeiten verfährt.

<sup>1)</sup> Brahm u. Wetzel: Abderhaldens biochem. Arbeitsmethoden Bd. 1, S. 296. 1910.

## Quantitative Methoden.

Die folgenden Paragraphen handeln von der Gewichts- und Maßanalyse. Eine Beschreibung der sog. Elementaranalyse und der gasanalytischen Methoden ist unterlassen. Eine genaue Schilderung würde den Umfang dieses Buches bedeutend vermehren, eine kurze aber für die praktischen Untersuchungen keinen Nutzen gewähren.

### Über Gewichtsanalyse.

11. Bei der gewichtsanalytischen Bestimmung handelt es sich zunächst um eine Isolierung der zu bestimmenden Substanz. Die Art der Isolierung ist in den einzelnen Fällen eine verschiedene. Fett z. B. läßt sich durch Äther, in dem es leicht löslich ist, von allen Stoffen, die in Äther unlöslich sind, befreien. Befindet sich die zu isolierende Substanz, wie es in der Regel der Fall ist, zusammen mit anderen Stoffen in Lösung, so läßt sich die Abscheidung in je nach der Natur der Substanz verschiedener Weise bewirken, z. B. dadurch, daß man einen Körper hinzufügt, der mit ihr eine unlösliche Verbindung eingeht (Chlorbarium, wenn Schwefelsäure bestimmt werden soll), oder dadurch, daß man sie direkt in eine unlösliche Modifikation überführt (Eiweiß durch Erhitzen), oder dadurch, daß man sie durch Eintragen von Salz in die Lösung zur Abscheidung bringt (Eiweiß). Die Fällungen werden in Bechergläsern, die Eiweißkoagulationen in Schalen vorgenommen. Stets ist darauf zu achten, daß die Abscheidung eine vollkommene ist: das Filtrat darf auf Zusatz weiteren Fällungsmittels keine Trübung mehr geben bzw. keine der Eiweißreaktionen mehr zeigen.

Die Filtration geschieht, wenn der Niederschlag später geglüht werden soll, durch ein aschefreies Filter, anderenfalls durch ein vorher getrocknetes und zwischen Uhrgläsern oder im Trockengläschen gewogenes Filter (§ 9). Das Trocknen des Filters muß bei derselben Temperatur geschehen, bei der später der Niederschlag getrocknet werden soll. In bezug auf Einlegen des Filters in den Trichter, Aufbringen des Niederschlags, Auswaschen desselben s. §§ 7 und 8. Das Filtrat muß völlig klar sein, evtl. solange zurückgegossen werden, bis dies der Fall ist. Die letzten Reste des Niederschlags werden mit der Federfahne oder mit einem mit Gummikappe versehenen Glasstab auf das Filter gebracht. Das Auswaschen ist fortzusetzen, bis im Filtrat keine Spur des Fällungsmittels oder eines anderen Stoffes nachgewiesen werden kann. Häufig empfiehlt sich die Verwendung der Saugpumpe.

Ist der Niederschlag rein anorganisch oder handelt es sich um ein organisches Salz, dessen Metall bestimmt werden soll, so verfährt man nach den in § 10 gegebenen Vorschriften. Der Tiegel ist vorher leer zu glühen und zu wägen und desgleichen mit dem Glührückstand. Die Differenz beider Gewichte ergibt die Menge der geglühten Substanz.

Soll der Niederschlag nicht geglüht, sondern nur getrocknet und gewogen werden, so verfährt man nach § 9. Das Trocknen und Wägen geschieht zwischen denselben Uhrgläsern bzw. in demselben Trockengläschen, in dem das Filter getrocknet war, so daß die Gewichtszunahme das Gewicht des Niederschlags direkt ergibt. Glühen sowie Trocknen muß bis zum konstanten Gewicht fortgesetzt werden.

In manchen Fällen, z. B. bei der Bestimmung von Chlorsilber, empfiehlt Goochtiegel. es sich, die Filtration durch Asbest unter Benutzung eines Goochtiegel, d. h. eines Porzellan- oder Platintiegels mit durchlöcherter Boden vorzunehmen.

Zur Herstellung dieser Filter fügt man den Goochtiegel mittels eines Gummiringes in ein Glasrohr ein, dessen nach unten verjüngtes Ende in einem Gummistopfen steckt, welcher auf eine mit der Wasserstrahlpumpe verbundene Saugflasche paßt. Auf den Boden des Tiegels breitet man

etwas (etwa 0,05—0,1 g Asbest\*) aus, saugt ihn unter Benutzung der Wasserstrahlpumpe fest, sodaß er eine dünne, aber gleichmäßige und feste Lage bildet und wäscht mit Wasser, das in langsamem Strom durchfließt, gründlich aus, bis alle Salzsäure entfernt ist. Der Tiegel wird nun getrocknet, geglüht (indem man ihn zu dem Zwecke in einen größeren Tiegel, sog. Schutztiegel, stellt, um eine direkte Einwirkung der Flammengase zu vermeiden) oder im Luftbade erhitzt und nach dem Erkalten im Exsiccator gewogen. Er ist für eine ganze Reihe Bestimmungen derselben Art zu verwenden.

Um eine Bestimmung auszuführen, fügt man den gewogenen Tiegel in die oben beschriebene Apparatur ein, filtriert den Niederschlag unter geringem negativen Druck, wäscht aus und verfährt weiter wie angegeben. Die Gewichtszunahme ergibt das Gewicht.

12. In bezug auf die Benutzung der analytischen Wage ist folgendes zu <sup>Wage.</sup> bemerken: Die Wage ist stets arretiert zu halten, außer in der einzelnen Probe beim Wägen selbst. Desgleichen ist die Tür geschlossen zu halten und nur zum Zweck des Aufbringens der Gewichte zu öffnen. Die zu wägende Substanz darf nie direkt auf die Wagschale gelegt werden. Die Gefäße, in denen Substanzen gewogen werden, sollen möglichst leicht sein und die Größe der Totalbelastung der Wage darf sich möglichst wenig der größten erlaubten Belastung (meist 100—200 g) nähern; ist letzteres unvermeidlich, so ist die Arretierung besonders behutsam und nur auf kurze Zeit zu lösen. Die zu wägenden Gegenstände müssen völlig abgekühlt sein; heiße Körper erscheinen wegen der an ihnen aufsteigenden erwärmten Luftströme leichter als sie sind. Flüchtige Stoffe, auch Wasser enthaltende Körper, sowie vorher getrocknete hygroskopische Substanzen dürfen nur in verschlossenen Gefäßen gewogen werden. Die Gewichte dürfen nur mit der Pinzette gefaßt und transportiert werden, nie mit den Fingern. Es ist zweckmäßig, die Gewichte stets auf die eine, die zu wägende Substanz auf die andere Wagschale zu legen. Die Wägung ist beendet, wenn der Zeiger nach beiden Seiten gleich ausschlägt; man Sorge aber dafür, daß die Exkursionen ausgiebig erfolgen. Schließlich addiere man zunächst nach den fehlenden Gewichten im Gewichtskasten das Gewicht der Substanz und kontrolliere dann beim Zurückbringen der Gewichte in den Kasten. Die Belastung darf auf der Wage nicht längere Zeit stehen bleiben, am wenigsten einseitige Belastung.

Zum Abwägen trockener pulveriger Substanzen werden am besten auf der einen Seite zugeschmolzene Röhren von ca. 1 cm lichter Weite und 10—15 cm Länge (Wägeröhren) benutzt. Man tariert eines derselben auf einer groben Wage, legt auf die andere Wagschale so viel Gramme oder Bruchteile von Grammen in Gewichten, als man ungefähr Substanz für die Bestimmung benutzen will und füllt nun Substanz in das Röhren, bis ungefähr Gleichgewicht erreicht ist. Jetzt bringt man in soviel Röhren, als man Kontrollanalysen ausführen will, die der abgewogenen dem Augenschein nach gleiche Menge, stellt die Röhren zusammen in ein Becherglas, wägt auf einer feinen Wage genau, notiert das Gewicht, schüttelt den Inhalt eines Röhrens in das für den jeweiligen Zweck geeignete Gefäß (Platinschale, Becherglas, Kolben\*\*) aus, stellt es in das Becherglas zurück, wägt und notiert wieder das Gewicht. Die Differenz ergibt die Menge der Substanz. Nun wird ein zweites Röhren in ein anderes Gefäß ausgeschüttet und in derselben Weise verfahren usw. Sollen klebrige Substanzen (Muskeln, Organe) in genau abgewogener Menge in einen Kolben gebracht werden, so wägt man sie auf einem vorher gewogenen Stückchen asche- (und stickstoff-)freien Filtrierpapiers ab und schiebt sie in Form eines allseitig von Papier umschlossenen Paketchens durch den Hals des Kolbens hindurch. Statt dessen kann man auch Bruchstücke eines Reagensglases, von dem man sich vorher überzeugt hat, daß es den Kolbenhals passiert, als Träger benutzen.

\*) Langfaseriger glänzender Asbest wird mit der Schere in 5—7 cm lange Stücke geschnitten und in Mengen von je einigen Grammen in einem Zylinder mit etwa 300 ccm 5 proz. Salzsäure mit Hilfe eines starken Luftstromes, welcher einige Minuten hindurchgeht, fein zerteilt, dann in verdünnter Salzsäure aufbewahrt.

\*\*) Soll ein Kolben, z. B. ein Kjeldahlkolben benutzt werden, so muß das Röhren mindestens die Länge des Kolbenhalses haben, damit man es vor dem Ausschütten durch den Kolbenhals hindurchschieben kann.

### Über Maßanalyse.

13. Für volumetrische oder titrimetrische Bestimmungen dienen Lösungen von bekanntem Gehalt, bekanntem „Wirkungswert“ (Titrierflüssigkeiten), welche zu den Lösungen, die die zu bestimmende Substanz enthalten, in gemessenen Mengen aus Büretten zugesetzt werden bis zur sog. Endreaktion. Aus der Anzahl der bis zum Eintritt der Endreaktion gebrauchten Kubikzentimeter ergibt sich das Resultat durch Rechnung. Die Endreaktion ist fast stets eine Farbenreaktion.

Die Titrierflüssigkeiten sind entweder Normallösungen oder empirische Lösungen.

Normallösungen enthalten in 1 l Wasser das Äquivalentgewicht einer Säure, einer Base, eines Salzes in Grammen gelöst. Das Äquivalentgewicht fällt bei einwertigen Säuren und Basen (z. B. HCl, NaOH) mit dem Molekulargewicht zusammen, bei mehrwertigen Säuren und Basen [z. B. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Ca(OH)<sub>2</sub>] findet man es, wenn man das Molekulargewicht durch die Wertigkeit dividiert.

Bei physiologisch-chemischen Untersuchungen benutzt man meist schwächere Lösungen, z. B.  $\frac{1}{10}$ -,  $\frac{1}{20}$ -,  $\frac{1}{100}$ -Normallösungen ( $\frac{n}{10}$ -,  $\frac{n}{20}$ -,  $\frac{n}{100}$ -Lösungen), die also den 10., 20., 100. Teil des Äquivalentgewichtes im Liter enthalten.

Empirische Lösungen dienen ganz bestimmten Zwecken. Der Gehalt wird mit Rücksicht auf die Einfachheit der Rechnung gewählt, so ist z. B. die für die Chlortitrierung benutzte Silberlösung so hergestellt, daß 1 ccm gerade 0,01 g NaCl entspricht.

Man unterscheidet unter den volumetrischen Methoden: 1. Acidi- und Alkalimetrie, 2. Fällungsanalysen, 3. Oxydimetrie mittels Permanganat, 4. Jodometrie.

14. Allgemeine Vorbemerkungen. 1. Genaue Abmessungen können nur in Maßkolben, Büretten, Pipetten vorgenommen werden. Maßzylinder dienen nur zu annähernden Abmessungen. 2. Alle Gefäße, Büretten, Pipetten, Trichter, welche zur Aufnahme oder Herstellung von Titrierflüssigkeiten dienen, müssen trocken sein oder wiederholt mit der betreffenden Flüssigkeit ausgespült werden. Dasselbe gilt für alle sonstigen Abmessungen, welche bei der Berechnung der Resultate in Betracht kommen. 3. Beim Auffüllen von Maßkolben, Einstellen der Flüssigkeit in Büretten und Pipetten ist darauf zu achten, daß die untere Grenze des dicken (bei durchfallendem Licht durch Reflexion und Brechung dunkel erscheinenden) Ringes, welcher sich an der Peripherie des Niveaus durch Emporsteigen der Flüssigkeit an der Glaswand bildet, auf der Marke oder dem betreffenden Teilstrich gerade aufsitzt. Das Gefäß muß sich dabei in vollkommen vertikaler Stellung, das Auge in gleicher Höhe mit dem Flüssigkeitsniveau befinden. Dasselbe gilt für das Ablesen des Flüssigkeitsstandes in Büretten. Die Einteilung der Bürettenskala in  $\frac{1}{10}$  ccm gestattet  $\frac{1}{20}$  ccm noch genau abzulesen. Ein möglichst genaues Ablesen ist durchaus erforderlich. Vor Beginn einer jeden Titrierung ist der Flüssigkeitsstand in der Bürette zu notieren. 4. Beim Füllen der Büretten ist darauf zu achten, daß alle Luft aus dem Gummiverbindungsstück und der Glasspitze entfernt wird. Man erreicht dies durch wiederholtes schnelles Öffnen des Bürettenhahnes. 5. Die Titrierungen mit Ausnahme derjenigen, bei denen der Gehalt schon annähernd bekannt ist, sind wiederholt auszuführen. Die erste hat nur den Zweck einer Orientierung über die ungefähr nötige Menge und wird deshalb ganz schnell ausgeführt. Man kommt bei Befolgung dieses Rates trotz der Wiederholung schneller zum Ziel, als wenn man die Titrierlösung von vornherein so langsam zuläßt, wie es nötig ist, um nicht über das Ziel hinauszuschießen. Bei der Alkali- und Acidimetrie ist nur eine Titrierung erforderlich, da man hier den Vorteil hat, einen zugefügten Überschuß durch Zurücktitrieren wieder



korrigieren zu können. 6. Die für eine Titrierung erforderliche Kubikzentimeteranzahl soll weder eine zu kleine noch eine zu große sein. Braucht man z. B. bei der Acidimetrie für 5 ccm einer Säure nur 2 oder 3 ccm eines Normalalkali, so wiederholt man die Titrierung unter Benutzung der vielleicht vierfachen Menge, oder ist in einem anderen Falle nach Zufügen von 25 ccm die Endreaktion immer noch nicht erreicht, so wiederholt man die Titrierung ebenfalls, nachdem die Säure mit gemessenem Volumen Wasser verdünnt ist.

#### *Acidimetrie und Alkalimetrie.*

Erforderliche Lösungen:  $\frac{n}{10}$ -Natronlauge,  $\frac{n}{10}$ -Schwefelsäure und Indikatoren.

15. **Indikatoren** sind Farbstofflösungen, welche beim Übergang der sauren Indikatoren. in die alkalische Reaktion und umgekehrt ihre Farbe ändern und dadurch die Endreaktion angeben. Als solche kommen unter vielen anderen in Betracht Lackmus, Phenolphthalein, Methylorange, Methylrot, Lackmoid.

**Lackmuslösung.** Sie wird hergestellt, indem man von dem besten käuflichen Lackmus einen wässerigen Auszug herstellt, filtriert, das Filtrat zum Kochen erhitzt und tropfenweise verdünnte Salzsäure hinzufügt, bis auch nach längerem, 7—8 Minuten dauerndem Kochen die violette Farbe nicht mehr in Blau übergeht, sondern deutlich bestehen bleibt. Nach dem Erkalten fügt man das gleiche Volumen Alkohol hinzu und hebt die Flüssigkeit in mit Wattebausch locker verschlossener Flasche auf. Sie wird durch Säuren rot, durch Alkalien blau gefärbt und eignet sich zur Titration von starken, besonders anorganischen Säuren (nicht von Phosphorsäure), von Hydroxyden der Alkali- und Erdalkalimetalle und von Ammoniak.

**Phenolphthaleinlösung.** Man benutzt eine etwa 1proz. alkoholische Lösung. Sie färbt sich auf Zusatz von Säuren nicht, wird aber mit einer Spur Alkali oder Alkalicarbonat schön rot und eignet sich zur Titration von Säuren, auch schwachen Säuren und starken Basen, nicht von Ammoniak und schwachen Basen.

**Methylorangelösung.** Man benutzt eine etwa 0,02proz. wässrige Lösung von p-Dimethylaminoazobenzol-p-sulfosäure  $N(CH_3)_2 \cdot C_6H_4 \cdot N=N \cdot C_6H_4 \cdot SO_3H$ . Sie färbt sich durch Säuren rot, durch Alkalien und Ammoniak gelb und eignet sich zur Titration von starken Säuren (nicht von organischen), starken und schwachen Basen, auch Ammoniak.

**Methylrotlösung.** Man benutzt eine 0,2proz. alkoholische Lösung von p-Dimethylaminoazobenzol-o-carbonsäure  $N(CH_3)_2 \cdot C_6H_4 \cdot N=N \cdot C_6H_4 \cdot COOH$ . Sie färbt sich durch Säuren violettrot, durch Laugen gelb und eignet sich zur Titration von schwachen Basen, Ammoniak.

**Lackmoidlösung.** Man benutzt eine etwa 0,2proz. Lösung von reinem Lackmoid. Ist sie nicht rein blau, sondern etwas violett, so fügt man ein wenig einer alkoholischen Lösung von Malachitgrün hinzu. Sie färbt sich auf Zusatz von Säuren gelbrot und eignet sich zur Titration von starken Säuren und Basen, auch von Ammoniak, aber nicht zur Titration von schwachen Säuren.

16. **Ausführung einer Bestimmung.** Man fülle 2 Büretten, die eine mit  $\frac{n}{10}$ -NaOH, die andere mit  $\frac{n}{10}$ -H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, bringe ein bestimmtes Volumen der auf ihren Gehalt an Säure zu bestimmenden Flüssigkeit, z. B. 5 ccm verdünnter Salpetersäure, mit einer Pipette in ein Kölbchen, füge einige Tropfen eines Indikators, z. B. Lackmustinktur, hinzu und lasse aus der Bürette unter Umrühren solange  $\frac{n}{10}$ -NaOH zufließen, bis die rote Farbe in Blau umschlägt. Jetzt gebe man aus der anderen Bürette vorsichtig  $\frac{n}{10}$ -H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> hinzu, bis die blaue Farbe eben wieder in Rot übergegangen ist und gehe so vorsichtig hin

und her, bis die Flüssigkeit einen violetten Farbenton (sog. Übergangsfarbe) zeigt, welcher auf Zusatz eines Tropfens Säure in Rot, eines Tropfens Alkali in Blau übergeht. Jetzt ist die Titrierung beendet. Die Anzahl der verbrauchten Kubikzentimeter  $n/_{10}$ -NaOH abzüglich der verbrauchten Kubikzentimeter  $n/_{10}$ -H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ergeben mit 6,3 (der 10. Teil des Äquivalentgewichtes der HNO<sub>3</sub>) multipliziert in Milligramm die Menge HNO<sub>3</sub>, welche in 5 ccm der verdünnten Salpetersäure enthalten war.

Acidimetrische und alkalimetrische Bestimmungen werden bei physiologisch-chemischen Untersuchungen vielfach angewandt, z. B. bei der Bestimmung des Stickstoffs nach Kjeldahl, bei der Ammoniakbestimmung, bei der Untersuchung der Acidität von Harn, Magensaft, der Alkaleszenz von Blut, bei der Phosphorsäurebestimmung nach A. Neumann.

#### 17. Herstellung von $n/_{10}$ -Natronlauge und $n/_{10}$ -Schwefelsäure.

a) Mit Hilfe von  $n/_{10}$ -Oxalsäure. Da Ätznatron und Schwefelsäure nicht frei von Wasser und Kohlensäure bzw. Wasser abgewogen werden können, so geht man von der  $n/_{10}$ -Oxalsäure aus und wägt von einer gut krystallisierten (nicht verwitterten) pulverisierten Oxalsäure (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O<sub>4</sub> + 2 H<sub>2</sub>O) 6,3024 g (der 10. Teil des Äquivalentgewichtes) auf einem Uhrglas genau ab, bringt sie ohne Verlust mit Hilfe der Spritzflasche in ein Becherglas, fügt Wasser hinzu, löst völlig auf, führt die Flüssigkeit quantitativ unter wiederholtem Nachspülen mit Wasser in einen Litermaßkolben über, füllt bis zur Marke mit Wasser auf und mischt gut.

Um mit Hilfe dieser  $n/_{10}$ -Oxalsäure die  $n/_{10}$ -NaOH herzustellen, werden etwa 12 ccm einer 33proz. kohlenstofffreien Natronlauge in einem großen Maßzylinder mit Wasser auf etwa 1000 ccm verdünnt und gut gemischt. Mit dieser Lösung füllt man eine Bürette, eine andere mit der  $n/_{10}$ -Oxalsäure, läßt von letzterer 10 ccm in ein Kölbchen fließen, fügt einige Tropfen Indikator hinzu und nun unter vorsichtigem Umschütteln solange von der Natronlauge, bis der Farbenumschlag erfolgt. Man liest ab, wieviel Kubikzentimeter gebraucht sind. Sind das z. B. 6,8, so hat man zu je 6,8 ccm der Natronlauge 3,2 ccm Wasser hinzuzufügen, um sie zu einer  $n/_{10}$ -NaOH zu machen. 6,8 ccm der Natronlauge sind also mit Wasser auf 10 ccm oder 680 ccm auf 1000 ccm zu verdünnen. Da bei dieser ersten Titration leicht ein kleiner Fehler unterläuft und der Fehler einer zu starken Verdünnung schwerer wieder gutzumachen ist als der umgekehrte, so empfiehlt es sich durchaus, etwas weniger Wasser als die berechnete Menge zuzufügen, also 680 ccm durch Zusatz von Wasser nicht auf 1000 ccm, sondern nur etwa auf 980 ccm zu bringen. Jetzt wird die gut gemischte Flüssigkeit in eine Bürette gefüllt und die Titrierung wiederholt. Wieder erfährt man durch Ablesen und Rechnung die Menge des noch zuzufügenden Wassers, setzt aber auch jetzt etwas weniger Wasser zu, als die Rechnung ergibt. Nach einer 2. oder 3. Wiederholung hat man bei genauem Arbeiten erreicht, daß zur Neutralisation von 10 ccm  $n/_{10}$ -Oxalsäure genau 10 ccm der Natronlauge erforderlich sind, daß also die Natronlauge eine  $n/_{10}$ -NaOH ist.

Die Herstellung der  $n/_{10}$ -H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> geschieht mit Hilfe der  $n/_{10}$ -NaOH ganz in der eben beschriebenen Weise.

b) Mit Hilfe der Natriumpresse von A. Kossel<sup>1)</sup>.

Dieser Apparat gestattet eine sehr einfache und schnelle Herstellung von  $n/_{10}$ -NaOH aus metallischem Natrium.

#### *Fällungsanalysen.*

18. Fällungsanalysen nennt man diejenigen volumetrischen Bestimmungen, bei denen die Titrierflüssigkeit einen Niederschlag hervorruft. Man verwendet

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 33, S. 1. 1901.

hierbei meist empirische Lösungen. Die Endreaktion besteht in den meisten Fällen in dem Auftreten eines andersgefärbten Niederschlags, der durch die als Indikator dienende Substanz hervorgerufen wird. Gewöhnlich kann man den Indikator von vornherein der zu titrierenden Flüssigkeit zusetzen (Salzsäurebestimmung nach Mohr und nach Volhard), zuweilen muß man sich der sog. Tüpfelmethode bedienen (Phosphorsäuretitrierung mit Uranylacetat und Ferrocyanium, Harnstofftitrierung).

#### *Oxydimetrie mittels Permanganat.*

19. Bei der Oxydation findet folgende Reaktion statt:



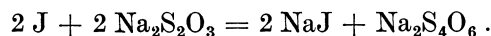
2 Mol. Permanganat liefern also 5 Atm. Sauerstoff, welche z. B. 5 Mol. Oxalsäure zu oxydieren vermögen ( $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 + \text{O} = 2 \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ ).

Da die Permanganatlösungen sich leicht zersetzen, stellt man Lösungen her, welche ungefähr 3—3,5 g Kaliumpermanganat im Liter enthalten und ermittelt vor jedesmaligem Gebrauch den Wirkungswert durch Titration mit  $\frac{n}{10}$ -Oxalsäure. Braucht man schwächere Lösungen, so löst man nur 0,3—0,35 g im Liter und titriert mit  $\frac{n}{100}$ -Oxalsäure. Die abgewogene Menge Kaliumpermanganat wird in einigen 100 ccm heißem Wasser gelöst, auf 1 l verdünnt, nach einigem Stehen vom etwa gebildeten Bodensatz abgegossen und die Lösung in einer Flasche mit Glasstopfen aufgehoben. Für die Feststellung des Titors bringt man 10 ccm der Oxalsäure in einen Kolben, fügt überschüssige verdünnte Schwefelsäure hinzu, erwärmt auf 70—80° und läßt nun die in einer Glashahnbürette befindliche Permanganatlösung unter Umschütteln zufließen, bis ein Tropfen eine auch beim Umschütteln nicht verschwindende eben erkennbare Rosafärbung bewirkt (Endreaktion). Die bis zum Eintritt der Endreaktion erforderlichen Kubikzentimeter vermögen gerade 0,063 bzw. 0,0063 g Oxalsäure zu oxydieren, indem sie 0,008 bzw. 0,0008 g Sauerstoff liefern.

Diese Titrierung findet Verwendung z. B. bei der Bestimmung von Eisen und von Calcium, bei der Zuckerbestimmung nach Bertrand.

#### *Jodometrie.*

20. Man braucht dazu eine  $\frac{n}{10}$ -Natriumthiosulfat- und eine  $\frac{n}{10}$ -Jodlösung. Die Reaktion verläuft nach folgender Gleichung:



Herstellung der  $\frac{n}{10}$ -Natriumthiosulfatlösung. Man wiegt 25 g krystallisiertes Thiosulfat ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 + 5 \text{H}_2\text{O}$ ) ab, löst zu 1 l und läßt 14 Tage stehen (um die Kohlensäure des Wassers einwirken zu lassen), andererseits werden von aus heißem Wasser umkrystallisiertem, fein gepulvertem und im Wasserbadtrockenschrank bis zum konstanten Gewicht getrocknetem Kaliumbichromat 4,9033 g abgewogen und zu 1 l gelöst. Von dieser Lösung bringt man 25 ccm mit der Pipette in einen Glasstopfen-Erlenmeyerkolben, setzt 1,5 g reines Jodkalium, 90 ccm Wasser und 10 ccm Salzsäure (15 proz.) hinzu, läßt einige (höchstens 5) Minuten stehen und titriert das ausgeschiedene Jod ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 + 6 \text{KJ} + 14 \text{HCl} = 8 \text{KCl} + 2 \text{CrCl}_3 + 7 \text{H}_2\text{O} + 6 \text{J}$ ) mit der Thiosulfatlösung, die sich in der Bürette befindet. Die als Indikator dienende Stärkelösung\*) (2 ccm) wird erst ganz zuletzt zugesetzt. Gegen Ende findet die Reaktion langsamer statt, so daß man nach jedem Tropfen etwas warten muß, ob die Blaufärbung nicht verschwindet. Haben wiederholte Titrations das gleiche

\*) Hergestellt durch Auflösen von etwa 1 g löslicher Stärke in 500 ccm Wasser in der Siedehitze.

Resultat ergeben, so verdünnt man die Thiosulfatlösung mit so viel Wasser, daß für 25 ccm der Kaliumbichromatlösung gerade 25 ccm Thiosulfatlösung nötig sind, und kontrolliert durch Wiederholung der Titrierung. Die Lösung behält monatelang ihren Titer.

Herstellung der  $n_{10}$ -Jodlösung. Man bringt 12,7 g Jod in einen Litermaßkolben, fügt 25 g Jodkalium und 50 ccm Wasser hinzu, füllt, wenn alles Jod gelöst ist, bis zur Marke auf und mischt. Von dieser Lösung bringt man mit einer Pipette 25 ccm in einen Erlenmeyerglasstopfenkolben, fügt Wasser hinzu und läßt  $n_{10}$ -Thiosulfatlösung zufließen, bis die Flüssigkeit nur noch schwach gefärbt ist. Nach Zusatz von 2 ccm Stärkelösung läßt man tropfenweise zufließen bis zur Entfärbung. Hat eine zweite Titrierung dasselbe Resultat ergeben, so verdünnt man die Jodlösung mit der aus dem Ergebnisse der Titration berechneten Menge Wasser und kontrolliert durch Wiederholung der Titration.

Beide Flüssigkeiten sind in dunkeln, mit Glasstopfen versehenen Gefäßen aufzubewahren; die Jodlösung muß häufig auf ihren Titer geprüft werden. 1 ccm der Thiosulfatlösung entspricht 0,012692 g Jod.

Mit Hilfe der Jodometrie bestimmt man z. B. Eisen, Phenole, Aceton, Rhodanwasserstoff.

Für die Bestimmung der geringen Mengen von Eisen in der Asche von Harn und Geweben empfiehlt A. Neumann eine  $n_{250}$ -Thiosulfatlösung, deren Titer er mit Hilfe einer Eisenchloridlösung von bekanntem Gehalt einstellt (§ 542).

## Einige physikalische Methoden.

### Untersuchung von Krystallen.

21. Die Darstellung der Krystalle der verschiedenen krystallisierbaren Körper ist so verschiedenartig, daß sich allgemeine Regeln kaum geben lassen. Nur für die mikroskopische Untersuchung ist es von Wichtigkeit, darauf aufmerksam zu machen, daß man in vielen Fällen am besten tut, die Krystalle des Körpers, die man untersuchen will, auf dem Objektträger sich selbst bilden zu lassen, da feine Krystalle auch bei vorsichtiger Behandlung beim Übertragen auf den Objektträger meist sehr beschädigt werden. Man bringt zu dem Zwecke einen Tropfen der konzentrierten Lösung der zu prüfenden Substanz auf den Objektträger, legt ein Deckgläschen auf und läßt einige Zeit an der Luft oder, wenn der Körper leicht zerfließende Krystalle bildet, im Exsiccator stehen, läßt nötigenfalls von Zeit zu Zeit noch einige Tropfen der ganz konzentrierten Lösung von der Seite hinzufließen, untersucht schließlich die gebildeten Krystalle mit dem Mikroskope, während sie allseitig von der konzentrierten Lösung umgeben sind. Um bei unregelmäßigen Knollen- oder Kugelformen zu entscheiden, ob sie aus Krystallen oder aus amorphen Stoffen gebildet sind, untersucht man die fraglichen Körper unter Anwendung des Polarisationsmikroskops und eines dünnen Gips- oder Glimmerblättchens, welches bei gekreuzten Nicols so unter den Objektträger geschoben ist, daß das Licht erst durch das Glimmerblättchen und dann durch die zu prüfenden Krystalle geht. Ist das Glimmerblättchen richtig orientiert, so ist das Gesichtsfeld lebhaft gefärbt und darüber befindliche Krystalle werden, wenn sie nicht dem regulären System zugehören, je nach ihrer Lage gleiche oder andere Farben haben als das übrige Gesichtsfeld, während amorphe Substanzen keine Änderung oder Färbung des Gesichtsfeldes hervorrufen. Tierische oder pflanzliche Gewebsteile zeigen jedoch so wie die nichtregulären Krystalle Doppelbrechung und lassen sich daher durch die Prüfung im polarisierten Lichte mit dem Glimmerblättchen nicht von letzteren unterscheiden. Auch solche Substanzen, welche in Wasser aufgequollen auf dem

Objektträger eintrocknen, zeigen während und nach dem Trocknen Doppelbrechung, da sie beim Trocknen eine unregelmäßige Spannung erhalten; so zeigt es sich z. B. beim Leim. Es sind daher alle auf Krystallisation zu prüfenden Körper während der Untersuchung vor dem Trocknen zu schützen, indem man sie stets von Flüssigkeit umgeben erhält.

### Bestimmung des spezifischen Gewichts von Flüssigkeiten.

22. a) Durch Aräometer. Das Gefäß, in dem die Bestimmung vor- Aräometer. genommen werden soll, muß eine solche Weite haben und so hoch mit der zu prüfenden Flüssigkeit gefüllt sein, daß das Aräometer, ohne die Wandungen und den Boden zu berühren, schwimmen kann. Das Instrument soll in vollkommen reinem und trockenem Zustande langsam in die Flüssigkeit eingesenkt werden und darf während der Ablesung nicht an die Wandung anstoßen. Der Teilstrich der Skala, bei welchem das Niveau der Flüssigkeit die Spindel des schwimmenden Aräometers schneidet, gibt bei zweckmäßig hergestellten Instrumenten direkt das spezifische Gewicht an.

Die Aräometerspindeln sind gewöhnlich für Flüssigkeiten von 15—17° angefertigt und eine Korrektur ihrer Angabe ist nur dann nötig, wenn die Temperatur der mit ihnen untersuchten Flüssigkeiten hiervon mehr als einige Grade abweicht. Es ist am einfachsten, in solchen Fällen die Flüssigkeit auf die richtige Temperatur zu bringen.

Zur Bestimmung des spezifischen Gewichts trüber Flüssigkeiten wie Blut, Milch, Eiter sind Aräometer nicht zu verwenden.

23. b) Durch Pyknometer. Diese Bestimmung, am besten in einem mit Pyknometer. Thermometer versehenen Pyknometer ausgeführt, ist für genaue Bestimmungen die allein zulässige.

Zur Ausführung ist zuerst das Gewicht des leeren und trockenem Pyknometers zu ermitteln, dann ist dasselbe mit ausgekochtem, destilliertem Wasser ganz zu füllen, nach Entfernung etwaiger Luftbläschen das Thermometer einzusetzen und die Oberfläche des Fläschchens schnell abzutrocknen, ohne es hierbei mit der Hand zu erwärmen. Nun hat man die Kappe auf das Capillarrohrchen aufzusetzen, die Temperatur am Thermometer abzulesen, einen etwa herabgelaufenen Tropfen abzutrocknen und zu wägen. Man gießt dann das Wasser aus und trocknet das Fläschchen, Thermometer usw. sorgfältig, füllt das Fläschchen mit der Flüssigkeit, deren spezifisches Gewicht bestimmt werden soll, in der angegebenen Weise, setzt das Thermometer ein, trocknet außen gut ab, setzt die Kappe auf das Capillarrohr, liest die Temperatur ab und wägt. Zieht man das Gewicht des Pyknometers von den beiden gefundenen Gewichten, 1. des Pyknometers mit Wasser und 2. des Pyknometers mit Flüssigkeit ab, so erhält man die Gewichte gleicher Volumina von Wasser und von der zu untersuchenden Flüssigkeit, und wenn beide Bestimmungen bei derselben Temperatur vorgenommen waren, so gibt das Gewicht der Flüssigkeit dividiert durch das Gewicht des gleichen Volumen Wasser das spezifische Gewicht jener Flüssigkeit. Meist werden jedoch die Füllungen und Wägungen des Pyknometers mit Wasser und mit den zu untersuchenden Flüssigkeiten bei verschiedenen Temperaturen vorgenommen und das Gewicht des Wassers, welches das Pyknometer füllt, ist entsprechend den Temperaturen, bei denen das Gewicht der Flüssigkeiten bestimmt wurde, zu korrigieren. Ist z. B. das Gewicht des Wassers, welches das Pyknometer bei 21° füllt, zu 24,1080 g gefunden und ferner das Gewicht einer Flüssigkeit, welche das Pyknometer bei 12° füllt, bestimmt, so ist zunächst zu berechnen, wie groß das Gewicht Wasser ist, welches das Pyknometer bei 12° füllen würde. Die Tabelle im Anhang gibt die spezifischen

Gewichte des Wassers für die verschiedenen Temperaturen; bei 21° ist dasselbe 0,998065, bei 12° dagegen 0,999544, hiernach ist das Gewicht des Wassers, welches bei 12° das Pyknometer füllen würde,  $= \frac{0,999544}{0,998065} \cdot 24,1080 = 24,1431$ .

Durch dies Gewicht sind nun die Gewichte der bei 12° dieses Pyknometer füllenden Flüssigkeiten zu dividieren und so die spezifischen Gewichte der letzteren zu erhalten. Es ist selbstverständlich, daß mit dem Pyknometer auch die Gewichte von festen Körpern oder von Gemengen, z. B. Flüssigkeiten, welche feine Teilchen suspendiert enthalten (Harne mit Sedimenten, Milch, Blut usw.), ermittelt werden können. — Sehr genaue Bestimmung des spezifischen Gewichts erreicht man mittels eines von Sprengel angegebenen Apparates<sup>1)</sup>.

### Bestimmung des Schmelz-, Koagulations- und Siedepunktes.

Schmelzpunkt.

24. Zur Bestimmung des Schmelzpunktes (Sp., Fp. oder F.) bringt man eine kleine Menge der völlig trockenen Substanz in ein Capillarröhrchen und befestigt dies mit einem Gummiring oder besser mit Hilfe eines kleinen Tröpfchens Schwefelsäure (durch Adhäsion) an ein Normalthermometer in der Weise, daß die Substanz sich in der Höhe des Quecksilbergefäßes befindet. Das Thermometer steckt in einem Korkstopfen und taucht in einen zu  $\frac{4}{5}$  mit konzentrierter Schwefelsäure gefüllten Jenaer Kolben bis zur Mitte der Flüssigkeit ein, indem es durch den locker auf der Mündung des Kolbenhalses aufsitzenden Stopfen gehalten wird. Der Kolben steht auf einem Drahtnetz und wird durch eine unterstehende Flamme erhitzt. Man beobachtet, bei welcher Temperatur die Substanz schmilzt, ob dem Schmelzen ein Zusammensintern vorangeht, ob sich die Substanz verfärbt, zersetzt usw. Der so gefundene Schmelzpunkt ist der sog. unkorrigierte. Er ist etwas zu niedrig, da der Quecksilberfaden des Thermometers zum großen Teil außerhalb der Schwefelsäure sich befindet. Den korrigierten Schmelzpunkt [Fp. (korr.)] findet man nach der Formel  $Fp. (korr.) = t + 0,000154 \cdot a \cdot (t - t')$ , wobei  $a$  die Anzahl der herausragenden Quecksilberfadengrade,  $t$  die abgelesene Temperatur,  $t'$  die Mitteltemperatur des herausragenden Fadens bedeutet. Um die letztere zu finden, benutzt man ein Hilfsthermometer, dessen Quecksilberkugel sich ungefähr in der Mitte des herausragenden Fadens befindet. Statt dessen kann man zur Ermittlung des korrigierten Schmelzpunktes sich abgekürzter (Zinckescher) Thermometer, welche nur ein kleines Temperaturintervall umfassen, bedienen. Am bequemsten ist es, von vornherein für eine ganze Anzahl von Temperaturgraden durch Vergleich der Zinckeschen mit dem zu benutzenden Normalthermometer für dieses die entsprechenden richtigen Werte festzustellen und in einer Tabelle zusammenzustellen. Zur Bestimmung des Schmelzpunktes hochschmelzender Substanzen (über 300°) s. Kutscher und Otori<sup>2)</sup>.

Koagulationspunkt.

Zur Bestimmung der Koagulationstemperatur von Eiweißstoffen bringt man die Eiweißlösung in ein Reagensglas, fixiert dieses in einem mit Wasser gefüllten und auf einem Drahtnetz stehenden Becherglas in der Weise, daß das Flüssigkeitsniveau im Becherglas höher steht, als im Reagensglas, bringt in das Reagensglas ein Thermometer, welches, durch einen auf dem Reagensglas lose ruhenden Stopfen gehalten, bis in die Mitte der Flüssigkeit eintaucht und erwärmt nun langsam unter gleichzeitigem Umrühren des Wassers mit einem Rührer, bis in der klaren Eiweißlösung eine Abscheidung erfolgt. Nun

<sup>1)</sup> S. bei Landolt: Das optische Drehungsvermögen organischer Substanzen. 2. Aufl. Braunschweig 1898, S. 406; vgl. hier auch die Angaben über die für möglichst genaue Bestimmungen erforderlichen Korrekturen.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 42, S. 193. 1904.

wird die Temperatur abgelesen, abfiltriert und das klare Filtrat weiter erhitzt, beim Erscheinen einer neuen Abscheidung in derselben Weise verfahren und so fort.

Zur Bestimmung des Siedepunktes (Sdp. oder Kp.) bringt man die Flüssigkeit in einen kleinen Rundkolben mit langem Hals, in dessen oberem Teil ein schräg nach abwärts geneigtes Ansatzrohr eingeschmolzen ist (Destillierkölbchen). Das Ansatzrohr führt in eine Vorlage. Bei niedrig siedenden Flüssigkeiten ist zwischen Ansatzrohr und Vorlage ein längeres Rohr oder ein Liebig'scher Kühler einzuschalten. Das Destillierkölbchen ist durch einen Stopfen verschlossen, in dessen Bohrung ein Thermometer steckt. Das Thermometer soll sich möglichst seiner ganzen Länge nach im Kolbenhals befinden, aber nicht in die Flüssigkeit eintauchen, damit der Quecksilberfaden während des Siedens ganz vom Dampf umgeben ist. Ist das nicht der Fall, so muß dieselbe Korrektur angebracht werden wie beim Schmelzpunkt (s. oben).

### Bestimmung der Löslichkeit.

25. Man schüttelt die möglichst fein gepulverte Substanz mit einer zur Lösung unzureichenden Menge Wasser oder eines anderen Lösungsmittels in einer Flasche stundenlang, am besten in einem Schüttelapparat, filtriert, verdunstet einen abgewogenen Teil des klaren Filtrats, trocknet den Rückstand und wägt. Um die Löslichkeit bei Siedetemperatur zu bestimmen, kocht man längere Zeit, etwa 1 Stunde, am Rückflußkühler, filtriert kochend heiß, wägt nach dem Erkalten, verdunstet, trocknet den Rückstand und wägt wieder.

### Optische Methoden.

Die Benutzung optischer Untersuchungsmethoden hat sich für die Lösung theoretisch- wie praktisch-chemischer Fragen bekanntlich außerordentlich hilfreich erwiesen. Ein hervorragendes Interesse auch für medizinisch-chemische Zwecke verdienen ohne Zweifel die Methoden der Spektral- und der Circumpolarisationsuntersuchungen, ferner die Colorimetrie, Nephelometrie und Refraktometrie. Seltener anwendbar, aber zuweilen von Wert ist die Untersuchung der Fluorescenz.

### Spektraluntersuchungen.

26. Abb. 1 gibt die Ansicht eines größeren Spektroskops. Dasselbe besteht aus dem Kollimatorrohr *ab*, an dessen einem Ende, dem Licht zugekehrt, bei *a* ein vertikaler Spalt, durch Mikrometerschraube enger oder weiter stellbar, sich befindet, während am anderen Ende des Rohrs bei *b* die Konvexlinse angebracht ist. Der Spalt soll im Brennpunkt der Konvexlinse liegen.

Das durch den Spalt eintretende Licht wird durch den Kollimator parallel gemacht und auf das Prisma *c* geworfen; in diesem Prisma gebrochen und in das Spektrum aufgelöst, treten die Lichtstrahlen in das astronomische Fernrohr *de* ein, welches gewöhnlich 6—8 malige Vergrößerung hat, und gelangen von da bei *e* zum Auge des Beobachters; am Kopfe des Rohres *g* *h* bei *h* befindet sich eine feine durch eine Lampe zu beleuchtende (womöglich auf Wellenlängen geeichte) Skala auf Glas. Ist diese beleuchtet, so stellt ihr Bild,

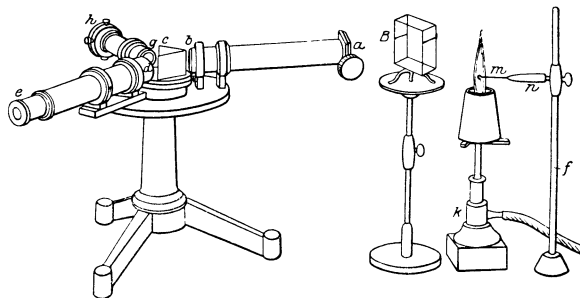


Abb. 1. Spektroskop.

von der dem Fernrohre zugekehrten Fläche des Prisma *c* als Spiegel reflektiert, sich dem Auge des Beobachters bei *e* dar, und zwar horizontal das Gesichtsfeld im Fernrohre teilend.

Es sind zuweilen zwei oder mehr Prismen im Spektralapparate kombiniert angewendet, um eine größere Dispersion des Spektrums zu erhalten. Für physiologisch-chemische Untersuchungen ist diese Verbreiterung des Spektrums wohl fast immer ohne Nutzen, insbesondere bei Untersuchung der Absorption der Lichtarten durch Farbstoffe. Hat das Prisma eine Neigung seiner Flächen von etwa  $60^\circ$  und besteht es aus hinreichend stark lichtzerstreuendem Gase, so wird es für jetzt allen Anforderungen für physiologisch-chemische Zwecke genügen, und sowohl starke Dispersion durch mehrere Prismen als stark vergrößernde Fernrohre sind durchaus zu vermeiden, da sie die Absorptionen des Lichtes in Flüssigkeiten weniger scharf zeigen, auch leuchtende Linien von glühenden Metaldämpfen wegen Lichtschwäche oft übersehen lassen, während man dieselben mit schwachem Fernrohre und einem Prisma noch ganz deutlich erkennt.

Um den Apparat richtig einzustellen, entfernt man zunächst das Prisma *c* und sieht in der Richtung von *b* nach *a* durch das erste Rohr bei mäßig geöffnetem Spalt; man zieht nun das Rohr mit dem Spalt so weit aus, bis die Ränder des letzteren ganz scharf begrenzt erscheinen, dann stellt man das Fernrohr *d e* so ein, daß man sehr weit entfernte Gegenstände recht deutlich dadurch erkennt, setzt darauf das Prisma wieder an seine Stelle und schiebt bei Beleuchtung der Skala *h* diese mit ihrem Rohre soweit ein, bis die Teilung der Skala bei der Beobachtung durch das Fernrohr möglichst scharf erkannt wird.

Für die meisten physiologischen Zwecke sind die Browningschen Taschenspektroskope vorzuziehen, besonders wo es sich um Untersuchung von Farbstoffen handelt. Durch Kombination verschiedener Prismen ist in diesen sehr bequemen, handlichen Instrumenten dem zum Auge des Beobachters austretenden Licht dieselbe Richtung gegeben, welche das durch den Spalt eintretende Licht besitzt. Die meisten Farbstoffprüfungen kann man mit ihnen schnell auch mit Benutzung von Tageslicht ausführen.

Neuerdings werden statt der Spektroskope für genaue Messungen Spektrographen bevorzugt, bei denen das Okular durch eine photographische Camera ersetzt ist. Die Beugung des Lichts erfolgt meist statt durch Prisma durch ein Beugungsgitter. Näheres über die Apparatur bei Schumm<sup>1)</sup>.

Spektroskopische  
Aschenunter-  
suchung.

27. Untersuchung der Aschen mittels des Spektrums. Alle organischen Bestandteile des Tierkörpers geben, in der Flamme des Bunsenschen Brenners verbrannt, Licht, welches durch den Spektralapparat in ein kontinuierliches Spektrum, wie es der Kohlenstoff selbst bei mäßiger Glühhitze liefert, zerlegt wird. Nur die Aschenbestandteile zeigen ein charakteristisches Verhalten, wenn man dieselben von Kohle sorgfältig gereinigt in die Flamme bringt und das von ihnen ausgehende Licht prüft.

Das zum Ohr umgebogene Ende eines feinen Platindrahtes wird erst in der Flamme des Brenners ausgeglüht, bis es keine leuchtende Flamme mehr gibt, dann schmilzt man in das Ohr eine Perle von der Asche ein, indem man mit dem zum Glühen erhitzten oder ein wenig mit Wasser befeuchteten Drahte etwas von der Asche aufnimmt, an der Oberfläche der Flamme trocknet und etwas sintern läßt. Man stellt nun (Abb. 1) vor dem Spalt *a* des Spektralapparates etwa 5—10 cm davon entfernt einen Bunsenschen Gasbrenner *k* mit nichtleuchtender Flamme und mit Schornstein versehen so auf, daß 1. die obere Grenze des Schornsteins etwa 2—3 cm tiefer als das untere Ende des Spaltes steht und 2. bei verschlossenen Luftlöchern des Brenners (also hellem Leuchten seiner Flamme) ein möglichst strahlendes Spektrum im Fernrohre sichtbar ist. Man öffnet wieder die Luftlöcher am Brenner, nachdem man die richtige Stellung desselben ausfindig gemacht hat, beleuchtet die Skala in *h*

<sup>1)</sup> Abderhaldens Handb. d. biochem. Arbeitsmeth. Bd. VI, S. 389—434. 1912.



am Spektralapparate und bringt nun die Aschenprobe am Platindrahte *m*, welcher durch ein an ihm angeschmolzenes Glasröhrchen *n* am Stative *f* befestigt ist, in die Flamme, während man durch das Fernrohr beobachtet. Es wird in allen Fällen ein diskontinuierliches Spektrum erscheinen, welches stets mehr oder weniger stark leuchtend die gelbe Natriumlinie enthält. Fast in allen Fällen wird sich daneben auch die rote Kaliumlinie zeigen. Man bestimmt nun die Lage der vorhandenen Linien nach der Skala und findet dann die Lage dieser Linien im Sonnenspektrum, wenn man Sonnenlicht an Stelle des Brennerlichtes in den Apparat eintreten läßt und die Lage der Fraunhoferschen Linien an der Skala des Apparates abliest. Statt dessen kann man reines Chlorkalium, Chlorcalcium usw. jedes für sich am reinen Platindrahte in die Flamme des Brenners bringen, die Lage der erscheinenden Linien auf der Skala ablesen und damit die Ergebnisse der Aschenprüfung vergleichen.

An vielen Spektralapparaten befindet sich vor der oberen Hälfte des Spaltes ein dieselbe deckendes kleines Prisma, welches gleichzeitige Beobachtung einer zweiten, seitlich gestellten Flamme oder des Sonnenlichtes gestattet, indem deren Strahlen durch das Prisma gebrochen in den Spalt eintreten und im übrigen denselben Weg verfolgen, als die der ersteren Flamme: Es erscheint dann das Spektrum der einen Flamme über, das der anderen unter der Mitte des Gesichtsfeldes im Spektroskop.

28. Untersuchung von Farbstoffen mit dem Spektralapparate. Die zu prüfenden Farbstoffe sind in womöglich konzentrierter Lösung in ein Gefäß mit zwei planparallelen Wandungen aus Spiegelglas oder in Flaschen mit planparallelen Seitenwänden zu bringen; Abb. 1 auf S. 17 stellt ein solches Gefäß *B* vor dem Spektralapparate dar. Zur Untersuchung der Flüssigkeit stellt man den mit einem schwarzen Tuche überdeckten Spektralapparat so auf, daß entweder direktes Sonnenlicht von einem Heliostaten oder starkes zerstreutes Tageslicht oder das Licht einer hellbrennenden Lampe in das Spektrum zerlegt im Fernrohre möglichst hell sichtbar wird; außerdem wird die Skala bei *h* beleuchtet, so daß auch deren Bild deutlich erkennbar sich mitten durch das Gesichtsfeld im Fernrohre hinzieht. Jetzt stellt man den mit der Farbstofflösung gefüllten Glaskasten dicht vor den Spalt, so daß das Licht senkrecht durch die Glasplatten dieses Gefäßes und die darin enthaltene Flüssigkeitsschicht hindurchgeht, ehe es in den Spalt eintritt. Beobachtet man dann das Spektrum durch das Fernrohr, so wird ein größerer oder geringerer Teil desselben fehlen, und es ist mittels der Skala leicht zu bestimmen, welche Teile desselben durch die Lösung abgehalten werden. Verdünnt man darauf die Farbstofflösung mit Wasser oder einem anderen farblosen Lösungsmittel, so werden bei wiederholter Untersuchung neue Partien des Spektrums sichtbar werden und bei weiter fortgesetzter Verdünnung wird allmählich das ganze Spektrum sich entfalten. Es zeigt sich nun hierbei, daß nur einige Farbstoffe bei weiterer Verdünnung ihrer Lösungen das Spektrum allmählich allseitig oder einseitig weiter und weiter sich entwickeln lassen, während eine große Anzahl von Farbstoffen und gerade diejenigen, welche die lebhaftesten Farben zeigen, bei der Verdünnung ein diskontinuierliches Spektrum erscheinen lassen, indem sie für bestimmte Stücke des Spektrums sehr kräftige und für nahe dabeiliegende Spektralabschnitte sehr schwache absorbierende Kraft besitzen. Bei gewissen Verdünnungen erscheinen dann ein oder mehrere schmale oder breitere Absorptionsstreifen, auch Spektralbänder genannt, deren Lage und Ausdehnung durch die Skala am einfachsten bestimmt und mit den Fraunhoferschen Linien des Sonnenspektrums verglichen oder noch genauer nach dem System der Wellenlängen angegeben werden können.

Spektroskopische  
Farbstoffunter-  
suchung.

**Spektrophotometrie.** Die Untersuchung im Spektrum in der geschilderten Weise gibt vorzügliche Resultate für den sicheren Nachweis einer großen Zahl von Farbstoffen, besonders des Blutfarbstoffes und einiger seiner Zersetzungsprodukte, ferner des Indigo, des Chlorophylls; man hat aber auch vielfach das Spektrum für quantitative Farbstoffbestimmungen verwertet und zu diesem Zweck verschiedene Kombinationen von Apparaten benutzt. Hauptsächlich sind hier die Arbeiten von Vierordt<sup>1)</sup> und von Hüfner<sup>2)</sup> zu erwähnen, durch welche diese Apparate vervollkommenet worden sind<sup>3)</sup>.

### Colorimetrie.

29. Die Colorimetrie, d. h. die quantitative Bestimmung einer Substanz auf colorimetrischem Wege, ist direkt und schnell ausführbar und gestattet, in vielen Fällen sehr kleine Mengen und ohne vorherige Isolierung zu ermitteln.

Mit ihrer Hilfe lassen sich alle gefärbten löslichen Stoffe oder solche farblose Verbindungen, welche durch Zusatz eines Reagens in gefärbte übergehen, bestimmen, unter der Voraussetzung, daß sie bei wechselnder Konzentration keine Dissoziation oder sonstige chemische Veränderung erfahren.

Die Colorimetrie beruht auf dem Beerschen Gesetz, daß das Lichtabsorptionsvermögen zweier Lösungen derselben Substanz das gleiche ist, wenn die Konzentration dieser Lösungen umgekehrt proportional den Schichtdicken ist. Bezeichnet man die Konzentrationen (Anzahl Gramme in 100 ccm) zweier Lösungen mit  $C$  und  $C'$ , die Schichtdicken mit  $d$  und  $d'$ , so gilt die Proportion  $C:C' = d':d$  oder  $C' = \frac{C \cdot d}{d'}$ . Kennt man also die

Konzentration  $C$  und die Schichtdicken, so kann man die Konzentration von  $C'$  berechnen. Von

den vielen Colorimetern, die angegeben worden sind, soll nur das von Duboscq (Abb. 2 u. 3) und das von Autenrieth - Königsberger beschrieben werden.

Ein Eintauchcolorimeter von vollkommen symmetrischem Bau und völlig identischem Strahlengang, zunächst für Hämoglobinmessungen bestimmt, ist neuerdings von Bürker<sup>4)</sup> angegeben worden (Optische Werke E. Leitz-Wetzlar). Von Kleinmann<sup>5)</sup> wird als alle anderen Colorimeter an Genauigkeit der Resultate überragend das Chromophotometer von Plesch<sup>6)</sup> empfohlen (Schmidt und Haensch-Berlin).

**Colorimeter nach Duboscq.** Es besteht aus 2 nebeneinanderstehenden zylindrischen Röhren  $Z$ , von denen die eine die Lösung von bekanntem Gehalt (Vergleichslösung), die andere die Lösung, deren Gehalt bestimmt werden soll, enthält. Die Schichtdicke (Schichthöhe) der Flüssigkeiten kann durch Tauchzylinder  $T$ , welche unten durch eine Glasplatte verschlossen sind und mittels Triebsschrauben  $S$  in der Flüssigkeit auf- und abbewegt werden können, verändert werden. An einer Graduierung liest man die Schichtdicke ab.

Das Licht (natürliches oder Auerlicht) wird mittels eines Spiegels  $M$  von unten in die Zylinder reflektiert, die austretenden Lichtstrahlen werden durch Prismen  $P$  oder Spiegel in das Okular geworfen, so daß das von oben hineinschauende Auge einen Kreis sieht, der durch eine Trennungslinie in zwei Hälften

<sup>1)</sup> K. Vierordt: Die Anwendung des Spektralapparates zur Photometrie der Absorptionsspektren usw. Tübingen 1873. — Derselbe: Die quantitative Spektralanalyse usw. Tübingen 1876.

<sup>2)</sup> Hüfner: Journ. f. prakt. Chem. N. F. Bd. 16, S. 290. 1877. Zeitschr. f. physikal. Chem. Bd. 3, S. 562. 1889. — E. Albrecht: Anleitung zum Gebrauch des Hüfnerschen Spektrophotometers usw. Tübingen 1892.

<sup>3)</sup> G. u. H. Krüss: Colorimetrie und quantitative Spektralanalyse usw. 2. Aufl. 1909. L. Voß.

<sup>4)</sup> Ber. über d. ges. Physiol. Bd. 2, S. 177. 1920.

<sup>5)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 99, S. 53. 1919. <sup>6)</sup> Zeitschr. f. klin. Med. Bd. 63, S. 472. 1907.

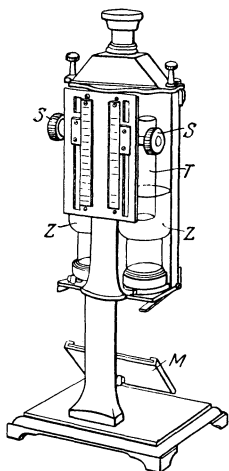


Abb. 2. Colorimeter nach Duboscq.

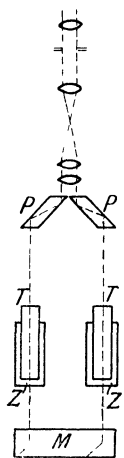


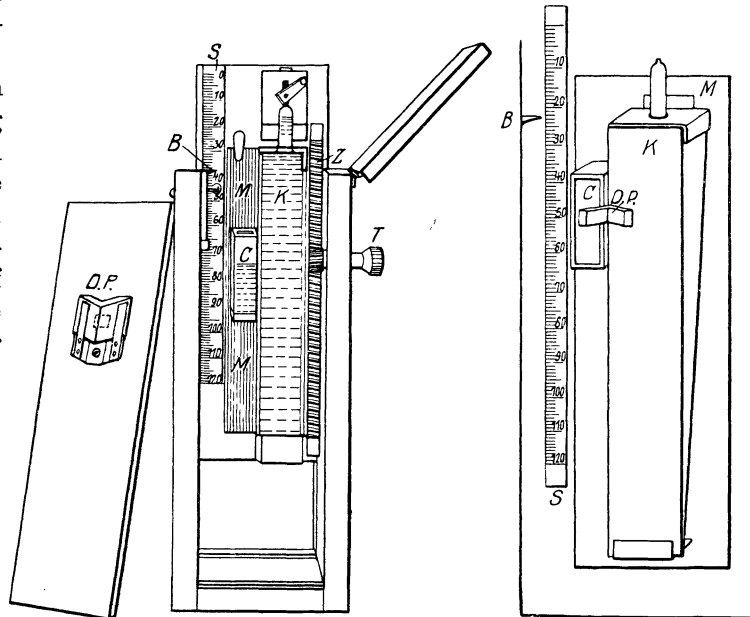
Abb. 3. Strahlengang im Colorimeter.

Colorimeter nach Duboscq.

geteilt ist und dessen eine Hälfte durch Strahlen beleuchtet ist, welche durch die Vergleichslösung, dessen andere durch Strahlen, welche durch die zu untersuchende Lösung gegangen sind.

Um eine Bestimmung auszuführen, stellt man zunächst das Colorimeter so auf, daß die beiden Teile des Gesichtsfeldes gleich hell erscheinen. Durch eine mehr vertikale oder horizontale Stellung der reflektierenden Spiegelfläche sowie durch eine Drehung des ganzen Instrumentes nach rechts oder links läßt sich das leicht erreichen. Nun bringt man die Flüssigkeiten ein und hebt oder senkt die Tauchzylinder mittels der Schraube, bis wieder gleiche Helligkeit beider Gesichtsfelder erreicht ist. Nach Ablesung der Schichtdicken wird die Berechnung nach obiger Formel ausgeführt.

Die Lösungen müssen vollständig klar sein und auch annähernd gleiche Temperatur haben. Der Temperaturunterschied darf keinesfalls mehr wie  $3^{\circ}$  betragen. Ferner sollen die Unterschiede der Schichtdicke beider Flüssigkeiten nicht zu groß sein. Es empfiehlt sich deswegen, die Vergleichslösung in einer Konzentration anzuwenden, die der zu untersuchenden Flüssigkeit ziemlich nahekommt.



Colorimeter nach Autenrieth-Königsberger.

Abb. 4. Kasten mit aufgeklapptem Deckel, herausgenommener Vorderwand und etwas in die Höhe geschraubter Hinterwand. Daneben die Vorderwand von der Innenseite gesehen mit der Doppelplatte von Helmholtz *D. P.*

Abb. 5. Schematische Ansicht des Innern: links die Skala *S* mit dem Zeiger *B*. Daneben vor der Milchglasscheibe *M* der Glastrog *C* und das keilförmige Gefäß *K*. Vor beiden die Doppelplatte *D. P.*

Colorimeter nach Autenrieth-Königsberger (Abb. 4 u. 5). Das Colorimeter ist in einem kleinen Holzkasten untergebracht, dessen Deckel aufklappbar ist und dessen Rückwand durch Drehen am Knopf *T* mittels der Zahnstange *Z* auf- und abwärts bewegt werden kann. Diese Rückwand, in welche eine Milchglasscheibe *M* eingelassen ist, trägt den keilförmigen Glasbehälter *K*, welcher die Vergleichsflüssigkeit enthält, und die Skala *S*. An der Innenseite der linken Seitenwand ist der feststehende Glastrog *C*, welcher die zu untersuchende Flüssigkeit enthält, angebracht. Er befindet sich unmittelbar neben dem keilförmigen Gefäß und wie dieses vor der Milchglasscheibe. An der Rückseite der Vorderwand in der Höhe des Glastroges und gerade vor diesem und dem keilförmigen Gefäß ist eine optische Doppelplatte nach Helmholtz *D. P.* angebracht, der gegenüber die Vorderwand einen horizontal verlaufenden Spalt hat, durch den die Beobachtungen gemacht werden. Die jeweilige Stellung des beweglichen keilförmigen Gefäßes zu dem feststehenden Glastrog wird an der Skala mittels des an der linken Seite und oben angebrachten Zeigers *B* abgelesen.

Colorimeter  
nach Autenrieth-  
Königsberger.

Als Vergleichsflüssigkeit dient im allgemeinen nicht eine Lösung des zu bestimmenden Stoffes von bekanntem Gehalt, sondern für jeden Stoff eine besondere haltbare Lösung einer anderen Substanz, welche aber der zu bestimmenden optisch gleichwertig ist. Um eine Bestimmung auszuführen, füllt man die zu untersuchende Lösung in den herausgenommenen Trog, stellt diesen wieder an seinen Platz, fügt den mit der Vergleichsflüssigkeit gefüllten Keil ebenfalls ein, hält das Colorimeter gegen den Himmel und in deutlicher Sehweite vom Auge so, daß man beim Sehen durch den Spalt weder eine Trennungslinie noch einen Zwischenraum zwischen den beiden Hälften des Gesichtsfeldes wahrnimmt. Nun verschiebt man den Keil, bis beide Flächen Farbgleichheit zeigen, liest die Stellung an der Skala ab und entnimmt aus einer beigegebenen Tabelle oder Kurve den Gehalt der Lösung an Substanz.

### Nephelometrie.

30. Sie besteht darin, aus dem Trübungsgrad einer Lösung ihren Gehalt an trübender Substanz zu ermitteln.

Zur Bestimmung des Trübungsgrades benutzt man das senkrecht zum Lichtkegel beobachtete Beugungslicht, das sog. Tyndalllicht. Die Gesetze der Nephelometrie entsprechen denen der Colorimetrie insofern die Voraussetzung gleicher Teilchengröße der trübenden Substanz erfüllt ist (Kleinmann<sup>1</sup>). Es besteht also Proportionalität zwischen Trübung und Konzentration und umgekehrte Proportionalität zwischen beleuchteter Schicht und Konzentration

zweier Lösungen derselben Substanz bei gleichem Trübungsgrad. Bezeichnet man die Konzentrationen zweier Lösungen mit  $C$  und  $C'$ , die Schichtdicken (bei gleichem Trübungsgrad) mit  $d$  und  $d'$ , so gilt die Gleichung  $C' = \frac{C \cdot d}{d'}$ . Kennt man also die Konzentration  $C$  und die Schichtdicken, so kann man die Konzentration  $C'$  berechnen.

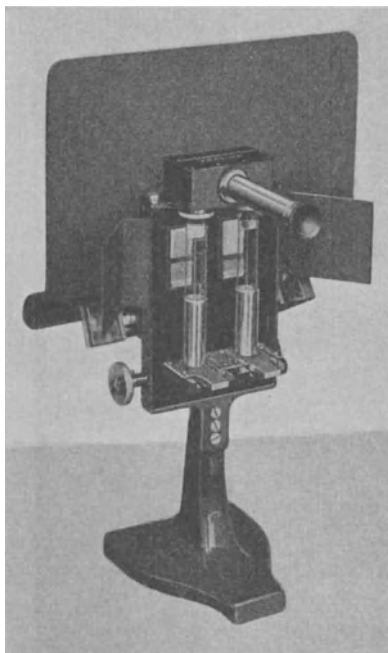


Abb. 6. Nephelometer nach Kleinmann.

Im folgenden soll das von Kleinmann<sup>1</sup>) angegebene Nephelometer der Firma Schmidt & Haensch in Berlin beschrieben\*) werden unter Bezugnahme auf nebenstehende Abbildungen, von denen Abb. 6 eine Gesamtansicht, Abb. 7 eine schematische Ansicht von hinten, und Abb. 8 eine solche von der Seite geben.  $a_1$  und  $a_2$  sind kleine Reagensgläser\*\*) aus tadellosem schlierenfreiem Glas von etwa 8 cm Länge und 1,4 cm lichter Weite. Sie werden von vorn beleuchtet, die Tyndallkegel von oben beobachtet. Das Beugungslicht geht zuerst durch zwei massive Glaszylinder ( $b_1$  und  $b_2$ ), die, völlig gleich, hintereinander aus demselben Stück der Glasmasse geschnitten, bis auf die Grund- und Deckfläche mattiert sind und in die Flüssigkeit der Reagensgläser eintauchen. Durch sie wird der Fehler, welcher durch Beobachtung der Oberfläche entsteht, vermieden. Wäh-

\*) Die Beschreibung ist die von Kleinmann gegebene.

\*\*) Statt ihrer können in Apparaten neuester Konstruktion auch vierkantige Tröge benutzt werden.

<sup>1</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 99, S. 115. 1919; Bd. 137, S. 144. 1923.

rend das Licht aus dem Reagensglas  $a_2$  durch ein Prisma  $d$  auf den Lummer-Brodhunschen Würfel  $f$  geworfen wird, gelangt das des Reagensglases  $a_1$  direkt in ihn, nachdem es durch einen kleinen Glaswürfel  $e$ , der die Lichtabsorption des Prisma ausgleicht, gegangen ist.

Die Einstellung der im Lummer-Brodhunschen Würfel erscheinenden konzentrischen Ellipsen erfolgt mittels eines Okulars.

Die Höhen der dem Licht ausgesetzten Gefäßteile können beliebig meßbar geändert werden, da durch bewegliche Metallplatten  $g_1$  und  $g_2$  die Länge der Fenster, die in die den Apparat frontal deckende Metallplatte geschnitten sind, veränderlich ist.

Die beweglichen Metallplatten liegen den Reagensgläsern dicht an und tragen eine scharfe Schneide, so daß der die Länge der beleuchteten Säule abschneidende Schatten ein sehr scharfer ist. Die Stellung der Metallplatten kann mit Hilfe eines Schlittens, der mit Trieb auf einer Zahnstange gleitet, beliebig geändert werden.

Die Triebstange trägt eine Millimeter-

skala, während der Schlitten mittels eines Nonius eine Ablesung auf 0,1 mm ermöglicht.

Die Reagensgläser stecken in federnden feststehenden Metallhülsen, in denen sie leicht auf und nieder bewegt werden können. Durch Hinaufschieben der Reagensgläser aus den Metallhülsen werden die massiven Glaszylinder  $b_1$  und  $b_2$ , über welche die frontale Schutzwand etwa 2 mm hinüberraagt, zum Eintauchen in die Flüssigkeit gebracht.

Zur Beleuchtung dient eine 50kerzige Osramlampe, die senkrecht in einer Entfernung von etwa  $\frac{3}{4}$  m vor dem Apparate in Höhe der Fenster steht.

Vorbereitung. Es ist zweckmäßig, zwischen die beiden Gläschen ein Stückchen passend geschnittene schwarze Pappe zu schieben und die Lichtdichtung nach hinten und oben durch ein schwarzes Tuch zu bewerkstelligen. Lichtquelle und Fenster werden in möglichst parallele, gleich hohe und symmetrische Stellung gebracht, die Reagensgläser mit derselben Lösung gefüllt, rechtes und linkes Fenster gleich gestellt und durch vorsichtiges Rücken des Apparates und der Lichtquelle gleiche Helligkeit im Gesichtsfeld erzielt. Sodann werden  $a_1$  und  $a_2$  vertauscht und falls das Gesichtsfeld unverändert bleibt, die Stellung des Apparates und der Beleuchtungsquelle durch Kreide markiert. Zeigt sich nach dem Umtausch das Gesichtsfeld nicht mehr einförmig hell, so muß man weiter einstellen, bis der Umtausch keine Veränderung mehr ergibt.

Ausführung. Man drückt die Reagensgläser in die Metallhülsen hinein, nimmt sie samt diesen aus den Schienen heraus, reinigt sie, füllt sie mit den Lösungen, bringt sie wieder ein und zieht sie in die Höhe, bis der massive Glaszylinder eintaucht, wobei darauf zu achten ist, daß sich keine

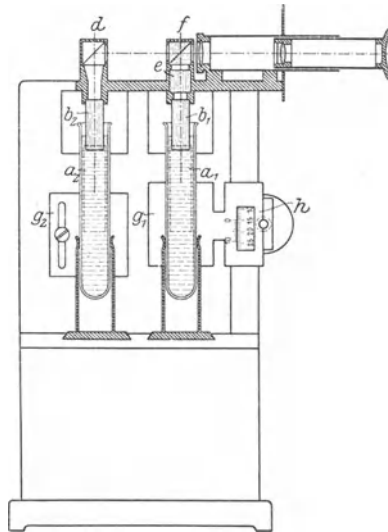


Abb. 7. Nephelometer nach Kleinmann (von hinten).

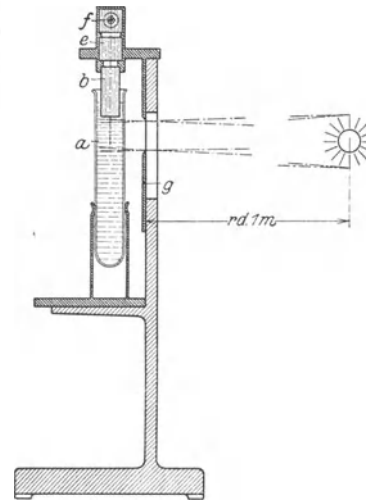


Abb. 8. Nephelometer nach Kleinmann (von der Seite).

Luftblasen unter dem Zylinder absetzen. Nach Festlegung der Stellung des einen Fensters wird das andere durch den Trieb eingestellt. Die Empfindlichkeit des Apparates ist eine große. Selbst bei schwachen Trübungen werden Veränderungen in der Fensterstellung um 0,1 mm wahrgenommen. Es ist nötig, das Auge 5—10 Minuten sich an die Dunkelheit anpassen zu lassen.

Wegen einer Menge von Einzelheiten der Arbeitsmethodik (Auswahl der richtigen Reagensgläser, Reinigung der Reagensgläser und der soliden Glaszylinder, Herstellen und Filtrieren der Lösungen, Art des Anfassens der Gläser zur Vermeidung von Fingerabdrücken, Kontrolle der Reinheit der Reagensgläser und der Lösungen usw.), die genau zu beachten sind, siehe die Ausführungen von Kleinmann<sup>1)</sup>.

Mikronephelometrie. Über Mikronephelometrie siehe bei Kleinmann.

### Untersuchung der Zirkumpolarisation \*).

31. Eine ganze Reihe von Kohlenstoffverbindungen zeigen infolge einer asymmetrischen Lagerung der Atome in ihrem Molekül rechts- oder linksseitige Zirkumpolarisation. Solche optisch aktive (links- und rechtsdrehende) Stoffe finden sich unter den Verbindungen, welche in den Geweben und Flüssigkeiten des tierischen und pflanzlichen Organismus vorkommen, und unter ihren Zersetzungsprodukten der Zahl und der Quantität nach in reichlicher Menge (Proteine, Kohlenhydrate, Gallensäuren, Aminosäuren usw.). In der Beobachtung der Zirkumpolarisation hat man einerseits ein schnell anwendbares Mittel, um über die Anwesenheit oder das Fehlen gewisser Gruppen von Stoffen in den zu prüfenden Flüssigkeiten Aufschluß zu erhalten, andererseits ergibt die Bestimmung der spezifischen Drehung eines Körpers unter dem Einfluß gewisser Agenzien auf diesen Körper eins der sichersten und feinsten Hilfsmittel zur Unterscheidung chemischer Stoffe voneinander, sowie zur Beurteilung der Veränderungen, welche diese Körper unter der Einwirkung gewisser Prozesse erfahren. Endlich dient die Bestimmung der Zirkumpolarisation zur schnellen Feststellung des Gehaltes einer Flüssigkeit an dem einen oder anderen optisch-aktiven Körper, z. B. an Glucose. Die Beobachtung der Zirkumpolarisation erfordert kaum 1 Minute Zeit und bedingt bei einiger Vorsicht keinen Verlust der zu prüfenden Flüssigkeit.

Ein Hauptfordernis für diese Untersuchung ist, daß die Lösungen klar, durchsichtig und möglichst farblos sind; schwachgelbe Färbung tut keinen erheblichen Eintrag an Genauigkeit, wohl aber rote oder braune Färbung. Zur Klärung und Entfärbung<sup>2)</sup> eignen sich Bleiacetat in Lösung oder in Substanz, Ferrum oxydatum dialysatum, Kieselgur. Die in den einzelnen Fällen anwendbaren Agenzien werden später an den betreffenden Stellen angegeben.

Mit der zu prüfenden Lösung füllt man die Untersuchungsröhre, deren Länge man nach der Klarheit und Tiefe der Färbung der Flüssigkeit auswählt. Da die Bestimmung um so genauer ausfällt, je länger die vom Lichte durchwanderte Flüssigkeitsschicht ist, verwendet man eine Röhre von möglicher Länge, nach deren Füllung aber beleuchtete Gegenstände beim Hindurchsehen durch die Flüssigkeitsschicht in der Röhre scharf unterschieden werden können. Röhren von 3, 2 und 1 dm Länge des in der Röhre eingeschlossenen Raumes

\*) Eine eingehende Beschreibung der Apparate und Untersuchungsmethoden der Zirkumpolarisation s. bei Landolt: Das optische Drehungsvermögen organischer Substanzen. 2. Aufl. Braunschweig 1898.

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 137, S. 144. 1923.

<sup>2)</sup> S. dazu Neuberg: Biochem. Zeitschr. Bd. 24, S. 424. 1910.

sind die gewöhnlich zu diesen Untersuchungen benutzten. Abb. 9 stellt ein solches Rohr dar. Die Kappen aus Metall, welche auf die Enden der Röhre aufgeschraubt sind, haben eine mindestens 5 mm weite runde Durchbohrung und drücken durch einen eingelegten Kautschukring eine runde Glasplatte gegen den gerade abgeschliffenen Rand der Röhre; sie dürfen nicht zu fest aufgeschraubt werden. Sehr praktisch ist das in Abb. 10 abgebildete Rohr. Man braucht es nicht bis zum Überlaufen zu füllen, da eine kleine eingeschlossene Luftblase bei horizontaler Lage des Rohrs in die Erweiterung *a* eintritt und nicht im Gesichtsfeld störend erscheint. Für Beobachtungen bei bestimmter Temperatur ist das mit der Flüssigkeit zu füllende Rohr zweckmäßig von einem wasserdicht aufgesetzten weiteren Rohr umgeben (Abb. 11). Durch den Zwischenraum zwischen beiden Rohren zirkuliert beständig Wasser von bestimmter Temperatur, welches durch das eine Ansatzrohr zu- und durch das andere abfließt. Der Tubus in der Mitte, welcher in Verbindung mit dem inneren Rohr steht, dient zum Einbringen der Flüssigkeit und zur Aufnahme eines Thermometers.

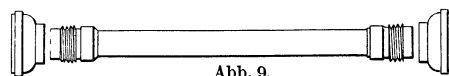


Abb. 9.

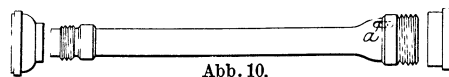
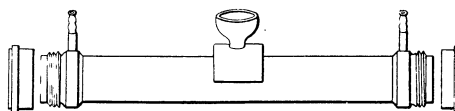


Abb. 10.

Abb. 11.  
Polarisationsröhren.

Sollen die Beobachtungen bei Natriumlicht ausgeführt werden, so benutzt man als Lichtquelle einen von einem weiten, innen und außen geschwärzten Metallzylinder umgebenen Bunsenbrenner (Abb. 12). Durch den unteren Teil des seitlichen Ausschnitts dieses Zylinders wird eine ringförmige Rinne aus Platin, welche mittels einer horizontal verlaufenden Stange *v* an einer um die vertikale Achse drehbaren Stange *w* befestigt ist, durch Drehen dieser Stange am Trieb *x* in die Flamme geschoben. In der Rinne befindet sich trockenes Kochsalz. Statt dessen empfiehlt Neuberg<sup>1)</sup> Natriumnitrit, welches durch seine Abgabe von Sauerstoff die Temperatur der Flamme erhöht und dadurch eine bedeutend größere Lichtstärke bewirkt. Damit herabfallende Salzpartikelchen nicht die Öffnung des Bunsenbrenners verstopfen, ist diese Öffnung seitlich bei *y* angebracht, wie aus der Abbildung hervorgeht. Die Lampe ist so aufzustellen, daß nur das Licht aus der oberen Abteilung des Ausschnittes zu dem Apparat gelangt. Ein bedeutend intensiveres Natriumlicht gibt die Landoltsche Natriumlampe<sup>2)</sup>. Um das Natriumlicht von Beimengungen zu befreien, läßt man es durch eine gesättigte Lösung von Kaliumbichromat treten. Diese befindet sich in einem 3 cm langen Rohr in dem hinteren Teile des Polarisationsapparates hinter der Beleuchtungslinse. Eine noch vollständigere Reinigung wird mit dem Lippichschen Natriumfilter erreicht (Landolt<sup>3)</sup>). Als Lichtquelle für weißes Licht dienen Petroleum-, Gas-, Auerlicht- oder elektrische Lampen, bei denen der Glaszylinder bzw. die mattierte Birne mit einem Metallzylinder, welcher an passender Stelle eine seitliche Öffnung zum Durchtritt der Lichtstrahlen hat, umgeben ist.

Die besten Polarisationsapparate sind die neuen auf dem Prinzip von Lippich beruhenden Halbschattenapparate, von denen einer in der Ausführung von Landolt (§ 33) beschrieben wird. Von älteren Apparaten wird das im folgenden Paragraphen auseinandergesetzte Polaristrobometer von Wild noch vielfach gebraucht. Für die speziellen Zwecke der Traubenzuckerbestimmung

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 24, S. 423. 1910.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. Instrumentenk. Bd. 4, S. 390. 1884 u. Landolt a. a. O. S. 357.

<sup>3)</sup> a. a. O. S. 362.

ist das Soleil-Ventzkesche Saccharimeter durch den viel empfindlicheren Halbschattenapparat mit Keilkompensation verdrängt. Er ist im § 34 beschrieben.

*Polaristrobometer nach Wild.*

32. Abb. 12 stellt den Apparat dar. Das von der Natriumflamme ausgehende Licht tritt bei  $d$  in das Instrument ein, geht in seiner Achse hindurch und trifft bei  $a$  das Auge des Beobachters. Durch ein Diaphragma bei  $d$  gelangt das Licht zunächst zu einem Nicol, welcher im Zentrum der Scheibe  $k$  mit dieser zusammen um ihre Achse durch ein Zahngetriebe mittels des Knopfes  $c$  drehbar ist. An der Peripherie der Scheibe  $k$  befindet sich eine Kreisteilung in  $\frac{1}{5}$  Grade geteilt.

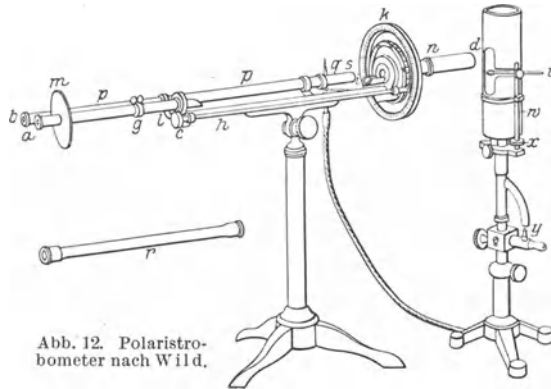


Abb. 12. Polaristrobometer nach Wild.

Das drehbare Nicolsche Prisma wird gehalten durch den Träger  $h$ , an welchem andererseits ein kleines Fernrohr, ein Nicol und das Polariskop  $a g l$ , endlich vor der Kreisscheibe  $k$  der Indicator  $i$  befestigt sind. Zwischen Polariskop und drehbarem Nicol ist der Raum für die einzulegenden mit den zu untersuchenden Flüssigkeiten gefüllten Beobachtungsröhren  $r$ . Der dem Auge des Beobachters zugewandte Teil des Instruments besteht bei  $a$  aus einem Nicol und Savartschem

Polariskop (zusammengesetzt aus 2 Kalkspatplatten, die unter  $45^\circ$  gegen die optische Achse des Krystalls geschnitten und mit ihren Hauptschnitten unter  $90^\circ$  gekreuzt aufeinander gelegt sind). Dies letztere bewirkt, daß bei der Beobachtung in allen Stellungen der Nicol gegeneinander das durch das Instrument gehende Licht horizontale Interferenzstreifen zeigt, wenn nicht die Schwingungsebene des zweiten Nicols parallel oder senkrecht zu derjenigen des in ihn eintretenden Lichtes ist. Am Kopf des Apparates befindet sich ferner, wie bereits angegeben, ein kleines Fernrohr, und in dem Rohre an geeigneter Stelle ein Fadenkreuz, dessen Bild bei der Beobachtung genau einzustellen ist. Durch das Fernrohr  $b p p s$  ferner beobachtet man die Skala der Scheibe  $k$  und den Indikator  $i$ , während von dem Schlitzbrenner  $q$  die Beleuchtung dieser Skala vermittels eines schräg gestellten, in der Mitte durchbohrten Metallspiegels, der sich am Ende des Fernrohrs befindet, bewirkt wird. Der Träger  $h$  ist auf dem Stativ horizontal und vertikal drehbar, damit man ihn mit  $d$  genau auf die Natriumflamme einstellen kann.

Um Beobachtungen mit dem Instrumente auszuführen, richtet man dasselbe zunächst mit dem Ende  $d$  gegen die Natriumlichtquelle, stellt das Okular in  $a$  so ein, daß man das Fadenkreuz scharf sieht, beleuchtet durch die Flamme  $q$  die Skala und dreht mittels des Knopfes  $c$  die Scheibe  $k$  mit dem analysierenden Nicol. Es zeigen sich schwarze Interferenzstreifen horizontal das Gesichtsfeld durchsetzend, welche bei der Drehung des einen Nicols bald dunkler, bald wieder heller werden, aber nur dann vollständig aus der Mitte des Gesichtsfeldes verschwinden, wenn die beiden Nicol entweder gleiche Stellung haben oder

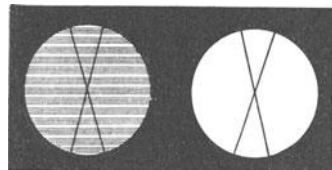


Abb. 13.

genau unter  $90^\circ$  gegeneinander gekreuzt sind. Abb. 13 erläutert die Erscheinung der Interferenzstreifen und ihr Verschwinden im Gesichtsfelde mit dem Faden-



kreuz. Dreht man also den Nicol um seine Achse einmal ganz herum, so verschwinden die Interferenzstreifen 4 mal entsprechend den 4 Quadranten des Kreises. Die Stellung der Nicol, bei welcher die Interferenzstreifen verschwinden, läßt sich an der Kreisteilung genau ablesen.

Legt man nun, nachdem an der Skala die Stellung festgestellt ist, bei welcher die Interferenzstreifen verschwunden sind, eine mit drehender Flüssigkeit gefüllte Röhre zwischen den drehbaren Nicol und das Polariskop ein, so wird das Verschwinden der Interferenzstreifen nicht mehr bei der Stellung des Nicols stattfinden, bei welcher dies vor Einlegen der Röhre der Fall war. Man sucht jetzt durch Drehung des Knopfes *c* die Stellung des Nicols auf, bei welcher nun die Interferenzstreifen verschwunden sind, liest durch das Fernrohr an der Skala ab, wie weit man nach der einen oder anderen Seite den Nicol hat drehen müssen, um das Verschwinden der Streifen herbeizuführen, und findet in der Differenz der beiden Ablesungen den Winkel der Rotation, welche die Flüssigkeit ausübt. Hat man, um die Interferenzstreifen zum Verschwinden zu bringen, vom Nullpunkt aus bei Rechtsdrehung weniger weit nach rechts als bei Linksdrehung nach links drehen müssen, so handelt es sich in den meisten Fällen um eine rechtsdrehende, im umgekehrten Falle um eine linksdrehende Substanz. Ist man über die Drehungsrichtung im Zweifel (bei stark drehenden Substanzen), so wiederholt man die Polarisationsbestimmung unter Benutzung eines Rohres von der halben Länge.

Bestimmung der spezifischen Drehung. Die spezifische Drehung einer aktiven Substanz ist diejenige Drehung der Polarisationsebene, welche 1 g in 1 ccm Flüssigkeit gelöst bei einer Rohrlänge von 1 dm bewirkt. Die spezifische Drehung bezeichnet man mit  $[\alpha]$  und die auf Natriumlicht und eine Temperatur von z. B.  $20^\circ$  sich beziehende mit  $[\alpha]_D^{20}$ . Enthält die Flüssigkeit nur eine optisch aktive Substanz, so ist  $[\alpha] = \pm \frac{\alpha}{c \cdot l}$ , wobei  $\alpha$  den beobachteten Drehungswinkel, *c* die Menge der Substanz in Grammen, welche in 1 ccm der Lösung bei  $20^\circ$  enthalten sind, und *l* die Länge des Rohrs in Dezimetern bezeichnet. Bestimmung der spezifischen Drehung.

Handelt es sich darum, die Änderungen der spezifischen Drehung bei verschiedenen Konzentrationen festzustellen, so ist es nötig, auch den Gehalt der Substanz in Grammen in 1 g der Lösung (*p*) und das spezifische Gewicht der Lösung (*d*) bei  $20^\circ$  (bezogen auf Wasser von  $4^\circ$  als Einheit) zu kennen und die spezifische Drehung  $[\alpha]_D^{20}$  nach der Formel  $\pm \frac{\alpha}{p \cdot l \cdot d}$  zu berechnen.

Die spezifische Drehung der meisten Substanzen ändert sich mit der Konzentration der Lösung, mit dem Lösungsmittel und der Temperatur. Die Lösungen mancher Substanzen, z. B. mancher Zucker, zeigen, frisch hergestellt, ein anderes Drehungsvermögen als nach einiger Zeit (Mutarotation).

Bestimmung des Gehaltes der Flüssigkeit an aktiver Substanz. Kennt man die spezifische Drehung der untersuchten Substanz, weiß man, daß diese sich mit der Konzentration nicht oder nur wenig ändert und enthält die Lösung nur diese eine optisch aktive Substanz, so ergibt sich aus der Drehungsbestimmung der Gehalt der Lösung an der aktiven Substanz nach der Formel  $c = \frac{\alpha}{[\alpha] \cdot l}$ , worin  $\alpha$  die beobachtete Drehung,  $[\alpha]$  die spezifische Drehung, *l* die Rohrlänge in Dezimetern und *c* das Gewicht des die Drehung bewirkenden Stoffes für 1 ccm Lösung. Bestimmung des Gehaltes an aktiver Substanz.

#### *Halbschattenpolarimeter mit Lippichs dreiteiligem Polarisator in der Konstruktion von Landolt.*

33. Von allen Halbschattenapparaten, welche seit dem von Jellett<sup>1)</sup> nach diesem Prinzip zuerst konstruierten Instrument bekannt geworden sind, zeichnen sich die mit Lippichs Polarisator<sup>2)</sup> versehenen Apparate durch die große

<sup>1)</sup> Rapports of the British Assoc. Bd. 2, S. 13. 1860; vgl. hinsichtlich der übrigen Halbschattenapparate, von denen besonders der von Laurent sehr verbreitet ist, Landolt: Das optische Drehungsvermögen organischer Substanzen usw. 2. Aufl. Braunschweig 1898.

<sup>2)</sup> Naturwissenschaftl. Jahrbuch Lotos N. F. Bd. 2. 1880. Prag, Tempsky. Zeitschr. f. Instrumentenk. Bd. 2, S. 167. 1882; Bd. 14, S. 326. 1894. Sitzungsber. d. Akad. Wien Bd. 91, II, S. 1081. 1885 u. Bd. 105, II, S. 317. 1896; zitiert nach Landolt.

Schärfe, mit welcher sie Bestimmungen auszuführen gestatten, aus. Es sind überhaupt die genauesten aller Polarimeter. Im folgenden soll eine von H. Landolt<sup>1)</sup> empfohlene, von der Firma Schmidt & Haensch in Berlin ausgeführte Konstruktion beschrieben werden, welche den großen Vorteil gewährt, daß nicht nur Beobachtungsröhren, sondern auch beliebig gestaltete Beobachtungsgefäße eingeschaltet werden können (Abb. 14).

Was die optische Einrichtung betrifft, so folgt zunächst auf das Diaphragma *S* eine Beleuchtungslinse, dann bei *P* der dreiteilige Lippichsche Polarisator, bestehend aus einem um die Achse des Apparates drehbaren polarisierenden Nicolschen Prisma, welches das ganze Gesichtsfeld bedeckt, und zwei

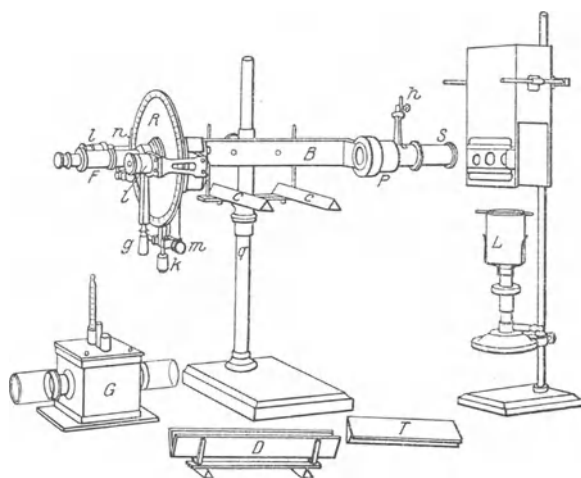


Abb. 14. Halbschattenpolarimeter nach Landolt.

kleinen feststehenden Nicolschen Prismen (Halbprismen), die hinter dem großen in symmetrischer Stellung und so angeordnet sind, daß jedes ein äußeres Drittel des Gesichtsfeldes deckt. Hierdurch wird eine Dreiteilung des Gesichtsfeldes bewirkt\*). Das drehbare Prisma läßt sich behufs Änderung des Winkels zwischen den beiden Polarisierungsebenen durch den festschraubbaren Zeiger bei *h* verstellen und die Größe des Winkels (Halbschatten) an der Skala bei *h* ablesen. Der Winkel beträgt im allgemeinen  $7,5^\circ$ . Zwischen *P* und *R* werden die Beobachtungsröhren oder -gefäße eingeschaltet. Im Zentrum von *R* ist das analysierende Nicolsche Prisma fest in die drehbare Scheibe eingefügt. Der Rand dieser Scheibe ist in Viertelgrade eingeteilt und durch Nonius in Hundertstelgrade ablesbar eingerichtet. Die Drehung erfolgt durch den Hebel *g* und weiterhin zum Zweck der feinen Einstellung nach Anziehen der Klemme *k* mittels der Mikrometerschraube *m*, und wird gemessen mit Hilfe der beiden feststehenden Nonien *n*, welche mit den Lupen *l* abgelesen werden. *F* stellt ein Fernrohr dar, mit dem man die Grenzlinien des dreiteiligen Gesichtsfeldes scharf einstellt.

Die beschriebenen Teile sind auf einer starken eisernen Schiene *B* montiert, welche an einem schweren Stativ verschoben und festgeklemmt werden kann\*\*). Die Führungshülse ist am unteren Ende schraubenförmig gestaltet und mit einer Schraubenmutter *q* versehen, mittels deren sich eine horizontale Schiene, an welcher die zwei prismatischen Träger *c c* sitzen, emporheben läßt. Sollen die letzteren gesenkt werden, so wird *q* tiefer geschraubt und mit den Fingern auf die Schiene gedrückt. Zwei dünne Stahlstangen, welche durch den hinteren Teil der Hauptschiene *B* gehen, vermitteln die genaue Vertikalführung. Auf die beiden Träger *c c* kann 1. die zum Einlegen von Flüssigkeitsröhren dienende Rinne *D* gesetzt und horizontal verschoben werden, bis die Röhre in der optischen Achse liegt; die zugleich nötige Vertikaleinstellung bewirkt man mit der

\*) Ist nur ein feststehendes Halbprisma vorhanden, welches die eine Hälfte des Gesichtsfeldes deckt, so erhält man ein zweiteiliges Gesichtsfeld. Der dreiteilige Polarisator leistet das Doppelte an Genauigkeit, ist deswegen dem zweiteiligen bei weitem vorzuziehen.

\*\*\*) Von hier an ziemlich wörtlich nach Landolt.

<sup>1)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 28, 3, S. 3102. 1895.

Schraube  $q$ ; ferner ist die Rinne  $D$  auf ihrer Bodenplatte um einen kleinen Winkel verschiebbar; 2. eine ebene, unten mit Führungsleisten versehene Messingplatte  $T$  aufgelegt werden, die als Unterlage für Glaströge dient; 3. der Kasten  $G$  eingeschaltet werden, ein mit Asbest bekleideter Kasten aus Messingblech, durch welchen eine inwendig vergoldete Messingröhre geht, deren herausragende Enden sich durch gläserne Deckplatten und Überwurfsschrauben verschließen lassen. Ein in die Röhre senkrecht eingelötetes enges Röhrchen, welches durch den abnehmbaren Deckel des Kastens hindurchgeht, erlaubt die Ausdehnung oder Zusammenziehung der eingefüllten aktiven Substanz. Außerdem besitzt der Deckel 2 Öffnungen für Thermometer und Rührer. Füllt man den Kasten mit einer als Bad geeigneten Flüssigkeit, und erhitzt mittels untergestellten Brenners, so läßt sich das Drehungsvermögen der Substanz bis zu beliebig hohen Temperaturen untersuchen. Werden behufs Beobachtung bei niedriger Temperatur Kältemischungen in den Kasten gebracht, so müssen, um den Wasserbeschlag auf der Außenseite der Deckgläser zu verhindern, an die Überwurfsschrauben Glaszylinder (aus der Zeichnung ersichtlich) angesteckt werden, welche am Ende mit Platten verschlossen sind und in die man etwas Chlorcalcium gebracht hat.

Über eine mit diesem Polarisationsapparat kombinierte elektrisch heizbare Vorrichtung zur Ablesung und Beobachtung des Drehungsvermögens bei konstanter Temperatur s. Abderhalden<sup>1)</sup>.

Aufstellung der Lampe. Die Lichtquelle soll so aufgestellt sein, daß durch die Beleuchtungslinse ein Bild von ihr auf dem Analysatordiaphragma entworfen wird. Zu dem Zwecke hält man an das Analysatordiaphragma ein Blättchen weißes Papier und dicht vor die Lichtquelle einen zugespitzten Draht; alsdann gibt man der Lichtquelle mit dem Draht eine solche Lage, daß ein scharfes Bild der Drahtspitze auf dem weißen Papier erzeugt wird (Landolt<sup>2)</sup>).

Ausführung von Bestimmungen. Nach richtiger Aufstellung der Natriumlichtflamme und scharfer Einstellung des Fernrohres  $F$  auf die Grenzlinien des Gesichtsfeldes wird die Klemme  $k$  gelöst und nun durch Bewegung des Hebels  $g$  dem Analysator eine Stellung gegeben, bei welcher die 3 Teile des Gesichtsfeldes annähernd gleiche Beschattung zeigen. Jetzt schraubt man  $k$  fest, führt durch Drehen der Mikrometerschraube  $m$  möglichst gleiche Beschattung des Gesichtsfeldes herbei und liest am Rande der Scheibe  $R$  durch die Lupen an Gradteilung und Nonius die Stellung ab. Diese Bestimmung wird oft wiederholt, auch das eine Mal von der einen, das andere Mal von der anderen Seite her die Gleichstellung herbeigeführt, schließlich aus allen Beobachtungen das Mittel berechnet (Nullpunkt). Bei Wiederholung der Versuchsreihe nach Drehung um  $180^\circ$  muß der gleiche Nullpunkt gefunden werden.

Durch Verschiebung des Zeigers  $h$  an seiner Skala und hierdurch bewirkter Drehung des das ganze Gesichtsfeld deckenden Nicolschen Prisma kann man erkennen, bei welchem Winkel der Polarisationssebene desselben zu derjenigen des Polarisators für die herrschende Belichtung die schärfste Bestimmung erzielt werden kann.

Nachdem auf dem beschriebenen Wege die Bestimmung des Nullpunktes mit möglichster Schärfe ausgeführt ist, wird die Röhre mit der zu prüfenden Flüssigkeit eingelegt, das Fernrohr scharf eingestellt und nun die Bestimmung in der angegebenen Weise wiederholt. Die Differenz der beiden Ablesungen ergibt die Größe des Winkels, um den die Flüssigkeit nach links oder rechts dreht.

Um den Sinn der Drehung in zweifelhaften Fällen festzustellen, verfährt man nach § 32; desgleichen werden die Berechnungen der spezifischen Drehung

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 84, S. 300. 1913.

<sup>2)</sup> a. a. O. S. 289.

und des Gehaltes an optisch aktiver Substanz im bestimmten Volumen der Flüssigkeit in der in § 32 angegebenen Weise ausgeführt.

Über eine mit dem Polarisationsapparat kombinierte Vorrichtung zur selbsttätigen photographischen Registrierung der Drehungsänderungen, welche in Flüssigkeiten, z. B. unter der Einwirkung von Fermenten auftreten, s. Abderhalden und Wildermuth<sup>1)</sup>.

Mikropolarisation. Über die Apparatur und das Verfahren bei der polarimetrischen Bestimmung ganz kleiner Mengen (5—10 mg) (Mikropolarisation) s. E. Fischer<sup>2)</sup>.

*Halbschattenapparat mit Keilkompensation zur Bestimmung des Traubenzuckergehalts nach Schmidt & Haensch (Saccharimeter).*

34. Es ist ein Apparat, bei dem zwischen Polarisator und Analysator, die beide festliegen, eine Quarzkeilkompensation eingeschaltet ist und der in folgedessen bei weißem Licht benutzt werden kann. Es ist ferner so eingerichtet, daß auf der Skala direkt der Gehalt der untersuchten Flüssigkeit an Traubenzucker in Prozenten (d. h. Grammen in 100 ccm Flüssigkeit) abgelesen werden kann. Abb. 15 stellt den Apparat dar. Von der Lampe aus tritt das Licht ein. Bei *B* ist die Beleuchtungslinse, bei *P* das Halbschattenprisma angebracht. In dem Gehäuse *G* befindet sich der Quarzkeil, dessen Verschiebung durch die Schraube *T* an der Skala durch die Lupe *L* ablesbar ist. Die Beleuchtung der Skala erfolgt durch den Spiegel *M*, der sein Licht von der Beobachtungslampe her empfängt. Von der Quarzkeilkompensation

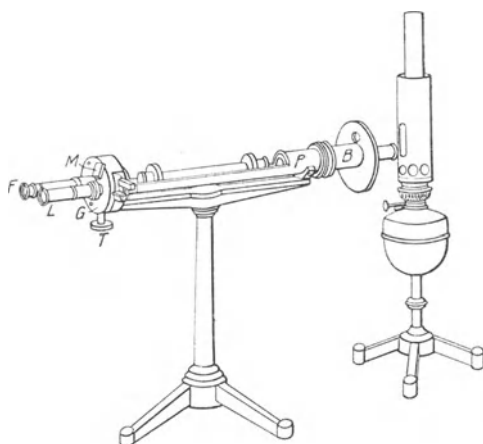


Abb. 15. Saccharimeter.

geht das Licht zum Analysator und zum Fernrohr *F*. Soll eine Bestimmung ausgeführt werden, so überzeugt man sich zunächst, daß nach richtiger Aufstellung der Lampe und scharfer Einstellung des Fernrohrs bei gleicher Helligkeit der beiden Gesichtshälften, die man durch Drehen an der Schraube *T* herstellt, der Nullstrich der Skala mit dem Nullstrich des Nonius genau zusammenfällt. Ist das nicht der Fall, so muß der Nonius mittels eines dem Apparat beigegebenen Schlüssels entsprechend verschoben werden. Jetzt wird die Beobachtungsröhre (von 2, 1 oder  $\frac{1}{2}$  dm Länge) eingelegt und nach Richtigstellung des Fernrohrs an der Schraube *T* bis zur gleichen Helligkeit beider Gesichtshälften gedreht. Bei Benutzung einer 2 dm langen Röhre gibt die Teilstrichzahl der Skala, bei der der Nullstrich des Nonius steht, direkt den Prozentgehalt an Traubenzucker an, bei Benutzung einer 1 oder  $\frac{1}{2}$  dm langen Röhre muß die Zahl mit 2 oder 4 multipliziert werden.

Ein einfacher Polarisationsapparat, ebenfalls mit Quarzkeilkompensation, der gleichzeitig für Makro- und Mikrobestimmung bei weißem Licht verwendet werden kann und auf Traubenzucker (Meßbereich — 8 bis + 10%) geeicht ist, aber natürlich auch zur Polarisation von Aminosäuren usw. dienen kann, ist von Neuberg<sup>3)</sup> angegeben worden.

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. Fermentforsch. Bd. 1, S. 63. 1916.

<sup>2)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 44, 1, S. 129. 1911.

<sup>3)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 67, S. 102. 1914.

### Refraktometrie.

35. Sie dient zur Bestimmung des Brechungskoeffizienten (Brechungsindex, Brechungsexponenten) einer Substanz, welcher in vielen Fällen ein Kennzeichen der Reinheit und ein Maß der Konzentration der Lösungen ist.

Von den für diesen Zweck angegebenen Instrumenten soll nur auf das Eintauchrefraktometer von Pulfrich und seine Handhabung eingegangen werden.

*Ausführung in Flüssigkeiten, die nicht zu dunkel gefärbt sind, und nicht nur in ganz kleinen Mengen (Tropfen) zur Verfügung stehen.*

Die Bestimmungen beruhen auf der Messung des Grenzwinkels der Brechung bei streifendem Einfall des Lichtstrahls an der Grenze der zu untersuchenden Flüssigkeit und eines Glasprismas. Zwischen dem Brechungswinkel und dem Brechungsexponenten der Substanz besteht eine einfache Beziehung, so daß der letztere leicht berechnet werden kann.

Die an der Grenzfläche des Prismas gebrochenen Strahlen gelangen in den Tubus eines Fernrohrs und werden hier in einer Bildebene vereinigt, wobei die der streifenden Incidenz entsprechenden die helle Zone der Bildebene abgrenzen. Die Messung geschieht durch eine in der Bildebene befindliche Skala mit willkürlicher Teilung (von  $-0,5$  bis  $+105$ ), auf die eingestellt wird.

Da der Brechungsexponent mit der Temperatur veränderlich ist, müssen alle Bestimmungen bei einer bestimmten Temperatur ausgeführt werden.

Das Prisma *P* (Abb. 16) ist unmittelbar an das Fernrohr angeschlossen. Dieses enthält einen dreiteiligen Amicischen Prismensatz *A*, der den Zweck hat, den bei Benutzung von Tageslicht an der Grenzlinie auftretenden farbigen Saum zu beseitigen, und dem man durch Drehung an dem geriefelten Ring *R* eine entsprechende Stellung gibt, ferner die erwähnte Skala *Sc*, welche durch die Mikrometerschraube *Z* verschoben werden kann. Während des Versuchs hängt das Fernrohr in einem Bügel *H* über dem Wasserbad (Abb. 17),

Abb. 16. Eintauchrefraktometer nach Pulfrich.

in das eine Anzahl kleiner Bechergläser mit den zu untersuchenden Flüssigkeiten eingesetzt sind, und taucht mit seinem Prisma in eine dieser Flüssigkeiten ein. Das Wasserbad ist mit Zu- und Abfluß versehen und wird dauernd von Wasser der bestimmten Temperatur durchflossen. In seinen Boden ist eine matte Glasscheibe eingelassen, durch die mittels eines drehbaren Spiegels Licht in die im Becherglas befindliche Flüssigkeit reflektiert wird.

Prüfung des Instrumentes. Man stelle das Wasserbad so auf, daß der Spiegel dem hellen Himmel zugewendet ist, fülle es reichlich zur Hälfte mit Leitungswasser, bringe ein mit destilliertem Wasser gefülltes Becherglas in eines der 6 Löcher und hänge das Refraktometer an dem Bügel so auf, daß das Prisma ganz in das Becherglas eintaucht. Nach etwa 10 Minuten, nachdem das destillierte Wasser genau die Temperatur des Bades angenommen hat, stellt man das Okular durch Drehen an dem geriefelten Rande der Okularmuschel *Oc* auf größte Genauigkeit der Zahlen und Striche der Skala ein und richtet den Spiegel so, daß der Schein des hellen Himmels durch das

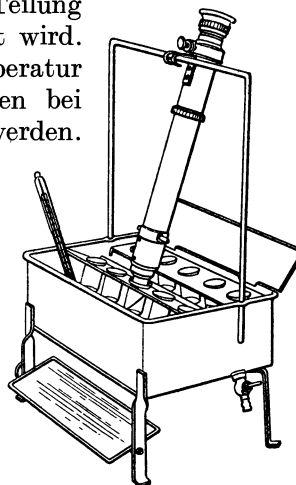


Abb. 17. Eintauchrefraktometer nach Pulfrich.

Becherglas sichtbar ist. Der obere Teil des Gesichtsfeldes von 0 bis etwa 15 erscheint jetzt hell und ist von dem unteren, dunklen Teile durch eine scharfe Grenze getrennt, wenn die Teilung am Ringe *R* auf 5 steht. Man liest nun ab, an welchem Skalenteil die Grenze von Hell und Dunkel liegt, und außerdem an einem Thermometer die Temperatur des Wassers im Becherglas, und vergleicht die Befunde mit folgenden Zahlen, wobei die in Klammern eingeschlossenen den dem Temperaturgrad entsprechenden Skalenteil ergibt:

10° (16,3)	16° (15,3)	21° (14,25)	26° (13,0)
11° (16,15)	17° (15,1)	22° (14,0)	27° (12,7)
12° (16,0)	17,5° (15,0)	23° (13,75)	28° (12,4)
13° (15,85)	18° (14,9)	24° (13,5)	29° (12,1)
14° (15,7)	19° (14,7)	25° (13,25)	30° (11,8)
15° (15,5)	20° (14,5)		

Weicht das Mittel mehrerer sorgfältiger Ablesungen um mehr als 0,1 Teilstrich ab, so ist eine Justierung vorzunehmen, derentwegen auf die Carl-Zeiß-Druckschrift, Meß 165, S. 7 verwiesen wird.

**Ausführung einer Bestimmung.** Man bringe die Temperatur des Wasserbades auf die Normaltemperatur von 17,5° und Sorge dafür, daß sie konstant bleibt. Das Becherglas mit der zu untersuchenden Flüssigkeit (oder deren mehrere) wird in das Wasserbad eingesenkt, das Prisma des Refraktometers eingetaucht und nach etwa 10 Minuten, nachdem die Flüssigkeit die

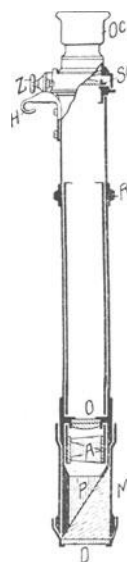


Abb. 18. Eintauchrefraktometer nach Pulfrich mit Becher.

Für diesen Zweck ist dem Refraktometer ein metallener, auf das Prisma aufsteckbarer Becher *M* (Abb. 18) beigegeben. Man hält mit der linken Hand das Instrument mit dem Prisma nach oben, setzt mit der rechten den Becher auf, zieht den Bajonettverschluß fest an, füllt den Becher fast vollständig mit der zu untersuchenden Flüssigkeit und setzt den Deckel *D* (Abb. 18), der unten eine Glasscheibe trägt, sorgfältig auf. Im übrigen wird wie oben beschrieben verfahren.

**Ausführung in Flüssigkeiten, die dunkel gefärbt sind oder nur in ganz kleinen Mengen zur Verfügung stehen (z. B. Blutserum).**

Die Bestimmungen beruhen auf der Beobachtung des Grenzwinkels der Totalreflexion, welcher bei umgekehrtem Gang der Lichtstrahlen dem Grenz-

<sup>1)</sup> Diss. Jena, philos. Fak. 1903 u. Tabellen zum Eintauchrefraktometer. Sondershausen 1907. Vom Verfasser oder von Carl Zeiß-Jena zu beziehen.

winkel der Brechung gleich ist, so daß dieselbe einfache Beziehung zum Brechungsexponenten besteht.

Um das Refraktometer für diese Bestimmung geeignet zu machen, verwendet man ein Hilfsprisma und verfährt so: Man setzt, wie oben beschrieben, den Metallbecher auf das Instrument, bringt auf die horizontal gehaltene Hypotenusenfläche des Hilfsprismas einige Tropfen der zu untersuchenden Flüssigkeit, schiebt dieses so in den Becher ein, daß seine Hypotenusenfläche auf die elliptische Fläche des Refraktometerprismas zu liegen kommt und setzt den Deckel auf. Die Flüssigkeitsmenge soll den Zwischenraum zwischen den beiden Prismenflächen ganz ausfüllen. Dazu reichen aber einige Tropfen schon aus. Durch Anbringung eines kleinen Korkstopfens, der gegen den Deckel drückt, ist dafür gesorgt, daß das Hilfsprisma an dem Hauptprisma fest anliegt. Im übrigen wird wie angegeben verfahren.

### Untersuchung der Fluorescenz.

36. Fluorescenz in auffallenderem Grade zeigen nur wenige der in höheren Tieren vorkommenden Substanzen. Stark fluorescieren die Lösung der Gallensäuren in konzentrierter Schwefelsäure sowie Urobilinlösungen. Eiweißlösungen, Harn usw. lassen schwache Fluorescenz erkennen.

Um eine Flüssigkeit auf Fluorescenz zu prüfen, läßt man Sonnenlicht durch eine Linse konzentriert, in die Flüssigkeit in der Weise einfallen, daß die Spitze des gebildeten Lichtkegels sich in der Flüssigkeit befindet. Erkennt man den Lichtkegel in der einen oder anderen Farbe leuchtend und bleibt dieses Leuchten unverändert, wenn man den Kegel durch ein Nicolsches Prisma betrachtet, und dies Prisma vor dem Auge um seine Längsachse herumdreht, so ist die Flüssigkeit fluorescierend. Wird dagegen der leuchtende Kegel bei der Drehung des Nicols dunkler und bei weiterer Drehung wieder heller, so rührt die Zerstreuung des Lichtes nicht von Fluorescenz her, sondern von feinen in der Flüssigkeit suspendierten Teilchen.

## Zweite Abteilung.

# Vorkommen, Darstellung, Eigenschaften und Nachweis der bis jetzt aus dem Tierkörper gewonnenen Stoffe.

## Anorganische Stoffe.

### Allgemeines.

Jeder Teil eines tierischen oder menschlichen Körpers, sei er eine mit Flüssigkeit imbibierte geformte Masse wie Fleisch oder Drüsensubstanz, sei er, wie z. B. die Sekrete, eine Flüssigkeit, läßt sich in Wasser und eine Anzahl fester Körper zerlegen. In jedem Organe eines Tieres, in jeder seiner Flüssigkeiten sind C, H, N, O, S, P in verschiedenen chemischen Kombinationen enthalten; alle hinterlassen ferner beim Glühen mehr oder weniger Asche. Die chemischen Stoffe, welche man als Bestandteile des Körpers kennengelernt hat, werden in organische und anorganische eingeteilt, je nachdem dieselben Kohlenstoff enthalten oder nicht. Die Aschen können, abgesehen von der Kohlensäure, nie organische Stoffe enthalten, aber sie stellen durchaus nicht immer die Gesamtheit der anorganischen Stoffe dar, welche in der geglühten Substanz enthalten waren, da Ammoniakverbindungen beim Erhitzen leicht verflüchtigt werden, auch Schwefelsäure, Salzsäure, Phosphorsäure, wenn sie nicht mit feuerbeständigen Basen verbunden sind, beim Glühen verdampfen oder sich zerlegen. Die Bildung der Aschen ist sonach zunächst abhängig von dem Vorhandensein solcher Metallverbindungen, die in schwacher Glühhitze nicht flüchtig sind.

Die Betrachtung der anorganischen Stoffe ist der organischen im folgenden vorausgeschickt, da sie eine ziemlich gut abgegrenzte Klasse bilden, soweit sie die Bestandteile der Aschen sind. Das Ammoniak und seine Verbindungen bilden dann gleichsam den Übergang zu den organischen Stoffen, aus denen es bei der Zersetzung derselben fast immer entsteht, wenn diese Stoffe Stickstoff enthalten.

Die Behandlung der einzelnen Stoffe ist weder eine erschöpfende noch eine gleichmäßige. Rücksichten auf die analytischen Zwecke waren die in erster Linie maßgebenden.

Den sämtlichen in diesem Lehrbuche enthaltenen Berechnungen liegen die Atomgewichte  $H = 1,008$ ,  $C = 12,00$ ,  $O = 16,00$ ,  $N = 14,01$  usw. zugrunde (Atomgewichtstabelle im Anhang).

### Alkalimetalle.

Kalium und Natrium finden sich in fast jeder tierischen Asche nebeneinander; auch Lithium ist nachgewiesen worden. Die Verbindungen der Alkalimetalle, welche in den tierischen Organen und den daraus gewonnenen Aschen vorkommen, sind sämtlich in Wasser leicht löslich, werden aus ihren



wässrigen Lösungen weder durch kohlen-saures noch durch oxals-aures Ammoniak gefällt, sind in der schwachen Rotglühhitze nicht bemerkbar flüchtig, schmelzen dagegen in der Weißglühhitze und verflüchtigen sich dann allmählich unter Nebelbildung. Am flüchtigsten sind die kohlen- und die salzsauren Verbindungen, weniger die schwefelsauren und die phosphorsauren Salze dieser Metalle. Am leichtesten flüchtig sind die Kaliumverbindungen, am wenigsten die Natriumverbindungen. Lithium steht in der Mitte.

**37. Kalium K.** Kalium befindet sich besonders in der Asche der Muskeln, Vorkommen. der roten Blutkörperchen, der Nerven, des Eidotters, der Milch, des Harns, verbunden mit Salzsäure oder Schwefelsäure oder Phosphorsäure.

Fällungsreaktionen der Kalisalze:

Eigenschaften

1. Sie geben in nicht sehr verdünnten Lösungen mit einigen Tropfen Platinchlorid versetzt einen orangegelben, fein krystallinischen Niederschlag von Kaliumplatinchlorid, der in Wasser schwer, in Säuren leichter löslich, in Alkohol und Äther fast ganz unlöslich ist. Empfindlichkeitsgrenze bei etwa 0,2—0,3% K.

2. Sie geben mit Weinsäure einen weißen krystallinischen Niederschlag von saurem weinsauren Kali, wenn die Lösung ziemlich neutral oder von organischen Säuren sauer ist. Das saure weinsaure Kali löst sich in 180 Tl. kaltem Wasser; ist also die Lösung sehr verdünnt, so entsteht kein Niederschlag. Ist die Lösung nicht sehr konzentriert, so bildet sich der Niederschlag nur allmählich; Umschütteln und Reiben mit dem Glasstab beschleunigen seine Bildung. Empfindlichkeitsgrenze bei etwa 0,1—0,2% K. Abfiltriert, getrocknet und geglüht gibt dieser Niederschlag einen kohligen Rückstand, der Kaliumcarbonat enthält, daher alkalisch reagiert und mit Säuren aufbraust.

3. 10proz. Lösung von Natriumnitrit mit Kobaltchlorid und Essigsäure gemischt oder einfacher eine wässrige Lösung des käuflichen Kobaltnatriumnitrit  $\text{Na}_3\text{Co}(\text{NO}_2)_6$  gibt mit wässriger Lösung eines Kalisalzes sofort gelben krystallinischen Niederschlag  $\text{K}_3\text{Co}(\text{NO}_2)_6$ , wenn die Mischung mindestens 0,1% K enthält; bei geringerem Gehalte gelbe Lösung. Der Niederschlag ist unlöslich in Alkohol.

Macallum<sup>1)</sup> empfiehlt diese Reaktion auch für den mikrochemischen Nachweis von Kalium in tierischen und pflanzlichen Geweben.

4. Auf Zusatz von 10proz. Lösung von Phosphorwolframsäure entsteht in Lösungen, die 0,25% oder mehr K enthalten, sofort milchige Fällung, in Lösungen, die 0,1—0,2% K enthalten, nach 1—2 Minuten, in Lösungen, die 0,05% K enthalten, nach 1—2 Stunden (Wörner<sup>2)</sup>).

5. Auf Zusatz von wässriger Lösung von Überchlorsäure im Überschuß entsteht weißer krystallinischer Niederschlag von Kaliumperchlorat. 100 Tl. Wasser lösen bei 0° 0,07 Tl.

6. Nicht allzu verdünnte Lösungen werden durch Phosphormolybdänsäure gefällt, der Niederschlag ist gelb und feinpulverig wie phosphormolybdänsaures Ammoniak.

Kaliumverbindungen färben die Flamme violett. Zu dieser Prüfung glüht man zunächst das Ende eines reinen dünnen Platindrahtes in der Flamme, bis keine leuchtenden Dämpfe mehr davon ausgehen, taucht ihn dann in die zu prüfende möglichst konzentrierte Lösung oder nach Anfeuchten mit einem Tröpfchen Wasser in die Asche selbst, welche zu untersuchen ist, bringt ihn in den äußeren Saum der Flamme und beobachtet die davon ausgehende Färbung.

<sup>1)</sup> Journ. of physiol. Bd. 32, S. 95. 1905. Handb. d. biochem. Arbeitsmeth. Herausg. von Abderhalden. Bd. 5, 2, S. 1099. 1912.

<sup>2)</sup> Ber. d. Dtsch. pharmazeut. Ges. Bd. 10, S. 4. 1900.

Ist Kalium fast allein zugegen, so erhält die Flamme die bezeichnete violette Färbung, ist dagegen viel Natrium neben Kalium in der geprüften Substanz, so kann man das intensive Natriumlicht dadurch vom Auge abhalten, daß man die Flamme durch ein tiefblaues Kobaltglas beobachtet. Dies absorbiert das Natriumlicht stark, läßt dagegen das Kaliumlicht wenig geschwächt hindurchgehen<sup>1)</sup>. Die spektralanalytische Untersuchung des Kaliums zeigt helle Linie im Rot bei der Spektrallinie A und Linie im Violett.

Bei allen Untersuchungen auf Alkalimetalle usw. durch Flammenfärbung ist es unerlässlich, daß keine organischen Stoffe, auch keine Kohle, in der zu prüfenden Substanz enthalten sind, sowie daß die Flamme mit bläulichem Licht brennt.

**Nachweis.** Zum Nachweis dienen besonders die oben unter 1., 2. und 5. aufgeführten Reaktionen und die Flammenreaktion.

**Vorkommen.** 38. **Natrium Na.** Natrium befindet sich besonders reichlich im Blutplasma, Harn, Pankreassaft, in der Galle des Menschen und der meisten Tiere, in serösen Transsudaten gebunden an Salzsäure, Schwefelsäure, Phosphorsäure, Kohlensäure, und andere organische Stoffe, wie Milchsäure, Harnsäure usw.

Selbst konzentrierte Lösungen werden durch Platinchlorid, Weinsäure, Phosphorwolframsäure oder Phosphormolybdänsäure nicht gefällt.

**Eigenschaften.** Fällungsreaktion der Natronsalze:

Eine frisch bereitete Lösung von pyroantimonsaurem Kali gibt in nicht sehr verdünnten, neutralen oder schwach alkalischen Lösungen (saure sind zunächst durch Zusatz von Kalilauge oder Ammoniak schwach alkalisch zu machen) einen weißen, krystallinischen Niederschlag von pyroantimonsaurem Natron. Umschütteln und Reiben beschleunigt seine Bildung. Dieser Niederschlag löst sich in 300—400 Tl. kaltem, leichter in heißem Wasser.

Eine quantitative Fällung als gelbes Natriumcaesiumwismutnitrit erfolgt auch auf Zusatz einer mit Wismutnitrat und Caesiumnitrat versetzten Lösung von reinem Kaliumnitrit (Ball<sup>2)</sup>).

Bringt man eine natriumhaltige Substanz in die Flamme in gleicher Weise, wie es § 37 bezüglich der Prüfung auf Kalium angegeben ist, so entsteht eine strahlend gelbe Flammenfärbung. Diese Reaktion ist so scharf, daß nicht mehr sichtbare Staubteilchen am Platindraht diese Färbung deutlich erkennbar erzeugen, wengleich sehr vorübergehend. Ist in einer Substanz Natrium in nicht zu geringer Spur enthalten, so tritt dauerndes und intensiv strahlendes Leuchten ein. Die spektralanalytische Untersuchung zeigt gelbe Linie auf der Linie D. Beleuchtet man mit der gelben Natriumflamme Krystalle von saurem chromsauren Kali oder eine mit Quecksilberjodid bestrichene Papierfläche, so erscheinen erstere farblos, letztere weiß.

**Nachweis.** Zum Nachweis dient die Reaktion mit Kaliumpyroantimoniat und die Flammenreaktion.

**Lithium Li.** Lithium ist mittels Spektralanalyse in Fleisch, Blut und Milch von Tieren, die lithiumhaltiges Futter genossen, einige Male in Spuren nachgewiesen. E. Herrmann<sup>3)</sup> fand es ebenfalls mittels der Spektralanalyse als regelmäßigen Bestandteil menschlicher Organe, auch in menschlichen Föten.

Es färbt die Flamme intensiv rot, wenn es auf die oben § 37 geschilderte Weise am Platindraht geprüft wird.

Zur Prüfung einer Asche auf Spuren von Lithium fällt man zuerst durch Barytwasser die Phosphorsäure, filtriert und fällt im Filtrate das Barium durch verdünnte Schwefelsäure, erwärmt auf dem Wasserbade, filtriert, dampft das Filtrat ein und erhitzt den Rückstand zur Entfernung

<sup>1)</sup> Cartmell: Philosoph. mag. Novbr. 1858.

<sup>2)</sup> Journ. chem. soc. London Bd. 95, S. 2126. 1909 u. Bd. 97, S. 1408. 1910.

<sup>3)</sup> Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 109, S. 26. 1905.

der freien Schwefelsäure, indem man zuletzt einige Stückchen kohlen-saures Ammoniak in den Tiegel bringt. Nach dem Erkalten laugt man die Masse mit absolutem Alkohol aus, filtriert, dampft ein und prüft den Rückstand mittels Spektralanalyse. Helle Linien ungefähr auf der Mitte zwischen den Spektrallinien des Sonnenspektrums B und C. Herrmann benutzte ein etwas modifiziertes Verfahren.

### Erdalkalimetalle, Magnesium, Zink.

Calcium und Magnesium finden sich in allen Teilen der tierischen Organe. Strontium kommt gleichfalls bei Fütterung mit Strontium enthaltenden Nährstoffen vor. Die Skelettsubstanz der Acantharien besteht aus Strontiumsulfat (Bütschli<sup>1</sup>), die Granellen der als Xenophyophora bezeichneten Rhizopoden aus Bariumsulfat (F. E. Schulze und H. Thierfelder<sup>2</sup>). Calcium und Magnesium unterscheiden sich von den Alkalimetallen unter anderem durch die Unlöslichkeit ihrer neutralen kohlen-sauren und phosphor-sauren Salze in Wasser und größere Feuerbeständigkeit.

**39. Calcium Ca.** Es findet sich in geringer Menge in jeder tierischen Zelle und Flüssigkeit, reichlich in Knochen, Zähnen und allen tierischen Gerüstsubstanzen sowie in vielen pathologischen Produkten (Arterienverkalkungen, Tuberkelmassen, Harn-, Gallen-, Speichel-, Pankreassteinen). Auch in den Faeces ist es regelmäßig vorhanden. Man nimmt an, daß es in Knochen, Zähnen, pathologischen Ablagerungen an Phosphorsäure, Kohlensäure, Fluorwasserstoff gebunden ist, in den Lösungen an Phosphorsäure, Kohlensäure (als saures Salz), Salzsäure oder organische Säuren, in den Faeces an Schwefelsäure und organische Säuren sowie an Kohlensäure und Phosphorsäure. In den Zellen und Flüssigkeiten findet es sich vermutlich auch in Verbindung mit Protein- und anderen organischen Stoffen. Vorkommen.

Kalksalze werden gefällt:

Eigenschaften.

1. Durch Oxalsäure oder oxalsaures Ammoniak in neutralen, alkalischen oder essigsäuren Lösungen. Der weiße, sehr feinkörnige, zuweilen schwer filtrierbare Niederschlag, oxalsaurer Kalk, ist unlöslich in Wasser oder Alkohol, wird beim vorsichtigen Glühen ohne Verkohlung in kohlen-sauren Kalk, beim heftigen Weißglühen in Calciumoxyd verwandelt.

2. Durch neutrale kohlen-saure Alkalien in neutraler oder alkalischer Lösung. Der feine weiße Niederschlag, kohlen-saurer Kalk, ist leicht löslich in Säuren unter Aufbrausen. Saure kohlen-saure Alkalien fällen die Kalksalze nicht oder nicht vollständig, dagegen entsteht nach ihrem Zusatz ein Niederschlag beim längeren Kochen der Mischung.

3. Durch phosphorsaures Natron in neutraler oder alkalischer Lösung. Der weiße, flockige, gallertartige Niederschlag, phosphorsaurer Kalk, ist leicht löslich in Säuren, auch in citronensaurem Ammoniak, unlöslich in Alkalien.

4. Durch Schwefelsäure oder schwefelsaure Salze in nicht zu verdünnten, wässrigen, vollständig in alkoholischen Lösungen. Der bald kristallinisch werdende Niederschlag, schwefelsaurer Kalk, ist löslich in 400—500 Tl. Wasser, etwas leichter in Säuren oder konzentrierten Salzlösungen, unlöslich in Alkohol.

Die salpeter- und salzsauren Verbindungen des Calciums oder andere Kalksalze mit Salzsäure befeuchtet färben die Flamme gelbrot. Die spektralanalytische Untersuchung zeigt mehrere Linien im Grün und Orange und eine Linie im Violett.

Zum Nachweis dient besonders die unter 1. aufgeführte Reaktion.

Nachweis.

**40. Magnesium Mg** findet sich (in meist geringerer Quantität) als steter Begleiter des Calcium in tierischen Organen; reichlich ist es gewöhnlich im

Vorkommen.

<sup>1</sup>) Ref. Biochem. Centralbl. Bd. 6, S. 266. 1907.

<sup>2</sup>) desgl. Bd. 3, S. 657. 1904/05.

Harne, auch in den Faeces enthalten, fast stets in Verbindung mit Phosphorsäure, oft als phosphorsaure Ammoniakmagnesia in Krystallen (fauler Harn, Faeces usw.).

Eigenschaften. Die Lösungen der Magnesiumverbindungen werden durch schwefelsaure oder oxalsaure Alkalisalze aus verdünnten Lösungen nicht gefällt, dagegen treten Fällungen ein:

1. Bei Gegenwart von Chlorammonium durch Ammoniak und phosphorsaures Natron als allmählich entstehender krystallinischer, in reinem Wasser sehr wenig, in Säuren, auch in Essigsäure, leicht löslicher weißer Niederschlag: phosphorsaure Ammoniakmagnesia. Derselbe ist unlöslich in citronensaurem Ammoniak.

2. Durch kohlensaures Natron in neutraler Lösung bei Abwesenheit von Ammoniakverbindungen. Die Fällung ist nur durch Kochen der Mischung vollständig zu erhalten. Der bei gewöhnlicher Temperatur dargestellte weiße gallertige Niederschlag ist basisch kohlen saure Magnesia. Saure kohlen saure Alkalien fällen Magnesiasalze gar nicht; durch kohlen saures Ammoniak werden sie teilweise gefällt und bei Gegenwart von Chlorammonium tritt erst sehr spät schwache Fällung ein.

3. Durch Alkalien, Kalk- oder Barytwasser wird aus Lösungen der Magnesiasalze Magnesiumhydroxyd als flockiger weißer Niederschlag ausgeschieden, löslich in Ammoniumsalsen.

Nachweis. Zum Nachweis dient besonders die unter 1. aufgeführte Reaktion.

Vorkommen. 41. Zink Zn findet sich in kleiner Menge in den menschlichen Organen, besonders in der Leber (Rost und Weitzel<sup>1</sup>), v. Itallie und v. Eck<sup>2</sup>), Giaya<sup>3</sup>) u. a.), Prostata und Sperma (Bertrand und Vladesco<sup>4</sup>), Organen von Wirbellosen (Bertrand und Vladesco<sup>5</sup>), auch in den Organen von Kaninchen und anderen Wirbeltieren, besonders auch der Vögel (Bertrand und Vladesco<sup>6</sup>), auch in Leber und Blut von Mollusken (Sycotypus), in Austern (Hiltner und Wichmann<sup>7</sup>) und anderen Seetieren (Bodansky<sup>8</sup>), Severy<sup>9</sup>).

Eigenschaften. Die Lösungen der Zinksalze werden gefällt:

1. Durch Alkalien oder Ammoniak als weißes gallertiges Hydroxyd, welches im Überschuß des Fällungsmittels und in Säuren löslich ist.

2. Durch Schwefelammonium als weißes gelatinöses Schwefelzink, welches in verdünnten Mineralsäuren löslich, in Essigsäure unlöslich ist.

3. Durch kohlen saure Alkalien als basisches Zinkcarbonat, durch phosphorsaure Alkalien als Zinkphosphat, durch Ferrocyankalium als Ferrocyanzink.

Über die Bestimmung in Organen, Kot, Harn siehe auch Weitzel<sup>10</sup>).

### Schwermetalle.

Vorkommen. 42. Eisen Fe. Eisen findet sich im roten Farbstoffe des Blutes der Wirbeltiere, daher relativ reichlich als Ferrioxyd in der Asche des Blutes, welche durch dasselbe rötlich gefärbt erscheint. Außer dem Blut ist besonders die Galle noch eisenhaltig, doch ist die Quantität hier schon sehr unbedeutend. Kleine Mengen finden sich in Leber, Milz, Lymphdrüsen, reichlicher (Ablagerungen von Ferrihydroxyd) unter pathologischen Verhältnissen. In den übrigen

<sup>1</sup>) Arb. a. d. Kais. Gesundheitsamt Bd. 51, S. 494. 1919.

<sup>2</sup>) Arch. d. Pharm. Bd. 251, S. 50. 1913.

<sup>3</sup>) Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 170, S. 906; ref. Chem. Zentralbl. 1920, III, S. 420.

<sup>4</sup>) Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 173, S. 176; ref. Chem. Zentralbl. 1922, III, S. 186.

<sup>5</sup>) Bull. de la soc. chim. de France [4] Bd. 33, S. 341; ref. Chem. Zentralbl. 1923, III, S. 1176.

<sup>6</sup>) Bull. de la soc. chim. de France [4], Bd. 31, S. 268; ref. Chem. Zentralbl. 1922, III, S. 276.

<sup>7</sup>) Journ. biol. chem. Bd. 38, S. 205. 1919. <sup>8</sup>) desgl. Bd. 44, S. 399. 1920.

<sup>9</sup>) desgl. Bd. 55, S. 79. 1923.

<sup>10</sup>) Arb. a. d. Kais. Gesundheitsamt Bd. 51, S. 476. 1919.

Gewebe und tierischen Flüssigkeiten zeigen sich nur Spuren davon, so z. B. im Harn. Im Inhalte des Darmkanals kann es sich reichlich finden, da die Speisen fast stets eisenhaltig sind.

In Leichen hat sich teils im Darmkanale, teils in verschiedenen Organen oft Vivianit, Ferrophosphat, gefunden, das seine Entstehung wohl stets einer Zersetzung der organischen Stoffe durch Fäulnis und Reduktion des Ferrioxides verdankt.

Bei der Prüfung auf Eisen hat man sehr darauf zu achten, daß die Reagenzien und das benutzte Filtrierpapier eisenfrei sind, und daß kein Staub Eisenpartikel in die Flüssigkeit trägt.

Das Eisen ist in den hier in Betracht kommenden Verbindungen in der heftigsten Weißglühhitze durchaus nicht flüchtig; trotzdem kann es bei Veraschungen leicht geschehen, daß durch die entweichenden Gase wägbare Quantitäten von Ferrioxyd fortgerissen werden (§ 10). In den Aschen findet sich das Eisen nach völligem Verbrennen der Kohle stets als Ferrioxyd frei oder an Phosphorsäure gebunden. Eigenschaften.

Lösungen, welche das Eisen als Ferriverbindung enthalten, werden gefällt:

1. Durch Alkalien oder kohlen-saure Alkalien. Der flockige, rotbraune, gallertige Niederschlag, welcher Alkali enthält, besteht aus Ferrihydroxyd, ist unlöslich in überschüssigem Alkali und verwandelt sich beim Erhitzen in pulveriges Ferrioxyd. Befindet sich in der Lösung Weinsäure in hinreichender Menge, so tritt diese Fällung nicht ein.

2. Durch Schwefelammonium in neutraler oder alkalischer Lösung (auch bei Gegenwart von Weinsäure). Der schwarze Niederschlag (grüne Färbung bei starker Verdünnung) besteht aus Ferrosulfid; der Bildung des letzteren geht eine Reduktion des Ferrisalzes zu Ferrosalz voran, bei der zugleich Schwefel abgeschieden wird. Das Schwefeleisen ist leicht zerlegbar durch Mineralsäuren, wird an der Luft rot durch Oxydation zu basischem Ferrisulfat. In Schwefelammonium ist das Schwefeleisen völlig unlöslich.

3. Durch Ferrocyankalium in neutraler oder salzsaurer Lösung. Der blaue Niederschlag, Berlinerblau, wird durch Alkalien in Ferrihydroxyd und Ferrocyanmetall zerlegt.

4. Durch Gallustinktur in neutraler Lösung schwarz (Tinte).

5. Durch phosphorsaures Natron in neutraler oder essigsaurer Lösung. Der gelblichweiße flockige Niederschlag, Ferriphosphat, ist unlöslich in Essigsäure, etwas löslich in überschüssigem Ammoniak, phosphorsaurem Natron oder Ferriacetat.

6. Durch Kochen mit essigsauerm Natron in neutraler Lösung; der rotbraune Niederschlag ist basisches Ferriacetat.

Durch Rhodankalium werden selbst sehr verdünnte Lösungen von Ferrisalzen schön blutrot gefärbt, wenn die Lösung etwas freie Salzsäure enthält.

Schwefelwasserstoff fällt Eisen aus seinen Lösungen in verdünnten Mineralsäuren nicht, reduziert aber beim Erwärmen das Ferrisalz zu Ferrosalz unter Abscheidung von Schwefel. Metallisches Zink reduziert das Ferrisalz in salzsaurer Lösung schnell zu Ferrosalz.

Zum Nachweis dienen besonders die Reaktionen mit Ferrocyankalium Nachweis. und mit Rhodankalium.

**Mangan Mn.** Mangan findet sich zuweilen in geringen Spuren als Begleiter des Eisens Vorkommen. in der Blutase und in der Asche der Galle, doch ist sein Vorkommen in diesen Aschen durchaus

nicht konstant (Hoppe - Seyler). Nach Bertrand und Medigreceanu<sup>1)</sup> findet es sich in Blut und Organen der Säugetiere, Vögel und Fische. Es ist ferner nachgewiesen im Blut der Steckmuschel (Pinna) und in den Geweben der Süßwassermuscheln Unio und Anadonta (Bradley<sup>2)</sup>), in Wohnröhren und Geweben von Meeranneliden (Berkeley<sup>3)</sup>).

**Eigenschaften.** Es ist in den in Betracht kommenden Verbindungen in der heftigsten Weißglühhitze durchaus nicht flüchtig. Es wandelt sich beim Glühen, wenn die übrigen Bestandteile seiner Verbindungen flüchtig sind, in Oxyduloxyd um und so, meint man, sei es auch in den Aschen enthalten; ist jedoch Alkalicarbonat zugegen, so geht es beim Glühen an der Luft in Mangansäure über. Die wässrige Alkalmanganat enthaltende Lösung der Asche färbt sich bald rot und scheidet einen flockigen Niederschlag von manganiger Säure ab.

Manganosalze werden aus ihren Lösungen gefällt:

1. Durch Alkalien als weißes Hydroxyd, welches an der Luft schnell in braune manganige Säure und Manganite übergeht. Ammoniak ruft bei Gegenwart von Ammoniaksalzen und Ausschluß der Luft keine Fällung hervor.

2. Durch Schwefelammonium in konzentrierter Lösung sogleich, in verdünnter allmählich als gelblicher oder fleischroter Niederschlag, Schwefelmangan, welcher in Schwefelammonium unlöslich ist, an der Luft bald braun wird durch Umwandlung in manganige Säure und Manganite. Bei Gegenwart von viel Ammoniak ist Mangan aus verdünnten Lösungen durch Schwefelammonium schwer fällbar.

3. Durch kohlen saure oder phosphorsaure Alkalien, weißer Niederschlag.

**Nachweis.** Zum Nachweis dienen folgende Reaktionen:

1. Eine Probe einer manganhaltigen Substanz, mit etwas trockener Soda und Salpeter auf Platinblech heftig geglüht, gibt eine blaugrüne geschmolzene Masse (mangansaures Alkali); sehr scharfe und sichere Probe. 2. Erhitzt man eine manganhaltige Substanz mit etwas sirupöser Phosphorsäure und Salpeter im Porzellantiegel, so erhält man eine schöne, violette, geschmolzene Masse von Manganphosphat. 3. Bringt man in einem Probierröhrchen auf etwas Bleihyperoxyd oder Mennige etwas von einer chlorfreien manganhaltigen Flüssigkeit, fügt verdünnte Salpetersäure hinzu und erhitzt zum Sieden, so tritt schöne violette Färbung der Flüssigkeit durch gebildete Übermangansäure ein\*) (Hoppe - Seylers Probe).

**Vorkommen.** 43. **Kupfer Cu.** Das Vorkommen von Kupfer in Leber und Galle der Menschen und Säugetiere ist fast konstant, auch in Niere, Milz, Gehirn von Menschen ist es in geringerer Menge, im Blut in Spuren nachgewiesen; im Blute einiger Krebs- und Schneckenarten, auch im Blute und in der Leber von manchen Cephalopoden und Gastropoden, in Seefischen und anderen Seetieren<sup>4)</sup> ist es reichlich und konstant gefunden. In welcher Verbindung das Kupfer in diesen tierischen Geweben sich befindet, ist nicht sicher festgestellt, jedenfalls handelt es sich um eine Kupferproteinverbindung. Henze<sup>5)</sup> fand das Nucleoproteid des Hepatopankreas von Octopoden kupferhaltig. Im Blut der genannten niederen Tiere findet es sich im Farbstoff (Hämocyanin). Auch der Farbstoff aus den Flügel Federn von Musophagiden (Turacin) ist kupferhaltig.

Bei Darstellung der Aschen kupferhaltiger organischer Massen durch Glühen bei Luftzutritt wird es stets als Oxyd gewonnen. Die Lösungen der Cuprisalze werden gefällt:

**Eigenschaften.** 1. Durch Alkalien bei gewöhnlicher Temperatur als gelatinöser, flockiger, blauer Niederschlag, Cuprihydroxyd. Dieser Niederschlag entsteht nicht bei Gegenwart von viel Ammoniak oder gewissen organischen Stoffen. Das Hydroxyd verwandelt sich beim Kochen der Flüssigkeit, in der es suspendiert ist, in schwarzes, feinflockiges oder pulveriges Oxyd.

2. Durch Schwefelwasserstoff in verdünnter, saurer oder neutraler Lösung als schwarzes, flockiges, in Wasser (nach Oxydation zu Kupfersulfat) oder Schwefelammonium ein wenig lösliches Cuprisulfid.

3. Durch kohlen saures Natron als grünlich blaues, basisches Kupfercarbonat.

4. Durch Ferrocyan kalium als kapuzinerbraunes Ferrocyan kupfer (in sehr verdünnter Lösung entsteht nur braune Färbung derselben).

5. Durch metallisches Eisen oder Zink als metallisches Kupfer, welches das in die Lösung gestellte Eisen- oder Zinkstück als kohärente Schicht überzieht.

6. Durch Traubenzucker in alkalischer Lösung bei Abwesenheit von Ammoniak in der Wärme als gelbes Cuprohydroxyd oder rotes Cuprooxyd.

\*) Die Probe gelingt in der beschriebenen Ausführung nur bei Anwesenheit von sehr wenig Mangan.

<sup>1)</sup> Bull. de la soc. chim. de France [4] Bd. 11, S. 857. 1912 u. [4], Bd. 13, S. 18. 1913. — Reiman u. Minot, Journ. of biol. chem. Bd. 42, S. 329. 1920.

<sup>2)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 3, S. 151. 1907; Bd. 8, S. 237. 1910/11.

<sup>3)</sup> Biochem. Journ. Bd. 16, S. 70. 1922.

<sup>4)</sup> Zusammenstellung der Literatur bei Rose u. Bodansky: Journ. biol. chem. Bd. 44, S. 99. 1920. Siehe auch Severy, ebenda Bd. 55, S. 79. 1923.

<sup>5)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 55, S. 433. 1908.

Ammoniak oder kohlensaures Ammoniak bewirken in neutralen oder sauren Lösungen zunächst Niederschläge, die bei Zusatz eines Überschusses mit blauer Farbe in Lösung gehen unter Bildung einer komplexen Verbindung. Die blaue Farbe der Lösung ist auch bei geringem Kupfergehalt bemerkbar.

Alle Kupfersalze färben besonders nach Zusatz von etwas Salzsäure die Flamme schön grün.

Selbst aus den verdünntesten Lösungen wird Kupfer durch Elektrolyse am positiven Pol abgeschieden. Über den elektrolytischen Nachweis siehe den nächsten Paragraphen. Nachweis.

**44. Blei Pb.** Blei ist hier und da im Blut in Spuren nachgewiesen, zuweilen auch in der Leber. Bei Bleikrankheiten ist es in Knochen, Muskeln, Leber, Harn gefunden. Vorkommen.

Lösungen der Bleisalze werden gefällt:

Eigenschaften.

1. Durch Alkalien als weißes, im Überschuss lösliches Bleihydroxyd.

2. Durch Schwefelwasserstoff aus nicht zu saurer Lösung als schwarzes, in Schwefelammonium unlösliches Schwefelblei.

3. Durch Natriumcarbonat als weißes basisches Bleicarbonat (Bleiweiß).

4. Durch Salzsäure nur aus konzentrierten Lösungen als in heißem Wasser reichlich lösliches weißes Chlorblei.

5. Durch Schwefelsäure auch aus verdünnten Lösungen als weißes Bleisulfat.

6. Durch Kaliumchromat als gelbes Bleichromat, durch Jodkalium als gelbes Jodblei.

Gegen die Elektrolyse verhält es sich ebenso wie Kupfer.

Zum Nachweis von Kupfer oder Blei in Flüssigkeiten oder Organen bedient man sich mit Nachweis.

Vorteil der Elektrolyse: Man mischt die zu prüfende Substanz, die möglichst mechanisch vorher zu zerkleinern ist, in einer Porzellanschale mit verdünnter Salzsäure und trägt unter Erhitzen der Mischung auf dem Wasserbade allmählich kleine Portionen chloresäures Kali ein, so lange bis die Flüssigkeit hellgelb geworden ist und die organischen Stoffe nur gelblichweiße, flockige oder faserige Massen hinterlassen haben. Man filtriert jetzt ab, wäscht den Niederschlag einige Male mit heißem Wasser aus und engt die Flüssigkeit im Wasserbade auf ein kleines Volumen ein (färbt sie sich dabei dunkelbraun, so fügt man noch ein wenig chloresäures Kali hinzu). Man gießt dann die konzentrierte, noch saure Lösung in eine Flasche, deren Boden abgesprengt und durch ein wasserdicht übergebundenes Stück gutes vegetabilisches Pergament ersetzt ist, und hängt diese Zelle in einem Becherglase von etwas größerem Durchmesser, welches mit verdünnter Schwefelsäure zum Teil gefüllt ist, so auf, daß das Niveau der Flüssigkeit in der Zelle und dem Becherglase ungefähr gleich hoch steht, bringt ein Stück Platinblech an einem hinreichend starken Platindraht befestigt in der Weise unter den Pergamentboden der Zelle, daß es horizontal und ziemlich dicht an dem Boden anliegt, ein gleiches mit Platindraht verbundenes Platinblech in die Zelle ein, so daß es horizontal über dem Pergament liegt, und verbindet den ersteren Draht mit dem positiven, den letzteren mit dem negativen Pole einer galvanischen Batterie von etwa 4 Groveschen oder Bunsenschen Elementen. Sofort soll sich Entwicklung von Gasen an beiden Elektroden einstellen; ist sie zu stürmisch, so schaltet man ein Element fürs erste aus. Man läßt etwa 6 Stunden den Strom in Tätigkeit (ist die Quantität der Flüssigkeit groß, etwas länger, ist sie klein, so sind ein paar Stunden völlig ausreichend), unterbricht dann die Leitung, nimmt Platindraht und Blech aus der Zelle, spült ein paar Male mit destilliertem Wasser ab und stellt sie dann in ein Probierglas in verdünnte Salpetersäure, erhitzt zum Kochen, gießt die Lösung ab und verdunstet in einer kleinen Schale auf dem Wasserbade. Ist Blei vorhanden, so gibt der Rückstand mit einem Tropfen verdünnter Schwefelsäure einen weißen Niederschlag, der abfiltriert, mit dem Filter getrocknet und mit Soda auf Kohle mittels des Lötrohrs zum Schmelzen erhitzt regulinisches Blei gibt, welches durch Waschen, Schlemmen mit Wasser in einer Reibschale gereinigt und durch Reiben zum Blech ausgewalzt wird. Ist dagegen Kupfer zugegen, so gibt der obige Rückstand auch nach dem Zusatz von Schwefelsäure (behufs Prüfung auf Blei) mit Ammoniak im Überschuss dunkelblaue Lösung und nach dem Verdunsten dieser Lösung und Ansäuern mit Salzsäure mit Ferrocyankalium einen braunen Niederschlag. Schon beim Herausnehmen der Elektrode aus der Zelle erkennt man, ob eine Ablagerung eines roten oder grauen Metalls stattgefunden hat. Die oben angegebenen Reaktionen der Metalle dienen zur weiteren Bestätigung.

**Vanadin V** findet sich in dem Chromogen der Blutkörperchen der Asciden (Henze<sup>1</sup>). Vorkommen.  
Beim Veraschen des Chromogens und Abrauchen mit Salpetersäure hinterbleibt es als orange-rotes Vanadinsäureanhydrid ( $V_2O_5$ ).

Angesäuerte Vanadinsäurelösungen werden durch Schwefelwasserstoff, durch Zink, durch Kochen mit Oxalsäure oder Weinsäure reduziert und blau. Gibt man Rhodankalium zu einer auch nur Spuren eines vanadinsäuren Salzes enthaltenden Lösung, so erhält man bei vorsichtigem tropfenweisen Zusatz von konz. Schwefelsäure eine tiefblaue Lösung. Eigenschaften.

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 72, S. 494. 1911; Bd. 79, S. 215. 1912.

**Arsen As** findet sich nach Gautier<sup>1)</sup> und Bertrand in ganz geringen Spuren physiologischerweise in weite Verbreitung in den tierischen Geweben. Hödlmóser<sup>2)</sup> u. a. konnten die Angaben nicht bestätigen. Nach Bloemendal<sup>3)</sup> können Spuren in den Geweben angetroffen werden. Vermutlich erklären sich diese Widersprüche aus örtlichen Verhältnissen (Vorhandensein und Fehlen von Arsen in Nahrung, Wasser, Boden usw.). Wegen der Methode des Nachweises siehe die angeführten Arbeiten. Unter Benutzung eines ganz besonders empfindlichen und schnellen quantitativen Verfahrens<sup>4)</sup> finden Billeter und Marfurt<sup>5)</sup> kleine Mengen in allen Teilen des menschlichen Körpers.

### Säuren.

**Vorkommen.** 45. **Chlorwasserstoff HCl.** Chlor findet sich gebunden an Kalium oder Natrium in fast allen Teilen des tierischen und menschlichen Körpers; nur im Magensaft ist bei Menschen und Säugetieren freie Salzsäure oder an organische Stoffe gebundene nachgewiesen. Besonders reichlich sind Chlormetalle, abgesehen vom Magensaft, im Blutserum, in Transsudaten und im Harn enthalten.

**Eigenschaften.** Der Chlorwasserstoff ist ein farbloses, mit Wasserdampf oder mit Ammoniakgas weiße Nebel bildendes Gas. Eine mehr oder weniger gesättigte Lösung dieses Gases in Wasser ist die bekannte Salzsäure. Durch stark oxydierende Substanzen, z. B. durch Manganhyperoxyd, wird der Chlorwasserstoff in Chlor und Wasser umgewandelt. Die Verbindungen mit Alkalien sind leicht löslich in Wasser, krystallisieren im regulären Systeme, meist als Würfel, in unreinen Lösungen auch in Oktaeder-, Pyramidenwürfel- und Tetraederform. Chlorkalium sowie Chlornatrium schmelzen in der Weißglühhitze und verflüchtigen sich dann, das Chlorammonium sublimiert bereits unter der Rotglühhitze, ist aber bei 100° nicht bemerkbar flüchtig. Chlorkalium und Chlornatrium sind sehr schwer löslich in absolutem Alkohol, leichter in verdünntem, unlöslich in Äther. Chlorammonium ist leichter löslich in Alkohol, auch etwas löslich in Äther. Durch freie Schwefelsäure werden diese Salze in freien Chlorwasserstoff und schwefelsaure Salze umgewandelt, durch Abdampfen und Erhitzen mit viel Salpetersäure in salpetersaure Salze. Chlorcalcium und Chlormagnesium sind sehr hygroskopisch, leicht löslich in Wasser oder Alkohol, nicht in Äther; beim heftigen Erhitzen verliert das letztere Chlorwasserstoff und die wässrige Lösung des Rückstandes reagiert alkalisch.

Die Lösungen der salzsauren Salze werden gefällt:

1. Durch salpetersaures Silber. Der weiße, besonders beim Erwärmen sich käsige absetzende Niederschlag von Chlorsilber ist unlöslich in Salpetersäure, löslich in Ammoniak, färbt sich am Licht grauviolett.

2. Durch Mercurosalze. Der weiße Niederschlag von Kalomel (Mercurchlorid) färbt sich mit Ammoniak schwarz.

3. Durch Bleisalze. Der weiße Niederschlag von Chlorblei löst sich schwer in kaltem, leicht in heißem Wasser.

**Nachweis.** Zum Nachweis dient die Reaktion mit Silbernitrat und das Verhalten des Chlorsilbers gegen Salpetersäure und Ammoniak.

**Vorkommen.** **Jod J** und **Jodwasserstoff HJ.** Jod kommt in organischer Bindung (Thyreoglobulin, Thyroxin) in der Schilddrüse vor, aber nach Blum und Grützner<sup>6)</sup> normalerweise nicht in anderen Organen oder Blut, unter pathologischen Verhältnissen (Eklampsie, Nephritis) hier und da im menschlichen Blut in ganz kleinen Mengen. Auch in Knochtumoren mit Schilddrüsenbau ist es nachgewiesen

<sup>1)</sup> Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 170, S. 261; ref. Chem. Zentralbl. 1920, I, S. 538. Hier die älteren Arbeiten von Gautier zitiert. Siehe auch Gautier: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 36, S. 391. 1902; Segale: desgl. Bd. 42, S. 175. 1904.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 33, S. 329. 1901; s. auch Cerny: desgl. Bd. 34, S. 408. 1911/12; Kunkel: desgl. Bd. 44, S. 511. 1905.

<sup>3)</sup> Arch. d. Pharmazie Bd. 246, S. 599. 1908.

<sup>4)</sup> Billeter: Helv. chim. act. Bd. 1, S. 475. 1918; Bd. 6, S. 258 u. 771. 1923.

<sup>5)</sup> Ebenda: Bd. 6, S. 780. 1923.

<sup>6)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 91, S. 450. 1914; Bd. 92, S. 360. 1914.



(Gierke<sup>1</sup>). Die menschliche Hypophyse ist auch frei von organisch gebundenem Jod (Wells<sup>2</sup>), Denis<sup>3</sup>). In den Gerüstsubstanzen einiger niederer Tiere (Anthozoen, Schwämme) findet es sich in organischer Bindung (Jodgorgosäure), auch in den Wohnröhren der Anneliden.

Beim Veraschen dieser jodhaltigen Gewebe mit Alkalien und Salpeter erhält man es als Jodalkali.

Lösungen von Jodiden werden durch salpetersaures Silber unter Bildung von gelbem, Eigenschaften. in Ammoniak und Salpetersäure unlöslichem Jodsilber gefällt. Versetzt man sie mit Chlorwasser oder mit Kaliumnitrit und Salpetersäure und schüttelt mit Chloroform, so färbt sich letzteres violett. Freies Jod färbt Stärkelösung intensiv blau.

**Brom Br und Bromwasserstoff HBr.** Brom findet sich in organischer Bindung (Brom- Vorkommen. gorgosäure) in den Gerüstsubstanzen der Anthozoen. In menschlichen Organen scheint Brom nicht vorzukommen (Pillat<sup>4</sup>).

Beim Veraschen bromhaltiger Gewebe mit Alkali und Salpeter erhält man es als Bromalkali.

Lösungen von Bromiden werden durch Silbernitrat gefällt, wobei leicht gelb gefärbtes Eigenschaften. Silberbromid, das in Salpetersäure unlöslich, in Ammoniak löslich ist, entsteht. Versetzt man sie mit Chlorwasser oder mit Kaliumnitrit und Salpetersäure und schüttelt mit Chloroform, so färbt sich letzteres gelb bis braun. Über empfindliche Bromreaktionen s. bei Pillat.

**.46. Fluorwasserstoff HF.** Fluor findet sich in sehr geringen Mengen in Vorkommen. allen menschlichen und tierischen Organen und Geweben (Blut, Herz, Nieren, Milz, Leber, Gehirn, Lungen, Knochen, Zähnen, Epidermis, Nägeln, Fischschuppen, Gräten usw.) (Zdarek<sup>5</sup>), Gautier und Clausmann<sup>6</sup>). Auch in Milch und Harn ist es nachgewiesen, ferner in Molluskenschalen. Man nimmt an, daß es an Calcium gebunden ist.

Fluormetalle werden durch konzentrierte Schwefelsäure unter Freiwerden Eigenschaften. von Fluorwasserstoff zerlegt, der gasförmige Fluorwasserstoff greift Glas an, indem er Fluorsilicium, Fluormetall und Wasser bildet.

Um Flüssigkeiten oder Gewebe auf Fluor zu prüfen, trocknet man sie, Nachweis. verascht den Rückstand, extrahiert die Asche, wenn sie viel lösliche Salze enthält, mit Wasser, ohne jedoch viel auszuwaschen. Den Rückstand kann man nach folgenden beiden Methoden untersuchen.

1. Man bringt ihn in einen Platintiegel, gießt einen Überschuß konzentrierter Schwefelsäure darauf und bedeckt den Tiegel sofort mit einem in folgender Weise vorbereiteten Uhrglase. Man überzieht es an der konvexen Seite mit geschmolzenem Wachs in dünner Schicht und graviert in diesen Überzug mittels eines spitzen Hölzchens einen Buchstaben in der Weise, daß in dieser Gravierung die spiegelnde Glasfläche entblößt ist. Man bedeckt mit diesem Glase, die konvexe Seite nach unten, den Tiegel (doch darf es die Flüssigkeit im Tiegel nicht berühren), bringt oben in seine Höhlung einige Tropfen Wasser oder besser ein Stückchen Eis und erwärmt den Tiegel auf etwa 40°. Indem man zuweilen die Masse im Tiegel mit einem Platindrahte umrührt, läßt man 24 Stunden stehen, entfernt dann durch Schmelzen des Wachses und Waschen mit Petroleum den Wachsüberzug, trocknet das Glas und beobachtet, ob der in den Wachsüberzug gravierte Buchstabe auf der Glasfläche aufgeätzt erscheint, und wenn er nicht sichtbar ist, ob er beim Anhauchen des Glases zum Vorschein kommt.

2. Ebenso läßt sich der Nachweis führen durch Überführung des Fluors beim Erhitzen mit Kieselsäure und konzentrierter Schwefelsäure in SiF<sub>4</sub> und Zerlegung dieses Gases durch Wasser (man bringe einen mit Wasser befeuchteten Glasstab in die Dämpfe) in Kieselfluorwasserstoff und Kieselsäurehydrat, das sich als gallertiger Niederschlag oder Beschlag an dem Glasstab abscheidet.

**47. Schwefelwasserstoff H<sub>2</sub>S.** Als ziemlich konstanter Bestandteil findet Vorkommen sich Schwefelwasserstoff in dem Gemisch der Gase im Dickdarm, oft auch im

<sup>1</sup>) Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 3, S. 286. 1903.

<sup>2</sup>) Journ. biol. chem. Bd. 7, S. 259. 1909/10. <sup>3</sup>) desgl. Bd. 9, S. 363. 1911.

<sup>4</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 108, S. 158. 1919/20.

<sup>5</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 69, S. 127. 1910.

<sup>6</sup>) Bull. soc. chim. de France [4], Bd. 13, S. 909. 1913.

übrigen Darne. Er bildet sich bei der Fäulnis in Leichenteilen sowie in brandigen Abscessen, Pneumothorax, faulendem Eiter. Auch bei der Autolyse der Leber und anderer Organe tritt er auf (Magnus - Levy<sup>1</sup>). In Verbindung mit Alkalimetallen erhält man ihn beim Kochen vieler schwefelhaltiger organischer Substanzen mit Alkalien oder beim Glühen von schwefelsauren Salzen mit Kohle bei gehindertem Luftzutritt.

**Eigenschaften.** Schwefelwasserstoff ist ein farbloses, wie faule Eier riechendes, vom Wasser reichlich absorbierbares Gas; es färbt feuchtes blaues Lackmuspapier rot (an der Luft getrocknet wird dies wieder blau), brennt mit bläulicher Flamme und wird durch Oxydationsmittel unter Abscheidung oder gleichzeitiger Oxydation des Schwefels oxydiert. Mit Alkalien verbindet sich Schwefelwasserstoff zu in Wasser löslichen, an der Luft sehr veränderlichen Schwefelmetallen.

Die Lösungen der Schwefelalkalien werden:

1. Durch viele Schwermetalle unter Bildung meist gefärbter Sulfide gefällt. Schwefelblei und Schwefelsilber sind schwarz und in verdünnten Säuren unlöslich.
2. Durch Nitroprussidnatrium rotviolett gefärbt.
3. Sie entwickeln auf Zusatz von Salzsäure Schwefelwasserstoff.

**Nachweis.** Freier Schwefelwasserstoff gibt die erste, aber nicht die zweite Reaktion. Zum Nachweis der Schwefelalkalien dient der schwarze Niederschlag (bzw. Schwarzfärbung) auf Zusatz von essigsauerm Blei und die Rotviolett-färbung auf Zusatz von Nitroprussidnatrium.

Zum Nachweise des Schwefelwasserstoffs dienen außer dem charakteristischen Geruche noch folgende Proben: Ein Schwefelwasserstoff enthaltendes Gasgemenge färbt 1. einen mit einer Lösung von essigsauerm Blei und etwas Ammoniak befeuchteten Papierstreifen schwarz; 2. einen mit einer Lösung von Nitroprussidnatrium und einem Tropfen verdünnter Natronlauge befeuchteten Papierstreifen rotviolett. Die geringsten Spuren von Schwefelwasserstoff findet man in Gasgemengen, wenn man dieselben durch eine mit überschüssiger Natronlauge versetzte Bleizuckerlösung streichen läßt.

**Vorkommen.** 48. Schwefelsäure  $H_2SO_4$ . Die Schwefelsäure, in sehr geringer Menge im Blute, in den Gewebsflüssigkeiten, auch in allen Sekreten enthalten, findet sich nur im Harn etwas reichlicher, wohl stets an Alkalien gebunden. Sie ist im Trinkwasser und in fast allen Nahrungsmitteln enthalten und bildet sich im Tierkörper als Oxydationsprodukt der Proteinstoffe. Sie ist im Molekül der Chondroitin- und Mucoitinschwefelsäure enthalten. Freie Schwefelsäure findet sich im Speicheldrüsensekret von *Dolium galea*, *Pleurobranchaea* und anderen Schnecken, in den Blutkörperchen der Ascidien (Henze<sup>2</sup>), in den Blasen-zellen des Mantels von *Ascidia mentula* (Henze<sup>3</sup>).

**Eigenschaften.** Die reine Schwefelsäure stellt eine erst weit über 100° flüchtige, mit Wasser, Alkohol oder Äther in jedem Verhältnisse mischbare, farblose Flüssigkeit dar. Sie ist bei gewöhnlicher Temperatur eine der stärksten Säuren und treibt alle leichter flüchtigen Säuren aus ihren Verbindungen beim Erwärmen aus. Die neutralen schwefelsauren Salze sind in Alkohol und Äther unlöslich. Beim Glühen mit Kohle werden sie zu Schwefelmetallen reduziert; beim Glühen mit Soda und Kohle geben sie Schwefelnatrium, welches in Wasser gelöst metallisches Silber schwarz färbt (Schwefelsilber) und beim Zusatz von Salzsäure Schwefelwasserstoff entwickelt.

Die Lösungen schwefelsaurer Salze werden gefällt:

1. Durch Chlorcalcium in konzentrierter Lösung. Der krystallinische Niederschlag, schwefelsaurer Kalk, bildet sich, wenn die Lösung nicht sehr

<sup>1</sup>) Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 2, S. 276. 1902.

<sup>2</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 79, S. 215. 1912. <sup>3</sup>) desgl. Bd. 86, S. 345. 1913.

konzentriert ist, allmählich, ist in viel Wasser löslich, leichter in Salzlösungen unlöslich in Alkohol.

2. Durch Chlorbarium oder salpetersauren Baryt. Der sehr feinkörnige, leicht durchs Filter gehende Niederschlag, schwefelsaurer Baryt, ist unlöslich in Wasser, kaum löslich in Säuren. In sehr verdünnten Lösungen entsteht er erst nach einigen Sekunden. Durch Erwärmen und Zusatz von Chlorammonium wird er besser filtrierbar. Stark mit Salzsäure oder Salpetersäure versetzte Lösungen geben auch bei Abwesenheit von Sulfaten mit Chlorbarium einen weißen, krystallinischen, in Wasser leicht löslichen Niederschlag.

3. Durch essigsäures Blei. Der weiße feinkörnige Niederschlag, schwefelsaures Blei, ist sehr schwer löslich in Wasser oder verdünnten Säuren.

4. Durch Benzidinchlorhydrat.

Zum Nachweis der Schwefelsäure benutzt man vor allem das Verhalten <sup>Nachweis.</sup> gegen Barytsalze, da dies keine Verwechslung zuläßt.

Unterschweiflige Säure (Thioschwefelsäure)  $H_2S_2O_3$ . Von Schmiedeberg<sup>1)</sup> und <sup>Vorkommen.</sup> Meißner<sup>2)</sup> als fast regelmäßiger Bestandteil des Katzenharns und sehr häufiger Bestandteil des Hundeharns nachgewiesen. Ihr Auftreten in diesen Harnen steht wahrscheinlich in Beziehung zum Cystin, welches im Hundeharn nicht selten ist und bei der Oxydation mit Wasserstoffhyperoxyd unterschweiflige Säure liefert. Spiegel<sup>3)</sup> fand auch in einem Fall von menschlicher Cystinurie diese Säure im Harn. Im Kaninchenharn erscheint sie bei Fütterung mit Weißkohl (Salkowski<sup>4)</sup>), ferner nach Eingabe von Taurin (Salkowski<sup>5)</sup>) und von Cystin (Wohlgemuth<sup>6)</sup>). Sie entsteht bei der Fäulnis von Cystin (Wohlgemuth<sup>7)</sup>), Taurin und Chondroitinschwefelsäure (Neuberg und Rubin<sup>8)</sup>).

Die unterschweiflige Säure ist im freien Zustande nicht bekannt, in Verbindung mit Natrium <sup>Eigenschaften.</sup> erhält man sie am einfachsten durch Kochen einer Lösung von schwefligsaurem Natron mit gepulvertem Schwefel. Ihre Alkali- und Erdalkalisalze sind ebenso wie das Magnesium- und Zinksalz in Wasser löslich, am wenigsten das Barytsalz, es entsteht daher ein Niederschlag von unterschweifligsaurem Baryt, wenn man eine nicht allzu verdünnte Lösung des Alkalisalzes mit Chlorbarium versetzt. Das Silbersalz ist unlöslich in Wasser, aber leichtlöslich in überschüssigem unterschweifligsaurem Alkali. Das unterschweifligsaure Silber schwärzt sich bald durch Bildung von Schwefelsilber. Das Kalk- sowie das Strontiansalz zersetzen sich beim Kochen der Lösung unter Abscheidung von Schwefel. Versetzt man die Lösung eines unterschweifligsauren Salzes mit Salzsäure, so trübt sich die Flüssigkeit bald durch Abscheidung von amorphem Schwefel, in der Lösung ist dann schweflige Säure. Unterschweifligsaure Salze entfärben Jod unter Bildung von jodwasserstoffsäuren und tetrathionsäuren Salzen.

Schmiedeberg stellte unterschweifligsauren Baryt aus Hunde- und Katzenharn dar, indem <sup>Darstellung aus Harn.</sup> er zunächst den Harn mit Kalkmilch und salpetersaurem Kalk fällte, dann durch Kohlensäure im Filtrate den Kalk entfernte, mit Essigsäure oder Salpetersäure neutralisierte und mit Bleiessig fällte. Den mit Wasser ausgewaschenen Bleiniederschlag zerlegte er mit kohlen-saurem Ammoniak, entfärbte mit Tierkohle, erwärmte mit Ätzbaryt, solange Ammoniak ausgetrieben wurde, fällte den überschüssigen Baryt mit Kohlensäure und dampfte das Filtrat zur Krystallisation ein.

Meißner behandelte den Harn sogleich mit Barytwasser im Überschuß, filtrierte, dampfte ein, fällte mit Alkohol. Der dicke weiße Niederschlag löste sich größtenteils in kochendem Wasser und beim Abdampfen und nachherigen Erkalten der Lösung schied sich der unterschweifligsaure Baryt in schönen farblosen Krystallen ab.

Gegen diese Darstellungsmethode ist nur einzuwenden, daß Cystin, welches jedenfalls oft in diesen Harnen vorkommt, bei dem längeren Erwärmen mit Barytwasser Schwefelbarium und durch Einwirkung der Luft unterschweifligsauren Baryt liefern kann.

Den einfachsten Nachweis der unterschweifligen Säure im Harne erhält man durch Zusatz <sup>Nachweis.</sup> von starker Salzsäure, der Harn wird bei ihrer Anwesenheit bald milchig trübe und setzt im Verlaufe mehrerer Tage Schwefel mit anderen Substanzen (Kynurensäure usw.) ab. Der Schwefel kann dann mit frisch rektifiziertem Schwefelkohlenstoff gelöst und durch Verdunsten der Lösung

1) Arch. d. Heilk. Bd. 8, S. 422. 1867.

2) Zeitschr. f. rat. Med. Bd. 31, S. 322 Anm. 1868.

3) Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. Bd. 166, S. 364. 1901.

4) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 89, S. 485. 1914.

5) Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. Bd. 58, S. 476. 1873.

6) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 40, S. 81. 1903/04.

7) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 43, S. 469. 1904/05.

8) Biochem. Zeitschr. Bd. 67, S. 82. 1914.

rein erhalten werden. Ferner gibt ein thiosulfathaltiger Harn, auf dem Drahtnetz zum Sieden erhitzt und tropfenweise aus einer Pipette mit Mercurichlorid versetzt, einen Niederschlag von Mercurisulfid, welcher zunächst schmutziggrau, beim Sieden schwarz oder grünlichschwarz wird (Salkowski<sup>1)</sup>) und sich in Salpetersäure nicht löst.

**Vorkommen.** 49. **Phosphorsäure  $H_3PO_4$ .** Nächst dem Calcium ist die Phosphorsäure im Körper der Wirbeltiere am reichlichsten von allen anorganischen Substanzen enthalten, und zwar besonders in den Knochen und Zähnen, hier nur an Calcium und Magnesium gebunden; sie findet sich mit diesen Metallen und mit Alkalimetallen verbunden in geringer Menge in allen tierischen Flüssigkeiten, besonders auch im Harn, ist ein gewöhnlicher Bestandteil der Harnsteine und anderer Konkremente und wird frei bei der Spaltung der Nucleinsäuren, der Phosphatide, des Lactacidogens, der Glycerinphosphorsäure, der Phosphorproteide und anderer wenig bekannter phosphorsäurehaltiger Verbindungen.

**Eigenschaften.** Sie ist eine farblose Säure, die bei gewöhnlicher Temperatur leicht aus ihren neutralen Salzen einen Teil des Metalls an andere Säuren abtritt und saure Salze bildet, in der Hitze dagegen die meisten Säuren aus ihren Salzverbindungen austreibt. Beim Erhitzen geht sie unter Wasserverlust in Pyro- und endlich in Metaphosphorsäure über, welche durch Glühen mit kohlenurem Natron wieder in gewöhnliche Phosphorsäure umgesetzt werden. Beim lebhaften Erhitzen der freien Säure in offener Platinschale verdampft sie, ihre neutralen Alkalisalze werden beim Erhitzen mit Kohle nicht zerlegt, die Verbindungen mit schweren Metallen dagegen werden durch Glühen mit organischen Stoffen zersetzt.

Die Phosphorsäure ist dreibasisch, gibt also mit Metallen drei Reihen von Verbindungen, ein neutrales und zwei saure Salze und viele Doppelsalze. Die Verbindungen mit Alkalien sind löslich in Wasser, unlöslich in Alkohol; die neutralen Verbindungen mit alkalischen Erden sind alle unlöslich in Wasser, etwas löslich in kohlenurehaltigem Wasser, unlöslich in Ammoniak, leicht löslich in Mineralsäuren, auch löslich in Essigsäure.

Die Verbindungen mit 1 Äquivalent Alkali röten blaues Lackmus, lassen Lackmoid blau, Phenolphthalein oder Curcuma farblos resp. gelb. Die Verbindungen von 1 Äquivalent Phosphorsäure mit 2 Äquivalenten Alkali lassen Curcuma und Phenolphthalein unverändert, färben aber rotes Lackmus blau. Die Verbindungen mit 3 Äquivalenten Alkali färben auch Curcuma braun, Phenolphthalein rot. Freie Phosphorsäure färbt auch Lackmoid rot.

Die nur zwei Atome feuerbeständige Basis enthaltenden Salze werden beim Glühen in pyrophosphorsäure Salze umgewandelt.

Die Lösungen phosphorsaurer Salze werden gefällt:

1. Durch Chlorbarium oder Chlorcalcium und Ammoniak; der weiße, flockige Niederschlag ist unlöslich in Ammoniak, löslich in Essigsäure und in Mineralsäuren.

2. Durch salpetersaures Silber; der gelbe Niederschlag ist in Säuren oder Ammoniak leicht löslich.

3. Durch Magnesiämischung (Anh.); in nicht zu verdünnten Lösungen entsteht der weiße Niederschlag als feinkörniges Pulver sofort, in sehr verdünnten allmählich sich als Krystalle an den Glaswandungen abscheidend. Der Niederschlag, phosphorsäure Ammoniakmagnesia, ist leichtlöslich in Säuren, unlöslich in Ammoniak.

4. Durch wenig Eisenchlorid (in nur Essigsäure als freie Säure enthaltender Lösung) als flockiger, gelblichweißer Niederschlag, phosphorsaures Eisenoxyd (Eigenschaften des Niederschlags s. § 42, 5).

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 89, S. 485. 1914.

5. Durch Lösung von molybdänsaurem Ammoniak in Salpetersäure (Anh.). Der gelbe Niederschlag entsteht bei gewöhnlicher Temperatur langsam, beim Erwärmen schneller und überhaupt nur dann, wenn die Lösung weniger Phosphorsäure als zu ihrer Ausfällung erforderliches molybdänsaures Ammoniak enthält und keine Weinsäure zugegen ist; er ist unlöslich allein in der Lösung des Fällungsmittels selbst. Gegenwart von Salzsäure beeinträchtigt diese Fällung sehr.

6. Durch Uranylsalzlösungen bei Gegenwart von Natriumacetat als gelblichweißer, flockiger Niederschlag von Uranylphosphat.

Zum Nachweis dienen die unter 3 und 5 aufgeführten Reaktionen.

Nachweis.

Pyrophosphorsäure  $H_4P_2O_7$  bildet sich aus der gewöhnlichen Phosphorsäure, wenn entweder sie selbst oder ihre Salze, die nur zwei Atome feuerbeständiger Basen enthalten, stark erhitzt werden. Sie bildet sich z. B. bei Verkohlungen und Veraschung des Gehirns und anderer phosphatidreicher Substanzen.

Die pyrophosphorsäuren Alkalien sind in Wasser löslich, die Salze der alkalischen Erden nur in Lösungen anderer Salze. Die Lösungen pyrophosphorsaurer Alkalien geben:

1. mit salpetersaurem Silber einen weißen, in Salpetersäure sowie in Ammoniak löslichen Niederschlag;

2. mit schwefelsaurer Magnesia einen weißen, flockigen Niederschlag, der sowohl in überschüssiger schwefelsaurer Magnesia als in überschüssigem phosphorsaurem Alkali sich löst. Durch Ammoniak wird diese Lösung nicht gefällt;

3. mit Luteokobaltchlorid (Kobaltihexaminchlorid)  $Co(NH_3)_6Cl_3$  bei mäßiger Verdünnung sogleich, bei starker Verdünnung erst beim Umschütteln einen blaßbräunlichgelben kristallinischen Niederschlag, während die Lösungen der Alkalisalze der gewöhnlichen Phosphorsäure und der Metaphosphorsäure erst nach einigen Stunden Niederschläge geben, die auch durch ihr Ansehen von dem der Pyrophosphorsäure leicht zu unterscheiden sind.

Durch Kochen mit Säuren oder Glühen mit Alkalien oder alkalischen Erden geht die Pyrophosphorsäure in gewöhnliche Phosphorsäure über.

**Borsäure**  $H_3BO_3$  erhielten Bertrand und Agulhon<sup>1)</sup> in ganz kleinen Mengen bei der Veraschung der verschiedensten Organe aller darauf untersuchten Tiere, auch von Milch und Eiern. Über die Methode des Nachweises siehe Bertrand und Agulhon<sup>2)</sup>.

**50. Kieselsäure**  $SiO_2$ . Aus ihr bestehen die Panzer der niedrigsten Tierklassen (Bacillarien, Infusorien). Sie findet sich in kleinen Mengen in weitester Verbreitung in den tierischen Geweben und Flüssigkeiten<sup>3)</sup>, in den epithelialen Gebilden, Drüsen, Bindegewebe (hier zuerst von Hugo Schulz als regelmäßig vorkommender Bestandteil festgestellt), Muskeln, Blut, Milch, Galle, Harn (reichlicher im Harn der Pflanzenfresser), Harnsteinen usw. Es ist wohl zweifelhaft, ob die Methodik in allen diesen Untersuchungen einwandfrei war. So fand z. B. Frauenberger mit einer offenbar besseren Methodik für die Warthonsche Sulze einen viel niedrigeren Wert als H. Schulz. Die Angabe von Drechsel<sup>4)</sup>, daß sie in den Federn auch als organische esterartige Verbindung vorkomme, konnte Cerny<sup>5)</sup> nicht bestätigen.

Vorkommen.

Die wasserfreie Kieselsäure stellt ein feuerbeständiges, weißes, in gewöhnlichem Feuer nicht schmelzbares Pulver dar, das in Wasser oder Säuren nach dem Trocknen in der Hitze unlöslich ist. Wird die lösliche Säure aus ihren alkalischen Verbindungen durch Säuren abgeschieden, so bleibt sie zunächst gelöst, bildet beim Konzentrieren der sauren Lösung eine Gallerte mit dem noch rückständigen Wasser und bleibt beim Eintrocknen und Erhitzen des Rückstandes als weiße, pulverige, in Wasser und in Säuren unlösliche, in kochender Alkalilauge lösliche Masse zurück. Fluorwasserstoff löst die Kieselsäure zu Fluorsiliciumgas, welches sich mit Wasser in Kieselfluorwasserstoff und gallertige Kieselsäure zerlegt (s. § 47).

Eigenschaften.

<sup>1)</sup> Bull. de la soc. chim. de France [4], Bd. 13, S. 395, 549 u. 824. 1913; [4], Bd. 15, S. 197; ref. Chem. Zentralbl. 1914, I, S. 427.

<sup>2)</sup> Bull. de la soc. chim. de France [4], Bd. 7, S. 90, 1910; [4], Bd. 15, S. 197; ref. Chem. Zentralbl. 1914, I, S. 427.

<sup>3)</sup> Schulz, H.: Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 84, S. 67. 1901; Bd. 89, S. 112. 1902; Bd. 131, S. 447. 1910; Bd. 144, S. 346 u. 350. 1912. Biochem. Zeitschr. Bd. 46, S. 376. 1912; Bd. 70, S. 464. 1915. — Salkowski: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 83, S. 143. 1913. — Frauenberger: desgl. Bd. 57, S. 17. 1908. — Gonnermann: desgl. Bd. 99, S. 255. 1917; Bd. 102, S. 78. 1918. Biochem. Zeitschr. Bd. 88, S. 401. 1918; Bd. 94, S. 163. 1919.

<sup>4)</sup> Zentralbl. f. Physiol. Bd. 11, S. 361. 1898.

<sup>5)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 62, S. 296. 1909.

**Nachweis.** Zum Nachweis der Kieselsäure in Aschen (die in Platingefäßen angefertigt sein müssen) fügt man zu denselben mäßig verdünnte Salzsäure in genügendem Überschusse, verdunstet zur Trockne, erhitzt den Rückstand einige Minuten auf dem Sandbade über  $100^{\circ}$ , solange saure Dämpfe entweichen, läßt erkalten, übergießt mit verdünnter Salzsäure und erwärmt; ist Kieselsäure vorhanden, so bleibt sie als feines weißes Pulver zurück, welches, mit überschüssiger wässriger Flußsäure in einer Platinschale verdampft, sich ganz verflüchtigt.

### Ammoniak $\text{NH}_3$ .

**Vorkommen.** 51. In Verbindungen mit Säuren findet sich Ammoniak im Magen- und Darminhalte, besonders im Dickdarne oft reichlich, im Harne in geringen, wechselnden Mengen normal, bei manchen Krankheiten reichlicher. Regelmäßig findet es sich im Blute, in der Milch und, soweit die Untersuchungen reichen, in allen Organen als intermediäres Stoffwechselprodukt. Bei der Fäulnis von Harn, Blut, Eiter, tierischen Geweben und Organen bildet es sich reichlich, ebenso bei der Zersetzung von Harnstoff, Proteinen usw. durch Kochen mit starken Säuren oder Alkalien; es entsteht auch bei der Pankreasverdauung der Eiweißstoffe.

**Eigenschaften.** Das freie Ammoniak ist ein farbloses Gas von eigentümlichem, stechendem Geruche, welches bei gewöhnlicher Temperatur sehr reichlich vom Wasser absorbiert wird und aus wässrigen Flüssigkeiten beim Kochen oder Stehen an der Luft nur langsam vollkommen entweicht. Es färbt feuchtes rotes Lackmuspapier blau, Curcumapapier braun, mit Mercuronitratlösung befeuchtetes Papier schwarz, Cochenilletinktur carminrot. Das Ammoniak verbindet sich direkt mit Säuren zu Salzen, als Gas gibt es mit dem Dampfe von Säuren, wie Salzsäure, Salpetersäure, Essigsäure weiße Nebel, welche aus Ammoniaksalzen bestehen. Die Verbindungen des Ammoniaks mit Säuren gleichen den entsprechenden Verbindungen des Kalis und geben auf die gleiche Weise wie diese Niederschläge mit Platinchlorid, Weinsäure, Phosphorwolframsäure, Phosphormolybdänsäure. Das durch Fällung der Ammoniaklösungen mit Platinchlorid erhaltene hellgelbe, feinkristallinische Ammoniumplatinchlorid ist in Wasser schwer, in Alkohol und Äther fast gar nicht löslich; beim Erhitzen zerlegt es sich unter Verflüchtigung von Salzsäure und Chlorammonium und Hinterlassung von metallischem Platin. Aus seinen Salzen wird das Ammoniak durch Alkalien oder alkalische Erden in Freiheit gesetzt und kann durch die oben beschriebenen Eigenschaften leicht erkannt werden.

**Nachweis.** Zum Nachweis von freiem Ammoniak in Flüssigkeiten ist es zweckmäßig, die zu prüfende Flüssigkeit in ein Becherglas zu bringen, ohne dessen Rand damit zu benetzen; man bedeckt das Becherglas mit einer reinen Glasplatte, an deren untere Seite ein Stück feuchtes, rotes Lackmuspapier angelegt ist. Enthält die Flüssigkeit auch nur Spuren von Ammoniak, so wird das Papier nach einiger Zeit blau gefärbt. Bei Anwesenheit stickstoffhaltiger organischer Stoffe, die leicht zersetzlich sind, darf man die Flüssigkeiten nicht zu lange vor der Prüfung stehenlassen, da man sonst befürchten muß, daß eine Zerlegung unter Ammoniakentwicklung eintritt. Auf Ammoniaksalze prüft man die Flüssigkeiten in gleicher Weise, nachdem man einen genügenden Überschuß von Kalkmilch oder, bei Anwesenheit von leicht zersetzlichen stickstoffhaltigen Substanzen, z. B. Proteinen, von Magnesia hinzugefügt hat.

**Nachweis von Ammoniak in Spuren.**

Flüssigkeiten, die selbst nur Spuren von freiem Ammoniak enthalten, geben mit einigen Tropfen Mercurichlorid versetzt weiße Trübung oder Niederschlag von Quecksilberammoniumchlorid, mit Neßlers Reagens (Anh.) versetzt braune Fällung oder gelbe Färbung. Diese letztere Reaktion tritt auch ein bei Anwesenheit von Spuren von Ammoniaksalzen. Natürlich dürfen die zu prüfenden Flüssigkeiten keine anderen Substanzen, welche durch

diese Reagenzien gefällt werden, enthalten. Ist das der Fall, so empfiehlt es sich, den Nachweis mit Hilfe des Neßlerschen Reagens in der Weise zu führen, daß man mittels eines Aspirators Luft durch drei miteinander verbundene Kugelapparate leitet, von denen der erste mit Schwefelsäure, der zweite mit der zu untersuchenden Flüssigkeit und der dritte mit Neßlers Reagens gefüllt ist. Die durch Schwefelsäure von Ammoniak völlig befreite Luft entzieht der zu prüfenden Flüssigkeit allmählich das freie Ammoniak vollständig und bewirkt beim Durchstreichen durch die alkalische Jodquecksilber-Jodkaliumlösung einen braunen Niederschlag oder mindestens eine gelbe Färbung.

## Organische Stoffe.

### Allgemeines.

Die sog. organischen Körper oder Kohlenstoffverbindungen sind beim anhaltenden Erhitzen unter Zutritt der atmosphärischen Luft entweder unzerlegt oder unter Zersetzung flüchtig. Die letzteren, d. h. die in der Hitze sich zerlegenden organischen Stoffe geben bei dem Erhitzen fast alle zunächst Kohle, welche dann beim weiteren Glühen mit dem Sauerstoff der Luft zu Kohlensäure verbrennt. Beim Erhitzen mit leicht oxydierenden Körpern, wie Kupferoxyd, Salpeter, chlorsaurem Kali, wird der ganze Kohlenstoffgehalt zu Kohlensäure, der ganze Wasserstoffgehalt zu Wasser oxydiert. Erhitzt man dagegen organische Stoffe bei Ausschluß oder unzureichender Menge von Sauerstoff oder oxydierenden Substanzen, so treten außer Kohlensäure und Wasser noch andere meist sehr mannigfaltige flüchtige Zersetzungsprodukte auf und Kohle bleibt zurück.

Alle hierhergehörigen Körper mit Ausnahme der gasförmigen Kohlensäure und der Rhodanverbindungen enthalten Wasserstoff, alle mit wenigen Ausnahmen (z. B. Rhodanverbindungen, Adenin) auch Sauerstoff. In vielen Kohlenstoffverbindungen findet sich außerdem Stickstoff, welcher beim Erhitzen als Ammoniak oder Ammoniakverbindung entweicht. Nur wenige der im folgenden abgehandelten Stoffe enthalten Schwefel, noch weniger Phosphor (und zwar letzterer stets in der Verbindung der Phosphorsäure), Eisen, Jod, Brom.

Zur Erkennung organischer Stoffe erhitzt man ein wenig der zu prüfenden Substanz auf Platinblech zuerst sehr vorsichtig, allmählich bis zum Glühen. Die meisten organischen Stoffe, die hierher gehören, werden bei dieser Erhitzung unter Hinterlassung von Kohle zerlegt, auch diese verbrennt beim weiteren Glühen, und man erkennt dann, ob außer der organischen Substanz sich noch schmelzbare oder unschmelzbare anorganische Stoffe in der Probe befinden. Andere verflüchtigen sich ohne Bildung von Kohle, z. B. Ammoniaksalze, organische flüchtige Säuren, Oxalsäure.

Zur weiteren Spezialisierung ist es erforderlich, einen organischen Stoff, über dessen Zusammensetzung man keine hinreichende Kenntnis besitzt, auf Gehalt an Stickstoff, Schwefel, Phosphor, Eisen, Halogen zu untersuchen.

**52. Untersuchung organischer Stoffe auf Stickstoffgehalt.** Körper, welche viel Stickstoff enthalten, entwickeln beim Erhitzen den Geruch nach verbranntem Horn oder Leim, und die sich entwickelnden Gase geben die Reaktionen des freien Ammoniaks. Zur sicheren Prüfung schlägt man folgende Wege ein:

a) Man vermischt die zu untersuchende Substanz mit vorher geglühtem Natronkalk im Überschusse und erhitzt dann das Gemenge im Röhrchen. Ist die Substanz stickstoffhaltig, so entweicht Ammoniak gasförmig und wird an seinem Geruche, Verhalten gegen feuchtes, rotes Lackmuspapier, gegen Salzsäure usw. (vgl. § 51) erkannt.

b) Sehr scharfe Erkennung des Stickstoffgehaltes in organischen Körpern gestattet Lasseignes Methode<sup>1)</sup>. Man bringt die trockene Substanz in ein trockenes Röhrchen aus schwer schmelzbarem Glas, fügt die etwa zehnfache Menge Kalium oder Natrium hinzu und erhitzt allmählich bis zum Glühen und glüht eine Zeitlang. Dabei entsteht Cyanalkali. Das noch heiße Röhrchen läßt man in ein etwa 8 ccm Wasser enthaltendes Reagensglas gleiten, fügt einige Tropfen Ferrosulfatlösung hinzu, kocht 1—2 Minuten, filtriert, säuert mit verdünnter Salzsäure an und fügt einige Tropfen frisch bereiteter kaltesättigter Ferrosulfatlösung (nicht Ferrisalz) hinzu: grüne bis blaue Färbung oder blauer Niederschlag (Berlinerblau). Ist die Färbung grün, so filtriert man mehrmals durch dasselbe Filter und überzeugt sich, daß ein blauer Niederschlag zurückbleibt.

**53. Untersuchung organischer Stoffe auf Schwefelgehalt.** Der Schwefel kann in organischen Stoffen als locker gebundener oder als festgebundener vorkommen. Als locker gebundenen bezeichnet man den Schwefel, welcher beim Kochen mit starker Alkalilauge als Schwefelalkali abgespalten wird.

Nachweis des Schwefels. Man mischt die zu untersuchende (sulfatfreie) Substanz mit der vielfachen Menge eines Gemisches von 1 Tl. Soda und 2 Tl. Salpeter im Platinschälchen, glüht vorsichtig bis zum Verschwinden der Kohle, löst nach dem Erkalten in Wasser, säuert die evtl. filtrierte Lösung mit Salzsäure an und versetzt mit Chlorbariumlösung. Trübung oder Niederschlag ( $\text{BaSO}_4$ ) beweisen das Vorhandensein von Schwefel. Bei sehr geringem Gehalt an Schwefel ist es nötig, vor dem Zusatz von Chlorbarium die Flüssigkeit wiederholt nach Zusatz von viel Salzsäure zur Trockne abzdampfen, um die Salpetersäure zu entfernen; auch ist es in diesem Falle zweckmäßig, die Probe bis zum nächsten Tag stehenzulassen.

Mandel und Neuberg<sup>2)</sup> empfehlen folgendes Verfahren: Man löst die Substanz in einem weiten und langen Reagensglas in 0,5—1 ccm Wasser oder, wenn in diesem Mittel nicht löslich, in 1—2 ccm Eisessig, fügt eine Spur Ferrochlorid und etwa 1 ccm 50 volumproz. (15 gewichtsproz.) Wasserstoffsperoxyd (Merck-Darmstadt) hinzu und erwärmt. Nach Ablauf der heftigen Reaktion prüft man wie oben mit Bariumchlorid.

Nachweis des locker gebundenen Schwefels. Man kocht die Substanz mit starker Natronlauge und etwas Bleiacetat längere Zeit. Braunfärbung bzw. schwarzer Niederschlag von Schwefelblei zeigen locker gebundenen Schwefel an.

**54. Untersuchung organischer Stoffe auf Phosphorgehalt.** Die (von Phosphaten freie) Substanz wird, mit der vielfachen Menge einer Mischung von 1 Tl. Soda und 2 Tl. Salpeter gemengt, in einer Platinschale bis zum Verschwinden der Kohle vorsichtig geglüht, die Masse nach dem Erkalten entweder

a) in überschüssiger verdünnter Salpetersäure gelöst, die Lösung zum Kochen erhitzt, etwas eingengt und mit einer Lösung von molybdänsaurem Ammoniak (Anh.) im Überschuß versetzt. Bei Anwesenheit von Phosphor entsteht allmählich, schneller bei 40°, eine Gelbfärbung bzw. ein gelber Niederschlag von phosphormolybdänsaurem Ammoniak; oder

b) in Salzsäure gelöst, die Lösung mit Ammoniak übersättigt und mit Magnesiamischung (Anh.) versetzt. Bei Anwesenheit von Phosphor entsteht ein weißer Niederschlag von Ammoniummagnesiumphosphat.

Nach Mandel und Neuberg kann man auch mit Wasserstoffsperoxyd und Eisensalz zerstören. Die Ausführung, wie § 53 beschrieben, nur nimmt man statt Ferrochlorid besser Eisennitrat.

<sup>1)</sup> S. dazu Vorländer: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 46, 1, S. 187. 1913.

<sup>2)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 71, S. 212. 1915.



**55. Untersuchung organischer Stoffe auf Eisengehalt.** Man verascht die (von anorganischen Eisenverbindungen freie) Substanz mit der vielfachen Menge eines Gemisches von 1 Tl. Soda und 2 Tl. Salpeter in einer Platinschale, löst die Schmelze in Salzsäure und prüft das Filtrat nach § 42 mit Rhodankalium oder Ferrocyankalium auf Eisen.

Die benutzten Reagenzien müssen frei von Eisen sein.

**56. Untersuchung organischer Stoffe auf Halogengehalt.** Man glüht die Substanz mit überschüssigem reinen Calciumoxyd in einem Reagensglas, löst die geglühte Masse in Salpetersäure und prüft auf Halogenwasserstoff mit Silbernitrat nach § 45.

**Probe von Beilstein.** Man bringt eine ganz kleine Menge der Substanz auf ein Körnchen Kupferoxyd, das sich in der Öse eines Platindrahtes befindet und vorher bis zur Farblosigkeit der Flamme ausgeglüht war, und erhitzt am unteren und inneren Rand einer mäßig geöffneten, nichtleuchtenden Bunsenflamme. Sobald das Leuchten der Flamme (Verbrennung der organischen Substanz) aufgehört hat, färbt sie sich grün oder blaugrün (flüchtiges Halogenkupfer), wenn Halogen vorhanden ist.

**57. Untersuchung organischer Stoffe auf Jodgehalt.** Die Substanz, z. B. Schilddrüse, wird in einem Nickeltiegel mit etwas Wasser übergossen und nach Zugabe von der doppelten Menge Ätznatron (jodfrei aus metallischem Natrium hergestellt) bis zur völligen Verkohlung erhitzt, darauf die gleiche bis anderthalbfache Menge fein gepulverten Salpeters zugefügt und geglüht, die Schmelze nach dem Abkühlen in Wasser heiß gelöst und filtriert. Beim Schütteln des abgekühlten und mit Schwefelsäure angesäuerten Filtrats mit Chloroform färbt sich dieses violett, wenn Jod vorhanden war.

Bezüglich der Beschreibung der einzelnen organischen Verbindungen gilt dasselbe, was S. 34 in betreff der anorganischen gesagt wurde; sie nimmt in erster Linie Rücksicht auf die analytischen Zwecke dieses Buches.

### Alkohole.

**58. Äthylalkohol  $C_2H_6O$ .** Spuren von Alkohol finden sich in den menschlichen Organen, wie Gehirn, Muskeln, Leber nicht allein nach Alkoholgenuß, sondern sie scheinen auch ohne letzteren stets vorhanden zu sein. <sup>Vorkommen.</sup>  $\begin{matrix} CH_3 \\ | \\ CH_2(OH) \end{matrix}$  Rajewski<sup>1)</sup> fand in ganz frischem Muskelfleisch und Gehirn von Kaninchen, Pferd und Rind, Leber von Hunden bei Destillation mit Wasser im Destillat geringe, mit Kalilauge und Jod durch Jodoformbildung nachweisbare Mengen und stellte aus frischem Pferdefleisch Alkohol dar, den er mit Platinmohr in Aldehyd und Essigsäure überführte. Taylor<sup>2)</sup> wies Alkohol (durch Überführung in p-Nitrobenzoesäureäthylester) in frischen Muskeln von Hunden, deren Magen und Darm entfernt war, nach. Béchamp fand gleichfalls Alkohol in der Leber. Diese Angaben sind auch von Landsberg<sup>3)</sup> bestätigt worden, welcher auch feststellte (wie schon Béchamp), daß bei bakterieller Zersetzung die Alkoholmenge in den Geweben zunimmt und ferner, daß bei der Autolyse eine solche Vermehrung nicht erfolgt. Im Harn tritt er nur nach sehr reichlichem Genuß von Alkohol auf, im diabetischen kann er beim Stehen durch Vergären des Zuckers sich bilden.

<sup>1)</sup> Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 11, S. 122. 1875.

<sup>2)</sup> Journ. biol. chem. Bd. 15, S. 217. 1913.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 41, S. 505. 1904.

**Isolierung.** Zur Isolierung sehr geringer Mengen von Alkohol aus tierischen Organen destilliert man das schnell zerkleinerte Organ mit Wasser, bis etwa  $\frac{2}{5}$  übergegangen ist, destilliert das Destillat wieder usw., indem man immer etwa  $\frac{2}{5}$  übergehen läßt. Schließlich sättigt man das Destillat fast mit Kaliumcarbonat, destilliert abermals und sättigt nun völlig mit diesem Salz. Sind irgend erhebliche Mengen von Alkohol vorhanden, so scheiden sie sich in Tropfen ab.

Hanzlik<sup>1)</sup> empfiehlt die Destillation unter Zusatz von Phosphorsäure auszuführen und in das Destillationsrohr einen Wattebausch einzuführen, um Fettsäuren usw. zurückzuhalten.

**Eigenschaften.** Farblose Flüssigkeit, leicht brennbar. Kp. 78,3°. Über das spez. Gewicht in Gemischen mit Wasser s. Anhang. Beim Behandeln mit p-Nitrobenzoylchlorid auf dem Wasserbad am Rückflußkühler geht er quantitativ in p-Nitrobenzoesäureäthylester über, welcher nach Entfernung aus der alkalisch gemachten Flüssigkeit mit Äther aus Methylalkohol umkrystallisiert werden kann und bei 57° schmilzt. Durch Oxydationsmittel wird er in Aldehyd und Essigsäure umgewandelt. Benetzt man mit einigen Tropfen Alkohol Platinmohr, am besten mit Asbest gemengt, in einem Schälchen bei gutem Luftzutritt, so erhält man den Geruch nach Aldehyd. Extrahiert man nun mit etwas Wasser, fügt zur Lösung einen Tropfen Silbernitrat und erwärmt, so scheidet sich metallisches Silber ab. Läßt man einige Tropfen auf Platinmohr einige Zeit stehen, so werden sie stark sauer; filtriert man dann, fügt ein wenig Silberoxyd hinzu, erwärmt und filtriert, so enthält die Lösung essigsäures Silber.

**Nachweis.** Zum Nachweis isoliert man den Alkohol in der oben beschriebenen Weise und identifiziert die abgeschiedenen Tropfen am besten durch Darstellung des p-Nitrobenzoesäureäthylesters (Buchner und Meisenheimer<sup>2)</sup>). Gelingt die Abscheidung in Form von öligen Tropfen nicht, so prüft man das Destillat mit folgenden empfindlichen Proben:

1. Man erwärmt gelinde, fügt etwas Jodjodkaliumlösung und tropfenweise Natronlauge gerade bis zur Entfärbung hinzu: es tritt je nach der Alkoholmenge gleich oder allmählich Trübung und Abscheidung sechseckiger mikroskopischer Blättchen von Jodoform und dessen charakteristischer Geruch auf (Liebens Jodoformprobe). Die Reaktion ist nicht beweisend für Äthylalkohol, da eine Reihe anderer Verbindungen (Aldehyd, Aceton, andere Alkohole, Oxy- und Ketofettsäuren) sie auch geben.

2. Beim Unterschichten mit ein wenig einer Lösung von Kaliumbichromat und konzentrierter Schwefelsäure entsteht an der Berührungsstelle innerhalb von 5 oder 10 Minuten ein blauer oder hellgrüner Ring, der allmählich intensiver wird und dann abblaßt (Hanzlik). Andere Stoffe geben dieselbe Reaktion.

3. Beim Erhitzen mit konzentrierter Schwefelsäure und etwas Natriumacetat gibt sich der charakteristische Geruch nach Essigäther zu erkennen.

4. Beim Schütteln mit einigen Tropfen Benzoylchlorid und einigen Kubikzentimetern 10 proz. Natronlauge entsteht der eigentümliche Geruch nach Benzoesäureäthylester. Andere Alkohole geben übrigens Ester mit ähnlichem Geruch.

Über den Nachweis und die Bestimmung in serösen Flüssigkeiten s. § 654, in Organen s. § 747.

**Cetylalkohol**  $C_{16}H_{34}O$ . Im Walrat findet sich Cetylalkohol in Verbindung mit fetten Säuren, hauptsächlich mit Palmitinsäure. Er findet sich auch unter den unverseifbaren Bestandteilen der Haifisch- und Rochenleberöle (Т о у а м а<sup>3)</sup>). Palmitinsäure-Cetylester, der Hauptbestandteil des Walrats, schmilzt bei 53,5°. Man stellt den Cetylalkohol aus dem Rückstande des Ätherextraktes des Walrats durch Verseifung mit alkoholischer Kalilauge, Fällen des Alkohols mit Wasser und öfteres Umkrystallisieren aus Äther oder Eisessig dar.

<sup>1)</sup> Journ. biol. chem. Bd. 11, S. 61. 1912.

<sup>2)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 38, 1, S. 624. 1905.

<sup>3)</sup> Chem. Zentralbl. 1923, I, S. 111.

Der reine Cetylalkohol krystallisiert in dünnen blätterigen Tafeln, die bei 49–49,5° schmelzen zu einer Flüssigkeit vom spez. Gew. 0,8105 bei 60°, welche bei 344° unzersetzt destilliert. Er ist unlöslich in Wasser, löslich in Alkohol, Äther, Eisessig. Beim andauernden Erhitzen mit Säuren verbindet er sich mit denselben zu Estern und geht mit Kalihydrat auf 220–275° erhitzt in Palmitinsäure über.

**Oktadekylalkohol**  $C_{18}H_{38}O$  findet sich nach Röhmann<sup>1)</sup> in reichlicher Menge im Extrakt und Sekret der Bürzeldrüse von Gänsen (wurde von de Jonge<sup>2)</sup> irrtümlich für Cetylalkohol gehalten) an Fettsäuren gebunden. Auch im Walrat ist er an Säuren gebunden vorhanden (Krafft<sup>3)</sup> und wahrscheinlich auch in Dermoidcysten (Ameseder<sup>4)</sup>.

Man erhält ihn durch Ausschütteln des verseiften Ätherauszugs der Bürzeldrüse mit Petroläther, Waschen des Petrolätherrückstandes mit heißem Wasser und Umkrystallisieren aus Petroläther und Alkohol.

Er ist unlöslich in Wasser und krystallisiert aus Petroläther in atlasglänzenden, dünnen fettigen Plättchen, aus wasserhaltigem Alkohol in feinen, zu radiär gestreiften Kugeln vereinigten Nadeln. Fp. 58,5°. Jodid Fp. 34° (Levene<sup>5)</sup>. Durch Erhitzen mit Natronkalk auf 270–280° wird er in Stearinsäure übergeführt.

**Eikosylalkohol**  $C_{20}H_{42}O$ . Als primärer gesättigter Alkohol dieser Zusammensetzung ist wahrscheinlich die bei der Verseifung des Dermoidcystenätherauszuges auftretende, früher für Cetylalkohol gehaltene Substanz anzusehen (Ameseder<sup>6)</sup>.

Er wurde durch Ausschütteln des verseiften Ätherauszuges der Dermoidcysten mit Äther und Umkrystallisieren des Ätherrückstandes aus Alkohol gewonnen und mittels fraktionierter Destillation seines Essigsäureesters gereinigt.

Fp. 66–67°. Fp. des Essigsäureesters 44°. Jodid Fp. 42° (Levene). Bei der Oxydation mit Chromsäureanhydrid in eisessigsaurer Lösung entsteht Arachinsäure.

**Carnaubylalkohol**  $C_{24}H_{50}O$  von Darmstädter und Lifschütz<sup>7)</sup> aus verseiftem Wollfett erhalten. Fp. 68–69°. Er liefert bei der Oxydation mit Chromsäure Carnaubasäure. Röhmann<sup>8)</sup> hält den Nachweis dieses Alkohols im Wollfett nicht für erbracht.

**Cerylalkohol**  $C_{26}H_{54}O$  findet sich als Cerotinsäureester im chinesischen Insektenwachs und auch im Bienenwachs, ferner ist er aus Wollfett erhalten worden (Darmstädter und Lifschütz<sup>9)</sup>, Röhmann<sup>10)</sup>. Weiße krystallinische Masse. Fp. 80°. Jodid Fp. 56–57° (Levene). Beim Schmelzen mit Kali oder Erhitzen mit Natronkalk geht er in Cerotinsäure über.

**Myricylalkohol (Melissylalkohol)**  $C_{30}H_{62}O$  als Palmitinsäureester im Bienenwachs erhalten. Fp. 87,5–88°. Jodid Fp. 70–71° (Levene). Nach Gascard<sup>11)</sup> kommt ihm die Formel  $C_{31}H_{64}O$  zu.

**Psyllaalkohol**  $C_{33}H_{68}O$  wurde von Sundwik<sup>12)</sup> im Sekret der Blattlaus *Psylla alni* aufgefunden, in dem er sich als Ester in Verbindung mit Psyllasäure  $C_{32}H_{65}COOH$  (S. 72) findet. Der Ester ist unlöslich in kaltem oder heißem Äther, löslich in heißem Chloroform, aus dem er sich beim Erkalten in feinen mikroskopischen Nadeln abscheidet. Fp. 96°. Der Alkohol ist unlöslich oder schwer löslich in Äther, leicht löslich in Benzol und Essigäther, sehr leicht in heißem, schwer in kaltem Aceton und bildet eine lockere, blendend weiße Krystallmasse (Fp. 69–69,5°); er krystallisiert (mit Wasser) in schrägen Tafeln. Beide (Ester und Alkohol) haben die Fähigkeit, reichliche Mengen Wasser zu binden, das über 100° entweicht. Beim Erhitzen mit Natronkalk entsteht Psyllasäure.

Ein Alkohol von derselben Zusammensetzung, demselben Schmelzpunkt und denselben Löslichkeitsverhältnissen, der aber beim Erhitzen mit Natronkalk sich anders verhält, wurde aus Hummelwachs gewonnen (Sundwik).

**Oleinalkohol**  $C_{18}H_{36}O$  aus Haifisch- und Rochenleberöl nach der Verseifung erhalten (T o y a m a<sup>13)</sup>). Ungesättigter Alkohol  $Kp_{13}$  207, geht bei der Hydrierung in Octadecylalkohol über.

<sup>1)</sup> Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 5, S. 110. 1904.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 3, S. 225. 1879.

<sup>3)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 17, 2, S. 1627. 1884.

<sup>4)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 52, S. 121. 1907.

<sup>5)</sup> Journ. biol. chem. Bd. 20, S. 521. 1915.

<sup>6)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 52, S. 121. 1907.

<sup>7)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 29, 3, S. 2890. 1896.

<sup>8)</sup> Ref. Zentralbl. f. Physiol. Bd. 19, S. 317. 1906 u. Biochem. Zeitschr. Bd. 77, S. 298. 1916.

<sup>9)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 31, 1, S. 97. 1898.

<sup>10)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 77, S. 298. 1916.

<sup>11)</sup> Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 170, S. 886. 1920; ref. Chem. Zentralbl. 1920, III, S. 126.

<sup>12)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 17, S. 425. 1893; Bd. 25, S. 116. 1898; Bd. 32, S. 355. 1901; Bd. 26, S. 56. 1898/99; Bd. 53, S. 365. 1907; Bd. 72, S. 455. 1911.

<sup>13)</sup> Chem. Zentralbl. 1923, I, S. 111 u. 1601.

- Vorkommen. **59. Glycerin  $C_3H_8O_3$ .** Das Glycerin kommt im freien Zustande wohl nur in Spuren im Inhalt des Dünndarms vor. In kleinen Mengen ist es auch im Blutplasma nachgewiesen (Tangl und Weiser<sup>1</sup>), Schmitz<sup>2</sup>). In Verbindung mit Fettsäuren findet es sich in den Fetten, in Verbindung mit Fettsäuren und Phosphorsäure in Phosphatiden. Es bildet sich bei der alkoholischen Gärung des Zuckers in geringer Menge, in reichlicher, wenn sie in Gegenwart von Dinatriumsulfit verläuft (Connstein und Lüdecke<sup>3</sup>), Neuberg und Reinfurth<sup>4</sup>).
- Darstellung. Synthetisch läßt es sich auf verschiedene Weise darstellen. Um es aus Fetten zu gewinnen, verseift man durch Wasser unter Druck, destilliert das Glycerin mit überhitztem Wasserdampf ab, reinigt mit Tierkohle und dampft im Vakuum ein oder man verseift durch Kochen mit Bleioxyd und Wasser, filtriert von fettsaurem Blei ab, befreit das Filtrat durch Schwefelwasserstoff von gelöstem Bleioxyd und dampft die von Schwefelblei abfiltrierte Flüssigkeit im Vakuum ein. Die Verseifung des Fettes kann auch mittels eines in den Ricinussamen enthaltenen Fermentes bewirkt werden.
- Eigenschaften. Das Glycerin stellt in reinem Zustande eine farb- und geruchlose, süß schmeckende, sehr hygroskopische, in Wasser oder Alkohol in jedem Verhältnis lösliche, in Äther unlösliche, sirupöse Flüssigkeit dar, welche bei 0° allmählich krystallisiert. Es siedet im luftverdünnten Raum bei 50 mm Druck bei 210° und verflüchtigt sich in geringer Menge schon beim Kochen seiner wässerigen Lösung mit den Wasserdämpfen. Seine Lösungen reagieren neutral. Als dreiwertiger Alkohol kann es sich mit 1, 2 oder 3 Mol. einbasischer Säuren zu Estern verbinden. Diese Verbindungen nennt man Glyceride. Zu ihnen gehören die Glycerinphosphorsäure und die Fette, welche durch Erhitzen von trockenem Glycerin mit wasserfreier Phosphorsäure bzw. trockenen Fettsäuren erhalten werden können. Beim Schütteln von Glycerin mit Benzoylchlorid und Natronlauge bilden sich in Wasser unlösliche Benzoessäureester (Diez<sup>5</sup>). Bei ganz kurzem Erhitzen von 1 g sorgfältig entwässertem Glycerin mit 5,1 g  $\alpha$ -Naphthylisocyanat entsteht Glycerin-tri- $\alpha$ -naphthylurethan, welches aus Pyridin umkrystallisiert, bei 279—280° schmilzt und in den meisten organischen Lösungsmitteln schwerlöslich ist (Neuberg und Hirschberg<sup>6</sup>). Glycerin löst Kalk, Baryt, Kupferoxyd, Bleioxyd und andere Metalloxyde unter Bildung von Alkoholaten auf, auch Fettsäuren wie Palmitinsäure, Stearinsäure, Ölsäure sind etwas löslich in ihm. Mit Kupfersulfat und Alkali gibt es eine dunkelblaue Flüssigkeit, die beim Kochen nicht reduziert wird. Durch kochenden Jodwasserstoff entsteht aus Glycerin Isopropyljodid. Auf dieser Reaktion beruht ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung des Glycerins im Blut (§ 656).
- Benzoessäureester.
- Verbindung mit Naphthylisocyanat.
- Umwandlungen. Erhitzt man Glycerin mit wasserfreier Phosphorsäure oder saurem schwefelsauren Kali, so bildet sich durch Zerlegung des Glycerins Wasser und Acrolein  $C_3H_4O$ , eine äußerst stechend riechende, leicht flüchtige und sich an der Luft schnell oxydierende Flüssigkeit, welche auch Silber in ammoniakalischer Lösung schnell reduziert. Ein in die Dämpfe gehaltener Papierstreifen, der mit einer natronlauge- und ammoniakhaltigen Silberlösung getränkt ist, wird sofort schwarz. Beim Schmelzen mit Alkalien bildet das Glycerin zunächst Wasserstoff und Milchsäure, durch weitere Einwirkung auf die Milchsäure entstehen

<sup>1</sup>) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 115, S. 152. 1906.

<sup>2</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 45, S. 18. 1912.

<sup>3</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 52, 2, S. 1385. 1919.

<sup>4</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 92, S. 234. 1918.

<sup>5</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 11, S. 472. 1887.

<sup>6</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 27, S. 341. 1910.

Buttersäure, Essigsäure, Ameisensäure usw. Auch durch Bakterien wird es unter Bildung von Alkoholen und Säuren zersetzt.

Zum Nachweis des Glycerins ist seine Mischbarkeit mit Wasser und Alkohol, <sup>Nachweis.</sup> der süße Geschmack, die Fähigkeit, Kupferoxyd in alkalischer Lösung mit schön blauer Farbe zu lösen, und die Unfähigkeit, es beim Erwärmen zu reduzieren, zu verwerten.

Die Acroleinprobe leidet an dem Nachteil, daß zahlreiche andere organische Stoffe ähnlich riechende Produkte entwickeln, ganz abgesehen davon, daß nur wasserfreies Glycerin mit Bisulfat unter Wasserabspaltung reagiert (Neuberg).

Beim Erhitzen von etwas Glycerin mit Borax am Platindraht in der Flamme tritt Grünfärbung auf (Senier und Lowe<sup>1</sup>), doch verhalten sich andere Borsäureester ebenso.

Zum sicheren Nachweis eignet sich nach Mandel und Neuberg<sup>2</sup>) folgende Probe, welche auf der Überführung von Glycerin in Glycerose und deren Erkennung mit Hilfe von Orcin beruht: 2—3 ccm einer 1proz. oder 1prom. wässrigen Glycerinlösung werden mit genau 3 Tropfen (= 0,12 ccm) n-Natriumhypochloritlösung\*) versetzt und 1 Minute gekocht. Dann fügt man abermals 3 Tropfen n-Hypochlorit hinzu und läßt wiederum 1 Minute lang sieden. Zu der noch heißen Flüssigkeit gibt man 3 Tropfen gewöhnliche Salzsäure (D = 1,124) und kocht  $\frac{1}{2}$ —1 Minute zur Zerstörung vielleicht noch vorhandenen Hypochlorits bzw. zur Austreibung des Halogens, wobei eine völlig farblose Flüssigkeit entstehen muß. Nun versetzt man mit der gleichen Menge rauchender Salzsäure und einer kleinen Messerspitze Orcin. Beim Kochen färbt sich (wenn wirklich alles Chlor entfernt ist) die Mischung schön violett oder grünblau. Sie zeigt einen Absorptionsstreifen, der meist sehr viel deutlicher nach Ausschütteln mit reinem Amylalkohol wird. Die eingetretene Ausscheidung löst sich dabei und der Amylalkohol ist schön blaugrün. Der Streifen liegt im Gelb.

Eine Verwechslung mit Pentosen und Glucuronsäure, welche auch die Orcinreaktion geben, ist dadurch ausgeschlossen, daß mit ihnen die Trommersche Probe positiv ausfällt. Sie können übrigens durch vorsichtiges Eindampfen mit Kalk- oder Barytwasser und nachheriger Ausfällung mit Alkoholäther entfernt werden.

Über quantitative Bestimmung des Glycerins in Fetten siehe § 95, in serösen Flüssigkeiten s. § 656. <sup>Quantitative Bestimmung.</sup>

**Batylalkohol**  $C_{20}H_{42}O_3$ . Gesättigter Alkohol, rechteckige Blättchen, Fp. 69°.

**Selachylalkohol**  $C_{20}H_{40}O_3$ . Ungesättigter Alkohol, geht bei der Hydrierung in Batylalkohol über. Sie wurden aus Haifisch- und Rochenleberöl nach der Verseifung erhalten (Tsujimoto und Toyama<sup>3</sup>), Toyama<sup>4</sup>).

### Thioalkohole und Thioäther.

60. **Methylmercaptan**  $CH_3S$  fanden Nencki und Sieber<sup>5</sup>) regelmäßig unter <sup>Vorkommen.</sup> den Gasen, welche sich bei der Zersetzung von Eiweiß und Leim durch die  <sup>$CH_3(SH)$</sup>  verschiedensten Bakterien bilden. Wohlgemuth<sup>6</sup>) erhielt es bei der bakteriellen

\*) Zu ihrer Herstellung gibt man in einer 1-l-Flasche zu 180 ccm der gewöhnlichen technischen konz. Natronlauge (35% NaOH) 0,6 kg Eis, tariert auf einer Wage und leitet so lange einen kräftigen Chlorstrom ein, bis die Gewichtszunahme 71 g beträgt. Man füllt auf 1 l auf und filtriert. Die Lösung, welche etwa den 10. Teil des angewandten Natrons unverändert enthält, hält sich monatelang (Raschig: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 40, 4, S. 4586. 1907).

<sup>1</sup>) Journ. of the chem. soc. (London) Bd. 33, S. 438. 1878.

<sup>2</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 71, S. 214. 1915.

<sup>3</sup>) Chem. Zentralbl. 1922, I, S. 878. <sup>4</sup>) desgl. 1923, I, S. 111 u. 1601.

<sup>5</sup>) Monatshefte f. Chem. Bd. 10, S. 526. 1889.

<sup>6</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 43, S. 469. 1904/05. — Siehe auch Kondo: Biochem. Zeitschr. Bd. 136, S. 198. 1923.

Zersetzung von Cystin. L. Nencki<sup>1)</sup> konnte es in den menschlichen Exkrementen nachweisen und M. Nencki<sup>2)</sup> im menschlichen Harn nach Spargelgenuß. Auch nach Genuß von Blumenkohl, Rotkohl tritt es im Harn auf (Rubner<sup>3)</sup>). Es entsteht auch, wie Nencki und Schoubenko<sup>4)</sup> feststellten, wenn man Eiweiß und Leim (20 g) mit Ätzkali (200 g)  $\frac{3}{4}$ —1 Stunde auf 250—280° erhitzt. Auch der beim Erhitzen von Hornspänen mit Wasser in geschlossenem Rohr auf 150° entstehende lauchartig riechende Körper ist höchstwahrscheinlich Methylmercaptan (Bauer<sup>5)</sup>).

**Isolierung.** Um es aus der Kalischmelze zu gewinnen, löst man sie in Wasser, säuert mit Oxalsäure an (in betreff der genauen Beschreibung s. die Originalarbeit), erwärmt und fängt die übergelassenen Gase in 3proz. Quecksilbercyanidlösung auf. Den entstehenden Niederschlag von Schwefelquecksilber und Methylmercaptanquecksilber filtriert man ab, wäscht ihn und löst in Salzsäure. Das freigewordene Methylmercaptan destilliert man in eine 3proz. Lösung von essigsäurem Blei, es scheidet sich Methylmercaptanblei in Form eines gelben Niederschlags von mikroskopischen Tafeln und Prismen ab. In derselben Weise läßt es sich aus dem Harn isolieren.

**Eigenschaften.** Das Methylmercaptan stellt eine leichte, auf Wasser schwimmende Flüssigkeit dar, welche bei 5,8° siedet und einen charakteristischen unangenehmen Geruch (nach faulem Kohl) besitzt. Es bildet mit Blei, Quecksilber, Platin, Gold in Wasser unlösliche Verbindungen und färbt Isatinschwefelsäure grün.

**Nachweis.** Mit dieser Reaktion lassen sich außerordentlich kleine Mengen erkennen, noch empfindlicher ist der Nachweis mit Hilfe von Platin- oder Goldchlorid (Rubner).

**n-Butylmercaptan**  $C_4H_{10}S$ , im Drüsensekret des Stinkdachs enthalten (E. Beckmann<sup>6)</sup>. Flüssigkeit von durchdringendem Geruch, in Wasser unlöslich, leichter wie Wasser, mit Alkohol und Äther mischbar. Kp. 97° (Grabowsky und Saytzeff<sup>7)</sup>).

**61. Äthylsulfid**  $C_4H_{10}S$  ist nach Abel<sup>8)</sup> die flüchtige, stark nach Knoblauch riechende Verbindung, welche sich aus Hundeharn beim Versetzen mit Kalkmilch oder Alkali aus einer Muttersubstanz entwickelt.

**Vorkommen.** Diese Muttersubstanz ist nach Neuberg und Großer<sup>9)</sup> eine Diäthylmethylsulfoniumbase  $(C_2H_5)_2S(CH_3)OH$ , welche aus dem Harn durch Phosphorwolframsäure gefällt und nach Zersetzung des Niederschlags mit Schwefelsäure oder Salzsäure durch Wismutkaliumjodid abgeschieden werden kann.

Nach Drechsel<sup>10)</sup> entsteht eine flüchtige, dem Äthylsulfid sehr ähnlich riechende Substanz bei der Zersetzung der Eiweißkörper durch Salzsäure. Wohlgemuth<sup>11)</sup> erhielt es bei der bakteriellen Zersetzung des Cystin.

**Isolierung.** Um das Äthylsulfid aus Hundeharn zu erhalten (die Reindarstellung ist noch nicht gelungen), macht man ihn alkalisch und leitet einen langsamen Luftstrom hindurch. Derselbe passiert nacheinander mit Salzsäure, mit Natronlauge, mit Kalistückchen und mit granuliertem Chlorcalcium gefüllte Waschflaschen bzw. U-Röhren und tritt schließlich durch konzentrierte Schwefelsäure, welche das Äthylsulfid zurückhält.

**Eigenschaften.** Es ist eine farblose, bei 92° siedende Flüssigkeit, löst sich in Alkohol und Äther, nur wenig in Wasser, wohl aber in konzentrierter Schwefelsäure unter

<sup>1)</sup> Monatshefte f. Chem. Bd. 10, S. 862. 1889.

<sup>2)</sup> Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 28, S. 206. 1891. <sup>3)</sup> Arch. f. Hyg. Bd. 19, S. 136. 1893.

<sup>4)</sup> Arch. des sciences biol. publ. par l'inst. imp. de méd. exp. à St. Petersburg Bd. 1, S. 315. 1892.

<sup>5)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 35, S. 343. 1902.

<sup>6)</sup> Malys Jahresber. d. Tierchem. 1896, S. 566. <sup>7)</sup> Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 171, S. 251. 1874.

<sup>8)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 20, S. 253. 1895.

<sup>9)</sup> Ref. Zentralbl. f. Physiol. Bd. 19, S. 316. 1906.

<sup>10)</sup> Zentralbl. f. Physiol. Bd. 10, S. 529. 1897.

<sup>11)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 43, S. 469. 1904/05. — Siehe auch Kondo: Biochem. Zeitschr. Bd. 136, S. 198. 1923.

Verschwinden des Geruchs und beim Verdünnen mit Wasser sich wieder abscheidend. Sublimat ruft in seinen Lösungen einen Niederschlag hervor, der abfiltriert und mit Wasser gewaschen aus heißem Alkohol in langen glänzenden Prismen krystallisiert  $(C_2H_5)_2SHgCl_2$ , Fp.  $119^\circ$ . Mit Bromessigsäure bildet es ein schön krystallisierendes Bromid der Diäthylsulfinessigsäure  $Br(C_2H_5)_2S \cdot CH_2COOH$ . Auf Zusatz von Jodjodkalium entsteht in wässriger oder schwefelsaurer Lösung ein schwarzbrauner Niederschlag  $(C_2H_5)_2SJ_2$ , der sich nur sehr allmählich in schwarzbraunen Öltröpfchen abscheidet. Sehr empfindliche Reaktion, da noch in sehr verdünnten Lösungen wolkenartige Trübungen entstehen. Sehr vorsichtiger Zusatz von salpetrigsaurem Salz zu einer Lösung von Äthylsulfid in Schwefelsäure ruft eine Grünfärbung hervor, welche aber beim Stehen und bei überschüssigem Zusatz des Reagens verschwindet (weniger empfindliche Reaktion).

Zum Nachweis dienen die beiden eben genannten Reaktionen, doch ist <sup>Nachweis.</sup> zu bemerken, daß auch Methylamin, welches sich aus mit Kalkmilch versetztem Hundeharn entwickeln kann, mit Jod eine ähnliche Reaktion gibt<sup>1)</sup>.

### Aldehyde und Ketone.

62. Acetaldehyd  $C_2H_4O$  wurde von Stepp<sup>2)</sup> im Harn von Diabetikern und <sup>Vorkommen.</sup> im Blut von Diabetikern und Nephritikern nachgewiesen. Es findet sich hier stets zusammen mit Aceton. Auch im normalen Harn ist es in kleinen Mengen  $\begin{matrix} CH_3 \\ | \\ CHO \end{matrix}$  vorhanden (Stepp und Feulgen). Es entsteht als Zwischenstufe aus Zucker bei den Oxydationsvorgängen im Muskel (Hirsch<sup>3)</sup>, durch Hefe (Neuberg), Bact. coli, die Erreger der Ruhr und des Gasbrandes (Neuberg und Nord<sup>4)</sup>, eine Reihe von Spaltpilzen (Cohen<sup>5)</sup>, Bact. lact. aerog. (Neuberg, Nord und Wolff<sup>6)</sup>, Bac. butyl. (Neuberg und Arinstein<sup>7)</sup>, Mucorarten und viele andere anaerobe Pilze (Neuberg und Cohen<sup>8)</sup>, aus Xylose durch bestimmte Pentose vergärende Bakterien (Peterson und Fred<sup>9)</sup>, ferner bei der Essigsäuregärung (Neuberg und Nord<sup>10)</sup>, bei der Cellulosegärung (Neuberg und Cohn<sup>11)</sup>, bei der Vergärung von Glucosäure, Milchsäure und andern Säuren durch Bact. coli und Bact. lact. aerog. (Nagai<sup>12)</sup> und kann als Bisulfitverbindung abgefangen werden, wenn diese Gärungen bei Gegenwart von Sulfiten (Dinatriumsulfit) verlaufen.

Er wird dargestellt durch Oxydation von Äthylalkohol mit Chromsäure oder aus Ace- <sup>Darstellung,</sup> tylen durch Wasseranlagerung.

<sup>Darstellung aus Harn.</sup> Darstellung aus Harn als Aldomedon<sup>2)</sup>. Man destilliert von einer größeren Menge diabetischen Harnes (mehrere Liter), dessen Gehalt an Aldehyd durch die Eigenschaft seines Destillates, ammoniakalische Silberlösung in der Kälte zu reduzieren, festgestellt ist, portionsweise etwa den 5. Teil ab (bei Neigung zu schäumen verdünnt man vorher mit Wasser und fügt ein wenig Essigsäure hinzu), destilliert das Destillat noch mehrmals, indem man immer nur den zuerst übergehenden Teil auffängt, bis die Destillatmenge nur noch 20—25 ccm beträgt.

Zweckmäßiger ist es mit Wasserdampf zu destillieren und schließlich einen Hempelschen Fraktionsaufsatz zu benutzen, zumal bei der Isolierung aus normalem Harn, von dem sehr große

<sup>1)</sup> Analyse des Harns (Neubauer-Huppert). 11. Aufl. S. 761, 1913.

<sup>2)</sup> Stepp u. Feulgen: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 114, S. 301. 1921 u. Bd. 119, S. 72. 1922. — Stepp: Biochem. Zeitschr. Bd. 107, S. 60. 1920.

<sup>3)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 117, S. 113. 1921 u. Bd. 134, S. 415. 1923.

<sup>4)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 96, S. 133. 1919. — Nagai, Ebenda Bd. 141, S. 261. 1923.

<sup>5)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 112, S. 139. 1920. <sup>6)</sup> desgl. Bd. 112, S. 144. 1920. — Nagai a. O.

<sup>7)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 117, S. 269. 1921. <sup>8)</sup> desgl. Bd. 122, S. 204. 1921.

<sup>9)</sup> Journ. biol. chem. Bd. 44, S. 29. 1920. <sup>10)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 96, S. 158. 1919.

<sup>11)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 139, S. 527. 1923. <sup>12)</sup> desgl. Bd. 141, S. 266. 1923.

Mengen (etwa 150 l) zu verwenden sind. Näheres über das Destillationsverfahren bei Stepp und Fricke<sup>1)</sup> und Fricke<sup>2)</sup>.

Die Destillate sind in eisgekühlter Vorlage, in der sich etwas Wasser befindet, aufzufangen, und das Kühlrohr muß in das Wasser eintauchen. Man fügt nun eine Lösung von 0,1 g Dimedon (s. unten) in 1 ccm 96proz. Alkohol und 0,2 g Kochsalz hinzu, läßt über Nacht stehen und entfernt dann das Aceton, welches die völlige Abscheidung des Aldomedons (s. unten) hindert, durch Eindampfen auf etwa 5 ccm. Das Aldomedon krystallisiert aus, wird abgesaugt und mit Wasser gewaschen. Zur Entfernung des beigemengten Dimedons löst man in der zehnfachen Menge 96proz. Alkohol und fügt im ganzen das zwanzigfache Volumen Wasser hinzu, aber mit der Vorsicht, daß, sobald auf Zusatz einiger Tropfen Trübung auftritt, diese durch Reiben mit dem Glasstab zunächst in den krystallisierten Zustand übergeführt wird, ehe man mit dem Wasserzusatz fortfährt. Die abgesaugten Krystalle werden aus der fünffachen Menge 80proz. Alkohol umkrystallisiert und durch den Schmelzpunkt identifiziert. Sie können weiter in das Anhydrid übergeführt werden (s. unten).

Eigenschaften.

Acetaldehyd, ist eine farblose, leicht bewegliche Flüssigkeit. Kp. 21°. Spezifisches Gewicht etwa 0,8. Er ist in Wasser, Alkohol, Äther leicht löslich, wird in wässrigen Lösungen durch Tierkohle adsorbiert (Abderhalden und Suzuki<sup>3)</sup>), brennt mit leuchtender Flamme. Durch geringe Mengen konzentrierter Schwefelsäure geht er in den polymeren Paraldehyd (CH<sub>3</sub>COH)<sub>3</sub> über.

Verbindung mit Natriumbisulfit.

Er vereinigt sich mit Natriumbisulfit und Dinatriumsulfit zu einer in Wasser leicht, in Alkohol schwer löslichen krystallisierenden Verbindung CH<sub>3</sub>CH(OH)

Verbindung mit Dimethylhydroresorcin.

(OSO<sub>2</sub>Na) und reagiert mit Dimethylhydroresorcin (Dimedon) (Vorländer<sup>4)</sup>), einer in Alkohol und Aceton löslichen, in Wasser bei 25° zu 0,4%, in Äther, Ligroin, Schwefelkohlenstoff schwer löslichen Verbindung, unter Bildung von Äthyliden-

Aldomedon.

bis-dimethylhydroresorcin (Aldomedon). Aldomedon ist ein in Wasser schwerlöslicher (0,008%), in Ligroin leicht löslicher (Fricke<sup>5)</sup>) krystallisierender Körper vom Fp 139—140°, welcher in der dreifachen Menge Eisessig, 7 Stunden bei 100° erhitzt, in sein Anhydrid übergeht, das beim Verdünnen der Eisessiglösung krystallinisch ausfällt und bei 173—174° schmilzt. Dimedon reagiert nicht mit β-Oxybuttersäure, Acetessigsäure, Aceton, Crotonsäure, Ameisensäure, Essigsäure, Harnsäure (Fricke).

Acetaldehyd wird durch Kochen mit Silberoxyd am Rückflußkühler zerstört unter Bedingungen, unter denen Aceton quantitativ erhalten bleibt<sup>6)</sup>.

Nachweis.

Er gibt die Liebensch Jodoformprobe (§ 58), die Proben von Reynolds-Gunning und Legal (§ 63), reduziert Fehlingsche Lösung und ammoniakalische Silberoxydlösung, rötet fuchsinschweflige Säure und gibt die Rimini'sche Reaktion. Diese letztere (Blaufärbung auf Zusatz einiger Tropfen kaltgesättigter Lösung von Nitroprussidnatrium und etwas 50proz. Diäthylamin) ist streng beweisend für Acetaldehyd.

Über quantitative Bestimmung s. Stepp u. Fricke<sup>7)</sup> und Rieter<sup>8)</sup>-Rippert<sup>9)</sup>.

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 116, S. 296. 1921. <sup>2)</sup> desgl. Bd. 118, S. 245. 1922.

<sup>3)</sup> Zeitschr. f. Fermentforsch. Bd. 6, S. 137. 1922.

<sup>4)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 30, 2, S. 1801. 1897 u. Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 294, S. 314. 1897. Desgl. Bd. 309, S. 373. 1899. — Neuberg u. Reinfurth: Biochem. Zeitschr. Bd. 106, S. 281. 1920. — Fricke: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 116, S. 129. 1921.

<sup>5)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 116, S. 129. 1921.

<sup>6)</sup> Masuda: Biochem. Zeitschr. Bd. 45, S. 144. 1912.

<sup>7)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 116, S. 293. 1921. — Fricke: desgl. Bd. 118, S. 241. 1922.

<sup>8)</sup> Zeitschr. f. analyt. Chem. Bd. 36, S. 403. 1897. <sup>9)</sup> desgl. Bd. 35, S. 232. 1896.



63. Aceton  $C_3H_6O$ . Zuerst im Destillat diabetischer Harne nachgewiesen und in diesen oft in reichlicher Menge vorhanden, auch in der Expirationsluft und im Blut und in Organen Diabetischer gefunden, kommt es auch bei vielen anderen fieberhaften Krankheiten und bei langdauernder Inanition im Harn und nach v. Jaksch in kleinen Mengen auch im Destillat normaler Harne vor. Es entsteht in kleiner Menge beim Erhitzen von Zucker mit Alkalien, bei der Oxydation von Gelatine (Blumenthal und Neuberg<sup>1</sup>) und Eieralbumin (Orgler<sup>2</sup>) mit käuflichem (d. h. Mineralsäure enthaltendem) Wasserstoffsperoxyd und Eisensalz, auch aus Kohlenhydraten durch manche Bakterien.

Vorkommen.



Bildung.

Es entsteht aus Isopropylalkohol und  $\beta$ -Oxybuttersäure durch Oxydation, aus Acetessigäther durch Einwirkung starker Säuren oder Alkalien neben Kohlensäure und Alkohol, aus Acetessigsäure durch einfaches Erhitzen und bildet sich reichlich bei der trockenen Destillation von essigsaurem Kalk, Holz, Zucker und Kalk.

Darstellung.

Zur Isolierung des Acetons aus Harn destilliert man größere Mengen (ohne Säurezusatz), bis etwa der 10. Teil übergegangen ist, säuert das Destillat mit Salzsäure an, destilliert noch mehrmals und fängt stets nur den zuerst übergehenden Teil in stark gekühlter Vorlage auf.

Isolierung aus Harn.

Es ist eine mit Wasser, Alkohol oder Äther sich mischende Flüssigkeit von angenehmem eigentümlichen Geruch, siedet bei  $56,3^\circ$  und hat das spezifische Gewicht 0,814 bei  $0^\circ$ . Mit sauren schwefligsauren Alkalien vereinigt es sich zu krystallisierenden Verbindungen. Aus schwach alkoholischer Lösung fällt es auf Zusatz von p-Nitrophenylhydrazin in essigsaurer Lösung als p-Nitrophenylhydrazonacetone, welches aus heißem Alkohol in langen goldgelben Nadeln (Fp.  $148-148,5^\circ$ ) krystallisiert (Bamberger und Sternitzki<sup>3</sup>). Diese Verbindung ist auch in kaltem Wasser fast unlöslich und deshalb auch zur quantitativen Bestimmung des Aceton im Harn benutzt. Noch sehr verdünnte Lösungen (in wässrigem Methylalkohol) geben mit einigen Tropfen Benzaldehyd und 10proz. Natronlauge während 24stündigen Stehens krystallinische Abscheidung von Dibenzalacetone (Fp.  $112^\circ$ ) (Vorländer und Hobohm<sup>4</sup>). Erhitzt man eine sehr verdünnte Acetonlösung mit dem gleichen Volumen einer Mercurisulfatlösung, welche aus 5 g Mercurioxyd, 20 ccm konzentrierter Schwefelsäure und 100 g Wasser dargestellt ist, 10 Minuten in verschlossener Flasche im siedenden Wasserbad, so erhält man einen weißen krystallinischen Niederschlag, welcher aus Aceton, Quecksilber und Schwefelsäure besteht (Denigès<sup>5</sup>).

Eigenschaften.

Hydrazon.

Dibenzalacetone.

Aceton, in wässriger Lösung mit Silberoxyd am Rückflußkühler gekocht, erfährt keine Zersetzung unter Bedingungen, unter denen Acetaldehyd völlig zerstört wird (Masuda<sup>6</sup>).

Mit Jod und Kalilauge behandelt gibt Aceton Jodoform, durch Natriumamalgam und Wasser wird es in Isopropylalkohol umgewandelt.

Umwandlungen.

Zum Nachweis des Acetons dienen folgende Reaktionen, welche mit der wässrigen Lösung anzustellen sind.

Nachweis.

1. Probe von Lieben (§ 58). Die Abscheidung von Jodoform erfolgt viel schneller als bei Alkohol. Noch 0,01 mg geben die Reaktion in einigen Minuten.

Diese Reaktion geben auch Äthylalkohol, Aldehyd; indessen ist die Reaktion mit Alkohol, besonders in der Kälte, viel weniger empfindlich.

2. Probe von Lieben-Gunning. Auf Zusatz einer alkoholischen Jodlösung und Ammoniak: schwarzer Niederschlag von Jodstickstoff, der allmählich

<sup>1</sup>) Dtsch. med. Wochenschr. 1901, S. 6. Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 2, S. 238. 1902.

<sup>2</sup>) Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 1, S. 583. 1902.

<sup>3</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 26, 2, S. 1306. 1893. — van Ekenstein u. Blanksma: Recueil des travaux chim. des Pays-Bas Bd. 22, S. 434. 1903 u. Bd. 24. S. 33. 1905.

<sup>4</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 29, 2, S. 1840. 1896. Vgl. auch Embden u. Kalberlah: Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 8, S. 122. 1906.

<sup>5</sup>) Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 126, S 1868. 1898 u. Bd. 127, S. 963 1898.

<sup>6</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 45, S. 144. 1912.

verschwindet (bei geringem Acetongehalt erst nach vielen Stunden) und in den gelben Jodofornniederschlag übergeht. Die Reaktion ist nicht ganz so empfindlich, wird aber von Äthylalkohol und Aldehyd nicht gegeben.

3. Probe von Frommer. Man fügt zu etwa 10 ccm 1 g festes Ätzkali und gleich weiter 1—2 ccm einer 10proz. alkoholischen Lösung von Salicylaldehyd\*) und erwärmt auf 70°: Purpurfarbe (beruhend auf der Bildung von Dioxydibenzalacetone. Sehr empfindlich, Alkohol und Aldehyd geben sie nicht.

4. Probe von Reynolds-Gunning. Man fügt Sublimat oder Mercurnitrat, dann alkoholische Kalilauge bis zur stark alkalischen Reaktion hinzu, schüttelt stark um und filtriert. Schichtet man über das klare Filtrat etwas Schwefelammonium ohne Umschütteln, so zeigt sich an der Grenze der Flüssigkeiten Schwarzfärbung, wenn Aceton zugegen ist, da dasselbe unter diesen Verhältnissen etwas Quecksilber löst. Bei geringem Acetongehalt tritt die Schwarzfärbung unter Umständen nur ein, wenn vor dem Zusatz des Schwefelammoniums mit Salzsäure schwach angesäuert ist.

5. Probe von Legal. Frisch aufgelöstes Nitroprussidnatrium und Natronlauge geben Rotfärbung, die bald in Gelb übergeht. Fügt man jetzt Essigsäure hinzu, so entsteht Purpur- bis Carminrotfarbe; ähnlich aber langsamer mit Ammoniak statt Natronlauge. Nicht sehr empfindlich.

Die Proben 4 und 5 geben auch Aldehyd.

Über Bestimmung im Harn s. § 607 ff., im Blut § 706, in Organen § 745.

#### Einbasische gesättigte und ungesättigte Fettsäuren.

64. Folgende sind in menschlichen und tierischen Organismen und ihren Exkreten gefunden worden (die Liste ist unvollständig):

		Spez. Gewicht	bei Temp.	Siedepunkt	bei Druck mm	Schmelzpunkt
Ameisensäure . . .	CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1,2415	0°	100,8°	760	+ 8,6°
Essigsäure . . .	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	1,0701	0°	118,1°	760	+ 16,5°
Propionsäure . . .	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	1,0168	0°	140,9°	760	— 22,0°
Buttersäure . . .	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	0,9746	0°	162,5°	760	— 7,9°
Isobuttersäure . .	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	0,9651	0°	154,0—154,2°	760	— 79,0°
Valeriansäure . . .	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	0,9577	0°	185°	760	— 58,5°
Isovaleriansäure .	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	0,9467	0°	173,7°	760	— 51,0°
d-Valeriansäure . .	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	0,948	15°	173—174°	760	—
Capronsäure . . .	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	0,9446	0°	204,5—205°	760	— 1,5°
d-Capronsäure . . .	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	0,930	15°	196—198°	770	—
Caprylsäure . . .	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	0,9270	0°	236—237°	770	+ 16,5°
Caprinsäure . . .	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	0,889	37,0°	268—269°	770	+ 31,3bis + 31,4°
Laurinsäure . . .	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	0,8750	43,6°	225,0°	100	+ 43,6° **)
Myristinsäure . . .	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	0,8622	53,8°	250,5°	100	+ 53,8° **)
Palmitinsäure . . .	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	0,8527	62,6°	268,5°	100	+ 62,6° **)
Stearinsäure . . .	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	0,8454	69,2°	291,0°	100	+ 69,2°
Arachinsäure ***)	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>	—	—	—	—	+ 77°
Lignocerinsäure . .	C <sub>24</sub> H <sub>48</sub> O <sub>2</sub>	—	—	—	—	+ 80 bis 81°
Cerotinsäure . . .	C <sub>26</sub> H <sub>52</sub> O <sub>2</sub>	0,8359	79°	—	—	+ 78,5°
Oleinsäure . . .	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	0,898	14°	223°	10	+ 14°
Gadoleinsäure . . .	C <sub>20</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	—	—	—	—	+ 24,5°
Erucasäure . . .	C <sub>22</sub> H <sub>42</sub> O <sub>2</sub>	—	—	254,5°	10	+ 34°

\*) Schmitz empfiehlt statt dessen p-Oxybenzaldehyd (Biol. Arbeitsmeth. Herausgegeben von Abderhalden IV. 5, S. 193. 1924.

\*\*) Levene und West fanden für Laurinsäure, Myristinsäure und Palmitinsäure nach mehrmaliger Krystallisation aus Aceton die Schmelzpunkte 48,0°, 58,0° und 63—64° (Journ. of biol. chem. Bd. 18, S. 463. 1914).

\*\*\*) Nach Ehrenstein und Stuewer hat die Arachinsäure die Formel C<sub>22</sub>H<sub>44</sub>O<sub>2</sub> und eine verzweigte C-Kette. Journ. f. prakt. Chem. N. F. Bd. 105, S. 199. 1923.

**Säuren der Reihe  $C_nH_{2n}O_2$ .**

Vergleicht man zwei in ihrer Zusammensetzung einander nahestehende Glieder der Säurereihe  $C_nH_{2n}O_2$  hinsichtlich ihrer chemischen Eigenschaften, so ist es nur bei einigen bis jetzt möglich, bestimmte Unterschiede beider aufzufinden, die nicht bloß graduelle Differenzen wären, während die weit auseinander liegenden Glieder sich ziemlich leicht voneinander trennen und in ihren physikalischen und chemischen Eigenschaften unterscheiden lassen. Die Schwierigkeit des Nachweises dieser Substanzen im einzelnen wird durch den Umstand noch wesentlich erhöht, daß gerade die in ihrer Zusammensetzung einander nahestehenden Säuren in den Organismen zusammen in denselben Organen, in denselben Flüssigkeiten vorzukommen pflegen. So finden sich in dem menschlichen und tierischen Fett als wesentliche Bestandteile wohl überall Palmitinsäure, Stearinsäure und Ölsäure nebeneinander in verschiedenen Mengenverhältnissen in Verbindung mit Glycerin, während die Glyceride der Myristinsäure, Laurinsäure, Caprin-, Capryl-, Capron- und Buttersäure sich nicht konstant darin finden, und wo sie überhaupt darin auftreten, nur in relativ geringen Mengen sich zeigen. Andererseits sind in tierischen Flüssigkeiten die niedrigen Homologen, wenn auch nur in geringer Menge, so doch reichlicher als die Fettsäuren von höherem Molekulargewicht vorhanden; letztere können auch ganz fehlen. Bei der bakteriellen Zersetzung der Kohlenhydrate, Proteine bilden sich viele der obigen Säuren nebeneinander. In den festen Exkrementen sowie im Dickdarminhalte sind fast alle enthalten, teils aus der Nahrung herrührend, teils im Darmkanale gebildet.

Die niederen Glieder der Reihe  $C_nH_{2n}O_2$  sind in Wasser leicht lösliche Flüssigkeiten von stechendem Geruch, die mittleren ölige, in Wasser wenig lösliche Substanzen von unangenehmem schweißartigem Geruch, die höheren feste, in Wasser unlösliche Körper ohne Geruch. Alle sind in Alkohol und besonders in Äther löslich. Die niederen und mittleren bis zur Caprinsäure destillieren mit den Wasserdämpfen und auch für sich unzersetzt, die höheren gehen nur im luftverdünnten Raum ohne Zersetzung über. Bei der Oxydation mit Wasserstoffsperoxyd geben sie alle Kohlensäure in wechselnden Mengen neben anderen Oxydationsprodukten (Dakin<sup>1</sup>). Zur Identifizierung haben für die Säuren von niedrigerem Molekulargewicht die Siedepunkte hohe Bedeutung, für die von hohem Molekulargewicht die Schmelzpunkte. Wo keine Angaben über spezifisches Gewicht und Siedepunkt gemacht sind, fehlen noch zuverlässige Bestimmungen.

Zur Identifizierung sind auch die Phenacyl-, p-Halogen- (speziell p-Brom-) phenacylester empfohlen worden deren Schmelzpunkte hier folgen: Phenacylester<sup>2</sup>) der Essigsäure 40°, der Palmitinsäure 52,5°, der Stearinsäure 64°, die Ester der Ameisen-, Butter-, Valerian-, Ölsäure krystallisieren nicht; p-Bromphenacylester<sup>3</sup>) der Essigsäure 85°, Propionsäure 59°, Buttersäure 63,2°, Isobuttersäure 76,8°, Valeriansäure 63,6°, Isovaleriansäure 68°, Capronsäure 71,6°, Caprylsäure 65,5°, Caprinsäure 66°, Palmitinsäure 81,5°, Stearinsäure 78,5°.

Zu ihrer Darstellung löst man die Säure (und zwar etwas mehr als 1 g Phenacyl- bzw. p-Bromphenacylbromid äquivalent ist) und etwas weniger Natriumcarbonat als zu ihrer Neutralisation nötig ist, unter Erwärmen in 5 ccm Wasser, fügt 1 g des Bromids und 10 ccm 95 proz. Alkohol hinzu und kocht 1 Stunde (bei zweibasischen 2 Stunden, bei dreibasischen 3 Stunden), indem man noch etwas Alkohol hinzufügt, wenn das zur Lösung des Esters nötig ist.

Über die Methoden der Abscheidung und Trennung der Fettsäuren s. § 80 und 81.

<sup>1</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 4, S. 227. 1908.

<sup>2</sup>) Rather u. Reid: Journ. of the Americ. chem. soc. Bd. 41, S. 75; ref. Chem. Zentralbl. 1919, III, S. 48.

<sup>3</sup>) Judefind u. Reid: Journ. of the Americ. chem. soc. Bd. 42, S. 1043; ref. Chem. Zentralbl. 1920, III, S. 310.

Allgemeine  
Eigenschaften.

Phenacyl-, Brom-  
phenacylester.

Alk  
: C=O  
:  
O  
: CH<sub>2</sub>  
:  
CO  
:  
C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>

- Vorkommen.** 65. Ameisensäure  $\text{CH}_2\text{O}_2$ . In ziemlich konzentrierter Lösung findet sich freie Ameisensäure in den Ameisen; auch in Bienen und anderen Insekten, in Raupen (Prozessionsraupe). Sie findet sich im Harn, Blut, in den Muskeln und soll in der Milzflüssigkeit vorhanden sein, auch vom Schweiße, dem Pankreas, der Thymus wird ihr Vorkommen angegeben. Sie entsteht bei Zersetzung des Blutfarbstoffes sowie eines im Harn häufig auftretenden, kaum gekannten Körpers durch Säuren, ferner bei der Oxydation von Eiweiß und Kohlenhydraten mit Braunstein und Schwefelsäure, von Eiweiß und Leim mit Calciumpermanaganat sowie auch bei der hydrolytischen Spaltung der Hexosen (und solcher Kohlenhydrate, die beim Kochen mit verdünnten Säuren Hexosen liefern) neben Lävulinsäure und Huminsubstanzen, auch bei der Autolyse der Leber. Sie bildet sich bei der Fäulnis der Glutamin- und Asparaginsäure. Auch im Pflanzenreich ist sie vielfach gefunden worden, z. B. in Brennesseln, Tannennadeln.
- Darstellung.** Künstlich dargestellt wird sie durch Destillation von entwässerter Oxalsäure mit trockenem Glycerin. Technisch gewinnt man Formiate durch Einwirkung von Kohlenoxyd auf erhitztes Alkali unter Druck.
- Eigenschaften.** Die Ameisensäure ist eine farblose Flüssigkeit von stechendem, für sie charakteristischem Geruch, mit Wasser, Alkohol, Äther in jedem Verhältnisse mischbar. Schmelzpunkt und Siedepunkt s. § 64. Ihre Salze sind alle in Wasser leicht löslich, am schwersten das Mercurosalz, welches sich jedoch, wie weiter unten angegeben, leicht zerlegt. Das Bleisalz ist in 63 Tl. Wasser von  $16^\circ$  löslich; man benutzt es zweckmäßig zur Analyse. Das Zinksalz ist in absolutem Alkohol völlig unlöslich (Unterschied von essigsauem und buttersauem Zink, *Casalz*. *Haberland*<sup>1)</sup>). Das Kalksalz krystallisiert wasserfrei. 100 Tl. Wasser lösen bei  $20^\circ$  16,60 Tl. des Kalksalzes (*Lumsden*<sup>2)</sup>). Das Chininsalz (Fp.  $110-113^\circ$ ) löst sich in Tetrachlorkohlenstoff 1:16000 (*Phelps und Palmer*<sup>3)</sup>). Eine neutrale Flüssigkeit, welche Ameisensäure enthält, gibt mit neutralem Eisenchlorid eine dunkelrote Färbung der Lösung und beim Kochen gelben Niederschlag eines basischen Salzes. Essigsäure verhält sich ebenso.
- Zersetzungen** Die Ameisensäure unterscheidet sich von allen ihren Homologen durch ihre leichte Zerlegung. Sie zersetzt sich in Berührung mit feinverteiltem Rhodium zu Kohlensäure und Wasserstoff unter Freiwerden von Wärme; dieselbe Zersetzung bewirken Mikroorganismen, z. B. im Kloakenschlamm enthaltene. Durch Erhitzen mit konzentrierter Schwefelsäure zerfällt sie in Kohlenoxyd und Wasser, durch Erhitzen mit Ätzkali oder besser Baryt bildet sie unter Wasserstoffentwicklung Oxalsäure. Salpetersaures Silber wird durch Ameisensäure beim Kochen schnell zu metallischem Silber reduziert, während Kohlensäure entweicht. Mercurisalze, auch Quecksilberchlorid, werden zunächst durch Erwärmen mit Ameisensäure in Mercurosalze unter Kohlensäureentwicklung umgewandelt, beim fortgesetzten Erwärmen (allmählich bei gewöhnlicher Temperatur) tritt Reduktion zu metallischem Quecksilber unter erneuter Entwicklung von Kohlensäure ein. Fügt man daher zu einer sauren Lösung von Ameisensäure Silberoxyd, Mercurioxyd oder Mercurisulfat und kocht, so wird die Ameisensäure völlig zu Kohlensäure und Wasser zersetzt. Auf diese Weise läßt sich Ameisensäure aus Flüssigkeiten entfernen. Fehlingsche Lösung wird nicht reduziert. Bei der Oxydation mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  entsteht  $\text{CO}_2$  in reichlichen Mengen (*Dakin*).

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. analyt. Chem. Bd. 38, S. 217. 1899.

<sup>2)</sup> Journ. of the chem. Soc. (London) Bd. 81, S. 350. 1902.

<sup>3)</sup> Journ. of the americ. chem. soc. Bd. 39, S. 136; ref. Chem. Zentralbl. 1917, I, S. 1032 und Journ. of the biol. chem. Bd. 29, S. 199; ref. Chem. Zentralbl. 1917, I, S. 776.

Zu ihrem Nachweis kann das Verhalten gegen salpetersaures Silber und gegen Eisenchlorid benutzt werden. Am besten verfährt man nach Fincke<sup>1)</sup> so: Man erhitzt die zu prüfende schwach saure (formaldehydfreie) Flüssigkeit 1 bis 2 Stunden im Wasserbad mit Mercurichlorid und Natriumacetat. Erfolgt hierbei keine Abscheidung, welche sich mit Ammoniak schwarz färbt, so ist keine Ameisensäure vorhanden. Tritt Schwarzfärbung ein, so ist mit der folgenden Reaktion von Fenton und Sisson<sup>2)</sup> auf Ameisensäure zu prüfen. Sie beruht auf der Reduktion zu Formaldehyd und Nachweis des letzteren, und gestattet, in der Ausführung von Fincke noch 0,5 mg in 10 ccm Flüssigkeit zu erkennen. Man bringt 10 ccm der zu prüfenden neutralen oder schwach sauren (aldehydfreien) Lösung in ein Reagensglas und drückt in die Flüssigkeit 0,5 g Magnesiumband in Form einer Spirale oder eines zusammengewickelten Knäuels, der sich federnd im Reagensglas anklemt, ein. Während das Reagensglas sich in einem größeren Gefäß mit kaltem Wasser befindet, fügt man etwa 6 ccm Salzsäure (spez. Gew. 1,124) tropfenweise innerhalb von etwa 15 Minuten hinzu, läßt noch einige Minuten stehen und prüft dann 5 ccm der in ein geräumiges Reagensglas abgegossenen Flüssigkeit in folgender Weise auf Aldehyd: Man fügt 2 ccm frische Milch hinzu und 7 ccm Salzsäure (spez. Gew. 1,124), welche auf 100 ccm 0,2 ccm einer 10 proz. Eisenchloridlösung enthält, erhitzt zum Kochen und hält 1 Minute lang in lebhaftem Sieden: bei Anwesenheit von Formaldehyd tritt Violettfärbung auf.

Über quantitative Bestimmung der Ameisensäure s. S. 78.

66. Essigsäure  $C_2H_4O_2$ . Freie Essigsäure findet sich normal in menschlichen Fäkalstoffen, pathologisch nicht selten im Mageninhalt (Erbrochenen) bei Störungen der Magenverdauung, auch ohne vorangegangenen Essiggenuß, durch eine daselbst verlaufende Gärung von Milch, Brot usw. entstanden, besonders häufig bei kleinen Kindern, zusammen mit freier Milchsäure. Sie ist ein normales Zwischenprodukt des Stoffwechsels und ist in geringen Spuren im Saft verschiedener Organe (Milz, Muskeln), im Blute bei Leukämie, im Schweiß, in der Galle, im Harn nachgewiesen. Sie entsteht bei der Fäulnis der Proteine, bei der Gärung von Kohlenhydraten (daher ihr häufiges und reichliches Vorkommen im aufbewahrten diabetischen Harn), bei der trockenen Destillation und Oxydation von Kohlenhydraten, bei der Oxydation von Eiweißstoffen und Leim mit Calciumpermanganat, bei der hydrolytischen Spaltung der Mucine und anderer Substanzen, die bei dieser Behandlung Glucosamin bzw. Chondrosamin liefern, bei der Autolyse der Leber. Sie findet sich auch in Pflanzen.

Man stellt die Essigsäure durch Gärung von Wein oder Bier mit Essighefe (*Mycoderma aceti*) oder aus den Produkten der trockenen Destillation des Holzes dar; die konzentrierte wird gewöhnlich durch Destillation von getrocknetem essigsäurem Natron mit konz. Schwefelsäure erhalten. Neuerdings gewinnt man sie aus Acetylen über Acetaldehyd.

Die Essigsäure besitzt einen bekannten charakteristischen Geruch. Schmelzpunkt und Siedepunkt s. § 64. Sie mischt sich mit Wasser, Alkohol und Äther in jedem Verhältnisse, wird durch konzentrierte Schwefelsäure beim Erhitzen kaum angegriffen (meist geringe Schwärzung unter Entwicklung von schwefliger Säure). Die neutralen Salze sind in Wasser löslich, schwer löslich bei gewöhnlicher Temperatur das Silber- und das Mercurosalz. Salpetersaures Silber gibt mit hinreichend konzentrierten Lösungen essigsaurer Salze weißen Niederschlag von essigsäurem Silber, das in heißem Wasser leichter löslich ist und sich beim

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 51, S. 253. 1913.

<sup>2)</sup> Proc. of the Cambridge philos. soc. Bd. 14, S. 385. 1908; ref. Chem. Zentralbl. 1908, I, S. 1379.

Quantitative Bestimmung.  
Vorkommen.



Bildung.

Darstellung

Eigenschaften.

Ag. salz.

- Erkalten der heiß konzentrierten Lösung in blätterigen Krystallnadeln ausscheidet (100 Tl. Wasser lösen bei 20° 1,0351 Tl.); Reduktion des Silbers tritt beim Kochen nicht ein. Das Calciumsalz krystallisiert aus Wasser mit 2 Mol. H<sub>2</sub>O, aus Wasser oberhalb 84° mit 1 Mol H<sub>2</sub>O. Seine Löslichkeit in Wasser nimmt mit steigender Temperatur etwas ab. 100 Tl. lösen bei 0° 37,40, bei 100° 29,65 Tl.
- Ca salz. wasserfreies Salz (Lumsden). Das Chininsalz (Fp. 124—126°) löst sich in
- Chininsalz. Tetrachlorkohlenstoff 1:2000 (Phelps und Palmer). Gegen Eisenchlorid verhalten sich die neutralen Salzlösungen der Essigsäure wie die der Ameisensäure.
- Fe salz. Phen- und Bromphenacyl ester S. 61.

Bei der Oxydation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entstehen CO<sub>2</sub>, Glyoxylsäure, Formaldehyd, Ameisensäure (Dakin).

- Nachweis. Zu ihrem Nachweis dient das Verhalten der neutralen Lösungen ihrer Salze gegen Eisenchlorid (Ameisensäure verhält sich ebenso), der Geruch nach Essigsäureäthylester, welcher beim Erwärmen ihrer Salze mit einem Gemisch gleicher Volumina konzentrierter Schwefelsäure und Alkohol auftritt, sowie der Kakodylgeruch, der beim Erhitzen von trockenem Alkaliacetat mit Arsenigsäureanhydrid entsteht. Indessen verhalten sich andere Fettsäuren bei diesen Reaktionen ähnlich. Eine Entscheidung gibt die Analyse des Silbersalzes.

- Vorkommen. 67. Propionsäure C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub> soll sich im Schweiße, in der Galle und zuweilen auch im Mageninhalt finden. Sie entsteht leicht bei Gärungen von milchsaurem Kalk neben Essigsäure und Buttersäure, auch bei der Fäulnis von Asparaginsäure, Asparagin, d-Glucosamin.
- Bildung. Man stellt sie durch Kochen von Propionnitril mit Kalilauge, Oxydation von n-Propylalkohol oder durch Reduktion von Milchsäure dar.
- Eigenschaften. Die reine Propionsäure besitzt einen der Essigsäure ähnlichen Geruch. Schmelzpunkt und Siedepunkt s. § 64. Sie mischt sich in jedem Verhältnis mit Wasser, wird aber durch viel Chlorcalcium oder andere leicht lösliche Salze aus der Lösung als ölige Flüssigkeit abgeschieden. Ihre Salze sind gleichfalls denen der Essigsäure sehr ähnlich. Das Natronsalz ist leichter löslich in Wasser als das essigsäure Natron. Das basische Bleisalz, das sich in kaltem Wasser leicht löst, ist in kochendem Wasser fast unlöslich und unterscheidet sich dadurch von den Bleisalzen der Ameisensäure, Essigsäure, Buttersäure (Haberland<sup>1</sup>). Das Kalksalz krystallisiert mit 1 Mol. H<sub>2</sub>O, das erst bei 100° entweicht. Die Löslichkeit in Wasser nimmt mit steigender Temperatur bis zu 55° ab, dann zu. Bei 20° lösen 100 Tl. Wasser 39,85 Tl. (Lumsden). Das Barytsalz krystallisiert in charakteristischen rhombischen Formen, die zur Erkennung der Propionsäure dienen können.
- Chininsalz. (Fitz<sup>2</sup>). Das Chininsalz (Fp. 110—111°) löst sich in Tetrachlorkohlenstoff 1:450. Zur Trennung Bromphenacyl ester von Ameisensäure geeignet (Phelps u. Palmer). Bromphenacyl ester S. 61.

- Vorkommen. 68. Buttersäure C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>. Die normale Buttersäure wurde zuerst in der Butter entdeckt, in welcher sie an Glycerin gebunden ist und beim Ranzigwerden der Butter zum Teil frei wird; sie findet sich als Glycerinverbindung auch im Frauenmilchfett und ist außerdem im Schweiße, im Dickdarminhalt und den festen Exkrementen, zuweilen im Mageninhalt und Harne aufgefunden. Auch im Blute, Saft der Milz, in Ovarialcystenflüssigkeiten und Muskeln ist sie nachgewiesen. Ferner ist sie in dem braunen Saft, den die Laufkäfer von sich geben, enthalten. Auch in Pflanzen findet sie sich, frei, als Salz und Ester.
- Bildung. Sie entsteht reichlich beim Schmelzen von Eiweiß mit Kali, wenig beim Erhitzen von milchsaurem Kalk mit Natronkalk, ferner bei der Fäulnis von Proteinen, von Glutaminsäure und bei der Oxydation von Proteinen mit Braunstein und Schwefelsäure oder Chromsäure oder Calciumpermanganat, auch bei Oxydation von Leim mit Calciumpermanganat, bei der Gärung von Kohlenhydraten, bei der Oxydation von Fett mit Salpetersäure, bei der Autolyse der Leber, bei der Kalischmelze von Melanin (Salkowski<sup>3</sup>).

- Darstellung. Man stellt die Buttersäure durch Gärung von Kohlenhydraten mit Buttersäurebakterien bei Gegenwart von Calciumcarbonat, Fällung des gebildeten buttersauren Kalkes mit kohlensaurem

<sup>1</sup>) Zeitschr. f. analyt. Chem. Bd. 38, S. 217. 1899.

<sup>2</sup>) Ber. d. Dtsch. chem. Ges. Bd. 17, 1, S. 1191. 1884.

<sup>3</sup>) Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. Bd. 227, S. 121. 1920.

Natron, Eindampfen der Lösung und Destillation der konzentrierten Flüssigkeit mit verdünnter Schwefelsäure dar.

Sie ist in Wasser in jedem Verhältnisse löslich, ebenso in Alkohol oder Äther, besitzt einen ihr eigentümlichen, unangenehmen, durchdringenden Geruch (nach ranziger Butter). Schmelzpunkt und Siedepunkt s. § 64. Sie wird durch Chlorcalcium und ebenso durch manche andere Salze aus ihrer wässrigen Lösung ölartig abgeschieden. Die trockene ölige Säure vereinigt sich beim längeren Stehen mit Chlorcalcium zu einer festen krystallinischen Masse, ebenso wie manche andere ihr homologe Säure. Das Barytsalz krystallisiert aus heißer wässriger Lösung mit 2, aus kalter Lösung mit 4 Mol.  $H_2O$ , löst sich leichter in Wasser als das capronsaure Salz. Das Kalksalz mit 1 Mol.  $H_2O$  krystallisiert in zarten Nadeln, 100 Tl. Wasser lösen bei  $20^\circ$  18,20 Tl. Die Löslichkeit nimmt mit steigender Temperatur bis  $75^\circ$  ab, dann wieder etwas zu (Lumsden). Beim Erhitzen der kalt gesättigten Lösungen scheidet sich also etwas Salz ab (zur Erkennung der Buttersäure zu verwenden). Das Silbersalz wird aus konzentrierter wässriger Lösung eines Alkalisalzes durch Silbernitrat gefällt; es ist viel schwerer löslich als essigsäures Silber (1 Tl. in 200 Tl. Wasser von  $14^\circ$ ). Das Chininsalz (Fp.  $77,5^\circ$ ) scheidet sich aus seiner Lösung in Essigester auf Zusatz der 20fachen Menge Petroläther krystallinisch ab. Es löst sich in Tetrachlorkohlenstoff 1 : 25 und kann zur Trennung der Buttersäure von Ameisensäure und Essigsäure dienen (Phelps und Palmer). Buttersaures Guanidin liefert beim Erhitzen auf  $230^\circ$  buttersaures Guanamin, welches sich bei dieser Temperatur größtenteils verflüchtigt, in Wasser leichter löslich ist als isobuttersaures Guanamin und in rechtwinkligen Tafeln krystallisiert (Nencki<sup>1</sup>).

Beim Erhitzen einer Lösung von Buttersäure in Alkohol mit konzentrierter Schwefelsäure entsteht der charakteristische Ananasgeruch des Äthylesters. Bromphenacylester S. 61.

Von Chromsäure wird sie zu Kohlensäure und Essigsäure oxydiert, durch alkalische Permanganatlösung völlig verbrannt. Durch Wasserstoffsperoxyd entstehen aus Buttersäure Acetessigsäure, Aceton, Propylaldehyd, Acetaldehyd, Essigsäure, Ameisensäure, Kohlensäure (Dakin<sup>2</sup>).

Zum Nachweis kann man die Eigenschaft des Calciumsalzes, sich in heißem Wasser schwerer zu lösen als in kaltem, benutzen (doch verhalten sich die Calciumsalze anderer Fettsäuren ebenso), ferner den Ananasgeruch des Äthylesters. S. auch das bei Isobuttersäure Gesagte.

Isobuttersäure  $C_4H_8O_2$  findet sich in den Faeces sowie unter den Fäulnisprodukten der Proteine. In den Pflanzen findet sie sich als freie Säure, z. B. im Johannisbrot, und als Ester. Sie entsteht bei der Oxydation von Valin mit  $H_2O_2$ .

Sie wird aus Isopropylecyanid durch Kochen mit Kalilauge oder durch Oxydation von Isobutylalkohol erhalten.

Sie mischt sich nicht in allen Verhältnissen mit Wasser wie die n-Buttersäure, sondern erfordert dazu 5 Tl. bei  $20^\circ$  zur Lösung. Durch Eintragen von Calciumchlorid wird sie aus der wässrigen Lösung abgeschieden. Schmelzpunkt und Siedepunkt s. § 64. Das Calciumsalz krystallisiert bei Temperaturen unter  $62^\circ$  mit 5 Mol.  $H_2O$  aus, bei Temperaturen über  $80^\circ$  mit 1 Mol.  $H_2O$ . Die Löslichkeit nimmt bis  $62^\circ$  zu (bei dieser Temperatur lösen 100 Tl. Wasser 28,70 Tl. des krystallwasserfreien Salzes), bei Temperaturen bis  $100^\circ$  nur ganz wenig ab (guter Unterschied von der normalen Säure). Das Silbersalz ist leichter löslich in kaltem und heißem Wasser als das Salz der normalen Säure; es wird

<sup>1</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 9, 1, S. 228. 1876.

<sup>2</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 4, S. 77. 1908.

aus konzentrierter Lösung eines Alkalisalzes durch Silbernitrat erhalten. Iso-  
buttersaures Guanidin liefert beim Erhitzen auf 230° isobuttersaures Guanamin,  
welches in Wasser schwer löslich ist und in spitzen Rhomboedern krystallisiert  
(Nencki, Brieger<sup>1</sup>).

**Bromphenacyl ester.** Bromphenacyl ester S. 61.

**Oxydations-  
produkte.** Durch Chromsäure wird sie zu Aceton, Essigsäure und Kohlensäure oxydiert,  
durch alkalische Permanganatlösung zu Oxyisobuttersäure (Meyer<sup>2</sup>).

**Nachweis.** Dieses verschiedene Verhalten der beiden Buttersäuren gegen alkalische  
Permanganatlösung eignet sich zum Nachweis der Isobuttersäure neben  
Buttersäure besser als das verschiedene Verhalten der Kalksalze (s. Hutzler  
und Meyer<sup>3</sup>).

**Bildung.** 69. **n-Valeriansäure**  $C_5H_{10}O_2$ . Die normale Valeriansäure wurde von Skraup  
und Witt<sup>4</sup>) bei der Einwirkung von Bromlauge auf Casein erhalten. Sie scheint  
auch bei der Oxydation von (unreinem) Leucin aus Casein und Nackenband  
(Heckel<sup>5</sup>), Samec<sup>6</sup>) mit Kaliumpermanganat entstanden zu sein. Die bei  
der Einwirkung eines in den Ascariden enthaltenen Fermentes auf Kohlenhydrate  
auftretende Valeriansäure ist wahrscheinlich n-Valeriansäure (Weinland<sup>7</sup>).  
Sie wird aus milchsaurem Kalk durch Spaltpilze gebildet (Fitz<sup>8</sup>) und entsteht  
bei der Fäulnis des Eiweiß und des Prolin.

**Eigenschaften.** Der Buttersäure ähnlich riechende Flüssigkeit, die sich bei 16° in 27 Tl.  
**Ca salz.** Wasser löst. Schmelzpunkt und Siedepunkt s. § 64. Das Calciumsalz krystalli-  
siert immer mit 1 Mol.  $H_2O$ . Seine Löslichkeit in Wasser nimmt mit steigender  
Temperatur etwas ab, dann wieder zu. 100 Tl. Wasser lösen bei 0° 9,82 Tl.,  
bei 57° 7,75 Tl., bei 100° 8,78 Tl. (Lumsden).

**Bromphenacyl ester.** Bromphenacyl ester S. 61.

**Vorkommen u. Bildung.** **Isovaleriansäure**  $C_5H_{10}O_2$  ist gefunden im Tran von Delphinus globiceps,  
in Faeces von Menschen, bildet sich reichlich bei Fäulnis von Eiweißstoffen,  
von Leucin (neben Ammoniak und Kohlensäure), von d,l-Valin, bei der Oxy-  
dation von Eiweißstoffen und Leim mit Chromsäure, bei der Oxydation von  
Leucin mit  $H_2O_2$  bei Gegenwart von Ferrosulfat.

Man erhält sie aus Isobutylcarbinol durch Oxydation mit Chromsäure.

**Eigenschaften.** Sie ist in 26,6 Tl. Wasser bei 20° löslich und wird durch Salze aus dieser  
**Ca salz.** Lösung abgeschieden. Über Schmelzpunkt und Siedepunkt s. § 64. Das Calcium-  
salz krystallisiert aus kaltem Wasser mit 3 Mol.  $H_2O$  in dicken prismatischen  
Nadeln, aus heißem Wasser (oberhalb 46°) mit 1 Mol.  $H_2O$  in dünnen Platten.  
Die Löslichkeit nimmt mit steigender Temperatur ab. 100 Tl. Wasser lösen  
**Ba salz.** bei 20° 21,80 Tl. wasserfreies Salz (Lumsden). Auch das Bariumsalz ist in  
**Ag salz.** Wasser leichtlöslich und gut krystallisierbar. Das Silbersalz ist in Wasser sehr  
schwer löslich.

**Bromphenacyl ester.** Bromphenacyl ester S. 61.

**Vorkommen u. Bildung.** **d-Valeriansäure (d-Methyläthyllessigsäure)**  $C_5H_{10}O_2$  wurde von Neuberg  
und Rosenberg<sup>9</sup>) unter den Fäulnisprodukten von Casein und Leim nach-  
gewiesen, tritt auch bei der Fäulnis von d-Isoleucin auf. Sie entsteht auch bei

<sup>1</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 10, S. 1027. 1877.

<sup>2</sup>) Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 219, S. 240. 1883.

<sup>3</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 30, 3, S. 2519. 1897.

<sup>4</sup>) Monatshefte f. Chem. Bd. 28, S. 605. 1907.

<sup>5</sup>) Monatshefte f. Chem. Bd. 29, S. 15. 1908.

<sup>6</sup>) Monatshefte f. Chem. Bd. 29, S. 55. 1908.

<sup>7</sup>) Zeitschr. f. Biol. Bd. 42, S. 55. 1901 u. Bd. 43, S. 86. 1902.

<sup>8</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 13, 1, S. 1309. 1880 u. Bd. 14, 1, S. 1084. 1881.

<sup>9</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 7, S. 178. 1908. — Neuberg: Biochem. Zeitschr. Bd. 37,  
S. 501. 1911.



der Spaltung des Glykosides Convolvulin durch Erhitzen mit 0,5proz. Schwefelsäure (Taverne<sup>1</sup>).

Man erhält sie durch Oxydation von d-Amylalkohol mit Chromsäure (Marckwald<sup>2</sup>) und aus der synthetisch gewonnenen d,l-Methyläthyllessigsäure (nach Abscheidung eines Teiles der l-Säure als Brucinsalz) als Silbersalz durch fraktionierte Krystallisation (Marckwald<sup>3</sup>).

Siedepunkt s. § 64. Das Kalksalz krystallisiert bei 0° mit 5 Mol. H<sub>2</sub>O, bei 25° mit 3, bei 90° mit 1 Mol., und ist ebenso wie das Zinksalz in heißem Wasser schwerer löslich als in kaltem. Das Silbersalz scheidet sich beim Vermischen von sehr verdünnter heißer Lösung des Natriumsalzes und Silbernitrat langsam in federförmig gruppierten glänzenden Nadeln ab, wasserfrei. 100 ccm wässriger Lösung enthalten bei 20° 0,73 g Silbersalz, das Silbersalz der d,l-Säure ist löslicher.  $[\alpha]_D = +18,62^\circ$  (Marckwald),  $[\alpha]^D = +17,30^\circ$  (Taverne).

Zur Feststellung, um welche Valeriansäure es sich handelt, kann man den Krystallwassergehalt des bei 25° krystallisierten Kalksalzes benutzen (Neuberg<sup>4</sup>).

70. **Capronsäure C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub>**. Die normale Capronsäure findet sich in Kuh-, Schaf- und Frauenmilchfett als Glycerinverbindung, im Limburger Käse, in den Faeces, bildet sich oft sehr reichlich bei der bakteriellen Zersetzung, besonders aus Milchsäure oder Glycerin.

Sie ist in Wasser kaum löslich. Schmelzpunkt und Siedepunkt s. § 64. Der capronsaure Baryt krystallisiert wasserfrei in radial gestellten feinen Nadeln; 100 Tl. Wasser lösen bei 24° 10,2 Tl. des Salzes nach Wein, bei 18,5° 8,5 Tl. Salz nach Lieben und Rossi. In heißem Wasser viel reichlicher löslich. Das Calciumcapronat krystallisiert mit 1 Mol. H<sub>2</sub>O in dünnen glänzenden Krystallblättchen oder langen, verzweigten Nadeln, nicht leicht löslich in Wasser und in heißem ungefähr ebenso wie in kaltem Wasser, bei 20° lösen 100 Tl. Wasser 2,18 Tl. (Lumsden). Das Silbersalz bildet eine käsige Masse, fast unlöslich in kaltem, schwer löslich in heißem Wasser, aus heißer wässriger Lösung in kleinen Nadeln krystallisierend. Das Zinksalz löst sich in Wasser bei 24—25° zu 1% und ist schwerer löslich als die Zinksalze der Butter- und n-Valeriansäure.

Bromphenacylester S. 61.

**d-Capronsäure (d-β-Methyl-β-äthylpropionsäure) C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub>**. Eine rechtsdrehende Hexonsäure (wahrscheinlich ein Gemisch von Isobutylessigsäure und d-β-Methyl-β-äthylpropionsäure) wurde von Neuberg und Rosenberg<sup>5</sup>) unter den Fäulnisprodukten von Casein und Leim nachgewiesen und fast ganz reine d-Methyläthylpropionsäure von Neuberg<sup>6</sup>) unter den Fäulnisprodukten des d-Isoleucin.

Die d-β-Methyl-β-äthylpropionsäure wurde von v. Romburgh<sup>7</sup>) durch Oxydation des in römisch Kamillenöl enthaltenen d-Hexylalkohols mit Chromsäure gewonnen und von Neuberg und Rewald<sup>8</sup>) aus der synthetischen d,l-Säure mit Hilfe des Brucinsalzes.

Farblose Flüssigkeit von schwachem, an den der Capronsäure erinnernden Geruch. Siedepunkt s. § 64. Das Kalksalz krystallisiert in zu Bündeln vereinigten Nadeln und enthält 3 Mol. H<sub>2</sub>O, welche aber im Exsiccator entweichen. Das Silbersalz scheidet sich aus heißem Wasser in kleinen gekrümmten Nadeln ab. Es ist mehr als 4 mal so löslich in Wasser als das Silbersalz der racemischen Säure.  $[\alpha]_D = +8,92^\circ$  (v. Romburgh). l-Methyläthylpropionsäure  $[\alpha]_D = -8,98^\circ$  (Neuberg und Rewald).

<sup>1</sup>) Recueil des travaux chim. des Pays-Bas Bd. 13, S. 187. 1894.

<sup>2</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 37, 2, S. 1045. 1904.

<sup>3</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 32, 1, S. 1089. 1899.

<sup>4</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 37, S. 495. 1911.

<sup>5</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 7, S. 178. 1908. <sup>6</sup>) desgl. Bd. 37, S. 501. 1911.

<sup>7</sup>) Recueil des travaux chim. des Pays-Bas Bd. 5, S. 221. 1886.

<sup>8</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 9, S. 403. 1908.

- Vorkommen. 71. **Caprylsäure**  $C_8H_{16}O_2$ . In der Butter und im Frauenmilchfett als Glycerinverbindung enthalten, nach Lerch auch im Schweiß, ferner im Käse.
- $\begin{array}{l} CH_3 \\ | \\ (CH_2)_6 \\ | \\ COOH \end{array}$  Sie löst sich nur sehr wenig in Wasser. Schmelzpunkt und Siedepunkt § 64. Das Kalksalz krystallisiert mit 1 Mol.  $H_2O$ , bei  $20^\circ$  lösen 100 Tl. Wasser 0,31 Tl. (Lumsden). Das Barytsalz krystallisiert wasserfrei; es lösen sich bei  $10^\circ$  0,79 Tl. (Fehling), bei  $18^\circ$  0,76 Tl. (Wein), bei  $20^\circ$  0,62 Tl. des Salzes in 100 Tl. Wasser.
- Bromphenacyl ester. Bromphenacyl ester S. 61.
- $\begin{array}{l} CH_3 \\ | \\ (CH_2)_8 \\ | \\ COOH \end{array}$  72. **Caprinsäure**  $C_{10}H_{20}O_2$ . In der Butter, im Frauenmilchfett, auch in einem Lipom als Glycerinverbindung gefunden, kommt auch im Käse vor.
- Ba salz. Sie bildet feine Nadeln, 1 Tl. löst sich in etwa 1000 Tl. kochendem Wasser. Schmelzpunkt und Siedepunkt § 64. Das Barytsalz krystallisiert in fettglänzenden Blättchen, in kaltem Wasser kaum, in kochendem Alkohol oder Wasser etwas löslich. Das Calciumsalz ist etwas leichter löslich, aber schwerer als das Ag salz. der Caprylsäure. Das Silbersalz, aus der Lösung von Ammoniumcaprinat gefällt, stellt einen weißen, in heißem Wasser sehr wenig, in heißem Alkohol reichlicher löslichen, in kaltem Wasser unlöslichen Niederschlag dar.
- Bromphenacyl ester. Bromphenacyl ester S. 61.
- Vorkommen. 73. **Laurinsäure**  $C_{12}H_{24}O_2$ , **Myristinsäure**  $C_{14}H_{28}O_2$ . Diese Säuren finden sich in geringen Mengen, wie es scheint, im Walrat, in der Butter (nach Siegfeld<sup>1</sup>) ist Myristinsäure neben Ölsäure wohl der Hauptbestandteil des Butterfettes), im Frauenmilchfett, im Leberfett, vielleicht auch in den übrigen Fetten als Glycerinverbindungen. Myristinsäure wurde auch im verseiften Fett des Chylus (Erben<sup>2</sup>), des Gehirns, der Dermoidcysten, im verseiften Wollfett der Schafe (Darmstaedter und Lifschütz<sup>3</sup>) (von Röhmann<sup>4</sup>) nicht bestätigt) und im verseiften Dorschleberöl (Bull<sup>5</sup>) und Heringsöl nachgewiesen und auch aus der Rindergalle (Lassar - Cohn<sup>6</sup>) erhalten.
- Eigenschaften. Beide sind fest, die Laurinsäure ist in heißem Wasser noch ein wenig löslich, die Myristinsäure nicht mehr. Schmelzpunkt und Siedepunkt § 64. Die Laurinsäure läßt sich noch mit Wasserdämpfen destillieren, die Myristinsäure nur noch in Spuren. Die Bariumsalze sind in Wasser und Alkohol sehr wenig löslich. Das Lithiumsalz der Laurinsäure ist etwa 5 mal so löslich in Wasser bei  $16-50^\circ$  (0,15—0,28%) als das Lithiumsalz der Myristinsäure (und die Löslichkeit der Lithiumsalze von Palmitin- und Stearinsäure ist noch geringer), was zur Trennung der Laurinsäure von Myristinsäure, Palmitin- und Stearinsäure benutzt werden kann (Jacobson und Holmes<sup>7</sup>). Das Magnesiumsalz der Myristinsäure ist etwa 5 mal so löslich in absolutem Alkohol bei  $15$  und  $25^\circ$  als das Magnesiumsalz der Palmitinsäure, was zur Trennung der Myristinsäure von Palmitin- und Stearinsäure benutzt werden kann (Jacobson und Holmes).
- Über die Löslichkeit einer ganzen Reihe von Salzen dieser beiden Säuren in verschiedenen Lösungsmitteln s. bei Jacobson und Holmes.
- Aus dem verseiften Ätherextrakt der Bürzeldrüse von Gänsen erhielt Röhmann<sup>8</sup>) ein Fettsäuregemisch, dessen Zusammensetzung, Siedepunkt usw. zu der Annahme stimmte, daß ein Gemisch von Laurin- und Myristinsäure vorlag. Indessen unterschied es sich insofern, als es bei Zimmertemperatur flüssig war und optisch aktiv. Für die Acetonlösung  $[\alpha]_D = -25,9$  bis  $26,3^\circ$ . Die Bariumsalze waren in Alkohol, die Blei- und Silbersalze in Äther löslich.
- <sup>1</sup>) Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. Bd. 24, S. 453. 1912.  
<sup>2</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 30, S. 436. 1900.  
<sup>3</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 29, 1, S. 618. 1896.  
<sup>4</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 77, S. 298. 1916.  
<sup>5</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 39, 4, S. 3570. 1906.  
<sup>6</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 17, S. 67. 1893.  
<sup>7</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 25, S. 29 u. 55. 1916.  
<sup>8</sup>) Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 5, S. 110. 1904.

74. **Palmitinsäure**  $C_{16}H_{32}O_2$ , **Stearinsäure**  $C_{18}H_{36}O_2$ . Das im Unterhautbindegewebe sowie an anderen Orten des menschlichen Körpers und bei Tieren abgelagerte Fett enthält außer Ölsäure hauptsächlich Palmitinsäure und Stearinsäure in ihren Glycerinverbindungen, ebenso sind beide reichlich in der Butter (nach Siegfeld fehlt Stearinsäure in der Butter oder ist nur in geringer Menge vorhanden), im Frauenmilchfett in Verbindung mit Glycerin, im Walrat in Verbindung mit Cetylalkohol enthalten, in den Lecithinen und anderen Phosphatiden in Verbindung mit Glycerinphosphorsäure, im Wollfett in Verbindung mit Cholesterinen, in der Galle in Verbindung mit Desoxycholsäure als Choleinsäure (Wieland und Sorge<sup>1</sup>). Palmitinsäure kommt reichlich im Bienenwachs an Myricylalkohol gebunden vor. Auch pathologische Fettbildungen enthalten beide. In Verbindung mit Kalk finden sich beide Säuren in den Faeces und im Leichenfette (Adipocire), wahrscheinlich in Verbindung mit Natron im Blutserum und den Transsudaten, auch im Eiter und im normalen Menschenharn (Hybbinette<sup>2</sup>) in ganz geringer Menge. Stearinsaurer Kalk wurde auch einmal als hauptsächlichster Bestandteil eines menschlichen Gallensteines gefunden (Fouquet<sup>3</sup>), die freie Säure in kleinen Mengen in Rindergallensteinen (H. Fischer und Meyer<sup>4</sup>). Im freien Zustande treten sie in zersetztem Eiter, zerfallenen käsigen Tuberkelmassen auf.

Beide Säuren sind geruch- und geschmacklose krystallinische Massen. Der Schmelzpunkt der Palmitinsäure liegt bei  $62,6^\circ$  (nach Levene und West bei  $63-64^\circ$ ), der der Stearinsäure bei  $69,2^\circ$ . Nach den Bestimmungen von Heintz zeigen die Gemische beider Säuren folgende Schmelz- und Erstarrungspunkte:

Ein Gemisch von

Stearinsäure	Palmitinsäure	schmilzt bei	erstarrt bei
90	10	$67,2^\circ$	$62,5^\circ$
80	20	$65,3^\circ$	$60,3^\circ$
70	30	$62,9^\circ$	$59,3^\circ$
60	40	$60,3^\circ$	$56,5^\circ$
50	50	$56,6^\circ$	$55,0^\circ$
40	60	$56,3^\circ$	$54,5^\circ$
30	70	$55,1^\circ$	$54,0^\circ$
20	80	$57,5^\circ$	$53,8^\circ$
10	90	$60,1^\circ$	$54,5^\circ$

Die Mischung gleicher Teile beider Säuren krystallisiert am schönsten großblättrig, die reinen Säuren bilden dagegen schuppig-krystallinische perlmutterglänzende Massen, die bei der mikroskopischen Untersuchung als dünne, rhombische, biegsame Blättchen sich ergeben. Sie machen auf Papier Fettflecke, sind in Wasser ganz unlöslich, in kaltem Alkohol lösen sie sich schwer, die Stearinsäure noch schwerer als die Palmitinsäure. In kochendem Alkohol lösen sie sich. Sehr leicht sind sie löslich in Äther, Chloroform, Petroläther; auch Eisessig löst sie reichlich, besonders in der Wärme. Durch Wasser werden sie aus der Lösung in Eisessig oder Alkohol abgeschieden. Von Alkalien werden sie aufgelöst, und kocht man sie mit wässriger Lösung kohlenaurer Alkalien und dampft das Gemenge zur Trockne ab, so treiben sie die Kohlensäure aus und bilden Salze. Diese Alkalisalze sind in Wasser sehr leicht löslich, werden aber durch Zusatz von viel Wasser in Alkali und saures palmitinsaures oder saures stearinsaures Alkali zerlegt, welche seidenartig glänzende, krystallinische, sich schwer absetzende Niederschläge bilden. Das palmitinsaure und stearinsaure

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 97, S. 1. 1916.

<sup>2</sup>) Skandinav. Arch. f. Physiol. Bd. 7, S. 380. 1897.

<sup>3</sup>) Ref. Malys Jahresber. d. Tierchem. 1896, S. 470.

<sup>4</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 76, S. 95. 1911/12.

Kali und Natron sind wesentliche Bestandteile der gewöhnlichen Seifen. Sie werden aus ihrer wässerigen Lösung durch Eintragen von Salzen, z. B. Kochsalz, ausgeschieden. In heißem Alkohol sind diese Alkalisalze ziemlich leicht löslich, scheiden sich aber aus der konzentrierten Lösung beim Erkalten teilweise gallertartig aus; die Gallerte wandelt sich allmählich in Krystalle um. Die Verbindungen der Palmitinsäure und der Stearinsäure mit alkalischen Erden oder mit Schwermetallen sind in Wasser und Alkohol unlöslich. Die Bleisalze sind in heißem Benzol löslich, in kaltem so gut wie unlöslich, ebenso in Äther. Die Silbersalze scheiden sich ab, wenn man eine ammoniakalische Lösung, welche Fettsäure und Silbernitrat enthält, mit Wasser verdünnt. Die unlöslichen Salze zersetzen sich beim Waschen mit Wasser, am wenigsten ist das bei den Silbersalzen der Fall, weshalb diese sich für die Analyse besonders eignen.

Über die Löslichkeit einer ganzen Reihe von Salzen dieser beiden Säuren in verschiedenen Lösungsmitteln s. Jacobson und Holmes. Methylester der Palmitinsäure Fp. 29,5°, der Stearinsäure Fp. 38°, Äthylester der Palmitinsäure Fp. 24,2°, der Stearinsäure Fp. 33,7°.

**Bromphenacyl-ester.** Bromphenacyl-ester S. 61.

**Trennung.** Fügt man zu einer siedend heißen Lösung eines Gemisches von stearin- und palmitinsäurem Natrium in Alkohol in kleinen Portionen eine heiße gesättigte Lösung von essigsäurem Baryt, so fällt zuerst nur stearinsäurer Baryt aus, später ein Gemenge von stearin- und palmitinsäurem Salz und zuletzt reiner palmitinsäurer Baryt. Man erhält aus den Salzen die Säure, indem man sie in Wasser zerteilt, mit Salzsäure und dann mit Äther übergießt, gut schüttelt, den Äther abgießt, mit etwas Wasser wäscht und abdestilliert, es bleiben die reinen Säuren zurück.

**Heptadekansäure**  $C_{17}H_{34}O_2$ . Säuren dieser Zusammensetzung sollen nach Ebert<sup>1)</sup> im Leichenwachs, nach Kreis und Hafner<sup>2)</sup> im Schweineschmalz, nach Klimont, Meisl und Mayer<sup>3)</sup> im Pferde- und Gänsefett enthalten sein. Indessen sind jedenfalls die Säure aus Schweinefett nach Holde<sup>4)</sup> und Bömer<sup>5)</sup> und die Säure aus Pferdefett nach Heiduschka und Steinruck<sup>6)</sup> nicht einheitlich, sondern Gemische von Säuren mit paarer Atomzahl und für die anderen dürfte dasselbe der Fall sein.

**Arachinsäure**  $C_{20}H_{40}O_2$  \*), zuerst aus dem Erdnußöl dargestellt, ist von Heintz in der verseiften Butter gefunden und durch fraktionierte Fällung isoliert. Sie wurde auch aus dem verseiften Fett der Dermoidcysten gewonnen (v. Zeynek<sup>7)</sup>). In kaltem Alkohol sehr schwer-, in heißem leicht lösliche glänzende Blättchen. Fp. 77°, Methylester Fp. 54,5°, Äthylester Fp. 50°.

**Vorkommen.** 75. **Lignocerinsäure**  $C_{24}H_{48}O_2$ . Zuerst aus dem Paraffin des Buchenholzteers von Hell und Hermanns<sup>8)</sup> dargestellt, findet sie sich als Glycerinester auch im Erdnußöl (Kreiling<sup>9)</sup>), ferner im Torfboden (Schreiner und Shorey<sup>10)</sup>), in dem Öl der Samen von *Maluba pansa* (Wagner und Muesmann<sup>11)</sup>), im

\*) Nach Ehrenstein und Stuewer<sup>12)</sup> hat die Arachinsäure die Formel  $C_{22}H_{44}O_2$  und eine verzweigte Struktur und ist identisch mit der von Meyer, Brod und Soyka durch Abbau der Lignocerinsäure erhaltenen sog. Isobehensäure (Anmerkung bei der Korrektur).

<sup>1)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 8, 1, S. 775. 1875. <sup>2)</sup> desgl. Bd. 36, 3, S. 2766. 1903.

<sup>3)</sup> Monatshefte f. Chem. Bd. 35, S. 1115. 1914 u. Bd. 36, S. 281. 1915.

<sup>4)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 38, 1, S. 1250. 1905.

<sup>5)</sup> Zeitschr. f. Unters. d. Nahr. u. Genußm. Bd. 25, S. 321. 1913.

<sup>6)</sup> Journ. f. prakt. Chem. N. F. Bd. 102, S. 241. 1921.

<sup>7)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 23, S. 40. 1897.

<sup>8)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 13, I, S. 1713. 1880. <sup>9)</sup> desgl. Bd. 21, I, S. 880. 1888.

<sup>10)</sup> Journ. of the Americ. chem. soc. Bd. 32, S. 1674. 1910.

<sup>11)</sup> Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. Bd. 27, S. 124. 1914.

<sup>12)</sup> Journ. f. prakt. Chem. N. F. Bd. 105, S. 199. 1923.

faulen Eichenholz (Sullivan<sup>1</sup>) unter den Spaltungsprodukten des Kerasins (Thierfelder<sup>2</sup>), Levene<sup>3</sup>) und des Sphingomyelins (Levene<sup>4</sup>).

Sie krystallisiert aus Alkohol in Nadeln, aus Petroläther in dichten körnigen Krystallen; sie löst sich auch in Benzol, Schwefelkohlenstoff, Eisessig, Chloroform in der Wärme, um beim Erkalten wieder auszukrystallisieren. Fp. 80—81°. Bleisalz leichtlöslich in heißem Benzol, beim Erkalten gallertartig sich abscheidend, in absolutem Alkohol wenig, in Äther gar nicht löslich. Fp. 117°. Methylester Fp. 57—57,5°; Äthylester Fp. 56°. Beide Ester krystallisieren aus Petroläther in fettglänzenden, spießigen Blättchen, leicht in Chloroform und Schwefelkohlenstoff, etwas weniger in Äther, ziemlich schwer in Alkohol löslich. Sie läßt sich in Cerebronsäure überführen (Levene und Taylor<sup>5</sup>).

Nach Brigl und Fuchs<sup>6</sup>) ist die Lignocerinsäure (aus Buchenholztee) ein Gemenge von zwei Säuren, deren Schmelzpunkt 11° auseinander liegt. Die höher schmelzende ist identisch mit der synthetisch aus der Behensäure von Meyer, Brod und Soyka<sup>7</sup>) und von Brigl<sup>8</sup>) dargestellten n-Tetrakoransäure. Fp. 85°. Der Methylester (Fp. 60°) ist in den meisten organischen Lösungsmitteln schwer, der Phenylester (Fp. 69°) leichter löslich. Die niedriger schmelzende Säure hat dieselbe Zusammensetzung, scheinbar auch normale Struktur und ist vielleicht eine Modifikation der n-Tetrakorsäure (s. darüber bei Brigl und Fuchs).

**Carnaubasäure**  $C_{24}H_{48}O_2$  wurde von Stürcke<sup>9</sup>) aus Carnaubawachs gewonnen, von Meyer und Eckert<sup>10</sup>) aus Kaffeebohnenöl. Fp. 74°. Fp. des Bleisalzes 99—110°. Weitere Untersuchungen fehlen. Darmstädter und Lifschütz<sup>11</sup>) wollen diese Säure auch im verseiften Wollfett gefunden haben, indessen handelt es sich hier nach Röhm ann<sup>12</sup>) um ein Gemenge aus Cerotinsäure und kohlenstoffärmeren Fettsäuren.

**Hyänenasäure**  $C_{25}H_{50}O_2$  ist eine Fettsäure von Carius<sup>13</sup>) genannt, die er in der Fettmasse an den Analdrüsen einer Hyäne neben Palmitinsäure und Ölsäure an Glycerin gebunden fand und die von Schulze<sup>14</sup>) in Verbindung mit Cholesterin im Fett der Schafwolle nachgewiesen wurde. Sie ist schwerlöslich in kaltem, leichtlöslich in heißem Alkohol, scheidet sich beim Erkalten der heißen alkoholischen Lösung in Körnern mikroskopischer Nadeln aus. Fp. 77—78°. In den meisten Eigenschaften stimmt sie mit der Stearinsäure überein. Von den anderen Säuren wurde sie durch fraktionierte Fällung getrennt. Vergleiche indessen Holde<sup>15</sup>), welcher die Individualität der Hyänenasäure bezweifelt.

**Cerotinsäure**  $C_{26}H_{52}O_2$  findet sich als freie Säure und als Cerylester in reichlicher Menge im Bienenwachs, an Cerylalkohol gebunden im chinesischen Wachs. Auch aus verseiftem Wollfett ist sie erhalten worden (Röhm ann<sup>16</sup>). Sie scheidet sich beim Erkalten ihrer heißen alkoholischen Lösung krystallinisch aus. Fp. 78,5°. (Nach Gascard<sup>17</sup>) schmilzt die Säure aus chinesischem Wachs bei 82—82,5° und ist von der aus Bienenwachs verschieden.)

<sup>1</sup>) Journ. of ind. a. engin. chem. Bd. 8, S. 1027; ref. Chem. Zentralbl. 1918, I, S. 632.

<sup>2</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 85, S. 35. 1913.

<sup>3</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 15, S. 359. 1913.

<sup>4</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 15, S. 153. 1913.

<sup>5</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 52, S. 227. 1922

<sup>6</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 119, S. 280. 1922.

<sup>7</sup>) Monatshefte f. Chem. Bd. 34, S. 1113. 1913.

<sup>8</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 95, S. 161. 1915. S. auch Brigl u. Fuchs.

<sup>9</sup>) Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 223, S. 306. 1884.

<sup>10</sup>) Monatshefte f. Chem. Bd. 31, S. 1228. 1910.

<sup>11</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 29, I, S. 618. 1896.

<sup>12</sup>) Ref. Zentralbl. f. Physiol. Bd. 19, S. 317. 1906; Biochem. Zeitschr. Bd. 77, S. 298. 1916.

<sup>13</sup>) Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 129, S. 168. 1864.

<sup>14</sup>) Journ. f. prakt. Chem. N. F. Bd. 7, S. 162. 1873 u. Bd. 9, S. 321. 1874. Journ. f. Landwirtschaft 1879, S. 125.

<sup>15</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 38, I, S. 1258. 1905.

<sup>16</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 77, S. 298. 1916.

<sup>17</sup>) Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. Bd. 170, S. 1326; ref. Chem. Zentralbl. 1920. Bd. 3, S. 420.

**Psyllostearylsäure (Psyllasäure)**  $C_{33}H_{66}O_2$  findet sich im Psyllawachs in Verbindung mit Psyllastearylalkohol und wurde aus den Verseifungsprodukten isoliert (Sundwik<sup>1</sup>). Sie krystallisiert in viereckigen rautenförmigen Blättern mit Winkeln von je  $74^\circ$  und  $106^\circ$ , ist auch in heißem Äther und Petroläther schwer löslich. Fp.  $94-95^\circ$ . Alle Salze sind unlöslich. (S. hierzu auch die Bemerkungen von Holde, S. 71, Fußnote 15.)

#### Säuren der Reihe $C_nH_{2n-2}O_2$ .

Sie addieren Wasserstoff, Halogene, verändern sich an der Luft. Die Veränderungen zeigen sich unter anderem in Dunklerwerden, Abnahme der Jodzahl (§ 93) und teilweisem Unlöslichwerden in Petroläther. Sie werden ebenso wie die ungesättigten Säuren der anderen Reihen hauptsächlich durch ihr Additionsvermögen und ihr Verhalten bei der Oxydation charakterisiert.

**Säure  $C_{14}H_{26}O_2$**  wurde aus Spermöl und Delphintran erhalten. Sie gab bei der Hydrierung Myristinsäure, bei der Oxydation Dioxymyristinsäure (Tsuji<sup>2</sup>).

**Säure  $C_{16}H_{30}O_2$** . Säuren dieser Zusammensetzung wurden aus verseiftem Dorschleberöl (Bull<sup>3</sup>), aus verseiftem Pottwalfett (Hofstädter<sup>4</sup>) (Physetölsäure), aus verseiftem Seehundsfett (Ljubarsky<sup>5</sup>), aus verseiftem Heringsöl (Bonnievie Svendsen<sup>6</sup>) gewonnen.

**Vorkommen.** **76. Oleinsäure (Ölsäure)  $C_{18}H_{34}O_2$** . Die Ölsäure findet sich gebunden an Glycerin in allen Fetten des tierischen Körpers, auch in der Butter, hier besonders reichlich (Siegfeld<sup>7</sup>), und im Frauenmilchfett, ferner in Lecithinen und anderen Phosphatiden. Im freien Zustande oder als Alkalisalz kommt sie im Darminhalte vor, an anderen Orten höchstens in Spuren. Aus Galle wurde sie erhalten (Lassar-Cohn<sup>8</sup>) und in sehr geringer Menge aus normalem Menschenharn (Hybbinette<sup>9</sup>).

**Eigenschaften.** Die reine Ölsäure bildet bei gewöhnlicher Temperatur eine farb-, geschmack- und geruchlose ölige Flüssigkeit, die, wenn sie vorher bei niedriger Temperatur krystallinisch erstarrt ist, bei  $14^\circ$  schmilzt. Siedepunkt s. § 64. Sie ist unlöslich in Wasser, löslich in kaltem Alkohol, Äther oder Chloroform. Im Wasserdampfstrom von  $250^\circ$  destilliert die Ölsäure unzersetzt über. Die destillierte Säure verändert sich nur sehr langsam, die nichtdestillierte schnell an der Luft unter Sauerstoffaufnahme und Bildung der sauren Substanzen, welche im alten Fette den ranzigen Geruch und Geschmack bewirken. Die alkoholische Lösung reagiert neutral. Sie verbindet sich direkt mit Brom und Jod, Jodzahl 89,93. Die Verbindungen der Ölsäure mit Alkali sind löslich in Wasser oder Alkohol, nichtlöslich in konzentrierter Alkalilauge oder Salzlösungen. Sie werden aus ihrer wässerigen Lösung durch Eintragen von Salz, z. B. Kochsalz, ausgeschieden. Die Natronverbindung ist bei gewöhnlicher Temperatur nicht zerfließlich, wohl aber die Kaliverbindung; auf dieser Verschiedenheit der Eigenschaften beruht die Verschiedenheit der Kali- und Natronseifen. Die wässrige Lösung der Alkaliverbindungen wird durch essigsäures Blei gefällt; der weiße, zähe Niederschlag, ölsaures Blei, welcher die zähe, klebrige Beschaffenheit der Bleipflaster bedingt, ist löslich in Äther und in Benzol, weniger in Alkohol, unlöslich in Wasser. Ölsaures Calcium ist in Äther und Alkohol löslich. Ölsaures Barium, welches aus einer ammoniakalischen Lösung der Ölsäure durch Bariumchlorid ausgefällt wird, ist in Wasser unlöslich, wird aus Alkohol krystallisiert erhalten.

Na-, K salz.

Pb salz.

Ca salz.

Ba salz.

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 32, S. 355. 1901 u. Bd. 54, S. 255. 1907/08.

<sup>2</sup>) Chem. Zentralbl. 1923, I, S. 1371.

<sup>3</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 39, 4, S. 3570. 1906.

<sup>4</sup>) Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 91, S. 177. 1854.

<sup>5</sup>) Journ. f. prakt. Chem. N. F. Bd. 57, S. 19. 1898.

<sup>6</sup>) Malys Jahresber. d. Tierchem. 1916, S. 33.

<sup>7</sup>) Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. Bd. 24, S. 453. 1912.

<sup>8</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 17, S. 67. 1893.

<sup>9</sup>) Skandinav. Arch. f. Physiol. Bd. 7, S. 380. 1897.

Es löst sich, auch beim Erwärmen, nur in Spuren in Benzol, wohl aber beim Erwärmen in 5% 95proz. Alkohol enthaltendem Benzol, um sich beim Erkalten in silberglänzenden Nadeln oder Blättchen fast quantitativ abzuscheiden (Unterschied von den Bariumsalzen der noch mehr ungesättigten Säuren) (Farnsteiner<sup>1)</sup>); in Äther ist es fast unlöslich. Zinksalz äußerst schwer löslich in Alkohol (Erdmann<sup>2</sup>).

Durch salpetrige Säure wird die Ölsäure bald fest und krystallinisch unter Bildung der ihr isomeren, bei 44,4° (corr) schmelzenden Elaidinsäure. Mit Kalihydrat zum Schmelzen vorsichtig erhitzt, zerlegt sich Ölsäure in Palmitinsäure und Essigsäure. Mit Jodwasserstoff und rotem Phosphor auf 210° erhitzt, wird sie zu Stearinsäure reduziert, ebenso auch durch Wasserstoff bei Gegenwart eines Katalysators, z. B. feinverteiltem Nickel, Platinmoor oder kolloid. Palladium. Bei der Oxydation mit Permanganat in alkalischer Lösung entsteht neben Pelargon- und Azelainsäure Dioxystearinsäure, unlöslich in kaltem und heißem Wasser, schwerlöslich in Äther und kaltem Alkohol. Letztere krystallisiert aus Alkohol in perlmutterglänzenden Blättchen. Fp. 136,5° (von anderen wird 130—131° angegeben). Ihr Bariumsalz ist in Wasser unlöslich. Bei der Bromierung entsteht Ölsäuredibromid (Dibromstearinsäure), löslich in Äther, Petroläther, Eisessig.

Zum Nachweis dient die Löslichkeit des Bleisalzes in Äther und Benzol, das Erstarren beim Abkühlen auf 4°, die Jodzahl, die rotviolette Farbe, welche auftritt, wenn man Ölsäure mit ein wenig Rohrzucker und konzentrierter Schwefelsäure zusammenbringt. Als ungesättigte Verbindung entfärbt sie in ätherischer Lösung beim Schütteln Bromwasser und eine soda-alkalische Lösung von Permanganat unter gleichzeitiger Abscheidung von Braunstein.

Probe von Lifschütz<sup>3)</sup>: Versetzt man 1 Tropfen Ölsäure, in 3—4 ccm Eisessig gelöst, mit 1 Tropfen 10proz. möglichst wasserarmer Chromsäurelösung in Eisessig und vermischt mit 10—12 Tropfen konzentrierter Schwefelsäure, so verblaßt die grüne Farbe schnell und es tritt eine violette bis kirschrote auf. Bei der spektroskopischen Untersuchung sieht man ein ziemlich tief dunkles breites Absorptionsband im Grünen, dicht an Blau, ein schmäleres näher dem Gelb, und ein noch schwächeres und schmäleres zwischen Orange und Gelb. Die Gegenwart auch großer Mengen gesättigter Fettsäuren beeinträchtigt die Reaktion nicht, sie tritt auch mit Olein auf.

Elaidinsäureprobe: Gießt man etwas Ölsäure in einige Kubikzentimeter gesättigte Natriumnitritlösung und fügt wenig verdünnte Schwefelsäure hinzu, so entsteht nach einiger Zeit aus flüssiger Ölsäure feste Elaidinsäure.

Eine mit der gewöhnlichen Ölsäure isomere, welche die doppelte Bindung an anderer Stelle enthält, findet sich nach Hartley<sup>4)</sup> im Leber-, Herz- und Nierenfett. S. dazu auch Reinger<sup>5)</sup>. Eine weitere Isomere kommt nach Grey<sup>6)</sup> vielleicht im Gehirn vor.

Gadoleinsäure  $C_{20}H_{38}O_2$  von Bull<sup>7)</sup> aus verseiftem Dorschleberöl, Heringsöl und Waltran erhalten. Fp. 24,5°. Bleisalz in Äther schwer löslich. Das saure und neutrale Kalisalz in kaltem Alkohol recht schwer löslich. Jodzahl 80,3. Durch Einwirkung von salpetriger Säure entsteht aus ihr die isomere Gadelaidinsäure. Fp. 49° (Bonnievie Svendsen<sup>8)</sup>).

Erucasäure  $C_{22}H_{42}O_2$ , welche als Glycerid in verschiedenen pflanzlichen Ölen vorkommt und aus Rüböl leicht erhalten werden kann, wurde von Bull<sup>7)</sup> aus verseiftem Dorschleberöl und

1) Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. Bd. 2, S. 1. 1899 u. Bd. 6, S. 161. 1903.

2) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 74, S. 179. 1911. 3) desgl. Bd. 56, S. 446. 1908.

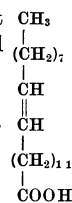
4) Journ. of physiol. Bd. 38, S. 353. 1909.

5) Ber. d. dtsh. pharmaz. Ges. B. 32 S. 124; ref. Chem. Zentralbl. 1922, III, S. 127.

6) Biochem. Journ. Bd. 7, S. 148; ref. Chem. Zentralbl. 1913, II, S. 1811.

7) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 39, 3, S. 3570. 1906. — Ellmer, Inaug.-Diss., philos. Fak. Freiburg 1909.

8) Malys Jahresber. d. Tierchem. 1916, S. 33.



von Bonnevie Svendsen aus verseiftem Heringsöl erhalten; krystallisiert aus Alkohol in Nadeln. Fp. 34°. Kp. 254,5° (bei 10 mm). Das Bleisalz ist in kaltem Äther sehr schwer, in warmem leicht löslich, das neutrale und das saure Kalisalz nur wenig in kaltem Alkohol löslich. Jodzahl 75,06.

**Säuren der Reihen**  $C_nH_{2n-4}O_2$ ,  $C_nH_{2n-6}O_2$ ,  $C_nH_{2n-8}O_2$ ,  $C_nH_{2n-10}O_2$ ,  $C_nH_{2n-12}O_2$ .

Sie addieren Wasserstoff, Halogene und verändern sich sehr leicht an der Luft. Die meisten sind bis jetzt wohl kaum rein dargestellt worden. Man hat sie in vielen Fällen nicht direkt aus den verseiften Fetten isolieren können, sondern in Form ihrer Oxydations- und Bromsubstitutionsprodukte. Aus den Bromprodukten wurden die Säuren durch Reduktion mit Zink und Salzsäure erhalten.

Vorkommen. 77. **Linolsäure (Leinölsäure)**  $C_{18}H_{32}O_2$ . Die Linolsäure, zuerst von Sack aus Leinöl gewonnen und von Peters<sup>1)</sup> in ihrer richtigen Zusammensetzung erkannt, läßt sich auch aus Mohnöl, Hanföl und anderen trocknenden Ölen nach dem Verseifen erhalten (Hazura<sup>2)</sup>. Auch im Eigelblecithin (Cousin<sup>3)</sup>, Levene und Rolf<sup>4)</sup> und im Gehirnkephalin (Cousin<sup>5)</sup>, Parnaß<sup>6)</sup> finden sich Säuren dieser Zusammensetzung (Kephalinsäure). Sie scheinen auch im Fett von Wels, Stör, grauem und weißem Hasen, kaspischem Seehund (Kurbatow<sup>7)</sup> und in verseiftem Schweinefett und Rindertalg (Farnsteiner<sup>8)</sup>, Fahriou<sup>9)</sup> und vielleicht auch unter den bei der Verseifung von Leber-, Nieren- und Herzmuskelfett erhaltenen Fettsäuren (Hartley<sup>10)</sup> vorzukommen.

Die reinste Linolsäure ist wohl die aus verseiftem Mohnöl von Rollet<sup>11)</sup> über das Tetrabromid und den Methylester dargestellte (Jodzahl 179 statt 181,22) und die von Riehm<sup>12)</sup> ebenfalls über das Tetrabromid gewonnene. In ihr liegt ein Gemenge von zwei Stereoisomeren ( $\alpha$ - und  $\beta$ -Linolsäure) vor; welche nach Erdmann<sup>13)</sup> auch beide im Leinöl vorkommen.

Eigenschaften.	CH <sub>3</sub>   (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>   CH    CH	Die aus trocknenden Ölen gewonnene Linolsäure ist ein in der Kälte nicht erstarrendes Öl, löslich in Alkohol und Äther. Unzersetzt nur im Vakuum von weniger als 4 mm siedend. Die Alkalisalze sind in Wasser löslich. Das Bariumsalz ist in Alkohol, Äther, Benzol, Petroläther löslich (Farnsteiner) und unterscheidet sich dadurch von den Bariumsalzen der Öl-, Palmitin- und Stearinsäure.
Alkalisalze.	CH <sub>2</sub>	Das Bleisalz ist in Äther und Benzol löslich, Zinksalz in Alkohol schwerlöslich (viel schwerer als das $\alpha$ -linolensaure und leichter als das ölsaure Zink) (Erdmann <sup>13)</sup> . Methylester, Öl, Kp <sub>18</sub> 207—208°, Jodzahl 172,3 (statt 172,8) (Rollet).
Ba salz.	CH	
Pb salz.	CH   (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub>   COOH	Bei der Reduktion entsteht Stearinsäure (Peters), bei der Oxydation mit Permanganat in alkalischer Lösung zwei stereoisomere Tetraoxystearinsäuren von denen die eine bei 170°, die andere bei 153° schmilzt (Hazura). Bei der Einwirkung von Brom entstehen 2 Tetrabromide (Tetrabromstearinsäure). Von ihnen ist das $\beta$ -Linolsäuretetrabromid flüssig, das $\alpha$ -Tetrabromid krystallisiert. Es schmilzt bei 114—115° (nach Erdmann bei 111°), ist sehr leicht in Alkohol, Äther, Eisessig löslich (Unterschied von $\alpha$ -Linolensäurehexabromid), wenig löslich
Zn salz.		
Methylester.		
Reduktion und Oxydation.		
Bromierung.		

<sup>1)</sup> Monatshefte f. Chem. Bd. 7, S. 552. 1886. — Reformatzky: Journ. f. prakt. Chem. N. F. Bd. 41, S. 529. 1890.

<sup>2)</sup> Monatshefte f. Chem. Bd. 7, S. 637. 1886; Bd. 8, S. 147, 156 u. 260. 1887; Bd. 9, S. 180 u. 469. 1888. Zeitschr. f. angew. Chem. 1888, S. 312 u. 696.

<sup>3)</sup> Journ. de pharmacie et de chim. [6], B. 18, S. 102. 1903.

<sup>4)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 51, S. 507. 1922.

<sup>5)</sup> Journ. de pharmacie et de chim. [6], Bd. 24, S. 101. 1906.

<sup>6)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 22, S. 411. 1909.

<sup>7)</sup> Ref. Malys Jahresber. d. Tierchem. 1892, S. 32.

<sup>8)</sup> Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. Bd. 2, S. 1. 1899 u. Bd. 6, S. 161. 1903.

<sup>9)</sup> Chemiker-Zeit. Bd. 17, S. 610. 1893.

<sup>10)</sup> Journ. of physiol. Bd. 36, S. 17. 1908 u. Bd. 38, S. 353. 1909.

<sup>11)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 62, S. 410. 1909.

<sup>12)</sup> Inaug.-Diss. philos. Fak. Halle 1914.

<sup>13)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 74, S. 179. 1911.



in Petroläther (Unterschied von Ölsäuredibromid). Beim Erhitzen mit Zink und Salzsäure in alkoholischer Lösung geht es in Linolsäure über.

78. **Linolensäuren**  $C_{18}H_{30}O_2$ . Eine Säure von dieser Zusammensetzung wurde von Hazura<sup>1)</sup> zuerst als in den trocknenden Ölsäuren enthalten erkannt und kommt wahrscheinlich auch unter den bei der Verseifung von Leber-, Nieren-, Herzmuskel (Hartley), Fischtranen (Jecocerinsäure<sup>2)</sup>, Lecithin und anderen Phosphatiden entstehenden Produkten vor.

Die im Leinöl enthaltene Linolensäure wurde zuerst von Erdmann<sup>3)</sup> rein dargestellt und als  $\alpha$ -Linolensäure bezeichnet. Er versetzte das aus dem verseiften Leinöl erhaltene Fettsäuregemenge mit dem gleichen Volumen Petroläther (unter 60° siedend), kühlte auf -18° ab, filtrierte unter Druck in einer Kühlkammer die festen Fettsäuren ab, destillierte aus dem Filtrat den Petroläther unter vermindertem Druck ab und zerrieb den aus Leinölsäuren bestehenden Rückstand mit überschüssigem frisch gefälltem basischem Zinkcarbonat. Die Masse wurde mit Alkohol (auf 376 g l l) durch kurzes Aufkochen extrahiert, nach 20 Minuten langem Stehen in kaltem Wasser abgesaugt. Aus dem Filtrat schied sich nach Abdestillation des Alkohols auf Zusatz von verdünnter Schwefelsäure die  $\alpha$ -Linolensäure ab. Die Trennung beruht auf der leichten Löslichkeit des  $\alpha$ -linolensäuren Zinks in Alkohol, in dem das linolensäure Zink bedeutend schwerer und das ölsäure Zink äußerst schwer löslich ist.

$\alpha$ -Linolensäure, wasserhelles Öl, löslich in Alkohol, sehr leicht in Äther, auch in Petroläther, aus der 10fachen Menge Petroläther bei starker Abkühlung sich abscheidend; viel leichter veränderlich als Ölsäure und nur unter äußerst niedrigem Druck unzersetzt destillierbar. Jodzahl 269—278 (statt 273,8). Zinksalz s. oben bei Darstellung, Ammoniumsalz in Alkohol leicht löslich, Bariumsalz in Alkohol zu 0,728%, in Chloroform zu 1,77% löslich.

Beim Versetzen ihrer Lösung in Eisessig in einer Kältemischung mit Brom fällt Hexabromid (Hexabromstearinsäure)  $C_{18}H_{30}Br_6O_2$  krystallisiert aus (Unterschied von Linolsäuretetrabromid und Ölsäuredibromid, welche dabei in Lösung bleiben). In Äther sehr schwer löslich. Schmelzpunkt bei vorsichtigem Erhitzen 179°. Die Umwandlung in das Hexabromid ist quantitativ. Durch Kochen des Hexabromides mit Alkohol und geraspelttem Zink erhält man ein Gemenge von  $\alpha$ -Linolensäure und der ihr stereoisomeren  $\beta$ -Linolensäure, welche letztere beim Bromieren ein flüssiges Tetrabromid  $C_{18}H_{30}Br_4O_2$  gibt.  $\alpha$ - und  $\beta$ -Linolensäure verhalten sich zueinander wie Ölsäure und Elaidinsäure (Erdmann, Bedford und Raspe<sup>4)</sup>). Durch Wasserstoff mit Hilfe von frisch reduziertem Nickel wird  $\alpha$ -Linolensäure quantitativ in Stearinsäure übergeführt. Bei der Oxydation mit alkalischer Kaliumpermanganatlösung entsteht eine Hexaoxystearinsäure (Hazura<sup>5)</sup>).

$\gamma$ -Linolensäure erhielten Heiduschka und Lüft<sup>6)</sup> bei der Bromierung der ungesättigten Fettsäuren aus dem Oenotheraöl als in Äther und Eisessig unlösliches Hexabromid  $C_{18}H_{30}O_2Br_6$  vom Fp. 195—196°. Diese Linolensäure gibt bei der Oxydation mit Permanganat eine Hexaoxystearinsäure vom Fp. 245° (unter Zersetzung).

**Clupanodonsäure**  $C_{18}H_{28}O_2$ \*) wurde als ätherunlösliches Octobromid aus japanischem Sardinentrans, Herings- und Waltran und Schildkrötenöl isoliert und aus diesem durch Reduktion

\*) Durch Fraktionierung der Methylester der hoch ungesättigten Säuren des japanischen Sardinentrans erhielt Tsujimoto in neuen Untersuchungen reine Clupanodonsäure, der er auf Grund ihrer Hydrierung zu Behensäure die Formel  $C_{22}H_{34}O_2$  gibt. Jodzahl 390, Methylester Kp<sub>5</sub> 222° (Chem. Zentralbl. 1923, I, S. 38).

<sup>1)</sup> Monatshefte f. Chem. Bd. 8, S. 260. 1887.

<sup>2)</sup> Fahrion: Chem. Zentralbl. 1917, I, S. 925.

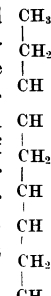
<sup>3)</sup> E. Erdmann: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 74, S. 179. 1911. — Erdmann u. Bedford: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 42, I, S. 1324. 1909 u. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 69, S. 76. 1910. S. auch Rollet: desgl. Bd. 62, S. 422. 1909 u. Bd. 70, S. 404. 1910/11.

<sup>4)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 42, I, S. 1334. 1909.

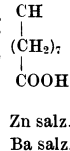
<sup>5)</sup> Monatshefte f. Chem. Bd. 8, S. 156. 1887 u. Bd. 9, S. 180. 1888.

<sup>6)</sup> Arch. d. Pharmazie Bd. 257, S. 33. 1919.

Vorkommen.



Eigenschaften.



Bromierung.

Reduktion.

Oxydation.

mit Zink in alkoholischer Suspension erhalten (Tsujimoto<sup>1</sup>). Leichtflüssiges Öl von Fischgeruch. Jodzahl 365—370. Sie findet sich auch im verseiften Heringsöl (Bonnie Svendsen<sup>2</sup>), Grimme<sup>3</sup>) und im Knochenöl von Landtieren (Marcusson und Böttger<sup>4</sup>). Da bei der Hydrierung mit Wasserstoff und kolloidalem Palladium neben Stearinsäure noch niedriger schmelzende Produkte entstehen, scheint sie nicht einheitlich zu sein (Riedel<sup>5</sup>). Eine Säure derselben Zusammensetzung (Therapinsäure) wurde als Octobromid aus verseiftem Lebertran gewonnen (Heyerdahl, Ellmer<sup>6</sup>). Auch bei der Verseifung von Schweineleber scheint eine sehr stark ungesättigte Säure frei zu werden (Hartley).

79. **Arachidonsäure**  $C_{20}H_{32}O_2$ . Auf das Vorkommen einer Säure dieser Zusammensetzung in den Phosphatiden der Schweineleber schließt Hartley<sup>7</sup>) daraus, daß er bei der Bromierung der durch Verseifung der Phosphatide erhaltenen Fettsäuren eine Octobromarachinsäure  $C_{20}H_{32}O_2Br_8$  und bei der Oxydation eine Octooxyarachinsäure (F. 195°) erhielt. Zu demselben Resultat kam Levene bei der Untersuchung des Lecithin aus Rinderleber<sup>8</sup>), Eigelb<sup>9</sup>), Gehirn<sup>10</sup>) und des Kephalin aus Gehirn<sup>11</sup>). Octobromarachinsäure, Fp. 245° unter Zersetzung, in Äther unlöslich. Die aus ihr durch Reduktion in methylalkoholischer Lösung mit Zink und Salzsäuregas erhaltene Säure hatte die Jodzahl 305 (statt 335 für  $C_{20}H_{32}O_2$ ) und ließ sich in alkoholischer Lösung mit Wasserstoff nach Paal zu  $C_{20}H_{40}O_2$  reduzieren (Levene und Simms).

Säuren  $C_{20}H_{30}O_2$ ,  $C_{21}H_{32}O_2$ ,  $C_{22}H_{34}O_2$  scheinen im verseiften Heringsöl vorhanden (Bonnie Svendsen). Siehe auch Brown u. Beal<sup>12</sup>), welche das Maifischöl untersuchten.

*Abscheidung und Trennung der niederen Fettsäuren bis zur Caprinsäure.*

Abscheidung.

80. Die flüchtigen Fettsäuren von niedrigerem Molekulargewicht (§§ 65—72) lassen sich durch Destillation im Wasserdampfstrom oder durch Vakuumdestillation (s. unten) von den nichtflüchtigen Körpern trennen. Harn oder Schweiß kann man ohne weiteres mit verdünnter Phosphorsäure versetzt zum Zweck dieser Trennung der Destillation unterwerfen; allerdings können dabei im Harn durch Einwirkung der Säure auf gewisse Stoffe flüchtige Fettsäuren gebildet werden (Buligin<sup>13</sup>), auch kann es sich ereignen, daß Benzoesäure aus dem Harn in das Destillat übergeht, welche dann besonders die Gruppe der Capron-, Capryl-, Caprinsäure verunreinigen würde, wenn Glieder derselben vorhanden sind. Seröse Flüssigkeiten, die frei von Blutfarbstoff sind, werden am einfachsten mit dem mindestens 3fachen Volumen Alkohol kalt gefällt, filtriert, das Filtrat nötigenfalls nach Zusatz von etwas kohlen-saurem Natron durch Abdestillieren des Alkohols konzentriert, dann auf dem Wasserbade auf ein kleines Volumen verdunstet und der Rückstand nach Zusatz von verdünnter Phosphorsäure destilliert. Blut sowie bluthaltige Organe können erst dann auf flüchtige Säuren geprüft werden, nachdem nicht allein die Eiweißstoffe gefällt sind, sondern auch der Blutfarbstoff unzersetzt abgeschieden ist. Es würde sich dies auf zwei Wegen erreichen lassen, entweder kann man nach Mischung des Blutes mit verdünnter Lösung von schwefelsaurem Natron resp. nach Extraktion der zerkleinerten Organe mit einer solchen Lösung die Blutkörperchen sich senken lassen, die abgossene blutfarbstofffreie oder doch wenigstens blutfarbstoffarme Lösung eindampfen und nach Abfiltrieren der

<sup>1</sup>) Chem. Zentralbl. 1909, I, S. 1491 u. 1616; 1913, I, S. 1150.

<sup>2</sup>) Malys Jahresber. d. Tierchem. 1916, S. 33. <sup>3</sup>) Chem. Zentralbl. 1921, II, S. 706.

<sup>4</sup>) Chem. Zentralbl. 1914, II, S. 845. <sup>5</sup>) desgl. 1914, I, S. 1882.

<sup>6</sup>) Inaug.-Diss. philos. Fak. Freiburg 1909.

<sup>7</sup>) Journ. of physiol. Bd. 38, S. 353. 1909.

<sup>8</sup>) Levene u. Simms: Journ. of biol. chem. Bd. 51, S. 285. 1922.

<sup>9</sup>) Levene u. Rolf: Journ. of biol. chem. Bd. 51, S. 507. 1922. <sup>10</sup>) desgl. Bd. 54, S. 99. 1922.

<sup>11</sup>) Levene u. Rolf: Journ. of biol. chem. Bd. 54, S. 91. 1922.

<sup>12</sup>) Journ. of the Americ. chem. soc. Bd. 45, S. 1289; ref. Chem. Zentralbl. 1923, Bd. III, S. 632.

<sup>13</sup>) Med.-chem. Untersuchungen, herausgeg. von Hoppe-Seyler, Heft 2, S. 240. 1867.

Eiweißstoffe mit verdünnter Phosphorsäure destillieren, oder das Blut bzw. die zerkleinerten Organe mit möglichst kaltem Alkohol schnell gut zusammenrühren unter Einsetzen in eine Kältemischung, kalt filtrieren und das Filtrat, wie es oben für seröse Flüssigkeiten angegeben ist, weiter behandeln. Faeces extrahiert man zunächst mit Alkohol, filtriert, neutralisiert mit kohlensaurem Natron, dampft zur Trockne ab und destilliert den Rückstand in Wasser verteilt mit verdünnter Phosphorsäure. Man setzt in allen Fällen die Destillation so lange fort, bis das Destillat nicht mehr sauer reagiert\*).

Die zuerst von Welde<sup>1)</sup> für die Isolierung der flüchtigen Fettsäuren empfohlene **Vakuumdampfdestillation** (Temperatur des Wasserbades 60°, 10—15 mm B.) hat verschiedene Vorteile: Sie ist in viel kürzerer Zeit beendet; Milchsäure, welche bei der Destillation mit Wasserdampf bei 100° mit überdestilliert, geht nur in Spuren über; die Gefahr der Bildung von flüchtigen Fettsäuren durch Zersetzung etwa anwesender Eiweißstoffe, Fette und Kohlenhydrate ist sehr viel geringer, wenn auch vielleicht nicht ganz ausgeschlossen<sup>2)</sup>, so daß es sich empfehlen dürfte, solche Stoffe zunächst durch Alkoholbehandlung (s. oben) möglichst zu entfernen. Andererseits werden bei der Vakuumdestillation höhere Glieder der Fettsäurereihe mit übergehen.

Das auf die eine oder andere Weise erhaltene Destillat übersättigt man mit Natriumcarbonat, dampft auf dem Wasserbad ein, säuert mit Phosphorsäure an und schüttelt mit Äther aus. Der Äther wird mit Glaubersalz getrocknet und verdunstet. Von dem Rückstand prüft man eine ganz kleine Probe nach Sättigen mit Ammoniak durch Kochen mit Silbernitrat auf Ameisensäure (Reduktion von Silber). Der Hauptteil wird, wenn es seine Menge erlaubt (anderenfalls s. unten), der fraktionierten Destillation unterworfen, wobei das längere Beharren einer Siedetemperatur sofort zu erkennen gibt, welche Säuren hauptsächlich vorhanden sind (s. die Tabelle § 64, welche die Siedepunkte der Säuren enthält). Die Valeriansäure- und Capronsäurefraktion ist zu polarisieren, um auf d-Valerian- und d-Caprinsäure zu prüfen. Die einzelnen Fraktionen werden (evtl. nach nochmaliger Fraktionierung) mit Ammoniak übersättigt und nach Entfernung des überschüssigen Ammoniaks durch Eindampfen in hinreichend konzentrierter Lösung fraktioniert mit Silbernitrat gefällt. Die einzelnen Fällungen werden abfiltriert, mit Wasser, Alkohol und Äther gewaschen. Den ganzen Niederschlag oder einen Teil trocknet man in einem gewogenen Porzellantiegel im Vakuumexsiccator bei 40—50° bis zum konstanten Gewicht, glüht vorsichtig, wägt und berechnet den Prozentgehalt an Silber. Man erfährt so, welche Säuren vorliegen. Ameisensäure enthält 70,56%, Essigsäure 64,64%, Propionsäure 59,63%, Buttersäure 55,35%, Valeriansäure 51,63%, Capronsäure 48,38% Silber.

Reicht die Menge des Ätherrückstandes für eine fraktionierte Destillation nicht aus, so löst man ihn in Wasser, macht mit Ammoniak alkalisch, entfernt das überschüssige Ammoniak durch Eindampfen und fällt fraktioniert mit Silbernitrat.

Für die Trennung und Bestimmung der einzelnen Fettsäuren in einer Gesamtmenge der Fettsäuren von nur etwa 0,05—0,3 g mit Hilfe der Silberfällung haben Edelstein und v. Csonka<sup>3)</sup> genaue Vorschriften gegeben.

\*) Es ist zu beachten, daß bei der Wasserdampfdestillation immer etwas Phosphorsäure in das Destillat geht. Um das zu vermeiden, schaltet man zwischen Destillierkolben und Kühler ein mit Glasperlen gefülltes und im Wasserbad erwärmtes Kölbchen (Dampfwäscher) ein. S. darüber Heuser<sup>4)</sup>.

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 28, S. 504. 1910.

<sup>2)</sup> S. dazu McCaughey: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 72, S. 140, 1911 u. Edelstein u. Welde: desgl. Bd. 73, S. 152, 1911.

<sup>3)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 42, S. 372. 1912. <sup>4)</sup> Chemiker-Zeit. Bd. 39, S. 57. 1915.

Weitere Trennungs-  
verfahren.

Weiter sind noch folgende Verfahren zur Trennung einzelner Säuren voneinander angegeben worden.

Trennung der Ameisen- und Essigsäure von den übrigen Fettsäuren. Man sättigt die wässrige Lösung der freien Säuren im Scheidetrichter mit reinem Chlorcalcium und trennt die wässrige Schicht, welche Ameisensäure und Essigsäure enthält, von der öligen, welche die höheren Fettsäuren enthält, ab. Ist die Menge der Öltropfen sehr gering, so filtriert man sie durch ein mit Chlorcalciumlösung getränktes Papier.

Trennung der Essig- von der Ameisensäure. Man kocht die Lösung, welche beide Säuren enthält, mit dem gleichen Volumen einer Lösung von Kaliumchromat in verdünnter Schwefelsäure (12 g Kaliumbichromat gelöst in einer Mischung von 30 ccm konz. Schwefelsäure und 100 ccm Wasser) 10 Minuten am Rückflußkühler. Die Ameisensäure wird zerstört, die unveränderte Essigsäure abdestilliert (Macnair<sup>1</sup>).

Trennung der Ameisen- und Essigsäure von der Buttersäure. Sie beruht darauf, daß buttersaures Chinin in Tetrachlorkohlenstoff viel leichter löslich ist als ameisensaures und essigsäures Chinin (Phelps und Palmer<sup>2</sup>).

Trennung der Ameisen-, Essig-, Propion- und Buttersäure voneinander. Der Rückstand der mit Bleioxyd eingeeigneten Flüssigkeit wird in kaltem Wasser gelöst und zum Kochen erhitzt, das ausgeschiedene basisch propionsaure Blei abfiltriert, das Filtrat nach Entfernung des Blei durch Schwefelsäure mit Zinkoxyd zur Trockne verdampft, der Rückstand nach zweistündigem Trocknen bei 150° mit absolutem Alkohol behandelt. Dabei bleiben ameisensaures und schwefelsaures Zink ungelöst. Durch Destillation mit Phosphorsäure im Dampfströme erhält man die Ameisensäure. Die alkoholische Lösung des essigsäuren und buttersäuren Zinks wird zur Trockne verdampft, der Rückstand mit Phosphorsäure versetzt und im Dampfströme destilliert. Die übergegangenen Säuren (Essig- und Buttersäure) trennt man auf Grund der verschiedenen Löslichkeit ihrer Silbersalze oder auf andere Weise (Haberland<sup>3</sup>).

Trennung der Essig- von der Isovaleriansäure. Man kocht die im Vakuum getrockneten Natriumsalze wenige Minuten am Rückflußkühler mit einer Mischung von 99,5% Aceton und 0,5% Wasser. Das isovaleriansaure Natrium geht in Lösung, das essigsäure nicht (Chapman<sup>4</sup>).

Trennung der Essig-, Butter- und Capronsäure voneinander. Bei der Destillation der wässrigen Lösung dieser drei Säuren unter zeitweiligem Ersatz des verdunsteten Wassers geht zuerst Capronsäure, dann Buttersäure und zuletzt Essigsäure über (Fitz<sup>5</sup>).

Trennung der Essig- von der Buttersäure. Sie kann mit Hilfe der verschiedenen Löslichkeit ihrer Silbersalze geschehen, dann auch durch fraktionierte Destillation ihrer Amylester. Dazu kocht man die Silbersalze in einem Kölbchen mit 96proz. Alkohol und der etwa 10fachen Menge Amylchlorid  $\frac{3}{4}$  Stunde am Rückflußkühler und destilliert fraktioniert. Nachdem bis 100° Alkohol und überschüssiges Amylchlorid übergegangen, destilliert zwischen 135 und 138° das Amylacetat, zwischen 175 und 177,5° das Amylbutyrat (Haberland<sup>6</sup>).

Trennung der Capron-, Capryl- und Caprinsäure voneinander. Sie kann durch fraktionierte Krystallisation der Barytsalze versucht werden.

Trennung durch Destillation. Aciditätsbestimmungen der bei der Dampfdestillation eines Säuregemisches erhaltenen einzelnen Fraktionen zur Erkennung der vorhandenen Säuren zu benutzen, ist neuerdings wieder von Dyer<sup>7</sup>) empfohlen worden. Das Verfahren versagt aber, wenn es sich um mehr als zwei Säuren handelt (Wolf und Teifer<sup>8</sup>).

Bestimmung der  
Ameisensäure.

Bestimmung der Ameisensäure. Eine abgemessene Menge des neutralisierten Destillates, welches nicht mehr als 0,5 g Ameisensäure im Liter enthalten soll, wird mit einigen Tropfen verdünnter Salzsäure schwach angesäuert und mit einer Lösung<sup>9</sup>), welche in einem Liter 200 g Sublimat, 300 g (ameisensäurefreies!) Natriumacetat und 80 g Kochsalz enthält (diese Lösung im Anfang nicht ganz klar, läßt sich aber nach 2 Tagen von einem farblosen Niederschlag klar abgießen) in einem mit Steigrohr versehenen Kolben, der in ein Wasserbad versenkt ist, wenigstens 2 Stunden gekocht. Das nach der Gleichung  $\text{HCOOH} + 2 \text{HgCl}_2 = \text{CO}_2 + 2 \text{HCl} + 2 \text{HgCl}$  gebildete Calomel filtriert man durch gewogenen Goochtiiegel, wäscht mit warmem Wasser, Alkohol und Äther, trocknet 1 Stunde bei 95–100° und wägt. 1 g Calomel = 0,0977 g Ameisensäure. Siehe auch § 589.

<sup>1</sup>) Ref. Zeitschr. f. analyt. Chem. Bd. 27, S. 398. 1888.

<sup>2</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 29, S. 199; ref. Chem. Zentralbl. 1917, II, S. 776.

<sup>3</sup>) Zeitschr. f. analyt. Chem. Bd. 38, S. 223. 1899.

<sup>4</sup>) The Analyst Bd. 24, S. 114; Ref. Chem. Zentralbl. 1899, I, S. 1298.

<sup>5</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 11, 1, S. 46. 1878.

<sup>6</sup>) Zeitschr. f. analyt. Chem. Bd. 38, S. 223. 1899.

<sup>7</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 28, S. 445; Chem. Zentralbl. 1917, I, S. 1143.

<sup>8</sup>) Biochem. journ. Bd. 11, S. 197; Chem. Zentralbl. 1918, II, S. 56.

<sup>9</sup>) Franzen u. Egger: Journ. f. prakt. Chem. N. F. Bd. 83, S. 323. 1911. — Fincke: Biochem. Zeitschr. Bd. 51, S. 253. 1913. — Auerbach u. Zeglin: Zeitschr. f. physik. Chem. Bd. 103, S. 161. 1923.

**Abscheidung und Trennung der höheren Fettsäuren.**

81. Bei der Destillation wässriger Flüssigkeiten mit Phosphorsäure geht von den höheren Fettsäuren (§ 73 ff) nur die Laurinsäure in geringer Menge über. Da diese Säuren aber in Wasser und verdünnter Säure unlöslich, in Äther leicht löslich sind, so lassen sie sich bequem vom größten Teile der mit ihnen in tierischen Flüssigkeiten und Geweben zusammen auftretenden Stoffe trennen. Man extrahiert entweder, wenn man auf die freien Säuren untersuchen will, die hinreichend konzentrierten Flüssigkeiten, breiigen Massen oder fein pulverisierten, festen Stoffe mit Äther, läßt einige Zeit stehen und gießt dann die Ätherlösung ab, oder man fügt, wenn man auf die an Basen gebundenen Säuren prüfen will, zunächst verdünnte Schwefelsäure zu der zu untersuchenden Masse und extrahiert nun mit Äther usw. Die klare Ätherlösung schüttelt man im Scheidetrichter mit etwas Natronlauge, läßt die Lauge ab, schüttelt sie nochmals mit etwas Äther, um Fett zu entfernen, und erwärmt auf dem Wasserbad zur Entfernung des gelösten Äthers. Jetzt leitet man Kohlensäure ein, dampft zur Trockne, extrahiert den Rückstand mit heißem Alkohol, filtriert, dampft ein, löst den Rückstand in heißem Wasser und erhält so eine wässrige Lösung der Natriumsalze.

**Trennung der gesättigten und ungesättigten Säuren.** Eine gewisse Trennung erreicht man durch Umkrystallisieren der freien Säuren aus Aceton, aus dem sich beim Erkalten die gesättigten Säuren abscheiden, während die ungesättigten in Lösung bleiben. Bessere Resultate geben die folgenden Verfahren, welche auf der verschiedenen Löslichkeit der Bleisalze beruhen.

a) Nach Farnsteiner<sup>1)</sup>. Man fällt die heiße Lösung der Natriumsalze mit heißer Bleizuckerlösung, filtriert nach dem Abkühlen die Bleisalze ab, wäscht mit Wasser aus, spritzt den Niederschlag in den Kolben, in welchem die Fällung vorgenommen wurde, mit Wasser zurück und bringt ihn durch Einstellung des Kolbens in ein siedendes Wasserbad zum Schmelzen. Nach Abgießen des Wassers und vollständiger Entfernung des anhängenden Wassers durch Abtupfen mit Filtrierpapier löst man den Niederschlag in warmem Benzol, läßt bei Zimmertemperatur eine Zeitlang stehen und kühlt dann auf 8—12° ab. Nach 2 Stunden wird abfiltriert und der Rückstand noch 2 mal in derselben Weise mit Benzol behandelt. Man erhält auf diese Weise einen in Benzol unlöslichen Rückstand und 3 Benzollösungen, welche vereinigt werden, und hat eine wenn auch keineswegs quantitative Trennung der gesättigten Fettsäuren (Palmitinsäure, Stearinsäure usw.), deren Bleisalze in kaltem Benzol unlöslich sind, von den ungesättigten Fettsäuren (Ölsäure usw.), deren Bleisalze in kaltem Benzol löslich sind, erreicht. Der in Benzol unlösliche Rückstand (Bleisalze der gesättigten Fettsäuren) wird in heißem Benzol gelöst und mit dem gleichen Volumen 10proz. Salzsäure am Rückflußkühler bis zur völligen Zersetzung der Bleisalze gekocht. Die abgetrennte und mehrfach mit Wasser geschüttelte Benzollösung wird durch ein lockeres Wattefilter filtriert und das Benzol abdestilliert (gesättigte Fettsäuren). Die vereinigten Benzollösungen (Bleisalze der ungesättigten Fettsäuren) werden entsprechend behandelt (ungesättigte Fettsäuren).

b) Nach Varrentrapp. Statt mit Benzol kann man die Trennung der Fettsäuren als Bleisalze in gesättigte und ungesättigte nach Varrentrapp mit Hilfe von Äther, in dem die Bleisalze der gesättigten Fettsäuren unlöslich, die

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. Bd. 1, S. 390. 1898. — Jaekle: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 36, S. 53. 1902.

der ungesättigten löslich sind, bewirken. Eine quantitative Trennung erreicht man aber auch mit diesem Verfahren nicht. Es empfiehlt sich, in diesem Falle die ätherische Lösung der freien Fettsäuren mit alkoholischer Bleiacetatlösung zu fällen und diese nur bis zum Aufhören der Fällung zuzusetzen, also nur die gesättigten Säuren in die Bleisalze zu verwandeln (Heiduschka und Steinruck<sup>1</sup>). Der Niederschlag, welcher sich rasch absetzt, ohne an der Wandung zu kleben, wird abfiltriert, gewaschen und mit 20 proz. Salzsäure zerlegt, die ätherische Lösung der freien Säuren durch Schütteln mit Wasser von Salzsäure befreit und verdunstet: es hinterbleiben die gesättigten Fettsäuren. Das ätherisch-alkoholische Filtrat wird im Scheidetrichter mit Salzsäure zerlegt und nach Abtrennung der Salzsäure mit Wasser gewaschen. Nach Abdestillieren des Äthers im Wasserstoffstrom hinterbleiben die ungesättigten Fettsäuren.

Andere Trennungs-  
verfahren.

Es sind noch eine ganze Reihe anderer Verfahren zur Trennung der gesättigten von den ungesättigten Säuren angegeben und empfohlen worden, ohne indessen bei Nachprüfungen sich bewährt zu haben. Es ist zur Zeit kein für diese Zwecke brauchbares Verfahren bekannt. Da indessen in dem einen oder anderen Falle die eine oder andere Methode von Nutzen sein kann, so sollen sie hier wenn auch nicht genauer beschrieben, so doch kurz erwähnt werden.

Nach Partheil und Férié<sup>2</sup>). Sie beruht darauf, daß die Lithiumsalze der höheren gesättigten Fettsäuren, speziell der Palmitin- und Stearinsäure, aber auch der Myristinsäure aus warmem 50 proz. Alkohol mehr oder weniger vollständig ausfallen, während die Lithiumsalze der ungesättigten Säuren und der Laurinsäure in Lösung bleiben. S. dazu die Kritik von Farnsteiner<sup>3</sup>), Fahrion<sup>4</sup>) Jacobson und Holmes<sup>5</sup>).

Nach Facchini und Dorta<sup>6</sup>). Sie beruht darauf, daß Palmitin- und Stearinsäure in 1% petrolätherischer Lösung bei gewöhnlicher Temperatur nur wenig, bei Abkühlen auf 0° oder eine noch niedrigere Temperatur kaum löslich sind, sich also beim Abkühlen der warmen Lösung abscheiden, während Laurinsäure und die ungesättigten Fettsäuren in Lösung bleiben, ferner darauf, daß beim Abkühlen ihrer 1proz. Lösung in 10% Wasser enthaltenden Aceton die Kalisalze, der höheren gesättigten Fettsäuren auskrystallisieren (und zwar stearinsaures Kali zuerst, später palmitinsaures Kali), während myristinsaures Kali und die Kalisalze der ungesättigten Säuren in Lösung bleiben.

Nach Falciola<sup>7</sup>). Sie beruht auf der verschiedenen Löslichkeit der Ammoniumsalze in absolutem Alkohol. Bei 0° lösen sich in 100 ccm ammoniakalischem absolutem Alkohol je 0,1 g Stearat, 0,5 g Palmitat, 31 g Oleat und mehr als 35 g Linoleat. Man löst das Fettsäuregemisch in wenig warmem Äther, leitet Ammoniak in die Lösung, kühlt ab, verjagt den Äther fast völlig und behandelt bei 0° mit der etwa vierfachen Menge ammoniakalischem Alkohol, schüttelt, saugt ab und wäscht mit möglichst wenig kaltem, absolutem Alkohol. Aus dem Filtrat erhält man durch Zersetzung mit Salzsäure die ungesättigten, aus dem Filtrückstand die gesättigten Fettsäuren. Indessen ändern sich die Löslichkeitsverhältnisse der Ammonsalze der gesättigten Fettsäuren durch die Gegenwart der ungesättigten, so daß die Resultate besser sind, wenn die ersteren überwiegen.

Nach David<sup>8</sup>). Sie beruht darauf, daß in einem großen Überschuß von wässrigem Ammoniak bei 14° die Ammoniumsalze der gesättigten Fettsäuren ganz unlöslich, die der ungesättigten löslich sind.

1) Journ. f. prakt. Chem. N. F. Bd. 102, S. 244. 1921.

2) Arch. d. Pharmazie Bd. 241, S. 545. 1903.

3) Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. Bd. 8, S. 129. 1904.

4) Zeitschr. f. angew. Chem. Bd. 17, 2, S. 1482. 1904.

5) Journ. of biol. chem. Bd. 25, S. 55. 1916.

6) Boll. d. chim. e di farm. Bd. 49, S. 237; ref. Chem. Zentralbl. 1910, II, S. 597 u. Chem. Rev. f. Fett- u. Harzind. Bd. 19, S. 77; ref. Chem. Zentralbl. 1912, I, S. 1507. S. auch de Waele: Chem. Zentralbl. 1915, I, S. 509.

7) Gazz. chim. ital. Bd. 40, 2, S. 217 u. 425; ref. Chem. Zentralbl. 1911, I, S. 382 u. 804.

8) Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 151, S. 756. 1910; Chem. Zentralbl. 1911, I, S. 41.

Nach Grün und Janko<sup>1)</sup>. Sie beruht darauf, daß die Siedepunkte der Ester einerseits der gesättigten Fettsäuren und andererseits der Bromadditionsprodukte der ungesättigten Fettsäuren so weit auseinander liegen, daß sich Gemische durch Destillation, am besten bei 2—4 mm, leicht trennen lassen.

**Trennung der gesättigten Fettsäuren voneinander.** Über die Beimengung von ungesättigten Fettsäuren erhält man Aufschluß durch die Bestimmung der Jodzahl (§ 93). Gesättigte Fettsäuren addieren kein Jod. Anhaltspunkte für die Feststellung der vorliegenden Säuren geben weiter Schmelzpunkt und Titration. Zur Prüfung des Schmelzpunktes erwärmt man zum Schmelzen, saugt etwas von dem Öl in ein Capillarrohr, läßt es wieder fest werden und verfährt nach § 24. Man ermittle außer dem Schmelzpunkt auch den Erstarrungspunkt und vergleiche die erhaltenen Zahlen mit den in der Tabelle (§ 64) aufgeführten. Die Titration wird mit einer abgewogenen Menge in alkoholischer Lösung unter Benutzung von Phenolphthalein mit  $\frac{n}{10}$ -Lauge ausgeführt. 1 g Stearinsäure verbraucht 35,17 ccm, 1 g Palmitinsäure 39,06 ccm, 1 g Myristinsäure 43,82 ccm, 1 g Laurinsäure 49,95 ccm  $\frac{n}{10}$ -Lauge.

Daß eine einheitliche Säure vorliegt, ist erst dann nachgewiesen, wenn Schmelzpunkt und Titrationswert für eine und dieselbe Säure stimmen und nach dem Umkrystallisieren wieder dieselben Werte erhalten werden. Das Umkrystallisieren darf nicht aus Alkohol geschehen wegen der leichten Esterbildung, sondern etwa aus Aceton. Über die Verwendbarkeit des Pyridin zur Erkennung der Einheitlichkeit hochmolekularer Fettsäuren siehe Brigl und Fuchs<sup>2)</sup>.

Liegt ein Gemenge vor, so kann man eine Trennung auf eine der folgenden Weisen versuchen:

a) Fraktionierte Fällung. Man löst (es genügen schon 1—2 g) in heißem Alkohol, fügt zur Sättigung der Säuren hinreichende Lösung von kohlen-saurem Natron hinzu und dampft auf dem Wasserbade zur Trockne ab, erhitzt noch im Luftbade auf 130°, extrahiert dann den feingepulverten Rückstand mit kochendem absoluten Alkohol und filtriert heiß. Diese Lösung der Natronsalze wird nun fraktioniert gefällt; man erhitzt sie zu dem Zwecke wieder auf dem Wasserbade bis nahe zum Sieden, fügt dann zunächst 1—2 Tropfen Lösung von Chlorbarium oder von essigsäurem Baryt hinzu, filtriert schnell, erhitzt das Filtrat wieder zum Sieden, fügt eine neue kleine Portion Barytsalzlösung hinzu und filtriert heiß durch ein anderes Filterchen und fährt in dieser Weise fort, bis ein neuer Zusatz von Barytsalz zur alkoholischen Lösung keinen weiteren Niederschlag gibt. Der erste Barytniederschlag kann etwas kohlen-sauren Baryt enthalten; die übrigen Niederschläge untersucht man nach dem Waschen mit warmem Alkohol und Trocknen bei 120°, indem man eine gewogene Menge verascht, die Asche in Salzsäure löst, mit Schwefelsäure fällt und aus dem nach § 550,a abfiltrierten, getrockneten und gewogenem Bariumsulfat den Bariumgehalt berechnet. Es enthalten palmitinsaurer Baryt 21,21 % Barium, stearinsaurer Baryt 19,52 % Barium.

Zweckmäßiger ist es offenbar, zur Analyse an Stelle der Bariumsalze nach Jaeckle<sup>3)</sup> die Silbersalze zu benutzen. Sie sind leichter rein und frei von basischen und sauren Salzen darzustellen, unterliegen weniger der hydrolytischen Zersetzung beim Auswaschen und lassen sich auch bequemer analysieren. Man stellt zu diesem Zwecke aus den einzelnen Fraktionen der Bariumsalze die freie Säure her, löst einige Dezigramm in überschüssigem weingeistigen Ammoniak

<sup>1)</sup> Chem. Zentralbl. 1921, IV, S. 1239.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 119, S. 298. 1922.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 36, S. 53. 1902.

und setzt eine hinreichende Menge etwa 5proz. weingeistiger ammoniakalischer Silbernitratlösung hinzu. Nachdem eine etwa eintretende Abscheidung durch Ammoniakzusatz wieder in Lösung gebracht ist, wird die Flüssigkeit jetzt in so viel Wasser eingegossen oder so weit verdünnt, bis die über dem beim Umrühren sich rasch zusammenballenden Niederschlag stehende Flüssigkeit auf weiteren Wasserzusatz ganz klar bleibt. Der Niederschlag wird abfiltriert und bis zur Chlorfreiheit ausgewaschen. Nach dem Trocknen im Vakuumexsiccator bei 40–50° unter Lichtabschluß wird eine gewogene Menge im Porzellantiegel vorsichtig verbrannt und das Silber gewogen. Palmitinsaures Silber enthält 29,72% Ag, stearinsaures Silber 27,59% Ag.

mit Magnesium-  
acetat.

Statt mit Bariumsalzen kann man die fraktionierte Fällung auch mit Magnesiumacetat in alkoholischer Lösung vornehmen.

Eine Abtrennung chemischer Individuen mittels dieser zuerst von Heintz angegebenen fraktionierten Fällung mit Barium- oder Magnesiumsalzen, welche darauf beruht, daß sich zuerst die Salze der kohlenstoffreicheren, dann die der kohlenstoffärmeren Säuren abscheiden, ist sehr schwierig, wenn es sich um ein Gemenge von mehr als 2 Säuren handelt (wenn also außer Palmitin- und Stearinsäure auch noch Myristin- und Laurin- und andere höhere Fettsäuren zugegen sind) und erfordert eine nicht zu kleine Menge Ausgangsmaterial. Eine Isolierung einer einheitlichen Säure ist erst dann als erreicht anzusehen, wenn Barium- oder Silbergehalt einer Fraktion und der Schmelzpunkt und Titrationswert der aus dieser Fraktion isolierten Säure auf eine bestimmte Säure deuten, und der Schmelzpunkt nach wiederholtem Umkrystallisieren aus Aceton unverändert bleibt (vgl. dazu Holde<sup>1</sup>).

Trennung durch  
fraktionierte  
Destillation.

b) Fraktionierte Destillation bei vermindertem Druck. S. darüber Krafft und Weilandt<sup>2</sup>).

Siedepunkt der Laurinsäure	bei 15 mm	176°, im Vakuum	102°,
„ „ Myristinsäure	„ 15 „	196,5°, „	„ 121–122°,
„ „ Palmitinsäure	„ 15 „	215°, „	„ 138–139°,
„ „ Stearinsäure	„ 15 „	232,5°, „	„ 154,5–155 5°.

Doch fanden Kreis und Hafner<sup>3</sup>), daß ein Gemisch gleicher Teile Palmitin- und Stearinsäure mittels Vakuumdestillation nicht zu trennen war.

Auch die Trennung der Fettsäuren in Form ihrer Ester durch Vakuumdestillation ist empfohlen worden (s. Krafft<sup>4</sup>), Haller<sup>5</sup>), Levene und Rolf<sup>6</sup>).

Abtrennung der  
Stearinsäure.

c) Abtrennung der Stearinsäure nach Hehner und Mitchell<sup>7</sup>). Sie beruht auf der Schwerlöslichkeit dieser Säure und der leichteren Löslichkeit der kohlenstoffärmeren Fettsäuren in Alkohol bei 0°. Man wägt 0,5–1 g eines Fettsäuregemisches (das aber keine kohlenstoffreicheren Fettsäuren enthalten darf) in einem Kolben von 150 ccm und bekanntem Gewicht ab, fügt 100 ccm bei 0° mit Stearinsäure gesättigtem Alkohol hinzu, schließt den Kolben, erwärmt gelinde, bis alles gelöst ist, läßt über Nacht bei 0° stehen, saugt die Mutterlauge ab, wäscht die im Kolben verbleibenden Krystalle mit eiskaltem bei 0° mit Stearinsäure gesättigtem Alkohol aus, trocknet schließlich bei 100° und wägt. Über die Einzelheiten dieses auch von anderer Seite (Kreis und Hafner<sup>8</sup>), Heiduschka und Burger<sup>9</sup>) empfohlenen Verfahrens s. die Originalarbeiten.

<sup>1</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 38, 1, S. 1247. 1905.

<sup>2</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 29, 2, S. 1324. 1896. <sup>3</sup>) desgl. Bd. 36, 2, S. 2769. 1903.

<sup>4</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 36, 4, S. 4339. 1903.

<sup>5</sup>) Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 143, S. 657 u. 803. 1906; Bd. 144, S. 462. 1907; Bd. 146, S. 259. 1908.

<sup>6</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 46, S. 202. 1921. <sup>7</sup>) desgl. Bd. 39, S. 176. 1900.

<sup>8</sup>) Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. Bd. 6, S. 22. 1903.

<sup>9</sup>) Chem. Zentralbl. 1913, I, S. 1632.



**Trennung der ungesättigten Fettsäuren voneinander.** Die Jodzahl gibt einen gewissen Aufschluß über die Natur der Säuren. Ist sie höher als 90, so sind vermutlich außer der Ölsäure noch eine oder mehrere stärker ungesättigte Säuren vorhanden. Eine sicher zum Ziel führende Methode der Trennung der einzelnen ungesättigten Säuren ist nicht bekannt. Der Nachweis gründet sich auf Herstellung der Bromderivate und der durch Oxydation entstehenden Oxy-säuren und deren Trennung und Charakterisierung.

Folgendes mag als Anhaltspunkt für die Untersuchung dienen:

1. Eine Abtrennung von Ölsäure aus einem Gemisch, welches reich an Ölsäure ist, läßt sich bewirken auf Grund der sehr geringen Löslichkeit des ölsauren Baryts in kaltem alkoholhaltigen Benzol, welches in der Wärme dieses Salz löst. Man löst die Bariumsälze in der Wärme in 5% 95proz. Alkohol enthaltendem Benzol, beim Abkühlen und längeren Stehen scheidet sich ölsaures Barium ab, während die anderen Bariumsälze in Lösung bleiben. Nach mehrfachem Umkrystallisieren aus demselben Lösungsmittel stellt man durch Schütteln mit Salzsäure und Äther und Verdunsten des abgeschiedenen Äthers die freie Säure dar (Farnsteiner<sup>1</sup>).

2. Zur Isolierung der Linolensäure kann die Unlöslichkeit ihres Hexabromids in Eisessig, in dem die Bromide der Ölsäure und Linolsäure löslich sind, dienen, zur Isolierung der Linolensäure die geringe Löslichkeit ihres Tetrabromids in kaltem Petroläther, aus dessen heißer Lösung es sich abscheidet, während das Ölsäurebromid in Lösung bleibt. Zur Identifizierung dient der Schmelzpunkt und die Bestimmung des Molekulargewichts durch Titration der alkoholischen Lösung mit Phenolphthalein als Indicator.

Molekulargewicht des Ölsäuredibromid . . . . .	442
„ „ Linolsäuretetrabromid . . . . .	600
„ „ Linolensäurehexabromid . . . . .	758

Das Tetrabromid ist in Äther leicht löslich, das Hexabromid sehr schwer.

Näheres bei Farnsteiner<sup>1</sup>), Heiduschka und Steinruck<sup>2</sup>), Levene<sup>3</sup>).

3. Zur Trennung von Ölsäure, Linol- und Linolensäure empfiehlt Erdmann<sup>4</sup>) die verschiedene Löslichkeit der Zinksalze in Alkohol. Am leichtesten löslich ist das  $\alpha$ -linolensaure Zink, bedeutend schwerer das linolensaure und äußerst schwierig das ölsaure Zink.

4. Man oxydiert das Säuregemenge mit Kaliumpermanganat in alkalischer Lösung und sucht die einzelnen Oxydationsprodukte (Dioxystearinsäure usw.) zu isolieren und zu identifizieren. Für die Isolierung benutzt man die Unlöslichkeit der Bariumsälze der Oxydationsprodukte der Öl- und Linolsäure auch in heißem Wasser (während die Bariumsälze der Oxydationsprodukte der Linolensäure in Lösung gehen).

Näheres s. bei Hazura in den S. 74 Fußnote 2 zitierten Arbeiten, auch bei Fahrion<sup>5</sup>), Heiduschka und Steinruck<sup>6</sup>).

### Oxyfettsäuren.

82. **Milchsäure  $C_3H_6O_3$ .** Von den 2 strukturisomeren Oxypropionsäuren,  $\begin{matrix} CH_3 \\ | \\ CH(OH) \\ | \\ COOH \end{matrix}$  der Äthylenmilchsäure (Hydracrylsäure) und der Äthylidenmilchsäure  $\begin{matrix} CH_3 \\ | \\ CH(OH) \\ | \\ COOH \end{matrix}$  kommt nur die letztere in den Organismen vor. Von ihren 3 Modifikationen (d-, l- und d,l-Milchsäure) findet sich

die d,l-Milchsäure („Gärungsmilchsäure“) häufig, wenn nicht konstant, im Vorkommen. Magen- und Darminhalt von Menschen und Säugetieren, nach Heintz<sup>7</sup>) auch in den Muskeln (neben d-Milchsäure), in den Muskeln vom Tintenfisch, Schnecke, Regenwurm, Seewalze<sup>8</sup>), in Pflanzen, z. B. Himbeerblättern (Franzen u. Stern<sup>9</sup>). Sie entsteht beim Erhitzen von Rohr-, Milch-, Frucht- und Traubenzucker, Man- Bildung. nose, Galaktose mit mäßig verdünnter Alkalilauge und vor allem bei der sog. Milchsäuregärung, welche Kohlenhydrate durch ein in bestimmten Mikroorga-

<sup>1</sup>) Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. Bd. 2, S. 1. 1899 u. Bd. 6, S. 161. 1903.

<sup>2</sup>) Journ. f. prakt. Chem. N. F. Bd. 102, S. 248. 1921.

<sup>3</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 51, S. 287 u. 507. 1922 u. Bd. 54, S. 98. 1922.

<sup>4</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 74, S. 179. 1911.

<sup>5</sup>) Chemiker-Zeit. Bd. 17, S. 610. 1893. <sup>6</sup>) Journ. f. prakt. Chem. N. F. Bd. 102, S. 246. 1921.

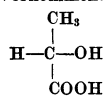
<sup>7</sup>) Liebig's Ann. d. Chem. Bd. 157, S. 320. 1871. Vgl. auch Siegfried: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 22, S. 2711. 1889.

<sup>8</sup>) Literatur bei Ackermann u. Mitarb., Zeitschr. f. Biol. Bd. 80, S. 155 u. 163. 1924.

<sup>9</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 115, S. 270. 1921 u. Bd. 121, S. 195. 1922.

nismen enthaltenes und vom Leben dieser Mikroorganismen unabhängiges Ferment (Buchner und Meisenheimer<sup>1)</sup> erfahren. So bildet sie sich bei dem Sauerwerden der Milch aus Milchzucker, bei der Gärung des Sauerkohls, der Gurke usw. In der sauren Milch kommt auch häufig d-Milchsäure oder auch ein Gemisch beider vor. Sie fand sich auch in der autolytierten Leber (neben d-Milchsäure) (Magnus-Levy<sup>2)</sup>, Saiki<sup>3)</sup>.

Vorkommen.



Die d-Milchsäure („Fleischmilchsäure“ oder „Paramilchsäure“) findet sich in den Muskeln (bei deren Arbeitsleistung sie aus Zucker entsteht), also auch im Fleischextrakt und in den verschiedensten Organen, auch im Gehirn. Die Angabe, daß die Gehirnmilchsäure d,l-Milchsäure sei, hat sich nicht bestätigt (Thudichum<sup>4)</sup>, Moriya<sup>5)</sup>. Sie ist in Galle, Blut, Perikardialflüssigkeit, Humor aqueus, Darminhalt nachgewiesen. Im Harn kommt sie normalerweise nicht vor, wird aber gefunden bei akuter gelber Leberatrophie und Phosphorvergiftung, zuweilen bei Lebercirrhose, ferner in solchen Zuständen, die mit Respirationsstörungen einhergehen, z. B. starken körperlichen Anstrengungen, nach epileptischen Anfällen, bei Eklampsie, kurz vor dem Tode bei verschiedenen Krankheiten. Aus pathologischen Transsudaten wird sie oft reichlich gewonnen. Die bei Osteomalacie in den Knochen, beim Puerperalfieber im Schweiß gefundene Milchsäure ist wahrscheinlich gleichfalls d-Milchsäure. Sie entsteht bei der Autolyse und Bebrütung der Hühnereier (Anno<sup>6)</sup>.

Die l-Milchsäure ist bisher im Körper nicht gefunden worden.

Bildung.

Beide aktiven Modifikationen entstehen durch die Einwirkung bestimmter Bakterien auf Kohlenhydrate. l-Milchsäure wurde zuerst von Blachstein<sup>7)</sup> durch Einwirkung eines aus Wasser gezüchteten Bacillus auf Rohrzucker erhalten, sie bildet sich auch bei der Zersetzung von Zucker durch Typhusbacillen, Choleravibrionen usw. Andere Bakterien, z. B. ein regelmäßig in saurer Milch vorkommendes, erzeugen d-Milchsäure.

Darstellung der inaktiven Säure.

Synthetisch erhält man die d,l-Milchsäure aus Aldehyd, Blausäure und Salzsäure, durch Einwirkung von salpetriger Säure auf d,l-Alanin, durch Behandlung von  $\alpha$ -Jodpropionsäure mit Silberoxyd und auf andere Weise.

Zur Darstellung größerer Mengen der d,l-Milchsäure versetzt man Rohrzuckerlösung mit saurer Milch und Zinkoxyd und läßt unter öfterem Umrühren bei warmer Temperatur einige Zeit stehen. Die abgesetzten Krusten von milchsaurem Zink werden in heißem Wasser gelöst. Die Lösung wird filtriert, noch heiß mit Schwefelwasserstoff behandelt, vom ausgeschiedenen Schwefelzink abfiltriert und auf dem Wasserbade verdunstet. Dem sirupartigen Rückstande entzieht man durch Schütteln mit Äther die freie Milchsäure, welche nach dem Verdunsten des Äthers zurückbleibt.

Isolierung.

Zur möglichst vollständigen Isolierung der Milchsäure aus Muskeln, Galle, serösen Flüssigkeiten usw. dient das folgende Verfahren. Das Fleisch wird zerkleinert, mit kaltem Wasser mehrmals extrahiert, abkoliert und ausgepreßt, das Extrakt oder die sonst zur Darstellung benutzte und wenn nötig vorher mit verdünnter Schwefelsäure schwach angesäuerte Flüssigkeit durch Kochen und Filtration von Eiweißstoffen befreit und zuletzt auf dem Wasserbad bei niedriger Temperatur oder im Vakuum zum dünnen Sirup eingedampft. Den Sirup mischt man mit absolutem Alkohol, fügt allmählich mehr Alkohol hinzu bis mindestens zum 10fachen Volumen des Sirup, rührt gut um, läßt kurze Zeit stehen und gießt dann ab. Der Rückstand wird in wenig Wasser wieder gelöst und abermals mit Alkohol in gleicher Weise behandelt. Von den abge-

<sup>1)</sup> Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 349, S. 125. 1906.

<sup>2)</sup> Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 2, S. 261. 1902.

<sup>3)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 7, S. 17. 1909/10.

<sup>4)</sup> Grundzüge der anat. u. klin. Chemie. Berlin 1886. S. 183.

<sup>5)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 43, S. 397. 1904/05.

<sup>6)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 80, S. 237. 1912.

<sup>7)</sup> Monatshefte f. Chem. Bd. 11, S. 545. 1890.

gossenen und filtrierten alkoholischen Auszügen wird der Alkohol abdestilliert und der dünne sirupöse Rückstand auf dem Wasserbad bei mäßiger Wärme zur Entfernung des Alkohols digeriert. Der Rückstand wird in wenig Wasser gelöst, mit  $\frac{1}{10}$  Vol. 50proz.  $H_2SO_4$  versetzt und 24 Stunden im Lindschen Apparat mit Äther extrahiert. Der Äther wird filtriert und nach Zusatz von Wasser verdunstet, die wässrige Lösung nach Zusatz von reinem Bleicarbonat (das Bleicarbonat ist durch wiederholtes Behandeln mit heißem Wasser von wasserlöslichen Verunreinigungen vorher zu befreien) auf dem Wasserbad eingedampft. Der Rückstand wird wieder in Wasser aufgenommen, filtriert, das Filtrat mit Schwefelwasserstoff entbleit und, nach Entfernung des Schwefelwasserstoffs durch einen Luftstrom, mit reinem Zinkcarbonat (das Handelspräparat ist in gleicher Weise zu reinigen wie das Bleicarbonat) einige Zeit gekocht. Man filtriert, wäscht mit heißem Wasser aus, dampft auf dem Wasserbad ein und läßt zur Krystallisation stehen; durch Zusatz von etwas Alkohol zur Mutterlauge und Stehenlassen werden weitere Krystalle erhalten. Aus der heißen wässrigen Lösung des Zinksalzes kann durch Schwefelwasserstoff das Zink als Sulfid ausgefällt und nach Filtration und Verdampfen auf dem Wasserbad zum Sirup die Milchsäure erhalten werden.

Aus der d,l-Milchsäure lassen sich die aktiven Säuren herstellen durch fraktionierte Krystallisation des Strychninsalzes, indem das d-milchsaure Strychnin leichter löslich ist als das l-milchsaure Salz (Purdie und Walker<sup>1</sup>), fraktionierte Krystallisation des Morphinsalzes (das d-Salz ist sehr leicht löslich in Wasser, während das l-Salz aus verdünnten Lösungen krystallisiert) (Irvine<sup>2</sup>), Herzog und Slansky<sup>3</sup>), mit Hilfe der Chininsalze (Jungfleisch<sup>4</sup>) oder auch durch Eintragen einer kleinen Spur krystallisierten d- oder l-Zinkammoniumlactats in eine konzentrierte, durch Abkühlen übersättigte wässrige Lösung des d,l-Doppelsalzes. Es scheidet sich dann das Doppelsalz der entsprechenden aktiven Säure ab (Purdie<sup>5</sup>). Manche Mikroorganismen assimilieren in einer Nährlösung, welche d,l-Milchsäure enthält, die eine Komponente schneller als die andere, so z. B. *Penicillium glaucum*, die l-Säure schneller als die d-Säure, so daß auf diese Weise auch aus der d,l-Säure aktive erhalten werden kann (Lewkowitsch<sup>6</sup>). Cholerabacillen verhalten sich umgekehrt.

Die inaktive und die aktiven Milchsäuren stellen sirupöse Flüssigkeiten dar. Die käufliche, durch Destillation im Vakuum gereinigte Gärungsmilchsäure krystallisiert bei starker Kälte (Krafft und Dyes<sup>7</sup>). Auch reine d- und l-Milchsäure kann zur Krystallisation gebracht werden. Sie mischen sich in allen Verhältnissen mit Wasser, Alkohol, Äther, besitzen stark saure Reaktion und rein sauren Geschmack, verflüchtigen sich beim Kochen ihrer Lösungen nicht unerheblich mit den Wasserdämpfen und bilden mit Metallen wohlcharakterisierte neutrale Salze. Durch längeres Erhitzen, auch schon bei langem Stehen über Schwefelsäure bei gewöhnlicher Temperatur, verlieren sie allmählich Wasser, indem sich Anhydride bilden. Längere Zeit auf  $150^\circ$  in trockenem Luftstrom erhitzt, gehen sie in Lactid  $C_6H_8O_4$  (Fp.  $124,5^\circ$ , Kp.  $255^\circ$ ) über, welches in Nadeln krystallisiert und beim Kochen mit Wasser und kohlensaurem Zink in d,l-Milchsäure übergeführt wird. Man kann also auf diesem von Strecker gefundenen Wege aktive Milchsäure in inaktive umwandeln.

<sup>1</sup>) Journ. of the chem. soc. (London) Bd. 61, S. 754. 1892.

<sup>2</sup>) Journ. of the chem. soc. (London) Bd. 89, 1, S. 935. 1906.

<sup>3</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 73, S. 240. 1911.

<sup>4</sup>) Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 139, S. 56. 1904.

<sup>5</sup>) Journ. of the chem. soc. (London) Bd. 63, S. 1143. 1893.

<sup>6</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 16, 2, S. 2720. 1883.

<sup>7</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 28, 3, S. 2589. 1895.

Eigenschaften der Salze. Li-Salze.	Die Alkalisalze sind leicht löslich in Wasser. Kali- und Natronsalze krystallisieren nicht. Die Lithionsalze krystallisieren sehr schön, wasserfrei; beim Eindampfen ihrer wässerigen Lösung scheiden sie sich unter eigentümlichem Spritzeln krystallinisch aus, beim langsamen Erkalten in großen cholesterinartigen Krystallen (F. Hoppe - Seyler und Araki <sup>1</sup> ). Die Baryt- und Bleisalze, welche nicht krystallisieren, sind leichtlöslich und können deshalb zur Trennung von den meisten anderen organischen Säuren benutzt werden. Das Bariumsalz ist in 80—83proz. Alkohol löslich (zur Trennung von Bernsteinsäure geeignet, dessen Bariumsalz fast unlöslich ist). Die Zink- und Calciumverbindungen sind hauptsächlich untersucht und von besonderer Wichtigkeit, weil auf ihrer Verschiedenheit die Unterscheidung der aktiven und inaktiven
Ba-, Pb-Salze.	Säuren vor allem beruht. Das Zinksalz der d,l-Milchsäure krystallisiert mit 18,16% H <sub>2</sub> O und entspricht dann der Formel (C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Zn + 3 H <sub>2</sub> O. 1 Tl. löst sich bei 15° in 53 Tl. Wasser, in Alkohol ist es unlöslich. Das Zinksalz der aktiven Säuren (C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Zn + 2 H <sub>2</sub> O enthält nur 12,89% H <sub>2</sub> O. 1 Tl. löst sich in 17,5 Tl. Wasser oder 1109 Tl. Alkohol bei 14—15°. Beide verlieren das
Zn-Salze.	Krystallwasser bei 110°. Das Kalksalz der d,l-Säure (C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Ca + 5 H <sub>2</sub> O ist gleichfalls verschieden durch Krystallwassergehalt und Löslichkeit vom Kalksalz der aktiven Säuren (C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Ca + 4 H <sub>2</sub> O, aber beide krystallisieren in
Ca-Salze.	blumenkohlähnlichen Kugeln von feinen mikroskopischen Nadeln. Das Zinkammoniumsalz der d,l-Säure (C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ZnNH <sub>4</sub> + 3 H <sub>2</sub> O ist wenig beständig, das entsprechende Salz der aktiven Säuren (C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ZnNH <sub>4</sub> + 2 H <sub>2</sub> O krystallisiert in kurzen Prismen, ist luftbeständig und in 3—4 Tl. kaltem Wasser löslich
Zinkammoniumsalz.	(Purdie). Chinin-d,l-lactat (Fp. 165,5°) löst sich in Tetrachlorkohlenstoff 1 : 14 000, Chinin-d-lactat (Fp. 175°) 1 : 9000, so daß man Milchsäure als Chininsalz (über das Bariumsalz hergestellt) von Propionsäure und Buttersäure trennen kann, deren Chininsalze viel leichter in CCl <sub>4</sub> sind (Phelps und Palmer <sup>2</sup> ). Ein in Wasser unlösliches komplexes Natriumferrisalz [Fe (C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> O <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]Na + 2 H <sub>2</sub> O, das unter Umständen zur Ausscheidung der Milchsäure dienen kann, ist von Hofmann <sup>3</sup> ) beschrieben worden. Wässerige Lösungen der Milchsäure und ihrer
Chininsalze.	Salze färben eine kaum gefärbte verdünnte wässerige Eisenchloridlösung gelb, ebenso eine wässerige Phenollösung, die durch Zusatz von etwas Eisenchlorid violett gefärbt ist (Uffelmannsche Reaktion). Äthylester, Flüssigkeiten
Eisensalze.	(d,l-Ester, Kp. <sub>760</sub> 154,5°, d-Ester, Kp. <sub>36</sub> 69—70°), können zur Isolierung benutzt werden.
Ester.	Die d- und l-Milchsäure zeigen nur schwache Drehung, die spezifische Drehung in Wasser steigt mit zunehmender Konzentration (J. Wislicenus <sup>4</sup> ). Krystallisierte d-Säure (1,5%) $[\alpha]_D^{15} = +2,61^\circ$ , krystallisierte l-Säure (1,2%) $[\alpha]_D^{20} = -2,26^\circ$ (Jungfleisch und Godchot <sup>5</sup> ). Anwesenheit von Ammoniummolybdat bewirkt erhebliche Steigerung der Drehung (Herzog und Slansky <sup>6</sup> ). Die Salze der d-Säure drehen links, die der l-Säure rechts, und zwar bei gleicher Konzentration gleichstark, die spezifische Drehung steigt mit abnehmender Konzentration. Hoppe - Seyler und Araki fanden für d-milchsaures Zink bei einem Prozentgehalt von 4,18 $[\alpha]_D = -7,55^\circ$ , bei einem Prozentgehalt von 9,08 $[\alpha]_D = -6,56^\circ$ . Die Lithionsalze zeigen die relativ stärkste
Optische Eigenschaften.	

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 20, S. 365. 1895.

<sup>2</sup>) Journ. americ. chem. soc. Bd. 39, S. 136; ref. Chem. Zentralbl. 1917, I, S. 1032.

<sup>3</sup>) Ber. d. dtsh. Chem. Ges. Bd. 53, 2, S. 2224. 1920.

<sup>4</sup>) Liebig's Ann. d. Chem. Bd. 167, S. 302. 1873.

<sup>5</sup>) Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 140, S. 719. 1905 u. Bd. 142, S. 515. 1906.

<sup>6</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 73, S. 240. 1911.

spezifische Drehung. Für 5,0—11,6 proz. Lösungen betrug  $[\alpha]_D = -11,7$ — $-13,1^\circ$ . Weitere Angaben über die spezifische Drehung der freien Säure, der Zink-, Kalk-, Lithion- und anderer Salze s. bei Hoppe - Seyler und Araki und bei Purdie und Walker<sup>1)</sup>. Eine Zusammenstellung der gefundenen Werte findet sich bei Landolt<sup>2)</sup>.

Beim Erhitzen mit mäßig verdünnter Schwefelsäure in zugeschmolzenem Rohr auf  $140^\circ$  zerfällt Milchsäure in Aldehyd und Ameisensäure, bei der Oxydation mit Permanganat entstehen Acetaldehyd, Essigsäure, Oxalsäure und  $\text{CO}_2$ , bei der Oxydation des Ammoniumsalzes mit Wasserstoffhyperoxyd entsteht Acetaldehyd, Ameisensäure, Essigsäure (Dakin<sup>3)</sup>), bei der Einwirkung von Sonnenlicht auf ihre wässrige Lösung Acetaldehyd,  $\text{CO}_2$  und Brenztraubensäure (Ganassini<sup>4)</sup>), durch bestimmte Bakterien Brenztraubensäure (Mazé<sup>5)</sup>.

Der Nachweis der Milchsäuren, welcher nur nach vorangegangener Isolierung möglich ist, gründet sich hauptsächlich auf die besprochenen Eigenschaften der Salze, namentlich der Zink- und Lithiumsalze, auf die Bildung von Acetaldehyd beim Erwärmen mit Permanganat, ferner auf die Umwandlung in Aldehyd und Ameisensäure. Es ist durchaus unzulässig, lediglich aus der Krystallform der Zinksalze oder aus dem positiven Ausfall der Uffelmannschen Reaktion auf Milchsäure zu schließen. Milchsäure gibt die „Jodoformreaktion“ (Neuberg<sup>6)</sup>.)

Reaktion von Hopkins und Fletcher<sup>7)</sup>. Sie scheint für physiologisches Material spezifisch zu sein, so daß ihr positiver Ausfall wohl als beweisend für Milchsäure angesehen werden darf; aus einem negativen darf aber nicht auf ihre Abwesenheit geschlossen werden. Wenn Äther für die Extraktion verwendet werden soll, so muß er zuerst gut mit Wasser gewaschen werden.

Man bringt zu ungefähr 5 ccm konzentrierter Schwefelsäure in einem Reagensglas einen Tropfen einer gesättigten Kupfersulfatlösung und darauf einige Tropfen der zu prüfenden, am besten alkoholischen Lösung, schüttelt und stellt die Probe 1—2 Minuten in ein stark siedendes Wasser enthaltendes Becherglas. Darauf wird das Reagensglas unter der Wasserleitung abgekühlt und nach Zufügen von 2 oder 3 Tropfen einer sehr verdünnten alkoholischen Lösung von Tiophen (10—20 Tropfen in 100 ccm) in das kochende Wasser zurückgebracht. Bei Anwesenheit von Milchsäure wird die Flüssigkeit schnell sherryrot. Die Farbe ist nur dann beständig, wenn das Reagensglas sofort nach ihrem Auftreten abgekühlt wird.

Reaktion von Herzog<sup>8)</sup>. Die auf Milchsäure zu prüfende Flüssigkeit wird mit Silbercarbonat neutralisiert, eingedampft und das ausgeschiedene Silbersalz in einem Reagensglas mit etwas alkoholischer Jodlösung erhitzt. Die Reaktionsprodukte (Acetaldehyd und Kohlensäure) leitet man durch ein Knierohr in ein zweites Reagensglas, in dem sich eine Spur Wasser befindet. Man weist den Aldehyd nach mit wenig Nitroprussidnatrium und etwas Piperidin: Es entsteht eine blaue Färbung, die auf Zusatz von 1 Tropfen Natronlauge violett, rot und gelb wird.

<sup>1)</sup> Journ. of the chem. soc. Bd. 67, S. 616. 1896.

<sup>2)</sup> Das optische Drehungsvermögen organischer Substanzen. 2. Aufl. Braunschweig 1898, S. 469.

<sup>3)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 4, S. 91. 1908.

<sup>4)</sup> Chem. Zentralbl. 1910, I, S. 729.

<sup>5)</sup> Cpt. rend. de la soc. de biol. Bd. 81, S. 1150; ref. Chem. Zentralbl. 1919, I, S. 960.

<sup>6)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 43, S. 500. 1912.

<sup>7)</sup> Journ. of physiol. Bd. 35, S. 308. 1907.

<sup>8)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 60, S. 135. 1909.

Eine weitere Reaktion, mit der man noch 0,19 g Milchsäure nachweisen kann und die auf der Bildung der Benzylidenverbindung ihres Hydrazides beruht, ist von Franzen und Stern<sup>1)</sup> angegeben worden.

Über Nachweis und Bestimmung in Harn s. § 611, serösen Flüssigkeiten s. § 657 u. § 708, Organen s. § 748 u. § 749.

Vorkommen. 83.  $\beta$ -Oxybuttersäure  $C_4H_8O_3$ . Die l- $\beta$ -Oxybuttersäure findet sich bei schweren Fällen von Diabetes im Harn (Külz<sup>2)</sup>, Minkowski<sup>2)</sup> (selten mehr wie 1%), ist aber auch bei verschiedenen anderen Krankheiten wie Masern, Scharlach, Diphtherie, Skorbut, ferner bei unzureichender Ernährung zuweilen im Harn gefunden, stets in Begleitung von Acetessigsäure. Hugouneq<sup>3)</sup> wies sie im Blut eines Diabetikers nach, Magnus - Levy<sup>4)</sup> u. a.<sup>5)</sup> in Blut und Organen im Koma gestorbener Diabetiker. Nach Sassa<sup>6)</sup> findet sie sich normalerweise in den Organen.

Darstellung. Die synthetisch durch Einwirkung von Natriumamalgam auf Acetessigester (Wislicenus<sup>7)</sup>) erhaltene  $\beta$ -Oxybuttersäure ist inaktiv. Mit Hilfe der Strychninsalze kann man aus ihr die l- und d-Säure gewinnen (Mc Kenzie<sup>8)</sup>).

Isolierung aus Harn. Zur Darstellung aus Harn verfährt man nach einer der folgenden Vorschriften:

1. Nach E. Külz<sup>9)</sup>. Man vergärt, dampft zum dünnen Sirup ein, neutralisiert mit Natronlauge und konzentriert weiter. Der Sirup wird mit dem 3fachen Volumen 95proz. Alkohol gefällt und filtriert, das Filtrat destilliert, der Rückstand mit absolutem Alkohol gefällt und Filtration, Destillation und Fällung so oft wiederholt, bis absoluter Alkohol keinen Niederschlag mehr gibt. Nach dem Abdestillieren des Alkohols wird 3 mal mit dem gleichen Volumen Äther ausgeschüttelt, der vom Äther nicht gelöste Rückstand mit Schwefelsäure übersättigt und so oft mit großen Mengen Äther ausgeschüttelt, bis sich in dem Auszug keine Linksdrehung mehr nachweisen läßt. (Einfacher ist es, die Extraktion in einem Lindschen Extraktionsapparat vorzunehmen.) Die beim Abdestillieren des Äthers zurückbleibende Säure wird in Wasser gelöst, in das Barytsalz übergeführt und dieses durch eine konzentrierte ammoniakalische Lösung von Silbersulfat in das Silbersalz umgewandelt. Die abfiltrierte Flüssigkeit, teils bei gelinder Wärme, teils im Vakuum über Schwefelsäure von überschüssigem Ammoniak befreit und konzentriert, läßt oxybuttersaures Silber in wohl ausgebildeten Krystallen herauskommen. Durch mehrfaches Umkrystallisieren aus Wasser wird es gereinigt und durch Salzsäure in die freie Säure übergeführt.

2. Nach Magnus - Levy<sup>10)</sup>. Etwa 500 ccm unvergorener Harn werden nach Zusatz von ca. 25 g Ammonsulfat auf etwa 100 ccm eingengt, filtriert, mit etwa 40 ccm verdünnter, mit Ammonsulfat gesättigter Schwefelsäure versetzt und in einem Extraktionsapparat\*) mit Äther erschöpft. Die abgetrennte

\*) Magnus - Levy schüttelt diese Menge sehr häufig (12—18 mal) im Schüttelapparat mit großer Menge Äther aus.

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 115, S. 274. 1921.

<sup>2)</sup> E. Külz: Zeitschr. f. Biol. Bd. 20, S. 165. 1884 u. Bd. 23, S. 329. 1887. — Minkowski: Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 18, S. 35 u. 147. 1884. — R. Külz: desgl. Bd. 18, S. 291. 1884. — Deichmüller, Szymanski u. Tollens: Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 228, S. 92. 1885.

<sup>3)</sup> Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. 1887, S. 161.

<sup>4)</sup> Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 42, S. 188. 1899.

<sup>5)</sup> Geelmuyden: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 58, S. 255. 1908/09. — Kanneway: Biochem. Journ. Bd. 12, S. 120. 1918.

<sup>6)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 59, S. 362. 1914.

<sup>7)</sup> Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 149, S. 205. 1869.

<sup>8)</sup> Journ. of the chem. soc. (London) Bd. 81, 2, S. 1402. 1902.

<sup>9)</sup> Zeitschr. f. Biol. Bd. 23, S. 329. 1887.

<sup>10)</sup> Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 45, S. 389. 1901.

ätherische Lösung wird (zur Entfernung von anorganischen Säuren usw.) mit wenig Wasser geschüttelt, durch trockenes Filter filtriert und verdunstet, der Rückstand mit Wasser aufgenommen, die (zur Entfernung von Hippursäure) filtrierte Lösung zur Entfernung von flüchtigen Säuren destilliert und dann mit Tierkohle gekocht und eingeengt. Durch Impfung mit krystallisierter Oxybuttersäure gelingt es oft, diesen Sirup zur Krystallisation zu bringen. Andernfalls neutralisiert man in wässriger Lösung mit Natronlauge, dampft ein, entwässert den Rückstand mit Alkohol und krystallisiert aus absolutem Alkohol (zuletzt unter Zuhilfenahme von Äther) um. Aus konzentrierter Lösung des Natronsalzes kann man dann durch Versetzen mit Schwefelsäure und Ausschütteln mit Äther die freie Säure gewinnen.

Shaffer und Marriott<sup>1)</sup> empfehlen zur Abtrennung anderer Säuren, welche mit der  $\beta$ -Oxybuttersäure in den Äther übergehen, die Überführung in die Zinksalze, von denen das oxybuttersäure Zink in der wässrigen mit Alkohol versetzten Lösung gelöst bleibt, während die anderen beim Stehen der Lösung sich abscheiden. Nach Filtration wird der Alkohol weggekocht und der Sirup nach Ansäuern mit 50proz. Schwefelsäure und Zufügen von Tierkohle mit wasserfreiem Natriumsulfat versetzt, die erhärtete Masse pulverisiert und im Soxhlet extrahiert. Für die weitere Reinigung benutzen sie das Zinkcalciumsalz. Gleiche Teile der wässrigen Lösung der Oxybuttersäure werden der eine mit Zinkcarbonat, der andere mit Calciumcarbonat erhitzt; die Filtrate werden vereinigt. Aus der genügend konzentrierten Lösung krystallisiert das Doppelsalz zum Teil direkt, zum Teil nach Zusatz des gleichen Volumens heißen Alkohols. Man krystallisiert noch einige Male aus Wasser.

3. Nach E. Fischer und Scheibler<sup>2)</sup>. Man verfährt zunächst nach Magnus - Levy, aber nur bis zur Isolierung der Rohsäure, welche beim Verdampfen des ätherischen Auszugs zurückbleibt. Die Reinigung geschieht durch Destillation des Methylesters. Über die Einzelheiten des Verfahrens s. die Originalarbeit.

4. Ein anderes Verfahren ist von Stadelmann<sup>3)</sup> angegeben.

Die Säure wird gewöhnlich sirupartig erhalten, krystallisiert aber auch. Eigenschaften.  
Der ziemlich wasserfreie Sirup kann (leichter nach Impfung mit einigen Krystallen) durch Reiben unter plötzlicher Temperaturerhöhung zur Krystallisation gebracht werden (Magnus - Levy<sup>4)</sup>. Glashelle plattenförmige Krystalle (Krystallographie bei Magnus - Levy), die bei 47,5—48° sintern und bei 49—50° schmelzen, leicht in Wasser, Alkohol, Aceton löslich. Die reine Säure verflüchtigt sich beim Erwärmen auf dem Wasserbad in Spuren, zersetzt sich aber nicht. Die Salze lösen sich leicht in Wasser, schwer in absolutem Alkohol. Die Kalium- K, Na salz. und Natriumsalze krystallisieren in zerfließlichen, die Zink- und Cadmiumsalze Zn-, Cd salz. in wenig hygroskopischen Nadeln, das Silbersalz in feinen Nadeln oder Schuppen. ZnCa salz. Das Zinkcalciumsalz krystallisiert aus Wasser, wenn die Konzentration 10% übersteigt (Shaffer und Marriott). Methylester, farbloser Sirup, Ester. in Wasser, Alkohol, Äther leichtlöslich, schwerer in Petroläther, siedet unter 13 mm bei 67—68,5° (E. Fischer und Scheibler): Äthylester,  $Kp_{15}$  76—77° (Vavon<sup>5)</sup>). Die Säure gibt die „Jodoformreaktion“ (Neuberg<sup>6)</sup>).

Die Säure und ihre Salze drehen links. Für 1—11proz. Lösungen der freien Säure beträgt  $[\alpha]_D = -24,12^\circ$ , für 2—12proz. Lösungen des Na-Salzes\*)  $[\alpha]_D = -14,35^\circ$  (Magnus - Levy), für 3—9proz. Lösungen des Zinkcalciumsalzes  $[\alpha]_D^{20} = -16,26^\circ$  (Shaffer und Marriott), für den Methyl- Optische Eigenschaften.

\*) Gegenwart von Bleiacetat steigert die Linksdrehung sehr erheblich.

1) Journ. of biol. chem. Bd. 16, S. 268. 1913/14.

2) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 42, 1, S. 1221. 1909.

3) Zeitschr. f. Biol. Bd. 23, S. 456. 1887.

4) Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 45, S. 389. 1901.

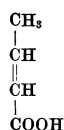
5) Ann. d. chim. et de physique [9], Bd. 1, S. 144; ref. Chem. Zentralbl. 1914, I, S. 1504.

6) Biochem. Zeitschr. Bd. 43, S. 500. 1912.

ester  $[\alpha]_D^{20} = -21,09^\circ$  (E. Fischer und Scheibler). Für die synthetische l-Säure fand McKenzie  $[\alpha]_D^{20} = -24,8^\circ$  und für ihr Natriumsalz  $[\alpha]_D^{15} = -14,5^\circ$ . Angaben über die spezifische Drehung anderer Salze finden sich in den oben zitierten Arbeiten.

Umwandlungen. Beim Erhitzen auf  $100^\circ$  geht sie teilweise in ihr Anhydrid über, welches etwas weniger links dreht (McKenzie). Beim Erhitzen der wässrigen Lösung zerfällt die  $\beta$ -Oxybuttersäure in Wasser und  $\alpha$ -Crotonsäure, welche überdestilliert, bei der Oxydation mit Kaliumbichromat und Schwefelsäure liefert sie Aceton, bei der Oxydation mit Wasserstoffhyperoxyd entstehen Acetessigsäure, Aceton, Acetaldehyd, Ameisensäure, Essigsäure (Dakin<sup>1</sup>). Über die Oxydation durch Permanganat s. Engfeldt<sup>2</sup>.

Nachweis. Über Nachweis und Bestimmung im Harn s. § 609 u. § 610, in serösen Flüssigkeiten s. § 708.



$\alpha$ -Crotonsäure, in Nadeln oder Prismen krystallisierend, schmilzt bei  $72^\circ$ , siedet bei  $184^\circ$ , löst sich bei  $15^\circ$  in 12 Tl. Wasser. Sie gibt bei der Oxydation mit Bromsäure Aldehyd und Essigsäure, bei der Oxydation mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  und Ferrosulfat Acetaldehyd, beim Schmelzen mit Ätzkali 2 Mol. Essigsäure, wird durch Natriumamalgam nicht angegriffen. Die Salze krystallisieren gut, das Zinksalz mit 2 Mol.  $\text{H}_2\text{O}$ , das Silbersalz ist schwer löslich in Wasser.

Lanopalminsäure  $\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_3$  aus verseiftem Wollfett erhalten. Krystallinisch, unlöslich in Wasser und in wässrigen Alkalien, löslich in Alkohol. Fp.  $87-88^\circ$  (Darmstaedter und Lifschütz<sup>3</sup>). Röhmann<sup>4</sup>) ist ihr bei der Untersuchung des Wollfettes nicht begegnet.

Säure  $\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{O}_3$ . Erben<sup>5</sup>) erhielt sie aus dem Harn eines Falles von Chylurie in folgender Weise. Der Rückstand des Ätherauszuges des Harns wurde zum Schmelzen erwärmt und filtriert. Der auf dem Filter bleibende braune Rückstand wurde mit verdünnter Sodalösung in der Wärme gelöst, die Lösung durch wiederholtes Ausschütteln mit Äther von Fett befreit, darauf mit Schwefelsäure angesäuert und abermals mit Äther ausgeschüttelt. Der Äther hinterließ beim Verdunsten die Säure.

Lichtbraun gefärbte, ziemlich harte undeutlich krystallinische Masse. Fp. etwa  $50^\circ$ . Bei der Destillation mit Wasserdampf ging eine geringe Menge einer weißen, in Wasser unlöslichen, aus Äther krystallinisch sich abscheidenden, in Alkohol und Petroläther löslichen Substanz vom Fp.  $51,5^\circ$  über. Erben hält diese Säure für ein Gemenge von Monoxystearinsäuren. Das Vorkommen der gleichen Substanz in einem Ascites wurde von Bernert<sup>6</sup>) wahrscheinlich gemacht.

Eine Säure  $\text{C}_{20}\text{H}_{40}\text{O}_3$ , Fp.  $73,5^\circ$ , und eine Dioxysäure, welcher vielleicht die Formel  $\text{C}_{22}\text{H}_{40}\text{O}_3$  zukommt (Fp.  $100-101^\circ$ ), wurden von Grey<sup>7</sup>) aus menschlichem Gehirn (nach Verseifung) erhalten.

84. Cerebronsäure  $\text{C}_{25}\text{H}_{50}\text{O}_3$ . d-Cerebronsäure ist ein hydrolytisches Spaltungsprodukt des Cerebrons (Phrenosin) (Thudichum, Thierfelder). Sie ist eine Oxysäure (Thierfelder<sup>8</sup>), und zwar ein  $\alpha$ -Hydroxyderivat der nächst höheren Homologen der Lignocerinsäure. Beide Säuren lassen sich ineinander überführen (Levene und Taylor<sup>9</sup>).

Konstitution. Auf Grund der Untersuchungen von Meyer, Brod und Soyka<sup>10</sup>), nach denen Lignocerinsäure keine normale Struktur besitzt, und der Verschiedenheit der Schmelzpunkte der Lignocerinsäure (Fp.  $81^\circ$ ) und der synthetischen n-Tetrakosansäure (nach M., B. u. S.  $85,5-86^\circ$ , nach Levene und West<sup>11</sup>)  $87,5-88,0^\circ$ , nach Brigl<sup>12</sup>)  $85^\circ$ ) nimmt L. für die Säure eine verzweigte Kohlenstoffkette an. Dazu stimmt auch, daß der aus beiden Säuren erhaltene Kohlenwasserstoff<sup>13</sup>)  $\text{C}_{24}\text{H}_{50}$

<sup>1</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 4, S. 91. 1908.

<sup>2</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 112, S. 176. 1921.

<sup>3</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 29, 3, S. 2890. 1896.

<sup>4</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 77, S. 323. 1916.

<sup>5</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 30, S. 436. 1900.

<sup>6</sup>) Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 49, S. 40. 1903.

<sup>7</sup>) Biochem. Journ. Bd. 7, S. 148; ref. Chem. Zentralbl. 1913, II, S. 1811.

<sup>8</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 43, S. 21. 1904/05.

<sup>9</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 52, S. 227. 1922. Hier frühere Literatur.

<sup>10</sup>) Monatshefte f. Chem. Bd. 34, S. 1113. 1913.

<sup>11</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 23, S. 71. 1915.

<sup>12</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 95, S. 161. 1915.

<sup>13</sup>) Levene u. West: Journ. of biol. chem. Bd. 14, S. 257. 1913 u. Bd. 18, S. 477. 1914.

Levene u. Taylor: desgl. Bd. 52, S. 227. 1922.



bei 51–51,5° schmilzt, während das n-Tetrakosan<sup>1)</sup> bei 55° (nach anderen bei 51,1°) schmilzt. Demgegenüber vertritt Brigl<sup>2)</sup> die Ansicht, daß die beiden Säuren normale Struktur haben. Sie findet eine wesentliche Stütze in der Feststellung von Brigl und Fuchs<sup>3)</sup>, daß in der Lignocerinsäure (aus Buchenholztee) in der Hauptsache n-Tetrakosansäure vorliegt, und weiter darin, daß die aus Cerebronsäure und aus Lignocerinsäure (aus Erdnuß) gewonnenen Pentakosane und das synthetische n-Pentakosan den gleichen Schmelzpunkt haben. Erstere schmelzen bei 56–56,5° (Levene und Taylor), letzteres bei 55,5–56° (Brigl).

In Äther, Pyridin und warmem Alkohol löslich, in Wasser unlöslich; Eigenschaften. krystallisiert aus Alkohol und aus Aceton. Die aus reinem Cerebron gewonnene Säure schmilzt bei 100° oder etwas darüber (Thierfelder<sup>4)</sup>, doch sind auch höhere, bis zu 108° (Rosenheim<sup>5)</sup>, Levene und Jacobs<sup>6)</sup>, und auch niedere, bis 86° (Levene und West<sup>7)</sup>, 82–84° (Levene und Taylor) Schmelzpunkte beobachtet. d,l-Cerebronsäure (erhalten aus Lignocerinsäure und aus Cerebronsäure über die Tetrakosansäure) schmilzt bei 92,5° (Levene und Taylor<sup>8)</sup>; d,l-Cerebronsäure (aus natürlicher, bei 99–100° schmelzender, durch 6stündiges Erhitzen mit n-alkoholischer Kalilauge auf 170° gewonnen) schmolz bei 97–100° (Brigl<sup>9)</sup>. Synthetische n- $\alpha$ -Oxyptakosansäure bei 102–104° (Brigl).

Cerebronsaures Natrium krystallisiert aus heißem Alkohol, in Wasser unlöslich. Acetylcerebronsaures Natrium, Methylester (Fp. 65°) krystallisieren aus heißem Alkohol (Thierfelder). Über weitere Verbindungen s. bei Levene und West<sup>10)</sup>.

Präparat vom Fp.	106–108°	$[\alpha]_D^{20} = +4,16^\circ$	in Pyridin	Levene u. Jacobs	Optische Eigenschaften.
„ „ „	105–106°	„ = +3,86°	„ „	Rosenheim	
„ „ „	99–101°	„ = +1,75° – +1,9°	„ „	Brigl	
„ „ „	99–100°	„ = +2,6°	„ „	Levene u. West	
„ „ „	99,5°	„ = +3,8°	„ „	Levene u. Taylor	
„ „ „	99°	„ = +3,5°	„ „	Levene u. Taylor	
„ „ „	91–93°	„ = +3,55°	„ „	Levene u. West	
„ „ „	86°	„ = +1,5°	„ „	Levene u. West	
„ „ „	82–85°	„ = $\pm 0^\circ$	„ „	Levene u. Jacobs	

Die Unterschiede im Schmelzpunkt und in der spezifischen Drehung dürften zum Teil wohl auf eingetretene Racemisation, zum Teil aber auch auf ungenügende Reinheit der Präparate zurückzuführen sein.

**Lanocerinsäure C<sub>30</sub>H<sub>60</sub>O<sub>4</sub>**, aus verseiftem Wollfett erhalten (Darmstaedter und Lifschütz<sup>11)</sup>). Fast unlöslich in Wasser, wässrigen Alkalien und kaltem Alkohol, leichtlöslich in heißem, aus dem sie in mikroskopischen Blättchen krystallisiert. Fp. 104–105°. Beim Erhitzen auf 110–115° wird 1 Mol. Wasser abgespalten. Röhmann<sup>12)</sup> ist dieser Säure bei der Untersuchung des Wollfettes nicht begegnet, dagegen erhielt er in kleiner Menge einen bei 103° schmelzenden Anteil, welcher dem Anhydrid entspricht.

<sup>1)</sup> Levene u. West: Journ. of biol. chem. Bd. 18, S. 477. 1914. — Levene, West und v. d. Scheer: desgl. Bd. 20, S. 521. 1915.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chm. Bd. 95, S. 161. 1915.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 119, S. 280. 1922.

<sup>4)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 44, S. 366. 1905.

<sup>5)</sup> Biochem. Journ. Bd. 10, S. 142. 1916.

<sup>6)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 12, S. 381. 1912. <sup>7)</sup> desgl. Bd. 26, S. 115. 1916.

<sup>8)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 52, S. 227. 1922.

<sup>9)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 95, S. 161. 1915.

<sup>10)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 14, S. 257. 1913.

<sup>11)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 29, 2, S. 1474. 1896.

<sup>12)</sup> Ref. Zentralbl. f. Physiol. Bd. 19, S. 317. 1906; Biochem. Zeitschr. Bd. 77, S. 298. 1916.

## Ketofettsäuren.

- Vorkommen.** 85. **Brenztraubensäure**  $C_3H_4O_3$  wurde von K. A. H. Mörner<sup>1)</sup> in sehr geringer Menge unter den hydrolytischen Zersetzungsprodukten verschiedener Proteinsubstanzen (Rinderhorn, Haare, Bluteiweiß, Casein) nachgewiesen. Da sie bei der Hydrolyse erst spät auftritt und beim längeren Kochen immer weiter gebildet wird, ist sie als ein sekundäres Zersetzungsprodukt anzusehen. Sie wird als Zwischenprodukt der alkoholischen Gärung des Zuckers betrachtet (Neuberg) und auch als Zwischenprodukt im Stoffwechsel des Menschen und der Tiere.
- Isolierung.** Zur Gewinnung wurde die Proteinsubstanz mit der etwa 3fachen Menge verdünnter Salzsäure (bis zu 15%) in verschlossenem Kolben auf dem kochenden Wasserbade etwa eine Woche lang erhitzt, die Flüssigkeit ausgeäthert, die Ätherlösung nach Waschen mit wenig Wasser verdunstet und aus der wässrigen Lösung des Ätherrückstandes das Hydrazon dargestellt. Dasselbe wurde in einigen Fällen völlig rein erhalten, in anderen Fällen ließ sich ein anderes Hydrazon (wahrscheinlich das der Propionylameisensäure) nicht abtrennen.
- Eigenschaften.** Brenztraubensäure ist eine in Wasser, Alkohol, Äther leicht lösliche Flüssigkeit, in der Kälte krystallinisch werdend, siedet ziemlich unzersetzt bei 165–170°. Das Zinksalz + 3 H<sub>2</sub>O zeigt ähnliches Verhalten, denselben Krystallwassergehalt und fast dieselbe Zusammensetzung wie das racemische Zinklactat. Um Milchsäure von Brenztraubensäure zu trennen, versetzt man die wässrige Lösung mit Natriumbisulfit, und zwar in einer Menge, die hinreicht, um mindestens die doppelte Menge der vorhandenen Brenztraubensäure zu binden und extrahiert nach Zusatz von festem Ammonsulfat mit Äther (Czapski<sup>2)</sup>). Aus ihrer schwach mit Salzsäure angesäuerten Lösung scheidet sich auch noch bei starker Verdünnung auf Zusatz von salzsaurem Phenylhydrazin das Hydrazon als schwach gelblicher krystallinischer Niederschlag ab, der beim Umkrystallisieren aus heißem Wasser oder heißem Alkohol sich in langen, haarfeinen gelben Nadeln abscheidet (E. Fischer und Jourdan<sup>3)</sup>). Schmelzpunkt beim raschen Erhitzen unter Zersetzung bei 192°, beim langsamen erheblich niedriger (E. Fischer<sup>4)</sup>). Sie wird durch Hefe in Acetaldehyd und CO<sub>2</sub> gespalten (Neuberg<sup>5)</sup>), auch durch Pilze (Nagajama<sup>6)</sup>). Fäulnisbakterien machen aus ihr Essigsäure, Kohlensäure, Wasserstoff (Neuberg<sup>7)</sup>), manche pathogene Mikroorganismen, welche Traubenzucker vergären, fast quantitativ gasförmige Produkte, die bis zu 90% aus H und bis zu 10% aus CO<sub>2</sub> bestehen können (Karczag<sup>8)</sup>).
- Nachweis.** Zum Nachweis dient das Hydrazon. Ferner die „Jodoformreaktion“ (S. 52), die schon in der Kälte eintritt, die Violettfärbung auf Zusatz von Lauge und Nitroprussidnatrium.
- Vorkommen.** 86. **Acetessigsäure**  $C_4H_6O_3$ . Acetessigsäure<sup>9)</sup>, ein normales Zwischenprodukt des Stoffwechsels, findet sich nicht selten in schweren Fällen von Diabetes und bei anderen pathologischen Zuständen im Harn, auch im Blut, normalerweise nicht oder nur in Spuren. Im allgemeinen tritt sie unter denselben Bedingungen auf wie das Aceton.
- Darstellung und Eigenschaften.** Die Acetessigsäure, erhalten durch 24stündiges Stehenlassen ihres Äthylesters mit etwas mehr als der berechneten Menge 2,5proz. Kalilauge, Ansäuern mit Schwefelsäure, Ausschütteln mit Äther und vorsichtiges Verdunsten des Äthers, stellt eine stark sauer reagierende sirupöse Flüssigkeit dar, die mit Wasser sich gut mischt und mit Barium und Kupfer amorphe Salze bildet. Mit Eisenchlorid geben die freie Säure, ihre Salze und Ester weinrote Färbung. Die Salze zerfallen ebenso wie die freie Säure beim Erhitzen ihrer wässrigen Lösungen in Aceton und Carbonate bzw. Kohlensäure. Diese Spaltung der Salze erfolgt auch bei der Digestion der Salze mit Eiweiß, Aminosäuren (Pollak<sup>10)</sup>). Durch Permanganat entsteht Oxalsäure und Essigsäure, kein Aceton (Engfeldt<sup>11)</sup>).
- 1) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 42, S. 121. 1904.  
 2) Biochem. Zeitschr. Bd. 71, S. 167. 1915.  
 3) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 16, 2, S. 2241. 1883 u. Bd. 17, 1, S. 572. 1884.  
 4) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 41, 1, S. 76. 1908. 5) desgl. Bd. 44, 2, S. 2477. 1911.  
 6) Biochem. Zeitschr. Bd. 116, S. 303. 1921. 7) desgl. Bd. 67, S. 90. 1914.  
 8) Biochem. Zeitschr. Bd. 55, S. 79. 1913 u. Bd. 70, S. 317, 320 u. 325. 1915.  
 9) Gerhardt: Wien. med. Presse 1865, S. 673. — Tollens u. Deichmüller: Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 209, S. 22 u. 30. 1881. — v. Jaksch: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 7, S. 487. 1882/83.  
 10) Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 10, S. 232. 1907.  
 11) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 112, S. 176. 1921.

Bei der Behandlung von Acetessigester mit Natriumamalgam bei niedriger Temperatur bildet sich d,l-β-Oxybuttersäure (§ 83).

Über den Nachweis und Bestimmung der Acetessigsäure im Harn s. § 607 Nachweis. und § 608, in seröser Flüssigkeit s. § 706, in Organen s. § 745.

87. **Lävulinsäure**  $C_5H_8O_3$ , welche aus Hexosen und solchen Polysacchariden, die bei der hydrolytischen Spaltung Hexosen liefern, durch Kochen mit Säuren neben Ameisensäure und Huminsubstanzen entsteht (Tollens), wurde von Kossel und Neumann<sup>1)</sup> auch unter den hydrolytischen Zersetzungsprodukten der Thymusnucleinsäure aufgefunden und ist seitdem auch als Spaltungsprodukt vieler anderer Nucleinsäuren nachgewiesen worden. Auch bei der hydrolytischen Spaltung von Pseudomucin wurde sie erhalten (Otori<sup>2)</sup>.

Zur Isolierung wurde die Nucleinsäure mit etwa 30proz. Schwefelsäure 2 Stunden auf 150° erhitzt, die Flüssigkeit ausgeäthert und der Ätherauszug verdunstet. Aus dem Ätherrückstand ließ sich die Lävulinsäure durch Destillation oder als Silbersalz gewinnen.

Lävulinsäure ist in Wasser, Alkohol, Äther leicht löslich, erstarrt zu blättriger Krystallmasse vom Fp. 33,5°, siedet unter geringer Zersetzung bei 250°. Aus ihrer mit Ammoniak neutralisierten wässrigen Lösung scheidet salpetersaures Silber krystallinischen Niederschlag von lävulinsaurem Silber ab, der sich aus heißem Wasser umkrystallisieren läßt. Auf Zusatz von essigsaurem Phenylhydrazin scheidet sich das Hydrazon vom Fp. 108° ab.

Zum Nachweis dienen die genannten Verbindungen, ferner folgende Reaktionen. Eine wässrige Lösung gibt

1. die „Jodoformreaktion“ (S. 52) schon in der Kälte,
2. mit Nitroprussidnatrium und Natronlauge dunkelkirschrote Färbung, die auf Zusatz von Essigsäure in eine Himbeerfarbe übergeht.

### Mehrbasische Säuren der Fettreihe.

88. **Oxalsäure**  $C_2H_2O_4$  kommt bei Menschen und höheren Tieren wohl nur als Kalksalz vor. Im Harn, auch der Pferde, Schweine, Kaninchen, ist dieses Salz wohl stets in sehr geringer Menge vorhanden, reichlicher zuweilen bei Diabetes und Ikterus. Beim Menschen scheidet es sich häufig krystallinisch ab, bildet auch oft feste Konkreme im Nierenbecken oder in der Harnblase (auch bei Schweinen), auch in der Speicheldrüse, oder nimmt teil an der Steinbildung. In der Gallenblase oder den Faeces ist seltener Calciumoxalat gefunden. Salkowski<sup>3)</sup> fand Oxalsäure stets in der Leber (Kalbs-, Rindsleber) in kleinen Mengen, noch weniger in den Muskeln, nicht im Pankreas. Im Pflanzenreiche sehr verbreitet. Sie entsteht auch aus Zucker durch Mikroorganismen (Pilze) und bei der Oxydation von Eiweißstoffen mit Salpetersäure in reichlicher Menge (C. Th. Mörner<sup>4)</sup>).

Sie entsteht bei der Oxydation von Zucker mit Salpetersäure, bei der Einwirkung von schmelzenden Alkalien auf Cellulose (auf diesen Reaktionen beruht ihre Darstellung).

Um sie aus den Organen zu isolieren, wird das feinzerhackte Gewebe mit dem mehrfachen Volumen Wasser digeriert, die Masse aufgekocht, koliert, abgepreßt, gewaschen, das Filtrat stark eingedampft und nach dem Ansäuern mit Salzsäure mit Äther extrahiert. Der Ätherrückstand wird in Wasser aufgenommen, die wässrige Lösung mit Ammoniak, dann mit Chlorcalcium und Essigsäure versetzt. Der Niederschlag ist mikroskopisch und in der unten beschriebenen Weise auf oxalsauren Kalk zu prüfen. Häufig entstehen bei der Ausfällung Trübungen, die von der Gegenwart von Fettsäuren herrühren. Die mikroskopische Untersuchung schützt vor Verwechslungen (Salkowski).

Die Oxalsäure krystallisiert mit 2 Mol.  $H_2O$  in feinen monoklinen Prismen, die in Wasser und Alkohol leicht, in Äther wenig löslich sind. Sie verflüchtigt sich beim Erhitzen ohne Kohlebildung (schon unter 100°, also auf dem kochenden Wasserbad) (Siegfried, Mörner), und wird durch Oxydation mit

<sup>1)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 27, 2, S. 2215. 1894.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 42, S. 453. 1904. <sup>3)</sup> desgl. Bd. 29, S. 448. 1900.

<sup>4)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 98, S. 97. 1916/17.

Permanganat, sofort bei 35—40°, in Kohlensäure und Wasser zerlegt. Von den Salzen lösen sich nur die Alkalisalze in Wasser.

Der oxalsäure Kalk  $C_2O_4Ca + 3 H_2O$  bildet sehr harte, meist mikroskopische Krystalle in der Form tetragonaler Oktaeder, deren eine Achse etwas kürzer ist als die beiden anderen; die Krystalle sind stets farblos, Ecken und Kanten scharf ausgebildet. Bei schneller Abscheidung krystallisiert er auch mit 1 Mol.  $H_2O$  in Plättchen. Zuweilen erscheint das Salz in der Form mikroskopischer rundlicher Knollen und Hantelform. Das Salz ist unlöslich in Wasser, Alkohol, Äther, ebenso unlöslich in Ammoniak, kohlen-sauren Alkalien, fast unlöslich in Essigsäure, etwas löslich in verdünnter oder konzentrierter Milchsäure, auch in Lösungen von phosphorsaurem oder harnsaurem Natron. In Salzsäure gelöst gibt der oxalsäure Kalk beim Verdunsten der Lösung ein Doppelsalz von Chlorcalcium mit oxalsaurem Kalk, welches in großen rhombischen Tafeln krystallisiert und sich bei Zusatz von Wasser zerlegt. Beim schwachen Glühen wird oxalsaurer Kalk ohne Verkohlungs in kohlen-sauren Kalk verwandelt.

Nachweis. Für den Nachweis dient besonders die Unlöslichkeit des Calciumsalzes in Wasser und Essigsäure. Über den Nachweis in Konkrementen s. § 625 ff. und über den Nachweis und die Bestimmung im Harn s. § 590.

Bildung u. Vorkommen. 89. **Bernsteinsäure**  $C_4H_6O_4$ . Die Bernsteinsäure ist in geringen Mengen in vielen tierischen Flüssigkeiten, im Saft verschiedener Organe (Milz, Thymus, Thyreoidea, Fleisch, Gehirn), zuweilen in Hydrocephalus- und Hydroceleflüssigkeiten, stets reichlich in Echinokokkusflüssigkeiten gefunden, ferner im Wollschweiß. Sie bildet sich bei der bakteriellen Zersetzung der Eiweißstoffe und Kohlenhydrate, findet sich z. B. häufig in saurer Milch, Käse, im Darminhalt, in jauchigem Eiter. Sie entsteht durch Fäulnis aus Glutaminsäure über die  $\alpha$ -Ketoglutar-säure (Neuberg<sup>1</sup>) und aus Asparaginsäure und Asparagin (Borchardt<sup>2</sup>), Neuberg<sup>3</sup>). Sie tritt auch bei der Autolyse von Leber, Muskeln, Hefe auf (Magnus - Levy<sup>4</sup>) und entsteht bei der alkoholischen Gärung des Zuckers, und zwar aus der d-Glutaminsäure über  $\alpha$ -Ketoglutar-säure und  $\beta$ -Aldehydpropionsäure (Neuberg und Ringer<sup>5</sup>). Die Angaben über das Vorkommen im Blut und normalen Harn, reichlicher im Harn von Hunden bei Fett- und Fleisch-nahrung (Meißner<sup>6</sup>), ferner reichlich im Menschenharn nach asparagin-haltigen Nahrungsmitteln (Hilger<sup>7</sup>), sind nicht bestätigt worden (Salkowski<sup>8</sup>), Longo<sup>9</sup>). Sie bildet sich bei der Oxydation von Eiweiß und Leim mit Calciumpermanganat (Seemann<sup>10</sup>) und mit Salpetersäure (C. Th. Mörner<sup>11</sup>), auch bei der Oxydation von Cholsäure (Panzer<sup>12</sup>) und Cholesterin (Windaus<sup>13</sup>) mit Salpetersäure.

Darstellung. Die Bernsteinsäure entsteht durch Verseifung von Äthylencyanid, ferner aus Äpfelsäure und Weinsäure durch Reduktion mit Jodwasserstoff und durch bakterielle Zersetzung dieser beiden Säuren. Letztere Bildungsweise dient zu ihrer Darstellung. Auch aus Zucker entsteht sie durch Mikroorganismen.

<sup>1</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 13, S. 299. 1908; Bd. 18, S. 431. 1909 u. Bd. 71, S. 237. 1915.

<sup>2</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 59, S. 96. 1909.

<sup>3</sup>) Neuberg u. Cappezzuoli: Biochem. Zeitschr. Bd. 18, S. 424. 1909. — Neuberg: Arch. di fisiol. Bd. 7, S. 87; ref. Chem. Zentralbl. 1910. I, S. 1129.

<sup>4</sup>) Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 2, S. 273. 1902.

<sup>5</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 71, S. 226. 1915 u. Bd. 91, S. 131. 1918.

<sup>6</sup>) Meißner u. Jolly: Z. rat. Med. [3], Bd. 24, S. 97. — Meißner u. Shepard: Untersuchungen über das Entstehen der Hippursäure im tierischen Organismus. Hannover 1866.

<sup>7</sup>) Lieb. Ann. d. Chem. Bd. 171, S. 208. 1874.

<sup>8</sup>) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 2, S. 367. 1869 u. Bd. 4, S. 95. 1871.

<sup>9</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 1, S. 213. 1877/78. <sup>10</sup>) desgl. Bd. 44, S. 229. 1905.

<sup>11</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 98, S. 90. 1916/17 u. Bd. 101, S. 18. 1918.

<sup>12</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 60, S. 376. 1909. <sup>13</sup>) desgl. Bd. 102, S. 160. 1918.

Zu ihrer Isolierung aus Organen und Flüssigkeiten wird der wässrige Auszug der zerkleinerten Organe oder die Flüssigkeit nach Ansäuern aufgeköcht, filtriert, eingengt und mit Ammonsulfat gesättigt, das Filtrat nach Zusatz von Schwefelsäure mit Äther im Extraktionsapparat (bis zur Erschöpfung) extrahiert, der Ätherauszug eingengt. Zur Entfernung der gleichzeitig vorhandenen Milchsäure löst man nach *Blumenthal*<sup>1)</sup> den Rückstand in Wasser, fügt Bleihydroxyd hinzu, kocht, verdampft auf dem Wasserbad zur Trockne und übergießt den Rückstand mit heißem Wasser. Das milchsaure Blei, welches dabei in Lösung geht, wird abfiltriert, der Rückstand mit Eisessig übergossen und erwärmt. Man filtriert ab, entbleit durch Schwefelwasserstoff und dampft das Filtrat zur Trockne ein. Ist der Rückstand nicht ganz rein, so kann man ihn in einem Gemisch gleicher Teile von absolutem Alkohol und Äther lösen, filtrieren und das Filtrat verdunsten. Bernsteinsäure scheidet sich krystallinisch aus.

Über ein anderes Verfahren, mit Hilfe dessen die Isolierung aus frischem Fleisch gelang, s. *Einbeck*<sup>2)</sup>.

Die Bernsteinsäure bildet farblose vierseitige Nadeln oder sechsseitige Tafeln, die bei 182° schmelzen zu einer Flüssigkeit, die bei 235° unter teilweiser Zersetzung zu Anhydrid und Wasser siedet. Schon bei 120° entwickeln sich beim Erhitzen der Säure Nebel, welche eingeatmet heftig zum Husten reizen, eigentümlich schmecken und riechen (charakteristisches Verhalten). 1 Tl. Bernsteinsäure löst sich in 14—15 Tl. Wasser von 20°, leichter in heißem, leicht in heißem Alkohol, sehr wenig in Äther, doch geht sie beim Schütteln ihrer wässrigen Lösung mit viel Äther oder bei stundenlanger Extraktion im Extraktionsapparat in diesen über. Bernsteinsäure Alkalisalze sind in Wasser leicht löslich, in Alkohol unlöslich, ebenso in Äther. Calcium- und Bariumsals sind in Wasser schwer, Magnesia- und Manganosalz leicht löslich. Das Bariumsals ist in 80—83 prozentigem Alkohol fast ganz unlöslich (Trennung von der Milchsäure, deren Bariumsals sich löst). Eine Lösung von bernsteinsäuren Alkalien wird durch Silbernitrat fast quantitativ gefällt, ebenso durch Bariumchlorid in der Siedehitze. Eisenchlorid bringt in neutralen Lösungen bernsteinsaurer Salze einen in Wasser unlöslichen, braunen, flockigen Niederschlag hervor. Beim gelinden Erwärmen und Schütteln einer mit Bleizuckerlösung versetzten wässrigen Bernsteinsäurelösung scheidet sich bernsteinsaures Blei als schwerer, krystallinischer Niederschlag ab (charakteristisches Verhalten, welches *Salkowski* zum Nachweis empfiehlt).

Bromphenacyl ester *Fp.* 148° *S.* 61.

Durch Salpetersäure wird sie nicht zersetzt, mit Kalihydrat erhitzt gibt sie Oxalsäure, mit Braunstein und Schwefelsäure Essigsäure, mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Ferrosulfat erwärmt Acetaldehyd (*Neuberg*<sup>3)</sup>), mit Ammoniak und Zinkstaub geglüht Pyrrol. Bei Anwesenheit eines Uransalzes zerfällt sie in wässriger Lösung, dem direkten Sonnenlichte ausgesetzt, in Propionsäure und Kohlensäure. Bei der Oxydation mittels frischen Fleischbreies bei Gegenwart von Sauerstoff geht sie in Fumarsäure über, aus der weiter inaktive Äpfelsäure wird (*Einbeck*<sup>4)</sup>).

Dem Nachweis muß die Isolierung in der oben beschriebenen Weise vorangehen. Gelingt es nicht, aus dem Ätherrückstand die Bernsteinsäure krystallinisch zu erhalten und an ihren charakteristischen Eigenschaften zu

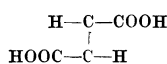
<sup>1)</sup> Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. Bd. 137, S. 550. 1894.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 87, S. 152. 1913 u. Bd. 90, S. 301. 1914.

<sup>3)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 67, S. 71. 1914.

<sup>4)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 90, S. 301. 1914; Biochem. Zeitschr. Bd. 95, S. 296. 1919.

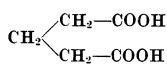
erkennen, so glüht man nach Neuberg<sup>1)</sup> einen Teil des Rückstandes in einem Reagensglase mit Ammoniak und Zinkstaub und hält nach Vertreibung des überschüssigen Ammoniaks in die Öffnung einen mit starker Salzsäure befeuchteten Fichtenspan (Streichholz). Eine Rotfärbung (Pyrrol) zeigt Bernsteinsäure an, doch nur dann, wenn die Substanz nicht aus dem Harn stammt (von Bestandteilen des Harns verhalten sich nämlich  $\beta$ -Oxybuttersäure, Acetessigsäure, Oxalsäure, Hippursäure ebenso) und die Anwesenheit von  $\beta$ -Oxybuttersäure auszuschließen ist, denn die Bernsteinsäure und  $\beta$ -Oxybuttersäure sind die einzigen bekannten Substanzen der tierischen Organe und Gewebsflüssigkeiten, welche in Äther löslich sind und diese Reaktion geben.



**Fumarsäure  $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4$ .** In den Säften vieler grüner Pflanzen und höherer Pilze häufig nachgewiesen, findet sie sich nach Einbeck<sup>2)</sup> auch im Extrakt von frischem Rindfleisch. Sie bildet sich bei der Oxydation von Bernsteinsäure mittels frischen Fleischbreies (Einbeck). Aus Invertzucker entsteht sie unter geeigneten Bedingungen durch einen Schimmelpilz (*Rhizopus nigricans*) (F. Ehrlich<sup>3)</sup>), ebenso durch *Aspergillus fumaricus* (Wehmer<sup>4)</sup>).

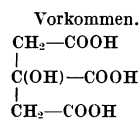
Sie entsteht bei längerem Erhitzen von Äpfelsäure auf 140–150°.

In kaltem Wasser fast unlösliche Krystalle, welche bei 200° sublimieren unter Bildung von Maleinsäureanhydrid. Die Lösung wird durch Barytwasser nicht gefällt, aber durch Silbernitrat. Dimethylester Fp. 102°.



**Glutarsäure  $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_4$ .** Die Glutarsäure oder normale Pyroweinsäure ist von Brieger<sup>5)</sup> neben Bernsteinsäure im jauchigen Eiter gefunden und auch im Wollschweiß vorhanden und im Rübensaft nachgewiesen. Sie wird synthetisch aus Propylcyanid durch Verseifung, ferner durch Reduktion aus Oxyglutarsäure oder Glutaminsäure dargestellt, bildet große flache Tafeln, ist leicht löslich in Wasser, schmilzt bei 97,5°, siedet bei 302° fast ohne Zersetzung. Das Calciumsalz  $\text{C}_5\text{H}_6\text{O}_4\text{Ca} + 2\text{H}_2\text{O}$  löst sich leicht in kaltem, schwer in heißem Wasser, krystallisiert schwer. Das Zinksalz löst sich bei 18° in 102 Tl. Wasser, in heißem Wasser noch schwerer.

**Isolierung.** Brieger säuerte jauchigen Eiter mit Schwefelsäure stark an und schüttelte mit Äther aus, entfernte dann durch Baryt die Schwefelsäure, versetzte das Filtrat mit Bleiessig, filtrierte, entfernte das Blei durch Schwefelwasserstoff, engte dann die Flüssigkeit auf dem Wasserbade ein, behandelte mit Barytwasser, entfernte den Bariumüberschuß durch Kohlensäure und erhielt aus dem Filtrat Barytsalze, welche mehrmals mit Schwefelsäure zersetzt und wieder gebildet und hierdurch gereinigt wurden. Die freigemachten Säuren wurden mit Tierkohle entfärbt und in die Kalksalze verwandelt, diese durch Krystallisation in bernsteinsäuren und glutarsäuren Kalk getrennt. Die freigemachte Glutarsäure schmolz bei 98° und war unzersetzt flüchtig.



**90. Citronensäure  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ .** Citronensäure, weitverbreitet in höheren und niederen Pflanzen, aus Zucker durch Pilze (*Citromyces*, *Aspergillus niger*) entstehend, findet sich auch in der Milch von Menschen, Kühen, Ziegen als regelmäßiger Bestandteil, der nicht aus der Nahrung her stammt (Henkel<sup>6)</sup>). Nach Amberg<sup>7)</sup> soll sie im menschlichen Harn vorkommen und nach Leake<sup>8)</sup> auch im Schweiß. Auch im Käse ist sie nachgewiesen (Winterstein<sup>9)</sup>).

**Darstellung.** Synthetisch erhält man die Citronensäure aus Acetondicarbonsäure und Blausäure und auf andere Weise. Dargestellt wird sie aus Citronensaft als Kalksalz oder auch aus Traubenzucker durch Einwirkung gewisser Schimmelpilze.

**Isolierung.** Zur Isolierung aus Milch bringt man Kuhmilch durch Zusatz einer Säure zur Gerinnung, filtriert, neutralisiert das Filtrat fast mit Ätzkalk, filtriert wieder

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 31, S. 574. 1900/01 u. Salkowski-Festschrift. Hirschwald: Berlin 1904, S. 271.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 90, S. 301. 1914.

<sup>3)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 44, 3, S. 3737. 1911 u. Bd. 52, 1, S. 63. 1919.

<sup>4)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 51, 2, S. 1663. 1918.

<sup>5)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 5, S. 366. 1881.

<sup>6)</sup> Molkereizeitung Bd. 2, S. 259; Ref. Chem. Zentralbl. 1888, S. 1561. Die landwirtschaftl. Versuchsstationen Bd. 39, S. 143. 1891. — A. Scheibe: desgl. Bd. 39, S. 153. 1891.

<sup>7)</sup> Amberg u. Mc Clure: Americ. Journ. of Physiol. Bd. 44, S. 453; ref. Chem. Zentralbl. 1922, III, S. 455. — Amberg u. Mayer: desgl. Bd. 60, S. 564; ref. Chem. Zentralbl. 1923, I, S. 973.

<sup>8)</sup> Americ. Journ. of Physiol. Bd. 63, S. 540; ref. Chem. Zentralbl. 1923, I, S. 1601.

<sup>9)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 41, S. 485. 1904.

und dampft ein. Es scheidet sich ein krystallinischer Niederschlag ab, der zu mehr als  $\frac{9}{10}$  aus citronensaurem Kalk besteht. 1 l Kuhmilch enthält 0,9—1,0 g Citronensäure. Über ein quantitatives Bestimmungsverfahren s. § 814.

Die Citronensäure krystallisiert mit 1 Mol.  $H_2O$  in rhombischen Prismen, Eigenschaften. die bei  $100^\circ$  schmelzen. Schmelzpunkt der wasserfreien Säure  $153—154^\circ$ . Die krystallisierte Säure löst sich sehr reichlich in kaltem Wasser, sie löst sich auch leicht in Alkohol, weniger reichlich in Äther. Die Alkalisalze, auch das saure Salze. Kalisalz, sind in Wasser leicht löslich. Das neutrale Kalksalz ist in Kali- oder Ca-Salz. Natronlauge unlöslich, aber löslich in Chlorammoniumlösung; diese Lösung, zum Kochen erhitzt, scheidet das Calciumcitrat aus, welches jetzt in Chlorammoniumlösung sich nicht wieder löst. Eine wässrige Citronensäurelösung, mit Kalkwasser übersättigt, gibt in der Kälte keinen Niederschlag, beim Kochen fällt das Kalksalz aus (charakteristisches Verhalten). Erwärmt man das amorphe, in Wasser schwerlösliche Barytsalz mit Bariumacetat oder Essigsäure Ba-Salz. längere Zeit, so löst es sich, und beim Erkalten und Stehen scheidet sich  $(C_6H_5O_7)_2Ba_3 + 3\frac{1}{2}H_2O$  in charakteristischen freiliegenden oder zu Bündeln vereinigten Büscheln ab. Bromphenacylester Fp. 104 (S. 61). Citronensäure gibt Bromphenacylester. die Jodoformreaktion (§ 58).

Dem Nachweis muß die Isolierung vorgehen. Zur Erkennung dienen Nachweis. außer den angegebenen Eigenschaften folgende Reaktionen:

1. Nach Sabanin und Laskowsky<sup>1)</sup>. 1 Tl. Citronensäure wird mit 6 Tl. Ammoniak 6 Stunden lang auf  $110—120^\circ$  im zugeschmolzenen Glasrohr erhitzt, die Lösung dann in eine flache Schale ausgegossen und an der Luft im Licht stehengelassen; sie färbt sich nach einigen Stunden blau, später grün. Die Reaktion gelingt noch mit 10 mg Citronensäure.

2. Nach Denigès<sup>2)</sup>. Sie ist noch empfindlicher. Man versetzt die wässrige Lösung mit etwas Mercurisulfatlösung (5 g Mercurioxyd in 20 ccm Schwefelsäure und 100 ccm Wasser), kocht und fügt einige Tropfen einer 2 proz. Kaliumpermanganatlösung hinzu. Unter Entfärbung der Lösung bildet sich erst eine Trübung und dann ein weißer Niederschlag (Mercurisulfatverbindung der Acetondicarbonsäure).

3. Nach Häußler<sup>3)</sup>. Verdunstet man eine Citronensäurelösung mit einer alkoholischen Vanillinlösung auf dem Wasserbad zur Trockne, fügt 3—4 Tropfen einer 20 proz. Schwefelsäure hinzu und erwärmt auf dem kochenden Wasserbad weiter 10—15 Minuten, so hinterbleibt ein dunkelviolettfärbter Rückstand, dessen wässrige Lösung grün ist und auf Zusatz von Ammoniak rot wird. Diese Reaktion wird nach Häußler von Äpfel-, Wein-, Oxal-, Malon-, Benzoe-, Salicyl-, Essig-, Milch-, Bernsteinsäure nicht gegeben. Die Grenze der Empfindlichkeit liegt zwischen 0,002 und 0,001 g, bei Gegenwart anderer Säuren zwischen 0,05 und 0,02 g. Zucker und Eiweiß müssen vorher entfernt werden.

## Fette.

### Allgemeines.

91. Fette sind in allen Geweben und Organen enthalten, in wechselnden, Vorkommen. oft nur ganz geringen Mengen, reichlich im Knochenmark, im subcutanen Bindegewebe, in der Bauchhöhle, zwischen den Muskeln und an vielen anderen Orten (Fettgewebe). Pathologischweise kann sich das Fett in jedem Organ anhäufen, es handelt sich in diesen Fällen um dasselbe Fett, wie man es im

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. analyt. Chem. Bd. 17, S. 74. 1878.

<sup>2)</sup> Ann. de chim. et de physique [7], Bd. 18, S. 413. 1899.

<sup>3)</sup> Chemiker-Zeit. Bd. 38, S. 937. 1914.

normalen Zustande findet. Auch fast alle Flüssigkeiten enthalten Fett in geringer Menge gelöst. Im Harn findet es sich nur bei Chylurie und in sehr seltenen Fällen in Konkrementen, die im wesentlichen aus Fettsäuren und Fett bestehen. Feinverteilt ist es reichlich in der Milch und im Chylus bei Fettfütterung vorhanden.

Komponenten  
der Fette.

Die Fette sind, wenn man die Öle der Seetiere\*) außer Betracht läßt, Glycerinfettsäureester, und zwar Triglyceride. Mono- und Diglyceride scheinen nicht vorzukommen. Die mit Glycerin verbundenen Fettsäuren sind hauptsächlich Palmitin-, Stearin- und Ölsäure; im menschlichen Fett überwiegt die letztere. Daneben finden sich in kleiner Menge Laurinsäure, Myristinsäure, Arachinsäure und im Milchfett auch Butter-, Capron-, Capryl- und Caprinsäure. Auch Säuren der Linol- und der Linolensäurereihe und noch mehr ungesättigte Säuren kommen vor, besonders in den Ölen der Seetiere. Neben einfachen Triglyceriden mit nur einer Fettsäure (z. B. Tripalmitin, Tristearin, Triolein usw.) finden sich auch sog. gemischte Triglyceride (z. B. Palmitodistearin), und zwar, wie es scheint, in reichlicher Menge.

Synthese.

Synthetisch können die einfachen Glyceride durch Erhitzen von Glycerin mit den betreffenden Fettsäuren unter stark vermindertem Druck auf 200—220° erhalten werden.

Auch 2fach<sup>1)</sup> und 3fach<sup>2)</sup> gemischte Triglyceride sind synthetisch dargestellt worden. Indessen gestatten die früher benutzten Methoden keinen sicheren Schluß auf die Struktur<sup>3)</sup>. Die ersten gemischten Triglyceride von sicher bekannter Konstitution ( $\alpha$ -Palmito- $\alpha'$  $\beta$ -dilaurin und  $\alpha$ -Lauro- $\alpha'$  $\beta$ -distearin) wurden von E. Fischer, Bergmann und Bärwind<sup>3)</sup> dargestellt. Sie erhielten sie aus reinen  $\alpha$ -Glyceriden (dargestellt aus Acetonglycerin als Ausgangsmaterial), auf deren Lösung in Chloroform sie eine Mischung von Fettsäurechlorid mit Chinolin oder Pyridin einwirken ließen. Nach derselben Methode haben Amberger und Bromig<sup>4)</sup>  $\alpha$ -Stearo- $\alpha'$  $\beta$ -dipalmitin und  $\alpha$ -Palmito- $\alpha'$  $\beta$ -distearin u. a. dargestellt.

Isolierung.

Aus fettreichem, wasserarmem Gewebe (Fettgewebe) läßt sich das Fett nach möglichster mechanischer Zerkleinerung durch Kochen mit Alkohol, Verdunsten des alkoholischen Filtrats im Vakuum und Aufnahme des Rückstandes mit Äther gewinnen. Statt dessen kann man auch das Fettgewebe bei möglichst niedriger Temperatur ausschmelzen, die Gewebsrückstände auspressen und das flüssige Fett durch Dekantieren und Filtrieren oder auch durch Aufnahme in Äther von Wasser und festen Gewebsteilen befreien. Fettarme Gewebe zerkleinert man mit der Maschine, entwässert sie durch wiederholtes Verrühren und Verreiben mit Alkohol, entfernt den Alkohol durch Absaugen auf der Nutsche, pulverisiert und extrahiert mit Äther. Die alkoholischen Auszüge werden durch Destillation im Vakuum vom Alkohol befreit und ebenfalls mit Äther extrahiert. In Flüssigkeiten suspendierte Fette kann man durch

\*) Diese verhalten sich vielfach ganz anders. Sie können bis zu 90% Kohlenwasserstoffe (Spinacen, Squalen) enthalten (Leberöl der Spinacidae und Haifische) oder Fettsäureester höherer einwertiger Alkohole (Fett der Wale).

<sup>1)</sup> Guth: Zeitschr. f. Biol. Bd. 44, S. 78. 1903. — Kreis u. Hafner: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 36, 1, S. 1123. 1903. — Grün: desgl. Bd. 38, 2, S. 2284. 1905. — Grün u. Schacht: desgl. Bd. 40, 2, S. 1778. 1907. — Bömer u. Limpricht: Zeitschr. f. Untersuch. d. Nahrungs- u. Genußmittel Bd. 25, S. 354. 1913. — Grün u. Schönfeld: Zeitschr. f. angew. Chem. Bd. 29, S. 37. 1915.

<sup>2)</sup> Grün u. Skopnik: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 42, 3, S. 3750. 1909.

<sup>3)</sup> E. Fischer, Bergmann u. Bärwind: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 53, 2, S. 1589. 1920. — Grün u. Wittka: desgl. Bd. 54, 1, S. 273. 1921.

<sup>4)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 130, S. 252. 1922.



Schütteln mit Äther oder Extraktion in einem Ätherextraktionsapparat (§ 4) aufnehmen, aus Emulsionen, z. B. Milch, erhält man sie in gleicher Weise, nachdem man etwas Natronlauge zugefügt hat.

Der nach Verdunsten des Äthers hinterbleibende Rückstand enthält außer Fett noch Phosphatide und Cholesterin; auch Fettsäuren, Farbstoffe, andere stickstoffhaltige Substanzen, vielleicht auch Cholesterinester<sup>1)</sup>, können in ihm enthalten sein. Die Anwesenheit von Fettsäuren gibt sich dadurch zu erkennen, daß die alkoholisch-ätherische Lösung einer Probe des Rückstandes tropfenweise zugefügte alkoholische Lösung von Phenolphthalein, welche durch Zufügen einer minimalen Menge Alkali rotgefärbt ist, entfärbt. Um sie zu entfernen, zerreibt man den Ätherrückstand mit verdünnter Sodalösung, dampft auf dem Wasserbad ein, nimmt mit Wasser auf und schüttelt mit Äther. Zum Nachweis der Phosphatide prüft man eine Probe des Ätherrückstandes nach § 54 auf Phosphor. Ihre Entfernung wird unter Umständen, wenigstens teilweise, in folgender Weise gelingen: Man fällt die ätherische Lösung mit Aceton, filtriert nach längerem Stehen von ausgefallenen Phosphatiden ab, verdunstet das Filtrat und behandelt den Rückstand mit Alkohol, in dem sich das Fett nur wenig löst, während Phosphatide in Lösung gehen. Cholesterin läßt sich aus einer ätherisch-petrolätherischen Lösung des Fettes mit 1 proz. alkoholischer Digitoninlösung fällen (Windaus, Klostermann<sup>2)</sup>.

Manche Fette sind flüssig (reicher Gehalt an Olein oder anderen Glycerinestern ungesättigter Fettsäuren), andere bei gewöhnlicher Temperatur kristallisiert; sie reagieren, wenn völlig rein, neutral, so daß ihre ätherische Lösung eine alkoholische, durch eine Spur Alkali rotgefärbte Phenolphthaleinlösung nicht entfärbt. Sie sind an sich farb-, geschmack- und geruchlos, lösen aber viel Farbstoff und erscheinen im Tierkörper wohl immer gefärbt. Sie durchtränken Papier und machen es durchscheinend (Fettflecke), beim Erhitzen verflüchtigen sie sich nicht unzersetzt. Sie sind unlöslich in Wasser, leichter als dieses, in flüssigem Zustand auf ihm schwimmend (Fettaugen), meist auch ziemlich unlöslich in kaltem, leichtlöslich in kochendem Alkohol. Alle lösen sich leicht in Äther, Chloroform, Schwefelkohlenstoff, Benzol, Petroläther und flüchtigen Ölen; sie lösen sich auch gegenseitig auf, so stellen die gewöhnlichen Öle wie Olivenöl eine Lösung von Stearin und Palmitin in Olein dar. Etwas löslich sind Fette auch in Seifen-, Eiweiß- oder Leimlösungen und besonders in Flüssigkeiten, welche gallensaure Salze enthalten. Schüttelt man flüssige Fette mit schleimigen oder Eiweißlösungen, so gehen sie in feine Zerteilung über, aus welcher sie sich nur langsam wieder zu einer Masse vereinigen (Emulsion). Eine haltbare Emulsion entsteht auch, wenn man gewöhnliches, nicht gereinigtes, flüssiges Fett (das infolge von Zersetzungen stets kleine Mengen freier Fettsäuren enthält) mit schwacher Sodalösung zusammenbringt; vollkommen neutrales Fett tut dies nicht, da sich in diesem Falle keine Seifen, auf deren Anwesenheit die Emulsionierung beruht, bilden können.

Durch Kochen mit Wasser werden die Fette kaum angegriffen, dagegen durch Erhitzen mit Alkalien, besonders in alkoholischer Lösung, schnell in Glycerin und Fettsäuren gespalten (Verseifung); dieselbe Zerlegung bewirkt Erhitzen mit verdünnter Schwefelsäure oder Wasserdampf, in das auf 220° erhitzte Fett eingeleitet, ferner die Lipase, die im Pankreas- und Magensaft enthalten ist und sich auch im Blut und den Organen findet. Auch eine Reihe von Mikroorganismen spalten Fett. Alkalien in der Kälte verseifen nicht, ebenso wenig kohlen-saure Alkalien in der Wärme.

<sup>1)</sup> Siehe Amberger: Zeitschr. f. Untersuch. d. Nahrungs- u. Genußmittel Bd. 35, S. 360. 1918.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. Untersuch. d. Nahrungs- u. Genußmittel Bd. 26, S. 433. 1913.

Beim Stehen der Fette in Berührung mit atmosphärischer Luft und Licht werden sie allmählich zerlegt und die freigewordenen Fettsäuren zu unangenehm riechenden Stoffen oxydiert (Ranzigwerden der Fette). Erhitzt man Fette zweckmäßig nach inniger Vermischung mit gepulvertem Kaliumbisulfat in trockenem Reagensglas, so gehen Fettsäuren und Acrolein über, dessen Nase und Augen stark reizende Dämpfe sich schon in geringen Mengen leicht kenntlich machen.

Nachweis. Zum Nachweis der Fette dient ihre Löslichkeit in Äther, dem sie auch beim Schütteln mit Sodalösung nicht entzogen werden (Unterschied von Fettsäuren), und das eben angeführte Verhalten beim Erhitzen, besonders mit Kaliumbisulfat. Außer Fetten und hochmolekularen fetthaltigen Verbindungen wie Phosphatide sind keine Stoffe bekannt, welche in Äther löslich sind und diese Reaktion geben. Speziell geben auch die hohen Fettsäuren, welche dieselben Löslichkeitsverhältnisse zeigen wie die Fette und auch „Fettflecke“ im Papier erzeugen, diese Reaktion nicht. Zur Unterscheidung von Fett und Fettsäuren kann auch die Reaktion ihrer ätherischen Lösung dienen, die man in der beschriebenen Weise mit einer rotgefärbten alkalischen Phenolphthaleinlösung prüft.

#### *Einzelne Glyceride.*

Schmelzpunkt. Vorbemerkung. Die aus Lösungsmitteln krystallisierten Glyceride zeigen nur einen Schmelzpunkt, die aus dem Schmelzfluß erstarrten einen doppelten, der bedingt ist durch zwei isomere Modifikationen (eine labile und eine stabile). Beim Erwärmen werden diese geschmolzenen und durch schnelles Abkühlen auf etwa 15° erstarrten Glyceride bei einer bestimmten Temperatur durchscheinend oder ganz durchsichtig (sog. Umwandlungspunkt, Übergang der labilen in die stabile Modifikation), beim weiteren Erwärmen wieder vollkommen undurchsichtig, um dann bei einer bestimmten Temperatur endgültig zu schmelzen. Damit die Umwandlung der labilen in die stabile Modifikation vollständig wird, ist es nötig, die Temperatur eine Zeitlang (5—10 Minuten oder noch länger) über der Temperatur des Umwandlungspunktes zu halten. Bei reinen Glyceriden stimmen die Schmelzpunkte der aus einem Lösungsmittel krystallisierten und der aus dem Schmelzfluß erstarrten und wieder in die stabile Modifikation übergeführten völlig oder nahezu völlig überein (Bömer<sup>1</sup>). Bei den Schmelzpunktsangaben im folgenden bedeutet die erste Zahl den Schmelzpunkt des aus der Lösung krystallisierten Glycerides, die mittlere eingeklammerte den Umwandlungspunkt und die letzte den Schmelzpunkt des geschmolzenen und wieder in die stabile Form übergeführten.

92. Isolierung einzelner Glyceride aus Fett. Sie ist sehr schwierig und hat nur bei Benutzung großer Mengen von Fett Aussicht auf Erfolg. Eine gewisse Trennung erreicht man, wenn man das Fett einige Zeit bei einer Temperatur hält, bei der ein Teil der gelösten festen Glyceride auskrystallisiert. Diese Temperatur würde für Butter etwa 20°, für Lebertran, Knochenöl etwa 0° sein und so für jedes Fett verschieden. Man filtriert durch Papier das flüssige Öl ab, preßt die ausgeschiedenen Krystallmassen aus und läßt das Öl bei einer niedrigeren Temperatur stehen, bei welcher wieder ein Teil sich ausscheidet, filtriert usw. (Man kann auch eine Trennung der krystallisierten von den flüssigen Teilen durch Aufstreichen auf Tonplatten bewirken. Die flüssigen lassen sich den zerkleinerten Platten durch Extraktion mit Äther entziehen.) Weiter sucht man durch fraktionierte Krystallisation aus verschiedenen Lösungsmitteln, Alkohol, Benzol, Äther, Aceton, Chloroform oder auch aus Gemischen Trennung zu erreichen. Ein reines Glycerid muß bei wiederholter Krystallisation auch aus verschiedenen Lösungsmitteln den gleichen Schmelzpunkt zeigen, auch müssen die Schmelzpunkte des aus Lösung krystallisierten und des aus dem Schmelzfluß erstarrten gleich sein oder doch einander sehr nahe liegen. Ferner muß es die von der Theorie geforderte Verseifungszahl (§ 93) und Elementarzusammensetzung

<sup>1</sup>) Zeitschr. f. Untersuch. d. Nahrungs- u. Genußmittel Bd. 14, S. 97. 1907.

geben und bei der Verseifung die richtigen Fettsäuren im richtigen Verhältnis liefern.

Zur Darstellung reiner Glyceride der gesättigten Fettsäuren aus natürlichen festen Fetten (Rind-, Hammel-, Schweinefett) verfuhr Bömer<sup>1)</sup> in folgender Weise. Das Fett (1—2 kg) wird durch fraktionierte Krystallisation aus Äther, Benzol, Chloroform (bewirkt durch Erniedrigung der Temperatur oder Verringerung des Lösungsvermögens durch Alkoholzusatz) in einzelne Fraktionen zerlegt, die man durch Wiederholung des Verfahrens weiter zerlegen kann. Die Fraktionen mit naheliegender Schmelzpunkt werden vereinigt, in Chloroform gelöst und mit Wijsscher Jodmonochlorideisessiglösung versetzt, um die ölsäurehaltigen Glyceride in die Chlorjodverbindungen überzuführen. Nach hinreichend langem Stehen versetzt man die einzelnen Lösungen mit genügendem Überschuß von Eisessig oder Alkohol, saugt die sich ausscheidenden Glyceride ab und wäscht mehrmals mit Eisessig oder Alkohol. Der Vorteil dieser von Kreis und Hafner empfohlenen Behandlung besteht darin, daß man mit Hilfe der Kupferoxydreaktion (§ 56) jederzeit feststellen kann, ob das isolierte Glycerid frei von ursprünglich ölsäurehaltigem ist. Jetzt unterwirft man die einzelnen Fraktionen der „fraktionierten Lösung“, deren Wesen darin besteht, daß man die Substanz so oft, 10—30 mal, umkrystallisiert, bis eine Ausscheidung von Krystallen aus der Lösung nicht mehr erfolgt. Zu dem Zweck erwärmt man das Glycerid in einem Becherglas mit einer so geringen Menge des Lösungsmittels auf dem Wasserbade, daß sich die ganze Menge löst, aber beim Abkühlen bis auf einen geringen Teil wieder abscheidet. Der Schmelzpunkt der einzelnen Abscheidungen wird festgestellt. Man erhält so das am schwersten lösliche Glycerid. Die einzelnen Mutterlaugen werden wieder durch Destillation vom Lösungsmittel befreit und aus den Rückständen nach Maßgabe der Schmelzpunkte neue Gruppen gebildet, welche man nun wieder der fraktionierten Lösung unterwirft usw. Das Nähere s. im Original.

**Palmitin (Tripalmitin) C<sub>51</sub>H<sub>98</sub>O<sub>6</sub>.** Das Palmitin ist wenig löslich in kaltem, leichtlöslich in heißem Alkohol oder Äther. Beim Erkalten der heiß gesättigten Lösung scheiden sich feine Nadeln von Palmitin aus. Ist es mit Stearin gemischt, so scheiden sich aus den heißen Lösungen beim Erkalten Gemische (oder Verbindungen) von Palmitin und Stearin in Kugeln aus, welche aus radial um einen Punkt gestellten Blättchen oder Nadeln, die oft grashalmartig gewunden erscheinen, bestehen. Diese Gemenge hielt man früher für ein besonderes Fett, welches Margarin genannt wurde. Schmelzpunkt des reinen krystallisierten Palmitin 65,5° (50°) 65,5°. Geringe Beimengungen verändern ihn.

**Stearin (Tristearin) C<sub>57</sub>H<sub>110</sub>O<sub>6</sub>.** Es findet sich im Rinder- und Hammeltalg und konnte daraus zu 1,5 bzw. 3% isoliert werden (Bömer<sup>2)</sup>). Aus Schweinefett wurde es nicht erhalten (Bömer<sup>3)</sup>). Es ist das festeste, am schwersten schmelzbare unter den bekannten Fetten, in heißem Alkohol oder Äther schwerer löslich als die übrigen Fette (100 ccm Äther lösen bei 15° 0,0205 g) (Bömer<sup>4)</sup>) und wird beim Erkalten ihrer Lösungen zuerst ausgeschieden, gewöhnlich in rektangulären Tafeln, seltener in rhombischen Prismen. Schmelzpunkt des reinen krystallisierten Stearins 71,5° (55°) 71,5°. Geringe Beimengungen verändern ihn.

**Olein (Triolein) C<sub>57</sub>H<sub>104</sub>O<sub>6</sub>.** In reinem Zustande ein farbloses, flüssiges Öl bei gewöhnlicher Temperatur, erstarrt bei — 6° krystallinisch. Es wird leicht ranzig und färbt sich dabei gelb, ist ziemlich löslich in absolutem Alkohol, weniger in verdünntem, leichtlöslich in Äther. Bei der trockenen Destillation gibt es außer den Produkten, welche auch andere Fette liefern, noch Sebacin-säure. Im Vakuum destilliert reines Olein unzersetzt. Jodzahl 86,098.

**Tributyrin, Tricapronin, Tricaprylin** und die Triglyceride weiterer Fettsäuren sind noch nicht genügend untersucht. Die drei genannten sind Flüssigkeiten. Die beiden ersteren konnten von Amberger<sup>5)</sup> in der Butter nicht nachgewiesen werden. **Trilaurin** Fp. 45°, **Trimyristin** Fp. 56,5° (49°) 55°, **Triarachin** Fp. 72°.

1) Zeitschr. f. Untersuch. d. Nahrungs- u. Genußmittel Bd. 17, S. 353. 1909.

2) Zeitschr. f. Untersuch. d. Nahrungs- u. Genußmittel Bd. 14, S. 90. 1907.

3) Zeitschr. f. Untersuch. d. Nahrungs- u. Genußmittel Bd. 25, S. 321. 1913.

4) Zeitschr. f. Untersuch. d. Nahrungs- u. Genußmittel Bd. 26, S. 565. 1913.

5) Zeitschr. f. Untersuch. d. Nahrungs- u. Genußmittel Bd. 35, S. 313. 1918.

$\begin{array}{l} \text{CH}_2-\text{O}-\text{C}_{16}\text{H}_{31}\text{O} \\ | \\ \text{CH}-\text{O}-\text{C}_{16}\text{H}_{31}\text{O} \\ | \\ \text{CH}_2-\text{O}-\text{C}_{16}\text{H}_{31}\text{O} \end{array}$ 
 **$\alpha$ -Palmito- $\alpha$ ' $\beta$ -distearin**  $\text{C}_{55}\text{H}_{106}\text{O}_6$  krystallisiert aus Äther in dichten Drusen feiner Nadeln (100 ccm Äther lösen bei  $15^\circ$  0,2386 g) (Bömer), aus Hammelfett  $63^\circ$  ( $51,4^\circ$ )  $62,9^\circ$  (Bömer<sup>1</sup>), aus Butter  $62,9^\circ$  ( $51,5^\circ$ )  $62,8^\circ$  (Amberger<sup>2</sup>), aus Rinder- und Hammelfett  $63,5^\circ$  ( $52^\circ$ )  $63^\circ$  (Kreis und Hafner<sup>3</sup>), aus Hirschtalg (Klimont und Meisl<sup>4</sup>), aus Gänsefett (Bömer und Merten<sup>5</sup>). Das synthetische schmilzt bei  $63,2^\circ$  (Amberger und Bromig<sup>6</sup>).

$\begin{array}{l} \text{CH}_2-\text{O}-\text{C}_{16}\text{H}_{31}\text{O} \\ | \\ \text{CH}-\text{O}-\text{C}_{16}\text{H}_{31}\text{O} \\ | \\ \text{CH}_2-\text{O}-\text{C}_{16}\text{H}_{31}\text{O} \end{array}$ 
 **$\beta$ -Palmito- $\alpha$ ' $\alpha$ -distearin**  $\text{C}_{55}\text{H}_{106}\text{O}_6$  krystallisiert aus Äther in langen, schmalen, dünnen Tafeln. Aus Schweinefett  $68,0^\circ$  ( $51,3^\circ$ )  $67,9^\circ$  (Bömer<sup>7</sup>). 100 ccm Äther lösen bei  $15^\circ$  0,0662 g (Bömer). Das synthetische schmilzt bei  $67,9^\circ$  (Amberger und Bromig<sup>6</sup>).

$\begin{array}{l} \text{CH}_2-\text{O}-\text{C}_{16}\text{H}_{31}\text{O} \\ | \\ \text{CH}-\text{O}-\text{C}_{16}\text{H}_{31}\text{O} \\ | \\ \text{CH}_2-\text{O}-\text{C}_{16}\text{H}_{31}\text{O} \end{array}$ 
 **$\beta$ -Stearo- $\alpha$ ' $\alpha$ -dipalmitin**  $\text{C}_{53}\text{H}_{102}\text{O}_6$ . Aus Hammeltalg  $57,3^\circ$  ( $46,7^\circ$ )  $57,3^\circ$  (Bömer<sup>1</sup>) (100 ccm Äther lösen bei  $15^\circ$  1,3847 g (Bömer<sup>7</sup>), aus Schweinefett  $58,0^\circ$  ( $47,0^\circ$ )  $57,9^\circ$  (Bömer<sup>7</sup>) (100 ccm Äther lösen bei  $15^\circ$  1,0216 g) (Bömer), aus Butterfett  $58,0^\circ$  ( $46,9^\circ$ )  $57,9^\circ$  (Amberger<sup>2</sup>). Es findet sich auch in der Nebenniere (Wagner<sup>8</sup>) und im Gänsefett (Amberger und Bromig<sup>9</sup>), Bömer und Merten). Das synthetische (nach einer nicht ganz einwandfreien Methode hergestellt) schmilzt bei  $59,1^\circ$  (Amberger und Bromig<sup>6</sup>).

$\begin{array}{l} \text{CH}_2-\text{O}-\text{C}_{16}\text{H}_{31}\text{O} \\ | \\ \text{CH}-\text{O}-\text{C}_{16}\text{H}_{31}\text{O} \\ | \\ \text{CH}_2-\text{O}-\text{C}_{16}\text{H}_{31}\text{O} \end{array}$ 
 **$\alpha$ -Stearo- $\alpha$ ' $\beta$ -dipalmitin**  $\text{C}_{53}\text{H}_{102}\text{O}_6$  im Gänsefett als schwerstlösliches Glycerid aufgefunden  $63,0^\circ$  ( $52,6^\circ$ )  $62,8^\circ$  (Amberger und Bromig<sup>9</sup>). Das synthetische schmilzt bei  $63,5^\circ$  (Amberger und Bromig<sup>6</sup>).

**Ölsäurehaltige** gemischte Glyceride (**Oleodipalmitin, Dioleopalmitin, Dioleostearin**) wurden von Amberger und Bromig<sup>9</sup>) und von Bömer und Merten<sup>5</sup>) aus Gänsefett, letztere beiden von Hansen<sup>10</sup>) aus Hammel- und Rindertalg isoliert. Aus Pflanzenfetten ist **Oleodistearin** (Heise<sup>11</sup>), Fritzweiler<sup>12</sup>), Klimont<sup>13</sup>) und **Oleodipalmitin** (Klimont<sup>14</sup>) dargestellt. Reinheit wohl zweifelhaft. **Buttersäurehaltige** gemischte Glyceride scheinen in der Butter vorzukommen (Blyth und Robertson<sup>15</sup>), Amberger<sup>16</sup>).

#### *Ermittlung der Säurezahl und anderer „Zahlen“.*

93. Gewisse Anhaltspunkte über die Zusammensetzung eines natürlichen Fettes erhält man durch Ermittlung einer Reihe sog. „Zahlen“.

1. **Säurezahl**, d. h. die Milligramm KOH, welche zur Neutralisation der in 1 g Fett enthaltenen freien Fettsäuren nötig sind.

Man löst eine abgewogene Menge Fett (zweckmäßig 5—10 g) in neutralem Alkohol unter Erwärmen und titriert unter Zusatz von Phenolphthalein mit  $\frac{n}{10}$ -Lauge.

Zur Erhaltung genauer Resultate ist es nötig, daß der Gehalt der Titrierflüssigkeit an Alkohol bei Feststellung der Endreaktion (bleibende Rosafärbung) mindestens 40—50% beträgt (Kanitz<sup>17</sup>).

<sup>1</sup>) Zeitschr. f. Untersuch. d. Nahrungs- u. Genußmittel Bd. 17, S. 353. 1909.

<sup>2</sup>) Ebenda Bd. 26, S. 65. 1913.

<sup>3</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 36, 1, S. 1123. 1903.

<sup>4</sup>) Monatshefte f. Chem. Bd. 34, S. 1489. 1913.

<sup>5</sup>) Zeitschr. f. Untersuch. d. Nahrungs- u. Genußmittel Bd. 43, S. 101. 1922.

<sup>6</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 130, S. 252. 1922.

<sup>7</sup>) Zeitschr. f. Untersuch. d. Nahrungs- u. Genußmittel Bd. 25, S. 321. 1913 u. Bd. 26, S. 559. 1913.

<sup>8</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 64, S. 75. 1914.

<sup>9</sup>) Zeitschr. f. Untersuch. d. Nahrungs- u. Genußmittel Bd. 42, S. 193. 1921.

<sup>10</sup>) Arch. f. Hyg. Bd. 42, S. 1. 1902.

<sup>11</sup>) Arb. a. d. Reichs-Gesundheitsamte Bd. 12, S. 540, 1896 u. Bd. 13, S. 302. 1897.

<sup>12</sup>) Arb. a. d. Reichs-Gesundheitsamte Bd. 18, S. 371. 1902.

<sup>13</sup>) Monatshefte f. Chem. Bd. 25, S. 929. 1904.

<sup>14</sup>) Monatshefte f. Chem. Bd. 24, S. 408. 1903 u. Bd. 26, S. 563. 1905.

<sup>15</sup>) Ref. Chem. Zentralbl. 1889, I, S. 248.

<sup>16</sup>) Zeitschr. f. Untersuch. d. Nahrungs- u. Genußmittel Bd. 35, S. 313. 1918.

<sup>17</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 36, 1, S. 400. 1903.

**2. Verseifungszahl (Köttstorfersche Zahl),** d. h. die Milligramm KOH, welche nötig sind, um die in 1 g Fett enthaltenen und bei der Verseifung abgespaltenen Fettsäuren zu neutralisieren. Je höher die Verseifungszahl, desto höher der Gehalt des Fettes an Glyceriden niedriger Fettsäuren.

Man kocht eine abgewogene Menge Fett (1—2 g) mit 10 ccm einer  $\frac{n}{2}$ -Kalilauge und 50 ccm Alkohol in einem Kölbchen mit Steigrohr etwa  $\frac{1}{4}$  Stunde auf dem Wasserbad und titriert nach Zusatz von Phenolphthalein mit  $\frac{n}{2}$ -Säure zurück.

**3. Esterzahl,** d. h. die Milligramm KOH, welche nötig sind, um die bei der Verseifung von 1 g Fett abgespaltenen Fettsäuren zu neutralisieren.

Man erhält sie durch Subtraktion der Säurezahl von der Verseifungszahl. Bei neutralen Fetten fällt sie mit der Verseifungszahl zusammen. Sie wird um so größer sein, je mehr Ester niedriger Fettsäuren von kleinem Molekulargewicht in dem Fett enthalten sind.

**4. Reichert-Meißlsche Zahl,** d. h. die Anzahl Kubikzentimeter  $\frac{n}{10}$ -Lauge, welche zur Neutralisation der aus 5 g Fett nach der Verseifung erhaltenen flüchtigen Fettsäuren erforderlich sind.

Man verseift in einem etwa 200 ccm fassenden Kolben 5 g Fett mit etwa 2 g festem Ätzkali und 50 ccm 70 proz. Alkohols unter Schütteln auf dem Wasserbad, dampft bis zur völligen Entfernung des Alkohols ein, löst den Rückstand in 100 ccm Wasser, fügt 40 ccm Schwefelsäure (1 : 10) und einige hanfkorngroße Bimssteinstücke hinzu und destilliert unter Benutzung eines Kugelrohrs (zur Vermeidung des Überspritzens) und eines Liebigschen Kühlers genau 110 ccm ab. Von dem gut gemischtem Destillat filtriert man 100 ccm ab und titriert diese mit  $\frac{n}{10}$ -Lauge. Zu der verbrauchten Anzahl Kubikzentimeter addiert man noch den 10. Teil hinzu.

**5. Hehnersche Zahl,** d. h. die Menge in Wasser unlöslicher Fettsäuren, welche aus 100 g Fett nach der Verseifung erhalten werden.

Man verseift eine abgewogene Menge Fett (3—4 g) mit etwa 1,5—2 g festem Ätzkali und 50 ccm Alkohol in einer kleinen Schale im Wasserbad, verjagt den Alkohol, löst den Rückstand in etwa 150 ccm heißem Wasser und säuert mit verdünnter Schwefelsäure an. Jetzt füllt man ein vorher bei 100° getrocknetes und gewogenes Filter aus dichtem Papier halb mit heißem Wasser und gießt nun den Inhalt der Schale, welche man bis zum Schmelzen der Fettsäuren erhitzt hat, darauf. Wenn alle Fettsäuren auf das Filter gebracht sind, wäscht man mit heißem Wasser nach, bis das Filtrat nicht mehr sauer reagiert. Dazu sind manchmal 2—3 l Wasser erforderlich. Nun trocknet man bei 100°, wägt nach 2 Stunden und dann wieder nach 2 $\frac{1}{2}$  Stunden. Die Differenz ist dann meist kleiner als 1 mg. Eine völlige Konstanz ist nicht zu erreichen, längeres Trocknen unzweckmäßig.

**6. Jodzahl (Hübbsche Zahl),** d. h. die Gramm Jod, welche von 100 g Fett aufgenommen werden.

Da nur die Fette mit ungesättigten Fettsäuren Jod binden, so gibt die Hübbsche Zahl einen Anhaltspunkt zur Beurteilung der Menge ungesättigter Fettsäuren, die in den Fetten enthalten sind. Etwa vorhandenes Cholesterin bindet auch Jod.

Erforderliche Lösungen. 1. Jodlösung. Es werden einerseits 25 g Jod, andererseits 30 g Quecksilberchlorid in je 500 ccm 95 proz. reinem Alkohol gelöst. Nachdem letztere Lösung filtriert, vereinigt man beide. Eine Benutzung ist erst nach 24stündigem Stehen erlaubt, der Titer ist bei jedem Versuch festzustellen.

2. 10 proz. Jodkaliumlösung.

3. Stärkelösung (§ 20).

4. Reines Chloroform.

5. Natriumthiosulfatlösung, welche in einem Liter etwa 25 g des Salzes enthält.

6. Kaliumbichromatlösung, welche in einem Liter 3,8657 g reines Salz enthält. 20 ccm dieser Lösung machen 0,2 g Jod frei. Sie ist beliebig lange haltbar und dient zur Titerstellung der sich beim Stehen allmählich verändernden Thiosulfatlösung.

Titerstellung der Thiosulfatlösung nach Volhard. Man bringt 15 ccm der Jodkalilösung in eine Stöpselflasche, fügt 5 ccm Salzsäure hinzu, darauf 20 ccm der Kaliumbichromatlösung und dann aus der Bürette die Thiosulfatlösung, bis die Flüssigkeit nur noch weingelb ist. Jetzt gibt man etwas Stärkelösung hinzu und dann unter beständigem Umschütteln vorsichtig weitere Mengen Thiosulfatlösung, bis die Blaufärbung eben verschwindet. Die Anzahl der verbrauchten Kubikzentimeter der Thiosulfatlösung entspricht genau 0,2 g Jod.

Ausführung der Bestimmung. Man bringt die zuvor abgewogene Fettmenge (etwa 0,5 g) in eine 500—800 ccm fassende trockene, mit eingeriebenem Glasstopfen versehene Flasche, löst sie in etwa 15 ccm Chloroform und läßt 25 ccm Jodlösung zufließen. Wenn die Flüssigkeit nach dem Umschwenken nicht völlig klar ist, so wird noch etwas Chloroform hinzugefügt. Tritt in kurzer Zeit fast völlige Entfärbung ein, so sind noch 25 ccm Jodlösung zuzufügen. Die Flüssigkeit muß nach 2 Stunden noch stark braungefärbt sein. Am besten läßt man 6 Stunden stehen. Nun fügt man 20 ccm Jodkaliumlösung hinzu und nach dem Umschwenken 150 ccm Wasser. Scheidet sich jetzt ein roter Niederschlag von Quecksilberjodid ab, so ist noch mehr Jodkaliumlösung zuzusetzen. Man läßt nun unter häufigem Umschwenken so lange Thiosulfatlösung zufließen, bis die wässrige Flüssigkeit und die Chloroformlösung nur noch schwach gefärbt erscheinen, gibt etwas Stärkelösung hinzu und titriert zu Ende.

Unmittelbar vor oder nach der Titration ist der Versuch ganz in derselben Weise nur unter Weglassung des Fettes zu wiederholen, um den Titer der Jodlösung festzustellen.

7. Wasserstoffzahl (Erdmann und Bedford<sup>1)</sup>, d. h. die Gewichtsmenge Wasserstoff, welche durch 100 Gewichtsteile der ungesättigten Substanz aufgenommen werden kann. Man läßt die gewogene Substanz (etwa 5 g) auf Bimssteinstücke, welche mit metallischem Nickel imprägniert sind und sich in einem auf 170—200° erhitzten vertikalen Glasrohr befinden, auftropfen und leitet gleichzeitig Wasserstoff darüber. Man geht von einem genau gemessenen Volumen Wasserstoff aus und bestimmt den überschüssigen, d. h. zur Reduktion nicht verbrauchten, durch Überführung in Wasser wie bei der Elementaranalyse.

Die genaue Beschreibung und Abbildung des Apparates bei F. Bedford, Über die ungesättigten Säuren des Leinöls. Diss. Halle 1906, u. H. Meyer<sup>2)</sup>.

#### *Verseifung des Fettes und Isolierung der Spaltungsprodukte.*

94. Die Verseifung geschieht in der Regel entweder mit alkoholischer Kalilauge oder mit Natriumalkoholat.

Verseifung mit  
alkoholischer  
Kalilauge.

1. Verseifung mit alkoholischer Kalilauge nach E. Salkowski<sup>3)</sup>. Man löst 50 g Fett im Kolben unter Erwärmen in 50 ccm Alkohol von 90 Vol.-%, andererseits in einer Schale unter Erwärmen etwa 15 g Ätzkali in 10 ccm Wasser, gießt letztere Lösung in einen Kolben und spült mit 50 ccm Alkohol von 90 Vol.-% nach. Man erhitzt nun beide Lösungen zum beginnenden Sieden, vereinigt sie, schüttelt gut durch und erhitzt nochmals zum Sieden. Das Fett ist jetzt völlig verseift. Die alkoholische Lösung wird eingedampft.

<sup>1)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 42, 1, S. 1325. 1909.

<sup>2)</sup> Analyse und Konstitutionsermittlung. 4. Aufl. S. 1132. 1922.

<sup>3)</sup> Zentralbl. f. d. med. Wissensch. 1893, S. 467.

2. Verseifung mit Natriumalkoholat nach Kossel, Obermüller und Krüger<sup>1)</sup>. 5 g Fett werden in einem geräumigen Kolben mit 10—20 ccm absolutem Alkohol übergossen, auf dem Wasserbad erwärmt, bis das Fett geschmolzen, 10—15 ccm Alkoholatlösung\*) zugefügt, auf stark siedendem Wasserbad der Alkohol verdunstet und der Rückstand noch kurze Zeit erhitzt.

Verseifung mit  
Natriumalkoholat.

Der nach der einen oder anderen Weise erhaltene Rückstand wird in viel Wasser gelöst und die Lösung zur Entfernung des Cholesterins mit Äther ausgeschüttelt.

Der Ätherrückstand enthält außer Cholesterin noch etwas Seife, welche durch Waschen mit wässrigem kaltem Alkohol unter Zusatz eines Tropfens Salzsäure entfernt werden kann.

Die wässrige Lösung wird mit Schwefelsäure angesäuert und mit Äther ausgeschüttelt. Man erhält so eine ätherische Lösung (1), welche die Fettsäuren enthält, und eine wässrige schwefelsaure (2), welche das Glycerin enthält.

Trennung der  
Spaltungsprodukte.

1. Die ätherische Lösung. Ihre weitere Behandlung zur Isolierung der einzelnen höheren Fettsäuren\*\*) geschieht nach § 81.

Enthält das untersuchte Fett auch Triglyceride niedriger Fettsäuren, so wird zur Trennung der Fettsäuren nach § 80 verfahren.

2. Die wässrige schwefelsaure Lösung wird mit Bariumcarbonat neutralisiert, auf dem Wasserbad zu sehr kleinem Volumen eingedampft und mit Alkohol behandelt. Das alkoholische Filtrat wird eingedampft, der Rückstand durch mehrmaliges Aufnehmen mit Alkohol, Filtrieren und Eindampfen gereinigt. Zuletzt versetzt man die alkoholische Lösung mit dem gleichen Volumen Äther, läßt eine Zeitlang stehen, filtriert und verdunstet. Es bleibt Glycerin zurück, dessen Prüfung nach § 59 geschieht.

#### *Bestimmung des Glycerins im Fett.*

95. Das Verfahren von Zeisel und Fanto beruht auf der Überführung des Glycerins durch kochende Jodwasserstoffsäure in Isopropyljodid, dessen Dampf, von begleitendem Jod und Jodwasserstoff durch Passieren einer Aufschwemmung von rotem Phosphor in 10 proz. Natriumarsenitlösung befreit, in eine alkoholische Silbernitratlösung eingeleitet wird. Das dabei entstehende Jodsilber wird gewogen und aus seiner Menge die Menge des Glycerins berechnet. Dieses Verfahren, dessen Einzelheiten bei Tangel und Weiser<sup>2)</sup> angegeben sind, kann man direkt auf das Fett anwenden, wenn man nach Willstätter<sup>3)</sup> kleine Fettmengen (0,15—0,35 g) und 10 ccm einer Jodwasserstoffsäure von 1,8 spezifischem Gewicht anwendet und mäßig und genügend lange erhitzt. Man erwärmt also nur auf 100° bis gegen 115° (Badtemperatur), bis die Reaktion eintritt, die an starker Jodausscheidung und der Fällung der Silberlösung kenntlich wird, hält die Temperatur solange (20—40 Minuten) konstant, bis die Silberlösung sich wieder geklärt hat und die Zersetzung so gut wie beendet ist, steigert jetzt die Badtemperatur auf 130—140° und erhitzt noch mindestens 1 Stunde.

#### **Tierische Wachse.**

96. Ester einwertiger höherer Alkohole mit höheren Fettsäuren, beim Erhitzen mit alkoholischer Lauge verseifbar, finden sich z. B. im Walrat, Bienenwachs,

\*) Jedesmal frisch zu bereiten, indem man 5 g blankes metallisches Natrium in 100 ccm absolutem Alkohol ohne Abkühlen auflöst und den verdunsteten Alkohol wieder ersetzt.

\*\*) Beabsichtigt man nur eine Abtrennung der Hauptmenge der festen Fettsäuren (Stearinsäure, Palmitinsäure) von den bei gewöhnlicher Temperatur flüssigen, so löst man den Ätherrückstand in heißem Alkohol, filtriert und läßt erkalten. Die Abscheidung besteht aus festen Fettsäuren, während die flüssigen Säuren und ein Teil der festen Säuren in Lösung bleiben.

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 14, S. 599. 1890 u. Bd. 15, S. 321. 1891.

<sup>2)</sup> Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 115, S. 152. 1906.

<sup>3)</sup> Willstätter u. Madinaveitia: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 45, 2, S. 2825. 1912.

Psyllawachs. Das Walrat, aus dem im Kopf verschiedener Wale enthaltenen Walratöl beim Erkalten auskrystallisierend, besteht hauptsächlich aus Palmitinsäurecerylester (Fp. 53,5°) und zeigt die Löslichkeitsverhältnisse der Fette. Das Bienenwachs enthält u. a. Myricin (Palmitinsäuremyricylester).

### Kohlenhydrate.

Bei der Untersuchung der tierischen Organe und Flüssigkeiten kommen von Kohlenhydraten folgende in Betracht, die sich in ihnen teils normaler-, teils pathologischerweise in freiem oder in gebundenem Zustande oder in beiden Formen finden: von Monosacchariden die Aldopentosen Arabinose, d-Ribose, l-Xylose, die Aldoheptosen d-Glucose und d-Galaktose, die Ketoheptose d-Fructose; von Disacchariden Milchzucker, Maltose; von Polysacchariden, Glykogen, Dextrine; ferner die den Aldoheptosen nahestehenden d-Glucuronsäure, d-Glucosamin, Chondrosamin.

Sie sind in Wasser löslich (das Glykogen nur kolloidal). Sie werden aus ihren wässrigen Lösungen nicht gefällt durch Alkohol (außer Glykogen), neutrales Bleiacetat (Glykogen gibt Trübung), basisches Bleiacetat (außer Glykogen und Glucuronsäure), gefällt durch basisches Bleiacetat + Ammoniak. Die allgemeinen Eiweißfällungsmittel fallen nicht (außer Glykogen, das z. B. durch Phosphorwolframsäure und Quecksilberjodidjodkalium + Salzsäure gefällt wird). Auch Mercuriacetat + Natriumcarbonat, durch das Aminosäuren, Peptide und Peptone ausfallen, fallen die hier in Betracht kommenden Körper nicht (mit Ausnahme des Glucosamins).

Reaktion von  
Molisch.

97. Alle Kohlenhydrate geben schon in kleinster Menge die Reaktion von Molisch<sup>1)</sup>. Versetzt man etwa 0,5 ccm einer Lösung in einem Reagensglas mit 1—2 Tropfen einer 10proz. Lösung von reinem  $\alpha$ -Naphthol in reinem Alkohol, mischt und unterschichtet mit 1 ccm reiner konzentrierter Schwefelsäure, so entsteht an der Berührungsfläche eine violette Färbung. Beim Mischen unter der Wasserleitung färbt sich die ganze Flüssigkeit rot- bis blauviolett.

Salzsaures Glucosamin gibt diese Reaktion nicht, Glucuronsäure eine Grünfärbung.

Alle Kohlenhydrate, welche eine freie Aldehyd- oder Ketogruppe enthalten, geben die Mooresche Probe und die sog. Reduktionsproben (Trommersche, Böttgersche Probe).

Mooresche Probe. Beim Erhitzen mit Natronlauge tritt Gelb- und Braunrotfärbung ein, bei längerem Kochen und größerem Zuckergehalt Dunkelbraun- bis Schwarzfärbung. Gleichzeitig auftretender Caramelgeruch wird beim Ansäuern noch deutlicher.

Trommersche  
Probe.

Trommersche Probe. Man versetzt die Lösung mit überschüssigem Alkali und fügt dann unter gutem Umschütteln so lange tropfenweise eine verdünnte Lösung von Cuprisulfat hinzu, als der entstehende Niederschlag sich in der Flüssigkeit wieder auflöst und erhitzt dann allmählich bis zum Sieden. Enthält die Flüssigkeit ein solches Kohlenhydrat, so löst sie reichlich Cuprihydroxid zur dunkelblauen Farbe, und es scheidet sich beim Kochen reichlich der gelbe oder rote Niederschlag von Cuprooxyd aus. Ist mehr Zucker in der Flüssigkeit als das zugefügte Cuprioxyd zu oxydieren vermag, so wirkt das freie Alkali auf den übrigen Zucker ein und die Flüssigkeit färbt sich allmählich beim Sieden gelb bis braunrot. Hat man dagegen mehr Cuprioxyd hinzugefügt als der Zucker zu reduzieren vermag, so scheidet sich beim Kochen auch schwarzes Cuprioxyd aus und dies verdeckt dann leicht das gleichzeitig ausgeschiedene Cuprooxyd. Man hat sich deshalb wohl in acht zu

<sup>1)</sup> Monatshefte f. Chem. Bd. 7, S. 198. 1886.



nehmen vor zu großem Überschuß der Kupferlösung, während Alkali, in großem Überschuße angewendet, der Reaktion keinen Eintrag tut. Bei Verwendung von Fehlingscher Lösung (§ 599) schadet ein Überschuß von Kupfer nicht.

Böttgersche Probe. Man fügt zu der Lösung etwa den 10. Teil des Reagens von Almén-Nylander<sup>1)</sup> (dargestellt durch Lösen von 4 g Seignettesalz in 100 g 10proz. Natronlauge, Behandeln dieser Lösung mit 2 g Bismuthum subnitricum auf dem Wasserbad und Abfiltrieren des nicht in Lösung gehenden Wismutsalzes) und kocht 2 Minuten. Die Flüssigkeit färbt sich gelb, gelbbraun und schwarz, und es scheidet sich ein schwarzer Niederschlag von metallischem Wismut ab.

Ebenso wird auch alkalische Quecksilberlösung, alkalische Indigo-lösung in der Hitze und ammoniakalische Silberlösung schon in der Kälte reduziert.

Weiter ist zum Nachweis und zur Unterscheidung der einzelnen Kohlenhydrate das Verhalten zu Hefe, zum polarisierten Licht und zu Säuren (§§ 99 u. 100) zu benutzen.

98. Gärprobe. Man verteilt in der (zweckmäßig mit Weinsäure schwach angesäuerten) Flüssigkeit etwas Hefe und bringt sie entweder in ein Gärröhrchen, dessen langer Schenkel völlig mit ihr angefüllt und durch Eingießen von etwas Quecksilber abgeschlossen wird, oder auch in ein Reagensglas, das völlig mit ihr angefüllt, durch Aufsetzen des Fingers verschlossen und umgekehrt in eine mit Quecksilber gefüllte Schale gesetzt wird. Bei Zimmertemperatur, schneller bei 30—35°, erfolgt Gärung, d. h. Zerfall des Zuckers in Alkohol und Kohlensäure ( $C_6H_{12}O_6 = 2 C_2H_5OH + 2 CO_2$ ), welche am nächsten Tage beendet ist. Beim Schütteln mit starker Kalilauge wird das Gas fast völlig absorbiert. Um sich vor Irrtum zu hüten, ist es zweckmäßig, in einem Kontrollversuch, den man mit Wasser und Hefe in derselben Weise anstellt, die Hefe auf etwaige Beimengung von gärunsfähigem Zucker zu prüfen. Auch ist zu berücksichtigen, daß Hefe auch in völlig zuckerfreien Lösungen geringe Mengen von Gas liefert (Selbstgärung der Hefe).

Glucose, Fructose, Maltose gären, Galaktose auch, aber langsamer und nur bei Anwesenheit von Hefedekokt; Pentosen, Glykogen, Dextrine, Glucuronsäure, Glucosamin gären nicht, Milchzucker mit gewöhnlicher Bierhefe ebenfalls nicht.

Polarisationsprobe. Man untersucht die Lösung im Polarisationsapparat (§§ 31—34) auf optische Aktivität.

l-Arabinose, l-Xylose, d-Glukose, d-Galactose, Maltose, Milchzucker, Glykogen, Dextrine, d-Glucuronsäure, d-Glucosamin drehen rechts, d-Ribose, d-Fructose drehen links.

99. Für die Unterscheidung der Ketosen (Fructose) von den Aldosen kann man das Verhalten zu konzentrierter Schwefelsäure benutzen. Unterschichtet man eine Fructoselösung vorsichtig mit konzentrierter Schwefelsäure, so tritt an der Berührungsstelle Braunfärbung auf; Glucose-, Milchzucker-, Maltoselösungen färben sich bei gleicher Behandlung nicht. Ferner die Reaktionen von Seliwanoff und von Plaisance.

Reaktion von Seliwanoff<sup>2)</sup>. Kocht man eine Fructoselösung, welche 12% Chlorwasserstoff enthält (nicht mehr) 20 Sekunden mit etwas Resorcin, so tritt Rotfärbung ein. Aldoselösungen färben sich unter diesen Bedingungen nicht.

Sehr empfehlenswert ist die von Weehuizen<sup>3)</sup> angegebene Modifikation, nach der man die zum Syrup eingedampfte Lösung oder den trockenen Zucker

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 8, S. 175. 1883/84.

<sup>2)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 20, 1, S. 181. 1887. — Ofner: Monatshefte f. Chem. Bd. 25, S. 611. 1904.

<sup>3)</sup> Recueil des travaux chim. des Pays-Bas Bd. 37, S. 302. 1918.

mit einigen Kubikzentimetern mit Salzsäuregas bei 0° gesättigtem absoluten Alkohol und etwas Resorcin bei gewöhnlicher Temperatur schüttelt: kirschrote Färbung innerhalb von 3 Minuten.

Reaktion von  
Plaisance.

Reaktion von Plaisance<sup>1)</sup>. Erhitzt man eine Fructoselösung, welche 12% Chlorwasserstoff enthält, bis zum beginnenden Sieden, kühlt ab und fügt eine Lösung von Thiobarbitursäure in 12proz. Salzsäure hinzu, so bildet sich beim Stehen ein orangegelber Niederschlag. Aldoselösungen geben bei gleicher Behandlung mitunter eine gelbe Färbung, aber keinen Niederschlag.

In beiden Reaktionen beruht die Reaktion auf der Bildung von Oxymethylfurfurol, welches aus Aldosen zwar auch, aber in sehr viel geringerer Menge durch Salzsäure gebildet wird (v. Ekenstein und Blanksma<sup>2)</sup>).

Reaktionen auf  
Pentosen und  
Glucuronsäure.

100. Die Pentosen und die Glucuronsäure geben beim Erhitzen mit Salzsäure reichliche Mengen Furfurol und unterscheiden sich dadurch von den Hexosen, welche hierbei Lävulinsäure liefern. Sie geben ferner folgende beide Reaktionen, die zur Erkennung von Pentosen und Glucuronsäure dienen:

Orcin-Salzsäure-  
reaktion.

1. Orcin-Salzsäurereaktion<sup>3)</sup>. Man versetzt die zu untersuchende Flüssigkeit mit dem gleichen Volumen konzentrierter Salzsäure bzw. übergießt, wenn es sich um eine feste Substanz handelt, eine kleine Probe derselben mit Wasser und dem gleichen Volumen konzentrierter Salzsäure, fügt eine kleine Menge Orcin hinzu und erhitzt. Bei Anwesenheit von Pentosen (oder Glucuronsäure) färbt sich die Flüssigkeit rötlichblau und zeigt einen scharfen Absorptionsstreifen zwischen *C* und *D* nahe an *D*. Es entsteht bald eine bläuliche Färbung, deren zunächst rote, später schön grüne, amyalkoholische Lösung denselben Streifen erkennen läßt. Auch Pentosazone geben die Reaktion.

Phloroglucin-  
Salzsäure-  
reaktion.

2. Phloroglucin-Salzsäurereaktion<sup>4)</sup>. Man verfährt ebenso wie bei der Orcinprobe, nimmt nur statt des Orcins Phloroglucin. Die Flüssigkeit färbt sich kirschrot und zeigt bei schneller Untersuchung einen Streifen zwischen *D* und *E*. Da nach kurzer Zeit Trübung eintritt, ist es zweckmäßig, die Probe schnell abzukühlen, mit Amyalkohol gelinde zu schütteln und nun die amyalkoholische Lösung, welche den Farbstoff aufgenommen hat, spektroskopisch zu prüfen. Rhamnose gibt die Reaktion nicht.

Über Farben- und Spektralerscheinungen bei Ausführung dieser Probe in alkoholischer Lösung s. Pinoff<sup>5)</sup>. Modifikationen beider Reaktionen sind von Bial<sup>6)</sup>, A. Neumann<sup>7)</sup>, R. u. O. Adler<sup>8)</sup> u. a. angegeben worden.

Reaktionen mit  
Phenylhydrazin.  
 $\text{CH}=\text{N}-\text{NH}-\text{C}_6\text{H}_5$   
 $\text{(CHOH)}_4$   
 $\text{CH}_2\text{OH}$   
 Phenylglucosohydrazon.

101. Für die Isolierung und Charakterisierung der hierhergehörigen Substanzen, soweit sie eine Aldehyd- oder Ketogruppe enthalten, sind die Verbindungen mit Phenylhydrazin und substituierten Phenylhydrazinen (z. B. p-Bromphenylhydrazin, und die asymmetrisch substituierten Methylphenylhydrazin, Benzylphenylhydrazin, Diphenylhydrazin u. a.) von Bedeutung (E. Fischer). Sie reagieren mit 1 Mol. eines solchen Hydrazins unter Bildung von Hydrazonen\*) oder mit 2 Mol. unter Bildung von

\*) Sie entstehen, indem die Aldehyd- oder Ketogruppe mit der Aminogruppe unter Wasseraustritt zusammentreten.

<sup>1)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 29, S. 207; ref. Chem. Zentralbl. 1917, II, S. 776.

<sup>2)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 43, 2, S. 2355. 1910.

<sup>3)</sup> Allen u. Tollens: Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 260, S. 305. 1890. — Salkowski: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 27, S. 514. 1899.

<sup>4)</sup> Tollens u. Mitarbeiter: Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 254, S. 333. 1889 u. Bd. 260, S. 304. 1890. Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 29, 2, S. 1202. 1896. — Salkowski: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 27, S. 509. 1899.

<sup>5)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 38, 1, S. 766. 1905.

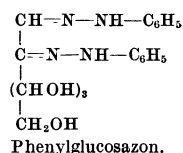
<sup>6)</sup> Dtsch. med. Wochenschr. Bd. 28, S. 253. 1902 u. Bd. 29, S. 477. 1903.

<sup>7)</sup> Berl. klin. Wochenschr. 1904, S. 1073.

<sup>8)</sup> Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 106, S. 323. 1905.

Osazonen\*). Die Hydrazone (des Phenylhydrazins) sind in Wasser löslich, die Osazone scheiden sich krystallinisch ab.

Zur Darstellung des Phenylglucosazons z. B. bringt man 1 Tl. Glucose in 20 Tl. Wasser gelöst zusammen mit 2 Tl. reinem salzsauren Phenylhydrazin\*\*) und 3 Tl. wasserhaltigem Natriumacetat und erhitzt im kochenden Wasserbad. Nach 10—15 Minuten beginnt die Ausscheidung gelber, zu Büscheln vereinigter Nadeln des Glucosazons (E. Fischer<sup>1</sup>) und beträgt nach 1¼ Stunden 85—90% des Zuckers. Zum Umkrystallisieren benutzt man Alkohol, in manchen Fällen ist auch Essigester geeignet. Fructose und Glucosamin bilden Osazone, welche mit dem des Traubenzuckers identisch sind. Im übrigen unterscheiden sich die einzelnen Osazone in der Löslichkeit (manche scheiden sich erst beim Abkühlen aus), im Schmelzpunkt\*\*\*), im Verhalten zum polarisierten Licht, im Verhalten zu Fermenten. S. darüber die Angaben bei den einzelnen Zuckern. Aus den Osazonen lassen sich die Zucker nicht wiedergewinnen.



Zur Darstellung z. B. des Arabinosebenzylphenylhydrazons bringt man 1 g Arabinose und 1,4 g  $\alpha$ -Benzylphenylhydrazin (molekulare Mengen) in einigen Kubikzentimetern 75proz. Alkohol warm gelöst zusammen, worauf sofort das Hydrazon krystallisiert. In anderen Fällen arbeitet man besser in wässriger oder essigsaurer Lösung. Die einzelnen Hydrazone unterscheiden sich in Löslichkeit, Schmelzpunkt usw. S. die einzelnen Zucker.

Um aus den Hydrazone die Zucker wieder zu gewinnen, erhitzt man eine Stunde oder länger im Wasserbad mit Formaldehyd, entfernt das gebildete Formaldehydhydrazon durch Ausschütteln mit Äther und den überschüssigen Formaldehyd durch wiederholtes Abdampfen (Ruff u. Ollendorf<sup>2</sup>).

Ausführliche Angaben über die Trennung der Monosaccharide und der Glucuronsäure voneinander mit Hilfe ihrer Hydrazone und Osazone s. bei van der Haar<sup>3</sup>).

#### Pentosen.

Die Pentosen, früher nur als Spaltungsprodukte im Pflanzenreich vorkommender Kohlenhydrate (besonders Gummiarten) bekannt, sind zuerst von E. Salkowski<sup>4</sup>) in kleinen Mengen in einigen Fällen im menschlichen Harn, dann von Külz und Vogel<sup>5</sup>) sehr häufig im diabetischen Harn, auch im Harn von Hunden nach Pankreasextirpation oder nach Phloridzinzugaben nachgewiesen. Inzwischen ist Pentose in einer ganzen Reihe von Fällen im menschlichen Harn gefunden worden (Pentosurie).

Pentose, und zwar d-Ribose, ist unter den hydrolytischen Spaltungsprodukten der Guanylsäure, Inosinsäure und der Hefenucleinsäure mit Sicherheit nachgewiesen. Über Nachweis im Harn s. § 604 und in Organen s. § 750.

\*) Sie entstehen, indem zunächst im Hydrazon die der ursprünglichen Aldehyd- bzw. Keto-Gruppe benachbarte sekundäre bzw. primäre Alkoholgruppe durch ein zweites Molekül Hydrazin zur Keto- bzw. Aldehydgruppe oxydiert werden und nun diese so entstandenen Gruppen mit der Aminogruppe eines dritten Hydrazinmoleküls unter Wasseraustritt zusammentreten.

\*\*) Das meist stark gefärbte Präparat ist aus heißem Alkohol umzukrystallisieren, bis es ganz farblos ist.

\*\*\*) Bei der Schmelzpunktbestimmung erhitzt man zweckmäßig schnell (1° Temperatursteigerung in 2 bis 3 Sekunden) (E. Fischer<sup>6</sup>).

<sup>1</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 17, 1, S. 579. 1884 u. Bd. 20, 1, S. 821. 1887.

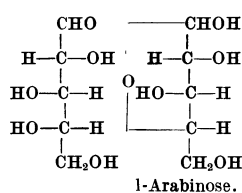
<sup>2</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 32, 3, S. 3234. 1899.

<sup>3</sup>) Anleitung zum Nachweis, zur Trennung und Bestimmung der reinen und aus Glucosiden usw. erhaltenen Monosaccharide und Aldehydsäuren. Berlin: Gebr. Bornträger 1920.

<sup>4</sup>) Zentralbl. f. d. med. Wissensch. 1892, S. 337 u. 593, besonders Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 27, S. 507. 1899.

<sup>5</sup>) Zeitschr. f. Biol. Bd. 32, S. 185. 1895.

<sup>6</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 41, 1, S. 75. 1908.



102. Arabinose  $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_5$ . Von den 3 Modifikationen ist die l-Arabinose durch Hydrolyse von arabischem oder Kirschgummi (Kilian und Köhler<sup>1</sup>), die d-Arabinose auf synthetischem Wege (Wohl<sup>2</sup>), Neuberg und Wohlgemuth<sup>3</sup>), die d,l-Arabinose durch Vereinigung gleicher Mengen d- und l-Arabinose erhalten worden. Ein Verfahren zur Zerlegung der d,l-Arabinose in die beiden optisch-aktiven ist von Neuberg und Federer<sup>4</sup>) angegeben worden.

Vorkommen. d,l-Arabinose ist von Neuberg<sup>5</sup>) im Harn eines Pentosurikers festgestellt worden und auch von Aron<sup>6</sup>).

In vielen anderen Fällen<sup>7</sup>) ist die Natur der Harnpentose noch nicht mit Sicherheit bestimmt worden. Nach Neuberg<sup>8</sup>) kommt sie nur zum Teil in freiem Zustande, zum Teil als Harnstoffverbindung vor. Im normalen menschlichen Harn kann sie auch in kleinen Mengen, aus der Nahrung stammend, auftreten.

Darstellung aus Pentoseharn. Zur Isolierung dampfte Neuberg\*) eine größere Menge Pentoseharn im Vakuum bei etwa 36° auf ein kleines Volumen ein, entfernte durch Zusatz von viel Alkohol die Hauptmenge der anorganischen Salze, wiederholte mit der alkoholischen Lösung diese Operation, bis schließlich eine Flüssigkeit erhalten wurde, die außer Pentose nur noch reichliche Mengen von Harnstoff und Kreatinin enthielt. Aus dieser Lösung schied sich auf Zusatz von Diphenylhydrazin beim Erwärmen ein Krystallbrei aus, der abfiltriert, mit wenig kaltem Alkohol gewaschen und portionsweise aus viel 50proz. wässrigen Pyridin unter Zusatz von etwas Tierkohle umkrystallisiert wurde. Aus diesem Diphenylhydrazon wurde durch Spaltung mittels Formaldehyd der Zucker regeneriert, zunächst als Sirup, der allmählich im Vakuum krystallisierte.

Eigenschaften. Arabinose krystallisiert in farblosen Prismen von süßem Geschmack, in Wasser löslich, und zwar löst sich bei 10° die aktive wie 1 : 1,7, die inaktive wie 1 : 5,9 (Ruff<sup>9</sup>), in absolutem Alkohol fast unlöslich. Nach dem Trocknen im Vakuum über Phosphorpentoxyd bei etwa 70° schmilzt die aktive bei 156 bis 157°, die inaktive bei 161—162° (Ruff). Aus wässriger Lösung wird sie durch Bleiessig und Ammoniak gefällt, aus Harn nach R. und O. Adler<sup>10</sup>) zum Teil auch durch Bleiessig. Sie reduziert Fehlingsche Lösung ein wenig schwächer als Glucose. Genauere Angaben bei Weiser und Zaitschek<sup>11</sup>). Sie gibt die Mooresche und die Reduktionsproben (§ 97) sowie die Orcin und Phloroglucinreaktion (§ 100), beim Kochen mit Salzsäure Furfurol.

Verbindungen; mit Phenylhydrazin. Arabinosephenylosazon  $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_3$  (§ 101) scheidet sich nach längerem Erhitzen beim Erkalten in gelben Nadeln ab. Das Osazon der aktiven Arabinose schmilzt bei 159—160° (Wohl), nach wiederholtem Umkrystallisieren aus wässrigem Alkohol und wässrigem Aceton bei 165—166° (v. d. Haar<sup>12</sup>), das der inaktiven (rasch erhitzt) bei 166—167° (E. Fischer<sup>13</sup>). Es löst sich leicht in heißem Wasser und läßt sich dadurch auch zu einem gewissen Grade von anderen Osazonen, z. B. dem Glucosazon, trennen. 0,2 g l-Arabinosazon, gelöst in 6 ccm absolutem Alkohol + 4 ccm gereinigtem Pyridin, dreht im Dezimeterrohr +1° 10' (Neuberg<sup>14</sup>). 0,1 g l-Osazon in 5 ccm Pyridin-Alkoholmischung im

\*) Einzelheiten s. im Original<sup>15</sup>).

<sup>1</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 37, S. 1210. 1904. <sup>2</sup>) desgl. Bd. 26, S. 730. 1894.

<sup>3</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 35, S. 31. 1902.

<sup>4</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 38, S. 868. 1905. <sup>5</sup>) desgl. Bd. 33, S. 2243. 1900.

<sup>6</sup>) Monatsschrift f. Kinderheilk. Bd. 12, S. 177. 1914.

<sup>7</sup>) Siehe Elliott u. Raper: Journ. of biol. chem. Bd. 11, S. 211. 1912. — Levene u. la Forge: desgl. Bd. 15, S. 481. 1913 u. Bd. 18, S. 319. 1914. — af Klercker: Dtsch. Arch. f. klin. Med. Bd. 108, S. 277. 1912. — Zerner u. Waltuch: Monatshefte f. Chem. Bd. 34, S. 1639. 1913 u. Bd. 35, S. 1025. 1914. Biochem. Zeitschr. Bd. 58, S. 410. 1914.

<sup>8</sup>) Ergebn. d. Physiol. Bd. 3, 1, S. 408. 1904.

<sup>9</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 32, S. 550. 1899.

<sup>10</sup>) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 110, S. 99. 1905. <sup>11</sup>) desgl. Bd. 93, S. 98. 1902.

<sup>12</sup>) Anleitung zum Nachweis usw., der Monosaccharide. Berlin: Bornträger. 1920. S. 211.

<sup>13</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 27, 2, S. 2486. 1894. <sup>14</sup>) desgl. Bd. 32, 3, S. 3386. 1899.

<sup>15</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 33, 2, S. 2243. 1900.

0,5-Dezimeterrohr  $[\alpha]_D$  gleich nach der Lösung  $+0,55^\circ$ , nach 18 Stunden  $+0,30^\circ$  (Levene und la Forge<sup>1</sup>).

Arabinose-p-Bromphenylosazon  $C_{17}H_{18}N_4O_3Br_2$  entsteht unter denselben Bedingungen wie das Phenylosazon und scheidet sich zum Teil schon in der Wärme ab. Schmelzpunkt für das aus aktiver und inaktiver Arabinose gewonnene Osazon um  $200^\circ$  (Neuberg<sup>2</sup>). Rewald<sup>3</sup>) fand für l-Osazon  $180^\circ$ , v. d. Haar nach Reinigen mit Hilfe von Pyridin  $185^\circ$ .

Arabinose-p-Bromphenylhydrazon  $C_{11}H_{15}N_2O_4Br$  scheidet sich in feinen farblosen Nadeln ab, wenn man eine frisch hergestellte Lösung von 1 Tl. p-Bromphenylhydrazin, 3,5 Tl. 50proz. Essigsäure und 12 Tl. Wasser mit einer 1proz. Arabinoselösung (auf 1 Tl. Arabinose ungefähr 2 Tl. Hydrazin) versetzt. Die Ausscheidung beginnt bei Zimmertemperatur schon nach  $\frac{1}{2}$  Stunde (E. Fischer<sup>4</sup>, Neuberg<sup>5</sup>). Es löst sich in heißem Wasser, schwerer in heißem Alkohol und wird aus 50proz. Alkohol umkrystallisiert. Schmelzpunkt für das aus aktiver und inaktiver Arabinose gewonnene Hydrazon  $165^\circ$  (korr.) oder einige Grade höher. Zur Trennung von Traubenzucker, Fruchtzucker und Xylose geeignet (E. Fischer). Diese geben kein sich abscheidendes Hydrazon. Glucuronsäureanhydrid verhält sich wie Arabinose; indessen bleibt dessen Bromhydrazonverbindung bei 1—2 maligen Umkrystallisieren aus 50proz. Alkohol in Lösung, läßt sich also leicht entfernen (v. d. Haar).

Arabinose-Diphenylhydrazon  $C_{17}H_{20}N_2O_4$  scheidet sich in feinen farblosen Nadeln ab beim Erwärmen molekularer Mengen von Arabinose und Diphenylhydrazin in alkoholischer Lösung auf dem Wasserbad (Neuberg<sup>5</sup>), Neuberg und Wohlgemuth<sup>6</sup>), in kaltem Wasser und kaltem Alkohol unlöslich, in heißem Wasser und heißem Alkohol nur schwer löslich. Beim schnellen Erhitzen schmilzt das aus aktiver Arabinose gewonnene Hydrazon bei  $216\text{—}218^\circ$  (nach Tollens<sup>7</sup>) bei  $204\text{—}205^\circ$ , das aus inaktiver gewonnene bei  $206^\circ$ . Wegen seiner Schwerlöslichkeit ist es für die Isolierung und Unterscheidung der Arabinose von Xylose sehr geeignet. Aus ihm läßt sich mittels Formaldehyd (Ruff und Ollendorff<sup>8</sup>) oder mittels Benzaldehyd (Herzfeld<sup>9</sup>) die Arabinose wieder gewinnen.

l-Arabinosebenzylphenylhydrazon  $C_{18}H_{22}N_2O_4$  krystallisiert nach Zusammenbringen der Komponenten in 75proz. Alkohol sofort aus, Fp.  $174^\circ$  (Lobry de Bruyn und v. Ekenstein<sup>10</sup>). Ruff und Ollendorff).

l-Arabinosediphenylmethandimethyldihydrazon  $CH_2[C_6H_4N(CH_3)N:C_5H_{10}O_4]_2$  scheidet sich aus wässerig-essigsaurer und wässerig-alkoholischer Lösung beider Komponenten als feines leichtes Pulver ab, in Alkohol fast unlöslich, in Pyridin löslich. Fp.  $180^\circ$  unter Aufschäumen. Xylose, Glucose, Fructose geben keine Abscheidung, aber Galaktose, Rhamnose und d-Ribose (v. Braun<sup>11</sup>).

l-Arabinose-m-tolyhydrazon  $C_{12}H_{18}O_4N_2$  leichtlöslich in Alkohol und warmem Wasser, wenig in kaltem (v. d. Haar<sup>12</sup>).

<sup>1</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 20, S. 429. 1915.

<sup>2</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 32, 3, S. 3387. 1899 u. Bd. 33, 2, S. 2243. 1900.

<sup>3</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 42, 3, S. 3134. 1909. <sup>4</sup>) desgl. Bd. 27, 2, S. 2490. 1894.

<sup>5</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 33, 2, S. 2243. 1900.

<sup>6</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 35, S. 31. 1902.

<sup>7</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 37, 1, S. 311. 1904 u. Bd. 38, 1, S. 500. 1905.

<sup>8</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 32, 3, S. 3234. 1899. <sup>9</sup>) desgl. Bd. 28, 1, S. 442. 1895.

<sup>10</sup>) Recueil des travaux chim. des Pays-Bas Bd. 15, S. 97 u. 227. 1897.

<sup>11</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 43, 2, S. 1495. 1910.

<sup>12</sup>) Recueil des travaux chim. des Pays-Bas Bd. 39, S. 191; ref. Chem. Zentralbl. 1921, I. S. 831.

Optische Eigen-  
schaften.

Bei Benutzung von etwa 10proz. Lösungen fand v. Lippmann<sup>1)</sup> (in Übereinstimmung mit anderen) für l-Arabinose  $[\alpha]_D^{20} = +105,4^\circ$ , Ruff für d-Arabinose  $[\alpha]_D^{20} = -105,1^\circ$ , Wohl für d-Arabinose  $[\alpha]_D^{20} = -104,1^\circ$ . Beide zeigen Mutarotation.

Umwandlungen.

Sie gärt nicht mit Hefe (§ 98). Beim Erwärmen mit schwacher Natronlauge geht l-Arabinose in l-Ribose über (v. Ekenstein und Blankma<sup>2)</sup>, durch Zinkhydroxydammoniak entsteht aus ihr Methylimidazol (Windaus<sup>3)</sup>, beim Erhitzen mit Natronlauge u. a. auch Milchsäure, bei der Oxydation mit Brom l-Arabinonsäure, bei der Oxydation mit Salpetersäure je nach den Versuchsbedingungen l-Arabin- oder Trioxyglutarsäure.

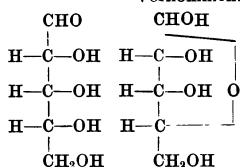
Nachweis.

Für Nachweis und Isolierung eignen sich außer den oben angeführten Reaktionen das Bromphenylhydrazon, das Diphenylhydrazon, das Benzylphenylhydrazon und das Diphenylmethandimethyldihydrazon.

Über Nachweis im Harn s. § 604.

Vorkommen.

103. **d-Ribose**  $C_5H_{10}O_5$ . Von den 3 Modifikationen ist d-Ribose als Baustein der Guanylsäure, Inosinsäure und Hefenucleinsäure nachgewiesen worden (Levene und Jacobs<sup>4)</sup>, Haiser und Wenzel<sup>5)</sup>, v. Braun<sup>6)</sup>, v. Ekenstein und Blankma<sup>7)</sup>). Synthetisch wurde sie zuerst von E. Fischer und Piloty<sup>8)</sup> dargestellt, in krystallisiertem Zustande (und zwar d- und l-Ribose) von v. Ekenstein und Blankma<sup>9)</sup>. Die inaktive krystallisiert aus der eingeeengten Lösung gleicher Mengen der d- und l-Ribose über Schwefelsäure (v. Ekenstein und Blankma).



Darstellung.

Zur Darstellung der d-Ribose geht man von Guanodin oder Adenosin aus (Levene<sup>10)</sup>). Über eine zweckmäßige Darstellung aus Guanodin s. § 272.

Eigenschaften.

d-Ribose, Krystalle, Fp.  $95^\circ$ , in Wasser leichtlöslich, fällbar durch Bleiessig + Ammoniak. Sie gibt die Mooresche und die Reduktionsproben (§ 97) sowie die Phloroglucin- und Orcinsalzsäurereaktion (§ 100), beim Kochen mit Salzsäure Furfurol.

Verbindungen:  
mit p-Bromphenyl-  
hydrazin

d-Ribose-p-Bromphenylsazon  $C_{17}H_{18}N_4O_3Br_2$  (§ 101), Fp.  $180-185^\circ$  (korr.), in heißem Wasser kaum löslich, leicht löslich in Alkohol, Äther, Pyridin. Die Lösung in Pyridin-Alkohol dreht links, beim Stehen nimmt die Drehung ab (Levene und Jacobs).

d-Ribose-p-Bromphenylhydrazon  $C_{11}H_{15}N_2O_4Br$ , in absolutem Alkohol und kochendem Wasser leicht löslich, wenig in kaltem, Fp.  $164^\circ$  (v. Ekenstein und Blankma),  $[\alpha]_D = +5,69^\circ$  (Levene und Jacobs<sup>11)</sup>).

mit Diphenylmethan-  
dimethyldihydrazin

d-Ribosediphenylmethandimethyldihydrazon  $CH_2[C_6H_4N(CH_3)N : C_5H_{10}O_4]_2$  scheidet sich mikrokrystallinisch ab beim Versetzen von d-Ribose mit der essigsauren Lösung des Dihydrazins. In warmem Alkohol löslich, Fp.  $141-142^\circ$  (v. Braun<sup>12)</sup>). Die entsprechende Arabinoseverbindung ist nicht krystallinisch, Xylose und Glucose geben keine Abscheidung, dagegen Galactose.

Optische Eigen-  
schaften.

$[\alpha]_D = -21,5^\circ$  (v. Ekenstein und Blankma<sup>13)</sup>).

Sie gärt nicht mit Hefe (§ 98).

<sup>1)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 17, 2, S. 2239. 1884.

<sup>2)</sup> Chem. Zentralbl. 1913, I, S. 1501.

<sup>3)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 40, 1, S. 799. 1907. <sup>4)</sup> desgl. Bd. 42, 3, S. 3247. 1909.

<sup>5)</sup> Monatshefte f. Chem. Bd. 31, S. 357. 1910.

<sup>6)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 46, 3, S. 3949. 1913.

<sup>7)</sup> Chem. Zentralbl. 1914, I, S. 965.

<sup>8)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 24, 2, S. 4220. 1891.

<sup>9)</sup> Chem. Zentralbl. 1909, II, S. 14 u. 1913, II, S. 1562.

<sup>10)</sup> Levene u. Jacobs: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 42, 2, S. 2469 u. Bd. 42, 3, S. 3247. 1909. — Levene u. Clark: Journ. of biol. chem. Bd. 46, S. 19. 1921.

<sup>11)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 42, 2, S. 2706. 1909. <sup>12)</sup> desgl. Bd. 46, 3, S. 3949. 1913.

<sup>13)</sup> Chem. Zentralbl. 1913, II, S. 1562.

Für die Erkennung und den Nachweis eignen sich, abgesehen von den oben angeführten Reaktionen, das Bromphenylhydrazon und die zuletzt genannte Verbindung.

104. l-Xylose  $C_5H_{10}O_5$ . Sie entsteht bei der Hydrolyse von Holzgummi, Maiskolben, Baumwollsamenhülsen, und ist von Neuberg<sup>1)</sup> und Rewald<sup>2)</sup> aus Pankreasnucleoproteid dargestellt. Nach Neuberg und Brahn<sup>3)</sup> soll sie auch die Pentose der Inosinsäure sein.

l-Xylose krystallisiert in Prismen, welche in Wasser sehr leicht-, in Alkohol schwerlöslich sind. Sie wird durch Bleiessig + Ammoniak gefällt, gibt die Mooresche und die Reduktionsproben (§ 97) sowie die Phloroglucin- und Orcinreaktion (§ 100), beim Kochen mit Salzsäure Furfurol. Sie reduziert Fehlingsche Lösung ein wenig stärker als Glucose. Genauere Angaben bei Weiser und Zaitscheck<sup>4)</sup>.

l-Xylosephenylosazon  $C_{17}H_{20}N_4O_3$  (S. 101) scheidet sich nach längerem Erhitzen beim Erkalten ab. Fp. 160°. 0,2 g gelöst in 6 ccm absolutem Alkohol + 4 ccm gereinigtem Pyridin drehen im Dezimeterrohr  $-0^\circ 15'$  (Neuberg<sup>5)</sup>).

l-Xylose-m-Nitrophenylhydrazon  $C_{11}H_{15}N_3O_6$ , gelbe Nadeln, Fp. 163°, in Alkohol ziemlich leicht löslich (v. d. Haar<sup>6)</sup>).

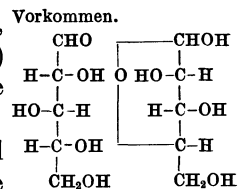
l-Xylose-Diphenylhydrazon  $C_{17}H_{20}N_2O_4$  (Neuberg und Wohlgemuth<sup>7)</sup>) eignet sich nicht für Nachweis und Isolierung.

Für 3—34proz. Lösungen beträgt  $[\alpha]_D^{20} = +18,095 + 0,06986 p$  (Schulze und Tollens<sup>8)</sup>). Die Lösungen zeigen Mutarotation.

Xylose gärt nicht, durch Zinkhydroxydammoniak entsteht aus ihr Methylimidazol (Windaus), durch Oxydation Xylonsäure und weiter Trioxyglutarsäure.

Für den Nachweis ist, abgesehen von den oben aufgeführten Reaktionen, sehr geeignet das Osazon, das m-Nitrophenylhydrazon und die Umwandlung in Xylonsäure durch Oxydation mit Brom, welche auch in unreiner Lösung erfolgt. Die Xylonsäure kann durch basisches Bleiacetat und Ammoniak abgeschieden und als schön krystallisierendes Brucinsalz (Fp. 172—174°) isoliert werden (Neuberg<sup>9)</sup>) oder man weist sie nach Bertrand als Doppelsalz von xylonsaurem Cadmium und Bromcadmium nach und verfährt nach Widtsoe und Tollens<sup>10)</sup> so: Etwa 0,2 g der zu prüfenden Substanz (oder auch weniger) wird mit 1 ccm Wasser, 0,5 g Cadmiumcarbonat und 7—8 Tropfen Brom im Reagensglas gelinde erwärmt. Nach 8—12stündigem Stehen im lose verkorkten Glas, Verdampfen bis fast zur Trockne, Lösen in 4—5 ccm Wasser, Filtrieren, Eindampfen bis fast zur Trockne und Zufügen von 1 ccm Alkohol scheiden sich wetzsteinförmige Krystalle ab. Nadelförmige müssen sich durch Umkrystallisieren in wetzsteinförmige überführen lassen, wenn es sich um Xylose handelt. Nur die Wetzsteinform ist nach v. d. Haar<sup>11)</sup> für Xylose beweisend.

Rhamnose  $C_6H_{12}O_5$ , oder eine ihr isomere Methylpentose wurde nur einmal in tierischem Gewebe gefunden, und zwar im Hühnereiweiß. Sie wurde in freiem Zustand und als Osazon isoliert und stimmt in allen Punkten mit der Rhamnose überein. Der Befund, welcher nicht regelmäßig erhoben wurde, hängt jedenfalls mit der Ernährung mit rhamnosehaltigem Futter zusammen



Eigenschaften.

Verbindungen:  
mit Phenylhydrazin

mit Nitrophenyl-  
hydrazin

mit Diphenyl-  
hydrazin.

Optische Eigen-  
schaften.

Nachweis.

<sup>1)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 35, S. 1467. 1902.    <sup>2)</sup> desgl. Bd. 42, 3, S. 3134. 1909.

<sup>3)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 5, S. 438. 1907.

<sup>4)</sup> Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 93, S. 98. 1902.

<sup>5)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 32, 3, S. 3386. 1899.

<sup>6)</sup> Anleitung usw. S. 184.

<sup>7)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 35, S. 40. 1902.

<sup>8)</sup> Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 271, S. 40. 1892.

<sup>9)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 35, 2, S. 1467 u. 1473. 1902.

<sup>10)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 33, 1, S. 136. 1900.

<sup>11)</sup> Anleitung usw. S. 58.

(O. Weiß<sup>1</sup>). Ein Zucker, der wahrscheinlich Rhamnose war, wurde von Zlataroff<sup>2</sup>) in einem diabetischen Harn gefunden.

#### Hexosen.

**Vorkommen.** 105. d-Glucose (Traubenzucker, Dextrose)  $C_6H_{12}O_6$ . Unter allen Zuckerarten hat die Glucose bei Menschen und Tieren das ausgebreitetste Vorkommen. Abgesehen vom Darminhalte, in welchem sie je nach der Nahrung in sehr wechselnder Quantität vorhanden sein, zeitweise auch fehlen kann, findet sie sich bei gesunden Tieren häufig in geringer Menge in dem Saft der Leber und auch wohl anderer Gewebe, regelmäßig im Blute, in der Lymphe, in der Cerebrospinalflüssigkeit, in Hühnereiweiß und -eigelb. Ebenso findet sich Traubenzucker stets in sehr geringer Menge im normalen menschlichen Harn (Baumann<sup>3</sup>). Bei Diabetes wird er im Harn in vermehrter, oft sehr reichlicher Menge ausgeschieden. Aus Glykogen, Amylum, Dextrinen, Maltose, Milchezucker und Rohrzucker entsteht er durch hydrolytische Spaltung, aus den 3 genannten Zuckern auch durch invertierende Enzyme.

**Darstellung aus diabetischem Harn.** Die Synthese der Glucose ist von E. Fischer<sup>4</sup>) ausgeführt. Um sie aus diabetischem Harn darzustellen, dampft man denselben bei mäßiger Temperatur auf dem Wasserbad zum dünnen Sirup ein. Nach einigen Tagen oder Wochen ist alles krystallisiert. Die körnige Masse wird nun mit wenig Alkohol zerrieben und gewaschen, um den Harnstoff zu entfernen, dann in siedendem Alkohol gelöst und heiß filtriert. Die beim Stehen allmählich ausgeschiedenen Krystallkörner und Kugeln werden dann noch mehrmals aus heißem Alkohol, nach Soxhlet besser aus Methylalkohol umkrystallisiert.

**Isolierung.** Um aus zuckerarmen, wässrigen, eiweißfreien Flüssigkeiten Glucose zu isolieren, bedient man sich mit Vorteil ihrer Fällbarkeit durch essigsäures Bleioxyd und Ammoniak. Zerteilt man den Niederschlag in Alkohol und leitet Schwefelwasserstoff hindurch, filtriert und dampft zum Sirupe ab, so erhält man den Zucker von einem großen Teile anderer Stoffe getrennt. Löst man den Rückstand in absolutem Alkohol und fügt alkoholische Kalilösung hinzu solange ein Niederschlag entsteht, so erhält man Traubenzucker-Kali als in Alkohol unlöslichen Niederschlag. Man filtriert, löst den Niederschlag in wenig Wasser, leitet schnell Kohlensäure bis zur Sättigung des Kalis hindurch, fällt die Lösung mit viel absolutem Alkohol, filtriert, verdunstet bei möglichst niedriger Temperatur zum Sirupe und läßt einige Wochen zur Krystallisation stehen. Diese Darstellung des Traubenzuckers führt nur dann zu einem guten Resultate, wenn man den Zucker nur sehr kurze Zeit mit dem Kali in Verbindung läßt, also schnell Kohlensäure einleitet und mit Alkohol fällt; ganz entgeht der Zucker trotz aller Geschwindigkeit und auch bei niedriger Temperatur der Zersetzung durch das Kali nicht.

Ferner kann man nach Baumann Glucose aus wässrigen Lösungen als Benzoessäureester abscheiden, wenn man mit Benzoylchlorid und Natronlauge in den weiter unten angeführten Verhältnissen bis zum Verschwinden des Geruchs nach Benzoylchlorid schüttelt. Aus dem Estergemenge läßt sich der Traubenzucker durch Verseifen mit Natriumalkoholat gewinnen (Kueny<sup>5</sup>). Es werden aber bei diesem Verfahren auch die übrigen Kohlenhydrate und viele andere Körper abgeschieden.

<sup>1</sup>) Jaffé-Festschrift. Braunschweig 1902, S. 455.

<sup>2</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 97, S. 28. 1916.

<sup>3</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 19, 2, S. 3218. 1886. — Wedenski: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 13, S. 122. 1889. — Baisch: desgl. Bd. 18, S. 193. 1894; Bd. 19, S. 339. 1894; Bd. 20, S. 249. 1895. — Lemaire: desgl. Bd. 21, S. 442. 1895/96.

<sup>4</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 23, 1, S. 799. 1890.

<sup>5</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 14, S. 341. 1890.



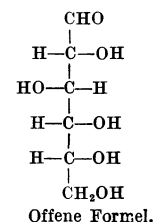
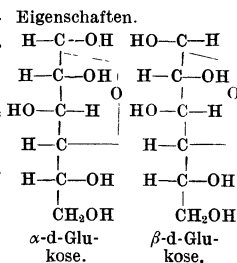
Der durch Umkrystallisieren aus Alkohol erhaltene wasserfreie Traubenzucker  $C_6H_{12}O_6$  ist völlig farblos, bildet vierseitige Prismen mit schräger oder gerader Endfläche; die Krystallflächen sind meist uneben an größeren Individuen; sie gruppieren sich beim Krystallisieren strahlig zu Kugeln und Knollen. Die Krystalle sind hart, luftbeständig bei gewöhnlicher Temperatur (Fp.  $146^\circ$ ). In Wasser lösen sie sich nicht sehr schnell. Die wässrige Lösung kann zur Trockne abgedampft werden, ohne daß sich ein Krystall bildet, während eine dünne, sirupöse Lösung binnen einiger Zeit ruhigen Stehens krystallinisch erstarrt, und zwar krystallisiert aus konzentrierten wässrigen Lösungen bei  $30-35^\circ$  und aus Alkohol ebenfalls wasserfreier Traubenzucker, Fp.  $146^\circ$ , aus wässrigen Lösungen in der Kälte dagegen wasserhaltiger  $C_6H_{12}O_6 + H_2O$ . Die Krystalle, schnell auf  $100^\circ$  erhitzt, schmelzen unter Bräunung; beim sehr langsamem Erwärmen, bei dem im Lauf einiger Stunden  $60^\circ$  erreicht wird, und dünner Schicht wird Wasser ohne Schmelzen ausgetrieben; es hinterbleibt eine weiße, undurchsichtige Masse von der Form der Krystalle, welche ohne Zerlegung auf  $120^\circ$  und darüber erhitzt werden kann.

Außer dem Traubenzucker von den genannten Eigenschaften, der  $\alpha$ -d-Glucose (s. nebenstehende Formel), gibt es noch die  $\beta$ -d-Glucose (s. nebenstehende Formel), welche aus der Lösung des Traubenzuckers in heißem Pyridin und aus seiner wässrigen Lösung bei einer Temperatur über  $98^\circ$  auskrystallisiert und bei  $148-150^\circ$  schmilzt. Über die Unterschiede beider in optischer Beziehung s. weiter unten. Außer diesen beiden Formen nimmt man noch eine dritte, die  $\gamma$ -d-Glucose, welche sich von den beiden anderen durch besondere Reaktionsfähigkeit unterscheidet, an.

Der Traubenzucker ist schwer löslich in kaltem, leicht in heißem Alkohol, langsam aber reichlich in Methylalkohol, in Pyridin zu 7—8%, unlöslich in Äther. Aus wässrigen Lösungen wird er durch essigsäures Blei nur bei Gegenwart von Ammoniak gefällt. Aus Harn soll er nach R. und O. Adler<sup>1)</sup> durch Bleiessig zum Teil gefällt werden. Aus den kochsalzhaltigen Lösungen des Traubenzuckers scheiden sich beim Stehen große sechsseitige Doppelpyramiden oder Rhomboeder aus, welche aus  $2 C_6H_{12}O_6 + NaCl + H_2O$  bestehen und 13,50% NaCl enthalten.

Wie alle Alkohole läßt sich auch die Glucose mit Basen und mit Säuren verbinden. Die Verbindung mit Basen vollzieht sich leicht und schnell schon bei gewöhnlicher Temperatur, so z. B. mit Kali ( $C_6H_{11}KO_6$ ), Natron, Kalk, Baryt ( $C_6H_{12}O_6 \cdot BaO$ ); eine wässrige Lösung von Traubenzucker löst reichlich Ätzkalk auf. Die Verbindungen sind in absolutem Alkohol unlöslich, eine Lösung von Glucose in Methylalkohol wird durch methylalkoholische Barytlösung quantitativ gefällt<sup>2)</sup>.

Der Traubenzucker verbindet sich mit Cuprioxyd. Die Verbindung löst sich leicht in Alkalilauge zu dunkelblauer Flüssigkeit, kann aber auch als Niederschlag  $C_6H_{12}O_6 \cdot 5 Cu(OH)_2$  erhalten werden, wenn man zu einer Lösung, die 1 Mol. Traubenzucker enthält (die Lösung muß mindestens 0,5proz. sein), 5 Mol. Cuprisulfat und 11 Mol. Natronhydrat fügt. Die nach einiger Zeit abfiltrierte Flüssigkeit ist dann zuckerfrei (Salkowski<sup>3)</sup>). Die alkalische Cuprioxydtraubenzuckerlösung ist sehr zersetzlich, schon nach kurzem Stehen scheidet sich gelbes Cuprohydroxyd oder rotes Cuprooxyd aus, während die Flüssigkeit sich entfärbt; in der Wärme geht diese Reaktion augenblicklich vor sich: der Zucker wird oxydiert (Trommersche Probe § 97). 1 ccm mit 4 Tl. Wasser verdünnte Fehlingsche Lösung entspricht nach Soxhlet<sup>4)</sup> 0 00495 g wasserfreiem Traubenzucker in 0,5—1 proz. Lösung. Ebenso erfährt auch das



Verhalten zu Alkalien und alkalischen Erden

Verbindungen: mit Schwermetallen, Reduktionsvermögen.

<sup>1)</sup> Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 110, S. 99. 1905.

<sup>2)</sup> Scheibler bei Leo: Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. Bd. 107, S. 109. 1887.

<sup>3)</sup> Salkowski: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 3, S. 79. 1879. — Yoshimoto: desgl. Bd. 56, S. 425. 1908.

<sup>4)</sup> Journ. f. prakt. Chem. N. F., Bd. 21, S. 255. 1880.

Wismut beim Kochen mit alkalischer Traubenzuckerlösung Reduktion zu metallischem Wismut (Böttgersche Probe § 97), auch Gold-, Platin-, Silber-, Quecksilbersalze werden durch dieselbe reduziert, Ferricyankalium in Ferrocyankalium umgewandelt und Indigo zu Indigoweiß reduziert.

mit Benzoesäure Mit den verschiedensten anorganischen und organischen Säuren bildet er unter geeigneten Bedingungen esterartige Verbindungen, unter denen neben den Acetaten die Benzoesäureester besondere Bedeutung erlangt haben<sup>1)</sup>. Schüttelt man Traubenzucker (5 g in 0,5proz. Lösung) mit Benzoylchlorid (40 g) und Natronlauge (300 ccm 10proz. Lösung) bis zum Verschwinden des Geruches nach Benzoylchlorid, so erhält man in Wasser unlösliche, in Alkohol, Äther, Benzol lösliche Niederschläge, welche Gemenge mehrfach benzoylesterter Glucose darstellen<sup>2)</sup>. Aus ihnen kann durch Verseifen mit Natriumäthylat der Zucker wieder gewonnen werden.

mit Harnstoff Mit Harnstoff vereinigt er sich bei Gegenwart von verdünnter Schwefelsäure zu einer in Wasser leichtlöslichen krystallisierenden Verbindung  $C_6H_{12}O_5 \cdot NCO \cdot NH_2$  (Fp. 207°), die links dreht (für 10proz. Lösungen  $[\alpha]_D^{15} = -23,5^\circ$ ), Fehlingsche Lösung nur nach längerem Kochen reduziert und durch Kochen mit verdünnter Säure zerlegt wird<sup>3)</sup>. Im Harn kommt es nicht zur Bildung dieser Ureidoglucose (P. Mayer<sup>4)</sup>).

mit Phenylhydrazin d-Phenylglucosazon (§ 101)  $C_{22}H_{18}N_4O_5$  ist in Wasser fast unlöslich, in heißem absoluten Alkohol schwer-, in heißem verdünnten (60proz.) leichter löslich, schmilzt bei raschem Erhitzen gegen 205° unter Zersetzung (E. Fischer<sup>5)</sup>. Es dreht in Eisessig gelöst links. In Pyridin löst sich das Osazon leicht (0,25 g in 1 g); auf Zusatz von Benzol, Ligroin, Äther scheidet es sich aus dieser Lösung wieder krystallinisch ab. Dieses Verhalten kann zur Reinigung benutzt werden. Eine Lösung von 0,2 g in 4 ccm reinem Pyridin und 6 ccm absolutem Alkohol dreht in 10 cm langer Schicht bei Natriumlicht  $-1^\circ 30'$  (Neuberg<sup>6)</sup>), eine Lösung von 0,1 g in 5 ccm Pyridin-Alkoholmischung in 5 cm langer Schicht bei Natriumlicht sofort  $[\alpha]_D = -0,62^\circ$ , nach 24 Stunden  $-0,35^\circ$  (Levene und La Forge<sup>7)</sup>).

mit Benzylphenylhydrazin d-Glucosebenzylphenylhydrazon  $C_{19}H_{24}N_2O_5$  (v. Ekenstein und Lobry de Bruyn<sup>8)</sup>, (§ 101), in Wasser und Alkohol wenig löslich. Fp. 165°. Es spaltet beim Kochen mit Formaldehyd Traubenzucker ab.

mit Diphenylhydrazin. d-Glucosediphenylhydrazon  $C_{18}H_{22}O_5N_2$ . Versetzt man 1 Tl. Traubenzucker in möglichst wenig Wasser gelöst mit 1,5 Tl. Diphenylhydrazin in alkoholischer Lösung, fügt, wenn nötig, noch so viel Wasser oder Alkohol zu, als zur Lösung erforderlich ist, erhitzt am Rückflußkühler 2 Stunden im Wasserbad, verdampft den Alkohol zum größten Teil und fügt Äther hinzu, so scheidet sich nach kurzer Zeit das Hydrazon krystallinisch ab. Aus heißem Wasser umkrystallisiert schmilzt es bei 161—162° (Stahel<sup>9)</sup>). Zur Erkennung des Traubenzuckers neben Fruchtzucker sehr geeignet.

<sup>1)</sup> Baumann: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 19, 2, S. 3220. 1886.

<sup>2)</sup> Kueny: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 14, S. 330. 1890. — Skraup: Monatshefte f. Chem. Bd. 10, S. 389. 1889.

<sup>3)</sup> Schoorl: Recueil des travaux chim. des Pays-Bas Bd. 19, S. 398. 1901 u. Bd. 22, S. 31. 1903.

<sup>4)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 17, S. 145. 1909.

<sup>5)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 17, 1, S. 579. 1884; Bd. 20, 1, S. 821. 1887 u. Bd. 41, 1, S. 75. 1908.

<sup>6)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 32, 3, S. 3384. 1899.

<sup>7)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 20, S. 429. 1915.

<sup>8)</sup> Recueil des travaux chim. des Pays-Bas Bd. 15, S. 225. 1896. — Ruff und Ollendorf: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 32, 3, S. 3234. 1897.

<sup>9)</sup> Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 258, S. 244. 1890.

Der Traubenzucker dreht in wässriger Lösung die Ebene des polarisierten Lichtes nach rechts, und zwar ergibt sich die spezifische Drehung für Lösungen, welche erhitzt waren oder längere Zeit gestanden hatten, aus folgender Formel: für den wasserfreien Traubenzucker  $[\alpha]_D = 52,50^\circ + 0,018796 p + 0,00051683 p^2$ , wobei p den Prozentgehalt der Lösung an Traubenzucker bezeichnet<sup>1)</sup>. Danach ist die spezifische Drehung sehr verdünnter Lösungen am geringsten, sie nimmt allmählich zu, ist bei 10 proz. Lösungen bei  $20^\circ 52,74^\circ$  und bei 50 proz. Lösungen  $54,73^\circ$ . Gleich nach der Auflösung in kaltem Wasser zeigt  $\alpha$ -d-Glucose  $[\alpha]_D =$  etwa  $+105^\circ$ ,  $\beta$ -d-Glucose = etwa  $+22^\circ$ . Beim Stehen, schnell beim Erhitzen, stellt sich bei beiden das Drehungsvermögen auf die gleiche konstante Höhe ein (Mutarotation). Über die Beeinflussung der spezifischen Drehung durch Salze s. Murschhauser<sup>2)</sup>, durch Säuren (Erhöhung) s. Bleyer und Schmidt<sup>3)</sup>. Über den Einfluß von Säuren, Natriumcarbonat, sekundärem und tertiärem Natriumphosphat, Natriumchlorid und anderen Salzen s. Murschhauser<sup>4)</sup>.

Optische Eigenschaften.

In wässriger alkalischer, erdalkalischer oder ammoniakalischer Lösung geht Glucose zum Teil in Lävulose und Mannose über (Lobry de Bruyn und v. Ekenstein<sup>5)</sup>). In einer 1—2 proz. nur  $n/100$ -ätzalkalischen Zuckerlösung sinkt schon bei  $37^\circ$  innerhalb von 24 Stunden die Drehung auf  $0^\circ$ , während  $n/100$ -Ammoniak ohne Wirkung ist (Jolles<sup>6)</sup>). Auch beim Kochen einer Traubenzuckerlösung mit Calcium-, Barium-, Strontium- und Magnesiumcarbonat nimmt die Drehung ab und geht schließlich in eine Linksdrehung über, während das Reduktionsvermögen in weit geringerem Grade heruntergeht (Murschhauser<sup>7)</sup>). Bei stärkerer Alkalikonzentration zersetzt sich der Zucker schon bei gewöhnlicher Temperatur, viel schneller in der Wärme unter Gelb- und Braunfärbung der Lösung (Mooresche Probe § 97). Dabei entsteht d,l-Milchsäure unter Umständen in großen Mengen, ferner Brenzcatechin und Ameisensäure (Hoppe-Seyler<sup>8)</sup>). Bei monatelanger Einwirkung von n-NaOH bei Zimmertemperatur entstehen 50—60% Milchsäure und 30—50% mehrwertige Oxysäuren (Meisenheimer<sup>9)</sup>). Wird ein lebhafter Luftstrom durch die alkalische Flüssigkeit geleitet (Framm<sup>10)</sup> oder ist Wasserstoffsperoxyd zugegen (Schade<sup>11)</sup>), so findet keine Braunfärbung statt. Unter diesen Umständen tritt keine Milchsäure auf, viel Ameisensäure, wenig Glykolsäure und als Hauptprodukt ein Säuregemisch von der der Erythronsäure ähnlichen Zusammensetzung (Buchner, Meisenheimer und Schade<sup>12)</sup>). Kohlensäure Alkalien wirken wie Ätzalkalien, nur schwächer. Auch andere alkalisch reagierende Salze wie Natriumphosphat, Natriumacetat zersetzen in der Wärme den Traubenzucker, so daß Traubenzuckerlösungen bei auch nur schwach alkalischer Reaktion nicht ohne Verlust gekocht oder eingedampft werden können. Durch Zinkhydroxyd-Ammoniak entsteht aus Traubenzucker Methylimidazol

Einwirkung von Alkalien.

<sup>1)</sup> Tollens: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 17, 2, S. 2238. 1884 u. Kurzes Handb. der Kohlenhydrate. 3. Aufl. 1914; S. 175.

<sup>2)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 136, S. 66. 1923. <sup>3)</sup> desgl. Bd. 138, S. 119. 1923.

<sup>4)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 104, S. 214. 1920; Bd. 106, S. 23. 1920; Bd. 110, S. 181. 1920; Bd. 117, S. 215. 1921; Bd. 125, S. 158. 1921; Bd. 136, S. 66. 1923.

<sup>5)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 28, S. 3078. 1895.

<sup>6)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 29, S. 152. 1910 u. Bd. 32, S. 97. 1911.

<sup>7)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 97, S. 97. 1919; Bd. 99, S. 190. 1919 u. Bd. 101, S. 74. 1920.

<sup>8)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 4, S. 346. 1871.

<sup>9)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 41, 1, S. 1009. 1908.

<sup>10)</sup> Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 64, S. 575. 1896.

<sup>11)</sup> Zeitschr. f. physikal. Chem. Bd. 57, S. 1. 1906.

<sup>12)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 39, 4, S. 4217. 1906 u. Bd. 41, 1, S. 1010 Fußnote 1. 1908.

(Windaus und Knoop<sup>1</sup>), durch Kupferhydroxyd-Ammoniak Imidazol-4-carbonsäure (Windaus und Ullrich<sup>2</sup>). In sauren Lösungen ist der Traubenzucker beständig, auch beim Kochen oder Abdampfen seiner mit Essigsäure oder Salzsäure angesäuerten Lösungen (Bickel<sup>3</sup>). Mit verdünnten Mineralsäuren erhitzt liefert er Huminsubstanzen, Ameisensäure, Lävulinsäure<sup>4</sup>) und wenig Furfurol<sup>5</sup>). Über Veränderungen des Drehungs- und Reduktionsvermögens beim Erhitzen mit Salzsäure s. Murschhauser<sup>6</sup>).

Oxydationen. Durch konzentrierte Salpetersäure in der Wärme wird er in Zuckersäure und Oxalsäure übergeführt, durch Brom in Gluconsäure und Zuckersäure, durch Permanganat in alkalischer Lösung in Oxalsäure und Kohlensäure.

Einwirkung von Hefe und Bakterien. Der Traubenzucker gärt mit Hefe (§ 98). Die Gärung geht am besten bei etwa 34° vor sich. Die Gärung zerlegt nur dann den ganzen vorhandenen Zucker, wenn die Lösung nicht über 15% davon enthält, da in konzentrierteren Lösungen der gebildete Alkohol die Gärung endlich inhibiert. Durch zahlreiche Bakterien wird der Traubenzucker in Milchsäure übergeführt, solche Bakterien finden sich regelmäßig in saurer Milch und im Käse. Diese Gärung verläuft langsamer als die alkoholische. Durch andere Bakterien entstehen aus ihm Buttersäure, Essigsäure, Citronensäure.

Nachweis. Zur Erkennung kann die Überführung in Zuckersäure, deren Kaliumsalz gut charakterisiert ist, dienen (Gans und Tollens<sup>7</sup>). Galaktose, Fructose, Pentosen geben keine Zuckersäure, wohl aber solche Kohlenhydrate, an deren Aufbau Glucose beteiligt ist, und Glucuronsäure.

Man dampft vorsichtig mit der etwa 6fachen Menge Salpetersäure (spez. Gew. 1,5) auf dem Wasserbade unter Umrühren zum Sirup ein, bis die Entwicklung roter Dämpfe aufhört und der zunächst farblose Sirup eben anfängt deutlich und dauernd gelb zu werden. Dann wird er sogleich in wenig Wasser gelöst und heiß mit gepulvertem Kaliumcarbonat versetzt, bis rotes Lackmuspapier deutlich blau gefärbt wird. Auf Zufügen von Eisessig bis zu deutlichem Geruch scheidet sich sofort oder nach geringem Einengen saures zuckersaures Kalium ab. Es wird am folgenden Tage abgesaugt, durch Umkrystallisation aus möglichst wenig Wasser von der Oxalsäure befreit und nochmals mit Tierkohle umkrystallisiert.

Zur Identifizierung kann man es aus der mit Ammoniak vorsichtig neutralisierten konzentrierten wässrigen Lösung mit dem anderthalben Gewicht des Kaliumsalzes an Silbernitrat in wässriger Lösung fällen, das neutrale zuckersaure Silber abfiltrieren, auswaschen, im Dunkeln trocknen und eine Silberbestimmung ausführen.  $C_6H_{12}O_6Ag_2$  gibt 50,91% Ag.

Zum Nachweis dienen weiter die § 97 aufgeführten Reaktionen von Trommer, Böttger, die Reaktion von E. Fischer (Phenylglucosazon) (§ 101), Gärprobe (§ 98) usw. sowie folgende beide Proben:

Barfoedsche Probe. Man kocht die Lösung mit einer 1proz. Lösung von essigsaurem Kupfer, der eine Spur Essigsäure zugesetzt ist: es scheidet sich Cuprooxyd ab.

Rubnersche Probe<sup>8</sup>). Versetzt man Traubenzuckerlösungen mit einer größeren Menge gepulverten Bleiacetats, kocht einige Zeit, träufelt dann in die siedende Lösung Ammoniak, bis eben ein dauernder Niederschlag entsteht, so färbt sich fast unmittelbar die ganze Lösung gelb und je nach der Konzentration dann rot; es setzt sich ein ebenso gefärbter flockiger Niederschlag ab, der aber bald in eine an Bleioxyd erinnernde gelbe Farbe übergeht.

<sup>1</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 38, 1, S. 1166. 1905. Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 6, S. 392. 1905.

<sup>2</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 90, S. 366. 1914.

<sup>3</sup>) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 75, S. 248. 1899.

<sup>4</sup>) Tollens: Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 206, S. 207. 1881. — Conrad u. Guthzeit: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 19, S. 2569. 1886.

<sup>5</sup>) Emmet: Journ. f. prakt. Chem. N. F. Bd. 12, S. 120. 1875.

<sup>6</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 116, S. 171. 1921.

<sup>7</sup>) Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 249, S. 218. 1888. <sup>8</sup>) Zeitschr. f. Biol. Bd. 20, S. 397. 1884.

Was nun die Beweiskraft der einzelnen Proben betrifft, so können die Trommersche und Böttgersche Probe keine Entscheidung über die Anwesenheit von Traubenzucker geben, denn eine ganze Reihe anderer Stoffe geben ebenfalls diese Reaktionen. Die Barfoedsche Probe geben Maltose und Milchzucker nicht, die Rubnersche gibt Milchzucker nicht. Die Rechtsdrehung schützt nicht vor der Verwechslung mit Maltose, Galactose, Dextrin; die Gärfähigkeit nicht vor der Verwechslung mit Maltose, Fructose (Lävulose). Dasselbe Osazon wie Traubenzucker geben auch Fructose und Glucosamin. Die Osazone anderer Zucker geben ähnliche mikroskopische Bilder, unterscheiden sich aber im Schmelzpunkt. Aus dem Verhalten den verschiedenen Reaktionen gegenüber wird sich wohl stets ein bestimmter Schluß ziehen lassen.

Über Nachweis und Bestimmung des Traubenzuckers im Harn s. § 597 f. und in serösen Flüssigkeiten s. § 652 u. § 653.

106. d-Fructose (Fruchtzucker, Lävulose)  $C_6H_{12}O_6$ , im Pflanzenreich weit verbreitet und bei der Hydrolyse von manchen Disacchariden (Rohrzucker) und manchen Polysacchariden (Inulin) entstehend, ist in einzelnen Fällen als einziger Zucker im Harn gefunden worden. Sie kann im Harn auch neben Traubenzucker auftreten und auch, meist pathologischerweise, nach Zufuhr von Fruchtzucker (alimentäre Fructosurie). Sie ist im Harn neugeborener Kälber (Langstein und Neuberg<sup>1)</sup>, im Fruchtwasser verschiedener Tiere (nicht im menschlichen) (Gürber und Grünbaum<sup>2)</sup>, mehrfach auch im Blutserum und anderen menschlichen Gewebsflüssigkeiten (Neuberg und Strauß<sup>3)</sup>) nachgewiesen.

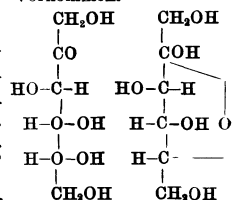
Neubauer<sup>4)</sup> gewann sie aus dem Harn eines Falles von reiner Fructosurie in folgender Weise: Das Filtrat des mit Bleizucker gefällten Harns wurde mit Bleiessig gefällt, der filtrierte und gewaschene Niederschlag mit verdünnter Essigsäure behandelt, die filtrierte Flüssigkeit durch Schwefelwasserstoff vom Blei und durch Silberoxyd von Salzsäure befreit. Nach Entfernung des überschüssigen Silberoxyds durch Schwefelwasserstoff wurde das Filtrat bei gelinder Temperatur verdunstet, der zurückbleibende Sirup mit warmem 96proz. Alkohol extrahiert. Die vereinigten alkoholischen Auszüge wurden über Schwefelsäure, dann über Ätzkalk bei gelinder Wärme konzentriert. Im Eisschrank krystallisierte der süßschmeckende Sirup nach dem Impfen mit Fruchtzuckerkrystallen. Über die Isolierung aus Harn s. auch Adler<sup>5)</sup>.

Fruchtzucker löst sich leicht in Wasser, in heißem Äthyl- und Methylalkohol; in kaltem Alkohol leichter als Traubenzucker. Löslich in Pyridin (18,5%). Aus Wasser krystallisiert er schwierig, mit 1 Mol.  $H_2O$ , aus Alkohol wasserfrei. Durch Bleizucker und Bleiessig wird er nicht gefällt, wohl aber durch Bleiessig +  $NH_3$  und aus Harn teilweise durch Bleiessig. Mit Kalk gibt er eine schwerlösliche Verbindung  $C_6H_{12}O_6 \cdot Ca(OH)_2$ , die sich abscheidet, wenn man in 100 ccm einer 10proz. Lösung, die in Eiswasser steht, 6 g Calciumhydroxyd einträgt, durch Umrühren löst und stehen läßt. Diese Verbindung, aus der man mit Oxalsäure den Fruchtzucker wiedergewinnen kann, läßt sich zur Abscheidung benutzen. Durch Kupferhydroxyd und Natronlauge wird er zum Teil gefällt (Yoshimoto<sup>6)</sup>).

Fruchtzucker verhält sich in vielen Beziehungen wie Traubenzucker, er gärt mit Hefe, gibt die Mooresche Probe, die Molischsche Probe und alle auf Reduktion beruhenden Reaktionen (§ 97). Das Reduktionsvermögen gegen Kupferoxyd ist etwas geringer als das des Traubenzuckers, verhält sich unter gleichen Verhältnissen wie 100 : 92,8.

Beim Erwärmen mit Phenylhydrazin und Essigsäure entsteht dasselbe Osazon wie aus Traubenzucker (S. 116). Zur Unterscheidung von Traubenzucker ist das Methylphenylosazon geeignet. Um es zu erhalten, fügt man zu einer Lösung von 1,8 g Lävulose in 10 ccm Wasser 4 g Methylphenylhydrazin und so viel Alkohol, daß eine klare Lösung entsteht, darauf 4 ccm 50proz. Essigsäure und erwärmt 5–10 Minuten auf dem Wasserbade. Innerhalb  $\frac{1}{4}$  Stunde beginnt die Krystallisation gelbroter Nadelchen, welche aus heißem 10proz. Alkohol leicht umkrystallisiert werden können. Fp. 153°. Aus einem Gemisch von Chloroform und Petroläther oder aus heißem Wasser unter Zusatz von etwas Pyridin umkrystallisiert, bildet es feine hellgelbe Nadeln vom Fp. 158–160°. Löslich in heißem Alkohol, Aceton, Chloroform. Eine Lösung von 0,2 g in 4 ccm reinem Pyridin und 6 ccm absolutem Alkohol dreht in 10 cm langer Schicht bei Natriumlicht

Vorkommen.



Darstellung aus Harn bei Fructosurie.

Eigenschaften.

Verbindungen: mit Phenylhydrazin mit Methylphenylhydrazin.

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 4, S. 292. 1907.

<sup>2)</sup> Münch. med. Wochenschr. 1904, S. 377.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 36, S. 227. 1902.

<sup>4)</sup> Münch. med. Wochenschr. 1905, 2, S. 1525.

<sup>5)</sup> Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 139, S. 93. 1911.

<sup>6)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 56, S. 425. 1908.

+1° 40' (Neuberg<sup>1</sup>). Methylphenylhydrazin gibt nach Ofner<sup>2</sup>) mit Traubenzucker dasselbe Osazon, aber sehr viel langsamer.

**Optische Eigenschaften.** Fruchtzucker dreht die Ebene des polarisierten Lichtes nach links, und zwar beträgt  $[\alpha]_D^{20} = -(91,90 + 0,111 p)$ , wo p Gramm Zucker in 100 g Lösung bedeutet (Ost<sup>3</sup>). Mit steigender Temperatur nimmt die Drehung ab. Die Lösungen zeigen Mutarotation. Anorganische Säuren erhöhen die Drehung, Alkalien, Bleiessig, Alkohol, Aceton vermindern sie. Siehe dazu auch Wender<sup>4</sup>). Über den Einfluß starker Säuren auf die Drehung s. Bleyer und Schmidt<sup>5</sup>).

**Einwirkung von Alkalien und Säuren.** In alkalischer und erdalkalischer Lösung geht er zum Teil in Traubenzucker und Mannose über (Lobry de Bruyn und v. Ekenstein<sup>6</sup>). Gegen Hydroxylionen ist er noch empfindlicher als Traubenzucker und gegen Säuren viel empfindlicher als dieser, so daß sein Zerfall in Lävulinsäure und Ameisensäure beim Kochen mit verdünnten Mineralsäuren viel leichter erfolgt als der des Traubenzuckers. Durch 3stündiges Kochen mit 7,5% Salzsäure wird er völlig zerstört, während Traubenzucker zum großen Teil unverändert bleibt (E. Fischer<sup>7</sup>). Durch Oxydation mit Salpetersäure (spez. Gew. 1,2) entsteht Glykolsäure, viel Oxalsäure, aber keine Zuckersäure.

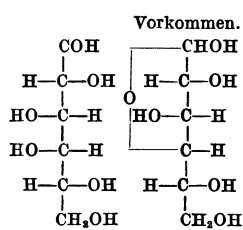
**Oxydation.** Durch Zinkhydroxydammoniak entsteht Methylimidazol (Windaus<sup>8</sup>).

**Nachweis.** Zur Unterscheidung des Fruchtzuckers vom Traubenzucker und zu seinem Nachweis dienen die Linksdrehung, das Methylphenylosazon und die Seliwanoffsche Reaktion (§ 99).

Über den Nachweis der Lävulose im Harn s. § 602.

**Leoscher Zucker**  $C_6H_{12}O_6$  wurde von Leo<sup>9</sup>) aus drei diabetischen Harnen dargestellt. Vom gleichzeitig vorhandenen Traubenzucker läßt er sich durch Ausfällen der methylalkoholischen Lösung mit methylalkoholischer Barytlösung trennen, durch welche der Leosche Zucker nicht niedergeschlagen wird.

Er stellt einen nicht süß, sondern scharf und salzartig schmeckenden, nicht krystallisierenden Sirup dar, welcher in Wasser leicht, in Methylalkohol weniger leicht, in Äther, Chloroform unlöslich ist; er wird durch Bleiessig nur bei Gegenwart von Ammoniak gefällt. Mit Phenylhydrazin gibt er nur eine ölige Verbindung. Er löst Kupferoxyd in alkalischer Lösung (es entsteht dabei aber keine lazurblaue Färbung) und reduziert dasselbe, nachdem einige Sekunden gekocht ist. Das Reduktionsvermögen beträgt nur 0,4024 von dem des Traubenzuckers; er dreht die Ebene des polarisierten Lichtes nach links, und zwar ist  $[\alpha]_D = -26,07^\circ$ . Mit Hefe gärt er nicht. Nach Rosenberger<sup>10</sup>) liegt wahrscheinlich eine Heptose vor. Er gewann aus dem Harn eines Kranken ein Osazon (Fp. 195°), dessen Analyse auf ein Heptosazon stimmt. Doch ist die Heptosenatur des Zuckers von Rosenberger keineswegs gesichert.



**107. d-Galaktose**  $C_6H_{12}O_6$ . Galaktose findet sich als solche nicht im Organismus, sie entsteht beim Erhitzen von Milchzucker, Cerebrosiden (Thierfelder<sup>11</sup>) und der schleimigen Umhüllung der Froscheier (v. Ekenstein und Blankma<sup>12</sup>) mit verdünnten Säuren, im ersten Fall neben Glucose; bei schwer magen-darmkranken Säuglingen kann sie sich im Harn finden (Langstein und Steinitz<sup>13</sup>). Sie läßt sich auch aus zahlreichen Gummiarten und Schleimstoffen des Pflanzenreichs durch Spaltung mit Säuren erhalten<sup>14</sup>), ebenso aus pflanzlichen Phosphatiden (Hiestand<sup>15</sup>).

**Darstellung.** Über ihre Darstellung aus Milchzucker s. Kent und Tollens<sup>16</sup>), Clark<sup>17</sup>).

**Eigenschaften.** Zu Warzen vereinigte Nadeln oder Blättchen von süßem Geschmack; in Wasser

<sup>1</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 35, 1, S. 959. 1902 u. Bd. 37, 4, S. 4616. 1904.

<sup>2</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 37, 3, S. 3362. 1904.

<sup>3</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 24, 2, S. 1636. 1891; siehe auch Vosburgh: Journ. of the Americ. chem., Bd. 42, S. 1696; ref. Chem. Zentralbl. 1920, III, S. 820.

<sup>4</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 30, S. 357. 1911. <sup>5</sup>) desgl. Bd. 138 S. 119. 1923.

<sup>6</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 28, 3, S. 3078. 1895. <sup>7</sup>) desgl. Bd. 22, 1, S. 95. 1889.

<sup>8</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 40, 1, S. 799. 1907.

<sup>9</sup>) Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. Bd. 107, S. 99. 1887.

<sup>10</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 49, S. 202. 1906. <sup>11</sup>) desgl. Bd. 14, S. 209. 1890.

<sup>12</sup>) Ref. Chem. Zentralbl. 1907, II, S. 1001.

<sup>13</sup>) Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 7, S. 575. 1906.

<sup>14</sup>) Müntz: Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 102, S. 624 u. 681. 1886. — v. Lippmann: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 20, S. 1001. 1887. Hier auch weitere Literaturangaben.

<sup>15</sup>) Inaug.-Diss. Zürich 1906. — Winterstein u. Hiestand: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 54, S. 288. 1907/08; Trier: desgl. Bd. 86, S. 153. 1913.

<sup>16</sup>) Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 227, S. 221. 1885.

<sup>17</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 47, S. 1. 1921.

schwerer löslich als Glucose, in Pyridin löslich (5,4%). Aus Alkohol umkrystallisiert schmilzt sie bei 165,5° (korr.). Durch Kupfersulfat und Natronlauge wird sie gefällt (Yoshimoto<sup>1</sup>). Sie reduziert alkalische Kupferoxydlösung etwas schwächer als Glucose (1 ccm mit 4 Tl. Wasser verdünnte Fehlingsche Lösung entspricht nach Soxhlet<sup>2</sup>) 0,00533 g Galaktose in 1proz. Lösung). Sie gibt die Reaktionen von Moore, Böttger und Molisch (§ 97) und die Phloroglucinreaktion der Pentosen (aber ohne den Streifen im Spektrum, § 100).

Mit Phenylhydrazin (§ 101) bildet sie ein bei raschem Erhitzen in der Nähe von 186° unter Zersetzung schmelzendes Osazon  $C_{18}H_{22}N_4O_4$  (E. Fischer<sup>3</sup>). Denselben Schmelzpunkt findet v. d. Haar<sup>4</sup>). Levene und La Forge<sup>5</sup>) geben 201—202° an. Es ist in heißem Wasser fast unlöslich, in Alkohol etwas leichter löslich als das Glucosazon, und zeigt in eisessigsaurer Lösung keine wahrnehmbare Drehung. In Pyridin löst es sich leicht und wird durch Zusatz von Benzol, Ligroin, Äther wieder krystallinisch ausgeschieden. Eine Lösung von 0,2 g in 4 ccm reinem Pyridin und 6 ccm absolutem Alkohol dreht in 10 cm langer Schicht bei Natriumlicht + 0° 48' (Neuberg<sup>6</sup>). Levene und La Forge fanden für 0,1 g in 5 ccm Pyridinalkohol in 5 cm langer Schicht bei Natriumlicht  $[\alpha]_D$  sofort nach Lösung = + 0,73°, nach 8 Stunden = + 0,32°.

Mit Methylphenylhydrazin gibt sie in wässrig-alkoholischer Lösung ein in Wasser und Alkohol schwerlösliches Hydrazon  $C_{13}H_{20}N_2O_5$ , das aus Wasser krystallisiert bei 191° schmilzt<sup>7</sup>) (v. Ekenstein und Lobry de Bruyn, Neuberg<sup>8</sup>) (zur Abscheidung der Galaktose sehr geeignet, da wohl nur noch Arabinose ein schwer lösliches Hydrazon bildet).

Bringt man Galaktose und Diphenylmethandimethyldihydrazin in wässrig-essigsaurer oder wässrig-alkoholischer Lösung zusammen, so scheidet sich das Hydrazon  $CH_2[C_6H_4 \cdot N(CH_3) \cdot N : C_6H_{12}O_5]_2$  je nach der Konzentration sofort oder nach kurzem Stehen als feines, spezifisch sehr leichtes Pulver ab, das durch Lösen in wenig Pyridin und Fällen mit Alkohol gereinigt werden kann und bei 185° schmilzt. Ebenso verhält sich Arabinose und Rhamnose, während Glucose, Xylose, Glucosamin und die Ketosen nicht reagieren und d-Ribose ein krystallinisches Dihydrazon gibt (v. Braun<sup>9</sup>).

Eine salzsaure mit Natriumacetat versetzte Lösung von Benzoyldihydro-methylketolhydrazin gibt mit Galaktose je nach der Konzentration nach 1/2—2 Stunden beginnende Trübung, die allmählich zur Abscheidung einer farblosen Krystallmasse führt (80% der Theorie). Das Hydrazon  $C_{22}H_{27}O_6N_3$  ist auch in warmem Alkohol kaum löslich, etwas in heißem Wasser, sehr leicht in Pyridin. Schmelzpunkt bei 181° unter Aufschäumen. Traubenzucker, Fruchtzucker, Arabinose, Xylose geben keine Abscheidung (v. Braun<sup>10</sup>).

Auch das o-Tolyldihydrazon  $C_{13}H_{20}N_2O_5$ , erhalten durch 1/2stündiges Erhitzen einer Lösung von 1 Tl. Galaktose in 1 Tl. Wasser mit 1 Tl. o-Tolyldihydrazin in 20 Tl. absolutem Alkohol im kochenden Wasserbad, ist für den Nachweis sehr

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 56, S. 425. 1908.

<sup>2</sup>) Journ. f. prakt. Chem. N. F. Bd. 21, S. 271. 1880.

<sup>3</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 20, 1, S. 826. 1887; Bd. 23, 1, S. 385 u. Bd. 23, 2, S. 2119. 1890; Bd. 41, 1, S. 76. 1908.

<sup>4</sup>) Anleitung usw. S. 214.

<sup>5</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 20, S. 429. 1915.

<sup>6</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 32, 3, S. 3384. 1899.

<sup>7</sup>) Recueil des travaux chim. des Pays-Bas Bd. 15, S. 225. 1896.

<sup>8</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 3, S. 531. 1907.

<sup>9</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 43, 2, S. 1495. 1910. <sup>10</sup>) desgl. Bd. 49, 1, S. 1266. 1916.

geeignet. Fast unlöslich in Wasser, nur wenig in kaltem Alkohol, leichter in heißem Wasser und heißem Alkohol, leichtlöslich in Pyridin. Fp. 176°. Glucose, Rhamnose, Xylose, Rohrzucker, Maltose, Milchzucker, Glucuronsäure scheiden kein Hydrazon ab (v. d. Haar<sup>1</sup>).

mit Benzoesäure. Mit Benzoylchlorid erhält man 5fach benzoyleerte Galaktose (Skraup<sup>2</sup>).  
Optische Eigenschaften. Galaktose dreht rechts und zeigt Mutarotation. Nach längerem Stehen

(10—16proz. Lösung)  $[\alpha]_D = 83,883^\circ + 0,0785 p - 0,209 t$ , wobei p Prozentgehalt und t Temperatur bedeutet (Meißl). Also in 10proz. Lösung bei 20° = +80,5°. Starke Säuren erhöhen die spezifische Drehung (s. Bleyer und Schmidt<sup>3</sup>).

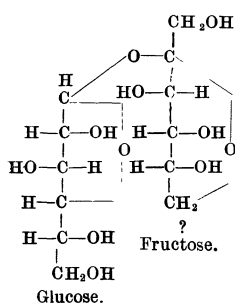
Einwirkung von Alkalien. Gegen verdünnte Alkalien ist sie weniger empfindlich als Glucose, durch stärkere entsteht d,l-Milchsäure, durch n-Natronlauge bei monatelangem Stehen bei Zimmertemperatur gegen 20% Milchsäure, wenig Ameisensäure und gegen 70% Polyoxysäuregemisch (Meisenheimer<sup>4</sup>).

Oxydation. Bei der Oxydation mit Salpetersäure entsteht Schleimsäure.

Verhalten zu Hefe. Sie wird durch eine große Anzahl von Hefearten bei Gegenwart von Hefedekokt vergoren, aber viel langsamer als Glucose (§ 98). Mit gewöhnlicher Bierhefe gärt sie ohne Dekokt nicht.

Nachweis. Zum Nachweis dienen die Rechtsdrehung, das Verhalten zu Hefe, die oben genannten Reaktionen, die oben besprochenen Hydrazone, besonders das o-Tolylhydrazon, das Osazon mit seinen optischen Eigenschaften und die Überführung in Schleimsäure, die durch Schwerlöslichkeit und Schmelzpunkt charakterisiert ist. Schleimsäure geben nur Galaktose und Galaktose enthaltende Kohlenhydrate. Man dampft nach Tollens<sup>5</sup>) mit der 6—12fachen Menge Salpetersäure (1,15 spez. Gew.) in einer Schale auf dem Wasserbade unter Umrühren bis zur bleibenden Gelbfärbung ein, fügt etwas Wasser hinzu und läßt bis zum nächsten Tage stehen. Die abfiltrierten und evtl. umkrystallisierten (Lösen in wenig verdünnter Natronlauge und Ansäuern mit Salzsäure) Abscheidungen schmelzen bei etwa 213°. Um die Schleimsäure weiter zu charakterisieren, bringt man eine kleine Menge auf den Objektträger, fügt einen Tropfen Wasser hinzu und neutralisiert mit Ammoniak. Nach Zufügen eines Körnchens Thalliumnitrat krystallisieren rechteckige Stäbchen von schleimsaurem Thallium (v. d. Haar<sup>6</sup>).

#### Disaccharide von der Formel $C_{12}H_{22}O_{11}$ .



**Saccharose (Rohrzucker)  $C_{12}H_{22}O_{11}$ .** Im Pflanzenreich sehr verbreitet, findet sich nicht in tierischen Geweben und im Harn, wenn überhaupt, nur ganz selten nach reichlicher Aufnahme. Nach parenteraler Zufuhr erscheint fast seine ganze Menge im Harn.

Krystalle von stark süßem Geschmack, in Wasser sehr leicht, in Alkohol schwer löslich. Er gibt die Mooresche Probe und die Reduktionsproben (§ 97) nicht, keine Verbindungen mit Hydrazinen. Durch basisches Bleiacetat + Ammoniak wird er gefällt.  $[\alpha]_D = +66,5^\circ$ . Eine Lösung von Rohrzucker in  $n/_{10}$ -Natronlauge (beliebiger Konzentration) zeigt nach Jolles<sup>7</sup>) keine Änderung der Drehung nach 24stündigem Stehen bei 37—38° oder nach  $3/4$ stündigem Kochen am Rückflußkühler, während 2proz. Lösungen der anderen Disaccharide und der Monosaccharide unter diesen Bedingungen inaktiv werden.

Durch Kochen mit Säure und durch das Ferment Invertin wird er schnell gespalten in Traubenzucker und Fruchtzucker, wobei Reduktionsvermögen und Linksdrehung auftritt. Durch Hefe wird er vergoren, indem zunächst das Invertin der Hefe hydrolysiert.

<sup>1</sup>) Recueil des travaux chim. des Pays-Bas Bd. 37, S. 108 u. 251 (1917); ref. Chem. Zentralbl. 1917, II, S. 706 u. 1918, I, 917.

<sup>2</sup>) Monatshefte f. Chem. Bd. 10, S. 389. 1889.

<sup>3</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 138, S. 119. 1923.

<sup>4</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 41, 1, S. 1009. 1908.

<sup>5</sup>) Kurzes Handbuch der Kohlenhydrate S. 301. Leipzig 1914.

<sup>6</sup>) Anleitung usw. S. 105.

<sup>7</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 43, S. 56. 1912 u. Bd. 57, S. 420. 1913.



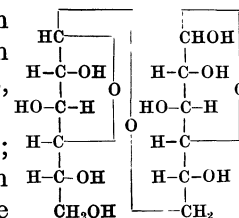
108. **Maltose (Malzzucker)**  $C_{12}H_{22}O_{11}$  entsteht aus Glykogen und Amylum durch Einwirkung diastatischer Fermente und als Zwischenprodukt beim Kochen mit verdünnter Salz- oder Schwefelsäure. Ob sie gelegentlich im Harn auftritt, ist unentschieden.

Auf rein chemischem Wege ist sie noch nicht synthetisch erhalten worden; unter dem Einfluß von Emulsin scheint sie aber aus Traubenzucker durch Kondensation entstehen zu können (Frankland Armstrong). Über ihre Darstellung s. bei Herzfeld<sup>1)</sup> und Fernbach und Wolff<sup>2)</sup>.

Sie krystallisiert in feinen, weißen, zu Warzen vereinigten Nadeln mit 1 Mol. Krystallwasser, das bei 135° entweicht, ist leichtlöslich in Wasser, auch ziemlich leichtlöslich in Alkohol (aber schwerer wie Glucose) und wird aus der alkoholischen Lösung durch Äther in weißen, nadelförmigen Krystallen ausgefällt, während zugleich vorhandene Glucose gelöst bleibt. Sie wird durch basisches Bleiacetat + Ammoniak gefällt, durch Kupferoxyd und Natronlauge teilweise (Yoshimoto<sup>3)</sup>). Sie löst Kupferoxyd in alkalischer Lösung und reduziert es, aber schwächer als Traubenzucker, und zwar wird 1 ccm mit 4 Tl. Wasser verdünnte Fehlingsche Lösung bei 4 Minuten langem Sieden reduziert von 0,0074 g wasserfreier Maltose in annähernd 1proz. Lösung (Soxhlet<sup>4)</sup>). Sie gibt auch die anderen Reduktionsproben und die Mooresche Probe (§ 97), aber nicht (zum Unterschied von der Glucose) die Barfoedsche Probe (S. 118).

Phenylmaltosazon  $C_{24}H_{32}N_4O_9$  (§ 101) entsteht bei 1½stündigem Erhitzen auf dem Wasserbad, scheidet sich aber erst beim Erkalten in gelben, nicht zu Aggregaten vereinigten Nadeln ab, löst sich in etwa 75 Tl. heißem Wasser und schmilzt bei raschem Erhitzen gegen 205° unter Zersetzung (E. Fischer<sup>5)</sup>). Es löst sich in einem Gemisch gleicher Teile Aceton und Wasser (Phenylglucosazon nicht). In Pyridin ist es leichtlöslich und wird durch Benzol, Ligroin, Äther krystallinisch ausgeschieden. Eine frische Lösung von 0,2 g in 4 ccm reinem Pyridin und 6 ccm absolutem Alkohol dreht in 10 ccm langer Schicht bei Natriumlicht + 1° 30' (Neuberg<sup>6)</sup>, nach 30 Stunden<sup>7)</sup> + 1° 20'. Das Maltosazon kann man auch daran erkennen, daß es (auch im Gemisch mit anderen Disaccharidosazonen, Hexo- und Pentosazonen) durch Hefe gespalten wird und eine reduzierende Flüssigkeit liefert. 0,01 g genügen für die Reaktion, wegen deren genauer Ausführung s. Neuberg und Saneyoshi<sup>8)</sup>. Mit Benzoylchlorid und Natronlauge gibt Maltose fünffach und sechsfach benzoyleerte Maltose (Skraup<sup>9)</sup>).

Das spezifische Rotationsvermögen wird zu +137—138° angegeben. Es ist nach Meißl<sup>10)</sup> veränderlich, wird mit steigender Konzentration der Lösung, ebenso mit steigender Temperatur geringer und läßt sich im allgemeinen ausdrücken durch die Formel  $[\alpha]_D = +140,375^\circ - 0,01837 p - 0,095 t$ , in welcher p den Prozentgehalt an wasserfreier Maltose und t die Temperatur bezeichnet. Kalt frischbereitete, wässrige Maltoselösungen steigern allmählich beim Stehen ihr Drehungsvermögen, bis sie nach 10—12 Stunden, sofort beim Erhitzen, die



Eigenschaften.

Verbindungen:  
mit Phenyl-  
hydrazin

mit Benzoesäure.

Optische Eigen-  
schaften.

<sup>1)</sup> Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 220, S. 209. 1883.

<sup>2)</sup> Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 142, S. 1216. 1906.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 56, S. 425. 1908.

<sup>4)</sup> Journ. f. prakt. Chem. N. F. Bd. 21, S. 285. 1880.

<sup>5)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 17, 1, S. 583. 1884; Bd. 20, 1, S. 831. 1887; Bd. 23, 2, S. 2119. 1890. Bd. 41, 1, S. 76. 1908.

<sup>6)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 32, 3, S. 3384. 1899.

<sup>7)</sup> Brigl u. Mistelet: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 126, S. 129. 1923.

<sup>8)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 36, S. 44. 1911.

<sup>9)</sup> Monatshefte f. Chem. Bd. 10, S. 389. 1889. — Kueny: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 14, S. 349. 1890.

<sup>10)</sup> Journ. f. prakt. Chem. N. F. Bd. 25, S. 120. 1882.

obige Größe erreicht haben (Mutarotation). Durch Säure wird die Drehung wenig beeinflusst (s. Bleyer u. Schmidt<sup>1</sup>).

Einwirkung von Alkalien.

Durch Zinkhydroxyd-Ammoniak entsteht aus Maltose Methylimidazol, aber weniger als aus Glucose (Windaus<sup>2</sup>). Bei der Einwirkung von verdünnten Lösungen von Ätzbaryt und anderen Hydroxyden findet schon bei Zimmertemperatur, schneller in der Wärme, eine Abnahme der Drehung bis zur Inaktivität statt. Es erfolgt Dunkelfärbung, Spaltung in Traubenzucker, der zum Teil in Fruchtzucker und Mannose übergeht; auch entstehen Milchsäure und andere Produkte (Kolb<sup>3</sup>).

Einwirkung von Säuren und Fermenten.

Durch Kochen mit verdünnten Säuren wird Maltose in Glucose übergeführt. Die Spaltung erfolgt viel langsamer wie die des Rohrzuckers. Die beste Ausbeute erhält man bei 3stündigem Kochen mit 3% Schwefelsäure, indem aus 100 g wasserhaltiger Maltose 98,3—98,9 g wasserfreie Glucose entstehen (Meißl<sup>4</sup>). In derselben Weise spaltend, wenn auch langsamer, wirken invertierende Fermente (Maltase), wie sie im Speichel, Pankreassaft, Blutserum, in der Dünndarmschleimhaut, Pankreasdrüse und in vielen anderen Organen vorkommen. Bei längerem Kochen mit Säuren entstehen Lävulinsäure und wenig Furfurol, ebenso wie aus Glucose.

Oxydation.

Bei der Oxydation entsteht Gluconsäure bzw. Zuckersäure, durch vorsichtige Oxydation mit Brom Maltobionsäure, welche beim Erwärmen mit verdünnter Schwefelsäure in Glucose und Gluconsäure zerfällt (E. Fischer und Meyer<sup>5</sup>).

Gärung.

Die Maltose gärt mit gewöhnlicher Hefe nach vorangegangener Spaltung durch die Maltase der Hefe. Manche Hefen, welche Traubenzucker vergären, vergären Maltose nicht, was zur Isolierung benutzt werden kann.

Nachweis.

Zum Nachweis dienen die erheblichen Unterschiede, die sich bei der titrimetrischen und polarimetrischen Bestimmung (auf Traubenzucker bezogen) ergeben, ferner die Vergärbarkeit, die Eigenschaften des Osazons (s. oben) und die Reaktion von Wöhllk<sup>6</sup>). Bringt man in einem schmalen Reagensglas eine Lösung von 0,5—0,7 g Maltose in 10 ccm 10proz. Ammoniak in ein Wasserbad, das eben zu kochen aufgehört hat, so tritt nach 15—20 Minuten eine krapprote Farbe auf. Milchzucker verhält sich ebenso, während Traubenzucker keine Färbung gibt.

Vorkommen.

109. Isomaltose findet sich nach Baisch<sup>7</sup>) und Lemaire<sup>8</sup>) in kleinen Mengen in normalem Harn, nach Pavy und Slau<sup>9</sup>) in Blut und Muskeln. Sie soll auch bei der Spaltung von Stärke und Glykogen durch Säuren (Scheibler und Mittelmeier<sup>10</sup>), Lintner, Cremer<sup>11</sup>), v. Friedrichs<sup>12</sup>) und durch im Speichel, Pankreassaft, Malz enthaltene diastatische Fermente (Külz und Vogel<sup>13</sup>), Röhm<sup>14</sup>), Lintner und Düll<sup>15</sup>) entstehen. Ihre Isolierung geschah in allen Fällen als Osazon. Vergleiche indessen dazu Brown und Morris<sup>16</sup>), wonach sehr wohl die Möglichkeit besteht, daß die aus Harn und Organen und aus den Spaltungsprodukten der Stärke isolierte Isomaltose verunreinigte Maltose ist.

Darstellung.

Sie wurde von E. Fischer<sup>17</sup>) erhalten durch 15stündiges Stehenlassen einer bei Zimmertemperatur hergestellten Lösung von Glucose in dem vierfachen Gewicht Salzsäure (spez. Gew. 1,19)

<sup>1</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 138, S. 119. 1923. <sup>2</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 40, 1, S. 799. 1907.

<sup>3</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 63, S. 1. 1914. <sup>4</sup>) Journ. f. prakt. Chem. N. F. Bd. 25, S. 125. 1882.

<sup>5</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 22, 2, S. 1941. 1889.

<sup>6</sup>) Zeitschr. f. analyt. Chem. Bd. 43, S. 670. 1904.

<sup>7</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 20, S. 249. 1895.

<sup>8</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 21, S. 442. 1895/96.

<sup>9</sup>) Journ. of physiol. Bd. 26, S. 282. 1900/01. <sup>10</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 23, 3, S. 3075. 1890.

<sup>11</sup>) Zeitschr. f. Biol. Bd. 31, S. 181. 1894. <sup>12</sup>) Chem. Zentralbl. 1914, I, S. 760.

<sup>13</sup>) Zeitschr. f. Biol. Bd. 31, S. 108. 1894. <sup>14</sup>) Zentralbl. f. d. med. Wissensch. 1893, S. 849.

<sup>15</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 26, 3, S. 2533. 1893.

<sup>16</sup>) Journ. of the chem. soc. (London) Bd. 67, S. 709. 1895.

<sup>17</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 23, 4, S. 3687. 1890; Bd. 28, 3, S. 3024. 1895. — v. Friedrichs: Chem. Zentralbl. 1914, I, S. 763.

bei 15–10°, Fallen mit Alkohol und Äther, Lösen des Niederschlages, welcher aus Glucose, Isomaltose und anderen unbekanntem Stoffen besteht, in Wasser, Vergärung und Isolierung der Isomaltose als Osazon. Auch bei der Einwirkung von Hefemaltase auf konz. Traubenzuckerlösung entsteht Isomaltose, wie Emmerling<sup>1)</sup> fand, während Croft Hill<sup>2)</sup>, welcher diese Synthese zuerst beobachtete, den Zucker für Maltose hielt. In reinem Zustand ist sie bisher nicht dargestellt. Amorph, zerfließt an der Luft zu Sirup, schmeckt süß, in wässrigem Alkohol und Methylalkohol löslich, unlöslich in absolutem Alkohol, rechtsdrehend, gibt die Trommersche Probe (§ 97). Das Isomaltosazon  $C_{24}H_{32}N_4O_9$  (§ 101) bildet feine gelbe meist zu kugeligen Aggregaten vereinigte biegsame Nadeln, löst sich in 4 Tl. heißem Wasser und ist auch in heißem Alkohol viel löslicher als das Maltosazon. Es beginnt gegen 140° zu sintern und schmilzt zwischen 150 und 154° oder etwas höher. Es wird von Hefefermenten nicht angegriffen, ergibt also unter ihrer Einwirkung keine reduzierende Lösung (Unterschied von Maltosazon); durch siedende verdünnte Schwefelsäure wird es gespalten, wobei gärungsfähiger Zucker entsteht. Siehe darüber Neuberg und Sanejoschi<sup>3)</sup>. Isomaltose zerfällt beim Kochen mit verdünnten Mineralsäuren in 2 Mol. Traubenzucker. Durch Hefe wird sie nicht vergoren (wenigstens nicht die von E. Fischer dargestellte). Über das Verhalten zu Emulsin und anderen Enzymen s. v. Friedrichs.

110. Lactose (Milchzucker)  $C_{12}H_{22}O_{11}$ . Der Milchzucker ist bis jetzt allein in der Milch des Menschen und der Säugetiere (in der Walfischmilch fehlt er nach Scheibe<sup>4)</sup> aufgefunden, und der einzige Zucker, der in diesem Sekret nachgewiesen ist; aus der Milchdrüse stammend, erscheint er regelmäßig in kleiner Menge auch im Harn von Wöchnerinnen und im Kuhharn einige Tage vor und nach der Geburt. Auch im Harn eines neugeborenen Kalbes wurde er gefunden (Langstein und Neuberg<sup>5)</sup>) und ebenso im Harn schwer magen-darmkranker Säuglinge (Langstein und Steinitz<sup>6)</sup>).

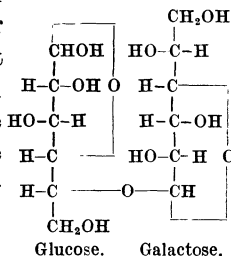
Man stellt ihn aus der Kuhmilch durch Ansäuern derselben mit Essigsäure bis zur Gerinnung des Caseins oder Ausscheiden des Caseins durch Lab, Koliieren durch ein leinenes Tuch, Erhitzen des Filtrats zum Kochen, Abfiltrieren des koagulierten Eiweiß, Abdampfen der Molken zur Krystallisation, Abgießen der Mutterlauge von den in einigen Tagen beim Stehen ausgeschiedenen Krystallen dar. Man reinigt ihn durch Umkrystallisieren aus warmem Wasser.

Zur Isolierung des Milchzuckers aus Harn dient das Verfahren von Hofmeister<sup>7)</sup>.

Der Milchzucker bildet farblose, harte, glänzende, oft ziemlich große Krystalle, welche 1 Mol. Krystallwasser enthalten, zum rhombischen Systeme gehören und sehr ausgeprägt hemiedrisch sind (achtseitige Prismen mit stärkerer Ausbildung von 4 Seiten gegen ihre benachbarten schmälere, schräge Endfläche unten und oben am Prisma). Vorsichtig allmählich auf 150° erhitzt, verliert er sein Krystallwasser ohne wesentliche weitere Zersetzung. Wird eine wässrige Lösung von Milchzucker in einem Metallgefäß schnell eingekocht, so erstarrt fast plötzlich die ganze Lösung zu einer porösen, nur aus kleinen, wasserfreien Krystallen bestehender Masse. Der Milchzucker löst sich in 6 Teilen kaltem und 2½ Teilen kochendem Wasser (der wasserfrei krystallisierte leichter), etwas in Pyridin, in 65proz. Alkohol zu 0,3%; ist unlöslich in Alkohol oder Äther. Seine wässrige Lösung hat einen schwach süßen Geschmack und färbt sich beim Erhitzen über 100° braun. Durch essigsaures Blei und Ammoniak wird Milchzucker ebenso wie Traubenzucker aus seinen wässrigen Lösungen völlig ausgefällt, während er durch Kochen mit neutralem, essigsaurem Blei weder gefällt noch verändert wird.

Eigenschaften.

Vorkommen.



Darstellung.

Eigenschaften.

<sup>1)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 34, 1, S. 600 und Bd. 34, 2, S. 2206. 1901.

<sup>2)</sup> Journ. of the chem. soc. (London) Bd. 73, S. 634. 1898.

<sup>3)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 36, S. 44. 1911.

<sup>4)</sup> Münch. med. Wochenschr. 1908, S. 795.

<sup>5)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 4, S. 292. 1907.

<sup>6)</sup> Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 7, S. 575. 1906.

<sup>7)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 1, S. 105. 1877/78.

Verbindungen mit Metallen.	Mit Basen verbindet sich der Milchzucker zu amorphen Körpern, durch Kupfersulfat und Natronlauge wird er teilweise gefällt (Yoshimoto <sup>1</sup> ). Er löst auch Cuprioxyd in alkalischer Lösung und reduziert dasselbe zu Cuproxid, und zwar wird 1 ccm Fehlingscher Lösung (gleichgültig ob verdünnt oder nicht) bei 6 Minuten langem Kochen von 0,00676 g Milchzucker (in 0,5- bis 1,5 proz. Lösung) reduziert (Soxhlet <sup>2</sup> ). Er gibt auch die anderen Reduktionsproben und die Mooresche Probe (§ 97), nicht aber (zum Unterschied von Glucose) die Barfoedsche Probe (S. 118).
Reduktionsvermögen.	
Verbindungen: mit Benzoesäure	Schüttelt man eine wässrige Lösung von Milchzucker mit Benzoylchlorid und Natronlauge, so scheidet sich ein Gemenge von 6- und 7- resp. 8fach benzoylierter Lactose ab (Skraup <sup>3</sup> ). Das Phenyllactosazon $C_{24}H_{32}N_4O_9$ (§ 97) scheidet sich erst beim Erkalten in gelben, zu kugeligen Aggregaten vereinigten Nadeln ab und ist in heißem Wasser ziemlich leicht löslich. Es beginnt bei raschem Erhitzen gegen 200° zu schmelzen, ist aber erst bei 210—212°, und zwar unter Zersetzung vollständig geschmolzen (E. Fischer <sup>4</sup> ). Es löst sich auch leicht in Pyridin und scheidet sich auf Zusatz von Benzol, Ligroin oder Äther wieder ab. Eine Lösung von 0,2 g in 4 ccm reinem Pyridin und 6 ccm absolutem Alkohol ist in 10 cm langer Schicht inaktiv. Hierdurch unterscheidet sich das Lactosazon von den Osazonen anderer Zucker, die unter denselben Bedingungen aktiv sind (Neuberg <sup>5</sup> ). Lactosazon wird durch Emulsin, Kefirferment, Hefe nicht gespalten. Durch Kochen mit verdünnter Säure erfolgt Abspaltung von Galaktose, die man an ihren Eigenschaften, besonders an ihrem Verhalten zu Hefe, erkennen kann. Es lassen sich auf die Weise noch 0,2 g Lactosazon erkennen (s. Neuberg und Sanejoshi <sup>6</sup> ). Auf Zusatz der äquivalenten Menge Benzylphenylhydrazin, in der molekularen Menge Eisessig gelöst, scheidet sich aus heißen Milchzuckerlösungen langsam ein hellgelber krystallinischer Niederschlag von Lactosebenzylphenylhydrazon (Fp. 128°) ab (v. Ekenstein und Lobry de Bruyn <sup>7</sup> ). Mit o-Tolylhydrazin gibt er kein Hydrazon (Unterschied von Galaktose (v. d. Haar <sup>8</sup> )).
mit Phenylhydrazin	
mit Benzylphenylhydrazin.	
Optische Eigenschaften.	Für den krystallwasserhaltigen Milchzucker $[\alpha]_D = +52,5^\circ$ nach längerem Stehen oder Kochen der Lösung, zunächst viel größer (Mutarotation) (Makris <sup>9</sup> ), Schmöger <sup>10</sup> ). Der krystallisierte wasserfreie zeigt zunächst geringe Rechtsdrehung, die beim Stehen zunimmt, verhält sich also umgekehrt wie der wasserhaltige (Erdmann <sup>11</sup> ). Starke Säure erhöht die spezifische Drehung. S. Bleyer und Schmidt <sup>12</sup> ).
Einwirkung: von Alkalien	Alkalische Lösungen zersetzen sich ebenso wie alkalische Traubenzuckerlösungen schon bei gewöhnlicher Temperatur allmählich, schneller beim Erhitzen, gleichfalls unter Braunfärbung und Bildung von Milchsäure und Brenzcatechin. Durch Einwirkung von Zinkhydroxydammoniak auf Milchzucker entsteht Methylimidazol (aber sehr viel weniger als aus Glucose) (Windaus <sup>13</sup> ).
von Säuren und Fermenten	In saurer Lösung in der Kälte und bei gelindem Erwärmen ist der Milchzucker

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 56, S. 425. 1908.

<sup>2</sup>) Journ. f. prakt. Chem. N. F. Bd. 21, S. 261. 1880.

<sup>3</sup>) Monatshefte f. Chem. Bd. 10, S. 389. 1889. — Kueny: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 14, S. 349. 1890.

<sup>4</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 17, 1, S. 583. 1884; Bd. 20, 1, S. 830. 1887; Bd. 41, 1, S. 76. 1908.

<sup>5</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 32, 3, S. 3384. 1899.

<sup>6</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 36, S. 44. 1911.

<sup>7</sup>) Recueil des travaux chim. des Pays-Bas Bd. 15, S. 225. 1896.

<sup>8</sup>) Recueil des travaux chim. des Pays-Bas Bd. 37, S. 251; ref. Chem. Zentralbl. 1918, I, S. 917.

<sup>9</sup>) Studien über die Eiweißkörper der Frauen- und Kuhmilch. Inaug.-Diss. Straßburg 1876.

<sup>10</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 13, 2, S. 1922. 1880. <sup>11</sup>) desgl. Bd. 13, 2, S. 2180. 1880.

<sup>12</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 138, S. 119. 1923.

<sup>13</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 40, 1, S. 799. 1907.

beständig. Wird er aber mit verdünnter Schwefelsäure oder Salzsäure längere Zeit gekocht, so zerfällt er in Glucose und Galaktose; durch Enzyme, welche in der Dünndarmschleimhaut des neugeborenen Menschen und mancher Tiere, in Kefirkörnern und in manchen Hefen enthalten sind sowie durch Emulsin erfährt er dieselbe Spaltung. Bei stärkerer Einwirkung von Säuren entstehen Ameisensäure, Lävulinsäure, Huminsubstanz, Furfurol. Bei der Oxydation mit Salpetersäure bilden sich Schleimsäure, Zuckersäure, weiterhin Weinsäure, Traubensäure, Oxalsäure usw.; bei vorsichtiger Oxydation mit Brom bei gewöhnlicher Temperatur erhält man Lactobionsäure  $C_{12}H_{22}O_{12}$ , welche beim Kochen mit Säuren in Gluconsäure und Galaktose zerfällt (E. Fischer und Meyer<sup>1</sup>).

von Oxydations-  
mitteln

Durch die sog. Milchzuckerhefen (nicht durch die gewöhnliche Bierhefe) wird Milchzucker zu Alkohol und Kohlensäure vergoren, wobei in manchen Fällen eine Spaltung in die Monosaccharide vorangeht, in anderen direkte Vergärung erfolgt (Willstätter und Oppenheimer<sup>2</sup>), durch verschiedene Arten von Bakterien, welche in saurer Milch und in Käse sich finden, besonders bei Gegenwart von Kreide oder Zinkoxyd sehr schnell in Milchsäuregärung versetzt (vgl. § 82).

von Hefen und  
Bakterien.

Zur Erkennung und zum Nachweis des Milchzuckers dienen der positive Ausfall sämtlicher Reduktionsproben (§ 97) mit Ausnahme der von Barfoed (S. 118), die Zunahme der Rechtsdrehung der Lösung nach  $\frac{1}{2}$ stündigem Kochen mit verdünnter Salzsäure, die Fähigkeit, nach 1stündigem Kochen der Lösung mit verdünnter Schwefelsäure und Neutralisation mit Calciumcarbonat mit gewöhnlicher Hefe zu gären, die Bildung von Schleimsäure bei der Oxydation mit Salpetersäure (noch mit ziemlich kleinen Mengen ausführbar) (S. 122), das Osazon mit seinen oben beschriebenen Eigenschaften, die Bildung eines Hydrazons mit o-Tolyhydrazin erst nach der Hydrolyse mit Schwefelsäure und Entfernung der Schwefelsäure mit Bariumcarbonat (v. d. Haar), der positive Ausfall der Probe von Wöhler (S. 124).

Nachweis.

Über Nachweis im Harn s. § 603, Nachweis und Bestimmung in der Milch § 805 und § 812.

#### *Polysaccharide von der Formel $(C_6H_{10}O_5)_n$ .*

111. **Amylum (Stärke)**  $(C_6H_{10}O_5)_n$ \*, in Pflanzen weit verbreitet. Weißes, aus kristallinen Körnern mit geschichteter Struktur bestehendes Pulver, in kaltem Wasser unlöslich, in warmem unter Platzen der Körner quellend und Kleister bildend, in Alkohol und Äther unlöslich. Durch Kochen mit Wasser unter Druck, durch  $\frac{1}{2}$ stündiges Erhitzen mit Glycerin auf  $190^\circ$  (Zulkowski), oder durch wochenlange Behandlung mit verdünnter Salzsäure bei gewöhnlicher Temperatur geht Stärke in eine in Wasser lösliche Modifikation (Amidulin) über. Mit Jod färbt sie sich blau, beim Erhitzen verschwindet die blaue Farbe, um beim Erkalten wieder zu erscheinen. Durch Eintragen von Salzen (besonders Magnesiumsulfat) wird Stärke aus ihren Lösungen ausgeschieden.

Vorkommen und  
Eigenschaften.

Nach A. Meyer und nach Maquenne bestehen die Stärkekörner aus zwei in ihren Mengenverhältnissen in Stärke verschiedener Herkunft schwankenden, physikalisch verschiedenen Bestandteilen: Amylopectin (Hüllensubstanz) und Amylose (Innensubstanz), deren Trennung mit Lauge, nach Samec am besten durch Elektrolyse der Stärkelösung geschieht. Dabei scheidet sich das Amylopectin als gallertige, schleimige Masse ab, während Amylose in Lösung

Bestandteile.

\*) Nach Karrer<sup>3</sup>) ist die Stärke polymerisiertes Maltoseanhydrid  $(C_{12}H_{20}O_{10})_n$ . Nicht im Einklang mit dieser Auffassung stehen Befunde von Pringsheim<sup>4</sup>) und von Pictet<sup>5</sup>), welche Spaltungsprodukte der Stärke von der Formel  $(C_6H_{10}O_5)_3$  erhielten.

<sup>1</sup>) Ber. d. Dtsch. Ch. m. Ges. Bd. 22, I, S. 361. 1889.

<sup>2</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 118, S. 168. 1922.

<sup>3</sup>) Karrer u. Nägeli: Helvetica chim. acta Bd. 4, S. 185. 1921.

<sup>4</sup>) Pringsheim u. Dernikos: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 55, S. 1433. 1922. S. dazu Karrer: desgl. Bd. 55, S. 2854. 1922.

<sup>5</sup>) Pictet u. Jahn: Helvetica chim. acta Bd. 5, S. 640. 1922.

bleibt. Ersteres, der Kleister bildende Teil der Stärke, ist eine Phosphorsäureverbindung, in Alkalien unlöslich, färbt sich mit Jod violett bis rot und zerfällt beim Erhitzen mit Wasser auf 120° in Phosphorsäure und ein wasserlösliches Kohlenhydrat, welches Samec Erythroamylose nennt. Der andere Bestandteil Amylose (von Samec Amyloamylose genannt), bildet keinen Kleister, ist in Alkalien löslich und färbt sich mit Jod blau. Beide werden durch Diastase verschieden leicht gespalten. Eingehende Untersuchungen über die Bestandteile des Stärkekorns und ihre Trennung sind von Biedermann<sup>1)</sup> ausgeführt. Er trennt die Amylose durch Behandeln mit Wasser von 80° ab. Weiteres im Original. Amylose kann man nach ihm<sup>2)</sup> daran erkennen, daß beim Eintrocknen eines Tropfens durch Jod blaugefärbter Lösung Rotfärbung auftritt (noch bei ganz kleinen Mengen ist auf einer weißen Unterlage ein rötlicher Hauch zu erkennen), während eine durch Jod violett gefärbte Amylopectinlösung einen farblosen Rückstand hinterläßt.

Umwandlungen.

Bei der trockenen Destillation der Stärke im Vakuum entsteht Lävoglucosan (Pictet und Sarasin<sup>3)</sup>). Durch Acetylbromid und Eisessig bei 0° entsteht aus Stärke Acetobrommaltose (Karrer und Naegeli<sup>4)</sup>), bei der Methylierung mit Dimethylsulfat und Barytwasser Methylstärke mit etwa 32% Methoxygehalt (auf 6 C 2 CH<sub>3</sub>). Sie ist in Wasser, heißem Alkohol, Chloroform, Aceton löslich, in Äther unlöslich, färbt sich mit kleinen Mengen Jod nicht, mit überschüssigem rotbraun. Molekulargewicht 900–1100 (Karrer und Naegeli<sup>5)</sup>). Eine noch stärkere Methylierung erreicht Irvine<sup>6)</sup>. Durch Kochen mit Säuren entsteht quantitativ Traubenzucker, durch diastatisches Ferment Maltose. In beiden Fällen erscheinen als Zwischenstufen Dextrine (s. § 113). Über die durch Bac. macerans entstehenden Dextrine siehe § 113. Bei der Oxydation mit Salpetersäure entsteht Zuckersäure, mit Brom Glukonsäure.

Vorkommen.

112. Glykogen (C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>)<sub>n</sub><sup>\*)</sup> 7). In den Lebern von gut genährten Fleisch- und Pflanzenfressern, wie es scheint bei allen Wirbeltieren, findet sich Glykogen reichlich, solange sie sich wohl befinden. Herz und Muskeln enthalten im frischen Zustande stets Glykogen. Dasselbe findet sich überhaupt in allen tierischen entwicklungsfähigen Zellen, normalen wie pathologischen, reichlich in solchen normalen und pathologischen Geweben (Geschwülsten), die eine lebhaftere Zellentwicklung und -neubildung zeigen, demgemäß auch im embryonalen Gewebe. Beim Hungern, bei der Arbeitsleistung nimmt der Glykogengehalt in Leber und Muskeln ab, um schließlich ganz zu verschwinden. In den Lebern kranker Tiere findet es sich nur in geringer Menge oder fehlt ganz. Auch in vielen wirbellosen Tieren aus der Klasse der Echinodermen, Crustaceen, Mollusken, auch bei Kephelopoden und Aplysien (Starkenstein und Henze<sup>8)</sup>) ist Glykogen nachgewiesen. Besonders reichlich fand G. Bizio<sup>9)</sup> Glykogen in verschiedenen Muscheln, besonders Ostrea edulis, Cardium edule. Ferner ist es in Pflanzen mehrfach nachgewiesen, besonders in vielen Pilzen, in der Hefe.

Den tierischen Organen läßt sich das Glykogen durch Kochen mit Wasser entziehen, durch sehr langes (viele Tage) fortgesetztes Kochen vollständig.

Darstellung reinen Glykogens.

Zur Gewinnung eines völlig reinen Glykogens verfuhr Gutin-Gruzewska<sup>10)</sup> unter Benutzung der Erfahrungen von Pflüger-Nerking<sup>11)</sup> und Cl. Bernard<sup>12)</sup> in folgender Weise:

\*) Nach Karrer ist Glykogen ebenso wie Stärke polymerisiertes Maltoseanhydrid (C<sub>12</sub>H<sub>20</sub>O<sub>10</sub>)<sub>n</sub>. Siehe dazu das bei Stärke (S. 127, \* Fußnote) Gesagte.

<sup>1)</sup> Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 183, S. 168. 1920.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. Fermentforsch. Bd. 4, S. 1. 1921.

<sup>3)</sup> Helvetica chim. acta Bd. 1, S. 87. 1918. — Karrer u. Rosenberg: desgl. Bd. 5, S. 575. 1922.

<sup>4)</sup> Helvetica chim. acta Bd. 4, S. 263 u. 678. 1921. <sup>5)</sup> desgl. Bd. 4, S. 185. 1921.

<sup>6)</sup> Nach Pringsheim: Die Polysaccharide, 2. Aufl., S. 205. Berlin: Julius Springer 1923.

<sup>7)</sup> Ältere zusammenfassende Darstellungen: Cremer: Ergebn. d. Physiol. Bd. 1, 1, 803. S. 1902. — Pflüger: Das Glykogen. 2. Aufl. Bonn: Martin Hager 1905.

<sup>8)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 82, S. 417. 1912.

<sup>9)</sup> Atti dell'Istituto veneto di scienze etc. Vol. XI, Ser. 3. 1866.

<sup>10)</sup> Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 102, S. 569. 1904 u. Pflüger: Das Glykogen. 2. Aufl. 1905, S. 29.

<sup>11)</sup> Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 76, S. 531. 1899.

<sup>12)</sup> Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 44, S. 578. 1857.

Die ganz frische Leber eines (am besten auf Glykogen gemästeten\*) Tieres wird gewogen, nach Zerkleinerung in einer Fleischhackmaschine in einen Kolben mit siedendem Wasser (auf 200 Wasser 100 Gewebe) gebracht, 5–6 Stunden auf stark kochendem Wasserbade erhitzt und nach Abkühlen durch Glaswolle und dann durch Papier filtriert. Jetzt fügt man auf je 800 ccm Lösung 80 g Jodkalium, 40 ccm 60 proz. Kalilauge und 400 ccm Alkohol von 96 Vol.-% hinzu, gießt nach einigen Stunden die klare überstehende Flüssigkeit ab, filtriert den feinpulverigen Niederschlag durch ein schwedisches Filter und wäscht ihn nacheinander je zweimal mit einer Lösung, welche aus 1000 ccm Wasser, 100 g Jodkalium, 50 ccm 60 proz. Kalilauge und 500 ccm Alkohol von 96 Vol.-% hergestellt ist, mit 66 proz. und mit 96 proz. Alkohol. Nach Auflösen des Glykogens auf dem Filter mit heißem Wasser und Wiederholung der eben beschriebenen Fällung und Waschung wird wieder in Wasser gelöst und zur Entfernung des Jodkaliums und Kaliumhydroxyds mit dem gleichen Volumen 96 proz. Alkohols gefällt, der Niederschlag filtriert und mit 66 proz. und 96 proz. Alkohol gewaschen. Man löst nun zur Entfernung stickstoffhaltiger Beimengungen in kleiner Menge heißer 30 proz. Kalilauge (aus bestem KOH hergestellt), erhitzt im Kolben 1 Stunde auf kochendem Wasserbade, verdünnt nach dem Abkühlen mit gleichem Volumen Wasser und fällt mit dem gleichen Volumen 96 proz. Alkohol. Das nach wenigen Stunden flockig abgesetzte Glykogen wird durch gut gewaschenes Filter filtriert und nacheinander je zweimal mit einer Lösung, die aus 1 Tl. 15 proz. Kalilauge und 1 Tl. 96 proz. Alkohol besteht, mit 66 proz., mit 96 proz. Alkohol, absolutem Alkohol und Äther gewaschen. Es folgen nun zur Entfernung des Ätzkalis 5–6 Fällungen aus wässriger Lösung mit 1 höchstens 2 Tl. 96 proz. Alkohols (der abtropfende Alkohol darf sich zuletzt mit Rosolsäure nicht mehr rot färben), darauf zur Entfernung von anorganischen Bestandteilen 3 Fällungen aus der mit ein wenig Essigsäure angesäuerten wässrigen Lösung mit dem gleichen Volumen 96 proz. Alkohol und schließlich zur Entfernung der Essigsäure 3–4 Fällungen aus wässriger Lösung mit 96 proz. ganz säurefreiem Alkohol. Weil das Glykogen mit zunehmender Reinheit immer schwerer durch Alkohol gefällt wird, muß man nicht zu verdünnte Lösungen anwenden und zur Erzielung der Vollständigkeit der Fällung etwas Äther hinzufügen. Zuletzt wäscht man das Glykogen noch einige Tage mit absolutem Alkohol und einige Tage mit Äther, indem man ein an das Trichterrohr angefügtes Schlauchstück mit einer Klemme verschließt, so daß der aufgegosene Alkohol und Äther einige Stunden auf dem Glykogen stehen bleibt, dann die Klemme öffnet, ablaufen läßt, neue Waschflüssigkeit aufgießt usw. Es wird im evakuierten Exsiccator über Chlorcalcium oder Phosphorsäureanhydrid (nicht über Schwefelsäure) getrocknet.

Die Darstellung nach Brücke<sup>1)</sup>, welche aber zu einem etwas veränderten Glykogen führt, geschieht folgendermaßen: Das unmittelbar nach dem Tode entnommene und schnell zerkleinerte Organ wird in kochendes Wasser gebracht (auf 100 g Organ etwa 400 g Wasser) und einige Stunden gekocht, das Filtrat nach dem Erkalten mit Salzsäure und Brückes Reagens (Anh.) in der Weise ausgefällt, daß man unter Umrühren abwechselnd Salzsäure und das Reagens zufügt, bis kein Niederschlag mehr entsteht. Man filtriert, fügt zum Filtrat unter Umrühren 2 Vol. Alkohol von 96 Vol.-% hinzu und filtriert das ausgeschiedene Glykogen ab. Der Niederschlag wird in wenig warmem Wasser gelöst, die Lösung nach dem Erkalten nochmals mit einigen Tropfen Salzsäure und Reagens versetzt, um etwaige kleine Reste von Eiweiß zu entfernen, filtriert und das Filtrat wieder mit Alkohol unter Umrühren gefällt. Das auf einem Filter gesammelte Glykogen wird zuerst mit Alkohol von 66 Vol.-%, dann mit Alkohol von 96 Vol.-%, darauf mit Äther und nochmals mit Alkohol gewaschen und schließlich im Exsiccator über Chlorcalcium oder Phosphorsäureanhydrid getrocknet.

Das Glykogen ist der Stärke sehr ähnlich, unterscheidet sich von ihr in dem Verhalten zu Wasser und zu Jod. Es stellt eine amorphe (während das Stärkekorn Krystallstruktur besitzt), farb- und geschmacklose, in Wasser kolloidal lösliche, in Alkohol oder Äther unlösliche Substanz dar, die sehr hygroskopisch

\*) Zur Mästung erhält ein Hund von 6–8 kg nach 8tägigem Hungern 3 Tage lang täglich 200 g Fleisch, 100 g Reis und 100 g Kartoffeln, darauf 4 Tage lang außerdem noch eine Zulage von 150–200 g Rohrzucker und am Abend vor dem Tage, an dem morgens die Tötung stattfinden soll, nochmals eine reichliche solche Mahlzeit. Die Trockensubstanz der Leber besteht dann zu ungefähr  $\frac{2}{3}$  aus Glykogen (Schöndorff<sup>2)</sup>).

<sup>1)</sup> Sitzungsber. d. Akad. Wien Bd. 53, II. 3. Febr. 1871.

<sup>2)</sup> Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 99, S. 201. 1903.

ist und sich bei 110—120° unter Dunkelfärbung zersetzt. Bei 100° getrocknet, hat es die Zusammensetzung  $(C_6H_{10}O_5)_n$  (Nerking<sup>1</sup>). Aus einer dünnen, wässrigen, mit absolutem Alkohol bis zum Auftreten einer undurchsichtigen Trübung und dann tropfenweise mit Wasser bis zum Verschwinden dieser Trübung versetzten Lösung reinen Glykogens scheidet es sich beim ruhigen Stehen allmählich in Form von Kugeln und Stäbchen ab (Gutin - Gruzewska<sup>2</sup>). Die wässrige Lösung zeigt eine starke, weiße Opalescenz, nach einigem Stehen findet man die unteren Schichten reicher an Glykogen als die oberen (Gutin - Gruzewska). Nach Samec<sup>3</sup>) wird die Lösung durch Elektrolyse zerlegt in einen flockig ausfallenden Teil (20%) und einen in Lösung bleibenden (80%).

**Fällungsmittel.** Beide enthalten kleine Mengen Phosphorsäure, letzterer mehr. Die wässrige Glykogenlösung wird durch Alkohol gefällt (vollständig durch das doppelte Volumen); eine ganz aschefreie Lösung aber erst nach Zusatz einer Spur von Chlornatrium oder essigsauerm Alkali oder von Äther. Eine 4% Ätzkali enthaltende wässrige Lösung wird durch das gleiche Volumen Alkohol von 96 Vol.-% vollständig gefällt, eine durch Ätzkali stark alkalische schon durch das halbe Volumen (Pflüger). Eine wässrige Lösung scheidet, mit Ammonsulfat bei gewöhnlicher Temperatur oder mit Natriumsulfat bei 33° gesättigt, das Glykogen ab, nicht aber bei der halben Sättigung mit Ammonsulfat (Young<sup>4</sup>). Sie wird ferner gefällt durch Ätzbarytlösung, und zwar entsteht bei unvollständiger Ausfällung ein Niederschlag von der Formel  $5(C_6H_{10}O_5) \cdot Ba(OH)_2$ , bei vollständiger Ausfällung wechselt die Menge des Baryts im Niederschlage mit der Konzentration des Barytwassers bis zu einem maximalen Gehalt, welcher der Formel  $5(C_6H_{10}O_5) \cdot 2 Ba(OH)_2$  entspricht (O. Nasse<sup>5</sup>). Die Niederschläge lösen sich in reinem Wasser und werden durch Kohlensäure in Glykogen und Bariumcarbonat zerlegt. Ferner entstehen Niederschläge mit Gerbsäure, Bleiessig, schwefelsauerm Kupferoxydammoniak, Eisenchlorid, Phosphorwolframsäure bei Gegenwart von starker Salzsäure. Bleizucker bewirkt nur Trübung; leitet man Schwefelwasserstoff durch die Lösung, so bleibt das Schwefelblei (wie in Lösungen von Eiweißstoffen oder Leim) suspendiert, fällt aber auf Zusatz von Alkali nieder. In konzentrierten Lösungen rufen starke Essigsäure, Propionsäure, Buttersäure Niederschläge hervor, die aber beim Erwärmen sich lösen, also wohl keine Verbindungen darstellen. Beim Schütteln von Glykogenlösung mit Benzoylchlorid und Natronlauge fällt ein weißes, körniges Pulver aus, das aus benzoiliertem Glykogen besteht (Wedenski<sup>6</sup>). Kupferoxydhydrat wird durch Glykogen in alkalischer Lösung aufgelöst, aber auch beim Kochen nicht reduziert. Jod färbt eine Glykogenlösung je nach ihrer Konzentration gelbbraun bis rotbraun bis rot unter Bildung von Jodglykogen; diese Reaktion wird durch Zusatz von Kochsalz, Chlorammonium oder anderen Salzen verstärkt, man benutzt deshalb am besten eine mit Kochsalz gesättigte Jodjodkalilösung (Nasse). Beim Erhitzen dissoziiert die Verbindung und die Flüssigkeit nimmt die dem vorhandenen freien Jod entsprechende Farbe an.

Verbindung mit  
Benzoessäure.

Verhalten zu  
Kupferhydroxyd.  
Verhalten zu Jod.

Methylierung.

Bei der Methylierung (mit Dimethylsulfat und Barytwasser) entsteht Methylglykogen, das in seiner Zusammensetzung und seinen Eigenschaften

<sup>1</sup>) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 85, S. 320. 1901.   <sup>2</sup>) desgl. Bd. 102, S. 569. 1904.

<sup>3</sup>) Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 176, S. 1419; ref. Chem. Zentralbl. 1923, III, S. 1070.

<sup>4</sup>) Journ. of physiol. Bd. 22, S. 401. 1897/98.

<sup>5</sup>) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 37, S. 582. 1883.

<sup>6</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 13, S. 125. 1889. — Kueny: desgl. Bd. 14, S. 352. 1890.



durchaus mit der Methylostärke (§ 111) übereinstimmt (Karrer<sup>1</sup>). Über Acetylierung s. Pringsheim und Laßmann<sup>2</sup>).

Durch Acetyl bromid bei Gegenwart von etwas Eisessigbromwasserstoff entsteht Acetobrommaltose ebenso wie aus Stärke (Karrer<sup>1</sup>), bei Gegenwart von viel Bromwasserstoff Acetobromglucose (Bergmann und Beck<sup>3</sup>).

Verhalten zu Acetyl-  
bromid u. Eisessig-  
bromwasserstoff.

Das Glykogen zeigt in wässriger Lösung sehr starke rechtsseitige Zirkumpolarisation, die mit wünschenswerter Genauigkeit sich schwer bestimmen läßt wegen der starken Lichtdispersion, welche die Glykogenlösungen zeigen. S. indessen § 751. Für ganz reines aschefreies Glykogen (1—2proz. Lösungen) fand Gutin-Gruzewska im Mittel mehrerer Bestimmungen, die nur um 2,5° voneinander abwichen,  $[\alpha]_D = +196,57^\circ$ . Külz fand die Drehung unabhängig von der Konzentration der Lösungen, auch unbeeinflusst durch Zusatz von Salzsäure, Kali- oder Natronlauge, Jodquecksilberjodkalium in der Kälte.

Optische Eigen-  
schaften.

Auch durch stundenlanges Kochen mit starker Kalilauge (z. B. 30proz.) wird es nicht angegriffen. Durch Kochen mit verdünnter (2proz.) Kalilauge erleidet es eine geringe Veränderung, welche sich in größerer Löslichkeit in Weingeist ausspricht und wahrscheinlich auch mit Zerstörung einer kleinen Menge Glykogen verbunden ist. Eine sehr viel erheblichere Zersetzung beim Kochen mit 2proz. Kalilauge erfährt das nach Brücke und Külz dargestellte Glykogen (Pflüger). Das in den Organen befindliche Glykogen ist aber gegen beliebig langes Kochen mit Kalilauge beliebiger Konzentration widerstandsfähig (Pflüger<sup>4</sup>). Beim Kochen mit verdünnter Salz- oder Schwefelsäure wandelt es sich zunächst in Dextrine, dann in Maltose, schließlich in Glucose um. Am vollständigsten erfolgt die Umwandlung in Glucose bei 3stündigem Erhitzen in siedendem Wasserbad mit 2,2proz. Salzsäure. Es werden dann 97% Glykogen in Glucose umgewandelt (Nerking, Grebe<sup>5</sup>). Durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bei Gegenwart von Ferrisulfat entsteht aus Glykogen Maltose und Traubenzucker (Neuberg und Miura<sup>6</sup>), auch in belichteter uransalzhaltiger Lösung entstehen reduzierende Zucker (Neuberg<sup>7</sup>) und ebenso unter der Einwirkung des elektrischen Gleichstroms (Neuberg<sup>8</sup>). Durch Einwirkung von Brom und Wasser entsteht Gluconsäure (Nebel<sup>9</sup>), durch Kochen mit schwacher Salpetersäure Zuckersäure und Oxalsäure. Durch die in Speichel, Pankreassaft, Blutserum, Lebergewebe usw. enthaltenen diastatischen Fermente entstehen Dextrine und weiter Maltose. Über die durch Bac. macer. gebildeten Dextrine s. § 113.

Einwirkung:  
von Alkalien

von Säuren

von Oxydations-  
mitteln

von Fermenten.

Zum Nachweis des Glykogens dient die Opalescenz seiner wässrigen Lösung, das Reduktionsvermögen nach der Spaltung durch Säuren oder Fermente und besonders die Jodreaktion, soweit nicht Verwechslung mit Dextrinen oder Amyloid zu befürchten ist. Da das letztere in Wasser nicht löslich ist und durch Fermente nicht in Zucker umgewandelt wird, so ist es leicht, beide Körper gut voneinander zu unterscheiden. Da aber das Glykogen an den Orten, wo es abgelagert ist, gewöhnlich zugleich Ferment zu seiner Umwandlung in Traubenzucker vorfindet, so müssen die Untersuchungen auf Glykogen in Organen oder Flüssigkeiten so schnell wie möglich begonnen, oder es muß durch Zusatz von Alkohol bis zur Fällung die Einwirkung des Ferments unmöglich gemacht werden.

Nachweis.

<sup>1</sup>) Helvetica chim. acta Bd. 4, S. 994. 1921.

<sup>2</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 55, S. 1409. 1922.

<sup>3</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 54, 1, S. 1574. 1921.

<sup>4</sup>) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 129, S. 362. 1909. <sup>5</sup>) desgl. Bd. 121, S. 604. 1908.

<sup>6</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 36, S. 37. 1911. <sup>7</sup>) desgl. Bd. 13, S. 305. 1908.

<sup>8</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 17, S. 270. 1909.

<sup>9</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 29, S. 482. 1900.

Bei der direkten Prüfung der Organauszüge auf Glykogen mit der Jodreaktion ist zu berücksichtigen, daß sich in solchen Auszügen andere jodbindende Substanzen befinden. Infolgedessen verschwindet die zunächst auftretende rotbraune Färbung beim Stehen oder schneller beim Erhitzen und wird erst dann beständig, wenn die anderen jodbindenden Substanzen mit Jod gesättigt sind (Pflüger).

Über Bestimmung des Glykogens in Organen s. § 751.

Glykogenähnliche  
Substanzen.

Weitere hierhergehörige Substanzen wurden von Bütschli<sup>1)</sup> aus Gregarinen, von Gottlieb<sup>2)</sup> und Kutscher<sup>3)</sup> aus *Euglena viridis*, von Schmiedeberg<sup>4)</sup> aus den Wohnröhren von *Onuphis tubicola* isoliert und beschrieben.

Bildung.

113. **Dextrine** ( $C_6H_{10}O_5$ )<sub>n</sub>. Dextrine nennt man Stoffe, welche bei der Spaltung von Amylum und Glykogen durch diastatische Fermente oder verdünnte Säure in der Hitze als Zwischenglieder auftreten, um weiterhin in Maltose und (wenn die Spaltung durch Säurewirkung erfolgt) in Traubenzucker zu zerfallen.

Vorkommen.

Sie finden sich im Darm als Zwischenprodukte der Kohlenhydratverdauung. Erythroextrin ist einmal im Hundeharn gefunden worden (Kotake<sup>5)</sup>).

Eigenschaften.

Es sind in Wasser lösliche, in absolutem Alkohol unlösliche Körper, welche in konzentrierter Lösung in Wasser dick gummiartige Beschaffenheit zeigen und beim Erhitzen mit Alkalien sich gelb und braun färben. Man unterscheidet die Gruppen der Amylo-, Erythro- und Achroodextrine, welche durch fortgesetzte Spaltung aus Stärke (Glykogen) und aus einander entstehen und auch in ihrem Verhalten Übergänge zwischen diesen Polysacchariden einerseits und Zucker andererseits darstellen. Alle drehen rechts, und zwar ungefähr  $[\alpha]_D = 195^\circ$ , sie gären nicht. Die Amylodextrine färben sich mit Jod blau, die Erythroextrine rot, die Achroodextrine gar nicht. Alle 3 Gruppen enthalten Fehlingsche Lösung reduzierende und nicht reduzierende (Moreau<sup>6)</sup>, Samec<sup>7)</sup> Stoffe. Mittels der Jodreaktion lassen sich bei gleichzeitiger Anwesenheit von Amylo- und Erythroextrinen beide nebeneinander nachweisen, wenn man sich einer sehr verdünnten Jodlösung bedient und diese nur tropfenweise zusetzt: es entsteht zunächst Blaufärbung, bei weiterem Zusatz Rotfärbung. Die sehr schwierige Trennung, welche aber bisher noch nicht zur Gewinnung chemischer Individuen geführt hat, geschieht mit Hilfe von Alkohol (Lintner und Düll<sup>8)</sup>) oder besser mit Hilfe von Ammonsulfat und anderen Neutralsalzen nach Young<sup>9)</sup>. Die besten Resultate scheint die fraktionierte Fällung mit Bariumhydrat zuerst in wässriger, dann in alkoholischer Lösung nach Moreau zu geben. Samec benutzt die osmotische Methode (Dialyse durch Kollodiummembran).

Polyamylosen.

Einheitliche krystallisierte Dextrine (Polyamylosen) sind bisher nur aus den Produkten, welche aus Stärke und Glykogen durch *Bac. macerans* entstehen, von Schardinger<sup>10)</sup> und Pringsheim<sup>11)</sup> isoliert

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. Biol. Bd. 21, S. 603. 1885.    <sup>2)</sup> Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 75, S. 51. 1850.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 24, S. 360. 1898.

<sup>4)</sup> Mitt. a. d. zool. Stat. zu Neapel 1882, S. 373.

<sup>5)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 65, S. 414. 1910.

<sup>6)</sup> Ref. Biochem. Zentralbl. Bd. 3, S. 648. 1904/05.

<sup>7)</sup> Kolloidchem. Beihefte Bd. 10, S. 289; ref. Chem. Zentralbl. 1919, III, S. 343.

<sup>8)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 26, 3, S. 2533. 1893 u. Bd. 28, 2, S. 1522. 1895.

<sup>9)</sup> Journ. of physiol. Bd. 22, S. 401. 1897/98.

<sup>10)</sup> Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. II, Bd. 14, S. 772. 1905; Bd. 19, S. 161. 1907; Bd. 22, S. 98. 1909; Bd. 29, S. 188. 1911.

<sup>11)</sup> Pringsheim u. Langhans: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 45, 2, S. 2533. 1912. — Pringsheim u. Eißler: desgl. Bd. 46, 3, S. 2959. 1913 u. Bd. 47, 3, S. 2565. 1914. — Pringsheim u. Lichtenstein: desgl. Bd. 49, 1, S. 364. 1916. — Pringsheim u. Persch: Bd. 54, 2, S. 3162. 1921; desgl. Bd. 55, 1, S. 1425. 1922; Pringsheim u. Dernikos: desgl. Bd. 55, S. 1433. 1922.

und besonders von letzterem und Karrer<sup>1)</sup> genauer untersucht worden. Dazu gehören

**$\alpha$ -Tetraamylose ( $\alpha$ -Dextrin)**  $[(C_6H_{10}O_5)_2]_2 + 2 C_2H_6O$ , zu 17,9% in Wasser löslich, von süßem Geschmack,  $[\alpha]_D = +138,6^\circ$ , Jodadditionsprodukt grüne Nadeln.

**$\beta$ -Hexaamylose ( $\beta$ -Dextrin<sup>2)</sup>**  $[(C_6H_{10}O_5)_3]_2 + 9 H_2O$ , zu 2,4% in Wasser löslich, sehr leicht in reiner Natronlauge, von süßem Geschmack,  $[\alpha]_D = +157,9^\circ$ , Jodadditionsprodukt dunkelrotbraune Prismen.

**$\alpha$ -Hexaamylose**  $[(C_6H_{10}O_5)_2]_3$ , in Wasser etwas leichter löslich als  $\beta$ -Dextrin, aber klar nur in wässrigem Alkohol, Jodadditionsprodukt grüne Nadeln.  $[\alpha]_D$  in wässrigem Alkohol =  $+139^\circ$ .

Die beiden nächsten wurden nicht als direkte Abbauprodukte der Stärke erhalten, sondern die Diamylose aus Tetra- und  $\alpha$ -Hexaamylose und die Triamylose aus  $\beta$ -Hexaamylose. Durch Essigsäureanhydrid und Chlorzink erfolgt nämlich Aufspaltung und Acetylierung, wobei aus Tetra- und  $\alpha$ -Hexaamylose Diamyloseheptacetat und aus  $\beta$ -Hexaamylose Triamylosemonoacetat entsteht. Bei der Verseifung in der Kälte gibt ersteres Diamylose und letzteres Triamylose.

**$\alpha$ -Diamylose**  $(C_6H_{10}O_5)_2 + 2 H_2O$ , in Wasser leicht löslich,  $[\alpha]_D = +136,6^\circ$ , Jodadditionsprodukt grüne Nadeln.

**$\beta$ -Triamylose**  $(C_6H_{10}O_5)_3 + 4 H_2O$ , zu 1,3% in Wasser löslich,  $[\alpha]_D = +151,8^\circ$ , Jodadditionsprodukt dunkelrotbraune Prismen. Nach Karrer<sup>3)</sup> existiert diese Triamylose nicht, sie ist vielmehr identisch mit  $\beta$ -Hexaamylose, welche er als  $[(C_6H_{10}O_5)_2]_3$  auffaßt (s. dazu Pringsheim<sup>4)</sup>).

Die Polyamylosen polymerisieren sich leicht. Durch Einwirkung von Acetylbromid und wenig Eisessig entstehen aus ihnen Acetobrommaltose (Karrer und Naegeli<sup>5)</sup>), durch Methylierung krystallinische Dimethyl-derivate (Pringsheim und Persch<sup>6)</sup>). Die Polyamylosen geben die Reduktionsproben (§ 97) nicht, gären nicht und werden durch Emulsin nicht gespalten, ebenso nicht durch Hundepankreassaft (Karrer<sup>7)</sup>). Beim Kochen mit Säuren zerfallen sie in Traubenzucker und ebenso durch Fermente einiger Schimmelpilze.

Eigenschaften  
der Polyamylosen.

**Tierisches Dextran.** Unter diesem Namen beschreibt L. Liebermann<sup>8)</sup> einen gummiartigen Körper, den er aus dem wässrigen Auszug der Exkremente einer Blattlaus (*Schizoneura lanuginosa*) durch Füllen mit Alkohol erhielt. Die Substanz, deren Analyse keine scharfen Zahlen gab (am besten paßt sie zu der Formel  $C_6H_{10}O_5$ ), verhält sich ganz wie Gummi, ist in kaltem Wasser schwer löslich, dreht stark rechts,  $[\alpha]_D = +156,7^\circ$ ; nach längerem Kochen mit Säuren reduziert sie alkalische Kupferoxydlösung.

**Tierisches Sinistrin**  $2(C_{12}H_{20}O_{10}) + H_2O$  nennt Hammarsten<sup>9)</sup> ein Kohlenhydrat, welches bei der Zersetzung des Glucoproteids der Eiweißdrüse von *Helix pomatia* mit 5–10proz. Kalilauge in der Kälte sich absplaltet und mit Hilfe der Brückeschen (S. 129) oder Landwehrschen Methode<sup>10)</sup> isoliert werden kann. Es löst sich leicht in Wasser zu einer schwach bläulichweiß opaleszierenden Flüssigkeit, welche linksdrehend ist, durch Jod nicht gefärbt und durch Speichel nicht angegriffen wird. Beim Erhitzen mit Säure wird das Sinistrin in einen süßschmeckenden Zucker übergeführt, welcher Fehlingsche Lösung reduziert, gärunsfähig ist und ziemlich stark rechts dreht; krystallisiert wurde derselbe nicht erhalten.

<sup>1)</sup> Karrer u. Naegeli: *Helvetica chim. acta* Bd. 4, S. 169 u. 263. 1921. — Karrer, Naegeli, Hurwitz u. Wälti: desgl. Bd. 4, S. 678. 1921. — Karrer: desgl. Bd. 4, S. 811. 1921. — Karrer u. Bürklin: desgl. Bd. 5, S. 181. 1922.

<sup>2)</sup> Biltz u. Truthe: *Ber. d. Dtsch. Chem. Ges.* Bd. 46, 2, S. 1377. 1913.

<sup>3)</sup> Karrer u. Bürklin: *Helvetica chim. acta* Bd. 5, S. 181. 1922. — Karrer: *Ber. d. Dtsch. Chem. Ges.* Bd. 55, S. 2854. 1922.

<sup>4)</sup> Pringsheim u. Dernikos: *Ber. d. Dtsch. Chem. Ges.* Bd. 55, S. 1433. 1922. — Pringsheim u. Goldstein: *Ber. d. Dtsch. Chem. Ges.* Bd. 56, S. 1520. 1923.

<sup>5)</sup> *Helvetica chim. acta* Bd. 4, S. 169. 1921.

<sup>6)</sup> *Ber. d. Dtsch. Chem. Ges.* Bd. 54, 2, S. 3162. 1921 u. Bd. 55, 1, S. 1425. 1922.

<sup>7)</sup> *Helvetica chim. acta* Bd. 6, S. 404. 1923.

<sup>8)</sup> Pflügers *Arch. f. d. ges. Physiol.* Bd. 40, S. 454. 1887. <sup>9)</sup> desgl. Bd. 36, S. 442. 1885.

<sup>10)</sup> Hoppe-Seylers *Zeitschr. f. physiol. Chem.* Bd. 8, S. 122. 1883/84.

**Cellulose (Tunicin) (C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>)<sub>n</sub>.** Im Mantel der Ascidien ist von C. Schmidt<sup>1)</sup> eine Substanz aufgefunden, die gegen starke Säuren und Alkalien sich auch beim Kochen sehr resistent verhält und die Zusammensetzung der Cellulose besitzt. Berthelot<sup>2)</sup>, der ihr den Namen Tunicin gab, hielt sie für eine von der Cellulose verschiedene Substanz. Nach den Untersuchungen von Schäfer<sup>3)</sup> u. a., besonders nach den Ergebnissen von Winterstein<sup>4)</sup>, ist sie als echte Cellulose anzusehen. Sie ist unlöslich in verdünnten Säuren und Alkalien, löslich in Kupferoxydammoniak, färbt sich mit Jod und Schwefelsäure oder Jod und Chlorzink blau oder blauviolett, wird von rauchender Salpetersäure in ein Nitroprodukt, ähnlich der Schießbaumwolle, übergeführt und gibt beim Zusammenreiben mit konz. Schwefelsäure, Eintragen der Masse in das 100fache Volumen Wasser und Kochen eine Lösung, aus der sich kristallisierter Traubenzucker gewinnen läßt. Auch entsteht aus ihr durch Essigsäureanhydrid und Schwefelsäure Octaacetylcellulose, welche mit der aus pflanzlicher Cellulose erhaltenen identisch ist (Abderhalden und Zemplén<sup>5)</sup>). Das Verhalten stimmt also vollkommen mit dem der Cellulose überein.

Nach Halliburton<sup>6)</sup> besteht die schleimige Umhüllung, welche die Kolonien oder Stöcke des Protozoon *Ophrydium versatile* umgibt, aus Cellulose. Die von Freund<sup>7)</sup> u. a. im Blut und in den Organen von Phthisikern gefundene Cellulose ist auf in den Tuberkelbacillen vorhandene Cellulose zu beziehen (Dreyfuß<sup>8)</sup>, Nishimura<sup>9)</sup>).

#### Glucuronsäure C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>7</sub>.

Vorkommen. 114. Die einbasische d-Glucuronsäure, welche, soweit bekannt, im Körper nicht im freien Zustande, sondern nur in gebundener Form vorkommt, wurde im freien Zustande zuerst von Schmiedeberg und H. Meyer<sup>10)</sup> aus Camphogluuronsäure, die im Harn nach Eingabe von Campher auftritt, dann von v. Mering<sup>11)</sup> aus Urochloralsäure (Trichloräthylalkoholglucuronsäure) und Urobtylchloralsäure, welche nach Aufnahme von Chloral- resp. Butylchloralhydrat im Harn erscheinen, durch Erhitzen mit verdünnten Säuren gewonnen. In Verbindung mit Phenol (Kresol) und Indoxyl (Skatoxyl) findet sie sich regelmäßig in kleinen Mengen im normalen Harn (Mayer und Neuberg<sup>12)</sup>), in größeren nach Eingabe einer sehr großen Anzahl Körper aus der aromatischen und fetten Reihe. Glucuronsäureverbindungen sind von P. Mayer<sup>13)</sup> auch im Rinderblut, von Stepp<sup>14)</sup> im Menschenblut (mit Hilfe von Naphthoresorcin) nachgewiesen worden, und nach Lépine und Boulud<sup>15)</sup> sollen sie sich in der Leber finden.

Glucuronsäure ist im Chondrosin (Schmiedeberg<sup>16)</sup>), Levene und la Forge<sup>17)</sup> und Mucosin (Levene und López-Suárez<sup>18)</sup>) enthalten.

Glucuronsäure findet sich auch im Pflanzenreich, z. B. in der Glycyrrhizinsäure (Tschirch<sup>19)</sup>), im Scutellarin (Goldschmiedt und Zerner<sup>20)</sup>), in grünen Erbsen, Savoyer, Kohl, (Busolt<sup>21)</sup>).

Synthese. E. Fischer und Piloty<sup>22)</sup> stellten sie synthetisch dar durch Reduktion der Zuckerlactonsäure mit Natriumamalgam in saurer Lösung. Jolles<sup>23)</sup> erhielt sie in ganz geringer Ausbeute als p-Bromphenylhydrazinverbindung bei der Einwirkung von Wasserstoffsperoxyd auf Zucker.

<sup>1)</sup> Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 54, S. 318. 1845.

<sup>2)</sup> Ann. de chim. et de physique Bd. 56, S. 149. 1859. Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 5, S. 587. 1872.

<sup>3)</sup> Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 160, S. 312. 1871.

<sup>4)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 18, S. 43. 1894. <sup>5)</sup> desgl. Bd. 72, S. 58. 1911.

<sup>6)</sup> Quart. Journ. of Microscop. Science 1885, July. <sup>7)</sup> Wien. med. Jahrb. 1886, S. 335.

<sup>8)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 18, S. 358. 1894.

<sup>9)</sup> Arch. f. Hyg. Bd. 21, S. 52. 1894.

<sup>10)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 3, S. 422. 1879. <sup>11)</sup> desgl. Bd. 6, S. 480. 1882.

<sup>12)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 29, S. 256. 1900. <sup>13)</sup> desgl. Bd. 32, S. 518. 1901.

<sup>14)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 107, S. 264. 1919.

<sup>15)</sup> Ref. Malys Jahresber. d. Tierchem. 1901, S. 531.

<sup>16)</sup> Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 28, S. 355. 1891.

<sup>17)</sup> Journ. of Biol. Chem. Bd. 15, S. 69. 1913. <sup>18)</sup> desgl. Bd. 36, S. 105. 1918.

<sup>19)</sup> Arch. d. Pharmazie Bd. 245, S. 97. 1907 u. Bd. 246, S. 545. 1908.

<sup>20)</sup> Monatshefte f. Chem. Bd. 31, S. 439. 1910. <sup>21)</sup> Chem. Zentralbl. 1914, II, S. 574.

<sup>22)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 24, 1, S. 521. 1891.

<sup>23)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 34, S. 242. 1911.

Am besten eignet sich zur Darstellung der Glucuronsäure die Euxanthin-  
säure<sup>1)</sup> (Euxanthonglucuronsäure), welche beim 1stündigen Erhitzen mit Wasser  
auf 120° in Euxanthon und Glucuronsäure zerfällt; aus der vom unlöslichen  
Euxanthon abfiltrierten Flüssigkeit scheiden sich nach entsprechender Kon-  
zentration große, glänzende, harte Krystalle ab, welche das Lacton der Glucuron-  
säure (Glucuron) darstellen. Da das Material zur Darstellung der Euxanthin-  
säure, Purree, jetzt kaum noch zu haben ist, so benutzt man Mentholglucuron-  
säure, die aus dem Harn von Kaninchen, denen wochenlang täglich Menthol  
in Emulsion (eine Lösung von 2 g in 1 ccm gelinde erwärmtem Alkohol mit  
20—25 ccm lauwarmem Wasser geschüttelt) mit der Schlundsonde zugeführt  
wurde, in folgender Weise darzustellen ist. Der gesammelte Harn wird mit Am-  
monsulfat halb gesättigt, zum Kochen erhitzt und warm filtriert. Beim Ab-  
kühlen scheidet sich das Ammoniumsals der Mentholglucuronsäure schneeweiß  
und fast quantitativ aus. Die freie Säure läßt sich durch Umkrystallisieren aus  
säurehaltigem Wasser oder Auflösen in säurehaltigem Alkohol leicht gewinnen  
(Neuberg und Lachmann<sup>2)</sup>). 50 g dieser Säure werden mit 500 ccm Wasser  
und 25 ccm  $\frac{1}{2}$ n-Schwefelsäure 3 Stunden im Autoklaven auf ca. 135° erhitzt.  
Nach dem Erkalten entfernt man das Menthol durch Ausschütteln mit Äther,  
dampft nach Zusatz von 70 ccm  $\frac{1}{5}$ n-Barytwasser im Vakuum bei 40° Außen-  
temperatur zum dünnen Sirup ein, gießt diesen in 500 ccm heißen Alkohol  
und engt die von den Abscheidungen befreite alkoholische Lösung im Vakuum  
zum Sirup ein, aus dem Glucuron auskrystallisiert. Aus der eingeengten Mutter-  
lauge erhält man eine zweite Krystallisation (Neuberg<sup>3)</sup>.

Das Lacton (Glucuron) schmilzt, langsam erhitzt, zwischen 160 und 170°  
unter Zersetzung. Die freie Säure ist sirupförmig; sie bildet gut krystallisierende  
Alkalisalze, ferner ein ebenfalls krystallisierendes Bleisalz und ein sehr leicht  
krystallisierendes Cinchoninsalz (schwach gelbe Nadeln), das (bei Abwesenheit  
von Mineralsäuren und größeren Mengen Essigsäure) zur Isolierung der Glucuron-  
säure dienen kann (Neuberg<sup>4)</sup>). Sie wird aus neutraler oder schwach essig-  
saurer Lösung nicht durch neutrales, aber durch basisches Bleiacetat gefällt  
(und zwar in der Wärme vollständig, Salkowski und Neuberg<sup>5)</sup>), ebenso  
wird sie durch Barytwasser im Überschuß gefällt: dabei entsteht ein charak-  
teristischer, feinflockiger Niederschlag des basischen Barytsalzes. Die Glucuron-  
säure gärt nicht mit Hefe. Sie gibt die Mooresche und die Reduktions-  
proben (§ 97) sowie die Phloroglucin-Salzsäure- und die Orcin-Salzsäurereak-  
tion (§ 100).

Eine Phenylhydrazinverbindung scheidet sich beim Erwärmen von 1 Tl.  
Kalisalz, 2 Tl. salzsaurem Phenylhydrazin und 3 Tl. Natriumacetat in 20 Tl.  
Wasser auf dem Wasserbad im Verlaufe einiger Stunden in gelben Krystallen ab.  
Abfiltriert, abgepreßt, mit Wasser und Alkohol gereinigt schmilzt sie bei 114  
bis 115° (Thierfelder<sup>6)</sup>), nach weiterer Reinigung bei 125° (Levene und  
López-Suárez<sup>7)</sup>). In Form dieser Verbindung hat Levene die Glucuron-  
säure aus Chondrosin und Mucosin gewonnen. Über Phenylhydrazinverbindungen

<sup>1)</sup> Spiegel: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 15, S. 1964. 1882. — Kütz: Zeitschr. f. Biol. Bd. 23, S. 475. 1887. — Thierfelder: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 11, S. 388. 1887; Bd. 13, S. 275. 1889; Bd. 15, S. 71. 1891.

<sup>2)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 24, S. 416. 1910. — Bang: Biochem. Zeitschr. Bd. 32, S. 445. 1911.

<sup>3)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 33, 3, S. 3317. 1900.

<sup>4)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 33, 3, S. 3315. 1900.

<sup>5)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 36, S. 264. 1902.

<sup>6)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 11, S. 388. 1887.

<sup>7)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 36, S. 118. 1918.

s. auch P. Mayer<sup>1)</sup>, über Glucuronsäureosazon Neuberg und Neimann<sup>2)</sup>. Zu sehr gut charakterisierten und zum Nachweis kleiner Mengen Glucuronsäure, auch bei Gegenwart anderer Zucker, geeigneten Verbindungen gelangt man nach Bergmann und Wolff<sup>3)</sup> in folgender Weise: Man schüttelt 1 g Glucuronsäureanhydrid (oder Glucuronsäure) in 10 ccm Wasser mit 3 g Phenylhydrazin in 8 ccm Essigäther. Nach  $\frac{1}{2}$  bis 1 Stunde beginnt Abscheidung langer Nadeln, die aus 65proz. Alkohol umkrystallisiert bei 182° schmelzen und bei 185° sich zersetzen. Es handelt sich um das Phenylhydrazid des Phenylhydrazons  $C_{18}H_{22}N_4O_5$ . Schüttelt man eine Lösung von 1 g Lacton (oder Glucuronsäure) in 10 ccm Wasser mit 3 g Benzylphenylhydrazin in 10 ccm Äther, so scheidet sich nach einiger Zeit in der Ätherschicht ein Brei mikroskopischer Nadeln ab, die durch Abscheiden aus Methylalkohol mit wenig Wasser gereinigt werden. Es handelt sich um das Benzylphenylhydrazon des Lactons  $C_{19}H_{20}N_2O_5$ . Leicht löslich in Essigäther, Alkohol, 50proz. Essigsäure, schwer in Benzol; Fp. 155°,  $[\alpha]_D^{26}$  in methylalkoholischer Lösung — 25,75°. Es löst sich in Alkalien und die entstandenen Salze krystallisieren, durch methylalkoholisches Ammoniak entsteht das Säureamid.

Mit Benzylphenylhydrazin.

mit p-Bromphenylhydrazin

Die Verbindung  $C_{12}H_{17}O_7N_2Br$ , ausgezeichnet durch Schwerlöslichkeit und optisches Verhalten, entsteht beim Erwärmen wässriger Glucuronsäurelösungen mit essigsäurem p-Bromphenylhydrazin nach folgender Vorschrift, die genau einzuhalten ist (Neuberg<sup>4)</sup>:

Zu einer Lösung von 2 g Glucuronsäure in 250 ccm Wasser gibt man eine vorher zum Sieden erhitzte Lösung von 5 g reinem salzsaurem p-Bromphenylhydrazin und 6 g Natriumacetat. Die sich zunächst trübende Flüssigkeit wird beim Erwärmen im Wasserbad wieder klar und beginnt nach 5–10 Minuten hellgelbe Nadeln abzuscheiden. Nach dem Abkühlen wird der reichliche Niederschlag abgesaugt, das Filtrat wieder im Wasserbade erwärmt, worauf eine neue Krystallisation erscheint. Man wiederholt das Verfahren 4–5 mal in 2–3 Stunden und erhält so eine reiche Ausbeute, welche nach dem Absaugen mit kaltem Alkohol gewaschen und wiederholt aus 60proz. Alkohol umkrystallisiert wird. Bei der Darstellung aus unreinen Lösungen dürfen Mineralsäuren und überschüssige Essigsäure nicht zugegen sein, auch ist es zweckmäßig, während des Erhitzens auf dem Wasserbade das Gefäß zu bedecken und so Verschmierung durch Luftoxydation zu verhindern.

Fp. 236°. In Wasser und Alkohol schwerlöslich. 0,2 g in 4 ccm reinem Pyridin + 6 ccm absolutem Alkohol drehen — 7,25°, also bedeutend stärker nach links als irgendwelche Phenylhydrazinderivate der Zucker. Goldschmidt und Zerner<sup>5)</sup> und Levene und la Forge<sup>6)</sup> konnten diese Verbindung nicht erhalten; die von v. d. Haar gewonnene schmolz bei 205–208°.

mit p-Nitrophenylhydrazin

Über eine Verbindung mit p-Nitrophenylhydrazin, die auch zur Abscheidung der Glucuronsäure benutzt worden ist, s. Medwedew<sup>7)</sup>.

mit Benzoesäure.

Beim Schütteln mit Benzoylchlorid und Natronlauge scheidet sich zweifach benzoyleerte Glucuronsäure ab. Über weitere Verbindungen s. P. Mayer<sup>8)</sup>, Neuberg<sup>9)</sup>, Giemsa<sup>10)</sup>, Neuberg und Neimann<sup>11)</sup>.

Optische Eigenschaften.

Die Glucuronsäure ist rechtsdrehend, und zwar beträgt für 8–14proz. Lösungen des Lactons  $[\alpha]_D^{18} = +19,25^\circ$  (Thierfelder). Mit der Verdünnung

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 29, S. 59. 1900.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 44, S. 97. 1905.

<sup>3)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 56, S. 1060. 1923.

<sup>4)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 32, 2, S. 2395 u. Bd. 32, 3, S. 3384. 1899. — Neuberg Der Harn. S. 433. Berlin: Julius Springer 1911.

<sup>5)</sup> Monatshefte f. Chem. Bd. 33, S. 1217. 1912 u. Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 46, 1, S. 113. 1913.

<sup>6)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 15, S. 69. 1913.

<sup>7)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 38, 2, S. 1646. 1905.

<sup>8)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 29, S. 59. 1900.

<sup>9)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 33, 3, S. 3315. 1900. <sup>10)</sup> desgl. Bd. 33, 3, S. 2996. 1900.

<sup>11)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 44, S. 97. 1905.

und mit ansteigender Wärme nimmt die spezifische Drehung zu. Über Drehungsänderung in mineral-saurer Lösung s. Schüller<sup>1)</sup>.

Sie zersetzt sich leicht in alkalischen Lösungen, besonders beim Erwärmen, unter Bildung von Brenzcatechin; beim anhaltenden Kochen mit Barytwasser entstehen 2 Säuren, vielleicht Tri- und Dioxyglutarsäure (Schmiedeberg). In sauren Lösungen ist sie beständiger. Beim Erhitzen mit Salzsäure liefert sie Kohlensäure (bei 3½stündigem mit Salzsäure 1,06 spez. Gew. 25%) (Lefèvre und Tollens<sup>2)</sup>) und reichliche Mengen von Furfurol (ungefähr 16%, Tollens<sup>3)</sup>). Bei der Oxydation mit Brom oder Salpetersäure entsteht aus der Glucuronsäure Zuckersäure, bei der Reduktion mit Natriumamalgam d-Gulonsäure (Thierfelder). Durch Fäulnisbakterien wird sie in l-Xylose unter Kohlensäureabspaltung übergeführt (Salkowski und Neuberg<sup>4)</sup>.)

Zum Nachweis der Glucuronsäure dienen die oben angegebenen Reaktionen und Eigenschaften, die Oxydation zu Zuckersäure, ferner die

Reaktion von Tollens<sup>5)</sup>. Sie gestattet eine Unterscheidung von den anderen Kohlenhydraten, speziell auch von den Pentosen, mit denen sie in der Orcin- und Phloroglucinsalzsäurereaktion (§ 100) übereinstimmt. Man mischt in 15—20 mm weitem Probierröhrchen ein hirsekorngroßes Stückchen der zu prüfenden Substanz mit 5—6 ccm Wasser, setzt 0,5—1 ccm einer 1proz. Lösung von Naphthoresorcin in Alkohol und ein der Flüssigkeit im Röhrchen gleiches Volumen Salzsäure (spez. Gew. 1,19) hinzu, erwärmt langsam zum Kochen, läßt unter Bewegung des Röhrchens 1 Minute gelinde kochen, setzt das Röhrchen beiseite, schüttelt es nach 4 Minuten unter einem Wasserstrahl bis zum Erkalten, gießt ein der Flüssigkeit gleiches Volumen Äther hinzu und schüttelt gut durch. Der Äther zeigt nach dem Absitzen eine blaue, blau- oder rotviolette Farbe und einen etwas rechts an und auf der D-Linie liegenden dunklen Absorptionsstreifen. Die Reaktion ist noch sehr stark bei Benutzung von 5 ccm einer 0,1proz. Lösung von Glucuronsäurelacton.

Die Carbonylsäuren im allgemeinen geben die Reaktionen auch (Mandel und Neuberg<sup>6)</sup>).

Handelt es sich darum, Osazone auf Glucuronsäure zu prüfen, so schüttelt man nach Neuberg und Sane-yoshi<sup>7)</sup> nicht mit Äther, sondern mit Benzol aus und verfährt in folgender Weise, die sich nach v. d. Haar<sup>8)</sup> überhaupt mehr empfiehlt als die Tollenssche Ausführung:

Man löst eine kleine Menge (etwa 8 mg) der zu untersuchenden Substanz in 4 ccm rauchender Salzsäure, fügt 4 ccm Wasser hinzu, kocht auf, fügt hinreichend Naphthoresorcin\*) hinzu und erhitzt ½ Minute. Läßt man jetzt langsam auf 50° erkalten und schüttelt mit etwa 1 ccm Benzol aus, so färbt sich dieses rotviolett und zeigt einen Streifen im Gelbgrün auf der D-Linie.

Reaktion von Goldschmiedt<sup>9)</sup>. Eine Spur Glucuronsäure (oder gepaarte Glucuronsäure) in etwa ½ ccm Wasser gelöst und mit 1—2 Tropfen 15proz.

\*) Da die alkoholische Lösung des Naphthoresorcins beim Stehen Veränderungen erleidet, empfiehlt Neuberg feste Substanz (Biochem. Zeitschr. Bd. 24, S. 437. 1910). Man soll einen gewissen Überschuß von Naphthoresorcin nehmen, da Substanzen zugegen sein können, welche Naphthoresorcin abfangen (Biochem. Zeitschr. Bd. 24, S. 439. 1910).

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. Biol. Bd. 56, S. 274. 1911.

<sup>2)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 40, 4, S. 4513. 1907.

<sup>3)</sup> Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 290, S. 157. 1896.

<sup>4)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 36, S. 261. 1902.

<sup>5)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 41, 2, S. 1788. 1908.

<sup>6)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 13, S. 148. 1908 u. Bd. 24, S. 436. 1910.

<sup>7)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 36, S. 56. 1911. <sup>8)</sup> desgl. Bd. 88, S. 205. 1918.

<sup>9)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 65, S. 389. 1910 u. Bd. 67, S. 194. 1910.

alkoholischer  $\alpha$ -Naphthollösung versetzt gibt auf Zusatz von 3—4 ccm konzentrierter Schwefelsäure (frei von Salpetersäure und salpetriger Säure) eine smaragdgrüne Lösung (S. 106). Auf vorsichtigen Wasserzusatz geht die Farbe in Blaugrün, Blau, Blauviolett und sogar Rot über. Fügt man wieder konzentrierte Schwefelsäure hinzu, so wird die Farbe wieder grün. Hexosen und Pentosen geben diese Reaktion nicht.

#### Hexosamine.

Vorkommen. 115. **d-Glucosamin**  $C_6H_{13}NO_5$ . Es wurde zuerst von Ledderhose<sup>1)</sup> aus Chitin durch Einwirkung von rauchender Salzsäure in der Wärme erhalten. Es tritt auf bei der Spaltung von Sputum- und Submaxillarismucin und Ovomucoid (Fr. Müller<sup>2)</sup>, Paramucin (Steudel<sup>3)</sup>, Pseudomucin (Neuberg und Heymann<sup>4)</sup>, Mucin aus Myxom und Ascitesflüssigkeit (Oswald<sup>5)</sup> und der Mucoitinschwefelsäure (aus Magenschleimhaut- und Nabelstrang-, Humor vitreus-, Cornea-, Serummucin) (Levene und López-Suárez<sup>6)</sup>. Es entsteht auch bei der hydrolytischen Spaltung des Eieralbumins (Seemann<sup>7)</sup>, Langstein<sup>8)</sup>, des Serumalbumins (Langstein<sup>9)</sup>, des Serumglobulins (Langstein<sup>10)</sup>, des Eiweiß aus Eigelb (Neuberg<sup>11)</sup>, des Lebereiweiß (Neuberg und Milchner<sup>12)</sup>, der Hefe (Meisenheimer<sup>13)</sup>, eines Gehirnnphosphatides (Fränkel und Kafka<sup>14)</sup>.

Synthese. Synthetisch wurde es von E. Fischer und Leuchs<sup>15)</sup> erhalten durch Überführung der d-Arabinose mittels Ammoniak und Blausäure in die d-Glucosaminsäure und Reduktion der letzteren. Danach ist das d-Glucosamin als ein Derivat des Traubenzuckers (oder der Mannose) anzusehen.

Darstellung. Zur Darstellung benutzt man am besten Hummerschalen. Sie werden durch verdünnte Salzsäure und gutes Auswaschen mit Wasser von Calciumcarbonat usw. befreit, in kleine Stücke zerschnitten, im Kolben im siedenden Wasserbad mit konzentrierter Salzsäure bis zur Lösung erhitzt und diese dann in einer Schale bis zur Abscheidung krystallinischer Krusten eingedampft. Man läßt unter gutem Umrühren erkalten, 24 Stunden stehen, verrührt mit Alkohol, saugt ab, wäscht mit Alkohol und krystallisiert unter Zusatz von Tierkohle um. Aus 50 g entkalkter lufttrockner Hummerschalen erhält man 30 g salzsaures Glucosamin (Ledderhose, Neuberg<sup>16)</sup>.

Zur Darstellung aus Sputum- oder Submaxillarmucin kocht man das Glucoprotein 3 Stunden mit 2,5 proz. Salzsäure, entfernt nach Zufügen von Eisenchloridlösung und genauem Neutralisieren mit Natronlauge durch Aufkochen und Filtrieren die Hauptmenge der Eiweißstoffe und schüttelt das Filtrat mit Benzoylchlorid und Natronlauge (auf 1 g reduzierende Substanz als Traubenzucker berechnet 10 g Benzoylchlorid und 100 ccm 10 proz. Natronlauge). Die abgeschiedenen und abfiltrierten Ester werden in heißem Alkohol gelöst und durch Eingießen der alkoholischen Lösung in viel destilliertes Wasser, Lösen des entstehenden Niederschlages in Alkohol, abermaliges Eintragen in Wasser und Wiederholung von Lösung und Fällung von Salzen befreit, dann durch 48stündiges Erhitzen in geschlossenem Rohr mit Salzsäure von 1,1 spez. Gewicht im

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 2, S. 213. 1878/79; Bd. 4, S. 139. 1880.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. Biol. Bd. 42, S. 468. 1901.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 34, S. 353. 1901/02.

<sup>4)</sup> Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 2, S. 201. 1902.

<sup>5)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 92, S. 144. 1914 u. Bd. 95, S. 100. 1915.

<sup>6)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 25, S. 511. 1916; Bd. 26, S. 373. 1916; Bd. 36, S. 105. 1918.

<sup>7)</sup> Inaug.-Diss. Marburg 1898.

<sup>8)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 31, S. 49. 1901/02.

<sup>9)</sup> Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 1, S. 259. 1902.

<sup>10)</sup> Monatshefte f. Chem. Bd. 26, S. 531. 1905.

<sup>11)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 34, 3, S. 3963. 1901.

<sup>12)</sup> Berl. klin. Wochenschr. 1904, S. 1081.

<sup>13)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 104, S. 229. 1919 u. Bd. 114, S. 205. 1921.

<sup>14)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 101, S. 159. 1920.

<sup>15)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 36, 1, S. 24. 1903.

<sup>16)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 43, S. 500. 1912.



kochenden Wasserbad gespalten. Aus der filtrierten und mit Äther ausgeschüttelten Lösung scheiden sich beim Verdunsten im Vakuumexsiccator Krystalle von salzsaurem Glucosamin ab (Fr. Müller).

Aus Ovomuroid und einigen anderen Mucoiden erhielt Oswald<sup>1)</sup> Glucosamin, indem er das Hydrolysat (erhalten durch 1stündiges, besser 2stündiges Erhitzen von 1 g Substanz mit 40 ccm einer Mischung von 1 Tl. konz. Salzsäure und 9 Tl. Wasser auf dem Wasserbade am Rückflußkühler) nach dem Filtrieren 24 Stunden dialysierte. Aus dem eingeengten Dialysat krystallisiert salzsaures Glucosamin aus. Aus Submaxillarmucin gelang die Isolierung auf diese Weise nicht (Zeller<sup>2)</sup>).

Über quantitative (polarimetrische) Bestimmung des Glucosamins in Ovomuroid und Pseudomucin s. Neuberg und Schewket<sup>3)</sup>.

Um die freie Base zu erhalten, übergießt man das gepulverte salzsaure Salz mit etwas mehr als der äquivalenten Menge einer Lösung von Natrium-methylat in absolutem Methylalkohol und fügt zu der Lösung trocknen Äther. Nach einiger Zeit scheidet sie sich in Krystallnadeln ab (Lobry de Bruyn<sup>4)</sup>). Nach Breuer<sup>5)</sup> schüttelt man die in absolutem Alkohol suspendierten Krystallflitter des salzsauren Salzes (erhalten durch Eingießen einer heißen konzentrierten, wässrigen Chlorhydratlösung in absoluten Alkohol) anhaltend mit Diäthylamin. Die abfiltrierten feinen Nadeln stellen die freie Base dar.

Glucosamin schmilzt unscharf bei 105—110°, ist in Wasser leichtlöslich, löslich auch in heißem Methylalkohol. Die wässrige Lösung reagiert alkalisch und zersetzt sich unter Ammoniakentwicklung, dabei entsteht ein Ammoniakderivat der Fructose (Lobry de Bruyn und v. Ekenstein<sup>6)</sup>), welches nach Stolte<sup>7)</sup> als 2,5-Ditetraoxybutylpyrazin aufzufassen ist. Das salzsaure Salz bildet farblose, harte, luftbeständige und wasserfreie Krystalle von süßem Geschmack. Dieselben sind polymorph. Über die Krystallform s. Ledderhose (a. a. O.) und Tanret<sup>8)</sup>. Sie verändern sich beim vorsichtigen Erhitzen bis über 100° nicht und lösen sich sehr leicht in Wasser, sehr schwer in Alkohol, auch in 80proz., nicht in Äther. Das bromwasserstoffsäure Salz, aus Hummerpanzern in der oben beschriebenen Weise mit Hilfe von konzentrierter Bromwasserstoffsäure dargestellt, ist mit der salzsauren Verbindung isomorph, aber in Alkohol löslicher als diese (Tiemann<sup>9)</sup>). Mit salpetersaurem oder schwefelsaurem Silber erhält man aus dem salzsauren das salpetersaure oder schwefelsaure Glucosamin in guten Krystallen. Durch Mercuriacetat wird es nicht gefällt, aber durch Mercuriacetat + Soda wie die Aminosäuren (S. 219) (Neuberg und Kerb<sup>10)</sup>). Mit Hilfe der Carbaminoreaktion wird es abgeschieden (S. 224) (Siegfried und Schutt<sup>11)</sup>).

Auf Zusatz von Alkalien färbt sich die Lösung des salzsauren Glucosamins grün, dann braunrot, endlich braun bis schwarz; es bildet sich Milchsäure und ein wenig Brenzcatechin. Es gibt die Reduktionsproben (§ 97), gärt aber nicht mit Hefe. Das Reduktionsvermögen ist dasselbe, wie das des Traubenzuckers (Ledderhose). Salzsaures Glucosamin gibt eine schwache, die freie Base eine ausgesprochene Ninhydrinreaktion (S. 219).

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 68, S. 173. 1910; Bd. 92, S. 144. 1914; Bd. 95, S. 100. 1915.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 86, S. 85. 1913.

<sup>3)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 44, S. 491. S. 1912.

<sup>4)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 31, 2, S. 2476. 1898. <sup>5)</sup> desgl. Bd. 31, 2, S. 2193. 1898.

<sup>6)</sup> Recueil des travaux chim. des Pays-Bas Bd. 18, S. 77. 1899.

<sup>7)</sup> Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 11, S. 19. 1908.

<sup>8)</sup> Bull. de la soc. chim. de Paris [3], Bd. 17, S. 802. 1897.

<sup>9)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 19, S. 49 u. 156. 1886.

<sup>10)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 40, S. 511. 1912.

<sup>11)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 81, S. 273. 1912. — Liebermann. Ebenda Bd. 58, S. 90. 1908/09.

Verbindungen: Beim Erwärmen mit essigsäurem Phenylhydrazin (§ 101) entsteht schwieriger als aus Traubenzucker d-Phenylglucosazon (Tiemann), beim Erwärmen mit essigsäurem p-Bromphenylhydrazin nur allmählich und in mäßiger Ausbeute p-Bromphenylglucosazon. Fp. 222°, im übrigen sich wie Phenylglucosazon verhaltend (Neuberg<sup>1</sup>). Beim Schütteln mit Benzoylchlorid und Natronlauge bildet sich ein krystallinisches Estergemenge, aus dem das aus Alkohol in langen Nadeln krystallisierende, in Wasser unlösliche Tetrabenzoylglucosamin (Fp. 198°) isoliert werden kann (Baumann<sup>2</sup>). Levene<sup>3</sup> erhielt Pentabenzoylglucosamin. Über Pentaacetylglucosamin s. Hudson und Dale<sup>4</sup>). Schüttelt man die alkalische Lösung des Glucosamins mit tropfenweise zugesetztem Phenylisocyanat unter starker Abkühlung, so scheidet sich beim Stehen eine Verbindung von Glucosamin und Isocyanat als gallertige Masse ab, die sich leicht absaugen läßt und in Wasser nur sehr schwer löslich ist. Beim 1stündigen Erhitzen mit 20proz. Essigsäure auf kochendem Wasserbad verliert sie 1 Mol. Wasser und scheidet sich beim Abkühlen als Hydantoin  $C_{13}H_{16}N_2O_5$  in schweren, großen Krystallen ab. Es ist in kaltem Wasser und kaltem Alkohol wenig-, in heißem Wasser und heißem Alkohol leichtlöslich, reduziert Fehlingsche Lösung nicht und schmilzt bei 210°. Eine 0,65proz. Lösung zeigte  $[\alpha]_D = +76,9^\circ$  (Steudel). Diese Verbindung ist für die Abscheidung des Glucosamins sehr geeignet, speziell auch für die Trennung von Aminosäuren, deren Additionsprodukte mit Phenylisocyanat erst in saurer Lösung ausfallen. Auch mit  $\alpha$ -Naphthylisocyanat bildet Glucosamin ein Anlagerungsprodukt (Glucosamin- $\alpha$ -Naphthylurethan) (Neuberg und Hirschberg<sup>5</sup>).

Optische Eigenschaften. Die spezifische Drehung beträgt für das salzsaure Salz nach Ledderhose (16,5proz. Lösung)  $[\alpha]_D = +70,15^\circ$ , nach Hoppe-Seyler<sup>6</sup>) (4—14proz. Lösung)  $+71,8—70,6^\circ$ , nach Landolt (5proz. Lösung)  $+74,64^\circ$ . Sie ist unabhängig von der Temperatur, aber sofort nach Lösung höher. (S. dazu Irvine und Earl<sup>7</sup>). Für das bromwasserstoffsäure Salz beträgt  $[\alpha]_D = +55,21^\circ + 0,053053 p$ , wobei p die Prozentmenge Wasser bedeutet, für die freie Base (1 bzw. 3—4proz. Lösung)  $[\alpha]_D = +48,64^\circ$  bzw.  $+47,08^\circ$  (Breuer). Lobry de Bruyn und v. Ekenstein geben für 0,4proz. Lösungen  $[\alpha]_D = +44^\circ$  an.

Bei tagelangem Kochen mit 25—30proz. Schwefelsäure entsteht Lävulinsäure (H. Hamburger<sup>8</sup>).

Oxydationsprodukte. Bei der Oxydation des Glucosamins mit Brom (bequemer und schneller mit gelbem Quecksilberoxyd<sup>9</sup>) entsteht eine in Blättchen und Nadeln krystallisierende Säure, die d-Glucosaminsäure  $C_6H_{13}NO_6$  ( $CH_2OH \cdot (CHOH)_3 \cdot CHNH_2 \cdot COOH$ ) (E. Fischer und Tiemann<sup>10</sup>). In 2,5proz. Salzsäure (nach Einstellung des Gleichgewichts)  $[\alpha]_D^{18} = -14,81^\circ$  (E. Fischer und Leuchs<sup>11</sup>). Bei der Behandlung von salzsaurem Glucosamin mit Salpetersäure in der Wärme

<sup>1</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 32, 3, S. 3387. 1899. Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 2, S. 210. 1902.

<sup>2</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 19, 2, S. 3220. 1886. — Kueny: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 14, S. 330. 1890.

<sup>3</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 26, S. 155. 1916.

<sup>4</sup>) Journ. of the Americ. chem. soc. Bd. 38, S. 1431; ref. Chem. Zentralbl. 1917, I, S. 564.

<sup>5</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 27, S. 339. 1910.

<sup>6</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 20, S. 507. 1895.

<sup>7</sup>) Journ. of the chem. soc. (London) Bd. 121, S. 2370; ref. Chem. Zentralbl. 1923, I, S. 1423.

<sup>8</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 36, S. 1. 1911.

<sup>9</sup>) Pringsheim u. Ruschmann: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 48, 1, S. 680. 1915.

<sup>10</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 27, 1, S. 138. 1894. — E. Fischer u. Andreae: desgl. Bd. 36, 2, S. 2587. 1903.

<sup>11</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 36, 1, S. 24. 1903.

entsteht Norisozuckersäure  $C_6H_{10}O_8$  bzw. ihr inneres Anhydrid, die Isozuckersäure  $C_6H_8O_7$ , welche letztere krystallisiert erhalten worden ist, und bei  $185^\circ$  schmilzt (Tiemann<sup>1</sup>). Die Norisozuckersäure bzw. ein Gemisch von ihr und Isozuckersäure bildet mit Cinchonin und Chinin in heißem Wasser lösliche, in kaltem wenig lösliche, sehr schön krystallisierende norisozuckersaure Salze. (Norisozuckersaures Cinchonin Fp.  $208^\circ$ ,  $[\alpha]_D = +175^\circ$ ). Sie lassen sich gut von den sehr viel leichter löslichen Alkaloidsalzen der Zucker- und Schleimsäure, die aus anderen Kohlenhydraten bei der gleichen Behandlung entstehen, trennen und für den Nachweis des Glucosamins benutzen (Neuberg und Wolff<sup>2</sup>). Durch salpetrige Säure entsteht Chitose (nach Levene Anhydromannose), die Armbrecht<sup>3</sup>), wie es scheint, als krystallisiertes Osazon erhielt, und bei der weiteren Oxydation mit Brom Chitonsäure  $C_6H_{10}O_6$  (nach Levene 2,5-Anhydromannonsäure), deren Calciumsalz die spezifische Drehung  $+32,8^\circ$  hat und auch zur Erkennung von Glucosamin benutzt werden kann (E. Fischer und Tiemann). Über den Abbau durch Mikroorganismen s. Takao<sup>4</sup>).

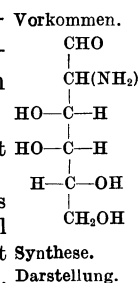
Zum Nachweis des Glucosamins (auch zur Unterscheidung von Chondrosamin) dient das gut charakterisierte salzsaure Salz. Um Glucosamin in Flüssigkeiten, die es neben anderen Stoffen enthalten, z. B. in hydrolytischen Zersetzungsfüssigkeiten von Proteinkörpern aufzufinden, dient die Phenylisocyanatverbindung (s. oben). Auch die durch Oxydation mit Salpetersäure aus dem Glucosamin entstehende Norisozuckersäure, welche als Bleisalz von manchen anderen gleichzeitig vorhandenen Stoffen abgetrennt werden kann und das charakteristische Cinchoninsalz bildet, leistet für die Erkennung gute Dienste.

Galactosamin wurde von Fr. N. Schulz und Ditthorn<sup>5</sup>) als hydrolytisches Spaltungsprodukt des Glucoproteids aus der Eiweißdrüse des Frosches in noch nicht reinem Zustande als salzsaures Salz erhalten. Die Isolierung geschah mit Hilfe der Benzoylverbindung. Bei der Oxydation mit Salpetersäure liefert es Schleimsäure. Weitere Untersuchung ist nötig. Durch Hydrolyse der Schleimhülle der Froscheier erhielten v. Ekenstein und Blanksma<sup>6</sup>) Galaktose.

116. Chondrosamin  $C_6H_{13}NO_5$  wurde als Spaltungsprodukt der Chondroitin-schwefelsäure (aus Knorpel-, Sehnen-, Aorta- und Scleramucoïd) von Schmiedeberg<sup>7</sup>) erkannt und von Levene und Mitarbeitern<sup>8</sup>) als ein von dem Glucosamin verschiedenes Hexosamin festgestellt, und zwar als 2-Amino-d-Lyxohexose.

Levene hat es synthetisch hergestellt durch Reduktion der Lyxohexosaminsäure mit Natriumamalgam<sup>9</sup>).

Zur Darstellung aus Nasensecheidewandknorpel trägt man reinpräpariertes und fein zerkleinertes Material (9 Kilo) in heiße 2proz. Kalilauge (30 l) ein, macht nach 2 Tagen, nachdem fast aller Knorpel gelöst ist, mit Essigsäure schwach sauer und mit überschüssigem Bariumcarbonat neutral, engt auf etwa  $\frac{1}{3}$  ein und saugt über Kieselgur ab. Das Filtrat wird mit basischem Bleiacetat ausgefällt, der Niederschlag durch Dekantieren gewaschen (etwa 10 mal), abgesaugt und portionsweise (zu etwa 2 Kilo) unter Benutzung eines Rührers mit möglichst wenig Eisessig in Lösung gebracht. Durch einen Überschuß von Eisessig wird nun die Chondroitinschwefelsäure ausgefällt, filtriert, noch einmal mit Eisessig behandelt, wieder filtriert und in 95proz. Alkohol suspendiert. Nach Wiederholung dieser Operation filtriert man und trocknet auf dem Wasserbad. Etwa 3 l Eisessig sind nötig. 400 g der trockenen Substanz werden mit 1600 ccm 20proz. Salzsäure, 40 g Zinnchlorid



1) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 17, 1, S. 241. 1884; Bd. 19, 1, S. 1257. 1886; Bd. 27, 1, S. 118. 1894.

2) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 34, 3, S. 3840. 1901.

3) Biochem. Zeitschr. Bd. 95, S. 108. 1919.

4) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 131, S. 307. 1923.

5) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 29, S. 373. 1900; Bd. 32, S. 428. 1901.

6) Chem. Zentralbl. 1907, II, S. 1001.

7) Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 28, S. 355. 1891.

8) Levene: Hexosamines, their derivatives usw. Monogr. of the Rockefeller inst. f. med. research New York 1922. (Zusammenfassende Darstellung.)

9) Levene: Journ. of biol. chem. Bd. 26, S. 155. 1916 u. Bd. 31, S. 609. 1917.

und 100 g Bariumchlorid am Rückflußkühler 12 Stunden gekocht. Man filtriert, engt unter vermindertem Druck zum dicken Sirup ein, nimmt ihn in 800 ccm Wasser auf, entfernt das Barium mit Schwefelsäure, engt wieder unter vermindertem Druck zum dicken Sirup ein, nimmt in 100 ccm Methylalkohol auf und fügt sehr vorsichtig Äther hinzu, bis Krystallisation beginnt. Die Ausbeute beträgt etwa 35–40 g salzsaures Chondrosamin (Levene<sup>1</sup>).

**Eigenschaften.** Das salzsaure Chondrosamin unterscheidet sich von dem salzsauren Glucosamin in der Krystallform (lange prismatische Nadeln), in der Löslichkeit (es ist außer in Wasser auch in 80proz. Alkohol löslich), im Schmelzpunkt, der bei 182° liegt (das synthetische schmilzt bei 185° (korr.). Salzsaures Glucosamin schmilzt auch über 200° nicht. Weitere Unterschiede bestehen zwischen beiden

**Optische Eigenschaften.** in bezug auf die Drehung und das Osazon.  $[\alpha]_D^{25}$  nach eingetretenem Gleichgewicht<sup>2</sup>) = +93° (für das synthetische +91,1°). Das Osazon, welches mit dem

**Verbindungen:** mit Phenylhydrazin Galaktosazon identisch ist, schmilzt bei 201° (korr.) unter Zersetzung und mit Essigsäure ist auch in verdünntem Alkohol löslich (Levene und la Forge<sup>3</sup>). Auch das Pentaacetat ist von dem Glucosaminpentaacetat verschieden (Hudson und

**Oxydationsprodukte.** Dale<sup>4</sup>). Bei der Oxydation mit Quecksilberoxyd entsteht Chondrosaminsäure  $C_6H_{13}NO_6$  (Levo-d-lyxohexosaminsäure). In 2,5proz. Salzsäure  $[\alpha]_D^{25} = -32^\circ$  (nach Einstellung des Gleichgewichts). Ebenso verhält sich die synthetische Säure (Levene<sup>5</sup>). Durch Oxydation mit Brom (nach vorangegangener Einwirkung von Silbernitrit) entsteht 2,5-Anhydrotalonsäure, dessen Brucinsalz bei 218° schmilzt;  $[\alpha]_D^{20} = -12,4^\circ$ , in Übereinstimmung mit der synthetischen Säure (Levene<sup>6</sup>). Durch Oxydation mit Salpetersäure (nach vorangegangener Desaminierung mit Silbernitrit) entsteht 2,5-Anhydrotaloschleimsäure  $C_6H_{10}O_8$ , deren Calciumsalz mit 2 Mol. Wasser krystallisiert ( $C_6H_8O_8Ca$ ).  $[\alpha]_D^{20}$  in 10proz. Salzsäure = -8,0° (Levene und la Forge, Levene<sup>7</sup>). Ebenso verhält sich die synthetische Säure (Levene<sup>8</sup>).

### Chitin, Chitosan, Lycoperdin.

**Vorkommen.** 117. Chitin ist ein, wie es scheint, sämtlichen Gliedertieren eigener Gewebsbestandteil, der sich auch im Tierkreis der Mollusken (z. B. organischer Hauptbestandteil der Sepiaschulpe), der Brachiopoden, Bryozoen, Würmer und Cölenteraten, und auch im Pflanzenreiche, z. B. in den Membranen von Pilzen (Winterstein<sup>9</sup>), Gilson<sup>10</sup>), Scholl<sup>11</sup>) findet.

**Konstitution.** Es ist ein polymeres Acetylglucosamin, in dem Glucosaminreste durch Stickstoff miteinander verbunden sind (Karrer und Smirnoff<sup>12</sup>) und in dem wenigstens ein Teil der Essigsäure am Stickstoff des Glucosamin haftet (Fränkel und Kelly<sup>13</sup>). Zusammensetzung und Molekulargewicht stehen noch nicht fest.

Es sind verschiedene Formeln angegeben worden:  $(C_{18}H_{30}N_2O_{12})_n$  Staedeler<sup>14</sup>), Araki<sup>15</sup>),  $(C_{15}H_{26}N_2O_{12})_n$  (Ledderhose<sup>16</sup>),  $(C_{32}H_{54}N_4O_{21})_n$  Brach<sup>17</sup>).

<sup>1</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 26, S. 143. 1916.

<sup>2</sup>) Levene: Journ. of biol. chem. Bd. 57, S. 337. 1924.

<sup>3</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 18, S. 123. 1914 u. Bd. 20, S. 433. 1915.

<sup>4</sup>) Journ. of the Americ. chem. soc. Bd. 38, S. 1431; ref. Chem. Zentralbl. 1917, I, S. 564.

<sup>5</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 31, S. 615. 1917. <sup>6</sup>) desgl. Bd. 31, S. 616. 1917.

<sup>7</sup>) Monogr. S. 81 u. Journ. of biol. chem. Bd. 31, S. 617. 1917.

<sup>8</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 31, S. 619. 1917.

<sup>9</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 21, S. 134. 1895/96.

<sup>10</sup>) Cellule, T. 11, Fasc. 1. 1895. <sup>11</sup>) Monatshefte f. Chem. Bd. 29, S. 1023. 1908.

<sup>12</sup>) Helvetica chim. acta Bd. 5, S. 832. 1922.

<sup>13</sup>) Monatshefte f. Chem. Bd. 23, S. 123. 1902.

<sup>14</sup>) Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 111, S. 21. 1859.

<sup>15</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 20, S. 498. 1895.

<sup>16</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 2, S. 213. 1878/79.

<sup>17</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 38, S. 468. 1912.

Biuret- und Reduktionsprobe gab, aber keine Jodreaktion. S. dazu das Lycoperdin (§ 119). Durch konzentrierte Schwefelsäure sowie durch heiße starke Salzsäure entsteht Glucosamin (etwa 70—75%) und Essigsäure, daneben Ameisensäure, Buttersäure als sekundäre Zersetzungsprodukte (Ledderhose). Brach erhielt aus dem von ihm dargestellten Chitin bei 2stündigem gelindem Kochen (Optimum für die Bildung) von 0,5 g mit 10 ccm konzentrierter Salzsäure unter Zusatz von 1 g Stannochlorid (zur Verhinderung der Huminformbildung) 85,31% Glucosamin und 22,5% Acetyl. Da das Präparat 6,66% Stickstoff enthält, so ist das Verhältnis N : Acetyl : Glucosamin = 1 : 1,1 : 1 (Brach<sup>1</sup>) (s. indessen das oben über dieses Chitin Gesagte).

von Salpetersäure.

Bei der Einwirkung von rauchender Salpetersäure entstehen aus Chitin Oxydationsprodukte, welche Salpetersäurereste enthalten (v. Fürth und Scholl<sup>2</sup>).

Destillation mit Zinkstaub.

Bei der Destillation mit Zinkstaub entsteht Chitopyrrol (2-Methyl-1-n-hexylpyrrol § 197) (Karrer und Smirnoff<sup>3</sup>).

Optische Eigenschaften und Nachweis.

Zum Nachweis des Chitins kann man nach Irvine<sup>4</sup>) die Bestimmung der spezifischen Drehung der salzsauren Lösung vor und nach der Hydrolyse benutzen. Für 1,75proz. Lösungen von Chitin verschiedener Herkunft in Salzsäure (spez. Gew. 1,160) beträgt  $[\alpha]_D^{20}$  gleich nach der Lösung im Durchschnitt  $-14,1^\circ$ , nach 8—10stündigem Stehen bei  $40-45^\circ + 56^\circ$ . Über die Verwendung dieser Methode zur Feststellung kleiner Mengen Chitin s. Irvine.

Für den mikroskopischen Nachweis des Chitins sind von van Wisselingh<sup>5</sup>) und von Brunswik<sup>6</sup>) Reaktionen angegeben, welche auf der Jodreaktion des Chitosans und auf der Fällung von kristallisierten Chitosansalzen beruhen.

Vorkommen.

118. **Chitosan.** Es hat die Formel  $(C_{11}H_{26}N_2O_{10})_n$  (Araki<sup>7</sup>) und ist als ein polymeres Monoacetyldiglucoamin anzusehen (Löwy<sup>8</sup>). Es wurde zuerst von Gilson<sup>9</sup>) aus der Gerüstsubstanz von Pilzen und aus Chitin erhalten und als Mykosin beschrieben, dann von Hoppe-Seyler<sup>10</sup>) ebenfalls aus Chitin dargestellt.

Darstellung.

Zu seiner Darstellung erhitzt man zerkleinertes Chitin mit der 5fachen Menge Ätzkali und etwas Wasser in einer Silberschale im Ölbad auf  $180^\circ$  (Temperatur des Ölbad) und hält  $\frac{1}{2}$  Stunde unter häufigem Umrühren auf dieser Temperatur. Nach Erkalten und Entfernen des Alkalis mit Wasser wird die Masse, welche noch die Struktur des ursprünglichen Materials zeigt, in verdünnter Essigsäure gelöst und mit Alkalilauge als gallertige Masse gefällt; man filtriert durch gehärtetes Filter und wäscht mit Wasser (Armbrecht<sup>11</sup>).

Eigenschaften.

Es ist völlig unlöslich in Wasser und verdünnten Alkalien, löst sich leicht in verdünnter Salzsäure oder in Essigsäure und wird aus diesen Lösungen durch Alkalien und überschüssige Salzsäure wieder gefällt. Phosphorwolframsäure und andere Alkaloidreagenzien bewirken Fällung (v. Fürth und Russo<sup>12</sup>). Es färbt sich mit sehr verdünnter Jodlösung bzw. mit Jodjodkalilösung und einer Spur

<sup>1</sup>) Monatshefte f. Chem. Bd. 23, S. 123. 1902.

<sup>2</sup>) Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 10, S. 188. 1907.

<sup>3</sup>) Helvetica chim. acta Bd. 5, S. 832. 1922.

<sup>4</sup>) Journ. of the chem. soc. (London) Bd. 95, S. 564. 1909.

<sup>5</sup>) Jahrb. f. wiss. Botanik Bd. 31, S. 619. 1898. — Wester: Arch. d. Pharmazie Bd. 247, S. 282. 1909.

<sup>6</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 113, S. 111. 1921.

<sup>7</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 20, S. 498. 1895.

<sup>8</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 23, S. 47. 1910.

<sup>9</sup>) Cellule T. 11, Fasc. 1. 1895. Bull. de la soc. chim. de Paris 1894, Nr. 23. — Winterstein: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 21, S. 134. 1895/96.

<sup>10</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 27, S. 3329. 1894.

<sup>11</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 95, S. 108. 1919.

<sup>12</sup>) Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 8, S. 163. 1906.

Gegen die Richtigkeit letzterer Formel für genuines Chitin, nach der das Chitin aus mindestens 4 unter Austritt von 3 Mol. Wasser miteinander verbundenen Monoacetylglucosaminen besteht, und welche durch die Ergebnisse der Analyse und der Spaltungsversuche gut gestützt ist, spricht der Umstand, daß bei der Umwandlung von Chitin in Chitosan (s. unten) ca. 25% Essigsäure erhalten worden sind. Schmiedeberg<sup>1)</sup> nimmt an, daß das von Brach untersuchte Chitin bei der Darstellung (längeres Kochen mit 20proz. Lauge) Acetylgruppen verloren hat. Er hält das genuine Chitin für ein Hexaacetylglucosamin (auf 4 Glucosamin 6 Essigsäure) entsprechend der Formel von Staedeler und Arai ( $C_{36}H_{58}N_4O_{23} + H_2O$ )<sub>x</sub>, wobei er annimmt, daß beim Trocknen der Präparate ein Rest Wasser zurückgeblieben ist.

Zur Darstellung dienen am besten die Panzer von großen Krebsen oder Käfern (Maikäfer), deren organischen Hauptbestandteil es ausmacht. Sie werden durch Salzsäure\*) und Wasser von organischen Salzen befreit und dann nacheinander mit verdünnter Kalilauge, Wasser, Alkohol und Äther ausgekocht. Nach Behandlung mit Permanganatlösung, welche die letzten Spuren von Farbstoffen entfernt, bleibt das Chitin vollkommen weiß und von der Form, die ihm in den Tieren eigen war, zurück.

Brach, der eine sehr eingehende Beschreibung seines Darstellungsverfahrens angibt, hat zweimal mit 20proz. Kalilauge einige Stunden gekocht und weiterhin nach Zermahlung der Stücke nochmals zweimal mit 20% Kalilauge 6 Stunden auf dem Wasserbade erhitzt.

Chitin verliert zwischen 100 und 130° allmählich Wasser, kann aber lange Zeit bei 132—135° ohne Zersetzung getrocknet werden. Hoch erhitzt schmilzt es nicht, sondern verkohlt. Es färbt sich mit Jodlösung braun, die Braunfärbung soll in manchen Fällen auf Zusatz von Chlorzinklösung in Violett übergehen (vielleicht durch Beimengung von Chitosan?). Es löst sich in starker Salzsäure und 50proz. Salpetersäure unter bald beginnender Zersetzung.

Der Behandlung mit starken Laugen widersteht es lange. Erhitzt man Chitin im kochenden Wasserbad am Rückflußkühler mit 10proz. Kalilauge, so läßt sich nach 12 Stunden noch kein Chitosan nachweisen, wohl aber nach 24 Stunden; benutzt man 20proz. Kalilauge, so ist Chitosan schon nach 12stündigem Kochen nachweisbar (Reaktion mit Jod und verdünnter Schwefelsäure) (Wester<sup>2)</sup>). Das ist bei der Darstellung (s. oben) zu beachten. Mit dem 10fachen Gewicht festen Ätzkalis und ein wenig Wasser einige Zeit im Ölbad bis auf 180° erhitzt, zerfällt es in Chitosan (80%) (s. § 118) und Essigsäure (etwa 25%) (Hoppe - Seyler<sup>3)</sup>, Arai). Nach Wester ist in einem Rohr mit 60proz. Kalilauge eingeschmolzenes Chitin nach 20 Minuten langem Erhitzen auf 160° völlig in Chitosan umgewandelt.

Bei der Einwirkung von etwa 70proz. Schwefelsäure auf Chitin in der Kälte entstehen Spaltungsprodukte, von denen eines am Stickstoff acetyliertes Glucosamin ist. Es krystallisiert, Fp. 190° unter Zersetzung,  $[\alpha]_D = +41,86^\circ$  (Fränkel und Kelly<sup>4)</sup>). Andere werden als Acetyldiglucoamin und polymeres Diacetylglucosamin angesprochen (Fränkel und Kelly, Offer<sup>5)</sup>). Aus der Zersetzungsflüssigkeit, die bei 3stündigem Kochen von Chitin mit 35proz. Schwefelsäure erhalten wurde, konnten Kotake und Sera<sup>6)</sup> mit Hilfe von Phosphorwolframsäurefällung ein krystallisiertes Sulfat isolieren, welches die

\*) Das Chitin von *Limulus polyphemus* erhielt bei einer monatelangen Einwirkung von verdünnter Salzsäure die Fähigkeit zu gelatinieren und dann in Wasser sich kolloidal zu lösen (Alsborg und Hedblom<sup>7)</sup>).

<sup>1)</sup> Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 87, S. 74. 1920.

<sup>2)</sup> Arch. d. Pharmazie Bd. 247, S. 282. 1909.

<sup>3)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 27, 3, S. 3329. 1894.

<sup>4)</sup> Monatshefte f. Chem. Bd. 23, S. 123. 1902.

<sup>5)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 7, S. 117. 1908.

<sup>6)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 88, S. 56. 1913.

<sup>7)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 6, S. 483. 1909.

Schwefelsäure intensiv violett und verliert diese Färbung beim Waschen mit Wasser nicht. Mit Jod und Chlorzink färbt es sich rotviolett bis blau.

Es verbindet sich mit Säuren zu Salzen, welche alle in derselben charakteristischen Weise krystallisieren (Sphärökrystalle). Vorwiegend sieht man quadratisch-gerundete Formen mit einer scharf begrenzten tiefen Delle. Über die Krystallform siehe v. Fürth und Russo und Brunswik<sup>1)</sup>. Das salzsaure Salz wird erhalten beim Versetzen der salzsauren Lösung mit konzentrierter Salzsäure, bis keine Fällung mehr entsteht. Beim Erwärmen erfolgt Lösung, aus der beim langsamen Erkalten das salzsaure Salz krystallisiert. Umkrystallisieren aus Wasser, in dem es leichtlöslich ist. Es gibt aber schon beim Trocknen im Vakuum einen Teil der Salzsäure ab (v. Fürth und Russo). Das Sulfat  $[2(C_{14}H_{26}N_2O_{10}) - H_2O] \cdot 3H_2SO_4$ , in Wasser unlöslich, fällt aus der Lösung des salzsauren Salzes durch Sulfate krystallinisch aus. Es ist beständig (Loewy). Über andere Salze siehe v. Fürth und Russo und Brunswik.

Mit Essigsäureanhydrid im zugeschmolzenen Rohr auf  $135^\circ$  erhitzt nimmt es Acetylgruppen auf und geht in einen dem Chitin ähnlichen Körper über (Hoppe - Seyler). Es gibt eine Benzoylverbindung, in der auf 1 Tl. Stickstoff eine Benzoylgruppe kommt (v. Fürth und Russo).

In essigsaurer Lösung dreht es links, und zwar beträgt bei einer 1,34proz. Lösung  $[\alpha]_D = -17,7 - 17,9^\circ$  (Araki). v. Fürth und Russo fanden für 1proz. Lösung des Chlorhydrats  $[\alpha]_D = -17^\circ$ .

Durch salpetrige Säure wird der Stickstoff quantitativ abgespalten (Brach<sup>2)</sup>, aus den Reaktionsprodukten der Einwirkung erhielt Armbrecht<sup>3)</sup> ein krystallisiertes Osazon, und zwar dasselbe wie aus mit salpetriger Säure behandeltem Glucosamin.

Beim Kochen mit konzentrierter Salzsäure entsteht Glucosamin und Essigsäure, daneben etwas Ameisensäure (Hoppe - Seyler, Araki). Bei 2stündigem Kochen erfolgt der Zerfall, wie die quantitative Bestimmung an dem krystallisierten Chitosansulfat ergab, nach der Gleichung  $(C_{28}H_{50}N_4O_{19})_n + 5nH_2O = 4n(C_6H_{13}NO_5) + 2n(CH_3COOH)$  (Loewy).

119.  $\alpha$ - und  $\beta$ -Lycoperdin  $C_{13}H_{24}N_2O_9$  finden sich unter den Zersetzungsprodukten von Lycoperdon (Lycoperdon gemmatum, L. Bovista) und Geaster granulosus (Erdstern) und werden aus diesen Pilzen durch Kochen mit Schwefelsäure erhalten (Kotake und Sera<sup>4)</sup>. Sie stehen dem Chitosan nahe. In Wasser unlösliche Körnchen, geben gut krystallisierte in Wasser meist leichtlösliche Salze.

Sulfat des  $\alpha$ -Lycoperdins  $(C_{13}H_{24}N_2O_9)H_2SO_4$  charakteristische Krystalle von quadratischer Form mit tiefer Delle in der Mitte (ähnlich dem Chitosanchlorhydrat), in kaltem Wasser nicht so leicht löslich wie das Sulfat des  $\beta$ -Lycoperdins, das gewöhnlich in Nadeln krystallisiert. Fällbar durch Phosphorwolframsäure, Pikrinsäure, Gerbsäure. Trommersche Probe positiv, ebenso Biuretreaktion. Mit Jodkalium und Chlorzink rotviolette Farbe. Kein Osazon.  $\alpha$ -Lycoperdin in salzsaurer Lösung sofort  $[\alpha]_D = -6,70^\circ$ , nach 24 Stunden  $[\alpha]_D = -5,28^\circ$ ,  $\beta$ -Lycoperdin ganz schwach linksdrehend. Beim Kochen mit konz. Salzsäure entstehen über 90% Glucosamin und etwa 14% Ameisensäure. Durch salpetrige Säure entsteht ein Sirup, welcher reduziert und Osazon gibt.

### Tierisches Gummi und Hyaloidine.

120. Tierisches Gummi. Unter diesem Namen beschreibt Landwehr<sup>5)</sup> ein Kohlenhydrat von der Zusammensetzung  $C_6H_{10}O_5$ , welches er als Spaltungsprodukt aus Submaxillarmucin und Metalbumin erhalten haben will. Weiß, mehlig, leicht Wasser anziehend und gummiartig werdend, in Wasser zu meist opaleszierender Flüssigkeit sich lösend, in Alkohol und Äther unlöslich, durch Jod nicht färbbar, durch diastatische Fermente nicht angreifbar. Seine wässrige Lösung dreht

1) Biochem. Zeitschr. Bd. 113, S. 111. 1921.

2) desgl. Bd. 38, S. 468. 1912.

3) Biochem. Zeitschr. Bd. 95, S. 108. 1919.

4) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 88, S. 56. 1913 u. Bd. 89, S. 482. 1914

5) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 8, S. 122. 1883/84. Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 39, S. 193. 1886 u. Bd. 40, S. 21. 1887.

schwach rechts, die alkalische löst Kupferoxyd mit hellblauer Farbe, beim Kochen scheiden sich bläulichweiße Flocken ab (charakteristische Reaktion). Mit verdünnter Säure gekocht liefert es einen nicht krystallisierenden Körper, welcher Fehlingsche Lösung reduziert, schwach süß schmeckt, nicht gärungsfähig ist.

Die von Ritthausen<sup>1)</sup> aus der Milch und die von Schützenberger<sup>2)</sup> aus Abkochungen von Milchdrüsen erhaltenen Kohlenhydrate sollen nach Landwehr tierisches Gummi darstellen. Loebisch<sup>3)</sup> erhielt einen Körper von derselben Zusammensetzung und im wesentlichen denselben Eigenschaften aus dem Sehnenmucin.

Nach späteren Untersuchungen (s. besonders Folin<sup>4)</sup>, Weydemann<sup>5)</sup>, Müller<sup>6)</sup>, Levene<sup>7)</sup>, Leathes<sup>8)</sup> existiert indessen das tierische Gummi von Landwehr nicht, wohl aber sind stickstoffhaltige Körper, die im allgemeinen die von Landwehr beschriebenen Eigenschaften zeigen, aber unter sich nicht übereinstimmen, aus verschiedenen Glucoproteiden dargestellt, so von Weydemann und Müller aus Mucinen verschiedener Herkunft und aus Pseudomucin durch Behandeln mit Alkalien, durch Erhitzen mit Wasser im Papinschen Topf und auch durch peptische und pankreatische Verdauung, von Folin aus Submaxillarmucin durch Erhitzen mit Wasser auf 110°, von Leathes aus Paramucin durch Verdauung mit Pepsinsalzsäure und Isolierung als Kupferkaliverbindung (s. auch § 121). Hierher gehören auch das von S. Fränkel<sup>9)</sup> aus ovomucoidfreiem Hühnereiweiß durch Kochen mit Barytwasser abgespaltene Albumin (s. § 121) und die von Langstein durch langdauernde peptische Verdauung von Serumweißstoffen<sup>10)</sup> und krystallisiertem Ovalbumin<sup>11)</sup>, durch Alkalibehandlung von Serumglobulin<sup>12)</sup> gewonnenen Substanzen.

Das bei der Hydrolyse dieser stickstoffhaltigen Polysaccharide auftretende Kohlenhydrat ist, soweit die Untersuchungen reichen, Glucosamin. Manche z. B. ein aus Submaxillarmucin von Weydemann erhaltenes, ein durch peptische Verdauung von Ovalbumin gewonnenes (Langstein) gaben nach Behandlung mit Kalilauge oder Barytwasser die Ehrlichsche Reaktion (Rotfärbung beim Erwärmen mit p-Dimethylaminobenzaldehyd in salzsaurer Lösung), andere z. B. das durch Kaliwirkung aus Serumglobulin erhaltene (Langstein) nicht.

Über das Vorkommen von tierischem Gummi im Harn<sup>13)</sup> s. die Arbeiten von Baisch<sup>14)</sup>, Lemaire<sup>15)</sup>, v. Alfthan<sup>16)</sup>, über sein Vorkommen im Blut die Angaben von Freund<sup>17)</sup>.

121. **Hyaloidine.** Nach Schmiedeberg<sup>18)</sup> handelt es sich bei den im vorigen Paragraphen erwähnten stickstoffhaltigen und nach dem Kochen mit Säuren reduzierenden Komponenten der Glucoproteide um von ihm sog. Hyaloidine. Sie wurden von ihm nach einem höchst komplizierten, im Original einzusehenden Verfahren aus den mit Lauge in der Hitze vorbehandelten Substanzen in Form von Kupfer und Chlor enthaltenden Verbindungen isoliert und als solche analysiert. Aus den Ergebnissen wurde die Formel berechnet. Die aus Eieralbumin, Ovomuroid, Echinokokkenhäuten und Schweinemagenmucin dargestellten Hyaloidine hält er für identisch und gibt ihnen die Formel  $C_{26}H_{46}N_2O_{20}$ . Hyaloidin reduziert schon direkt, stärker nach der Spaltung durch starke Salzsäure. Die aus den vier genannten Substanzen gewonnenen reduzieren nach der Hydrolyse gleich stark. Bei der Spaltung entstehen Glucosamin, nicht gärungsfähige Hexose\*) und Essigsäure, keine Pentose und keine Glucuronsäure (negativer Ausfall der Phloroglucin-

\*) Lücke (Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. Bd. 19, S. 189. 1860) hatte aus Echinokokkenhyaloidin beim Kochen mit verdünnter Schwefelsäure gärungsfähigen Zucker erhalten. Sch. ist geneigt anzunehmen, daß es sich um Glucose handelt, welche bei der Spaltung durch starke Salzsäure verändert wird, so daß sie nicht mehr gärt.

1) Journ. f. prakt. Chem. N. F. Bd. 15, S. 329. 1877.

2) Gaz. méd. de Paris 1879, No. 2.

3) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 10, S. 71. 1886.

4) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 23, S. 347. 1897.

5) Über das sog. tierische Gummi usw. Inaug.-Diss. Marburg 1896.

6) Zeitschr. f. Biol. Bd. 42, S. 468. 1901.

7) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 31, S. 395. 1900/01.

8) Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 43, S. 245. 1900.

9) Monatshefte f. Chem. Bd. 19, S. 819. 1898.

10) Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 1, S. 507. 1902.

11) Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 2, S. 229. 1902.

12) Monatshefte f. Chem. Bd. 24, S. 445. 1903 u. Bd. 25, S. 453. 1904.

13) Landwehr: Zentralbl. f. med. Wiss. 1885, S. 369.

14) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 19, S. 362. 1894.

15) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 21, S. 451. 1895/96.

16) Über dextrinartige Substanzen im diabetischen Harn. Helsingfors 1904.

17) Zentralbl. f. Physiol. 1892, S. 345.

18) Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 87, S. 1. 1920.



und Naphthoresorcinreaktion). Schmiedeberg nimmt an, daß das Hyaloidin aus einer Vereinigung von 2 Mol. Glucosamin, 2 Mol. Hexose und 1 Mol. Essigsäure unter Austritt von 4 Wassermolekülen besteht.

Die von Leathes<sup>1)</sup> aus pepsinverdaulichem Paramucin als Kupferkaliverbindung erhaltene Substanz, aus der beim Kochen mit verdünnter Salzsäure Paramucosin entsteht, ist nach Schmiedeberg ein noch eiweißhaltiges Hyaloid. Paramucosin ( $C_{12}H_{23}NO_{10}$ ) soll eine Verbindung von 1 Mol. Hexose und 1 Mol. Hexosamin unter Wasseraustritt sein. Das Hexosamin wurde später von Steudel<sup>2)</sup> als Glucosamin festgestellt.

Auch das Albumin von Fraenkel<sup>3)</sup> (erhalten aus Ovalbumin durch Kochen mit Barytwasser und Fällen mit Bleiacetat und Tannin), ein Diglucosamin ( $C_{12}H_{24}N_2O_9$ ) (rechtsdrehend und nach der Hydrolyse reduzierend), stammt nach Schmiedeberg ebenso wie ein ähnlicher von Langstein<sup>4)</sup> aus Ovalbumin erhaltener Körper aus dem Hyaloidinkomplex des Eiweißes.

Eine nach demselben Verfahren als kupfer- und chlorhaltige Verbindung aus Fibrin erhaltene Substanz hält Schmiedeberg für ein mit Fructose (Seliwanoffsche Reaktion) verbundenes Hyaloid.

Im Ascitesmucoid (Hammarsten), Pseudomucin, Submaxillaris- und Sputummucin nimmt er ebenfalls Hyaloidin an, dem er auf Grund von Berechnungen (dargestellt hat er das Hyaloidin nicht) auch die Formel  $C_{26}H_{46}N_2O_{20}$  gibt.

Diese Untersuchungen und Spekulationen von Schmiedeberg bedürfen nach vielen Richtungen hin der experimentellen Weiterführung und Sicherstellung. Erwähnt sei, daß Levene und López-Suárez<sup>5)</sup> aus Schweinemagenmucin Mucoitinschwefelsäure dargestellt haben.

### Rhodanwasserstoff CNSH.

122. Rhodanwasserstoff ist seit langer Zeit als Bestandteil des Parotiden- und Submaxillarsekrets sehr vieler, wenn auch nicht aller Menschen und einiger Tiere (fehlt nach J. Munk<sup>6)</sup> beim Hund und Pferd) bekannt, und auch im normalen Harne von Menschen und Tieren (J. Munk<sup>7)</sup>, in der Kuhmilch (Musso<sup>8)</sup>, im Magensaft von Hunden und Katzen (Nencki<sup>9)</sup> und im Nasen- und Conjunctivalsekret (Muck<sup>10)</sup> gefunden worden. Der Gehalt dieser Flüssigkeiten an Schwefelcyanverbindung ist stets gering. Nach Pollacci<sup>11)</sup> soll er in weitester Verbreitung im Körper sich finden.

Künstlich stellt man die Alkaliverbindung dar durch Schmelzen von Cyankalium mit Schwefel oder durch Einwirkung von Schwefelammonium auf Blausäure oder durch Verdampfen von Schwefelkohlenstoff, Alkohol und konzentrierter Ammoniakflüssigkeit.

Eine Isolierung aus den tierischen Flüssigkeiten ist der kleinen Menge wegen bisher nicht ausgeführt.

Die Verbindungen des Rhodanwasserstoffs mit Kalium, Natrium, Ammonium krystallisieren und sind in Wasser oder Alkohol leichtlöslich, farblos, leichtzerfließlich. Ihre Lösungen geben mit salpetersaurem Silber einen weißen, käsigen Niederschlag, der in verdünnter Salpetersäure unlöslich, in Ammoniak schwerlöslich ist. Mit Eisenchlorid geben sie intensiv blutrote Färbung der Flüssigkeit, die durch starke Salzsäure nicht verändert wird, mit Kupfersulfat smaragdgrüne Färbung (Colasanti<sup>12)</sup>, mit Jodsäure und Stärkekleister blaue Jodstärke (Solera<sup>13)</sup>. Eine Mischung von Eisenvitriol und Kupfervitriol fällt aus saurer oder neutraler Lösung den Rhodanwasserstoff in Verbindung mit

<sup>1)</sup> a. a. O.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 34, S. 333. 1901/02.

<sup>3)</sup> a. a. O.      <sup>4)</sup> a. a. O.      <sup>5)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 25, S. 511. 1916.

<sup>6)</sup> Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 61, S. 620. 1895.

<sup>7)</sup> Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. Bd. 69, 354. 1877. — Gescheidlen: Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 14, S. 401. 1877.

<sup>8)</sup> Ref. Malys Jahresber. d. Tierchem. 1877, S. 168.

<sup>9)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 28, S. 1318. 1895.

<sup>10)</sup> Münch. med. Wochenschr. 1900, S. 1168. — Keller: desgl. 1900, S. 1597.

<sup>11)</sup> Ref. Biol. Zentralbl. Bd. 2, S. 603. 1904.

<sup>12)</sup> Moleschott: Unters. zur Naturlehre. Bd. 14, Heft 2.

<sup>13)</sup> Ref. Malys Jahresber. d. Tierchem. 1877, S. 256.

Cuproxyd als feines, weißes Pulver. Mit Zink und Salzsäure zersetzt er sich unter Entwicklung von Schwefelwasserstoff.

Nachweis. Der Nachweis der Rhodanverbindungen geschieht am besten durch ihr Verhalten gegen Eisenchlorid.

Über Nachweis und quantitative Bestimmung im Harn siehe § 587, im Speichel § 767.

#### Kohlensäure und Kohlensäurederivate.

Vorkommen. 123. Kohlendioxyd  $\text{CO}_2$ . Gasförmig tritt Kohlensäure in der Exspirationsluft, den Darmgasen, dem Blute auf. Locker gebunden (durch die Luftpumpe austreibbar) findet sie sich im Blut und allen anderen Flüssigkeiten des tierischen Körpers, festgebunden (an Alkalien) in den alkalisch reagierenden Flüssigkeiten (Blut, seröse Flüssigkeiten, Galle, Sekrete). An Kalk oder andere Basen gebunden ist sie im Harn besonders der Pflanzenfresser enthalten, an Kalk gebunden in den Knochen und vielen pathologischen Konkrementen. Bei der Verbrennung organischer Stoffe wird sie reichlich gebildet, ebenso bei der Fäulnis, so ist sie z. B. reichlich im faulen Harn vorhanden.

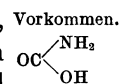
Eigenschaften. Kohlendioxyd ist bei gewöhnlicher Temperatur und einem 40 Atm. nicht übersteigenden Drucke ein farbloses Gas von stechendem Geruch und Geschmack. Es ist nicht weiter oxydierbar, also auch nicht brennbar. Bei  $0^\circ$  und 760 mm Druck absorbiert Wasser sein  $1\frac{1}{2}$ faches, bei  $10-12^\circ$  etwa sein 1faches Volumen Kohlendioxyd. Es wirkt wie eine sehr schwache Säure, welche feuchtes, blaues Lackmuspapier rötet, auch Kohlendioxyd enthaltendes Wasser färbt Lackmuspapier rot, die rote Farbe verliert sich aber bald beim Liegen des Papiers an der Luft. In der Lösung ist ein kleiner Prozentsatz an der eigentlichen Kohlensäure  $\text{H}_2\text{CO}_3$  anzunehmen.

Salze. Die neutralen kohlensauren Alkalien krystallisieren, sind löslich in Wasser, ihre Lösungen reagieren stark alkalisch. In Alkohol sind diese Salze unlöslich. Sie zerlegen sich nicht bei mäßigem Glühen. Die neutralen kohlensauren Erden sind in kohlensäurefreiem Wasser fast ganz unlöslich, in viel kohlensäurehaltigem Wasser lösen sie sich dagegen auf. Kohlensaurer Kalk zerfällt beim starken Glühen in Calciumoxyd und Kohlensäure. Die sauren kohlensauren Alkalien sind gut krystallisierbar, werden jedoch leicht beim Erhitzen auf  $100^\circ$ , auch selbst beim Stehen in einer Luft, die weniger als 1% Kohlensäure bei gewöhnlichem Luftdrucke enthält, in neutrales Salz, Kohlensäure und Wasser zerlegt. Wird zu einer Lösung eines neutralen kohlensauren Alkalis allmählich eine ungenügende Menge einer Säure zugefügt, so verbindet sich diese mit der äquivalenten Menge des Alkalis und die freigewordene Kohlensäure wandelt eine entsprechende Menge des noch übrigen kohlensauren Salzes in das saure Salz um. Wird dagegen schnell eine starke Säure hinzugefügt, so zerfällt durch die Erhitzung das saure kohlensaure Salz und es entweicht Kohlensäure unter Aufbrausen.

Nachweis. Zum Nachweis der Carbonate dient hauptsächlich das Aufbrausen, welches sich einstellt, wenn sie selbst oder ihre wässerigen Lösungen mit einer starken Säure (verdünnter Schwefelsäure) im Überschusse versetzt werden; Erwärmen beschleunigt die Entwicklung des Gases, welches nur langsam völlig entweicht. Die freie oder aus Salzen freigemachte, gasförmige Kohlensäure kann an der schwachen Rötung von feuchtem Lackmuspapier, dem Geruch und der in klar filtriertem Kalk- oder Barytwasser durch das überfließende Gas erzeugten weißen Trübung erkannt werden. Um in Flüssigkeiten gelöste Kohlensäure nachzuweisen, bringt man dieselben am besten in einen Kolben mit doppelt durchbohrtem Kork. In der einen Bohrung steckt ein bis auf den Boden des Kolbens reichendes, in der anderen ein kurzes, unter dem

Stopfen abschneidendes Glasrohr. Ersteres ist mit einem Kalilauge enthaltenden, letzteres mit einem klaren Kalk- oder Barytwasser enthaltenden Kugelapparat verbunden. Saugt man nun mittels eines Aspirators atmosphärische Luft durch die 3 miteinander verbundenen Gefäße, so wird, falls die Flüssigkeit Kohlensäure enthält, im Kalk- oder Barytwasser Trübung oder Niederschlag durch Bildung von Calcium- oder Bariumcarbonat entstehen. Erwärmen der zu prüfenden Flüssigkeit im Kolben beschleunigt das Entweichen von Kohlensäure.

124. Carbaminsäure  $\text{CH}_3\text{NO}_2$  ist von Drechsel<sup>1)</sup> im Blut nachgewiesen, sie findet sich auch im alkalischen Pferdeharn (Drechsel<sup>2)</sup> und, wenn auch nicht regelmäßig, im sauren Pferdeharn, sowie im normalen Menschen- und Hundeharn, in reichlicher Menge im Hundeharn nach Anlegung der Eckschen Fistel (Hahn und Nencki<sup>3)</sup>). Abel und Muirhead<sup>4)</sup> fanden sie im Hund- und Menschenharn nach Eingabe von Kalkmilch vermehrt. Ferner ist ihre Bildung bei der Einwirkung von übermangansaurem Kali auf verschiedene stickstoffhaltige organische Körper, z. B. Eiweißstoffe, erkannt worden.



Carbaminsäure ist in freiem Zustande nicht bekannt. Ihr Ammoniaksalz entsteht durch Einwirkung von trockenem Ammoniak auf trockene Kohlensäure. Carbaminsaurer Kalk wird dargestellt durch Einleiten von Kohlensäure in starkes wässriges Ammoniak und Zusatz von Kalkmilch in kleinen Portionen, bis man auch bei heftigem Schütteln keine weitere Lösung mehr wahrnimmt, sondern eine Ausscheidung von Krystallen beginnt. Man läßt dann etwas absitzen, filtriert direkt in das etwa gleiche Volumen auf 0° abgekühlten, absoluten Alkohol. Sofort entsteht dabei ein dicker, amorpher Niederschlag, der nach einiger Zeit krystallinisch wird. Man bringt ihn dann in eine weite Glasröhre, in der sich ein Filter von Glaswolle und Quarzsand befindet, wäscht einmal mit einer Mischung von gleichen Volumina Alkohol und starker Ammoniaklösung, dann mit absolutem Alkohol, endlich mit absolutem Äther und trocknet zuletzt durch einen durchgeleiteten starken trockenen Luftstrom. Das erhaltene krystallinische Pulver besteht aus meist mikroskopischen flachen Prismen, dem Gips ähnlich. Auch carbaminsaures Kalium und Natrium sind von Drechsel dargestellt worden.

Aus dem Harn ist die Carbaminsäure als Kalksalz isoliert nach einem dem eben beschriebenen sich anschließenden Verfahren (Schütteln des Harns mit Kalkmilch usw.), aber nicht in reinem Zustand. Indessen hat Nolf<sup>5)</sup> festgestellt, daß man aus Lösungen von neutralem und saurem Ammoniumcarbonat, aus Gemischen von Ammoniumchlorid und Natriumcarbonat und aus wässrigen Lösungen von Ammoniumchlorid und freier Kohlensäure nach dem gleichen Verfahren carbaminsauren Kalk in erheblicher Menge erhalten kann, und zwar auch aus sehr verdünnten Lösungen, deren Prozentgehalt an Kohlensäure und Ammoniak den physiologischen Verhältnissen entspricht. Danach ist eine spezielle physiologische Herkunft der Carbaminsäure fraglich, ihre Bildung vielmehr durch die allgemeinen Gesetze der Gleichgewichtszustände zu erklären.

Carbaminsaures Ammoniak bildet eine weiße Krystallmasse, welche in Wasser leichtlöslich ist, sich aber in dieser Lösung bald unter Wasseraufnahme teilweise in kohlen-saures Ammoniak umwandelt. Carbaminsaurer Kalk hat die Zusammensetzung  $2(\text{NH}_2\text{COO})_2\text{Ca} + \text{H}_2\text{O}$ . Beim Erhitzen zersetzt sich das Salz mit seinem Krystallwasser in Calciumcarbonat und carbaminsaures Ammoniak, während die Hälfte des carbaminsauren Kalks trocken übrig bleibt und beim weiteren Erhitzen erst in der Glühhitze in Calciumcyanamid, Wasser und Kohlensäure zerlegt wird  $(\text{NH}_2\text{COO})_2\text{Ca} = \text{CN}_2\text{Ca} + 2\text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2$ . Durch Säuren wird carbaminsaurer Kalk unter Aufbrausen schnell zersetzt. In Wasser löst sich das Calciumsalz klar auf, aber schon nach  $\frac{1}{2}$  Minute erfolgt Trübung,

1) Journ. f. prakt. Chem. N. F. Bd. 16, S. 180. 1877.

2) Arch. f. Anat. u. Physiol., physiol. Abt. 1891, S. 236.

3) Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 32, S. 185. 1893. \*) desgl. Bd. 31, S. 15. 1893.

5) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 23, S. 505. 1897.

und es scheidet sich allmählich Calciumcarbonat aus. Ammoniakalische Lösung des Salzes erhält sich um so länger unzersetzt, je konzentrierter die Ammoniaklösung ist. Aus einer gesättigten Lösung in warmem Ammoniak scheidet sich beim Erkalten das Salz in schönen, 4seitigen Prismen ab. Läßt man verdünnte Lösungen ruhig in der Kälte krystallisieren, so entstehen neben sternförmigen Konglomeraten regelmäßige Kreuzformen, die aus einer Zusammensetzung von Prismen und Blättchen bestehen und leicht in amorphes Calciumcarbonat übergehen. Dieses charakteristische Verhalten des carbaminsauren Kalkes setzt allerdings die größte Reinheit der Lösung voraus (Nolf). Die carbaminsauren Alkalien liefern trocken erhitzt cyansaures Alkali und Wasser  $\text{NH}_2\text{COONa} = \text{CNONa} + \text{H}_2\text{O}$ ; dieselbe Umwandlung erleidet auch die Calciumverbindung, doch wird sie in der Glühhitze weiter zu  $\text{CN}_2\text{Ca} + \text{CO}_2$  zerlegt.

Nachweis. Der Nachweis der Carbaminsäure gründet sich im wesentlichen auf die Eigenschaften des Calciumsalzes. Vgl. indessen das oben Gesagte.

Vorkommen. **125. Harnstoff  $\text{C}_4\text{H}_8\text{N}_2\text{O}$ .** Der Harnstoff ist ein stets vorhandener Bestandteil der Harnen von Menschen, Säugetieren und nackten Amphibien. Im normalen Blute von Säugetieren, Fischen, in Transsudaten, Lymphe, im Humor aqueus, Glaskörper, im Speichel, in der Milch, im Schweiß, in Tränen, Muskeln<sup>1)</sup>, im Gehirn und in anderen Organen und Flüssigkeiten findet er sich in kleinen Mengen oder in Spuren und häuft sich bei gehinderter Ausscheidung durch die Nieren in diesen Flüssigkeiten und Geweben an. Bei den Selachiern kommt er sehr reichlich in Blut, Galle und Organen vor. Auch im Pflanzenreiche (Pilze, Schimmelpilze, höhere Pflanzen) ist er gefunden. Er entsteht bei der Spaltung von Kreatin, Arginin, Purinkörpern u. v. a., bei der Oxydation vieler stickstoffhaltiger und -freier aliphatischer Verbindungen, auch von Eiweiß und Aminosäuren, Kohlenhydraten, Glycerin, Formaldehyd in ammoniakalischer Lösung (Hofmeister<sup>2)</sup>, Fosse<sup>3)</sup>.

Darstellung. Der Harnstoff wird künstlich dargestellt, indem man eine wässrige Lösung von cyansaurem Kali mit schwefelsaurem Ammoniak versetzt, zur Trockne abdampft, den Rückstand mit absolutem Alkohol auszieht, filtriert, zum Sirup abdampft und krystallisieren läßt (Wöhler). Technische Darstellung aus  $\text{CO}_2$  und  $\text{NH}_3$  unter Druck.

Darstellung aus Harn. Zur Darstellung von Harnstoff aus Hunde- resp. Menschenharn dampft man den Urin zunächst auf freiem Feuer, dann auf dem Wasserbade zum Sirup ein, zieht diesen mit Alkohol aus und verdunstet das alkoholische Filtrat auf dem Wasserbade zum Sirup. Aus dem Hundeharn scheidet sich alsbald der Harnstoff in Krystallen ab, welche durch Waschen mit wenig Alkohol und Auspressen von den Extraktivstoffen befreit werden können. Handelt es sich um Menschenharn, so fällt man den erkalteten Sirup durch Salpetersäure (eine Mischung gleicher Teile konzentrierter Salpetersäure und Wasser) in mäßigem Überschuß (unter Abkühlen falls Erwärmung erfolgt), saugt den Niederschlag ab, wäscht mit verdünnter Salpetersäure aus, zerteilt ihn in nicht zu viel Wasser und fügt Bariumcarbonat hinzu, solange Aufbrausen erfolgt. Jetzt dampft man auf dem Wasserbade zur Trockne, zieht den Rückstand mit absolutem Alkohol aus, filtriert und verdunstet das Filtrat zum Sirup. Der beim Stehen auskrystallisierende Harnstoff wird durch Umkrystallisieren aus Wasser unter Zusatz von Tierkohle gereinigt.

Eigenschaften. Der Harnstoff bildet meist sehr dünne, 4seitige, oft innen hohle Prismen mit sehr stumpfer Pyramide an den Enden, von der gewöhnlich nur eine oder zwei Flächen gut ausgebildet sind. Die Krystalle gehören dem tetragonalen

<sup>1)</sup> Schöndorff: Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 74, S. 346. 1899.

<sup>2)</sup> Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 37, S. 426. 1896.

<sup>3)</sup> Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 154, S. 1187, 1448, 1819. 1912; Bd. 168, S. 1164. 1919; ref. Chem. Zentralbl. 1919, III, S. 602.

Systeme zu. Sie sind wasserfrei, nicht hygroskopisch, können ohne Zersetzung auf  $120^\circ$  erhitzt werden und schmelzen bei  $132^\circ$ . In heißem Wasser löst sich der Harnstoff in jedem Verhältnisse. 1 Gewichtsteil Harnstoff löst sich in 1 Gewichtsteile kalten Wassers oder siedenden Alkohols, nur in 5 Tl. kalten Alkohols; in Äther ist er unlöslich, entzieht aber demselben Wasser, wenn er wasserhaltig war, und zerfließt damit. Durch Phosphorwolframsäure werden verdünnte Harnstofflösungen nicht gefällt. Mercurisulfat ruft in 0,25 proz. Lösungen noch deutlichen Niederschlag hervor, in 0,2 proz. nicht mehr.

Der Harnstoff vereinigt sich mit vielen Säuren, einigen Metalloxyden, Verbindungen: z. B. Quecksilberoxyd, einer Reihe von Salzen und organischen Substanzen zu meist krystallisierenden Verbindungen.

Salpetersaurer Harnstoff  $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O} \cdot \text{HNO}_3$  entsteht beim Versetzen einer mit Salpetersäure mindestens 10 proz. abgekühlten, wässrigen Harnstofflösung mit überschüssiger konzentrierter Salpetersäure als blättrig krystallinischer Niederschlag; bei schneller Ausscheidung bildet er mikroskopische, meist sehr dünne rhombische oder 6seitige Tafeln, die in der Regel mehrfach zusammengehäuft erscheinen. Große und dicke Krystalle erhält man, wenn man Salpetersäure-Äthylester durch Destillation von Alkohol mit starker Salpetersäure und Harnstoff darstellt und den Rückstand, welcher in der Retorte bleibt, aus Wasser umkrystallisiert. Er bildet dann dickere, bis 1,3 cm breite, 6seitige Tafeln oder Säulen des rhombischen Systems. Die rhombischen Tafeln zeigen einen Kantenwinkel von  $82^\circ$ . Das Nitrat ist schwerlöslich in kalter Salpetersäure, leichter löslich in kaltem, viel leichter in heißem Wasser, wenig löslich in Alkohol, unlöslich in Äther; schnell erhitzt verpufft es ohne Rückstand, allmählich auf  $140^\circ$  erwärmt zerlegt es sich in salpetersaures Ammoniak, Harnstoff, Stickoxydul, Kohlensäure, ebenso allmählich beim Kochen der wässrigen, stark sauer reagierenden Lösung.

Oxalsaurer Harnstoff  $(\text{CH}_4\text{N}_2\text{O})_2 \cdot \text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$  erhält man durch Fällung einer kon- mit Oxalsäure zentrierten Harnstofflösung mit Oxalsäure. Er bildet rhombische Tafeln, die leichter groß und dick zu erhalten sind als die Krystalle des salpetersauren Salzes. Der oxalsaurer Harnstoff ist löslich in kaltem Wasser (1 Tl. in 23 Tl.), schwerer in kaltem Alkohol (1 Tl. in 62 Tl. 90 proz. Alkohols), leichtlöslich in kochendem Wasser, fast ganz unlöslich in reinem Äther. Phosphorsaurer Harn- mit Phosphorsäure

stoff  $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O} \cdot \text{H}_3\text{PO}_4$  ist von J. Lehmann in großen, glänzenden Krystallen des rhombischen Systems aus Phosphorsäure und Harnstoff dargestellt und auch aus dem abgedampften Harne mit Kleie gefütterter Schweine erhalten worden. Die Krystalle sind in Wasser sehr leichtlöslich, aber nicht zerfließlich. Phosphorwolframsaurer Harnstoff bildet meist nadelförmige, in Wasser und mit Phosphor- wolframsäure Alkohol leichtlösliche Krystalle, die sich aus einer 5 proz. Harnstofflösung auf Zusatz von Salzsäure und Phosphorwolframsäure sofort, aus einer 3—4 proz. allmählich abscheiden (Mörner und Sjöquist<sup>1</sup>).

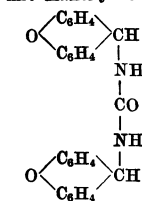
Harnstoff-Chlornatrium  $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O} \cdot \text{NaCl} + \text{H}_2\text{O}$  bildet rhombische Tafeln mit Chlornatrium oder Prismen, die sich häufig nach dem Abdampfen von Harn zum Sirup beim Stehenlassen abscheiden; auch mit anderen Alkalisalzen krystallisiert Harnstoff gern aus Lösungen, die beide enthalten. Beim Umkrystallisieren zerfallen diese Verbindungen leicht. Harnstoff-Palladiumchlorür  $(\text{CH}_4\text{N}_2\text{O})_2 \cdot \text{PdCl}_2$  ist ein mit Palladium- chlorür bräunlichgelber, krystallinischer Niederschlag, den säurefreie Palladiumchlorür-lösung in Harnstofflösung erzeugt. Unlöslich in Alkohol, schwerlöslich in Wasser (Drechsel<sup>2</sup>). Durch Mischung einer wässrigen Lösung von Harnstoff mit Mercurinitrat kann man 3 verschiedene Verbindungen darstellen, in denen Harn- mit Mercurinitrat stoff und Salpetersäure stets zu gleichen Molekülen mit verschiedenen Mengen

<sup>1</sup>) Skandinav. Arch. f. Physiol. Bd. 2, S. 466. 1891.

<sup>2</sup>) Journ. f. prakt. Chem. N. F. Bd. 20, S. 469. 1879.

Mercurioxyd verbunden sind. Liebig hat diesen 3 Verbindungen Formeln gegeben, nach denen die eine Verbindung 4, die zweite 3, die dritte nur 2 Äquivalente Quecksilber auf 1 Äquivalent Harnstoff enthält. Nach Liebig erhält man das 4 Äquivalente Quecksilber enthaltende Salz  $2\text{CO}(\text{NH}_2)_2 \cdot \text{Hg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{HgO}$  durch Hinzufügen überschüssiger, sehr verdünnter Lösung von Mercurinitrat zur gleichfalls verdünnten Harnstofflösung als körniges Pulver, welches aus radialgestellten Nadeln besteht. Auf der Bildung dieses Niederschlages beruht das Liebigsche Verfahren der Harnstofftitrierung. Die 3 Äquivalente Quecksilber enthaltende Verbindung  $2\text{CO}(\text{NH}_2)_2 \cdot \text{Hg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{HgO}$  erhält man durch Fällung einer Harnstofflösung mit verdünnter Lösung von Mercurinitrat, indem man die letztere so lange hinzufügt, wie sich noch ein Niederschlag bildet. Läßt man den Niederschlag an einem  $40-50^\circ$  warmem Orte stehen, so verwandelt er sich größtenteils in 6seitige Tafeln. Die Verbindung, welche 2 Äquivalente Quecksilber enthält  $2\text{CO}(\text{NH}_2)_2 \cdot \text{Hg}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{HgO}$ , scheidet sich in krystallinischen Krusten von kleinen, rechtwinkligen, zusammengehäuften Tafeln ab, wenn man eine Harnstofflösung mit einer Lösung von Mercurinitrat bis zur beginnenden Trübung versetzt, abfiltriert und das Filtrat stehen läßt. Alle 3 Verbindungen sind weiße Niederschläge, die, in Wasser zerteilt, durch einen anhaltenden Strom Schwefelwasserstoffgas in Schwefelquecksilber und salpetersauren Harnstoff zerlegt werden. Durch Verdunstenlassen der abfiltrierten Lösung kann man dies letztere Salz erhalten.

mit Xanthydrol



Eine alkoholische Lösung von Xanthydrol fällt noch aus sehr verdünnten essigsäurehaltigen Harnstofflösungen krystallinischen Dixanthylharnstoff aus. Zur Abscheidung sehr geeignet. Versetzt man 2 Tl. einer Harnstofflösung, welche mehr als einige Centigramm im Liter enthält, mit 7 Tl. reiner Essigsäure und 1 Tl. 10proz. alkoholischer Xanthydrollösung, so ist die Abscheidung nach 1 Stunde geschehen. Zur Reinigung kann man die Widerstandsfähigkeit gegen kochende Alkalilauge und die Schwerlöslichkeit benutzen. Ein Teil in 100 Tl. kochendem Pyridin gelöst krystallisiert beim Erkalten in Nadeln, die Verbindung kann auch zur quantitativen Bestimmung des Harnstoffs dienen (Fosse<sup>1</sup>). Weiteres über diese Verbindung siehe bei Harn § 580, 1.

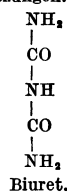
mit Phenylhydrazin

Phenylsemicarbazid  $\text{H}_2\text{NCONH} \cdot \text{NHC}_6\text{H}_5$  scheidet sich in Form weißer, in heißem Alkohol und heißem Wasser leichtlöslicher Tafeln oder Blättchen ab, wenn man eine nicht zu verdünnte (bis 2proz.) Harnstofflösung mit Phenylhydrazin und Essigsäure einige Stunden auf dem Wasserbad erwärmt (Jaffe<sup>2</sup>).

mit Zucker.

Harnstoff verbindet sich in wässriger Lösung bei Gegenwart von Schwefelsäure mit Traubenzucker und anderen reduzierenden Zuckern mit Ausnahme der Fructose unter Wasseraustritt zu krystallisierenden Ureiden. Über Traubenzuckerureid  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_5 \cdot \text{NCO} \cdot \text{NH}_2$  s. S. 116.

Zersetzungen.



Biuret.

Trocken erhitzt schmilzt der Harnstoff und liefert Biuret und Ammoniak  $2\text{CON}_2\text{H}_4 = \text{C}_2\text{H}_5\text{N}_3\text{O}_2 + \text{NH}_3$ , dann Cyanursäure; feucht erhitzt schmilzt er und zerlegt sich hauptsächlich zu Kohlensäure und Ammoniak. Wässrige Lösungen können bei  $60-75^\circ$  ohne merklichen Verlust eingedampft werden, beim Kochen geht ein kleiner Teil in cyansaures Ammoniak und weiter in kohlen-saures Ammoniak über. Vollständig ist diese Umwandlung in kohlen-saures Ammoniak beim Erhitzen einer wässrigen Lösung im zugeschmolzenen Rohr auf  $180^\circ$ , bei  $4\frac{1}{2}$ stündigem Erhitzen von 15 ccm einer 0,2proz. wässrigen Lösung mit 10 g krystallisierter Phosphorsäure auf  $150^\circ$  (Schöndorff<sup>3</sup>), beim

<sup>1</sup>) Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 157, S. 948. 1913 u. Bd. 158, S. 1076. 1914.

<sup>2</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 22, S. 552. 1896/97.

<sup>3</sup>) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 62, S. 1. 1896.

Erhitzen mit Alkalien, und zwar genügt nach Schöndorff ein 4 $\frac{1}{2}$ stündiges Erhitzen mit einer alkalischen Chlorbariumlösung im zugeschmolzenen Rohr auf 150°. Bakterien, wie sie sich z. B. im faulen Harn, im Harn bei Blasenkatarrh finden, zersetzen den Harnstoff in derselben Weise (ammoniakalische Harnsäure) mittels der in ihnen enthaltenen Urease. Dieses Ferment findet sich auch in den Sojabohnen und dient zum Nachweis und zur quantitativen Bestimmung des Harnstoffs. Kalkmilch wirkt beim Kochen nicht stark, in der Kälte gar nicht auf den Harnstoff ein. In konzentrierter Lösung mit salpetersaurem Silber versetzt und stark eingedampft zersetzt sich Harnstoff unter Bildung von cyansaurem Silber und salpetersaurem Ammoniak. Durch salpetrige Säure wird Harnstoff in Kohlensäure, Wasser und Stickstoff ( $\text{CON}_2\text{H}_4 + \text{N}_2\text{O}_3 = \text{CO}_2 + 2 \text{N}_2 + 2 \text{H}_2\text{O}$ ) zersetzt, durch feuchtes Chlorgas sowie durch Lösungen unterchlorigsaurer oder unterbromigsaurer Salze in Kohlensäure, Chlor- bzw. Bromwasserstoff und Stickstoff ( $\text{CON}_2\text{H}_4 + 3 \text{NaBrO} = \text{CO}_2 + \text{N}_2 + 3 \text{NaBr} + 2 \text{H}_2\text{O}$ ). Auf dieser Reaktion beruht die Harnstoffbestimmung nach Knop-Hüfner.

Zum Nachweis können folgende Proben dienen:

1. Beim Versetzen eines Krystalls Harnstoff oder eines Tropfens hinreichend konzentrierter Lösung desselben auf dem Objektträger mit 1 oder 2 Tropfen mäßig verdünnter Salpetersäure entstehen die rhombischen oder 6seitigen Krystalltafeln des salpetersauren Harnstoffs.

2. Versetzt man eine Lösung von Natriumnitrit mit einigen Tropfen Schwefelsäure bei Gegenwart von Harnstoff, so entwickeln sich farblose Gase (Stickstoff und Kohlensäure), während bei Abwesenheit von Harnstoff gelbbraune Nitrosdämpfe entstehen.

3. Erhitzt man trockene Harnstoffkrystalle im trockenen Probierröhr über kleiner Flamme vorsichtig zum Schmelzen und weiter, bis die Masse wieder fest wird, so entsteht Biuret, welches nach dem Erkalten mit etwas Natronlauge und einer Spur Kupfersulfatlösung Rotviolett färbung der Lösung bewirkt (Biuretreaktion).

4. Fügt man zu einer Harnstofflösung zerriebene Sojabohnen und 1 Tropfen Phenolphthaleinlösung, so tritt nach kurzer Zeit Rotfärbung auf (Umwandlung des Harnstoffes in Ammoniumcarbonat durch Urease).

5. Fügt man zu einem Harnstoffkrystall einen Tropfen fast gesättigter Lösung von Furfurol und dann sogleich einen Tropfen Salzsäure von ungefähr 1,1 spez. Gewicht, so entsteht Farbenänderung von Gelb in Grün, Blau, Violett bis prachtvoll Purpurrot. Ein Tropfen einer 1proz. Harnstofflösung mit  $\frac{1}{2}$  ccm Furfurolwasser und drei Tropfen Salzsäure gibt nach 5 Minuten noch intensive Färbung. Im Harn ist die Färbung nicht rein. Allantoin gibt die gleiche Reaktion, aber weniger intensiv und langsamer (Schiff<sup>1</sup>).

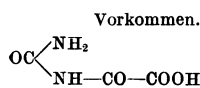
6. Eine alkoholische Harnstofflösung, die auch noch andere Stoffe enthalten kann, wird mit einer hinreichenden Menge einer alkoholischen Lösung von o-Nitrobenzaldehyd auf dem Wasserbade zur Trockne verdunstet, der Rückstand mit Alkohol übergossen, kurze Zeit erwärmt, der Alkohol abgossen und dies so oft (2—3 mal) wiederholt, bis alle in Alkohol löslichen Stoffe inkl. des überschüssig zugesetzten Nitrobenzaldehyds entfernt sind, d. h. bis der abgossene Alkohol keine Farbenreaktion mit Phenylhydrazin mehr zeigt. Es hinterbleibt das Kondensationsprodukt — o-Nitrobenzylidendiureid — als weißlicher, pulveriger Körper, fest an den Wandungen der Schale haftend. Übergießt man diesen Rückstand mit wenig verdünnter Lösung von salzsaurem Phenylhydrazin und 5—10 Tropfen einer 10proz. Schwefelsäure und erhitzt zum Sieden, so färbt sich die Flüssigkeit sogleich rot durch Bildung des o-Nitrobenzaldehydphenylhydrazons (Lüdy<sup>2</sup>).

7. Noch sehr verdünnte wässrige oder alkoholische Harnstofflösungen geben mit einigen Tropfen einer salzsauren Lösung von p-Dimethylamidobenzaldehyd zeisiggrüne Farbe. Die Reaktion gibt auch der stark verdünnte Harn, von den normalen Harnbestandteilen nur noch das Allantoin (Barrenscheen u. Weltmann<sup>3</sup>).

<sup>1</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 10, 1, S. 773. 1877.

<sup>2</sup>) Monatshefte f. Chem. Bd. 10. S. 310. 1889.

<sup>3</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 131, S. 591. 1922. — Barrenscheen: Ebenda Bd. 145, S. 426. 1923.



**126. Oxalursäure**  $\text{C}_3\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_4$ . Oxalursaures Ammoniak ist von Schunk<sup>1)</sup> und später von Neubauer<sup>2)</sup> in sehr geringer Menge im normalen menschlichen Harn nachgewiesen worden. Auf ihr wenn auch nicht regelmäßiges Vorkommen im Harn von Menschen, Hunden, Kaninchen lassen auch die Untersuchungen von Luzzatto<sup>3)</sup> schließen.

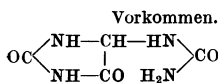
**Darstellung.** Oxalursaures Ammoniak wird erhalten durch Lösen von Harnsäure in warmer, sehr verdünnter Salpetersäure, Übersättigen nach dem Erkalten mit Ammoniak und Eindampfen zur Krystallisation, ferner durch Kochen einer wässrigen Lösung von Parabansäure mit Ammoniak.

**Isolierung aus Harn.** Zu seiner Gewinnung aus Harn läßt man denselben auf gekörnte Tierkohle, wie sie in den Zuckerfabriken angewendet wird, auftropfen. Diese Tierkohle befindet sich in einer pipettenartig geformten, unten ausgezogenen Glasröhre und ist überdeckt mit einem Stück Leinwand, welches Epithelien, Schleim usw. zurückhält und öfter gewechselt wird. Durch einen Quetschhahn reguliert man das Auftropfen in der Weise, daß in 24 Stunden etwa 20 l Harn die Kohle passieren. Hört die entfärbende Kraft der Kohle auf, so füllt man die Pipette mit neuer Kohle. Die Kohle wird dann mit destilliertem Wasser gewaschen, bis das Filtrat weder Chlor noch Phosphorsäure mehr enthält, an der Luft getrocknet und nun mit Alkohol ausgekocht, bis dieser sich nicht mehr gelb färbt. Von den alkoholischen Filtraten wird der größte Teil des Alkohols abdestilliert und der Rest in einer Porzellanschale auf dem Wasserbade verdampft. Der zurückbleibende Sirup wird mit Wasser behandelt, filtriert, das Filtrat zum Sirup verdunstet und dieser zur Krystallisation stehen gelassen. Zweckmäßig ist es, die Dialyse zur Reinigung zu benutzen, das Diffusat einzudampfen, die sich abscheidenden Krystalle von oxalursaurem Ammoniak mit absolutem Alkohol abzuspülen und aus heißem Wasser mit sehr wenig reiner Tierkohle umzukrystallisieren. Aus 100—150 l Harn erhielt Neubauer hinreichende Quantität, um die charakteristischen Eigenschaften des oxalursauren Ammoniaks an der Substanz zu prüfen; die Ausbeute ist also sehr gering.

**Eigenschaften.** Oxalursaures Ammoniak krystallisiert in seideglänzenden Nadeln. Das unreine Salz bildet kleine Krystallbüschel oder kugelige Aggregate, an der Oberfläche mit feinen Krystallnadeln besetzt. Es ist in Wasser sehr schwer löslich, die heiße Lösung gibt mit salpetersaurem Silber einen nach dem Erkalten in seideglänzenden Nadeln sich abscheidenden Niederschlag von oxalursaurem Silber, der in heißem Wasser oder Ammoniak löslich ist, ferner mit verdünnter Salpetersäure einen feinpulverigen krystallinischen Niederschlag von Oxalursäure. Versetzt man eine konzentrierte Lösung von oxalursaurem Ammoniak mit Chlorcalcium oder Chlorzink, so scheiden sich beim längeren Stehen die Salze dieser Basen in charakteristischen, mikroskopischen Krystallen aus; desgleichen ruft essigsäures Blei nach kurzer Zeit Trübung und pulverig krystallinischen Niederschlag von oxalursaurem Blei hervor. Wird eine Lösung von oxalursaurem Ammoniak mit Chlorcalcium und Ammoniak erwärmt, so scheidet sich, schon ehe die Siedehitze erreicht ist, bei genügender Verdünnung der Lösung oxalsaurer Kalk in schönen mikroskopischen Oktaedern aus. Wird die Oxalursäure mit verdünnter Säure gekocht, so spaltet sie sich in Harnstoff und Oxalsäure. Auch in der Kälte beginnt bei Anwesenheit von Salzsäure alsbald diese Spaltung.

Der Ansicht von Schunk, daß die allmählich sich abscheidenden oxalsauren Kalksedimente im Harne ihre Entstehung der Zerspaltung von oxalursaurem Ammoniak verdanken, trat Neubauer entgegen, weil er fand, daß letzteres Salz im Harne lange Zeit unverändert bestehen kann, bei der alkalischen Gärung aber die Oxalursäure verschwindet, ohne daß Oxalsäure nachzuweisen ist.

**Nachweis.** Zum Nachweis dienen die obige von Neubauer beschriebene Darstellungsmethode aus dem Harne sowie die genannten Reaktionen.



**127. Allantoin**  $\text{C}_4\text{H}_6\text{N}_4\text{O}_3$  wurde zuerst in der Amniosflüssigkeit der Kühe, dann in der Allantoisflüssigkeit des Kalbes und im Fruchtwasser und im Harn neugeborener Kälber gefunden. Es findet sich im Harn aller Säugetiere (Wiechowski<sup>4)</sup>, Hunter, Givens und Guion<sup>5)</sup>, Hunter und Givens<sup>6)</sup>, auch des Menschen, aber hier in sehr geringer Menge (Wiechowski<sup>7)</sup>). Allantoin ist das Hauptendprodukt des Purinstoffwechsels der Säugetiere mit Ausnahme des Menschen und der anthropoiden Affen (Wiechowski). Hunter<sup>8)</sup> fand es auch im Blut verschiedener Säugetiere, nicht im Blut des Menschen, Acroyd<sup>9)</sup>

1) Proc. of the roy. soc. Bd. 16, S. 140. 1866.

2) Zeitschr. f. analyt. Chem. Bd. 7, S. 225. 1868.

3) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 37, S. 225. 1903.

4) Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 11, S. 109. 1908.

5) Journ. of biol. chem. Bd. 18, S. 387. 1914. 6) desgl. Bd. 18, S. 403. 1914.

7) Biochem. Zeitschr. Bd. 19, S. 368. 1909.

8) Journ. of biol. chem. Bd. 28, S. 369; ref. Chem. Zentralbl. 1917, I, S. 1115.

9) Biochem. journ. Bd. 5, S. 400; zit. nach Biochem. Zentralbl. Bd. 11, S. 791. 1911.



in der Kuhmilch, *Moscattelli*<sup>1)</sup> in Ascitesflüssigkeit bei Lebercirrhose, *Naunyn*<sup>2)</sup> im Inhalt einer Ovarialcyste.

Auch in Pflanzen ist es nachgewiesen, z. B. in Sprossen von Platanen<sup>3)</sup> und Acerarten<sup>4)</sup>, in der Rinde von *Aesculus hippocastanum*<sup>4)</sup>, in Weizenkeimen<sup>5)</sup>, Rübensäften<sup>6)</sup> usw.

Zur Darstellung von Allantoin nach *Sundwik*<sup>7)</sup> suspendiert man 100 g Harnsäure in 1½ bis 2 l Wasser, bringt sie durch Zufügen von kleinen Portionen Natronlauge in Lösung und versetzt die alkalische Flüssigkeit mit 62 g Kaliumpermanganat in konzentrierter Lösung unter Umschütteln. Sobald sich die Flüssigkeit entfärbt hat (was sehr bald, spätestens nach einer Stunde der Fall ist und durch Abfiltrieren einer kleinen Probe festgestellt wird) filtriert man rasch ab, säuert mit Essigsäure an und dampft zur Krystallisation ein. Ausbeute fast in theoretischer Menge. Synthetisch ist Allantoin dargestellt von *Grimaux*<sup>8)</sup> durch längeres Erhitzen von Glyoxylsäure mit Harnstoff bei 100°.

Zur Isolierung benutzt man am besten ein Verfahren, das *Wiechowski*<sup>9)</sup> für den Harn angegeben hat, das von *Hunter*<sup>9)</sup> auch zur Abscheidung aus Blut angewendet worden ist. Es beruht auf der Beobachtung von *Wiechowski*, daß Allantoin bei neutraler Reaktion durch eine verdünnte Lösung von Mercuriacetat bei Gegenwart von viel Natriumacetat quantitativ als weißer Niederschlag ausgefällt wird.

Man fällt den Harn, welcher mit Phosphorwolframsäure, basischem Bleiacetat und Silberacetat gereinigt ist, mit einer etwa 30proz. Natriumacetatlösung, welche 0,5proz. Mercuriacetat enthält (*Wiechowski*'s Reagens\*) aus und zerlegt den ausgewaschenen Niederschlag mit Schwefelwasserstoff. Nach Eindampfen der von Schwefelquecksilber abfiltrierten Flüssigkeit krystallisiert Allantoin aus, und zwar rein, wenn es sich um Tierharn handelt. In betreff aller Einzelheiten des umständlichen Verfahrens, welches bei Menschenharn wegen seines geringen Allantoingehaltes noch besondere Modifikation erfordert, muß auf die Beschreibung von *Wiechowski*<sup>10)</sup> verwiesen werden. Kleine Abänderungsvorschläge sind von *Pohl*<sup>11)</sup> und von *Givens*<sup>12)</sup> gemacht worden.

Über die Darstellung aus Blut siehe § 644.

Das Allantoin krystallisiert in glänzenden, durchsichtigen, kleinen Prismen, ist geruch- und geschmacklos und ohne Reaktion auf Lackmus, in 160 Tl. kaltem Wasser, viel leichter in heißem Wasser löslich, unlöslich in kaltem, absolutem Alkohol oder Äther, in heißem Alkohol ziemlich löslich. Nach *Poduschka* ist es in Alkohol nicht unlöslich, und in Wasser von Zimmertemperatur nur zu 0,1% löslich; in kohlen-sauren Alkalien löst es sich leichter, leicht in Laugen. Beim Erhitzen bräunt es sich oberhalb 220° und schmilzt unter Zersetzung und Gasentwicklung bei 234°. Es verbindet sich mit Metallen. Durch ammoniakalische Silberlösung wird es aus seinen konzentrierten Lösungen

\*) Zu seiner Herstellung löst man käufliches Mercuriacetat (*Merck*) zu 1% in Wasser, trägt bis zur Sättigung reines Natriumacetat ein und verdünnt mit so viel Wasser, daß der Gehalt an Mercuriacetat 0,5% beträgt.

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 13, S. 202. 1889.

<sup>2)</sup> Arch. f. Anat. u. Physiol. 1865, S. 185.

<sup>3)</sup> Schulze u. Barbieri: Journ. f. prakt. Chem. N. F. Bd. 25, S. 145. 1882.

<sup>4)</sup> Schulze u. Bosshard: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 9, S. 420. 1885.

<sup>5)</sup> Richardson u. Crampton: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 19, 1, S. 1180. 1886.

<sup>6)</sup> v. Lippmann: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 29, 3, S. 2645. 1896.

<sup>7)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 41, S. 343. 1904.

<sup>8)</sup> Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 83, S. 62. 1876.

<sup>9)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 28, S. 369; ref. Chem. Zentralbl. 1917, I, S. 1115.

<sup>10)</sup> Analyse des Harns. Wiesbaden 1913, S. 1076.

<sup>11)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 78, S. 200. 1917.

<sup>12)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 18, S. 417. 1914.

gefällt, löst sich aber in überschüssigem Ammoniak wieder auf. Die niederfallenden weißen Flocken bestehen aus Allantoin Silber  $C_4H_5AgN_4O_3$ , beim Stehen wandeln sich dieselben in Körner um; trocknet man sie bei  $100^\circ$ , so tritt leicht Reduktion von Silber ein. Auch Blei- und Kupferverbindungen des Allantoin sind leicht zu erhalten. Durch Mercurinitrat wird Allantoin gleichfalls gefällt, ebenso durch eine mit Natriumacetat neutralisierte oder schwach alkalisch gemachte Lösung von Mercuriacetat (s. oben), aber weder durch Kupfersulfat und Natriumbisulfit noch durch Bleiacetate. Durch Phosphorwolframsäure wird seine salzsaure Lösung nicht gefällt. Fehlingsche Lösung wird bei längerem Kochen reduziert. Kohle adsorbiert Allantoin in beträchtlichen Mengen in wässriger Lösung (Ascher<sup>1</sup>).

Verhalten zu Fällungsmitteln.

Verhalten zur Fehlingschen Lösung.

Es ist inaktiv (Mendel und Dakin<sup>2</sup>).

Zersetzungen.

Es zersetzt sich allmählich in wässriger Lösung, schneller beim Erhitzen und bei alkalischer Reaktion (Wiechowski<sup>3</sup>), Givens<sup>4</sup>), auch in alkalischem Harn (Salkowski<sup>5</sup>). Durch Erhitzen mit konzentrierter Schwefelsäure wird Allantoin in Ammoniak, Kohlensäure und Kohlenoxyd, durch Kochen mit Barytwasser in Kohlensäure, Ammoniak, Oxalsäure und Hydantoin, durch konzentrierte Alkalilauge in Ammoniak, Kohlensäure, Essigsäure und Oxalsäure, durch kochende Salpetersäure in Harnstoff und Allantursäure verwandelt. Durch unterbromigsaures Natron wird die Hälfte des Stickstoffgehaltes in Freiheit gesetzt (Malerba<sup>6</sup>).

Nachweis.

Zum Nachweis ist das Allantoin zu isolieren und der Schmelzpunkt festzustellen, der auch beim Mischen mit reiner Substanz sich nicht ändern darf. Zu seiner Identifizierung dient weiter das Verhalten der Lösung der Krystalle zu ammoniakalischer Silberlösung und die Analyse der Silberverbindung. Das gut ausgewaschene und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknete Allantoin Silber gibt beim Glühen 40,73% Ag. Zur Bestätigung können folgende Reaktionen, welche aber keinen entscheidenden Wert haben, dienen:

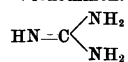
1. Schiffsche Reaktion, welche weniger stark und langsamer auftritt wie beim Harnstoff (S. 153).

2. Reaktion von Adamkiewicz. Violettfärbung, welche bei Zufügen von konzentrierter Schwefelsäure zu einer mit einer Spur Pepton versetzten Allantoinlösung auftritt. Das Allantoin wirkt hier wie Glyoxylsäure. Die Färbung tritt erst allmählich ein. Harnsäure, Kreatin, Kreatinin verhalten sich ganz ähnlich (Wiechowski<sup>7</sup>).

3. Reaktion von Salkowski. Man kocht eine kleine Menge der Krystalle im Reagensglas etwa 1—2 Minuten mit etwa 15proz. Natronlauge, säuert nach dem Erkalten mit Essigsäure an und prüft mit Calciumchlorid auf Oxalsäure. Harnsäure verhält sich ebenso<sup>8</sup>).

4. Reaktion von Barrenscheen und Weltmann s. bei Harnstoff (S. 153).

Vorkommen.



128. Guanidin  $CH_5N_3$ , welches zuerst durch Oxydation des Guanins (Strecker) erhalten wurde, entsteht auch bei der Oxydation des Arginins mit Bariumpermanganat (Benech und Kutscher<sup>9</sup>). Lossen<sup>10</sup>) erhielt es in geringer Menge bei der Oxydation von Hühnereiweiß mit Kaliumpermanganat. Es wurde

<sup>1</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 26, S. 370. 1910.

<sup>2</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 7, S. 153. 1909/10.

<sup>3</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 25, S. 431. 1910.

<sup>4</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 18, S. 417. 1914.

<sup>5</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 42, S. 213. 1904.

<sup>6</sup>) Gazz. chim. Bd. 15, S. 531. 1885.

<sup>7</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 25, S. 431. 1910.    <sup>8</sup>) desgl. Bd. 25, S. 456. 1910.

<sup>9</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 32, S. 278 u. 413. 1901.

<sup>10</sup>) Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 201, S. 369. 1880.

ferner bei der Oxydation von Leim (Kutscher und Zickgraf<sup>1)</sup>, von Pseudomucin und Casein (Otori<sup>2)</sup>, von Thymusnucleinsäure (Kutscher und Schenk<sup>3)</sup> mit Calciumpermanganat erhalten und unter den Produkten der hydrolytischen Zersetzung (mit Schwefelsäure) des Pseudomucins und wohl auch anderer Proteine (Otori<sup>4)</sup> und unter den Produkten der Pankreasselbstverdauung (Kutscher und Otori<sup>5)</sup> nachgewiesen. Rießer und Rona<sup>6)</sup> erhielten es bei der Spaltung von Hippomelanin mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. S. dazu Adler - Herzmark<sup>7)</sup>.

E. Schulze<sup>8)</sup> fand es in Wickenkeimlingen, v. Lippmann<sup>9)</sup> in Rübensäften.

Für die Darstellung größerer Mengen von Guanidin (als Sulfat) geht man aus von Cyanamid-Darstellung. calcium über Dicyandiamid (Levene und Senior<sup>10)</sup> oder wohl noch besser (als Carbonat) von Ammoniumthiocyanat (Sharpe<sup>11)</sup>.

Es bildet in Wasser und Alkohol leichtlösliche Krystalle von stark alkalischer Reaktion, zieht an der Luft Kohlensäure an und bildet ein schön krystallisierendes Carbonat (CH<sub>5</sub>N<sub>3</sub>)<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, auch mit anderen Säuren gut krystallisierende Verbindungen. Pikrat CH<sub>5</sub>N<sub>3</sub> · C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub> zersetzt sich unter Aufschäumen beim langsamen Erhitzen bei 311—315° (Kutscher und Otori<sup>12)</sup>. Es ist in Wasser (1 : 2630), Alkohol und Äther schwerlöslich und eignet sich deshalb und auch wegen seiner charakteristischen Krystallform (hakenförmige oder gezähnte durch fortgesetzte Zwillingbildung zustande kommende Platten) zur Isolierung und Erkennung des Guanidins (Emich<sup>13)</sup>. Indessen verhindern manche Beimengungen, z. B. Arginin, die Fällung durch Pikrinsäure oder pikrinsaures Natron (Kutscher und Otori). Pikrolonat scheidet sich aus konzentrierten wässrigen Lösungen von Guanidincarbonat auf Zusatz von alkoholischer Pikrolonsäurelösung ab, löst sich aber in überschüssigem Alkohol auf (Unterschied von Histidin- und Argininpikrolonaten, die in Alkohol schwerlöslich sind). Wässrige Pikrolonsäurelösung ruft noch in sehr verdünnten wässrigen Guanidincarbonatlösungen Fällung hervor, die sich aus heißem Wasser in aus feinen Nadeln zusammengesetzten Drusen abscheidet, CH<sub>5</sub>N<sub>3</sub> · C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>. Zersetzungspunkt unter Aufschäumen 272—274° (Schenk<sup>14)</sup>. Diese Verbindung ist wegen der Schwerlöslichkeit in kaltem Wasser ebenfalls für die Isolierung sehr geeignet. Guanidinimidazoldicarbonat in Wasser zu 0,49% lösliche, in Alkohol unlösliche Nadeln. Fp. 241—242° (Pauly und Ludwig<sup>15)</sup>. Guanidincadmiumchlorid CH<sub>5</sub>N<sub>3</sub> · HCl · 2 CdCl<sub>2</sub> scheidet sich beim Versetzen einer konzentrierten alkoholischen Guanidinchloridlösung mit kaltgesättigter alkoholischer Cadmiumchloridlösung ab, in kaltem Alkohol fast unlöslich, in heißem und ebenso in kaltem Methylalkohol ziemlich leichtlöslich (Schenk<sup>16)</sup>. Guanidinsilber CH<sub>5</sub>N<sub>3</sub> · Ag<sub>2</sub>O, dem Argininsilber sehr ähnlich, fällt wie dieses aus einer Lösung, welche Guanidincarbonat und Silbernitrat enthält, durch Barytwasser, in Säure und Ammoniak löslich, in Wasser kaum löslich (Kutscher und Otori<sup>17)</sup>. Benzolsulfoguanidin

Eigenschaften.  
Verbindungen:  
mit Kohlensäure

mit Pikrinsäure

mit Pikrolonsäure

mit Imidazol-  
dicarbonsäure  
mit Cadmiumchlorid

mit Silber

mit Benzolsulfosäure

<sup>1)</sup> Sitzungsber. d. preuß. Akad. d. Wiss. Bd. 28, S. 624. 1903. — Zickgraf: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 41, S. 259. 1904.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 43, S. 86. 1905. <sup>3)</sup> desgl. Bd. 44, S. 309. 1905.

<sup>4)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 42, S. 453. 1904. <sup>5)</sup> desgl. Bd. 43, S. 93. 1905.

<sup>6)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 61, S. 12. 1909.

<sup>7)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 49, S. 130. 1913.

<sup>8)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 17, S. 193. 1893.

<sup>9)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 29, S. 2645. 1896.

<sup>10)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 25, S. 623. 1916.

<sup>11)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 28, S. 399; ref. Chem. Zentralbl. 1917, I, S. 1084.

<sup>12)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 43, S. 98. 1905.

<sup>13)</sup> Monatshefte f. Chem. Bd. 12, S. 23. 1891.

<sup>14)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 44, S. 427. 1905. <sup>15)</sup> desgl. Bd. 121, S. 165. 1922.

<sup>16)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 43, S. 72. 1905. <sup>17)</sup> desgl. Bd. 43, S. 102. 1905.

$\text{CH}_4\text{N}_3 \cdot \text{SO}_2\text{C}_6\text{H}_5$ , weiße Nadeln (Fp.  $212^\circ$ ), in Wasser bei Zimmertemperatur löslich wie 0,02 : 100. Erwärmt man 3 g Guanidincarbonat mit 30 ccm Wasser, 6 ccm 33proz. Natronlauge und 4 ccm Benzolsulfochlorid unter Schütteln, so scheidet es sich beim Abkühlen aus und kann aus kochendem Wasser und kochendem Alkohol umkrystallisiert werden. Arginin gibt bei gleicher Behandlung keine schwerlösliche Verbindung (Ackermann<sup>1</sup>).

mit Phosphorwolframsäure. Durch Phosphorwolframsäure wird Guanidin gefällt (doch unter Umständen nur unvollständig). Der Niederschlag löst sich bei 1stündigem Schütteln zu etwa 23% in Acetonwasser (4 Tl. Aceton, 3 Tl. Wasser) (Wechsler<sup>2</sup>). Auch Neßlers Reagens fällt alle Guanidinsalze, neutrales und basisches Bleiacetat fallen nicht. Guanidin wird auch gefällt durch Dinitronaphtholsulfosäure (1-Naphthol-2,3-dinitro-7-Sulfosäure). Der Niederschlag (molekulare Verbindung) löst sich zu 0,25 % und ist weniger löslich als die entsprechende Lysinverbindung, löslicher als die entsprechende Histidin- und Argininverbindung (Kossel und Gross<sup>3</sup>).

Zersetzungen. Beim Kochen mit Barytwasser zerfällt es in Ammoniak und Harnstoff. Es reagiert nicht nach v. Slyke mit salpetriger Säure<sup>4</sup>), gibt mit Natriumhypobromit  $\frac{2}{3}$  seines Stickstoffs ab (Dehn<sup>5</sup>). Bei der Fäulnis entsteht Harnstoff (Ackermann<sup>6</sup>).

Vorkommen. 129. **Kreatin**  $\text{C}_4\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2$  findet sich in wohl allen Organen der Wirbeltiere (quergestreiften und glatten Muskeln, Hoden, Gehirn, Leber, Niere, Pankreas, Milz, Thyreoidea, Thymus, Blut), und zwar am meisten in den willkürlichen Muskeln (im Mittel 0,4—0,5% bei Säugetieren), am wenigsten im Blut (etwa 0,002% bei Säugetieren, 0,003—0,008% bei Menschen), auch in Transsudaten, Amniosflüssigkeit und auch häufig im Harn. Auch in den Muskeln vieler Wirbelloser ist es gefunden, nicht im Muskel der Crustaceen<sup>7</sup>), auch nicht im Krabbenextrakt und im Maikäferextrakt<sup>8</sup>).

Synthese. Synthetisch entsteht es nach Volhard<sup>9</sup>) durch direkte Vereinigung von Sarkosin und Cyanamid.

Darstellung. Für die Darstellung benutzt man am besten Fleischextrakt und verfährt nach Steudel<sup>10</sup>) so: 1 kg wird am Rückflußkühler mit 2 l absolutem Alkohol im Wasserbad einige Zeit gekocht und nach Abgießen der Lösung die Extraktion noch 2 mal mit je 1 l Alkohol wiederholt. Das nach Abdestillieren der vereinigten Auszüge zum dünnen Sirup auskrystallisierende Kreatin wird aus Wasser mit Tierkohle umkrystallisiert. Ausbeute 25—30 g.

Isolierung. Um es aus Organen, z. B. Muskeln, zu erhalten, extrahiert man das fein zerhackte Organ wiederholt mit Wasser, entfernt aus den vereinigten Auszügen durch Kochen die Eiweißstoffe, fällt das Filtrat mit Bleiessig unter Vermeidung eines Überschusses, filtriert, fällt aus dem Filtrate durch Schwefelwasserstoff das Blei, filtriert wieder und dampft bei mäßiger Temperatur auf ein kleines Volumen ein. Man läßt dann die Lösung eine Woche an einem kühlen Orte stehen, filtriert die ausgeschiedenen Krystalle ab und wäscht sie mit etwas 88proz. Alkohol.

Eigenschaften. Das Kreatin krystallisiert aus seinen Lösungen in durchsichtigen, farblosen, harten, rhombischen Prismen mit 1 Mol. Wasser; bei  $100^\circ$  getrocknet,

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 47, S. 366. 1906. <sup>2</sup>) desgl. Bd. 73, S. 138. 1911.

<sup>3</sup>) Ref. Chem. Zentralbl. 1923, III, S. 1151.

<sup>4</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 43, 3, S. 3170. 1910.

<sup>5</sup>) Journ. of the Americ. chem. soc. Bd. 31, S. 1220; ref. Chem. Zentralbl. 1910, I, S. 248.

<sup>6</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 60, S. 482. 1909.

<sup>7</sup>) Sharpe: Journ. of physiol. Bd. 51, S. 159; ref. Chem. Zentralbl. 1917, II, S. 692.

<sup>8</sup>) Ackermann, Zeitschr. f. Biolog. Bd. 71, S. 193. 1920.

<sup>9</sup>) Sitzungsber. d. bayer. Akad. 1868, H. 3, S. 472.

<sup>10</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 112, S. 53. 1921.

auch schon auf dem Wasserbade, werden die Krystalle weiß unter Verlust des Krystallwassers. Es besitzt einen bitteren, kratzenden Geschmack, löst sich in 74 Teilen kaltem, viel leichter in heißem Wasser, fast gar nicht in Alkohol, ist unlöslich in Äther. In einem Gemisch gleicher Teile Pyridin und Wasser löst es sich zu 16% bei 20—25° (Dehn<sup>1</sup>). Die Lösungen reagieren neutral. Mit der äquivalenten Menge einer Säure in wässriger Lösung versetzt und im Vakuum über Schwefelsäure verdunstet liefert es Salzverbindungen, die sehr unbeständig sind und sauer reagieren. Durch Mercurinitrat wird es in Flocken gefällt, aus konzentrierter Lösung erhält man durch Chlorzink allmählich harte, warzige Krystalle, besonders nach Zusatz von Alkohol, auch mit Chlorcadmium gibt es eine entsprechende, aber sehr lösliche Verbindung. Durch Phosphorwolframsäure und Bleiessig wird es nicht gefällt. Beim Zusammenschmelzen mit Benzoesäure oder Phthalsäureanhydrid entsteht Benzoylkreatin oder Phthalyldikreatin (Uran<sup>2</sup>), durch Essigsäureanhydrid Diacetylkreatin (Erlenmeyer<sup>3</sup>). Beim Erhitzen seiner wässrigen Lösung mit Formaldehyd entsteht Dioxymethylenkreatinin (Jaffe<sup>4</sup>).

Verbindungen mit  
Benzoesäure,  
Phthalsäure,  
Essigsäure.

Mit Säure erhitzt geht es in Kreatinin über. Über die Bedingungen, unter denen diese Umwandlung vollständig erfolgt, liegen Untersuchungen von Jaffe<sup>5</sup>, Dorner<sup>6</sup>, Folin<sup>7</sup>) u. a. vor. Nach Hahn und Barkan<sup>8</sup>) ist sie vollständig bei 24 stündigem Stehen einer 0,06—1,5proz. Lösung von Kreatin in n-HCl bei 60—65°. Im Harn verläuft die Reaktion ebenso wie in einer rein wässrigen Lösung (Hahn und Barkan). Bei alkalischer Reaktion (n—<sup>n</sup>/<sub>10</sub>-NaOH) geht ein Teil des Kreatin in Kreatinin über und es kommt zu einem Gleichgewichtszustand, der sich tagelang hält, dann aber ganz allmählich durch eine Zersetzung des Kreatinins gestört wird (Hahn und Barkan<sup>9</sup>). Auch beim Erhitzen von Kreatin in neutraler wässriger Lösung stellt sich ein solches Gleichgewicht zwischen Kreatin und Kreatinin her (Hahn und Barkan<sup>10</sup>).

Umwandlung in  
Kreatinin.

Beim Erhitzen über 100° wird es leicht zersetzt. Mit Quecksilberoxyd in wässriger Lösung gekocht gibt es unter Abscheidung von metallischem Quecksilber oxalsaures Methylguanidin. Methylguanidin, Formaldehyd, Ameisensäure, Kohlensäure und reichliche Mengen von Glyoxylsäure entstehen auch bei der Einwirkung von Wasserstoffhyperoxyd und einer Spur Ferrosulfat (Dakin<sup>11</sup>). In einer Lösung von Mercuriacetat wird Kreatin in einigen Tagen bei Zimmertemperatur zu  $\alpha$ -Methylguanidoglyoxylsäure (Baumann und Ingvaldsen<sup>12</sup>) oxydiert, weiter entstehen dabei Methylguanidin und Oxalsäure (Greenwald<sup>13</sup>). Beim Erhitzen von Kreatin mit Natronkalk erhält man Methylamin. Mit Barytwasser gekocht liefert es Methylhydantoin, Sarkosin, Harnstoff, Ammoniak und CO<sub>2</sub>.

Zersetzungen.

Zum Nachweis ist die Darstellung der Krystalle erforderlich. Man prüft, ob sie beim Trocknen auf dem Wasserbade weiß und undurchsichtig werden.

Nachweis.

<sup>1</sup>) Journ. of the Americ. chem. soc. Bd. 39, S. 1399; ref. Chem. Zentralbl. 1918, I, S. 49.

<sup>2</sup>) Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 9, S. 183. 1907.

<sup>3</sup>) Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 284, S. 49. 1905.

<sup>4</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 35, 3, S. 2896. 1902.

<sup>5</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 48, S. 435. 1906.

<sup>6</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 52, S. 229. 1907.

<sup>7</sup>) Hammarsten-Festschrift Nr. III. 1906. Journ. of biol. chem. Bd. 8, S. 399. 1910/11 u. Bd. 17, S. 466. 1914.

<sup>8</sup>) Zeitschr. f. Biol. Bd. 72, S. 305. 1920.

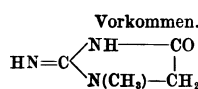
<sup>9</sup>) desgl. Bd. 72, S. 25. 1920.

<sup>10</sup>) Zeitschr. f. Biol. Bd. 72, S. 308. 1920.

<sup>11</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 1, S. 271. 1906. <sup>12</sup>) desgl. Bd. 35, S. 277. 1918.

<sup>13</sup>) Journ. of the Americ. chem. soc. Bd. 41, S. 1109; ref. Chem. Zentralbl. 1919, III, S. 781.

Die Fällbarkeit der Lösung durch Mercurinitrat, Reduktion von Quecksilberoxyd beim Kochen sind weitere, allerdings mangelhafte Reaktionen. Am besten kocht man die Lösung mit verdünnter Schwefelsäure und stellt mit der neutralisierten Lösung die Kreatininreaktionen an (s. folgenden Paragraphen).



130. **Kreatinin**  $\text{C}_4\text{H}_7\text{N}_3\text{O}$ . Das Kreatinin ist mit Sicherheit als konstanter Bestandteil des Harns von Menschen und einigen Säugetieren nachgewiesen. In kleinen Mengen findet es sich auch in den Muskeln neben Kreatin; auch in Blut, Leber, Schweiß, Milch, Eigelb ist es in geringer Menge vorhanden. Auch in Pflanzen ist es gefunden und im Boden.

Die Angaben von G. S. Johnson<sup>1)</sup>, daß das aus dem Harn dargestellte Kreatinin von dem Muskelkreatinin verschieden sei, haben sich nicht bestätigt (Toppelius und Pommerehne<sup>2)</sup>, Wörner<sup>3)</sup>. Ebenso ist die Angabe von Thesen<sup>4)</sup>, daß das aus dem Fleisch von Dorschen gewonnene Kreatinin (sog. Isokreatinin) in mehreren Punkten (gelbe Farbe usw.) von dem typischen abweiche, durch Poulsson<sup>5)</sup> und Korndörfer<sup>6)</sup> widerlegt worden.

**Darstellung:** Man kann es aus Kreatin erhalten, indem man dieses mit n-Schwefelsäure etwa 40 Stunden auf dem Wasserbad erhitzt, durch Bariumcarbonat neutralisiert, filtriert, auf dem Wasserbad zur Trockne verdunstet und den Rückstand mit Alkohol extrahiert. Aus dem Alkoholauszug krystallisiert beim Verdunsten Kreatinin. S. auch die Angaben bei Kreatin (S. 159).

**aus Harn.** Das beste Ausgangsmaterial für die Darstellung ist Menschenharn. Statt der älteren Methoden von Maly<sup>7)</sup> (Fällung mit Sublimat) und von Hofmeister<sup>8)</sup> (Fällung mit Phosphorwolframsäure) empfehlen sich die Methoden von Folin<sup>9)</sup> und von Benedict<sup>10)</sup>, von denen die letztere die bessere Ausbeute geben soll und hier beschrieben wird.

Man füge zu 10l frischem Harn unter starkem Umrühren eine Lösung von 180 g Pikrinsäure in 450 ccm heißen Alkohol, hebere am nächsten Tage die überstehende Flüssigkeit ab, bringe den Rückstand auf eine Nutsche, wasche 1- oder 2 mal mit kaltgesättigter Pikrinsäurelösung und sauge trocken. Der trockene oder nahezu trockene Rückstand wird in Mörser oder Schale mit konzentrierter Salzsäure übergossen (auf je 100 g Pikrat etwa 60 ccm) und 3—5 Minuten gründlich durchgerührt, so daß eine mäßig dünne Paste entsteht, dann auf gehärtetem Filter abgesaugt, 2 mal mit Wasser bedeckt und jedesmal möglichst trocken gesaugt. Das Filtrat wird in einem großen Kolben unter der Wasserleitung mit einem Überschuß von Magnesiumoxyd in kleinen Portionen neutralisiert (Lackmus), abgesaugt, der Rückstand 2 mal mit Wasser gewaschen, das Filtrat sofort mit einigen Kubikzentimetern Eisessig stark sauer gemacht (ohne Rücksicht auf auftretenden Niederschlag), mit etwa 4 Vol. 95proz. Alkohol verdünnt und nach etwas mehr als  $\frac{1}{4}$  Stunde abgesaugt. Zu diesem Filtrat fügt man 30—40 ccm 30proz. Zinkchloridlösung, rührt um und läßt über Nacht an einem kühlen Orte stehen. Nach Abgießen der überstehenden Flüssigkeit saugt man den Niederschlag ab, wäscht 1 mal mit Wasser, gründlich mit 50proz., schließlich mit 95proz. Alkohol und trocknet. Ausbeute gewöhnlich 15—18 g.

<sup>1)</sup> Proc. of the roy. soc. of London Bd. 43, S. 493. 1888; Bd. 50, S. 287. 1891. Chem. News Bd. 55, S. 304. 1887.

<sup>2)</sup> Arch. d. Pharmazie Bd. 234, S. 380. 1896.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 27, S. 1. 1899. <sup>4)</sup> desgl. Bd. 24, S. 1. 1898.

<sup>5)</sup> Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 51, S. 227. 1904.

<sup>6)</sup> Arch. d. Pharmazie Bd. 242, S. 373. 1904.

<sup>7)</sup> Liebig's Ann. d. Chem. Bd. 159, S. 279. 1871.

<sup>8)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 5, S. 67. 1881.

<sup>9)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 17, S. 463. 1914. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 41, S. 235. 1904.

<sup>10)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 18, S. 183. 1914.

Zum Umkrystallisieren bringt man 10 g mit 100 ccm Wasser und etwa 60 ccm n-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> zusammen, kocht bis zur klaren Lösung, fügt etwa 4 g reine Tierkohle hinzu, kocht noch 1 Minute und saugt durch eine kleine Nutsche ab, unter Zurückgießen des Filtrats, bis es farblos ist. Der Rückstand wird mit heißem Wasser gewaschen und das noch heiße Gesamtfiltrat in einem Becherglas mit 3 ccm einer starken Zinkchloridlösung und etwa 7 g Kaliumacetat (in wenig Wasser gelöst) versetzt. Nach etwa 10 Minuten fügt man das gleiche Volumen Alkohol hinzu, läßt einige Stunden am kühlen Orte stehen und filtriert die ausgeschiedenen Krystalle ab. Zur Entfernung von etwas beigemengtem Kaliumsulfat verrührt man das Kreatininchlorzink mit seinem doppelten Gewicht Wasser, filtriert, wäscht mit wenig Wasser und dann mit Alkohol. Man erhält so aus 10 g 8,5—9 g eines reinen weißen Präparates.

Um aus ihm Kreatinin zu gewinnen, wird es fein gepulvert in einem trockenen Kolben mit der 7fachen Menge konzentrierter wässriger Ammoniakflüssigkeit übergossen und durch gelindes Erwärmen und sanftes Schütteln (damit nicht zuviel Ammoniak entweicht) in Lösung gebracht. In dem verschlossenen Kolben krystallisiert im Eisschrank reines Kreatinin aus. Ausbeute 60—80% der theoretischen. Ist es noch gelblich gefärbt, so krystallisiert man es um, entweder aus kochendem Alkohol oder aus der 5fachen Menge konzentriertem Ammoniak, in dem es unter gelindem Erwärmen gelöst worden ist.

Das Kreatinin scheidet sich aus heißgesättigten Lösungen in farblosen, glänzenden, wasserfreien Prismen (monoklinoedrisch) von stark ätzendem Geschmacke ab; aus kaltgesättigten Lösungen krystallisiert es sehr häufig in großen Tafeln oder Prismen mit 2 Mol. Krystallwasser, die sehr leicht verwitern (Wörner). Im Vakuumexsiccator über Schwefelsäure wird es vollkommen wasserfrei. Es reagiert sehr schwach alkalisch oder neutral (Salkowski<sup>1</sup>), ist nicht flüchtig und löst sich in 11,5 Tl. kaltem, sehr leicht in heißem Wasser, in 625 Tl. absolutem Alkohol, leichter in heißem, sehr wenig in Äther. Phosphorwolframsäure (sowohl 2,5- als 25proz.) fällt noch bei Verdünnung 1 : 25 000, (Demjanowski<sup>2</sup>), Sublimat noch bei Verdünnung 1 : 3000 (Hofmeister<sup>3</sup>), Demjanowski), andere Mercurisalze fallen nicht (Demjanowski). Über die Löslichkeit des Phosphorwolframate in Aceton s. Wechsler<sup>4</sup>). Silbernitrat fällt aus nicht zu verdünnter Lösung. Der aus feinen Nadeln bestehende Niederschlag (C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>N<sub>3</sub>O · AgNO<sub>3</sub>) löst sich in heißem Wasser und scheidet sich beim Erkalten wieder aus (Smorodinzew<sup>5</sup>). Durch kolloidales Ferrihydroxyd, das zur Enteiweißung dient, wird Kreatinin nicht gefällt (Rona<sup>6</sup>).

Es verhält sich wie ein kräftiges Alkali, treibt Ammoniak aus seinen Verbindungen aus, bildet mit Säuren sauer reagierende, gut krystallisierende Salze. Salzsaures Kreatinin C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>N<sub>3</sub>O · HCl, durch Abdampfen von Kreatinin mit Salzsäure auf dem Wasserbade erhalten, bildet in Wasser leicht lösliche, durchsichtige Prismen oder rhombische Tafeln. Die beim Verdunsten kaltgesättigter wässriger Lösungen sich ausscheidenden Krystalle enthalten 1 Mol. Wasser. Die Lösung dieses Salzes wird durch Chlorzink nicht gefällt, wohl aber nach Zusatz von essigsauerm Natron im Überschusse. Salzsaures Kreatinin-Platinchlorid (C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>N<sub>3</sub>O · HCl)<sub>2</sub> · PtCl<sub>4</sub> bildet in Wasser leicht- (1 : 36), in Alkohol schwerer lösliche orangerote Prismen und Nadeln. Aus wässriger Lösung krystallisiert es mit 2 Mol. Krystallwasser, aus alkoholischer wasserfrei. Salzsaures Kreatinin-Goldchlorid C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>N<sub>3</sub>O · HCl · AuCl<sub>3</sub> ist in Wasser oder Alkohol

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 12, S. 211. 1888.

<sup>2</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 80, S. 212. 1912.

<sup>3</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 5, S. 67. 1881. <sup>4</sup>) desgl. Bd. 73, S. 138. 1911.

<sup>5</sup>) Chem. Zentralbl. 1916, II, S. 21.

<sup>6</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 27, S. 348. 1910.

- leicht löslich, in Äther unlöslich und scheidet sich in schönen, goldgelben Blättchen ab, wenn man bei 40—50° in möglichst wenig Wasser gelöstes salzsaures Kreatinin mit wenig mehr als der berechneten Menge Goldchlorid versetzt.
- mit Pikrinsäure Schmelzpunkt der bei 100° getrockneten Substanz bei 170—174°. Pikrinsaures Kreatinin  $C_4H_7N_3O \cdot C_6H_3N_3O_7$  scheidet sich in Form langer, gelber Nadeln aus, die in Wasser ziemlich schwerlöslich sind, wenn wässrige Kreatininlösung mit wässriger Pikrinsäure versetzt wird (Jaffe<sup>1</sup>). Fp. 212—213°. Pikrinsaures Kreatinin-Kali  $C_4H_7N_3O \cdot C_6H_3N_3O_7 + C_6H_2N_3O_7K$  scheidet sich aus normalem menschlichen Harn auf Zusatz von Pikrinsäure als gelbe Nadeln und Prismen ab, in heißem Wasser leicht-, in kaltem schwerlöslich (Jaffe<sup>1</sup>).
- mit Kynurensäure Diese Verbindung dient zur Isolierung aus Harn. Kynurensaures Kreatinin scheidet sich in Büscheln von farblosen, dünnen Prismen ab, wenn man gepulverte Kynurensäure in einer heißen, verdünnten Lösung von Kreatinin auflöst. Sie sind in Wasser leichtlöslich und zersetzen sich beim Umkrystallisieren<sup>1</sup>). Kreatininsilber fällt aus Kreatininsalzlösungen auf Zusatz von Silbernitrat und Barytwasser sowie von Silbernitrat und Ammoniak aus (Kutscher<sup>2</sup>).
- mit Silber
- mit Zinkchlorid Kreatinin-Chlorzink  $(C_4H_7N_3O)_2 \cdot ZnCl_2$ , dessen Unlöslichkeit in Alkohol man bei der Isolierung des Kreatinins benutzt, wird erhalten, wenn man zu einer alkoholischen oder nicht allzu verdünnten wässrigen Lösung von Kreatinin säurefreie, konzentrierte Chlorzinklösung hinzutropft. Es entsteht entweder sofort ein sehr feinkörniger Niederschlag, oder es bilden sich bei größerer Verdünnung allmählich schöne Gruppen feiner Nadeln oder Prismen. Aus dem Harnextrakte erhält man diese Verbindung nach Zusatz von Chlorzink meist in warzigen Krusten an den Wandungen des Gefäßes, denen zahlreiche Büschel und Sterne von Nadeln beigemischt sind. In kaltem Wasser ist die Verbindung sehr wenig, in heißem Wasser leichter löslich, in Alkohol unlöslich, in Mineralsäuren leichtlöslich. Durch Kochen mit Bleioxydhydrat wird Zinkoxyd, Chlorblei und freies Kreatinin erhalten. Beim Zusammenschmelzen mit Benzoesäureanhydrid oder Phthalsäureanhydrid entstehen dieselben Produkte wie aus
- mit Benzoesäure u. Phthalsäure
- mit Formaldehyd. Kreatin bei gleicher Behandlung (§ 129, Ura no). Beim Erhitzen seiner wässrigen Lösung mit Formaldehyd entsteht Dioxymethylenkreatinin (Jaffe<sup>3</sup>).
- Umwandlung in Kreatin. In alkalischer Lösung ( $n-\frac{n}{10}NaOH$ ) nimmt Kreatinin ab, indem Kreatin entsteht. Es kommt zu einem Gleichgewichtszustand. Daneben findet Zersetzung des Kreatinins statt (Hahn und Barkan<sup>4</sup>). Kaltgesättigtes Barytwasser wandelt das Kreatinin teilweise in Kreatin um, dabei findet Ammoniakentwicklung statt (Folin<sup>5</sup>); durch konzentrierte Ammoniakflüssigkeit findet diese Umwandlung nicht statt (Benedict).
- Verhalten zu Fehlingscher Lösung. Bei anhaltendem Kochen mit Fehlingscher Lösung tritt allmählich Entfärbung ein, das Kupferoxyd wird reduziert, kann aber nur zur Ausscheidung kommen, wenn die Lösung längere Zeit auf 90—100° erhitzt wird. 1 Mol. Kreatinin reduziert bei  $\frac{1}{2}$ stündigem Kochen 4 Mol. Kupferoxyd<sup>6</sup>).
- Zersetzungen. Bei der trockenen Destillation von Kreatininchlorid entstehen Ammoniak und Dimethylamin (Engeland<sup>7</sup>). Durch Kochen mit Quecksilberoxyd oder mit Bleihyperoxyd und Schwefelsäure oder durch übermangansaures Kali wird es ebenso wie Kreatin unter Bildung von Methylguanidin zerlegt. Methylguanidin, Formaldehyd, Ameisensäure, Kohlensäure und reichliche Mengen von

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 10, S. 391. 1886.

<sup>2</sup>) Zeitschr. f. Untersuch. d. Nahrungs- u. Genußmittel Bd. 10, S. 528. 1905.

<sup>3</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 35, 3, S. 2896. 1902.

<sup>4</sup>) Zeitschr. f. Biol. Bd. 72, S. 25. 1920. <sup>5</sup>) Hammarsten-Festschrift No. III. 1906.

<sup>6</sup>) Worm - Müller: Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 27, S. 59. 1882. — Wörner: a. a. O.

<sup>7</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 57, S. 65. 1908.



Glyoxylsäure entstehen auch bei der Einwirkung von Wasserstoffsperoxyd und einer Spur von Ferrosulfat (Dakin). Methylguanidin entsteht ferner beim Zusammenbringen von Kreatininlösungen mit überschüssigem Silbernitrat und Bariumhydroxyd, und zwar bei 1stündigem Erhitzen im Wasserbad fast quantitativ (Ewins<sup>1</sup>).

Bei der Fäulnis erhielt Ackermann<sup>2</sup>) Methylhydantoin und Sarkosin. Zersetzung durch  
Bakterien. Erstere Verbindung entsteht auch schon in 0,75proz. steriler Sodalösung bei Bruttemperatur aus Kreatinin (Ellinger und Matsuoka<sup>3</sup>).

Zum Nachweis dienen folgende Reaktionen:

Nachweis.

1. Reaktion von Weyl<sup>4</sup>). Man versetzt die zu prüfende Lösung, z. B. Menschenharn, mit wenigen Tropfen einer sehr verdünnten wässrigen Lösung von Nitroprussidnatrium und fügt dann tropfenweise verdünnte Natronlauge hinzu. Ist Kreatinin vorhanden, so färbt sich die Flüssigkeit schön rubinrot, aber nur kurze Zeit, die Farbe geht dann in Gelb über\*). Weder Kreatin noch andere ähnliche Körper geben diese Reaktion, wohl aber Aceton, bei dessen Anwesenheit die rote Farbe auf Zusatz von Essigsäure in Purpur- bis Carminrot übergeht (§ 63). Dasselbe läßt sich auch vor Anstellung der Probe durch Kochen entfernen. In einer wässrigen Lösung gibt 0,287 pro Mille Kreatinin noch diese charakteristische Färbung, im Menschenharn gibt sie noch 0,66 pro Mille Kreatinin. Salkowski<sup>5</sup>) fand, daß die gelbgeordnete Flüssigkeit nach Zusatz von Eisessig und Erhitzen sich erst grünlich, dann blau färbt (Berlinerblau); Colasanti<sup>6</sup>) empfiehlt Ameisensäure statt Essigsäure. War die Reaktion nur durch Aceton bedingt, so bildet sich kein Berlinerblau.

2. Reaktion von Jaffe<sup>7</sup>). Man versetzt die zu prüfende Lösung, z. B. Harn, mit etwas wässriger Pikrinsäurelösung und einigen Tropfen verdünnter Natronlauge. Bei Anwesenheit von Kreatinin tritt sofort Rotfärbung (rot-orange bis dunkelblutrot) ein; dieselbe nimmt in den nächsten Minuten zu und bleibt stundenlang unverändert. Sie fällt noch positiv aus bei Verdünnung von 1 auf 5000 Tl. Nur noch das Aceton zeigt auf Zusatz der genannten Reagenzien in der Kälte eine schwach rötlichgelbe Färbung, die indes mit der viel intensiveren rein roten Färbung durch Kreatinin nicht verwechselt werden kann.

3. Reaktion von Maschke<sup>8</sup>). Sättigt man eine wässrige Lösung von Kreatinin mit Natriumcarbonat und fügt Fehlingsche Lösung hinzu, so entsteht bei gewöhnlicher Temperatur allmählich, schneller beim Erhitzen, weißliche Trübung, dann flockiger Niederschlag, während die blaue Färbung der Lösung abnimmt. Der weiße Niederschlag besteht aus Kreatininkuproxyd, ist leichtlöslich in Wasser, verdünnter Salzsäure, auch in Ammoniak, schwerlöslich in gesättigter Natriumcarbonatlösung. Eine Lösung, welche 0,01 g Kreatinin in 100 ccm enthält, gibt noch weiße Trübung. Kreatin gibt diese Reaktion nicht. Harnsäure gibt eine ähnliche Reaktion (S. 171).

\*) Kühlt man diese gelbe Flüssigkeit durch Eis, fügt Essigsäure bis zur neutralen oder schwach sauren Reaktion hinzu und rührt tüchtig um, so scheidet sich ein weißer krystallinischer Niederschlag von der Zusammensetzung eines Nitrosokreatinins ab. Krahm: Zentralbl. f. d. med. Wiss. 1897, S. 785.

<sup>1</sup>) Biochem. journ. Bd. 10, S. 103; Ref. Chem. Zentralbl. 1916, II, S. 1126.

<sup>2</sup>) Zeitschr. f. Biol. Bd. 62, S. 208. 1913 u. Bd. 63, S. 78. 1914.

<sup>3</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 89, S. 451. 1914.

<sup>4</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 11, 2, S. 2175. 1878.

<sup>5</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 4, S. 133. 1880 u. Bd. 9, S. 127. 1885.

<sup>6</sup>) Gazz. chim. ital. Bd. 17, S. 133. 1887.

<sup>7</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 10, S. 399. 1886.

<sup>8</sup>) Zeitschr. f. analyt. Chem. Bd. 17, S. 134. 1878.

## Pyrimidinderivate.



131. Von Derivaten des Pyrimidins  $\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_2$  sind aus tierischen Geweben erhalten worden Uracil, Thymin und Cytosin, deren Konstitution und Beziehungen zueinander sich aus folgenden Bezeichnungen ergeben:

Numerierung des Pyrimidins:

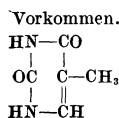


Uracil = 2, 6-Dioxyypyrimidin.  
 Thymin = 5-Methyluracil = 5-Methyl-2, 6-Dioxyypyrimidin.  
 Cytosin = 6-Amino-2-Oxyypyrimidin.

Sie sind im allgemeinen nicht im freien Zustande vorhanden, sondern entstehen bei der Spaltung vieler Nucleinsäuren durch Säuren, auch bei der Autolyse der Organe. Das Uracil scheint erst sekundär aus Cytosin gebildet zu werden.

Über Isolierung aus Thymonucleinsäure siehe § 276, aus autolysierten Organen § 724.

Sie haben eine Reihe gemeinsamer Eigenschaften. Sie sind alle in heißem Wasser leicht-, in kaltem schwerlöslich und zeigen das gleiche Verhalten gegen Silbernitrat und Ammoniak bzw. Barytwasser, d. h. sie werden aus ihrer silbernitratthaltigen Lösung durch Ammoniak und ebenso durch Barytwasser ausgefällt, und dieser Niederschlag ist in überschüssigem Ammoniak löslich, in überschüssigem Barytwasser unlöslich. Dieses Verhalten, in dem sie mit dem Histidin übereinstimmen, dient zu ihrer Abscheidung. Die Trennung von Uracil und Thymin von Cytosin kann dadurch geschehen, daß letzteres im Gegensatz zu den beiden ersteren durch Phosphorwolframsäure gefällt wird, die Trennung von Thymin und Uracil mit rauchender Salpetersäure in Form ihrer Nitroderivate (§ 132).



132. Thymin (5-Methyluracil)  $\text{C}_5\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_2$  wurde zuerst von Kossel und Neumann<sup>1)</sup> bei der hydrolytischen Spaltung der Nucleinsäure aus Thymus und Milz dargestellt und ist inzwischen aus den Nucleinsäuren wohl aller Organe gewonnen worden. Auch unter den Produkten, die bei der Autolyse der Organe auftreten, ließ es sich nachweisen.

Synthese.

Synthetisch gewannen es E. Fischer und Röder<sup>2)</sup>, indem sie aus Harnstoff und Methacrylsäure durch einstündiges Erhitzen auf 210–220° 5-Methylhydrouracil darstellten und dieses durch Erhitzen mit Brom in Eisessig auf 100° in 5-Methylbromhydrouracil überführten. Aus letzterem entsteht durch verdünnte Natronlauge Thymin. Die präparative Darstellung geschieht wohl am besten nach dem Verfahren von Wheeler und McFarland<sup>3)</sup>, welches ausgeht von der Kondensation von Thioharnstoff in alkoholischer Lösung mit Natrium- $\alpha$ -Formylpropionsäureester und Entschwefelung des gebildeten 2-Thiothymins mit Chloressigsäure.

Darstellung:  
aus Nucleinsäure.  
aus Heringstestikeln.

Über die Darstellung aus Thymonucleinsäure s. § 276. Um Thymin aus Heringstestikeln zu gewinnen, werden je 250 g, schon vorher zur Entfernung des Protamins mit Säure extrahiert, mit 20 proz. Schwefelsäure versetzt, so daß ein dicker Brei entsteht und dann im Autoklaven 2 Stunden auf 150° erhitzt. Nach Verdünnen mit dem gleichen Volumen Wasser wird filtriert, mit fein pulverisiertem Baryt bis zur schwach, aber deutlich alkalischen Reaktion versetzt, das Bariumsulfat abfiltriert, mit kochendem Wasser ausgewaschen und das Filtrat so mit Wasser verdünnt resp. eingeengt, daß das Volumen der Lösung für je 100 g trockener Testikel 500 ccm beträgt. Nachdem nun für eine kleine abgemessene Portion dieser Lösung nach schwachem Ansäuern mit Salpetersäure ermittelt ist, wieviel Kubikzentimeter einer 2 proz. Silbernitratlösung zugesetzt werden müssen, bis ein Tropfen der Flüssigkeit, in einen Überschuß von Barytlösung gebracht, keinen weißen, sondern einen gelben Niederschlag gibt, säuert man die ganze Menge mit Salpetersäure an und fügt zu je 500 ccm die berechnete Menge der 2 proz. Silbernitratlösung hinzu, filtriert ab, fügt

<sup>1)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 26, 3. S. 2753. 1893; Bd. 27, 2, S. 2217. 1894.

<sup>2)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 34, 3, S. 3751. 1901.

<sup>3)</sup> Americ. chem. journ. Bd. 43, S. 19 ref. Chem. Zentralbl. 1910, I, S. 1499.

Barytwasser bis zur schwach alkalischen Reaktion hinzu, wäscht den entstandenen Niederschlag durch Dekantieren mit kaltem Wasser und saugt ihn ab. Jede Portion des Niederschlags zersetzt man sofort mit Schwefelwasserstoff unter Druck, filtriert, vereinigt die Filtrate, dampft zur Krystallisation ein und krystallisiert unter Zusatz von Tierkohle um (Jones<sup>1</sup>).

Über die Isolierung aus autolysierten Organen § 724.

Thymin ist in kaltem Wasser schwer- (100 Tl. Wasser lösen bei 25° 0,404 Tl., Eigenschaften. Wheeler und Merriam<sup>2</sup>), in heißem leichtlöslich, in Alkohol weniger leicht. Aus heißem Wasser krystallisiert es in sternförmig oder dendritisch gruppierten kleinen Blättchen, selten auch in kurzen Nadeln. Über Krystallformen s. Gulewitsch<sup>3</sup>). Trocken bildet es ein fettig seidenglänzendes Filzwerk. Bei vorsichtigem Erhitzen sublimiert es, ohne zu schmelzen, bei raschem Erhitzen schmilzt das ganz reine Präparat bei 321° unter Gasentwicklung (E. Fischer und Roeder). Wheeler und McFarland geben 340° an. In heißer konzentrierter Kalilauge gelöst scheidet es sich beim Einengen als Thyminkalium Verbindungen:  $C_5H_5N_2O_2K$  aus, das aus Wasser mit 1 Mol.  $H_2O$  krystallisiert (Steudel<sup>4</sup>). mit K, Na  $C_5H_5N_2O_2Na$  und  $C_5H_5N_2O_2K + \frac{1}{2} H_2O$  scheiden sich auf Zusatz von Alkohol zu einer Lösung von Thymin und NaOH bzw. KOH in molekularen Mengen krystallinisch ab.  $C_5H_4N_2O_2Hg$  fällt aus einer Lösung von Thymin und NaOH mit Hg in molekularen Mengen auf Zusatz von Sublimat im Überschuß als krystallinischer Niederschlag aus.  $C_5H_4N_2O_2Pb + 2 H_2O$  (Myers<sup>5</sup>). Mit Salzsäure und Sal- mit Pb petersäure gibt es keine Verbindungen. Bromthymin  $C_5H_7N_2O_3Br$  kry- mit Halogenen stallisiert und ist in Wasser viel leichter löslich als Thymin (Jones<sup>6</sup>). Dichlorthymin  $C_5H_4N_2Cl_2$  bildet in Wasser fast unlösliche, in Alkohol, Äther leichtlösliche Krystalle (Steudel und Kossel<sup>7</sup>), Silbernitratlösung fällt Thymin nicht, aber nach vorsichtigem Zusatz von Ammoniak oder Barytwasser zu mit Ag. der Mischung entsteht ein in überschüssigem Ammoniak leicht löslicher, in überschüssigem Barytwasser unlöslicher, voluminöser Niederschlag. Dimethylthymin in Chloroform, Äther, Alkohol lösliche Nadeln, Fp. 153° (Steudel<sup>8</sup>).

Quecksilbernitrat erzeugt voluminöse Fällung, durch Phosphorwolframsäure Verhalten zu Fällungs- wird es nicht gefällt, kann aber unter Umständen mit in den Phosphorwolfram- mitteln. säureniederschlag hineingehen.

Durch Permanganat entsteht aus Thymin Harnstoff (Steudel<sup>9</sup>). In Umwandlungen. rauchender Salpetersäure (spez. Gew. 1,5) löst es sich schon in der Kälte Verhalten zu rauchender und geht beim Verdunsten bei gewöhnlicher Temperatur quantitativ in Oxy- Salpetersäure. nitrohydrothymin  $C_5H_7O_5N_3$  (Additionsprodukt von Thymin und  $HNO_3$ ) über. Es ist in heißem Wasser und sehr leicht in kaltem Alkohol löslich und scheidet sich aus beiden in charakteristischen Krystallen ab. Fp. 183—185° unter Aufschäumen. Durch Zinn und Salzsäure entsteht aus ihm wieder Thymin. Da Uracil durch rauchende Salpetersäure bei gewöhnlicher Temperatur in 5-Nitrouracil übergeht, welches in kaltem absoluten Alkohol nur sehr wenig löslich ist, so kann man Thymin und Uracil in Form dieser beiden Derivate trennen (Johnson<sup>10</sup>).

Zum Nachweis benutzt man sein charakteristisches Verhalten gegen Nachweis. Silbernitrat und Ammoniak, seine Sublimierbarkeit und seine Fähigkeit, Brom-

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 29, S. 461. 1900. — Ascoli: desgl. Bd. 31, S. 161, Anmerkg. 4. 1900/01.

<sup>2</sup>) Americ. chem. Journ. Bd. 29, S. 478. 1903.

<sup>3</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 27, S. 294. 1899. <sup>4</sup>) desgl. Bd. 30, S. 539. 1900.

<sup>5</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 7, S. 249. 1909/10.

<sup>6</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 29, S. 20. 1900. <sup>7</sup>) desgl. Bd. 29, S. 303. 1900.

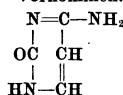
<sup>8</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 30, S. 539. 1900. <sup>9</sup>) desgl. Bd. 32, S. 241. 1901.

<sup>10</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 4, S. 407. 1908.

wasser zu entfärben. Eine Lösung von Thymin in Natronlauge färbt sich mit Diazobenzolsulfosäure rot (Steudel<sup>1</sup>), und zwar intensiver als Cytosin und Uracil (Johnson und Clapp<sup>2</sup>). Ferner folgende Reaktion:

Man gießt eine Lösung von Thymin (2—5 mg genügen) in heißem Wasser in eine große Menge 10proz. Natriumbicarbonatlösung, die sich in einem geräumigen Kolben befindet (für 2,6 g Thymin, in 100 ccm heißem Wasser gelöst, werden 2 Liter der Sodalösung und ein 5 Liter Kolben verwendet), fügt von einer frisch hergestellten 20proz. Lösung von Ferrosulfat in ausgekochtem Wasser den 4. Teil des Volumens der Sodalösung unter starkem Schütteln hinzu, schüttelt  $\frac{1}{2}$ — $\frac{3}{4}$  Stunde, gießt in einen Filtrierstutzen und läßt bis zum nächsten Tage stehen. Die von dem Bodensatz abgossene Flüssigkeit wird destilliert. Der Kolbenrückstand, welcher Brenztraubensäure enthält, gibt mit o-Nitrobenzaldehyd und Natronlauge Abscheidung von Indigo, der sich beim Schütteln mit Chloroform mit blauer Farbe löst. Die Anwesenheit von Uracil und Cytosin und, wie es scheint, auch Zucker stört nicht (Baudisch und Johnson<sup>3</sup>).

Vorkommen.



133. Cytosin (6-Amino-2-Oxypyrimidin)  $\text{C}_4\text{H}_5\text{N}_3\text{O}$  wurde zuerst von Kossel und Neumann<sup>4</sup>) bei der hydrolytischen Spaltung der Nucleinsäure aus Thymus erhalten. Die richtige Formel wurde von Kossel und Steudel<sup>5</sup>) festgestellt. Es ist seitdem aus den Nucleinsäuren der verschiedensten Organe, auch aus vegetabilischen Nucleinsäuren, isoliert. Es findet sich im Gehirn (Shimizu<sup>6</sup>) und im Boden.

Synthese.

Synthetisch gewinnt man es nach Wheeler und Johnson<sup>7</sup>), indem man durch Kondensation von Pseudoäthylthioharnstoffhydrobromid in alkalischer Lösung bei gewöhnlicher Temperatur mit Natriumformylessigester 2-Äthylmercapto-6-Oxypyrimidin bereitet und dieses über 2-Äthylmercapto-6-Chlorpyrimidin in 2-Äthylmercapto-6-Aminopyrimidin überführt, welches durch Kochen mit Bromwasserstoff (bromwasserstoffsäures) Cytosin gibt.

Darstellung:  
aus Nucleinsäure.  
aus Störtestikeln.

Über die Darstellung aus Thymonucleinsäure s. § 276.

Kossel und Steudel<sup>8</sup>) verfahren bei der Darstellung aus Störtestikeln in folgender Weise: Man kocht mit 20—30proz. Schwefelsäure 12 Stunden, macht mit Baryt alkalisch, erhitzt zur Entfernung des Ammoniaks auf dem Wasserbad, filtriert, macht mit Schwefelsäure schwach sauer, dampft ein und versetzt bei Gegenwart von 3—4% freier Schwefelsäure mit Mercurisulfat in kleinen Mengen, solange eine sofortige Entstehung eines Niederschlags zu beobachten ist. Erfolgt in einer abfiltrierten Probe die Fällung auf weiteren Zusatz erst nach einigen Sekunden, so saugt man den ganzen Niederschlag schnell ab, versetzt das Filtrat mit einem Überschuß von Quecksilbersulfat und läßt 2—3 Tage stehen. Der jetzt auftretende zweite das Cytosin enthaltende Niederschlag wird durch Schwefelwasserstoff zerlegt und die Flüssigkeit nach Entfernung des Schwefelwasserstoffs durch Phosphorwolframsäure gefällt, der Niederschlag durch Baryt zerlegt, das Filtrat nach Entfernung des Bariums durch Kohlensäure eingedampft und der Rückstand mit kochendem Wasser aufgenommen. Zur weiteren Reinigung kann man nun nach Kutscher das Silberbarytverfahren anwenden. S. auch die Originalarbeit.

Ein anderes Verfahren ist von Levene<sup>9</sup>) angegeben.

Über Gewinnung aus autolysierten Organen s. § 724.

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 42, S. 170. 1904 u. Bd. 48, S. 428. 1906.

<sup>2</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 5, S. 163. 1908/09.

<sup>3</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 55, 1, S. 18. 1922. <sup>4</sup>) desgl. Bd. 27, 2, S. 2215. 1899.

<sup>5</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 37, S. 177 u. 377. 1903.

<sup>6</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 117, S. 252. 1921.

<sup>7</sup>) Americ. chem. Journ. Bd. 29, S. 492. 1903.

<sup>8</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 38, S. 49. 1903. <sup>9</sup>) desgl. Bd. 38, S. 80. 1903.

Cytosin krystallisiert in farblosen dünnen, perlmutterglänzenden Plättchen mit 1 Mol.  $H_2O$ , das bei  $100^\circ$  entweicht. Bei  $320\text{--}325^\circ$  zersetzt es sich (Wheeler und Johnson). Es ist sehr schwerlöslich in Wasser (1 in 129 bei  $25^\circ$ , Wheeler und Johnson). Es bildet ein schwerlösliches basisches Sulfat  $(C_4H_5N_3O)_2 \cdot H_2SO_4$  und ein leichtlösliches saures  $C_4H_5N_3O \cdot H_2SO_4$ , ferner  $(C_4H_5N_3O)_4 \cdot H_2SO_4$  (s. auch Levene<sup>1</sup>) und Wheeler<sup>2</sup>). Pikrat  $C_4H_5N_3O \cdot C_6H_3N_3O_7$  hellgelbe glänzende Nadeln, die sich bei  $255^\circ$  bräunen und scharf bei  $270^\circ$  schmelzen. (Nach Wheeler und Johnson<sup>3</sup>) ist der Schmelzpunkt des aus synthetischem Cytosin dargestellten Pikrats nicht scharf, der Zersetzungspunkt bei etwa  $300\text{--}305^\circ$ .) Es ist schwerlöslich, aber zur Isolierung aus unreinen Lösungen nicht geeignet. Pikrolonat  $C_4H_5N_3O \cdot C_{10}H_8N_4O_5$  entsteht beim Versetzen einer Lösung von 0,5 g Cytosin in 100 ccm Wasser mit einer Lösung von 1 g Pikrolonsäure in etwa 350 ccm Wasser. Feine Nadeln oder Prismen. Schmelzpunkt etwa  $270\text{--}273^\circ$  unter Aufbrausen, sehr wenig löslich in Alkohol (Wheeler und Jamieson<sup>4</sup>). Platinchloriddoppelsalz  $(C_4H_5N_3O)_2 \cdot PtCl_4 \cdot 2 HCl$  sehr schwerlöslich und zur Isolierung und Analyse geeignet. Weitere Salze und Derivate bei Kossel und Steudel<sup>5</sup>) und Wheeler und Johnson<sup>6</sup>), Johnson und Clapp<sup>7</sup>).

Gegen Silbernitrat und Ammoniak sowie Barytwasser verhält es sich wie Thymin. Mischt man eine nicht zu verdünnte Lösung von Cytosin mit einigen Tropfen konzentrierter neutraler Silbernitratlösung, dann beginnt nach einiger Zeit die Ausscheidung einer in schönen Nadeln krystallisierenden, in kaltem Wasser ziemlich schwerlöslichen Doppelverbindung (Kutscher<sup>8</sup>).

Es wird aus schwefelsaurer Lösung langsam durch überschüssige Mercurisulfatlösung gefällt (Kossel und Steudel<sup>9</sup>), ebenso durch Phosphorwolframsäure (im Gegensatz zu Thymin und Uracil).

Durch salpetrige Säure wird es in Uracil umgewandelt, ebenso teilweise bei 3stündigem Erhitzen mit 20proz. Schwefelsäure bei  $150\text{--}170^\circ$  (Wheeler und Johnson) und durch Fäulnis (Iwatsuru und Chikano<sup>10</sup>), durch Bariumpermanganat zu Biuret und Oxalsäure oxydiert (Kossel und Steudel).

Es gibt die Weidelsche Reaktion (§ 137). Wheeler und Johnson<sup>11</sup>) haben folgende Reaktion angegeben: Versetzt man etwa 5 ccm einer Lösung mit Bromwasser bis zur bleibenden Färbung (aber unter Vermeidung eines Überschusses), erwärmt, läßt abkühlen, fügt evtl. noch etwas Brom (so daß ein wenig überschüssiges Brom vorhanden ist) hinzu, und nun überschüssiges Barytwasser, so tritt fast augenblicklich Purpurfärbung auf. Sehr verdünnte Lösungen, welche die Probe nicht direkt geben, verdampft man zur Trockne, nimmt den Rückstand in etwas Bromwasser auf, entfernt das überschüssige Brom und setzt Barytwasser hinzu.

Mit Diazobenzolsulfosäure und Alkalilauge entsteht Rotfärbung, aber weniger intensiv als bei Thymin.

134. **Uracil (2,6-Dioxypyrimidin)**  $C_4H_4N_2O_2$  wurde zuerst von Ascoli<sup>12</sup>) aus Hefenucleinsäure dargestellt und ist auch aus anderen Nucleinsäuren und



<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 39, S. 7. 1903.

<sup>2</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 3, S. 285. 1907.

<sup>3</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 38, S. 80. 1903.

<sup>4</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 4, S. 111. 1908.

<sup>5</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 37, S. 177 u. 377. 1903.

<sup>6</sup>) Americ. chem. journ. Bd. 31, S. 591. 1904.

<sup>7</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 5, S. 49. 1908/09.

<sup>8</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 38, S. 170. 1903. <sup>9</sup>) desgl. Bd. 38, S. 49. 1903.

<sup>10</sup>) Chem. Zentralbl. 1924, I, 1205. <sup>11</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 3, S. 183. 1907.

<sup>12</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 31, S. 161. 1900/01.

aus autolysierten Organen gewonnen worden, auch aus Gehirn und dem Extrakt von *Secale corn.* Es ist wohl in allen Fällen sekundär aus Cytosin entstanden.

Über seine Darstellung aus Thymonucleinsäure s. § 276, aus autolysierten Organen § 724.

**Synthese.** Synthetisch gewannen es E. Fischer und Röder<sup>1)</sup> aus Harnstoff und Acrylsäure nach dem § 132 beschriebenen Verfahren. Um es in großen Mengen darzustellen, kondensiert man nach Wheeler und Liddle<sup>2)</sup> Thioharnstoff mit Natriumformylessigester zu Thiouracil und entschweifelt dieses mit Chloressigsäure.

**Eigenschaften.** Weißes krystallinisches Pulver von rosettenförmig angeordneten Nadeln, in heißem Wasser leicht-, in kaltem schwerlöslich, leichtlöslich in Ammoniak, fast unlöslich in Alkohol und Äther. Vorsichtig erhitzt sublimiert es nur teilweise unzersetzt, zum Teil entwickelt es rote Dämpfe oder es verkohlt. Bei schnellem Erhitzen schmilzt es unter Gasentwicklung gegen 335°. Über Alkali- und Quecksilbersalze s. Myers<sup>3)</sup>. Gegen Silbernitrat und Barytwasser oder Ammoniak verhält es sich wie Thymin und Cytosin. Es wird durch Mercurinitrat gefällt, aber nicht durch Phosphorwolframsäure.

Es löst sich bei gewöhnlicher Temperatur in rauchender Salpetersäure (spez. Gew. 1,5) und geht quantitativ in 5-Nitrouracil über. Nitrouracil (in Alkohol schwerlöslich und so von dem in Alkohol leichtlöslichen Oxynitrohydrothymin trennbar, s. § 132) läßt sich durch Kochen in ammoniakalischer Lösung mit Aluminium oder Ferrosulfat zu Aminouracil reduzieren, dessen Pikrat bei 147—148° schmilzt (Johnson<sup>4)</sup>, Behrend und Grünwald<sup>5)</sup>.

**Nachweis.** Die Weidelsche Reaktion (§ 137) fällt positiv aus (Steudel), ebenso die Reaktion von Wheeler und Johnson (§ 133), bei deren Ausführung aber eine Erwärmung nicht nötig ist. Noch 0,002 g geben eine deutliche rötlich-blaue oder Lavendelfärbung. Die mit Diazobenzolsulfosäure und Lauge eintretende Rotfärbung ist weniger intensiv als bei Thymin.

**Orotsäure**  $C_5H_4N_2O_4$ , eine zweibasische Säure, wurde von Biscaro und Belloni<sup>6)</sup> aus den enteiweißten Molken durch basisches Bleiacetat ausgefällt und als krystallisierendes Monokalial Salz erhalten.

Während Biscaro und Belloni die Verbindung als ein Harnstoffderivat mit siebengliedrigem Ring ansehen, halten Wheeler, Johnson und Johns<sup>7)</sup> für wahrscheinlicher, daß ein Pyrimidin-derivat vorliegt. Die Formel ist die einer Uracilcarbonsäure. Die von Wheeler, Johnson und Johns dargestellte Uracil-5-Carbonsäure stimmt in einigen Eigenschaften mit der Orotsäure völlig überein, in anderen weicht sie ab.

Die freie Säure krystallisiert mit 1 Mol.  $H_2O$ , ist wenig löslich in Wasser, wenig löslich oder unlöslich in den organischen Lösungsmitteln, zersetzt sich bei 260°. Das ebenfalls krystallisierende Natronsalz ist in Wasser löslich, das Kalisalz  $C_5H_3N_2O_4K$  ist wenig löslich in kaltem Wasser, unlöslich in Alkohol, Äther, Chloroform. Das amorphe Silbersalz  $C_5H_3N_2O_4Ag \cdot H_2O$  ist in Wasser fast unlöslich.  $C_5H_2N_2O_4Pb$ ,  $(C_5H_3N_2O_4)_2Ba$ ,  $C_5H_2N_2O_4Ba$  in Wasser wenig lösliche Salze. Monomethylester weißes in Wasser und Alkohol lösliches Krystallpulver, Fp. 248—250°, Monoäthylester Fp. 200°. Dichlororotsäure  $C_5H_4N_2O_3Cl_2 + H_2O$ , aus siedendem Wasser als gelbe Nadelchen sich abscheidend, Fp. 115°. Bei der Oxydation mit Kaliumpermanganat entsteht Harnstoff.

<sup>1)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 34, 3, S. 3751. 1901.

<sup>2)</sup> Americ. chem. journ. Bd. 40, S. 547 ref. Chem. Zentralbl. 1909, I, S. 447.

<sup>3)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 7, S. 249. 1909/10.

<sup>4)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 4, S. 407. 1908. — Johnson u. Matsuo: Journ. of the americ. chem. soc. Bd. 41, S. 782; ref. Chem. Zentralbl. 1919, III, S. 609.

<sup>5)</sup> Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 309, S. 254. 1899.

<sup>6)</sup> Ref. Chem. Zentralbl. 1905, II, S. 63 u. 64.

<sup>7)</sup> Americ. chem. journ. Bd. 37, S. 392; Ref. Chem. Zentralbl. 1907, I, S. 1632.

## Purinderivate.

Unter dem Namen Purinkörper faßt E. Fischer eine Gruppe von Verbindungen zusammen, die sich alle von dem Purin  $C_5H_4N_4$  ableiten. Zu dieser Gruppe gehören von im tierischen Organismus gefundenen Stoffen die Harnsäure, die Nucleinbasen Xanthin, Hypoxanthin, Guanin und Adenin, das 1-Methylxanthin, Heteroxanthin, Paraxanthin, Epiguanin, Episarkin, sowie die dem Pflanzenreich angehörenden Coffein, Theobromin, Theophyllin. Fast alle diese Körper können jetzt künstlich dargestellt werden. Die Synthese der meisten ist von E. Fischer\*) ausgeführt worden.

Die Konstitution der genannten Purinkörper und ihre Beziehungen zueinander ergeben sich aus folgenden Bezeichnungen:

Harnsäure	=	2, 6, 8-Trioxypurin
Xanthin	=	2, 6-Dioxyypurin
1-Methylxanthin	=	1-Methyl-2, 6-Dioxyypurin
Heteroxanthin	=	7-Methylxanthin = 7-Methyl-2, 6-Dioxyypurin
Theophyllin	=	1, 3-Dimethylxanthin = 1, 3-Dimethyl-2, 6-Dioxyypurin
Paraxanthin	=	1, 7-Dimethylxanthin = 1, 7-Dimethyl-2, 6-Dioxyypurin
Theobromin	=	3, 7-Dimethylxanthin = 3, 7-Dimethyl-2, 6-Dioxyypurin
Coffein	=	1, 3, 7-Trimethylxanthin = 1, 3, 7-Trimethyl-2, 6-Dioxyypurin
Hypoxanthin	=	6-Oxyypurin
Guanin	=	2-Amino-6-Oxyypurin
Epiguanin	=	7-Methylguanin = 7-Methyl-2-Amino-6-Oxyypurin
Adenin	=	6-Aminopurin.

Alle diese Verbindungen enthalten einen Alloxan- und einen Harnstoffkern und werden deshalb von Kossel und Krüger<sup>1)</sup> auch als Alloxurkörper (von Alloxan und Urea), die Basen als Alloxurbasen bezeichnet.

**Harnsäure (2, 6, 8-Trioxypurin)  $C_5H_4N_4O_3$ .**

135. Die Harnsäure ist besonders reichlich im Harn der Vögel, beschuppten Amphibien und der Insekten sowie anderer Avertebraten enthalten, in geringer Menge im Harn des Menschen und der meisten Säugetiere. Die Blasen- und Nierensteine bestehen oft fast ganz aus Harnsäure und harnsauren Salzen. Im Blut von Hühnern, Enten, Gänsen findet sich Harnsäure zu etwa 0,005%, reichlicher nach Unterbindung der Ureteren in Blut, Lymphgefäßen und allen Organen von Vögeln und Schlangen, im Säugetierblut nur in Spuren, im Blut gesunder Menschen 0,001—0,003%. Bei Gicht, Leukämie, Pneumonie, Nephritis und anderen Krankheiten kann sie vermehrt sein. Bei Gicht bildet sie bzw. ihr Natriumsalz oft Ablagerungen in den Gelenken und am Periost der Knochen, in den Nieren, der Leber und anderen Organen. In normalen, frischen Organen (Milz, Leber) von Rindern findet sich keine Harnsäure (Stadt-hagen<sup>2)</sup>, Steudel und Suzuki<sup>3)</sup>. In der Milch, dem Speichel, Transsudaten, in der Ascitesflüssigkeit wurde sie nachgewiesen. In menschlichen Faeces findet sie sich nicht, wohl aber im menschlichen Mekonium. Bender fand Harnsäure im Gesicht, auf dem Magen und der Leber einer längere Zeit begraben gewesenen Leiche.

Durch in verschiedenen Organen enthaltene Fermente werden Nucleinbasen bei Luftzutritt in Harnsäure übergeführt (§ 521).

Synthetisch wurde sie erhalten aus Glykokoll und Harnstoff (Horbaczewski<sup>4)</sup> und aus Isodialursäure und Harnstoff (Behrend und Roosen<sup>5)</sup> sowie am einfachsten durch Erhitzen von Pseudoharnsäure mit Salzsäure (E. Fischer<sup>6)</sup>).

\*) Die Arbeiten finden sich zusammengestellt in E. Fischer: Untersuchungen in der Purin-  
gruppe. Berlin: Springer 1907.

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 20, S. 177. 1895.

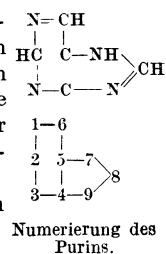
<sup>2)</sup> Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. Bd. 109, S. 390. 1887.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 119, S. 166. 1922.

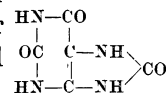
<sup>4)</sup> Monatshefte f. Chem. Bd. 3, S. 796. 1882 u. Bd. 6, S. 352. 1885.

<sup>5)</sup> Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 251, S. 235. 1888.

<sup>6)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 30, 1, S. 559. 1897.



Vorkommen.



**Darstellung:** Man stellt die Harnsäure aus Guano, am reinsten aus Schlangenexkrementen dar. Die letzteren werden mit verdünnter Natronlauge erhitzt, das Filtrat wird mit Kohlensäure gesättigt und das ausgeschiedene und abfiltrierte saure harnsaure Natron mit verdünnter Salzsäure gekocht. Die abgeschiedene Harnsäure filtrierte man nach dem Erkalten ab und wäscht sie gut mit Wasser aus.

**aus Harn.** Zur Isolierung der Harnsäure aus dem Harn versetzt man ihn, wenn er frei von Eiweiß und nicht sehr verdünnt ist, mit 5—10% konzentrierter Salzsäure und läßt 24 Stunden stehen; bei Gegenwart von Eiweiß bedient man sich besser der Essigsäure, doch ist es zweckmäßiger, durch Kochen erst das Eiweiß zu koagulieren und die filtrierte, etwas eingedampfte Flüssigkeit dann mit Essigsäure zu versetzen. Verdünnte Harne werden vor dieser Behandlung zuerst auf ein kleines Volumen abgedampft und dann mit der Säure versetzt. Die Abscheidung ist keine quantitative, kann unter Umständen sogar ganz ausbleiben. Es ist wichtig, die etwa vorhandenen Sedimente zu beachten, häufig fällt im diabetischen Harne die ganze Harnsäure als sandiges, rotes Krystallpulver binnen kurzer Zeit aus und kann dann leicht übersehen werden. Wäscht man die nach 24—48stündigem Stehen abgeschiedenen Harnsäurekrystalle mit Wasser, dann mit Alkohol, so wird der Farbstoff möglichst entfernt und etwa beigemengte Benzoe- oder Hippursäure gelöst. Zur weiteren Reinigung kann man die Krystalle in wenig Natronlauge lösen und nun entweder mit Chlorammonium saures harnsaures Ammoniak fällen und dies nach dem Abfiltrieren mit Salzsäure zerlegen oder mit Tierkohle kochen und mit Salzsäure fällen. Auch durch alkoholische Pikrinsäurelösung (für 100 ccm Harn 25 ccm einer 5proz. alkoholischen Lösung) wird die Harnsäure zugleich mit Kreatinin (S. 162) aus dem Harn ziemlich vollständig gefällt. Der gewaschene und getrocknete Niederschlag wird mit verdünnter Salzsäure gekocht und der Lösung die Pikrinsäure durch Schütteln mit Äther entzogen; allmählich scheidet sich die Harnsäure aus (Jaffe<sup>1</sup>).

**Krystallformen.** Die Harnsäure bildet ein krystallinisches, farbloses Pulver, wenn sie völlig rein ist; sie fällt jedoch aus allen durch Harnfarbstoff gefärbten Flüssigkeiten oder aus dem Extrakte des Guano stets gelbrot bis braun gefärbt nieder, krystallisiert im unreinen Zustande besser als nach völliger Reinigung und wird durch Kohle sehr schwer entfärbt. Die Krystalle sind fast stets mikroskopische, und zwar bilden sich durch Zusatz geringer Mengen Säure zur verdünnten Lösung, z. B. zum menschlichen Harn, ebenso häufig beim Stehen des Harns allmählich rhombische Tafeln oder Säulen, oft mehrere ineinander verwachsen, deren stumpfe Winkel meist stark abgerundet sind. Zuweilen zeigen sich spitzwetzsteinförmige, unvollkommene Krystalle. Ist die Harnsäure durch viel starke Säure schnell abgeschieden, so stellt sie 4seitige, gestreifte, oft treppenartig aneinandergereihte Prismen mit ziemlich vertikal zu den Prismenflächen aufgesetzter Endfläche dar.

**Eigenschaften.** Harnsäure ist eine schwache zweibasische Säure, die sich bei Gegenwart von Formaldehyd scharf als einbasische titrieren läßt (Phenolphthalein) (Sörensen<sup>2</sup>). Sie ist geschmack- und geruchlos, nicht flüchtig beim Erhitzen, löst sich nur wenig in Wasser (in reinem Wasser bei 18° 1 : 39 500 (His und Paul<sup>3</sup>), bei 37° 1 : 15 505 (Gudzent<sup>4</sup>), noch weniger in normaler Salz- und Schwefelsäure (His und Paul). In Blutserum ist sie löslicher als in

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 10, S. 391. 1886.

<sup>2</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 7, S. 99. 1908.

<sup>3</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 31, S. 1 u. 64. 1900/01. — Kohler: desgl. Bd. 72, S. 172 u. 176. 1911. — Biltz u. Herrmann: Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 431, S. 104. 1923.

<sup>4</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 60, S. 25. 1909.



Wasser (Bechhold und Ziegler<sup>1</sup>). Sie löst sich gar nicht in Alkohol und in Äther, in Glycerin zu 0,74%, ebenso in Pyridin, in Ammoniak sehr wenig, leicht in Alkalilauge. Auch in den wässerigen Lösungen einiger organischer Basen, z. B. Diäthylendiamin (Piperazin), Hexamethylentetramin (Urotropin) ist sie löslich. In 75proz. Schwefelsäure löst sie sich bei 120° zu 10% (Tafel<sup>2</sup>), auch in konzentrierter Schwefelsäure ohne Zersetzung, und scheidet sich bei Verdünnen mit Wasser wieder aus. Über die Löslichkeit in Essigsäure s. Rossi<sup>3</sup>). Sie löst sich auch in wässerigen Lösungen neutraler, borsaurer, phosphorsaurer, kohlenaurer, milchsaurer, selbst essigsaurer Alkalien (nicht in den Ammoniaksalzen dieser Säuren), indem sie den Säuren einen Teil des Alkalis entzieht und saures harnsaurer neben saurem borsaurer usw. Alkali entsteht.

Durch Phosphorwolframsäure bei Gegenwart von Salzsäure wird sie als hell-schokoladenfarbiger Niederschlag völlig gefällt, durch Bleiessig langsam. Zinksalze rufen in schwach alkalisch reagierenden Lösungen Fällungen hervor, welche Zink und Harnsäure enthalten. Aus Harn, der mit Natriumcarbonat schwach alkalisch gemacht ist, wird sie durch Zinksulfat völlig gefällt (Kashiwbara<sup>4</sup>), Siegfried<sup>5</sup>), Morris<sup>6</sup>).

Die geringe Menge Harnsäure, welche in ammoniakalischer Flüssigkeit löslich ist, wird durch ammoniakalische Silberlösung nicht gefällt, wohl aber entstehen gelatinös-flockige Niederschläge bei gleichzeitiger Gegenwart von Alkali oder Erdalkali- (z. B. Magnesia-)Salzen. Dieselben sind Doppelverbindungen der Harnsäure mit Silber und diesen Metallen (Salkowski<sup>7</sup>). Auf diesem Verhalten beruht die quantitative Bestimmung der Harnsäure im Harn nach Ludwig - Salkowski (§ 583).

Versetzt man eine Lösung von Harnsäure in Natronlauge mit Cuprisulfat, so tritt besonders beim Erwärmen Reduktion des Cupri- zu Cuprooxyd ein und es bildet sich ein weißer Niederschlag von harnsaurem Cuprooxyd, durch Zusatz von mehr Kupfersalz und Kochen erhält man freies Cuprooxyd. Beim Erhitzen ihrer Lösungen mit Cuprisulfat und Natriumbisulfit fällt Harnsäure ebenfalls als Cuprosalz aus; beim Erkalten wird die Abscheidung eine fast vollständige (Krüger<sup>8</sup>). Indigolösung wird durch Harnsäure in alkalischer Lösung schnell und reichlich entfärbt.

Die neutralen Alkalisalze, z. B.  $C_5H_2Na_2N_4O_3$ , existieren nur in fester Form oder in stark alkalischer Lösung. In Wasser gelöst zerlegen sie sich zu saurem Salz und dem betreffenden Hydroxyd. Die sauren Alkalisalze  $C_5H_3NaN_4O_3 + H_2O$ ,  $C_5H_3KN_4O_3$  und das saure Ammoniumsalz  $C_5H_3(NH_4)N_4O_3$  sind schwerlöslich, die übrigen Salze sehr schwerlöslich oder unlöslich.

Saures Kaliumurat löst sich in reinem Wasser bei 18° 1:653, bei 37° 1:370 (Gudzent), bei 100° 1:70—80. Saures Natriumurat\*) bei 18° 1:1201, bei 37° 1:665 (Gudzent), bei 100° 1:125. Saures Ammoniumurat bei 18° 1:2415, bei 37° 1:1352 (Gudzent). Das Lithiummonourat ist löslich 1:388 bei 18° und 1:362 bei 37° (Vicario<sup>10</sup>). Die angegebene Löslichkeit gilt aber nur für frisch bereitete Lösungen, sie nimmt allmählich ab bis zu einem konstanten Wert,

\*) Frisch gefälltes amorphes saures Natriumurat löst sich bei 18° 1:493<sup>11</sup>).

<sup>1</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 20, S. 189. 1909 u. Bd. 64, S. 471. 1914.

<sup>2</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 34, 1, S. 258. 1901.

<sup>3</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 54, S. 297. 1913.

<sup>4</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 84, S. 223. 1913. <sup>5</sup>) desgl. Bd. 24, S. 409. 1898.

<sup>6</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 25, S. 205. 1916.

<sup>7</sup>) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 5, S. 210. 1872. — Maly: desgl. Bd. 6, S. 201. 1872.

<sup>8</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 20, S. 170. 1895.

<sup>9</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 56, S. 150. 1908 u. Bd. 60, S. 38. 1909.

<sup>10</sup>) Journ. de pharmacie et de chim. [6], Bd. 15, S. 265. 1902; ref. Chem. Zentralbl. 1902, I, S. 913.

<sup>11</sup>) Barkan: Zeitschr. f. Biol. Bd. 76, S. 257. 1922.

was höchstwahrscheinlich mit der fortschreitenden Umwandlung der ursprünglichen Lactam- in die Lactimform zusammenhängt (Gudzent). In Blutserum ist das saure Natriumurat weniger löslich als in Wasser (Bechhold und Ziegler).

Eine Lösung von Harnsäure in Alkali wird durch anhaltendes Einleiten von Kohlensäure in der Kälte gefällt, der Niederschlag ist saures Alkalisalz. Diese Fällung durch Kohlensäure wird sehr behindert bzw. ganz aufgehoben bei Gegenwart von Thyminsäure oder Nucleinsäure (Goto<sup>1</sup>). Fügt man zu einer Lösung von Harnsäure in Alkalilauge einen Überschuß von Chlorammonium, so bildet sich alsbald oder nach einiger Zeit ein flockiger Niederschlag von saurem harnsaurem Ammoniak. Saures harnsaures Ammoniak  $C_5H_3(NH_4)N_4O_3$  ist häufig in Harnsedimenten, Blasen- und Nierensteinen enthalten, ebenso im Harne der Schlangen und Vögel. Dies Salz bildet entweder mikroskopische, an ihren Formen nicht erkennbare, jedoch eckig erscheinende Partikel oder Morgenstern-, Stechapfelformen, Kugel-, Keulen-, Rübenformen. Es ist in gesättigter Salmiaklösung völlig unlöslich. Saures harnsaures Natron  $C_5H_3NaN_4O_3$  bildet den Hauptbestandteil der meisten sog. Ziegelmehlsedimente (Sedimenta lateritia) und gleichfalls häufig den wesentlichen Bestandteil von Harnsteinen und Schlangenharn. (Die weiße Masse des Harns der Vögel besteht dagegen nach Meißner in der Hauptsache aus freier Harnsäure.) Die Formen dieses Salzes stimmen mit denen des harnsauren Ammoniaks völlig überein. Aus eingedampften Harnrückständen scheidet es sich stets in Kugeln und Knollen aus, welche denen des unreinen Leucins sehr ähnlich sind, aber dunklere Konturen haben. Der Unterschied in der Löslichkeit je nach der Temperatur (s. oben) bedingt die Ausscheidung des Salzes beim Erkalten des auch bei relativ großem Gehalte davon klar gelassenen Harns. Die leichte Löslichkeit dieser Niederschläge beim Erwärmen des Harns dient zur Erkennung des sauren harnsauren Natrons. Saures harnsaures Kali  $C_5H_3KN_4O_3$ , in jeder Beziehung dem Natronsalz ähnlich, findet sich gleichfalls meistens in Harnsedimenten.

**saures harnsaures Ammoniak**  
**saures harnsaures Natron**  
**saures harnsaures Kali.**

**Quadriurate.** In Sedimenten kommen nach Bence Jones auch sog. Quadriurate (auf 1 Alkalimetall 2 Mol. Harnsäure) vor, welche nach Roberts die Hauptbestandteile des Harns der Vögel und Schlangen und des Sedimentum lateritium bilden. Nach Kohler u. a.<sup>2</sup>) handelt es sich um Gemische von saurem Urat und Harnsäure. Siehe dazu Ringer<sup>3</sup>), welcher eine etwas andere Auffassung vertritt. Ein solches Gemenge von  $C_5H_4N_4O_3$  und  $C_5H_3NaN_4O_3$  findet sich auch in den arthritischen Ablagerungen auf den Gelenkknorpeln.

**Weitere Salze.** Über Zink-, Nickel-, Kupfersalze s. Curtman und Hart<sup>4</sup>).

So wie die Harnsäure selbst haben auch ihre Salze große Neigung, Farbstoffe aus dem menschlichen Harne beim Ausfallen mit sich niederzureißen, während die Ablagerungen in den Gelenken schneeweiß erscheinen, ebenso sind die Ausscheidungen, wie sie im Harne und, nach Unterbindung der Ureteren, in den verschiedensten Organen der Vögel auftreten, schneeweiß.

Durch Essigsäure oder Salzsäure werden alle die erwähnten Salze leicht unter allmählichem Absatz krystallisierter Harnsäure zerlegt. Anwesenheit von Thyminsäure und Nucleinsäure behindert auch die Fällung durch Salzsäure (Goto, Minkowski<sup>5</sup>).

**Umwandlungen.** Beim Erhitzen (trockene Destillation) zersetzt sich Harnsäure unter Bildung von Harnstoff, Cyanursäure, Ammoniumcarbonat, Blausäure und Hinterlassung

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 30, S. 473. 1900.

<sup>2</sup>) Tunnicliffe u. Rosenheim: Lancet, 16. Juni 1900 ref. Chem. Zentralbl. 1900, II, S. 626. — Kohler: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 70, S. 360. 1910/11; Bd. 72, S. 169. 1911; Bd. 88, S. 259. 1913.

<sup>3</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 75, S. 13. 1911. — Ringer u. Schmutzter: desgl. Bd. 82, S. 209. 1912 u. Bd. 89, S. 321. 1914.

<sup>4</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 46, S. 599. 1921.

<sup>5</sup>) Verhandl. d. 18. Kongr. f. inn. Med., Wiesbaden 1900, S. 438.

von Kohle. Mit kaltgesättigter Jodwasserstoffsäure oder Salzsäure auf 170° erhitzt zerfällt sie zu Glykokoll, Ammoniak und Kohlensäure, mit konzentrierter Schwefelsäure erhitzt liefert sie Ammoniak und Kohlensäure. Von heißer Salpetersäure wird sie unter Aufbrausen gelöst und zersetzt, mit verdünnter Salpetersäure oder Kaliumchlorat und Salzsäure abgedampft gibt sie beim Trocknen des Rückstandes einen roten Körper, welcher durch eine Spur Ammoniak schön purpurrot, durch Kali- oder Natronlauge prächtig violettblau gefärbt wird (purpursaures Ammoniak oder Murexid und purpursaures Kali oder Natron). Bei der Oxydation in saurer Lösung entsteht als charakteristisches Produkt Alloxa<sub>n</sub>, z. B. durch kalte konzentrierte Salpetersäure  $[C_5H_4N_4O_3 + O + H_2O = C_4H_2N_2O_4 + CO(NH_2)_2]$ , bei der Oxydation in neutraler oder alkalischer Lösung als charakteristisches Produkt Allantoin, z. B. durch Permanganat  $(C_5H_4N_4O_3 + O + H_2O = C_4H_6N_4O_3 + CO_2)$ . Bei der Reduktion mit Chloroform und Natriumhydroxyd bildet sich Xanthin und als Hauptprodukt Hypoxanthin (Sundwik<sup>1</sup>), bei der Reduktion mit Glycerin und Oxalsäure Xanthin (30—33%) (Sundwik<sup>2</sup>). Ein von Ulpiani<sup>3</sup>) isoliertes Bacterium zerlegt Harnsäure in Harnstoff und Kohlensäure. Durch andere Bakterien entstehen Allantoin, Harnstoff, Oxalsäure, Kohlensäure und Ammoniak (Liebert<sup>4</sup>). Eine Umwandlung der Harnsäure in Allantoin findet auch durch ein in manchen Organen enthaltenes Ferment (Uricase) statt. In menschlichen Organen scheint ein solches Ferment zu fehlen.

Oxydationen.

Reduktionen.

Umwandlung durch Bakterien und Fermente.

Dem Nachweis der Harnsäure muß ihre Isolierung vorangehen. Hat man nach einem der oben angegebenen Verfahren eine mehr oder weniger deutlich krystallinische Abscheidung erhalten, so prüft man sie in folgender Weise:

Nachweis.

1. Form und Farbe der Krystalle unter dem Mikroskop. Die Harnsäurekrystalle sind fast immer gelb bis dunkelbraun gefärbt, ihre Formen dagegen sehr wechselnd, Wetzstein-, Tonnenformen, rhombische Tafeln, gestreifte Prismen usw.

2. Murexidprobe. Man bringt ein wenig der Substanz auf einen Porzellantiegeldeckel oder in eine kleine Porzellanschale, fügt ein paar Tropfen Salpetersäure hinzu, erhitzt und verdampft dann, indem man die Schale mit der Hand hält, bei mäßiger Wärme unter Blasen zur völligen Trockne. Besteht die Masse aus Harnsäure, so löst sie sich in der Salpetersäure und gibt beim Abdampfen eine gelbliche, beim völligen Trocknen eine rote Masse, welche sich mit 1 Tropfen Ammoniak prachtvoll purpurrot, mit 1 Tropfen Alkalilauge blaviolett färbt. Jeder Überschuß von Ammoniak oder Alkalilauge ist ebenso zu vermeiden wie zu starkes Erhitzen beim Abdampfen und Trocknen.

3. Probe von Folin und Denis<sup>5</sup>). Man bringt 1—2 ccm der auf Harnsäure zu prüfenden Flüssigkeit mit etwa der gleichen Menge eines Reagens (das man durch 2stündiges gelindes Sieden am Rückflußkühler von 100 g Natriumwolframat (molybdat- und nitratfrei!), 80 ccm 85proz. Phosphorsäure und 750 ccm Wasser und Verdünnen der abgekühlten Flüssigkeit auf 1 l erhält) zusammen und fügt 3—10 ccm gesättigter Natriumcarbonatlösung oder gepulvertes Natriumcarbonat hinzu: Blaufärbung. Bei Benutzung von festem Natriumcarbonat tritt sie noch ein bei einer Verdünnung von 1:500000.

4. Probe von Denigès<sup>6</sup>). Man erhitzt ein wenig der zu prüfenden Substanz mit wenig verdünnter Salpetersäure bis zum Aufbrausen (Bildung von Alloxa<sub>n</sub>), verjagt vorsichtig die überschüssige Säure ohne bis zum Auftreten der Färbung zu trocknen und fügt 2—3 Tropfen konz.

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 23, S. 476. 1897 u. Bd. 26, S. 131. 1898/99.

<sup>2</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 76, S. 486. 1911/12.

<sup>3</sup>) Gazz. chim. ital. Bd. 33, 2, S. 93. 1903/04. — Cingolani: desgl. Bd. 33, 2, S. 98. 1903/04.

<sup>4</sup>) Malys Jahresber. d. Tierchem. 1909, S. 907. <sup>5</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 12, S. 239. 1912.

<sup>6</sup>) Journ. de pharmacie et de chim. [5], Bd. 18, S. 161. 1888.

Schwefelsäure sowie einige Tropfen käuflichen (thiophenhaltigen) Benzols hinzu. Es entsteht blaue Färbung, welche nach Verdunsten des Benzols in Braun übergeht, dann auf Zusatz von Benzol wieder auftritt.

5. Probe von Ganassini<sup>1)</sup>. Versetzt man eine schwach alkalische Harnsäurelösung mit einem Zinksalz und filtriert den Niederschlag ab, so färbt er sich bei Gegenwart von Alkali durch den Luftsauerstoff besonders im Sonnenlicht himmelblau. Kaliumferricyanid, Kaliumpersulfat rufen die Färbung sofort hervor.

6. Zur Bestätigung läßt sich noch das Verhalten der Harnsäure gegen Natronlauge und gegen Ammoniak benutzen. Man löst eine nicht zu kleine Portion in wenig Natronlauge, filtriert, wenn etwas ungelöst blieb, versetzt das Filtrat mit Chlorammonium im Überschuß und läßt, wenn nicht sofort ein Niederschlag entsteht, einige Zeit stehen. Es wird sich, wenn die Flüssigkeit nicht außerordentlich verdünnt ist, eine flockige Abscheidung von saurem harnsaurem Ammoniak bilden, die in Ammoniak nicht löslich ist und auf Zusatz von überschüssiger Salzsäure sich allmählich in Krystalle freier Harnsäure umwandelt.

7. Auch das Verhalten der Harnsäure beim Erwärmen mit Natronlauge und wenig Cuprisulfat (s. S. 171) kann man zur Bestätigung benutzen.

Über eine Verbindung der Harnsäure mit d-Ribose s. § 281, a.

Über Nachweis und Bestimmung im Harn s. § 583, in serösen Flüssigkeiten § 647, § 648 und § 704, in Organen § 742.

#### *Nucleinbasen (Purinbasen).*

Vorkommen und  
allgemeine Re-  
aktionen.

136. Die Nucleinbasen (Xanthin, Guanin, Hypoxanthin, Adenin), deren Beziehungen zu den Nucleinstoffen von Kossel erkannt sind, zeigen eine allgemeine Verbreitung in den Geweben von Tieren und Pflanzen, werden aus allen entwicklungsfähigen Zellen, welche darauf untersucht sind, erhalten und sind zum Teil im freien Zustande in den Organen gefunden. Die Quantitäten, in denen sie präformiert gefunden werden, sind stets nur geringe, aber diese werden durch Behandlung der Organe in höherer Temperatur unter Einwirkung verdünnter Säuren gesteigert, indem durch Zerlegung der Nucleinsäuren weitere Mengen derselben frei werden. Hypoxanthin und Xanthin entstehen dabei in vielen Fällen erst sekundär aus Adenin und Guanin. Diese Umwandlung von Adenin bzw. Guanin in Hypoxanthin und Xanthin kann auch durch Bakterien erfolgen und auch durch Fermente, welche neben solchen, die Hypoxanthin in Xanthin und dieses in Harnsäure überführen, in Organen vorhanden sind (§ 521).

Sie sind in Wasser mehr oder weniger schwerlöslich, leichtlöslich in Alkalien, bilden mit Säuren gut krystallisierende Salze. Sie werden alle durch ammoniakalische Silberlösung als Silberverbindungen, durch Kochen mit Kupfersulfat und Natriumbisulfit als Kupferoxydulverbindungen (Drechsel, Krüger<sup>2)</sup>) sowie durch Fällungsmittel für Basen, z. B. Phosphorwolframsäure, Phosphormolybdänsäure, Kaliumquecksilberjodid, Kaliumwismutjodid, ferner durch Quecksilbersulfat in schwefelsaurer Lösung, durch Sublimat, Bleiessig + Ammoniak gefällt. Die Nucleinbasen des Harns werden auch durch Zinksalze so gut wie völlig gefällt (Salkowski<sup>3)</sup>). Durch Oxydation mit Braunstein in essigsaurer Lösung werden sie nicht angegriffen im Gegensatz zu Harnsäure, welche dabei vollständig in das durch Kupfersulfat und Natriumbisulfit nicht mehr fällbare Allantoin übergeführt wird (Krüger und Schmid<sup>4)</sup>).

Isolierung und  
Bestimmung.

Über Isolierung und Bestimmung im Harn s. §§ 146, 584, 585, in serösen Flüssigkeiten s. §§ 648 und 649, in Organen §§ 724 und 741, in Faeces §§ 822 und 832.

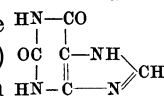
<sup>1)</sup> Chem. Zentralbl. 1909, I, S. 1043.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 18, S. 351. 1894 u. Bd. 20, S. 170. 1895.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 85, S. 346. 1913. <sup>4)</sup> desgl. Bd. 45, S. 11. 1905.

137. **Xanthin (2, 6-Dioxyapurin)  $C_5H_4N_4O_2$** . Xanthin findet sich in weiter Verbreitung in den Geweben (§ 136). Zuerst in menschlichen Blasensteinen (die sehr selten, aber dann, wie es scheint, fast ausschließlich aus Xanthin bestehen) aufgefunden, ist es in sehr kleiner Menge normalerweise im Harn vorhanden und in reinem Zustande zuerst von Krüger und Salomon<sup>1)</sup> aus ihm isoliert. Es findet sich auch in den Faeces und im Boden.

Vorkommen.



Synthetisch wurde es von E. Fischer<sup>2)</sup> aus Trichlorpurin\*) entweder durch Verwandlung des Trichlorids mit Natriumäthylat in das 2, 6-Diäthoxy-8-chlorpurin, welches durch Jodwasserstoff in Xanthin übergeführt wird, oder durch Überführung des Trichlorids in Dijodpurin mittels Jodwasserstoff bei 0° und nachträgliche Verwandlung dieses Dijodkörpers in Xanthin durch Erhitzen mit Salzsäure dargestellt. Man stellt es am besten dar durch Einwirkung von Natriumnitrit auf Guanin in schwefelsaurer Lösung (Strecker, E. Fischer<sup>3)</sup>). Es entsteht aus Guanin auch schon durch Kochen mit Salzsäure (E. Fischer<sup>4)</sup>). Aus Harnsäure erhält man es durch Erhitzen mit wasserfreier Oxalsäure und Glycerin zu 30—33% (Sundwik<sup>5)</sup>.)

Synthese, Darstellung.

Über Isolierung und Bestimmung siehe die Hinweise § 136.

Das Xanthin bildet in reinem Zustande ein farbloses Pulver, welches beim Reiben Wachsglanz annimmt; aus einer schwach alkalischen, sehr verdünnten, warmen Lösung scheidet es sich auf Zusatz von Essigsäure langsam in schönen, farblosen, makroskopischen Drusen ab, die mikroskopisch aus glänzenden rhombischen Blättchen bestehen. Die Krystalle enthalten 1 Mol. Wasser, das erst bei 125—130° entweicht (Horbaczewski<sup>6)</sup>). In Wasser ist es sehr wenig löslich. Nach Almén<sup>7)</sup> löst sich 1 Tl. bei 16° in 14 151 Tl., bei 100° in 1300 bis 1500 Tl. Wasser. In Alkohol oder Äther ist es unlöslich. In Alkalilauge, auch in Ammoniak, löst es sich leicht, nicht in Barytwasser, beim Verdunsten der ammoniakalischen Lösung scheidet sich das Xanthin in Gruppen von Krystallblättchen aus. In kalter, verdünnter Salpetersäure ist es schwerlöslich, ebenso in kalter, verdünnter Salzsäure, in dieser etwas leichter beim Erwärmen. Gegen Salpetersäure ist es beständig im Gegensatz zu Harnsäure. Beim Schütteln mit verdünnter Salpetersäure (auf 100 Tl. Wasser 5 Tl. Salpetersäure (spez. Gew. 1,4) im Wasserbad wird Harnsäure unter Gasentwicklung zerstört, Xanthin nicht. Das salzsaure Xanthin bildet kleine Prismen, die sich mit Wasser zersetzen, auch das schwefelsaure Salz verliert Schwefelsäure bei der Behandlung mit Wasser.

Eigenschaften.

Verbindungen:  
mit Salz- und  
Schwefelsäure

Die konzentrierte Lösung von Xanthin in Ammoniak wird von ammoniakalischer Lösung von salpetersaurem Silber gefällt; der gallertig-flockige Niederschlag hat die Zusammensetzung  $C_5H_2Ag_2N_4O_2 + H_2O$ . In heißer Salpetersäure löst sich dieser Niederschlag und beim Erkalten scheidet sich, wenn die Lösung verdünnt ist nur sehr langsam, das Xanthinsilbernitrat  $C_5H_4N_4O_2 \cdot AgNO_3$  in stark lichtbrechenden, kugligen Aggregaten kleiner Nadeln aus. Die Verbindung ist in Salpetersäure schwer löslich.

mit Silber.

Über die Verbindung mit Diazobenzolsulfosäure s. Burian<sup>8)</sup>. In der ammoniakalischen Lösung rufen Chlorzink oder Chlorcalcium Niederschläge hervor. Die wässerige wird durch Cupriacetat erst beim Kochen in gelbgrünen

Andere Ver-  
bindungen.

\*) Über die Darstellung des Trichlorpurins, das auch für die Synthese der anderen Nucleinbasen dient, s. E. Fischer: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 30, 2, S. 2220 u. 2208. 1897.

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 26, S. 358. 1898/99.

<sup>2)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 30, 2, S. 2232. 1897 u. Bd. 31, 3, S. 2562. 1898.

<sup>3)</sup> Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 215, S. 309. 1882.

<sup>4)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 43, 1, S. 805. 1910.

<sup>5)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 76, S. 486. 1911/12.

<sup>6)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 23, S. 226. 1897.

<sup>7)</sup> Journ. f. prakt. Chem. Bd. 96, S. 98. 1865.

<sup>8)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 37, 1, S. 696. 1904.

Flocken, durch Sublimat schon bei gewöhnlicher Temperatur gefällt, noch bei 30 000facher Verdünnung entsteht Trübung. Vgl. auch § 136.

**Methylierung.** Aus dem Xanthin entsteht durch Methylierung (Erhitzen von Xanthinblei mit Jodmethyl auf 100°) Theobromin (E. Fischer<sup>1</sup>), aus dem Theobromin durch weitere Methylierung Coffein (Strecker<sup>2</sup>).

**Umwandlungen.** Beim Erwärmen mit chlorsaurem Kali und Salzsäure zerfällt es in Alloxan und Harnstoff (E. Fischer). Mit starker Salzsäure im geschlossenen Rohr über 200° erhitzt zersetzt es sich in Ammoniak, Kohlensäure, Ameisensäure (resp. Kohlenoxyd und Wasser) und Glykokoll (E. Schmidt<sup>3</sup>). Ein in verschiedenen Organen vorhandenes Ferment vermag bei Gegenwart von Sauerstoff Xanthin zu Harnsäure zu oxydieren.

**Nachweis.** Zum Nachweis dienen folgende Reaktionen:

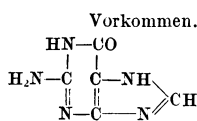
1. **Xanthinprobe.** Mit Salpetersäure abgedampft gibt eine Probe Xanthin einen gelben Rückstand, der durch Natronlauge rot und dann beim Erhitzen purpurrot gefärbt wird.

2. **Weidelsche Probe\*).** Kocht man eine kleine Menge von Xanthin mit frischem Chlorwasser oder Salzsäure und wenig chlorsaurem Kali, verdunstet dann auf dem Wasserbad zur Trockne und bringt den weißen oder schwach gelben Rückstand unter einer Glasglocke in eine Ammoniakatmosphäre, so färbt er sich in kurzer Zeit dunkelrosenrot (Murexidreaktion<sup>4</sup>).

3. Bringt man auf einem Uhrglase etwas Chlorkalk in Natronlauge, rührt um und trägt eine Probe Xanthin ein, so bildet sich um die Körnchen desselben zuerst ein dunkelgrüner, bald sich braun färbender Hof, der dann wieder verschwindet.

In zweifelhaften Fällen, besonders zur sicheren Unterscheidung von synthetischen Produkten empfiehlt E. Fischer<sup>5</sup>) die Umwandlung in Bromxanthin und Bromcoffein.

4. Eine Lösung in verdünnter Natronlauge färbt sich auf Zusatz von etwas Diazobenzolsulfosäure rot (Burian<sup>6</sup>).



138. **Guanin (2-Amino-6-Oxypurin)**  $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}_5\text{O}$ . Guanin findet sich in weiter Verbreitung in den Geweben (§ 136). Außerdem ist es der hauptsächliche Bestandteil der Exkremente von Spinnen und in wechselnder, aber nicht bedeutender Menge im Perugano vorhanden. Im menschlichen Harne ist es bis jetzt nicht mit Sicherheit nachgewiesen, aber in menschlichen Faeces. In der Kuhmilch ist es von Voegtlin und Sherwin<sup>7</sup>) nachgewiesen. Häufig treten körnige Ablagerungen von Guanin in den Muskeln kranker Schweine, ebenso in ihren Gelenken und Bändern auf (Virchow<sup>8</sup>). Guanin findet sich als irisierende Krystalle in den Fischschuppen und der Fischblase (Voit<sup>9</sup>), auch im Retinaepithel von Fischen ist es reichlich gefunden. Die Ophthalmolithen von delle Chiaje in verschiedenen Fischen enthalten Guaninkalk wie die weißen Krystalle der Fischschuppen usw.<sup>10</sup>).

\*) Diese Reaktion stammt, wie E. Fischer nachgewiesen hat, nicht von Weidel. Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 30, S. 2236. 1897.

<sup>1</sup>) Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 215, S. 311. 1882.    <sup>2</sup>) desgl. Bd. 118, S. 170. 1861.

<sup>3</sup>) Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 217, S. 308. 1883.

<sup>4</sup>) Kossel: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 6, S. 426. 1882. — E. Fischer: a. a. O.

<sup>5</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 31, 3, S. 2563. 1898.    <sup>6</sup>) desgl. Bd. 37, 1, S. 696. 1904.

<sup>7</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 33, S. 145. 1918,

<sup>8</sup>) Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. Bd. 35, S. 358. 1866 u. Bd. 36, S. 147. 1866.

<sup>9</sup>) Zeitschr. f. wiss. Zool. Bd. 15, Heft 4. 1865. — Bethe: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 20, S. 472. 1895.

<sup>10</sup>) Kühne u. Sewall: Untersuch. a. d. physiol. Inst. zu Heidelberg, Tl. 3, S. 221. 1880. — Krukenberg u. Ewald: desgl. Teil 4, S. 253. 1881.

Die synthetische Darstellung gelang E. Fischer<sup>1)</sup> durch Umwandlung von Trichlorpurin Synthese. (§ 137) durch Erhitzen mit Kalilauge in 6-Oxy-2, 8-Dichlorpurin, Überführung dieses letzteren durch Erhitzen mit alkoholischem Ammoniak in Chlorguanin und Reduktion des Chlorguanins durch Jodwasserstoff. Eine andere Synthese von Guanidin und Cyanessigester aus hat Traube<sup>2)</sup> angegeben.

Um aus dem Perugano Guanin zu gewinnen, kocht man ihn nach Strecker<sup>3)</sup> mit verdünnter Kalkmilch aus, solange die abfiltrierte Flüssigkeit noch gefärbt erscheint, und darauf mit Sodalösung, solange diese etwas aufnimmt. Beim Übersättigen der filtrierten Flüssigkeit mit Essigsäure scheidet sich das Guanin mit etwas Harnsäure aus. Der entstandene Niederschlag wird mit verdünnter Salzsäure zum Kochen erhitzt, filtriert und im Filtrate das Guanin durch Ammoniak gefällt. Ein anderes Verfahren hat Wulff<sup>4)</sup> angegeben. Auch die Schuppen von *Alburnus lucidus* sind ein geeignetes Material zur Darstellung von Guanin (Bethe, Burian und Hall<sup>5)</sup>). Bethe erhielt 1—1,5%.

Über die Darstellung des Guanins aus Thymonucleinsäure s. § 276, über Isolierung und Bestimmung s. die Hinweise § 136.

Das Guanin bildet ein farbloses, gewöhnlich amorphes, in Wasser, Alkohol, Äther unlösliches, in Ammoniak schwerlösliches Pulver. In Alkalien löst es sich leicht, ebenso in Mineralsäuren, auch in verdünnten. Versetzt man eine sehr verdünnte warme Lösung von Guanin in Lauge mit ungefähr  $\frac{1}{3}$  Vol. Alkohol und überschüssiger Essigsäure, so scheidet es sich in ziemlich großen, makroskopischen, krystallwasserfreien Drusen (mikroskopisch den Kreatininchlorzinkkrystallen ähnlich) aus (Horbaczewski<sup>6)</sup>). Es verbindet sich mit Basen, ebenso mit Säuren, und zwar mit 1 oder 2 Äquivalenten. Die Salze zerlegen sich im allgemeinen leicht in wässriger Lösung unter Abscheidung von Guanin.

Das einfach salzsaure Salz bildet eine Doppelverbindung mit Platinchlorid. Das schwer lösliche Sulfat  $(C_5H_5N_5O)_2 \cdot H_2SO_4$  krystallisiert mit 2 Mol. Wasser, die bei 120° entweichen, und unterscheidet sich dadurch von dem ihm sehr ähnlichen Sulfat des synthetischen 6-Amino-2-Oxypurins, das mit einem bei 120° nicht entweichenden Molekül Wasser krystallisiert (E. Fischer<sup>7)</sup>). (Letzteres ist zwar bisher im Körper nicht gefunden, könnte aber als Oxydationsprodukt des Adenins wohl vorkommen.) Durch Metaphosphorsäure wird Guanin fast quantitativ gefällt als  $C_5H_5N_5O \cdot HPO_3 + xH_2O$ . Diese Verbindung ist im Gegensatz zu den meisten anderen Salzen des Guanins, die leicht dissoziieren, sehr beständig und in Wasser und verdünnten Säuren äußerst wenig löslich (Wulff<sup>8)</sup>). (Hypoxanthin wird nicht gefällt, Adeninmetaphosphat löst sich im Überschuss des Fällungsmittels.) Das Phosphorwolframat fällt bei Gegenwart einer Säure als ziegelroter Niederschlag. Über seine Löslichkeit in Acetonwasser s. Wechsler<sup>9)</sup>. Pikrinsäure ruft auch in noch sehr verdünnten Lösungen von Guaninsalzen je nach der Verdünnung sofort oder allmählich einen Niederschlag goldgelber, in kaltem Wasser fast unlöslicher Krystalle  $C_5H_5N_5O \cdot C_6H_3N_3O_7 + H_2O$  hervor (Capranica<sup>10)</sup>, Wulff). (Adenin gibt eine ähnliche Fällung, Xanthin und Hypoxanthin geben leicht oder leichter lösliche Pikrate.) Guaninpikrat löst

<sup>1)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 30, 2, S. 2251. 1897.

<sup>2)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 33, 1, S. 1371. 1900 u. Bd. 46, 3, S. 3843. 1913.

<sup>3)</sup> Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 118, S. 152. 1861.

<sup>4)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 17, S. 468. 1893. <sup>5)</sup> desgl. Bd. 38, S. 385. 1903.

<sup>6)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 23, S. 226. 1897.

<sup>7)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 30, 2, S. 2247. 1897.

<sup>8)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 17, S. 468. 1893. <sup>9)</sup> desgl. Bd. 73, S. 138. 1911.

<sup>10)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 4, S. 233. 1880.

sich nicht in verdünntem Ammoniak, während Adenin- und Hypoxanthin-pikrat sich leicht lösen (Meisenheimer<sup>1</sup>). In einer Lösung von Guanin in Normalnatronlauge ruft Pikrolonsäure einen Niederschlag hervor, der aus Wasser umkrystallisiert der Formel  $C_5H_5N_5O \cdot 2 C_{10}H_8N_4O_5$  entspricht (Levene<sup>2</sup>).

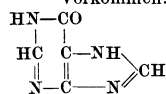
mit Silber. Versetzt man eine heiße, mit Pikrinsäure versetzte Lösung eines Guaninsalzes, bevor sich das Guanin-pikrat abscheidet, mit Silbernitrat, so bildet sich sofort ein citronengelber, amorpher Niederschlag  $C_5H_4AgN_5O \cdot C_6H_3N_3O_7 + 1\frac{1}{2}H_2O$  (Wulff). Durch Silbernitrat wird Guanin in salpetersauren Lösungen gefällt als  $C_5H_5N_5O \cdot AgNO_3$ , in kalter Salpetersäure fast unlöslich, in kochender schwerlöslich, sich beim Erkalten in Nadeln ausscheidend.

Andere Verbindungen. Ferricyankalium in konzentrierter Lösung gibt mit sehr verdünnten Guaninsalzlösungen prismatische Krystalle von gelbbrauner Farbe, die in warmem Wasser löslich sind (Capranica, Wulff). (Xanthin und Hypoxanthin geben keinen Niederschlag.) Auf Zusatz von Kupfersulfat und Natriumhyposulfit fällt es schon in der Kälte als Kupferoxydulverbindung (Krüger<sup>3</sup>). Vgl. auch § 136. Über weitere Verbindungen des Guanins s. Wulff a. a. O., über die Verbindung mit Diazobenzolsulfosäure Burian<sup>4</sup>).

Umwandlungen. Salpetrige Säure wandelt es in Xanthin um, ebenso Fäulnis (Schindler<sup>5</sup>) und langes Kochen mit 25proz. Salzsäure (E. Fischer<sup>6</sup>). Ein in verschiedenen Organen vorhandenes Ferment vermag Guanin in Xanthin überzuführen. Durch Salzsäure und Kaliumchlorat wird es in Kohlensäure, Parabansäure und Guanidin umgewandelt. Mit starker Salzsäure im Rohr erhitzt, erfährt es die gleiche Zersetzung wie Xanthin (Wulff<sup>7</sup>). Durch ein aus Taubenexkrementen isoliertes Bacterium entstehen aus Guanin Kohlensäure, Harnstoff und Guanidin (Ulpiani und Cingolani<sup>8</sup>).

Nachweis. Nachweis. Das Guanin gibt die Xanthinprobe (s. § 137), nur mit dem Unterschied, daß die Färbung nach Laugezusatz braunrot und beim Erhitzen mehr blauviolett ist, ferner die Reaktion mit Diazobenzolsulfosäure (§ 137). Zur Unterscheidung von Xanthin und Hypoxanthin dient das beschriebene Verhalten gegen Pikrinsäure und Ferricyankalium (Reaktionen von Capranica), zur Unterscheidung von Hypoxanthin und Adenin das Verhalten gegen Metaphosphorsäure. Zur Erkennung unter dem Mikroskop eignet sich das salzsaure Salz, welches in langen, büschelförmig angeordneten Krystallen anschießt, sowie das Verhalten dieser Krystalle in polarisiertem Licht<sup>9</sup>).

Vorkommen. 139. Hypoxanthin (Sarkin, 6-Oxypurin)  $C_5H_4N_4O$ . In den Geweben kommt es in weiter Verbreitung vor (§ 136). Im normalen Harn finden sich geringe Mengen (Salomon<sup>10</sup>), ebenso in den Faeces und im Boden.



Synthese. Alkali in 6-Oxy-2, 8-Dichlorpurin und Reduktion dieses Körpers mit Jodwasserstoff erhalten (beste Darstellungsweise). Man gewinnt es auch durch Einwirkung von Kaliumnitrit auf Adenin in schwefelsaurer Lösung (Kossel<sup>11</sup>) und aus Harnsäure durch Chloroform und Natronlauge (Sundwik<sup>12</sup>).

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 114, S. 213. 1921.

<sup>2</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 4, S. 320. 1907.

<sup>3</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 18, S. 355. 1894.

<sup>4</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 37, 1, S. 696. 1904.

<sup>5</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 31, S. 441. 1889.

<sup>6</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 43, 1, S. 805. 1910.

<sup>7</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 17, S. 473. 1893.

<sup>8</sup>) Chem. Zentralbl. 1906, I, S. 694.

<sup>9</sup>) Behrens, Schiefferdecker u. Kossel: Das Mikroskop usw. 1889. S. 280.

<sup>10</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 11, S. 410. 1889.

<sup>11</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 30, 2, S. 2227. 1897.

<sup>12</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 10, S. 258. 1886. — Krüger: desgl. Bd. 18, S. 444. 1894.

<sup>13</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 23, S. 476. 1897 u. Bd. 26, S. 131. 1898/99.



Über Isolierung und Bestimmung s. die Hinweise § 136.

Es bildet farblose, mikroskopische Krystalle, löst sich nach E. Fischer Eigenschaften. bei 19° in etwa 1400 Tl. Wasser, in etwa 70 Tl. kochendem Wasser, fast gar nicht in Alkohol. In selbst sehr verdünnter Alkalilauge, Ammoniak, Barytwasser und verdünnten Mineralsäuren wird es leicht gelöst, auch in konzentrierter Schwefel- oder Salpetersäure. Es verbindet sich mit Basen, Säuren oder Salzen zu teilweise gut krystallisierenden Körpern.

In verdünntem Barytwasser gelöst gibt es bei Zusatz von konzentrierter Verbindungen: Barytlösung einen krystallinischen Niederschlag  $C_5H_4N_4O \cdot Ba(OH)_2$ . Das salz- mit Bariumhydroxyd saure Salz  $C_5H_4N_4O \cdot HCl + H_2O$  scheidet sich beim raschen Eindampfen in mit Salzsäure kleinen, wetzsteinförmigen Krystallen, beim langsamen Verdunsten in glashellen Krystallen ab. Ebenso wie die übrigen Salze des Hypoxanthins zersetzt es sich beim Umkrystallisieren. Fügt man zu der heißen Lösung des salzsauren Salzes Platinchlorid, so krystallisiert beim Erkalten das Platindoppelsalz mit Platinchlorid  $(C_5H_4N_4O \cdot HCl)_2 \cdot PtCl_4$  aus. In heißer verdünnter Salpetersäure gelöstes mit Salpetersäure Hypoxanthin scheidet sich beim Erkalten in wetzsteinförmigen Krystallen  $C_5H_4N_4O \cdot HNO_3 + H_2O$  ab, die in Wasser leicht-, in Salpetersäure schwerlöslich sind (Krüger und Salomon<sup>1</sup>). Aus Hypoxanthinlösungen scheiden sich auf Zusatz von Pikrinsäure je nach Konzentration der Lösung schneller mit Pikrinsäure oder langsamer gelbe, glänzende, tafelförmige Krystalle von Hypoxanthin-pikrat mit 1 Mol. Wasser ab, die in Wasser im Verhältnis von 1 : 400—500 löslich sind (Wulff<sup>2</sup>), Krüger und Salomon<sup>3</sup>), sich spielend in Ammoniak lösen (ebenso wie Adenin-pikrat) (Meisenheimer<sup>4</sup>).

Beim Zusammenbringen einer siedenden Lösung von Hypoxanthin-pikrat mit Silber. mit neutralem oder nur schwach saurem salpetersauren Silber bildet sich ein citronengelber Niederschlag von Hypoxanthinsilber-pikrat  $C_5H_3AgN_4O \cdot C_6H_3N_3O_7$ , der das Hypoxanthin fast quantitativ enthält (Bruhns<sup>5</sup>). Versetzt man Hypoxanthinlösungen mit ammoniakalischer Silberlösung in der Siedetemperatur, so entsteht ein Niederschlag von der Zusammensetzung  $C_5H_2Ag_2N_4O + H_2O$ , der mehrere Stunden bei 120° getrocknet in die Verbindung  $C_5H_2Ag_2N_4O + \frac{1}{2} H_2O$  übergeht. Durch Silbernitrat allein werden wässrige Hypoxanthinlösungen ebenfalls gefällt, aber der entstehende Niederschlag hat keine konstante Zusammensetzung, sondern stellt ein wechselndes Gemenge der Verbindungen  $C_5H_4N_4O \cdot AgNO_3$  und  $C_5H_4N_4O \cdot 2 AgNO_3$  dar. Behandelt man dasselbe mit Ammoniak (auch in der Kälte geht die Einwirkung leicht vor sich), so entsteht die Verbindung  $C_5H_2Ag_2N_4O + 3 H_2O$  und fügt man bei der Behandlung gleich überschüssiges Silbernitrat hinzu und trocknet bei 120°, so bildet sich quantitativ die ganz konstant zusammengesetzte Verbindung  $C_5H_2Ag_2N_4O + \frac{1}{2} H_2O$  (Bruhns).

Die Verbindungen mit Zinkoxyd und Quecksilberoxyd sind in Wasser Andere Ver- unlöslich; beim Versetzen einer Hypoxanthinlösung mit Quecksilberchlorid im bindungen. Überschuß entsteht ein schwerer Niederschlag von der Zusammensetzung  $C_5H_3N_4OHg_2Cl_3 + H_2O$  oder  $\frac{1}{2} H_2O$  (Bruhns). Beim Kochen mit essigsaurem Kupfer erhält man Hypoxanthinkupferoxyd als graubraunen Niederschlag. Durch Kupfersulfat und Natriumhyposulfit werden selbst 0,5proz. Lösungen in der Kälte nicht gefällt (Krüger<sup>6</sup>). Über die Verbindung mit Diazobenzol-sulfosäure s. Burian<sup>7</sup>). Durch basisch essigsaures Blei wird reines Hypoxanthin

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 26, S. 362. 1898/99.

<sup>2</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 17, S. 505. 1893. <sup>3</sup>) desgl. Bd. 24, S. 386. 1898.

<sup>4</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 114, S. 213. 1921. <sup>5</sup>) desgl. Bd. 14, S. 533. 1890.

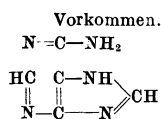
<sup>6</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 18, S. 355. 1894.

<sup>7</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 37, 1, S. 696. 1904.

nicht gefällt, aber durch Bleiacetat und Ammoniak. Vgl. auch § 136. Über weitere Verbindungen und Substitutionsprodukte s. bei Krüger<sup>1)</sup>. Mit Ätznatron und Äthylchlorocarbonat behandelt gibt das Hypoxanthin das Urethan desselben (Kossel<sup>2)</sup>). Beim Zusammenbringen von gleichen Teilen von Hypoxanthin und Adenin in heißer, wässriger Lösung scheiden sich beide Körper miteinander verbunden als schleimige, später kreideartige Masse aus (Bruhns).

**Umwandlungen.** Mit schmelzendem Kali auf 200° erhitzt liefert das Hypoxanthin Blausäure und Ammoniak (Kossel<sup>3)</sup>). Ein in verschiedenen Organen vorhandenes Ferment vermag bei Gegenwart von Sauerstoff Hypoxanthin zu Xanthin und Harnsäure zu oxydieren (§ 521).

**Nachweis.** Nachweis. Die Xanthinprobe und die Weidelsche Probe (§ 137) fallen negativ aus, dagegen gilt eine von Kossel für das Adenin angegebene Reaktion auch für das Hypoxanthin (s. § 140). Die Reaktion mit Diazobenzolsulfosäure (§ 137) fällt bei Vermeidung eines Alkaliüberschusses positiv aus (Burian<sup>4)</sup>).



**140. Adenin (6-Aminopurin) C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N<sub>5</sub>.** Es kommt in weiter Verbreitung in den Geweben vor (§ 136). Zuerst wurde es von Kossel<sup>5)</sup> aus dem Pankreas gewonnen. In kleinen Mengen ist es im Harn vorhanden (Krüger und Salomon<sup>6)</sup>), ebenso in den Faeces und im Boden. Es findet sich in der Kuhmilch (Voegtlin und Sherwin<sup>7)</sup>).

**Synthese.** Synthetisch wurde es von E. Fischer<sup>8)</sup> durch Überführung des Trichlorpurins (§ 137) durch Erhitzen mit Ammoniak in 6-Amino-2, 8-Dichlorpurin und Reduktion dieses Körpers mit Jodwasserstoff erhalten (beste synthetische Methode).

Zu seiner Darstellung benutzt man am besten Teelauge (Krüger<sup>9)</sup>).

Über Isolierung und Bestimmung s. die Hinweise § 136.

**Eigenschaften.** Adenin bildet farblose, lange, nadelförmige Krystalle mit 3 Mol. Krystallwasser oder wasserfreie, wetzsteinförmige Krystalle; die ersteren werden schon beim Liegen an der Luft, schneller beim Erwärmen undurchsichtig. Bringt man einige Krystalle in eine zur Lösung ungenügende Menge Wasser und erwärmt langsam, so sieht man bei 53° plötzlich Trübung der Krystalle auftreten (charakteristische Reaktion). Es sublimiert bei 220° und zersetzt sich bei 250° teilweise. Beim raschen Erhitzen im Capillarrohr schmilzt es plötzlich bei 360—365° unter starker Gasentwicklung, nachdem vorher leichte Bräunung eingetreten war. Es löst sich bei Zimmertemperatur in 1086 Tl. Wasser, leicht in heißem Wasser; die wässrige Lösung reagiert neutral. Es ist unlöslich in Äther, Chloroform, löslich in Eisessig, etwas löslich in heißem Alkohol. In Mineralsäuren, auch in Essigsäure wird es leicht gelöst, ebenso in Kali- oder Natronlauge, bei der Neutralisation fällt es wieder aus. In wässrigem Ammoniak ist es leichter löslich als Guanin, schwerer als Hypoxanthin. Mit sehr verdünnter Ammoniaklösung auf dem Wasserbade erwärmt geht es völlig in Lösung. Wird eine saure Lösung von Adenin mit kohlen-saurem Natron über-

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 18, S. 423. 1894. <sup>2)</sup> desgl. Bd. 16, S. 1. 1892.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 6, S. 429. 1882.

<sup>4)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 51, S. 425. 1907.

<sup>5)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 10, S. 250. 1886 u. Bd. 12, S. 241. 1888. — Thoiss u. Kossel: desgl. Bd. 13, S. 395. 1889. — Schindler: desgl. Bd. 13, S. 432. 1889. — Bruhns: desgl. Bd. 14, S. 533. 1890. — Bruhns u. Kossel: desgl. Bd. 16, S. 1. 1892. — Krüger: desgl. Bd. 16, S. 160 u. 329. 1892; Bd. 18, S. 423. 1894. — Wulff: desgl. Bd. 17, S. 468. 1893.

<sup>6)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 24, S. 364. 1898.

<sup>7)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 33, S. 145. 1918.

<sup>8)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 30, 2, S. 2238. 1897.

<sup>9)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 21, S. 274. 1895/96.

sättigt, so scheidet es sich außerordentlich langsam aus. Es verbindet sich mit Säuren, Basen und mit Salzen.

Die schwefelsaure, salzsaure und salpetersaure Verbindung krystallisieren, und zwar die erstere mit 2 Mol., die übrigen mit je  $\frac{1}{2}$  Mol. Krystallwasser. Das Sulfat löst sich in 153 Tl. Wasser, das Chlorhydrat in 41,9, das Nitrat in 110,6 Tl. Wasser. Sulfat und Chlorhydrat können umkrystallisiert werden, ohne dabei wie die entsprechenden Verbindungen des Hypoxanthins und des Guanins ihre Säure zu verlieren. Das aus neutralen und schwach sauren Lösungen durch Metaphosphorsäure ausgefällte amorphe Adeninmetaphosphat löst sich in einem größeren Überschuß der Säure (Wulff). Aus verdünnten Lösungen von salzsaurem Adenin fällt Platinchlorid nach einiger Zeit gelbe Nadeln ( $C_5H_5N_5 \cdot HCl$ )<sub>2</sub> · PtCl<sub>4</sub>. Kocht man eine Lösung dieses Salzes längere Zeit, so fällt ein gelbes Pulver  $C_5H_5N_5 \cdot HCl \cdot PtCl_4$  aus, welches in kaltem Wasser sehr wenig löslich ist. Setzt man zu einer Lösung von salzsaurem Adenin Goldchlorid, so scheidet sich Adeningoldchlorid  $C_5H_5N_5 \cdot (HCl)_2 \cdot AuCl_3 + H_2O$  zum Teil in blattförmigen Aggregaten, zum Teil in würfelförmigen oder prismatischen Krystallen oft mit abgestumpften Ecken und von ansehnlicher Größe ab. Dieser Niederschlag ist zur Erkennung, auch zur mikroskopischen, gut geeignet, weil die anderen Nucleinbasen keine derartigen krystallinischen Goldverbindungen geben. Aus konzentrierter Lösung von salzsaurem Adenin fällt auf Zusatz von Goldchlorid ein Golddoppelsalz von anderer Zusammensetzung in gelben, nadel-förmigen Krystallen aus (Krüger und Salomon<sup>1</sup>). Das Oxalat scheidet sich in voluminösen, rundlichen Massen ab und unterscheidet sich hierdurch sowie durch seine geringe Löslichkeit von den entsprechenden Salzen des Hypoxanthins, Xanthins und Guanins. Wässrige Adeninlösungen werden (bei Abwesenheit von Natriumphosphat) durch Pikrinsäure gefällt, der Niederschlag besteht aus büschelförmig gruppierten Nadeln, die 1 Mol. Krystallwasser enthalten und beim Umkrystallisieren aus heißem Wasser sich als dunkelgelbe, wasserfreie, makroskopische Prismen abscheiden (Krüger und Salomon<sup>1</sup>). Die Löslichkeit in Wasser, auf wasserfreies Salz berechnet, ist 1 : 3500. Sonach eignet sich diese Verbindung sowohl zum Nachweis des Adenins wie zur quantitativen Bestimmung und zur Trennung von Hypoxanthin, für letzteren Zweck aber nur dann, wenn man einen Überschuß des Fällungsmittels vermeidet, das Adeninpikrat alsbald nach der Fällung abfiltriert und die Hypoxanthinlösung nicht zu konzentriert ist (Wulff). Das Pikrat löst sich sehr leicht in verdünntem Ammoniak (ebenso wie Hypoxanthin-pikrat) (Meisenheimer<sup>2</sup>).

Um aus dem Pikrat das Adenin zu gewinnen, löst man es in 10 proz. Ammoniak, so daß die Lösung etwa 0,5% Adenin enthält, fällt mit ammoniakalischer Silberlösung, filtriert den gelatinösen Niederschlag ab, suspendiert ihn in kochendem Wasser und zersetzt ihn mit Salzsäure. Aus dem Filtrat scheidet sich eine kleine Menge Adenin-pikrat ab, von dem abfiltriert wird. Nun schüttelt man die Lösung mit wenig Äther aus, neutralisiert mit Natronlauge und fällt mit Kupfersulfat und Natriumbisulfid, filtriert den Niederschlag ab, zersetzt ihn mit Schwefelwasserstoff und filtriert. Das beim Einengen zurückbleibende Adenin wird aus heißer 5 proz. Schwefelsäure krystallisiert (Barnett und Jones<sup>3</sup>).

Auch alkoholische Pikrolonsäurelösung ruft in Adeninsulfatlösung einen Niederschlag hervor, der aus heißem Wasser umkrystallisiert der Formel  $C_5H_5N_5 \cdot C_{10}H_8N_4O_5$  entspricht und bei 265° schmilzt (Levene<sup>4</sup>).

Adenin-pikrat in heißer Lösung gibt mit salpetersaurem Silber einen Niederschlag von Adeninsilberpikrat  $C_5H_4AgN_5 \cdot C_6H_3N_3O_7 + H_2O$ . Versetzt man

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 24, S. 393. 1898.

<sup>2</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 114, S. 213. 1921.

<sup>3</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 9, S. 93. 1911.

<sup>4</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 4, S. 320. 1907.

eine ammoniakalische Adeninlösung mit ammoniakalischer Silberlösung, so entsteht ein Niederschlag von der Zusammensetzung  $C_5H_4AgN_5$ , wenn die Quantität des hinzugefügten Silbers ungefähr 1 Atom Silber auf 1 Mol. Adenin entspricht, von der Zusammensetzung  $C_5H_3Ag_2N_5 + H_2O$  hingegen, wenn beträchtlicher Silberüberschuß angewandt wird. Löst man Adeninsilber in heißer Salpetersäure, so scheiden sich beim Erkalten nadelförmige Krystalle aus, welche keine konstante Zusammensetzung haben und offenbar Gemenge von  $C_5H_5N_5 \cdot AgNO_3$  und  $C_5H_5N_5 \cdot 2 AgNO_3$  sind.

Andere Verbindungen.

Die wässrige Lösung des Adenins gibt einen Niederschlag mit alkoholischer Chlorzinklösung, ebenso mit Quecksilberchlorid, und zwar entsteht in der Hitze eine weiße, körnige Fällung von  $C_5H_4N_5HgCl$ , in der Kälte eine weiße, flockige Fällung  $C_5H_4N_5Hg_2Cl_3$ ; Niederschläge entstehen ferner mit Quecksilbernitrat, Kupfersulfat, Cadmiumchlorid, Ferro- und Ferrikaliumcyanid nach Zusatz von Essigsäure. Kupfersulfat und Natriumhyposulfit fallen Adenin noch aus sehr verdünnter Lösung in der Kälte als Kupferoxydulverbindung (Krüger<sup>1</sup>). Basisches Bleiacetat gibt keine Fällung, ebensowenig Bleiacetat und Ammoniak. Vgl. auch § 136. Über eine Verbindung mit Diazobenzolsulfosäure s. Burian<sup>2</sup>).

Umwandlungen.

Gegen Säuren und Alkalien, auch gegen Oxydationsmittel ist das Adenin sehr widerstandsfähig. Durch salpetrige Säure, ebenso durch Fäulnis bei Luftabschluß (besonders auch durch *Bact. coli*) wird es in Hypoxanthin übergeführt. Auch ein in verschiedenen Organen vorhandenes Ferment vermag Adenin in Hypoxanthin umzuwandeln. Beim Erhitzen mit Kali im Ölbad auf 200° bildet sich reichliche Menge von Blausäure. Bei der Reduktion mit Zink und Salzsäure auf dem Wasserbade geht es in einen Körper über, der höchstwahrscheinlich Azulminsäure ist. Mit Salzsäure im zugeschmolzenen Glasrohr auf 180—200° erhitzt zerfällt es in Ammoniak, Kohlensäure, Ameisensäure und Glykokoll.

Nachweis.

Zum Nachweis dienen folgende Reaktionen: Die Xanthinprobe (§ 137) und die Weidelsche Probe (§ 137) sind negativ, die Reaktion mit Diazobenzolsulfosäure (§ 137) bei Vermeidung eines Alkaliüberschusses nach Burian positiv. Indessen geben Steudel<sup>3</sup>) sowie Ackermann und Kutscher<sup>4</sup>) an, daß reines Adenin diese Reaktion nicht gibt. Folgendes von Kossel beobachtete Verhalten ist charakteristisch. Adenin wird  $\frac{1}{2}$  Stunde im Reagensglase mit Zink und Salzsäure im Wasserbad erwärmt; währenddessen tritt eine vorübergehende schöne Purpurfärbung auf (E. Fischer); die filtrierte und mit Natronlauge stark alkalisch gemachte Flüssigkeit färbt sich beim Stehen an der Luft langsam, schneller beim Schütteln anfangs rubinrot, später braunrot (Azulminsäure). Hypoxanthin gibt dieselbe Reaktion (nur sind die Farbenercheinungen schwächer), Guanin nicht. Zur Erkennung kann auch das Verhalten der Krystalle beim Erwärmen (s. oben) und das mikroskopische Verhalten des Golddoppelsalzes benutzt werden.

#### *Methyl-derivate des Xanthins und Guanins.*

1-Methylxanthin, Heteroxanthin, Paraxanthin, Epiguanin und Episarkin sind fast ausschließlich im Harn gefunden. Die ersten drei sind als Umwandlungsprodukte mit der Nahrung (Kaffee, Tee, Kakao) eingeführter Purinkörper (Coffein, Theobromin u. a.) aufzufassen, denn sie fehlten im Harn eines Menschen, der keinen Kaffee und Tee zu sich nahm (M. Krüger<sup>5</sup>).

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 18, S. 355. 1894.

<sup>2</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 37, 1, S. 696. 1904. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 51, S. 425. 1907.

<sup>3</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 48, S. 429. 1906.

<sup>4</sup>) Zeitschr. f. Biol. Bd. 75, S. 317. 1922.

<sup>5</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 15, S. 361. 1909.

Coffein, Theobromin, Theophyllin, 3-Methylxanthin sind im Harn von Menschen, Hunden und Kaninchen nur nach Eingabe größerer Dosen Coffein resp. Theobromin oder Theophyllin gefunden worden.

141. **1-Methylxanthin**  $C_6H_6N_4O_2$  wurde von Krüger und Salomon<sup>1)</sup> im menschlichen Harn, in dem es in kleiner Menge vorkommt, entdeckt und findet sich auch im Harn von Kaninchen nach Eingabe von Paraxanthin und Coffein (Krüger<sup>2)</sup>. Nach Okerblom<sup>3)</sup> soll es bei der Autolyse der Nebennieren auftreten.

Synthetisch wurde es von Engelmann<sup>4)</sup> und von Traube und Dudley<sup>5)</sup> dargestellt. Über die Isolierung aus Harn s. § 146.

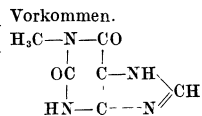
Es scheidet sich aus Wasser als farbloses Krystallpulver (mikroskopische, gleichförmige Rosetten ab), beim Eindampfen seiner salzsauren oder ammoniakalischen Lösungen in lockeren Massen von irisierendem Glanze. Am besten krystallisiert es aus essigsaurer Lösung, und zwar in dünnen, sechsseitigen, seltener vierseitigen Blättchen (Krüger<sup>6)</sup>). In kaltem Wasser ist es schwer löslich, aber erheblich leichter als Xanthin; leichtlöslich in Ammoniak und Natronlauge, verdünnten Säuren, auch in Salpetersäure (Unterschied von Xanthin). Es bildet keine schwerlösliche Natriumverbindung wie Heteroxanthin, kein schwerlösliches Barytsalz wie 3-Methylxanthin. Das salzsaure Salz krystallisiert in schönen, glasglänzenden, rhombischen Blättchen und Säulen. Die Salze werden ebenso wie Xanthin- und Heteroxanthinsalze durch Wasser leicht dissoziiert. Golddoppelsalz glänzende rhombische Säulen, Chloroplatinat sternförmig gruppierte Nadeln oder Prismen. Durch Ammoniak und Silbernitrat wird es gelatinös gefällt. Das 1-Methylxanthinsilbernitrat scheidet sich aus Salpetersäure in zu Rosetten vereinigten Nadelchen aus, genau wie die entsprechende Xanthinverbindung und ist auch wie diese in Salpetersäure schwer löslich. Kupfersulfat und Natriumbisulfit fällen schon in der Kälte, Kupfersulfat und Thiosulfat nur in der Wärme die Kupferoxydulverbindung. Bei der Methylierung geht es in Theophyllin und Coffein über.

Nachweis. Die Xanthinprobe (§ 137) fällt positiv aus, auf Zusatz von Natronlauge tritt eine Orangefärbung ein, die Weidelsche Reaktion (§ 137) ebenfalls positiv<sup>7)</sup>.

142. **Heteroxanthin (7-Methylxanthin)**  $C_6H_6N_4O_2$  wurde zuerst von Salomon<sup>8)</sup> aus Menschenharn, dann auch aus Hundeharn gewonnen. Nach Bresler<sup>9)</sup> findet es sich auch im Saft der Zuckerrübe. Eingegebenes Theobromin<sup>10)</sup> erscheint im Harn von Menschen, Hunden und Kaninchen (Bondzynski und Gottlieb<sup>10)</sup>, eingegebenes Coffein (Krüger<sup>11)</sup> im Harn von Kaninchen, z. T. als Heteroxanthin.

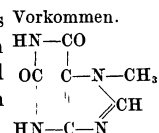
Synthetisch wurde es von E. Fischer<sup>12)</sup> aus Theobromin und von Traube und Dudley aus Guanin gewonnen. Über die Isolierung aus Harn s. § 146.

Es ist ein weißes Pulver, krystallisiert in zu Rosetten vereinigten Nadelchen. Beim raschen Erhitzen im Capillarrohr beginnt es über 360° zu sintern und sich zu färben und schmilzt erst gegen 380° unter Gasentwicklung. Es löst sich sehr schwer in kaltem, viel leichter in heißem Wasser (1 Tl. in 142 Tl.) mit neutraler Reaktion, ist unlöslich in Alkohol oder Äther, leichtlöslich in Ammoniak und in übersättigter, heißer Salzsäure; es gibt mit Salzsäure eine in langen Nadeln krystallisierende, schwerlösliche Verbindung, die schon durch kaltes Wasser zersetzt wird. Noch schwerer löslich ist das salpetersaure Salz, welches aus 10 proz. Salpetersäure ziemlich schnell auskrystallisiert. Auf Zusatz von Platinchlorid zur salzsauren Lösung entsteht ein krystallisierendes Doppelsalz. Löst man salzsaures Heteroxanthin in erwärmter verdünnter Natronlauge, so scheiden sich nach dem Erkalten glitzernde Krystalle aus, meist schiefwinklige Tafeln (häufig Zwillingskrystalle) von Heteroxanthinnatrium (lufttrocken mit 5 Mol. Wasser). Die heiße wässrige Lösung scheidet beim Durchleiten von Kohlensäure oder auf Zusatz von Essigsäure Heteroxanthin krystallinisch aus. Sowohl salpetersaure als ammoniakalische Lösungen werden durch salpetersaures Silber gefällt, die Niederschläge lösen sich leicht beim Erwärmen schon in sehr verdünnter Salpetersäure, und aus der Flüssigkeit scheidet sich nach dem Einengen salpetersaures Heteroxanthinsilber in kleinen,



Eigenschaften.

Nachweis.



Eigenschaften.

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 24, S. 364. 1898 u. Bd. 26, S. 350. 1898/99.

<sup>2)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 32, 3, S. 2680 u. 3336. 1899.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 28, S. 60. 1899.

<sup>4)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 42, 1, S. 177. 1909. <sup>5)</sup> desgl. Bd. 46, 3, S. 3839. 1913.

<sup>6)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 33, 3, S. 3665. 1900.

<sup>7)</sup> Näheres über diese Reaktion Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 24, S. 382. 1898.

<sup>8)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 18, 2, S. 3407. 1885. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 11, S. 412. 1887. — Salomon u. Neuberg: Salkowski-Festschrift. Berlin: Hirschwald 1904, S. 37.

<sup>9)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 41, S. 535. 1904.

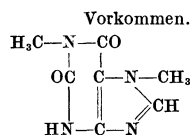
<sup>10)</sup> Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 36, S. 45. 1895. — Krüger u. Schmidt: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 32, S. 2677. 1899. Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 45, S. 259. 1901.

<sup>11)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 32, 3, S. 3336. 1899. <sup>12)</sup> desgl. Bd. 30, 3, S. 2400. 1897.

rombischen Blättchen und Prismen ab. Diese Verbindung ist in Salpetersäure schwer löslich, aber leichter als die entsprechende Xanthinverbindung. Durch Kupfersulfat und Natriumbisulfid wird es als Kupferoxydulverbindung gefällt, bei schwachem Erwärmen auch aus sehr verdünnter Lösung, durch Kupfersulfat und Natriumthiosulfat erst beim Erwärmen. Kupferacetat, Phosphorwolframsäure, basisches Bleiacetat + Ammoniak, Quecksilberchlorid schon in geringer Menge rufen Niederschläge hervor. Pikrinsäure gibt keinen Niederschlag.

**Umwandlungen.** Beim Erhitzen mit konz. Salzsäure im zugeschmolzenen Rohr auf 180—200° zerfällt es in Kohlensäure, Kohlenoxyd, Ammoniak und Sarkosin und durch Einwirkung von Methyljodid in alkoholischer Kalilauge entsteht Coffein.

**Nachweis.** Nachweis. Die Xanthinprobe (§ 137) fällt negativ, die Weidelsche Probe (§ 137) dagegen positiv aus. Das Verhalten gegen Natronlauge ist auch zum mikroskopischen Nachweis kleinster Mengen reiner Base geeignet.

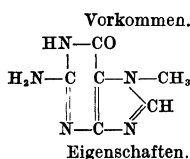


**143. Paraxanthin (1·7-Dimethylxanthin) C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>.** Dieser mit Theobromin und Theophyllin isomere Körper ist von Thudichum<sup>1)</sup>, außerdem von Salomon<sup>2)</sup> aus menschlichem Harn gewonnen und besonders von Salomon näher untersucht worden. Die im Harn vorkommenden Mengen sind äußerst gering. Eingegebenes Coffein (Krüger<sup>3)</sup> erscheint im Harn von Kaninchen und Hunden zum Teil als Paraxanthin.

Synthetisch wurde es zuerst von E. Fischer<sup>4)</sup> dargestellt. Traube und Dudley erhielten es aus Guanin. Über die Isolierung aus Harn s. § 146.

**Eigenschaften.** Es wurde in farblosen, glänzenden, wasserfreien Krystallen, meist sechsseitigen Tafeln, die in Büscheln und Rosetten angeordnet sind, erhalten; zuweilen krystallisiert es auch mit Wasser. Es schmilzt bei 295—296° und gibt bei stärkerem Erhitzen weiße Dämpfe mit Isonitrilgeruch. Es ist in kaltem Wasser viel leichter als Xanthin und seine übrigen Homologen löslich, noch leichter löslich in heißem Wasser (in ungefähr 24 Tl.) mit neutraler Reaktion, unlöslich in Alkohol und Äther, dagegen löslich in Ammoniak, Salzsäure und Salpetersäure. In konzentrierter Lösung fällt Natronlauge Paraxanthinnatrium in langen glänzenden, teils isolierten, teils in Büscheln gruppierten Tafeln; werden dieselben in Wasser gelöst und diese Lösung neutralisiert, so scheidet sich Paraxanthin krystallinisch aus. Ebenso kommt es zu einer krystallinischen Ausscheidung von Paraxanthin, wenn man die Krystalle von Paraxanthinnatrium in Lösungen von sauren Salzen oder Ammoniaksalzen einträgt. In ammoniakalischer Lösung wird Paraxanthin durch salpetersaures Silber flockig oder gelatinös gefällt und diese Niederschläge, in heißer Salpetersäure gelöst, scheiden sich beim Erkalten in Krystallbüscheln ab. Pikrinsäure gibt in salzsauren Lösungen krystallinischen Niederschlag, Platinchlorid gibt orangefarbiges Doppelsalz\*). Kupferacetat, Phosphorwolframsäure, basisches Bleiacetat und Ammoniak sowie Quecksilberchlorid im Überschuß geben Niederschläge, salpetersaures Quecksilber nicht. Durch Erwärmen mit Jodmethyl in alkalischer Lösung geht es in Coffein über (E. Fischer).

**Nachweis.** Nachweis. Die Xanthinprobe (§ 137) fällt negativ, die Weidelsche Probe (§ 137) positiv aus; außerdem ist das Verhalten gegen Natronlauge charakteristisch.



**144. Epiguanin (7-Methylguanin) C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>N<sub>5</sub>O** wurde von Krüger und Wulff<sup>5)</sup> im menschlichen Harn entdeckt.

E. Fischer<sup>6)</sup> stellte es synthetisch dar. Über die Darstellung aus Harn s. § 146.

Es krystallisiert aus Wasser in feinen Nadeln, aus ammoniakhaltigem Wasser in glänzenden, prismatischen Krystallen; lufttrocken stellt es eine verfilzte Masse von mattem Seidenglanz dar. Beim raschen Erhitzen beginnt sie gegen 390° sich zu färben und verkohlt bei höherer Temperatur ohne zu schmelzen. In kaltem Wasser fast unlöslich, in heißem schwerlöslich, desgleichen in Ammoniak, leichtlöslich in verdünnter Natronlauge, Salzsäure und Schwefelsäure, schwer in verdünnter Salpetersäure. Aus der Lösung in heißer, starker Natronlauge krystallisiert die Natriumverbindung in breiten, glänzenden Nadeln. Das Pikrat (zur Identifizierung geeignet) krystallisiert in Blättchen oder zu Büscheln vereinigten Nadeln, löst sich in ungefähr 2700 Tl. Wasser von 18°, beginnt bei etwa 253° zu sintern und zersetzt sich bei 257° unter Gasentwicklung. Chloroplatinat

\*) Über die Krystallformen s. Krüger u. Salomon: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 24, S. 376. 1898.

<sup>1)</sup> Ann. of chem. med. London 1879, I, S. 160.

<sup>2)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 16, 1, S. 195. 1883; Bd. 18, 2, S. 3406. 1885. Zeitschr. f. klin. Med. Supplbd. 7, S. 63. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 11, S. 410. 1887; Bd. 15, S. 319. 1891. Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. Bd. 125, S. 554. 1891. — Kossel: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 13, S. 302. 1889.

<sup>3)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 32, 3, S. 2818 u. 3336. 1899.

<sup>4)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 30, 3, S. 2400. 1897 u. Bd. 31, 3, S. 2622. 1898.

<sup>5)</sup> Arch. f. Anat. u. Physiol., physiol. Abt. 1894, S. 553. — Krüger u. Salomon: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 24, S. 387. 1898 u. Bd. 26, S. 389. 1898/99.

<sup>6)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 30, 3, S. 2411. 1897.

sechseckige, orangefarbene Prismen. Wässrige Lösungen werden durch Ammoniak und Silbernitrat gelatinös, durch Kupfersulfat und Natriumbisulfat schon in der Kälte, durch Kupfersulfat und Natriumthiosulfat erst in der Wärme gefällt, durch Bleiacetat, basisches Bleiacetat, Bleiacetat und Ammoniak nicht gefällt. Durch salpetrige Säure wird es in Heteroxanthin verwandelt.

Nachweis. Die Xanthinprobe (§ 137) fällt positiv aus, aber sehr viel weniger intensiv als beim Xanthin, die Weidelsche Probe (§ 137) ebenfalls positiv. Außerdem sind die Natriumverbindung und das Pikrat charakteristisch.

**Episarkin.** Unter diesem Namen beschreibt Balke<sup>1)</sup> einen von ihm aus menschlichem Harn isolierten Körper, der in kaltem Wasser fast unlöslich, in heißem Wasser schwerlöslich ist und in glasglänzenden Nadeln krystallisiert. In Salzsäure ist es leicht löslich; mit Silbernitrat gibt es einen in Salpetersäure unlöslichen, in Ammoniak ziemlich leicht löslichen Niederschlag, durch ammoniakalischen Bleiessig wird es gefällt, durch Pikrinsäure nicht gefällt. Der Körper ist vielleicht identisch mit Epiguanin, vgl. darüber Krüger und Salomon<sup>2)</sup>.

Nachweis. Die Xanthinprobe (§ 137) fällt negativ, die Weidelsche Probe (§ 137) positiv aus.

### Carnin.

145. Carnin  $C_7H_8N_4O_3$  wurde von Weidel<sup>3)</sup> im Fleischextrakt gefunden. Nach Krukenberg und Wagner<sup>4)</sup> ist es in den Muskeln einiger Süßwasserfische und im Froschfleisch vorhanden. Sein Vorkommen im Harn ist bisher nicht bewiesen. v. Lippmann<sup>5)</sup> wies es im Rübensaft nach. Nach Haiser und Wenzel<sup>6)</sup> ist das Carnin ein äquimolekulares Gemisch von Hypoxanthin und Inosin (§ 272).

Zur Darstellung aus Fleischextrakt nach Weidel fällt man die wässrige Lösung mit Barytwasser und das Filtrat mit Bleiessig aus. Der abfiltrierte Bleiniederschlag wird mit Wasser ausgekocht, das heiße Filtrat durch Einleiten von Schwefelwasserstoff und Filtration von Blei befreit und auf ein kleines Volumen eingedampft. Beim Erkalten scheidet sich das Carnin zuweilen schon als krümeliger, noch sehr gefärbter Krystallschlamm aus. Die ev. filtrierte Flüssigkeit wird mit einer konz. Silbernitratlösung ausgefällt, der Niederschlag, welcher Chlorsilber und Carninsilberoxyd enthält, mit Wasser gewaschen, durch nicht zu viel Ammoniakflüssigkeit vom Chlorsilber befreit und in heißem Wasser zerteilt. Leitet man nun Schwefelwasserstoff ein, filtriert heiß und dampft ein, so scheidet sich das Carnin ab; beim Entfärben mit Tierkohle bleibt ein Teil in dieser zurück. Ausbeute ungefähr 1% des Fleischextrakts.

Das Carnin bildet kreideweiße, feine und unregelmäßig begrenzte krystallinische Massen, welche bei 230° sich bräunen und bei 239° verkohlen. Es löst sich schwer in kaltem, leicht in heißem Wasser, ist nicht löslich in Alkohol oder Äther. Die wässrige Lösung reagiert neutral, wird nicht gefällt durch neutrales essigsaures Blei, Pikrinsäure, salpetersaures Quecksilber, wohl aber von basischem Bleiacetat, wenn die Lösung nicht neutrales Bleisalz enthält. Eine Lösung von Carnin in warmer, starker Salzsäure liefert beim Erkalten bald glasglänzende Nadeln von salzsaurem Carnin; löst man diese Nadeln in warmem Wasser, so scheiden sie sich zuerst als schlammiger Niederschlag aus, der allmählich wieder jene Nadeln liefert. Platinchlorid bewirkt in der salzsauren Lösung goldgelben, krystallinischen Niederschlag  $C_7H_8N_4O_3 \cdot HCl \cdot PtCl_4$ . (Krukenberg und Wagner erhielten makroskopische Oktaeder.) Salpetersaures Silber fällt Carnin flockig weiß, der Niederschlag ist unlöslich in Salpetersäure und in Ammoniak und besteht aus  $(C_7H_7AgN_4O_3)_2 \cdot AgNO_3$  mit 41,73% Silbergehalt. Aus einer Lösung in Alkali wird es durch Fehlingsche Lösung und salzsaures Hydroxylamin als Cuprooxydsalz gefällt (Balke<sup>7)</sup>).

Durch Kochen mit Barytwasser wird Carnin nicht zersetzt, auch nicht beim Erhitzen mit konz. Jodwasserstoff. Behandelt man eine heiße Lösung von Carnin mit gesättigtem Bromwasser, so zeigt sich unter Entfärbung Gasentwicklung und nach überschüssig zugesetztem Bromwasser erhält man nach dem Abdampfen und Erkalten bromwasserstoffsäures Hypoxanthin als weißes Krystallmehl.  $C_7H_8N_4O_3 + Br_2 = C_5H_4N_4O \cdot HBr + CH_3Br + CO_2$ .

Für den Nachweis besonders geeignete Reaktionen sind nicht bekannt, auch die Weidelsche Probe (§ 137) fällt bei reinem Carnin negativ aus.

1) Journ. f. prakt. Chem. N. F. Bd. 47, S. 563. 1893. — Salomon: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 18, S. 207. 1894.

2) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 26, S. 394. 1898/99.

3) Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 158, S. 353. 1871.

4) Sitzungsber. d. Würzburger phys.-med. Ges. 1883, S. 58.

5) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 29, 3, S. 2645. 1896.

6) Monatshefte f. Chem. Bd. 29, S. 157. 1909.

7) Journ. f. prakt. Chem. N. F. Bd. 47, S. 547. 1893.

*Darstellung von Purinbasen (Alloxurbasen) aus Harn nach Krüger und Salomon<sup>1)</sup>.*

146. Der Harn\*) wird siedendheiß mit Natriumbisulfit und Kupfersulfat ausgefällt, der Niederschlag abfiltriert, mit heißem Wasser gewaschen und mit Wasser erwärmt. Man macht mit Ammoniak schwach alkalisch, dann mit Salzsäure stark sauer, leitet Schwefelwasserstoff ein und filtriert heiß. Die Hauptmenge der Harnsäure bleibt auf dem Filter. Das salzsaure Filtrat wird durch möglichst wenig Tierkohle entfärbt und auf dem Wasserbade möglichst weit eingedampft, zum Schluß bei niedriger Temperatur und unter häufigem Umschwenken der Schale oder besser während Darüberleitens eines kräftigen Luftstromes. Die im sirupösen Rückstande noch reichlich vorhandene Salzsäure wird durch 2maliges Eindampfen mit Wasser und schließlich durch Eindampfen mit 96proz. Alkohol der Hauptmenge nach entfernt, bis die Masse grobpulverig geworden ist. Sie wird mit Wasser bei 40° digeriert, nach mehrstündigem Stehen abfiltriert, mit Wasser salzsäurefrei, dann mit Alkohol und Äther gewaschen. Das Filtrat kann noch einmal eingedampft und in derselben Weise behandelt werden; jedoch bleibt beim Digerieren mit Wasser nur ein geringer Rückstand, der mit dem ersten vereinigt wird.

Der ungelöste Teil (Xanthinfraktion) besteht aus Xanthin\*\*), Heteroxanthin und 1-Methylxanthin; in die wässrige Lösung (Hypoxanthinfraktion) gehen über: Epiguanin, Adenin, Hypoxanthin und Paraxanthin, sowie eine geringe Menge von Heteroxanthin und 1-Methylxanthin.

a) **Xanthinfraktion.** Trennung von Heteroxanthin, Xanthin und 1-Methylxanthin. Das Gemenge dieser Basen wird in der 15fachen Menge 3,3proz. salzsäurefreier Natronlauge heiß gelöst. Innerhalb 24 Stunden scheidet sich das Natriumsalz des Heteroxanthins in reinem Zustande und fast vollständig aus. Je 60 ccm des auf 60° erwärmten Filtrates werden in ein (vorher aufgekochtes) kaltes Gemisch aus 20 ccm konzentrierter Salpetersäure und 20 ccm Wasser langsam und unter Umrühren eingetragen. Hierbei wird der Rest der Harnsäure, welcher mit den Alloxurbasen in Lösung gegangen war (vgl. oben), zerstört und innerhalb mehrerer Stunden scheidet sich beim Stehen in der Kälte salpetersaures Xanthin aus. Erweist sich dasselbe unter dem Mikroskope noch nicht als rein, so neutralisiert man je 3 g des lufttrocknen Rohproduktes unter wenig Wasser mit Natronlauge, erwärmt, löst das freie Xanthin durch mehr Lauge, verdünnt auf 60 ccm und behandelt die auf 60° erwärmte Lösung wie oben. Reines salpetersaures Xanthin setzt sich als schweres Krystallpulver in aus Blättchen bestehenden Drusen ab. Zur Darstellung des freien Xanthins wird die ammoniakalische Lösung des Nitrates eingedampft, wobei sich die Base in amorphen Krusten abscheidet. Das 1-Methylxanthin wird aus dem salpetersauren Filtrate vom Xanthinnitrat durch Übersättigen mit Ammoniak und Eindampfen als atlasglänzende Masse, aus mikroskopischen Blättchen bestehend, erhalten. Der Rest kann durch ammoniakalische Silberlösung oder als Kupferoxydulverbindung gefällt werden.

b) **Hypoxanthinfraktion.** Trennung von Epiguanin, Adenin, Hypoxanthin und Paraxanthin. Die salzsaure, von Xanthin und seinen Homo-

\*) Da der Gehalt des Harns an Purinbasen ein sehr geringer ist, verwendet man mindestens 300 l. Dieselben werden zunächst in einzelnen Portionen ausgefällt. Dann findet eine Vereinigung und gemeinsame Weiterverarbeitung statt.

\*\*) Nach Barnett und Jones befindet sich ein Teil des Xanthins in der Hypoxanthinfraktion (Journ. of biol. chem. Bd. 9, S. 93. 1911).

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 26, S. 373. 1898/99 und persönliche Mitteilung von Herrn M. Krüger.



logen abfiltrierte Lösung scheidet auf Zusatz von Ammoniak in geringem Überschuß sofort das Epiguanin in kleinen, glänzenden Prismen aus. Das Filtrat wird durch Erhitzen vom Ammoniak befreit und die nicht zu konzentrierte Lösung in der Kälte vorsichtig mit 1,1proz. Pikrinsäurelösung in geringem Überschuß versetzt und das Adenin pikrat sofort mit einer Saugvorrichtung abfiltriert. Nachdem das mit Schwefelsäure versetzte Filtrat durch Ausschütteln mit Benzol oder Toluol von überschüssiger Pikrinsäure befreit ist, wird die Gesamtmenge der noch vorhandenen Basen durch ammoniakalische Silberlösung oder durch Kupfersulfat und Bisulfit gefällt, der Niederschlag durch Schwefelwasserstoffgas zersetzt und die wässrige Lösung der Basen eingedampft. Je 3 g des trockenen Rückstandes werden in 100 ccm heißer verdünnter Salpetersäure (90 ccm Wasser + 10 ccm konzentrierte Salpetersäure) gelöst. Beim Erkalten scheidet sich Hypoxanthinnitrat in reinem Zustande aus.

Aus dem Filtrat vom salpetersauren Hypoxanthin werden die Basen durch das Kupfer- oder Silberreagens ausgefällt und aus den Niederschlägen wieder in der üblichen Weise isoliert. Der Rückstand der (säurefreien) Basenlösung wird in der 15fachen Menge 10proz. Natronlauge gelöst. Beim Erkalten, am besten im Eisschrank, scheidet sich das Paraxanthinnatrium aus, aus welchem das freie Paraxanthin am besten durch Neutralisation der Lösung mit Essigsäure gewonnen werden kann.

### Tierische Basen<sup>1)</sup>.

(Bearbeitet von F. Wrede-Greifswald.)

Es sollen hier die Basen beschrieben werden, die im Körper und in den Stoffwechselprodukten der höheren Tiere und der Mikroorganismen gefunden sind. Nicht erwähnt werden die Basen, die sich nur in Pflanzen finden, die meist als Alkaloide bezeichnet werden. Die Purin-, Pyrimidin-, Pyrrol- und Indolderivate (außer Indoläthylamin), die Mehrzahl der Amide, die  $\alpha$ -Aminosäuren und die Hydantoine sowie das Glucosamin werden an anderer Stelle behandelt.

Für die Basen, die durch Bakterientätigkeit aus tierischem Gewebe entstehen, ist früher der Name *Pto maine* oder *Leichengifte* geprägt. Da ein Teil dieser Verbindungen aber nicht die vermutete Giftwirkung zeigt, manche nicht nur allein in Fäulnisprodukten gefunden werden, eine Anzahl sich auch nach chemischen Gesichtspunkten einreihen läßt, scheint es zweckmäßig, die obigen Namen fallen zu lassen. Ebenso scheint der Name „*Leucomaine*“ (Gautier) für „die Zersetzungsprodukte der Eiweißstoffe im Organismus ohne Mitwirkung von Mikroorganismen“ entbehrlich. Für die „Bruchstücke der Aminosäuren, die im Leben der Tiere und Pflanzen entstehen können“, ist von Ackermann und Kutscher<sup>2)</sup> der Name „*Aporrhemen*“ eingeführt worden. Von Guggenheim ist der Begriff „biogene oder proteinogene Amine“ geschaffen worden.

### Allgemeines.

Die zu behandelnden Körper sind Derivate des Ammoniaks oder des Ammoniumhydroxyds. Den primären, sekundären, tertiären Aminen und den quaternären Ammoniumbasen gemeinsam ist der basische Charakter, auf den sich im allgemeinen die Methode der Isolierung stützt. In freier Form sind sie meist sehr wasserlöslich, ja zerfließlich. Die Verbindungen mit gewissen

<sup>1)</sup> S. auch Brieger: Über *Pto maine* I, II, III. Berlin 1885/86. — Barger, G.: The simpler natural bases. London 1914. — Guggenheim: Die biogenen Amine. Berlin: Julius Springer 1920.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 69, S. 265. 1910.

Säuren, z. B. Pikrin- und Pikrolonsäure, sind dagegen durch eigentümliche Löslichkeitsverhältnisse und Neigung zur Krystallisation ausgezeichnet. Vielfach eignen sich die Verbindungen mit Schwermetallsalzen zur Abscheidung und Charakterisierung, besonders die mit Platin- oder Goldchlorid wegen ihrer meist typischen Zusammensetzung. Cadmiumchlorid, Zinkchlorid, Quecksilberchlorid, Kaliumquecksilberjodid u. a. geben auch häufig schwerlösliche oder krystallisierte Doppelverbindungen, doch sind diese weniger nach einem bestimmten Typus gebaut. Von Säuren werden vor allem die Pikrin-, Pikrolon- und Phosphorwolframsäure<sup>1)</sup> zur Ausfällung der Basen benutzt.

In chemischer Hinsicht zeigen die Basen einige charakteristische Reaktionen<sup>2)</sup>.

Primäre Amine entwickeln mit salpetriger Säure Stickstoff:  $R \cdot NH_2 + HNO_2 = R \cdot OH + H_2O + N_2$ . In alkoholischer Lösung geben sie mit Kalihydrat und Chloroform erwärmt Isonitrile, die am Geruch selbst in Spuren kennbar sind:  $R \cdot NH_2 + CHCl_3 + 3 KOH = R \cdot NC + 3 KCl + 3 H_2O$ . Sie addieren ebenso wie die sekundären Amine Cyansäurederivate, z. B. Phenylisocyanat oder Cyanamid unter Bildung von substituierten Harnstoffen, die oft gut krystallisieren:  $R \cdot NH_2 + C_6H_5NCO = RNH \cdot CO \cdot NHC_6H_5$ . Primäre und sekundäre Amine können sich ebenso wie Ammoniak mit Säuren zu Amidn verbinden. Mit Formaldehyd gehen sie Verbindungen ein.

Sekundäre Amine geben mit salpetriger Säure Nitrosamine:  $RR_1 = NH + HNO_2 = RR_1N \cdot NO + H_2O$ . Diese können nach Liebermann nachgewiesen werden (Erwärmen mit Phenol und konzentrierter Schwefelsäure, Verdünnen mit Wasser, Alkalischemachen mit Natronlauge: blaue Färbungen).

Tertiäre Amine geben mit salpetriger Säure und auch mit Formaldehyd keine Änderung.

Der Nachweis und die Trennung von primären, sekundären und tertiären Aminen ist auch mit Hilfe von Sulfochloriden durchführbar<sup>3)</sup>.

Alle Basen reagieren mit Jodmethyl so, daß aus primären Aminen sekundäre und tertiäre, dann quartäre Ammoniumderivate werden (erschöpfende Methylierung). Aus der Analyse der Ammoniumbase läßt sich auf die Formel und Konstitution der ursprünglichen Verbindung rückschließen. — Durch Kaliumpermanganat werden die Amine unter Bildung von Aldehyd oder Säure oxydiert. — Der Stickstoff in den Basen kann fast immer nach der Kjeldahl-Methode bestimmt werden, in den primären auch nach der Methode von van Slyke.

#### *Alkylamine.*

Sie können durch Abspaltung von Kohlensäure aus Aminosäuren entstehen. Auch auf andere Weise ist die Bildung möglich, z. B.:  $(CH_3)_3 \cdot N(OH) \cdot CH_2 \cdot CH_2OH = (CH_3)_3N + CH_2OH \cdot CH_2OH$ . — Die niederen Glieder sind gasförmig und ähneln in fast allen Eigenschaften dem Ammoniak, die höheren sind flüssig bis fest. Die wässrigen Lösungen der niederen Homologen reagieren stärker alkalisch als Ammoniaklösungen von entsprechender Konzentration. Sie fällen Schwermetalle als Hydroxyde aus, geben, im Überschuß zugesetzt, unter Umständen lösliche Komplexsalze.

<sup>1)</sup> Drummond: Biochem. Journ. Bd. 12, S. 5. 1918; ref. Chem. Zentralbl. 1918, II, S. 944.

<sup>2)</sup> Weiteres s. bei H. Meyer: Analyse und Konstitutionsermittlung organischer Verbindungen. Berlin: Julius Springer 1922.

<sup>3)</sup> Hinsberg: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 23, 3, S. 2962. 1890. — Solonina: Journ. d. russ. phys.-chem. Ges. Bd. 29, S. 404; Bd. 31, S. 640; ref. Chem. Zentralbl. 1897, II, S. 848; 1899, II, S. 867. — Hinsberg: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 33, 3, S. 3526. 1900. — Hinsberg u. Keßler: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 38, 1, S. 906. 1905.

**147. Methylamin  $\text{CH}_5\text{N}$ .** Es wurde nachgewiesen in der Heringslake<sup>1)</sup>, in Garnelenkonserven<sup>2)</sup>, in Kulturen von Streptokokken auf Fibrin<sup>3)</sup>, von *Bact. fluorescens* auf Gelatine<sup>4)</sup>, von Proteus- und Sarcinearten auf Leim<sup>5)</sup>, in Prodigiosuskulturen<sup>6)</sup>, in Tetanus kulturen<sup>7)</sup>. Weiter wurde es gefunden in den Produkten langwieriger Trypsinverdauung<sup>8)</sup>, im Harn von Kaninchen und Hunden, die mit Kreatinin gefüttert waren<sup>9)</sup>, auch im normalen Harn (wo es sich aus Methylharnstoff bilden soll) zu 3—4% des gesamten Harnstickstoffs<sup>10)</sup>, im Blut von Crustaceen<sup>11)</sup> sowie in den Gonaden von *Rhizostoma Cuvieri*<sup>12)</sup>. Reines Glykokoll gibt mit Fäulnisregern kein Methylamin<sup>13)</sup>.

Vorkommen.



Darstellung und Trennung von anderen Basen s. S. 190.

Methylamin ist ein farbloses, wie Ammoniak riechendes, brennbares Gas, das bei etwa  $-6^\circ$  flüssig wird. 1150 Vol. lösen sich in 1 Vol. Wasser bei  $12,5^\circ$ ; auch in Alkohol löst es sich leicht. Mit Nessler's Reagens entsteht ein Niederschlag<sup>14)</sup>.

Eigenschaften.

$\text{CH}_3\text{NH}_2 \cdot \text{HCl}$ : Blättchen vom Fp.  $227^\circ$ , unlöslich auch in heißem Chloroform.  $(\text{CH}_3\text{NH}_2)_2 \cdot \text{H}_2\text{PtCl}_6$ : Tafeln, Löslichkeit in kaltem Wasser 2 : 100. Pikrat  $\text{CH}_3\text{NH}_2 \cdot \text{C}_6\text{H}_2(\text{NO}_2)_3\text{OH}$ : Prismen oder Tafeln vom Fp.  $207-215^\circ$ , löslich in Wasser 1,3 : 100<sup>15)</sup>. Pikrolonat  $\text{CH}_3\text{NH}_2 \cdot (\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_4\text{O}_5)_2$ : Nadeln vom Zersp.  $244^\circ$ , kaum löslich in Wasser und in Alkohol.

**Dimethylamin  $\text{C}_2\text{H}_7\text{N}$ .** Wurde in der Heringslake<sup>16)</sup>, in faulem Fleisch<sup>17)</sup>, auch im Harn von Kaninchen gefunden, die mit Trimethylaminoxid gefüttert waren<sup>18)</sup>.

Vorkommen.



Darstellung und Trennung von anderen Basen s. S. 190.

Bei  $+7^\circ$  sich verflüssigendes Gas, das sich leicht in Wasser löst. Gibt mit Nessler's Reagens rotbraunen Niederschlag<sup>19)</sup>.  $(\text{CH}_3)_2\text{NH} \cdot \text{HCl}$ : Nadeln vom Fp.  $171^\circ$ , unlöslich in Alkohol, löslich in Chloroform<sup>20)</sup>.  $(\text{CH}_3)_2\text{NH} \cdot \text{H}_2\text{PtCl}_6$ : In Wasser mäßig lösliche Blättchen vom Fp.  $206^\circ$ . Pikrolonat  $\text{C}_2\text{H}_7\text{N} \cdot \text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_4\text{O}_5$ : Nadelchen vom Zersp.  $222^\circ$ , löslich in etwa 800 Teilen kaltem, in etwa 35 Teilen siedendem Alkohol oder Wasser.

Eigenschaften.

<sup>1)</sup> Tollens: Zeitschr. f. Chem. 1866, S. 516. — Bocklisch: Ber. d. Dtsch. chem. Ges. Bd. 18, 1, S. 86 u. 2, S. 1922. 1885.

<sup>2)</sup> Bigelow u. Bacon: Journ. of industr. a. engin. chem. Bd. 3, S. 832. 1911; ref. Chem. Zentralbl. 1912, I, S. 1136.

<sup>3)</sup> Emmerling: Ber. d. Dtsch. chem. Ges. Bd. 30, 2, S. 1863. 1897.

<sup>4)</sup> Emmerling u. Reiser: Ber. d. Dtsch. chem. Ges. Bd. 35, 1, S. 701. 1902.

<sup>5)</sup> Ssadikow: Biochem. Zeitschr. Bd. 41, S. 287. 1912.

<sup>6)</sup> Ackermann u. Schütze: Arch. f. Hyg. Bd. 73, S. 145. 1910.

<sup>7)</sup> Brieger: Dtsch. med. Wochenschr. 1887, S. 303.

<sup>8)</sup> Fränkel u. Jellinek: Biochem. Zeitschr. Bd. 130, S. 596. 1922.

<sup>9)</sup> Schiffer: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 4, S. 237. 1880; s. dagegen Folin: Journ. of biol. chem. Bd. 3, S. 83. 1907.

<sup>10)</sup> Folin: l. c.

<sup>11)</sup> v. Fürth: Vergleichende chemische Physiologie der niederen Tiere, S. 88. Jena 1903.

<sup>12)</sup> Haurowitz: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 122, S. 145. 1922.

<sup>13)</sup> Ackermann: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 60, S. 482. 1909.

<sup>14)</sup> Delépine: Ann. de chim. et de physique (7), Bd. 8, S. 439. 1896.

<sup>15)</sup> Delépine s. oben. — Ristenpart: Ber. d. Dtsch. chem. Ges. Bd. 29, 2, S. 2530. 1896.

<sup>16)</sup> Bocklisch: Ber. d. Dtsch. chem. Ges. Bd. 18, 2, S. 1924. 1885.

<sup>17)</sup> Ehrenberg: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 11, S. 239. 1887. — Mörner: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 22, S. 517. 1896/97.

<sup>18)</sup> Suwa: Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 129, S. 231. 1909.

<sup>19)</sup> Charitschkow: Journ. d. Russ. Phys.-Chem. Ges. Bd. 39, S. 230. 1907. — Dorée u. Golla: Biochem. Journ. Bd. 5, S. 306. 1910.

<sup>20)</sup> Behrend: Ber. d. Dtsch. chem. Ges. Bd. 15, 2, S. 1610. 1882.

Vorkommen. **Trimethylamin**  $C_3H_9N$ . Es wurde nachgewiesen in der Heringslake<sup>1)</sup>, in Austern<sup>2)</sup>, in Fischrogen<sup>3)</sup>, in den Gonaden von *Rhizostoma Cuvieri*<sup>4)</sup>, im Lebertran<sup>5)</sup>, in Sardinenkonserven<sup>6)</sup>, in faulem Fleisch<sup>7)</sup>, in Kulturen verschiedener Mikroorganismen auf Gelatine, Fibrin, Fleisch usw.<sup>8)</sup>, in Gorgonzolakäse<sup>9)</sup>, im Fleisch des Wasserhuhns *Fulica atra*<sup>10)</sup>. Weiter soll es sich in freier Form finden im Blut, in der Cerebrospinalflüssigkeit, im normalen Harn und im Harn Nervenkranker<sup>11)</sup>. Der Nachweis des Trimethylamins als solches ist jedoch nicht einfach, da es bei der Aufarbeitung leicht als Kunstprodukt sich bilden kann. So konnte Erdmann<sup>12)</sup> einen Teil der obigen Befunde nicht bestätigen. Aus Lecithin, Cholin und Betain kann durch Bakterienwirkung Trimethylamin entstehen<sup>13)</sup>. Aus Trimethylaminoxid und aus Betain wird im Körper Trimethylamin gebildet und im Harn ausgeschieden<sup>14)</sup>.

Darstellung und Trennung s. weiter unten.

Eigenschaften. Trimethylamin ist ein Gas, das bei  $+3^\circ$  flüssig wird. Es riecht nach Heringslake, ist in Wasser, Alkohol und Äther leicht löslich. Mit Nessler's Reagens entsteht ein weißer Niederschlag, der in viel Wasser löslich ist<sup>15)</sup>. Mit Kaliumquecksilberjodid bildet sich eine schwerlösliche Verbindung  $(CH_3)_3N \cdot HJ \cdot HgJ_2$ : Gelbe Nadeln vom Fp.  $136^\circ$ , die in einem Gemisch von gleichen Teilen Chloroform und Essigester löslich sind<sup>16)</sup>.  $C_3H_9N \cdot H_2PtCl_6$ : Krystalle vom Zersp.  $240-245^\circ$ , 0,03 g lösen sich in 180 ccm kochendem absoluten Alkohol. Pikrat  $C_3H_9N \cdot C_6H_3N_3O_7$ : Prismen vom Fp.  $216^\circ$ . Pikrolonat  $C_3H_9N \cdot C_{10}H_8N_4O_5$ : Täfelchen vom Zersp.  $250-252^\circ$ , kaum löslich in kaltem Wasser.

Darstellung und Trennung von Methyl-, Dimethyl- und Trimethylamin.

Zur Darstellung und Trennung der Alkylamine wird mit Lauge destilliert (unter Umständen mit Magnesia und im Vakuum<sup>17)</sup>), wobei die Amine und auch evtl. Ammoniak ins Destillat übergehen. Ammoniak kann nach François<sup>18)</sup> abgeschieden werden, indem das Destillat mit viel gelbem Queck-

<sup>1)</sup> Bocklisch: Ber. d. Dtsch. chem. Ges. Bd. 18, 2, S. 1924. 1885. — Wertheim: Jahresber. üb. d. Fortsch. d. Tierchemie 1851, S. 480.

<sup>2)</sup> Suzuki, Yoshimura u. Tanaka: Journ. of the coll. agr. Tok. Bd. 5, S. 1. 1912; ref. Chem. Zentralbl. 1913, I, S. 1042.

<sup>3)</sup> Yoshimura: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 86, S. 174. 1913.

<sup>4)</sup> Haurowitz: Hoppe-Seylers Zeitschr. Bd. 122, S. 145, 1922.

<sup>5)</sup> Winkler: Jahresber. üb. d. Fortsch. d. Tierchemie 1852. S. 553. — Gautier u. Morgues: Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 107, S. 110 u. 626. 1888/89.

<sup>6)</sup> Weber u. Wilson: Chem. Zentralbl. 1919, IV, S. 580.

<sup>7)</sup> Gautier u. Etard: Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 94, S. 1598. 1882; Bd. 97, S. 263. 1883.

<sup>8)</sup> Emmerling u. Reiser: Ber. d. Dtsch. chem. Ges. Bd. 35, 1, S. 701. 1902. — Emmerling: Ber. d. Dtsch. chem. Ges. Bd. 29, 2, S. 2721. 1896. — Carbone: Zentralbl. f. Bakteriolog., Parasitenk. u. Infektionskrankh. Bd. 8, S. 768. 1890; Bd. 12, S. 594. 1891. — Ackermann u. Schütze: Zentralbl. f. Physiol. Bd. 24, S. 210. 1910.

<sup>9)</sup> Malenchini: Zeitschr. f. Nahrungsm. u. Hyg. Bd. 7, S. 7. 1892.

<sup>10)</sup> Blaha: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 89, S. 456. 1914.

<sup>11)</sup> Dessaignes: Jahresber. üb. d. Fortsch. d. Tierchemie 1857, S. 382; Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 100, S. 218. 1856. — de Filippi: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 49, S. 433. 1906. — Dorée u. Golla: Biochem. journ. Bd. 5, S. 306. 1910. — Bauer: Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 11, S. 502. 1908.

<sup>12)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 8, S. 57. 1910; s. auch Takeda: Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 129, S. 82. 1909. — Kinoshita: Zentralbl. f. Physiol. Bd. 24, S. 776. 1910.

<sup>13)</sup> Ackermann: Zeitschr. f. Biol. Bd. 64, S. 44. 1914. — Ackermann u. Schütze: Zentralblatt f. Physiol. Bd. 24, S. 210. 1909.

<sup>14)</sup> Suwa: Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 129, S. 231. 1909. — Kohlrausch: Zeitschr. f. Biol. Bd. 57, S. 273. 1912.

<sup>15)</sup> Literatur s. bei Dimethylamin.

<sup>16)</sup> Woodward u. Alsberg: Journ. of biol. chem. Bd. 46, S. 1. 1921. <sup>17)</sup> Takeda s. bei <sup>12)</sup>.

<sup>18)</sup> Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 144, S. 567 u. 857. 1907; Bd. 146, S. 1284. 1908.

silberoxyd eine Stunde geschüttelt wird. Es wird filtriert, der Rückstand wird ausgewaschen. Das Filtrat wird mit wenig Natronlauge, Sodalösung und Quecksilberoxyd nochmals eine Stunde geschüttelt. Die danach abfiltrierte Flüssigkeit enthält höchstens noch 0,2% Ammoniak. Die Lösung der Amine wird nach Delépine<sup>1)</sup> mit 40proz. Formaldehyd und etwas Kalilauge versetzt. Methyl- und Dimethylamin geben mit dem Formaldehyd Verbindungen. Beim Destillieren geht zuerst Trimethylamin, dann bei ca. 85° die Dimethylaminverbindung, bei ca. 166° die Methylaminverbindung über. — Handelt es sich nur um die Isolierung des Trimethylamins, so können durch Einwirken von salpetriger Säure oder Natriumhypobromit die anderen Amine und Ammoniak zersetzt werden<sup>2)</sup>. — Andere Trennungsvorgänge sind von Koloman Budai<sup>3)</sup> und von Franzen und Schneider<sup>4)</sup> angegeben worden.

**Trimethylaminoxid C<sub>3</sub>H<sub>9</sub>NO**. Findet sich im Muskelextrakt des Dornhais  $O = N \begin{array}{l} \diagup CH_3 \\ \diagdown CH_3 \end{array}$  Acanthias vulgaris<sup>5)</sup> und von Cephalopoden<sup>6)</sup>.

Das Extrakt wird eingeeengt und nach der Methode von Kutscher (§ 723) aufgearbeitet. Mit alkoholischer Pikrinsäure wird Trimethylaminoxid ausgefällt. Ausbeute 20 g aus 20 kg Fischfleisch.

Trimethylaminoxid ist eine starke Base, die mit Wasser ein krystallisiertes Hydrat (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>NO + 2 H<sub>2</sub>O vom Fp. 96° gibt. (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>NO · HCl: Luftbeständige Krystalle vom Fp. 217—220°. Pikrat C<sub>3</sub>H<sub>9</sub>NO · C<sub>6</sub>H<sub>2</sub>(NO<sub>2</sub>)<sub>3</sub>OH: In Alkohol und Wasser schwer löslich, Fp. 198—202°. C<sub>3</sub>H<sub>9</sub>NO · HAuCl<sub>4</sub>: Krystalle vom Fp. 250°. C<sub>3</sub>H<sub>9</sub>NO · H<sub>2</sub>PtCl<sub>6</sub>: Blättchen vom Fp. 214° (245° nach Henze).

Trimethylaminoxid wird durch Zink in alkalischer Lösung zu Trimethylamin reduziert, ebenso erfolgt auch Reduktion im Tierkörper<sup>7)</sup>.

Weitere seltener beobachtete Alkylamine sind:

Diäthylamin (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>NH<sup>8)</sup>, Triäthylamin (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>N<sup>9)</sup>, Propylamine C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>N<sup>10)</sup>, Butylamine C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>N. Butylamin ist im Lebertran nachgewiesen<sup>11)</sup>. Butylamin entsteht auch aus α-Aminoisovaleriansäure durch Fäulnis<sup>12)</sup>. Isoamylamin C<sub>5</sub>H<sub>13</sub>N, bildet sich wohl aus Leucin. Es wurde gefunden in gefaulten Massen<sup>13)</sup>; vielleicht auch im Harn<sup>14)</sup>. Hexylamine C<sub>6</sub>H<sub>15</sub>N sollen sich im Lebertran finden<sup>15)</sup>.

An dieser Stelle mögen noch einige Amine angeführt werden, deren Alkylgruppe eine Hydroxyl- bzw. Carboxylgruppe trägt:

<sup>1)</sup> Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 122, S. 1064. 1896.

<sup>2)</sup> de Filippi: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 49, S. 432. 1906. — Dorée u. Golla: Biochem. journ. Bd. 5, S. 306. 1910.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 86, S. 107. 1913.

<sup>4)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 116, S. 195. 1921.

<sup>5)</sup> Suwa: Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 128, S. 421; Bd. 129, S. 231. 1909.

<sup>6)</sup> Henze: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 91, S. 230. 1914.

<sup>7)</sup> Suwa: l. c.

<sup>8)</sup> Bocklisch: Ber. d. Dtsch. chem. Ges. Bd. 18, 1, S. 86 u. 2, S. 1920. 1885. — Ehrenberg: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 11, S. 239. 1887.

<sup>9)</sup> Brieger: Ptomaine. — Ehrenberg: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 11, S. 239. 1887.

<sup>10)</sup> Brieger: Dtsch. med. Wochenschr. 1888, S. 469.

<sup>11)</sup> Gautier u. Mourgues: Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 107, S. 110 u. 626. 1888/89.

<sup>12)</sup> Neuberg u. Karczag: Biochem. Zeitschr. Bd. 18, S. 435. 1909.

<sup>13)</sup> Müller u. Hesse: Journ. f. prakt. Chemie Bd. 70, S. 65. 1857. — Nencki: Ber. d. Dtsch. chem. Ges. Bd. 10, 1, S. 1032. 1887. — Gautier, Etard u. Mourgues: Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 94, S. 1598. 1882; Bd. 107, S. 110 u. 254. 1888. — Rosenheim: Journ. of physiol. Bd. 38, S. 337. 1909. — Barger u. Walpole: Journ. of physiol. Bd. 38, S. 343. 1909.

<sup>14)</sup> Bain: Zentralbl. f. Biochem. u. Biophysik. 17, S. 496. 1914/15; s. dagegen Guggenheim u. Löffler: Biochem. Zeitschr. Bd. 72, S. 325. 1916.

<sup>15)</sup> Gautier u. Mourgues: Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 107, S. 110 u. 626. 1888/89.

Vorkommen. 148. **Aminoäthylalkohol (Colamin)  $C_2H_7NO$** . Es entsteht bei der hydrolytischen Spaltung von Kephalin<sup>1)</sup>, auch aus Serin durch Fäulnis unter Luftabschluß<sup>2)</sup>. Vielleicht kann es im Körper aus Serin durch Decarboxylieren gebildet werden.

Synthese. Synthetisch gewinnt man es aus Äthylenoxyd und Ammoniak<sup>3)</sup>.

Eigenschaften. Colamin ist eine farblose, ölige Flüssigkeit vom Kp. 171° bei 757 mm. Es hat schwachen Geruch, zieht Wasser und Kohlensäure aus der Luft an. Mit Ätherdämpfen ist es leicht flüchtig, leichter als mit Wasserdämpfen. Mit salpetriger Säure wird der Stickstoff in üblicher Weise quantitativ abgespalten. Es gibt die Jodoformreaktion von Lieben (S. 52). Mit den Alkaloidreagenzien entsteht kein Niederschlag. Nur das Pikrolonat ist schwer löslich.  $C_2H_7NO \cdot HAuCl_4$ : Krystalle vom Fp. 190°. Pikrolonat  $C_2H_7NO \cdot C_{10}H_8N_4O_5$ : Büschelförmige Nadeln vom Zersp. 225°. Schwerlöslich in Wasser, löslich in heißem Alkohol ca. 1:100, in kaltem ca. 1:500. Weitere Derivate sind von Fränkel und Cornelius<sup>4)</sup> beschrieben.

Darstellung und Trennung von Cholin und Colamin.

Aus dem durch Hydrolyse der Phosphatide erhaltenen Basengemisch wird mit alkoholischem Quecksilberchlorid die Hauptmenge des Cholins gefällt. Das Filtrat wird durch Kochen vom Alkohol, durch Einleiten von Schwefelwasserstoff vom Quecksilber befreit und dann zur Trockne gebracht. Der Rückstand wird in Alkohol aufgenommen und mit Platinchlorid versetzt, wodurch der Rest des Cholins gefällt wird. Das Filtrat wird mit Schwefelwasserstoff vom Platin befreit und mit Pikrolonsäure versetzt. Das Colaminpikrolonat krystallisiert aus. — Nach Thierfelder und Schulze<sup>5)</sup> wird das trockene Basengemisch mit Calciumoxyd verrieben und ca. 24 Stunden in einem Soxhletapparat extrahiert, in dessen Siedegefaß sich ätherische Pikrolonsäure befindet. Nur das Colamin wird durch den Äther gelöst und von der Pikrolonsäure gebunden. Aus dem Hülsenrückstand wird durch Alkoholextraktion das Cholin gewonnen. — Weitere Trennungsvorgänge sind von Levene und Ingvaldsen<sup>6)</sup> und von Fournau und González<sup>7)</sup> angegeben. — Der Aminostickstoff des Colamins ist nach van Slyke bestimmbar. Ist der Gesamtstickstoffgehalt bekannt, so ist das Verhältnis von Colamin und Cholin unter Umständen leicht zu berechnen<sup>8)</sup>.

$\begin{array}{l} CH_2-NH-CH_3 \\ | \\ CH_2-OH \end{array}$  **Äthanolmethylamin  $C_3H_9NO$** . Wurde von Koch<sup>9)</sup> als basischer Bestandteil des Phosphatids Kephalin angenommen. Das synthetisch erhaltene Produkt ist eine ölige Flüssigkeit vom Kp. 159°.

$\begin{array}{l} CH_2-NH_2 \\ | \\ CH_2-COOH \end{array}$  149.  **$\beta$ -Aminopropionsäure,  $\beta$ -Alanin  $C_3H_7NO_2$** . Findet sich in geringer Menge im Fleischextrakt<sup>10)</sup>. Wurde von Ackermann aus Asparaginsäure durch Fäulnis gewonnen<sup>11)</sup>. Sie ist im Carnosin (§ 160) enthalten.

<sup>1)</sup> Trier: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 73, S. 383, 1911; Bd. 76, S. 496. 1911/12; Bd. 86, S. 141 u. 153. 1913. — Eppler: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 87, S. 233. 1913. — Baumann: Biochem. Zeitschr. Bd. 54, S. 30. 1913. — Parnas: Biochem. Zeitschr. Bd. 56, S. 17. 1913.

<sup>2)</sup> Nord: Biochem. Zeitschr. Bd. 95, S. 281. 1919.

<sup>3)</sup> Knorr: Ber. d. Dtsch. chem. Ges. Bd. 30, 1, S. 909. 1897.

<sup>4)</sup> Ber. d. Dtsch. chem. Ges. Bd. 51, 2, S. 1654. 1918.

<sup>5)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 96, S. 296. 1915.

<sup>6)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 43, S. 355. 1920.

<sup>7)</sup> Ann. soc. esp. [2], Bd. 19, S. 151; ref. Chem. Zentralbl. 1921, IV, S. 454.

<sup>8)</sup> MacLean: Biochem. Journ. Bd. 9, S. 330. 1915.

<sup>9)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 36, S. 134. 1902.

<sup>10)</sup> Engeland: Zeitschr. f. Untersuch. d. Nahrungs- u. Genußmittel Bd. 16, S. 658. 1908; s. dazu aber Gulewitsch: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 73, S. 445, Anm. 2.

<sup>11)</sup> Zeitschr. f. B. ol. Bd. 56, S. 87. 1911; s. dagegen aber Borchardt: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 59, S. 96. 1909. — Neuberg u. Cappezzuoli: Biochem. Zeitschr. Bd. 18, S. 424. 1909. — Abderhalden u. Fodor: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 85, S. 112. 1913.

Synthetisch wurde es von Mulder<sup>1)</sup> sowie von Curtius und Hechtenberg<sup>1)</sup> dargestellt.

$\beta$ -Alanin bildet Tafeln vom Fp. 206—207°, leichtlöslich in Wasser, wenig löslich in Alkohol. Es schmeckt süß, zerfällt, namentlich in alkalischer Lösung, leicht in Ammoniak und Akrylsäure.  $C_3H_7NO_2 \cdot HCl$ : Tafelchen vom Fp. 122°.  $(C_3H_7NO_2)_2 \cdot H_2PtCl_6$ : Blättchen vom Fp. 210°. Äthylesterchlorhydrat  $C_3H_6NO_2 \cdot C_2H_5 \cdot HCl$ : Blättchen vom Fp. 65—70°.  $\alpha$ -Naphthylisocyanatverbindung  $C_{14}H_{14}N_2O_3$ : Krystalle vom Fp. 230—232°<sup>2)</sup>.

$\gamma$ -Aminobuttersäure  $C_4H_9NO_2$ . Wurde aus Glutaminsäure durch Fäulnis gewonnen<sup>3)</sup>. Auch aus den Produkten der Säurespaltung von Casein wurde eine Aminobuttersäure isoliert, von der aber nicht gesagt wird, ob es sich um  $\gamma$ -Aminobuttersäure handelt<sup>4)</sup>. Siehe § 170.

Die Synthese wurde durchgeführt von Schotten<sup>5)</sup>, von Gabriel aus Phthalimidobutyronitril<sup>6)</sup>, von Tafel und Stern aus Pyrrolidon<sup>7)</sup>, von Curtius und Hechtenberg aus Glutarsäureglycinester<sup>8)</sup>.

Blättchen vom Fp. 183—203°<sup>9)</sup>, leichtlöslich in Wasser.  $C_4H_9NO_2 \cdot HCl$ : Krystalle vom Fp. 135—136°, leichtlöslich in Wasser. Das Chlorid gibt Niederschläge mit Phosphorwolframsäure und mit Sublimat (nur zusammen mit Natriumacetat).  $C_4H_9NO_2 \cdot HAuCl_4$ : Krystalle vom Fp. 138°.  $(C_4H_9NO_2) \cdot H_2PtCl_6$ : Krystalle vom Fp. 220°, leichtlöslich in Wasser. Äthylester: Kp. bei 12 mm 75—77°. Salzsaurer Äthylester: Krystalle vom Fp. 72°.

Nachweis als Pyrrolidon wird von Tafel und Stern<sup>10)</sup> empfohlen.

$\delta$ -Aminovaleriansäure  $C_5H_{11}NO_2$ . Entsteht bei der Fäulnis von Fibrin, Fleisch, Gelatine, Pankreas und Casein, auch von Prolin<sup>11)</sup>. Wahrscheinlich bildet sie sich aus Arginin, wie Ackermann zeigen konnte<sup>12)</sup>. Vielleicht ist sie auch in der Schilddrüse vorhanden<sup>13)</sup>.

Synthetisch wurde sie dargestellt von Schotten<sup>14)</sup> und von Gabriel<sup>15)</sup>. Über die Identität des synthetischen Produktes mit dem natürlichen s. Gabriel und Aschan<sup>16)</sup>.

Blättchen vom Fp. 157—158°, löslich in Wasser, schwerlöslich in Alkohol, unlöslich in Äther.  $C_5H_{11}NO_2 \cdot HAuCl_4 + H_2O$ : Krystalle von Fp. 86°.  $(C_5H_{11}NO_2)_2 \cdot H_2PtCl_6$ : Tafeln, leichtlöslich in Wasser. — Gibt kein Kupfersalz,

<sup>1)</sup> Mulder: Ber. d. Dtsch. chem. Ges. Bd. 9, 2, S. 1903. 1876. — Curtius u. Hechtenberg: Journ. f. prakt. Chem. Bd. 105, S. 289, 1923.

<sup>2)</sup> Gulewitsch: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 73, S. 440. 1911.

<sup>3)</sup> Ackermann: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 69, S. 279. 1910; s. dagegen Abderhalden u. Kautsch: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 81, S. 294 u. 299. 1912. — Abderhalden, Fromme u. Hirsch: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 85, S. 131. 1913.

<sup>4)</sup> Foreman: Biochem. Zeitschr. Bd. 56, S. 1. 1913.

<sup>5)</sup> Ber. d. Dtsch. chem. Ges. Bd. 16, 1, S. 643. 1883.

<sup>6)</sup> Ber. d. Dtsch. chem. Ges. Bd. 23, 2, S. 1771. 1890; Bd. 40, 2, S. 2647. 1907. — Gabriel u. Colman: Ber. d. Dtsch. chem. Ges. Bd. 41, 1, S. 513. 1908.

<sup>7)</sup> Ber. d. Dtsch. chem. Ges. Bd. 33, 2, S. 2230. 1900.

<sup>8)</sup> Journ. f. prakt. Chem. Bd. 105, S. 319. 1923.

<sup>9)</sup> Siehe Abderhalden u. Kautsch: l. c.

<sup>10)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 33, 2, S. 2230. 1900.

<sup>11)</sup> E. u. H. Salkowski: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 16, 1, S. 1191 u. 2, S. 1802. 1883. — H. Salkowski: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 31, 1, S. 776. 1898. — Ackermann: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 54, S. 1. 1907; Bd. 60, S. 482. 1909; Bd. 69, S. 273. 1910; Zeitschr. f. Biol. Bd. 57, S. 104. 1912. — Neuberg: Biochem. Zeitschr. Bd. 37, S. 498. 1911.

<sup>12)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 60, S. 498. 1909; Bd. 69, S. 273. 1910.

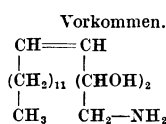
<sup>13)</sup> Lohmann: Zeitschr. f. Biol. Bd. 56, S. 1. 1911.

<sup>14)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 17, 2, S. 2545. 1884; Bd. 21, 2, S. 2238. 1888.

<sup>15)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 23, 2, S. 1767. 1890. <sup>16)</sup> desgl. Bd. 24, 1, S. 1364. 1891.

und kein Pikrat. Wird aus den Fäulnisgemischen mit Phosphorwolframsäure gefällt. Bei der Trennung nach Kossel-Kutscher (§ 724) findet sie sich in der Lysinfraktion, aus der sie dann durch fraktionierte Krystallisation der Schwermetallsalze isoliert werden kann.

Über Trennung von Basen s. § 165.



150. Sphingosin  $\text{C}_{17}\text{H}_{35}\text{NO}_2$ , wahrscheinlich von nebenstehender Formel. Es entsteht bei der Hydrolyse der Cerebroside und des Sphingomyelins<sup>1)</sup>. Wurde im Harn des Hundes nach Eingabe von Cerebron gefunden<sup>2)</sup>.

Es enthält eine primäre Aminogruppe, die nach van Slyke bestimmbar ist<sup>3)</sup>. Durch sie ist das Sphingosin amidartig an eine höhere Fettsäure in den Cerebroside gebunden. Zwei der Sauerstoffatome sind als zwei Hydroxylgruppen nachweisbar, die wohl beide die Bindung mit dem Zuckerkomplex (Galaktose) des Cerebrons vermitteln. Denn bei der Hydrolyse mit alkoholischer Schwefelsäure bildet sich ein dialkyliertes Sphingosin<sup>4)</sup>. Beim Acetylieren des Sphingosins entsteht eine Triacetylverbindung<sup>5)</sup>. Bei der Reduktion mit Jodwasserstoff bildet sich das ungesättigte Sphingamin  $\text{C}_{17}\text{H}_{35}\text{N}$ . Das Sphingosin addiert zwei Atome Brom, auch läßt es sich katalytisch reduzieren<sup>6)</sup>. Bei der Oxydation des Sphingosins mit Chromtrioxyd oder Ozon entsteht n-Tridecylsäure vom Fp.  $48^\circ$ , bei der des Dihydrosphingosins n-Pentadecylsäure vom Fp.  $53^\circ$ <sup>7)</sup>. — Aus all diesen Beobachtungen ergibt sich die obige Formel, bei der allerdings noch die Stellung der Amino- und Hydroxylgruppen unbestimmt bleibt.

Darstellung. Darstellung aus Cerebron durch Hydrolyse mit Schwefelsäure im Autoklaven oder am Rückfluß § 283.

Eigenschaften. Sphingosin bildet lange Nadeln, die unlöslich in Wasser, aber löslich in Alkohol sind. Sulfat  $(\text{C}_{17}\text{H}_{35}\text{NO}_2)_2 \cdot \text{H}_2\text{SO}_4$ : Nadeln vom Zersp.  $240-250^\circ$  (auch  $233-234^\circ$ ).  $[\alpha]_D = -13,12^\circ$  (0,53 g in 5 ccm Chloroform + 1 ccm Eisessig gelöst<sup>8)</sup>). Pikrolonat, aus der alkoholischen Lösung des Sulfats mit alkoholischer Pikrolonsäure durch Zusatz von heißem Wasser bis zur Trübung: Es fällt als bald erstarrendes Öl aus, das in Alkohol leichtlöslich ist, wenig löslich in Äther und in Wasser. Fp.  $87-89^\circ$ <sup>9)</sup>. Diacetat: Lange Nadeln. Triacetylsphingosin  $\text{C}_{17}\text{H}_{32}\text{NO}_2(\text{CH}_3\text{CO})_3$ : Fp.  $102-103^\circ$  (unkorr.). Dimethylsphingosin  $\text{C}_{17}\text{H}_{33}\text{NO}_2(\text{CH}_3)_2$ : Krystalle vom Fp.  $87^\circ$ .

#### Derivate des Ammoniumhydroxyds.

Ammoniumderivate kommen namentlich im Pflanzenreich in großer Anzahl vor. Falls sich in einer der Seitenketten eine Carboxylgruppe findet, so bilden sich meist innere Anhydride, die als Betaine (von Beta vulgaris, Runkelrübe, s. unten) bezeichnet werden.

Vorkommen. 151. Tetramin (Tetramethylammoniumhydroxyd)  $\text{C}_4\text{H}_{13}\text{NO}$ . Wurde aus Actinia equina isoliert<sup>10)</sup>. Aus 33 kg der Tiere ließen sich 12,4 g des reinen Chlorids gewinnen (§ 723).

<sup>1)</sup> Thudichum: Die chemische Konstitution des Gehirns usw. Tübingen 1901.

<sup>2)</sup> Shimizu: Biochem. Zeitschr. Bd. 117, S. 263. 1921.

<sup>3)</sup> Levene u. Jacobs: Journ. of biol. chem. Bd. 11, S. 547. 1912.

<sup>4)</sup> Rießer u. Thierfelder: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 77, S. 508. 1912. — Levene u. Jacobs: Journ. of biol. chem. Bd. 11, S. 547. 1912.

<sup>5)</sup> Levene u. Jacobs: l. c. — Thomas u. Thierfelder: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 77, S. 511. 1912.

<sup>6)</sup> Levene u. Jacobs: l. c.

<sup>7)</sup> Lapworth: Journ. of chem. soc. Bd. 103, S. 1029. 1913. — Levene u. West: Journ. of biol. chem. Bd. 16, S. 549. 1913; Bd. 18, S. 481. 1914; Bd. 24, S. 63. 1916.

<sup>8)</sup> Levene u. Jacobs: l. c.

<sup>9)</sup> Fränkel: Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden (Abderhalden). Lfg. 53, S. 56. 1922.

<sup>10)</sup> Ackermann, Holtz u. Reinwein: Zeitschr. f. Biol. Bd. 79, S. 113. 1923.



Starke Base, leichtlöslich in Wasser.  $C_4H_{12}NCl$ : Krystalle, leicht löslich in Wasser, verflüchtigen sich oberhalb von  $360^\circ$ .  $C_4H_{12}N \cdot AuCl_4$ : Schwerlösliche Nadeln vom Zsp.  $336^\circ$ .  $C_8H_{24}N_2 \cdot PtCl_6$ : Oktaeder, kaum löslich in Wasser, Zsp.  $278^\circ$ . Pikrat  $C_4H_{12}N \cdot C_6H_2(NO_2)_3O$ , Nadeln vom Zsp.  $312-313^\circ$ . Ist stark giftig. Eigenschaften.

**Cholin (Trimethyloxäthylammoniumhydroxyd)  $C_5H_{15}NO_2$ .** Wurde zuerst von Strecker<sup>1)</sup> aus Galle durch Behandlung mit Basen gewonnen. Es ist als Hydrolysenprodukt von Phosphatiden anzusehen, wird also leicht überall da gefunden, wo Lecithin vorkommt. Doch findet es sich auch in kleinen Mengen frei, so im Gehirn<sup>2)</sup>, in der Milz<sup>3)</sup>, in der Cerebrospinalflüssigkeit bei Krankheiten des Nervensystems (s. unten) und im Harn nach Parathyreoidektomie<sup>4)</sup>. In 1 l Blut, Harn oder Cerebrospinalflüssigkeit sollen nach neueren Untersuchungen ca. 0,01 g Cholin frei vorhanden sein, und zwar soll der Gehalt bei Störungen des Nervensystems im Liquor nicht gesteigert sein<sup>5)</sup>. Weiter wurde es in der Rindenschicht der Nebenniere, in der Schilddrüse und im Hoden gefunden<sup>6)</sup>, von Florence<sup>7)</sup> und Bocarius<sup>8)</sup> im Sperma, von Le Heux<sup>9)</sup> im Sekret der Darmwand, von Ackermann<sup>10)</sup> im Extrakt von Maikäfern, von Ackermann und Kutscher<sup>11)</sup> im Extrakt von Regenwürmern, von Houdas<sup>12)</sup> im Speichel des Pferdes, von Haurowitz in den Gonaden von *Rhizostoma Cuvieri*<sup>13)</sup>. — Es wirkt in größeren Dosen giftig. Vorkommen.

Es wurde künstlich dargestellt aus Äthylenoxyd oder Glykolchlorhydrin und Trimethylamin<sup>14)</sup>. Synthese.

12 Eigelb werden 2 mal mit je  $\frac{3}{4}$  l Äther, danach 2 mal mit heißem 96 proz. Alkohol erschöpft. Die vereinigten Extraktreste werden mit methylalkoholischer Barytlaug (5 proz.) am Rückflußkühler 1 Stunde gekocht. Es wird dann nach Ausfällen des Bariums mit Kohlensäure filtriert und eingedampft. Der Rückstand wird mit Wasser aufgenommen und filtriert. Das Filtrat wird wieder eingedampft, der Rückstand in Alkohol gelöst. Mit einer alkoholischen Sublimatlösung wird das Cholin gefällt. Der Niederschlag wird ausgewaschen und in heißem Wasser mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Das Filtrat wird schwach Darstellung aus Eigelb<sup>15)</sup>.

<sup>1)</sup> Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 123, S. 353. 1862; Bd. 148, S. 77. 1868.

<sup>2)</sup> Gulewitsch: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 27, S. 81. 1899; Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 134, S. 29. 1865. — Shimizu: Biochem. Zeitschr. Bd. 117, S. 252. 1921.

<sup>3)</sup> Berlin: Zeitschr. f. Biol. Bd. 68, S. 371. 1918.

<sup>4)</sup> Koch: Journ. of biol. chem. Bd. 15, S. 43. 1913.

<sup>5)</sup> Rosenheim: Journ. of physiol. Bd. 35, S. 465. 1907. — Hunt: Journ. of pharmacol. a. exp. therapeut. Bd. 7, S. 301. 1915. — Guggenheim u. Löffler: Biochem. Zeitschr. Bd. 74, S. 209. 1916.

<sup>6)</sup> Lohmann: Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 118, S. 215. 1907. Zentralbl. f. Physiol. Bd. 21, S. 139. 1907. Zeitschr. f. Biol. Bd. 56, S. 1. 1911. — Totani: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 68, S. 86. 1910. — Morinaka: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 124, S. 259. 1922.

<sup>7)</sup> Chem. Zentralbl. 1897, II, S. 1161.

<sup>8)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 34, S. 339. 1901/02.

<sup>9)</sup> Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 173, S. 8. 1918.

<sup>10)</sup> Zeitschr. f. Biol. Bd. 71, S. 200. 1920.

<sup>11)</sup> Zeitschr. f. Biol. Bd. 75, S. 315. 1922.

<sup>12)</sup> Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 156, S. 824; ref. Chem. Zentralbl. 1913, I, S. 1615.

<sup>13)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 122, S. 145. 1922.

<sup>14)</sup> Wurz: Liebigs Ann. d. Chem. Suppl.-Bd. 6, S. 116 u. 197. 1868. — Krüger u. Bergell: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 36, 3, S. 2901. 1903. — Meyer u. Hopff: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 54, 2, S. 2279. 1921.

<sup>15)</sup> Schmidt: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 53, S. 428. 1907; s. auch Diakonow: Mediz. chem. Untersuchungen. Herausgegeben von Hoppe-Seyler, H. 2, S. 221. 1867 u. H. 3, S. 405, 1868. Berlin: Hirschwald.

mit Salzsäure angesäuert und eingedampft. Es wird nun in Alkohol aufgenommen, filtriert, mit Wasser verdünnt und mit einer alkoholischen Cadmiumchloridlösung versetzt. Allmählich krystallisiert die Verbindung  $C_5H_{14}NOCl \cdot CdCl_2$  aus. Durch weiteren Alkoholzusatz kann die Krystallabscheidung vermehrt werden. Durch Schwefelwasserstoff wird aus ihr salzsaures Cholin erhalten.

Eigenschaften. Farblose Krystalle, die aus der Luft Kohlensäure und Wasser anziehen<sup>1)</sup>.  
 Verbindungen: Chlorhydrat  $C_5H_{14}NOCl$ , leichtlöslich in Wasser und in Alkohol, unlöslich in  
 mit Salzsäure Äther, krystallisiert im Exsiccator über Schwefelsäure. Gibt mit Goldchlorid  
 mit Goldchlorid Nadeln:  $C_5H_{14}NOCl \cdot AuCl_3$ , Schmelzpunkt verschieden angegeben:  $243-252^\circ$   
 und  $267-270^\circ$ <sup>2)</sup>, löslich in heißem, fast unlöslich in kaltem Wasser und in  
 mit Sublimat Alkohol. — Mit Sublimat gibt das Chlorhydrat eine Verbindung  $C_5H_{14}NOCl$   
 mit Cadmiumchlorid  $\cdot 6 HgCl_2$ , löslich in Wasser 1,5 : 100. Andere Quecksilberverbindungen sind  
 von Letsche beschrieben<sup>3)</sup>. Die Verbindung mit Cadmiumchlorid s. oben. —  
 mit Platinchlorid  $(C_5H_{14}NOCl)_2 \cdot PtCl_4$ : Krystalle vom Fp.  $213-242^\circ$ <sup>4)</sup>, löslich in Wasser 17:100,  
 unlöslich in Alkohol, krystallisiert dimorph, rhombisch und monoklin (charakteristische Reaktion für Cholin, s. unten). Das Pikrat und Pikrolonat ist  
 mit Pikrinsäure leichtlöslich in Wasser und in Alkohol, das Chromat löst sich leicht in Wasser  
 mit Pikrolonsäure (Unterschied von Neurinchromat<sup>5)</sup>). Die meisten Alkaloidreagenzien geben mit  
 mit Chromsäure salzsaurem Cholin Fällungen<sup>6)</sup>. Aus nicht zu verdünnten, schwachsauren oder  
 sodaalkalischen Lösungen wird Cholin durch Kaliumtrijodid fast quantitativ  
 mit Jod. als krystallisiertes Perjodid ausgefällt: Florences „Spermareaktion“<sup>7)</sup>.  
 Zersetzungen. Die freie Base zerfällt beim Erhitzen in Trimethylamin, Äthylenoxyd und  
 Wasser. Konzentrierte Lösungen geben beim Erhitzen mit Baryt (mit Kalilauge schon bei gewöhnlicher Temperatur) Trimethylamin.

Nachweis. Dem sicheren Nachweis des Cholins muß seine Isolierung vorausgehen. Die entweißten Extrakte werden mit Phosphorwolframsäure gefällt, aus der isolierten Fällung werden die Basen mit Baryt wieder in Freiheit gesetzt. Die schwach salzsauer gemachte Lösung wird eingedampft, der Rückstand wird in Alkohol aufgenommen und mit heiß gesättigter Sublimatlösung gefällt. Die aus dem Sublimatniederschlag mit Schwefelwasserstoff freigemachten Amine werden, falls Basen aus der Histidin- und Arginingruppe vorhanden sind, mit barytalkalischer Silbernitratlösung (s. unten) behandelt. Cholin wird dabei nicht gefällt. Die eingeeengte wässrige Lösung der von Barium und Silber befreiten Chloride wird mit Natriumpikratlösung versetzt (Überschuß vermeiden!), wodurch die Pikrate der Diamine größtenteils abgeschieden werden. Nach Entfernen der Pikrinsäure mit Äther ist noch Cholin und Betain in der Lösung. Ihre Chlorhydrate lassen sich durch Extraktion mit absolutem Alkohol trennen: Cholinchlorhydrat ist leicht in Alkohol löslich, Betainchlorhydrat schwer. Eine Trennung mittels Bicarbonat ist von Stanek angegeben<sup>8)</sup>. Das Cholin wird dann als Perjodid<sup>9)</sup>, als Perchlorat des Salpetersäureesters<sup>10)</sup> oder in Form eines

<sup>1)</sup> Dudley: Chem. Zentralbl. 1922, S. 13. — Meyer u. Hopff: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 54, 2, S. 2277. 1921.

<sup>2)</sup> Siehe Lohmann: Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 118, S. 215. 1907. Wrede u. Banik (Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 131, S. 38. 1923) fanden für die analysenreine Substanz den Schmelzpunkt bei  $265^\circ$ .

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 53, S. 57. 1907.

<sup>4)</sup> Meyer u. Hopff: l. c. <sup>5)</sup> Cramer: Journ. of physiol. Bd. 31, S. 31. 1904.

<sup>6)</sup> Gulewitsch, Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 24, S. 513. 1898.

<sup>7)</sup> Stanek: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 46, S. 280. 1905; Bd. 47, S. 83; Bd. 48, S. 334. 1906; Bd. 54, S. 354. 1908. — Kiesel: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 53, S. 215. 1907.

<sup>8)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 46, S. 280; Bd. 47, S. 83. 1905.

<sup>9)</sup> Stanek: l. c. — Rosenheim: Journ. of physiol. Bd. 35, S. 465. 1907.

<sup>10)</sup> Hofmann u. Hobold: Ber. d. Dtsch. chem. Ges. Bd. 44, 2, S. 1766. 1911.

sonstigen typischen Salzes, evtl. auch auf biologischem Wege charakterisiert<sup>1)</sup>. — Soll die umständliche Isolierung umgangen werden, so läßt sich das Cholin ziemlich exakt durch den Dimorphismus des Chloroplatinats identifizieren<sup>2)</sup>.

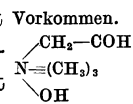
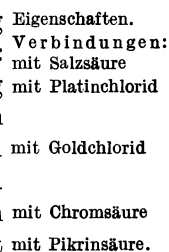
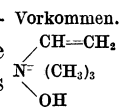
Über die Trennung von Colamin s. § 148, von Basen § 165. Über Isolierung aus Organen s. § 723 u. 724.

**Neurin (Trimethylvinylammoniumhydroxyd) C<sub>5</sub>H<sub>13</sub>NO**. Findet sich im tierischen Organismus nur spärlich. Der von Liebreich<sup>3)</sup> aus Protagon isolierte und von ihm als Neurin bezeichnete Stoff war Cholin. Vielleicht entsteht es im Tierkörper aus Cholin. Gewisse Mikroorganismen vermögen Cholin in Neurin zu verwandeln<sup>4)</sup>. Nachgewiesen wurde es in den Fäulnisprodukten von Fleisch<sup>5)</sup>, gelegentlich im Fleischextrakt<sup>6)</sup>, im Menschenharn<sup>7)</sup>, im Harn parathyreoid-ektomierter Hunde<sup>8)</sup> und in der Nebenniere<sup>9)</sup>. In den Spaltprodukten des Gehirns findet es sich nicht<sup>10)</sup>. — Es ist pharmakologisch wirksamer als Cholin.

Es wurde künstlich dargestellt aus dem Additionsprodukt von Äthylenbromid an Trimethylamin durch Schütteln mit Silberoxyd<sup>11)</sup>.

Krystallisierte, stark basische Masse, die in konzentrierter, wässriger Lösung Trimethylamin abspaltet. Addiert Halogene usw. — Chlorhydrat C<sub>5</sub>H<sub>12</sub>NCl: Ähnlich dem des Cholins. (C<sub>5</sub>H<sub>12</sub>NCl)<sub>2</sub> · PtCl<sub>4</sub>: Zuerst als käsiger Niederschlag ausfallend; aus heißem Wasser Oktaeder und Würfel vom Fp. 213°<sup>12)</sup>, löslich in Wasser 2,6 : 100. C<sub>5</sub>H<sub>12</sub>NCl · AuCl<sub>3</sub>: Nadeln, deren Schmelzpunkt verschieden angegeben wurde (228—248°), löslich in Wasser 0,3 : 100; leichtlöslich in heißem Wasser und heißem Alkohol. Chromat C<sub>5</sub>H<sub>13</sub>NO · H<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub>: In Wasser kaum löslich im Gegensatz zum Cholinchromat<sup>13)</sup>. Alkoholische Pikrinsäure scheidet aus salzsaurem Neurin das Pikrat ab, Cholinchlorid läßt keinen Niederschlag entstehen<sup>14)</sup>. Weitere Salze sind von Gulewitsch beschrieben<sup>15)</sup>. Zur Trennung von Cholin und Neurin eignen sich auch die Chloroplatinate, die eine fraktionierte Krystallisation und mechanische Auslese gestatten.

**Muscarin C<sub>5</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>3</sub>**, wahrscheinlich von nebenstehender Formel. Kommt im Fliegenpilz und seinen Verwandten vor und bedingt zum Teil deren Giftigkeit. 100 g frische Fliegenpilze enthalten ca. 20 mg Muscarin. Brieger<sup>16)</sup> hat eine Base aus gefaultem Dorsch isoliert, die vielleicht mit Muscarin identisch ist. Von King<sup>17)</sup> wird neuerdings behauptet, daß die früher beschriebenen Präparate von „Muscarin“ meist nicht einheitlich gewesen wären. Namentlich mit



<sup>1)</sup> Mott u. Halliburton: Phil. transact. Bd. 191, S. 211. 1899. — Hunt: Journ. of pharmacol. a. exp. therap. Bd. 7, S. 301. 1915. — Guggenheim u. Löffler: Biochem. Zeitschr. Bd. 74, S. 209. 1916; s. auch Schulze: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 60, S. 155. 1909.

<sup>2)</sup> Kauffmann u. Vorländer: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 43, 3, S. 2735. 1910.

<sup>3)</sup> Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 134, S. 29. 1865.

<sup>4)</sup> Schmidt: Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 252, S. 708. 1914.

<sup>5)</sup> Brieger: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 16, 1, S. 1190. 1883; Bd. 17, 1, S. 515 u. 1137. 1884.

<sup>6)</sup> Kutscher: Zeitschr. f. Untersuch. d. Nahrungs- u. Genußmittel Bd. 11, S. 582. 1906; s. auch Krimberg: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 56, S. 422. 1908.

<sup>7)</sup> Kutscher u. Lohmann: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 48, S. 1. 1906.

<sup>8)</sup> Koch: Journ. of biol. chem. Bd. 15, S. 43. 1913.

<sup>9)</sup> Lohmann: Zeitschr. f. Biol. Bd. 56, S. 1. 1911.

<sup>10)</sup> Gulewitsch: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 27, S. 50. 1899.

<sup>11)</sup> Hofmann: Jahresber. d. Chemie Jg. 1858, S. 339. — Bayer: Annalen d. Chemie Bd. 140, S. 311. 1866. — Meyer u. Hopff: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 54, 2, S. 2277. 1921.

<sup>12)</sup> Meyer u. Hopff: l. c.

<sup>13)</sup> Cramer: Journ. of physiol. Bd. 31, S. 31. 1904. — Halliburton: Ergebn. d. Physiol. Bd. 4, S. 24. 1905.

<sup>14)</sup> Meyer u. Hopff: l. c.

<sup>15)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 26, S. 175. 1898/99.

<sup>16)</sup> Ptomaine. <sup>17)</sup> Journ. of the chem. soc. (London) 121/122, S. 1743, 1922.

Cholin sollen sie verunreinigt gewesen sein. Näheres über das reine Muscarin s. in der Originalarbeit.

**Synthese.** Das von Berlinerblau<sup>1)</sup> und E. Fischer<sup>2)</sup> synthetisch gewonnene Produkt obiger Formel ist nicht mit dem natürlichen Muscarin identisch, auch nicht die von Schmiedeberg und Harnack<sup>3)</sup> aus Cholin durch Behandeln mit Salpetersäure dargestellten Körper<sup>4)</sup>.

**Eigenschaften.** Muscarin bildet geschmack- und geruchlose Krystalle. Es wird durch die meisten Alkaloidreagenzien gefällt.  $(C_5H_{14}NO_2Cl)_2 \cdot PtCl_4 + 2 H_2O$ : Oktaeder, schwerlöslich in Wasser, Schmelzpunkt unscharf.

**Vorkommen.** 152. **Betain**  $C_5H_{11}NO_2 + H_2O$ . Wurde zuerst von Scheibler aus dem eingedickten Saft der Zuckerrübe (*Beta vulgaris*) gewonnen. Es findet sich sehr häufig in Pflanzenteilen, weniger im Tierkörper: In der Mies- und Kammuschel<sup>5)</sup>, in den Gonaden von *Rhizostoma Cuvieri*<sup>6)</sup>, im Gewebe von Cephalopoden<sup>7)</sup>, von Schneckenarten<sup>8)</sup>, von Fischen<sup>9)</sup>, von Krebsarten<sup>10)</sup>, vom Regenwurm<sup>11)</sup>, in der Niere des Rindes<sup>12)</sup>, vielleicht auch im Harn<sup>13)</sup>. Verfüttertes Betain erscheint zum Teil im Harn, auch in der Milch wieder<sup>14)</sup>. — Pharmakologisch ist es kaum wirksam.

**Synthese.** Es wurde dargestellt aus Monochloressigsäure und Trimethylamin<sup>15)</sup> und aus Dimethylaminoessigsäuremethylester durch Erhitzen<sup>16)</sup>.

**Eigenschaften.** Betain bildet große, wasserhelle Krystalle, meist mit 1 Mol.-Krystallwasser.

**Verbindungen:** Löslich in Wasser von 14° 157 : 100, in Methylalkohol von 21° 54 g in 100 g, in Äthylalkohol von 18° 8,6 g in 100 g. Gibt mit stärkeren Säuren Salze, aber mit Salzsäure nicht mit Alkalien.  $C_5H_{11}NO_2 \cdot HCl$ : Tafeln vom Fp. 227—228°, löslich in Wasser, schwerlöslich in Alkohol (Unterschied vom Cholin, s. oben).  $C_5H_{11}NO_2 \cdot HAuCl_4$ : In Wasser schwerlösliche Nadeln oder Blättchen vom Fp. 209—238°. mit Goldchlorid  $(C_5H_{11}NO_2)_2 \cdot H_2PtCl_6$ : Tafeln vom Fp. 242°, unlöslich in Alkohol. — Die mit Pikrin- und Pikrolonsäure. Alkaloidreagenzien wirken ganz ähnlich wie auf Cholin. Das Pikrat und Pikrolonat ist in Wasser löslich, ersteres scheidet sich aus der mit Pikrinsäure gesättigten alkoholischen Lösung fast quantitativ ab.

**Umwandlung.** Beim Erhitzen mit Alkalien entweicht Trimethylamin.

<sup>1)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 17, 1, S. 1139. 1884.

<sup>2)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 26, 1, S. 464. 1893; Bd. 27, 1, S. 165. 1894; Bd. 41, 1, S. 1019. 1908.

<sup>3)</sup> Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 4, S. 168. 1875; Bd. 6, S. 101. 1877.

<sup>4)</sup> Nothnagel: Arch. f. Pharmakol. Bd. 232, S. 60. 1894. — Ewins: Biochem. Journ. Bd. 8, S. 44, 209 u. 366. 1914. — Weinhausen: Journ. of chem. soc. Bd. 42, S. 1670. 1920; ref. Chem. Zentralbl. 1920, III, S. 820.

<sup>5)</sup> Brieger: Ptomaine. — Jansen: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 85, S. 231. 1913. — Wilson: Journ. of biol. chem. Bd. 18, S. 17. 1914; ref. Chem. Zentralbl. 1914, III, S. 575. — Ackermann, Zeitschr. f. Biol. 74, S. 67. 1921.

<sup>6)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 122, S. 145. 1922.

<sup>7)</sup> Suzuki u. Mitarb.: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 62, S. 1. 1909. — Henze: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 70, S. 253. 1911.

<sup>8)</sup> Wilson: l. c.

<sup>9)</sup> Suwa: Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 128, S. 421; Bd. 129, S. 231. 1909. — Yoshimura u. Kanai: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 88, S. 346. 1913.

<sup>10)</sup> Kutscher: Zeitschr. f. Biol. Bd. 64, S. 240. 1914. — Ackermann u. Kutscher: Zeitschr. f. Untersuch. d. Nahrungs- u. Genußmittel Bd. 13, S. 610; Bd. 14, S. 687. 1907.

<sup>11)</sup> Ackermann u. Kutscher: Zeitschr. f. Biol. Bd. 75, S. 315. 1922.

<sup>12)</sup> Bebeschin: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 72, S. 380. 1911.

<sup>13)</sup> Liebreich: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 2, S. 12 und 167. 1869; Bd. 3, S. 161. 1870.

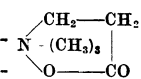
<sup>14)</sup> Kohlrausch: Zeitschr. f. Biol. Bd. 57, S. 273. 1912. — Rolle: Zeitschr. f. Untersuch. d. Nahrungs- u. Genußmittel Bd. 30, S. 361. 1915.

<sup>15)</sup> Liebreich: l. c.

<sup>16)</sup> Willstätter: Ber. d. Dtsch. chem. Ges. Bd. 35, 1, S. 584. 1902.

Isolierung und Trennung s. bei Cholin (§ 151), Trennung von Basen s. § 165. Isolierung aus Organen s. § 723.

**$\beta$ -Homobetain  $C_6H_{13}NO_2$ .** Ist nicht ganz sicher nachgewiesen in der Mutterlauge des Carnitins aus Fleischextrakt<sup>1)</sup>. Es entsteht aus Carnitin durch Oxydation mit Permanganat<sup>1)</sup>, wohl auch durch Methylierung des  $\beta$ -Alanins.



Wurde künstlich dargestellt von Weiß<sup>2)</sup>.

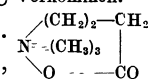
Synthese.

Weiß, seidige Prismen vom Fp. 126°, löslich in Wasser und in Alkohol.

Eigenschaften.

**$\gamma$ -Butyrobetain  $C_7H_{15}NO_2$ .** Entsteht wahrscheinlich aus  $\gamma$ -Aminobuttersäure durch Methylierung. Es wurde von Brieger<sup>3)</sup> aus faulem Pferdefleisch gewonnen. Außerdem fand es sich im Harn von Hunden, die mit Phosphor vergiftet waren<sup>4)</sup>, auch soll es sich im Harn von Kaninchen nach Eingabe von Carnitin nachweisen lassen<sup>5)</sup>.

Vorkommen.



Ist künstlich gewonnen durch Methylierung von  $\gamma$ -Aminobuttersäure<sup>6)</sup>.

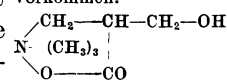
Synthese.

Es stellt weiße Blättchen dar, die Krystallwasser enthalten und bei 130° erweichen, bei 220° aufsieden.  $C_7H_{15}NO_2 \cdot HCl$ : Nadeln vom Fp. 200°.  $(C_7H_{15}NO_2)_2 \cdot H_2PtCl_6$ : Täfelchen, deren Schmelzpunkt verschieden angegeben ist (212—228°); ziemlich wasserlöslich, unlöslich in Alkohol.  $C_7H_{15}NO_2 \cdot HAuCl_4$ : Nadeln vom Fp. 176—184°. Das Pikrat ist löslich in Wasser.

Eigenschaften.

**Carnitin  $C_7H_{15}NO_3$ ,** wahrscheinlich von nebenstehender Formel<sup>7)</sup>. Findet sich im Säugetiermuskel zu ca. 0,03—0,2%<sup>8)</sup>, auch im Harn von Hunden, die mit Fleischextrakt gefüttert waren<sup>9)</sup>. Als Muttersubstanz kann die Glutaminsäure angesehen werden, aus der es auf dem Wege über die  $\gamma$ -Aminobuttersäure entstehen dürfte<sup>10)</sup>. Es ist wohl identisch mit dem Novain aus Fleischextrakt<sup>11)</sup>, wohl auch mit der Base  $C_7H_{15}NO_2$  von Dabrowski<sup>12)</sup>. Im Organismus des Kaninchens wird es vielleicht zu  $\gamma$ -Butyrobetain (s. oben) verändert. Möglicherweise ist das Auftreten von Reduktonovain (=  $\gamma$ -Butyrobetain?) im menschlichen Organismus auf denselben Reduktionsmechanismus zurückzuführen.

Vorkommen.



Das von E. Fischer und Göddertz<sup>13)</sup> synthetisierte „racemische Carnitin“ (aus  $\alpha$ -Brom- $\gamma$ -Phthaliminobuttersäure) ist nach Engeland (l. c.) konstitutionell verschieden vom Carnitin.

Synthese.

<sup>1)</sup> Engeland: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 42, 2, S. 2457. 1909.

<sup>2)</sup> Jenaische Zeitschr. f. Naturwiss. Bd. 60, S. 221. 1887.      <sup>3)</sup> Ptomaine.

<sup>4)</sup> Takeda: Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 133, S. 365. 1910.

<sup>5)</sup> Engeland: Zeitschr. f. Untersuch. d. Nahrungs- u. Genußmittel Bd. 16, S. 664. 1908.

<sup>6)</sup> Willstätter: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 35, 1, S. 584. 1902. — Krimberg: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 53, S. 521. 1907.

<sup>7)</sup> Engeland: Ber. d. Dtsch. chem. Ges. Bd. 54, 2, S. 2208. 1921.

<sup>8)</sup> Gulewitsch u. Krimberg: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 45, S. 326. 1905. — Krimberg: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 48, S. 412; Bd. 49, S. 89. 1906; Bd. 50, S. 361; Bd. 53, S. 515. 1907; Bd. 55, S. 466. 1908. — Engeland: Zeitschr. f. Untersuch. d. Nahrungs- u. Genußmittel Bd. 16, S. 658 u. 664. 1908. — Skworzow: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 68, S. 26. 1910. — Demianowski: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 80, S. 212. 1912. — Smorodinzew: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 87, S. 12. 1913; Bd. 92, S. 214 u. 221. 1914, Bd. 123, S. 116. 1922; Engeland u. Biehler: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 123, S. 290. 1922; Journ. d. russ. phys. chem. Ges. Bd. 49, S. 263. 1917; ref. Chem. Zentralbl. 1923, II, S. 946.

<sup>9)</sup> Kutscher u. Lohmann: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 48, S. 1. 1906.

<sup>10)</sup> Guggenheim: Die biogenen Amine.

<sup>11)</sup> Krimberg: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 55, S. 466. 1908. — Engeland: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 42, 2, S. 2459. 1909.

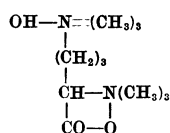
<sup>12)</sup> Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 135, S. 244. 1902. Sur la manite etc. 1903.

<sup>13)</sup> Ber. d. Dtsch. chem. Ges. Bd. 43, 3, S. 3272. 1910.

**Eigenschaften.** Darstellung aus frischem Muskelextrakt oder Fleischextrakt s. § 722 u. 723. Nichtkrystallisierende Masse von stark alkalischer Reaktion, löslich in Wasser und in Alkohol.  $[\alpha]_D = -20,9^\circ$  (10proz. Lösung, die freie Salzsäure enthält). Beim Erhitzen mit Barytwasser entsteht Trimethylamin und Crotonsäure (?), bei der Behandlung mit konzentrierter Schwefelsäure oder mit Jodwasserstoffsäure und Phosphor entsteht Apocarnitin  $C_7H_{13}NO_2$ , nicht  $\gamma$ -Butyrobetain, wie Krimberg (l. c.) angibt<sup>1)</sup>. —  $C_7H_{15}NO_3 \cdot HCl$ : Krystalle, löslich in Wasser und in Alkohol.  $(C_7H_{15}NO_3)_2 \cdot H_2PtCl_6$ : Prismen, löslich in Wasser, Fp. 214—218°.  $C_7H_{15}NO_3 \cdot H_2AuCl_4$ : Nadeln oder Täfelchen vom Fp. 150—151°.  $C_7H_{15}NO_3 \cdot 2HgCl_2$ : aus der alkoholischen Lösung der freien Base mit alkoholischer Sublimatlösung; Krystalle, schwerlöslich in Wasser, Fp. 204—205°, gut zur Isolierung des Carnitins geeignet. Weitere Verbindungen mit Sublimat s. bei Smorodinzew<sup>2)</sup>.

**Oblitin, Carnitinäthylester**  $C_{13}H_{38}N_2O_5$  (?). Es wurde von Kutscher aus Fleischextrakt gewonnen<sup>3)</sup>. Es hat sich nach Krimberg<sup>4)</sup> erst während der Isolierung aus Carnitin gebildet. Im tierischen Organismus wird es wieder zu Carnitin<sup>5)</sup>, ebenso bei der Einwirkung von Bakterien<sup>6)</sup>. — Nach Engeland unterscheidet sich Oblitin vom Carnitinäthylester dadurch, daß Oblitin ein Golddoppelsalz liefert, der Äthylester sich hingegen mit Goldchlorid zersetzt.  $C_{18}H_{38}N_2O_5 \cdot H_2PtCl_6$ : Rote Oktaeder oder Blättchen vom Zersp. 216—230°, schwerlöslich in Wasser und in Alkohol<sup>7)</sup>.  $C_{18}H_{38}N_2O_5 \cdot 2HAuCl_4$ : Blättchen, schwerlöslich in Wasser. Das in Nadeln krystallisierende Oblitinchlorhydrat gibt in Lösung mit Kaliumwismutjodid eine Trübung: es scheiden sich bald Nadeln ab, die in Wasser kaum löslich sind.

Über seine Isolierung aus Organen s. § 723.

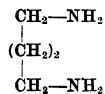


**Myokynin**, wahrscheinlich Ornithinbetain  $C_{11}H_{26}N_2O_3$ . Findet sich in geringer Menge im Hunde- und Pferdemuskel<sup>8)</sup>, auch im menschlichen Muskel<sup>9)</sup>. Bei der Aufarbeitung gerät es in die Lysinfraktion. Es ist dem synthetisch dargestellten Ornithinbetain nicht ganz gleich, vielleicht mit ihm stereoisomer<sup>10)</sup>. Das natürliche Myokynin dreht links:  $[\alpha]_D = -11^\circ$  bis  $-13,5^\circ$ . Es gibt mit Zinkstaub erhitzt keine Pyrroldämpfe. Das künstliche Ornithinbetain dreht nach rechts und gibt die Pyrrolreaktion. Die Platin- und Goldsalze sind sich jedoch sehr ähnlich. —  $C_{11}H_{28}N_2O_4 \cdot H_2PtCl_6$ : In Wasser schwer-, in Alkohol unlöslich. Zersp. 234—235°.  $C_{11}H_{24}N_2O_2 \cdot 2HAuCl_4 + 2H_2O$ : schwerlöslich in Wasser, Fp. unscharf bei 204—205°.

Darstellung aus Organen s. § 723.

#### Diamine.

**Vorkommen.** 153. **Putrescin (Tetramethyldiamin)**  $C_4H_{12}N_2$ . Es wurde zuerst von Brieger aus Fäulnisprodukten isoliert<sup>11)</sup>. Weiter fand es sich im Autolysat vom Schweine-



<sup>1)</sup> Engeland: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 54, 2, S. 2208. 1921.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 123, S. 116. 1922.

<sup>3)</sup> Zeitschr. f. Untersuch. d. Nahrungs- u. Genußmittel Bd. 10, S. 528. 1905; Bd. 11, S. 582. 1906.

<sup>4)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 56, S. 417. 1908; Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 42, S. 3879. 1909.

<sup>5)</sup> Kutscher u. Lohmann: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 48, S. 1. 1906.

<sup>6)</sup> Kutscher: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 48, S. 331. 1906.

<sup>7)</sup> Krimberg: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 55, S. 472. 1908.

<sup>8)</sup> Ackermann: Zeitschr. f. Biol. Bd. 59, S. 433; Bd. 61, S. 373. 1913.

<sup>9)</sup> Engeland: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 54, 2, S. 2208, Anmerkung. 1921.

<sup>10)</sup> Ackermann bei 1.

<sup>11)</sup> Ptomaine; s. dazu auch Willstätter u. Heubner: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 40, 3, S. 3874. 1907. — Ackermann: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 53, S. 545. 1907.

magen<sup>1)</sup>. Ob es dabei unter Ausschluß von Mikroorganismen entstanden ist, ist fraglich<sup>2)</sup>. Auch im Käse wurde es nachgewiesen<sup>3)</sup>. Ellinger beobachtete seine Bildung bei der Einwirkung von Bakterien auf Ornithin<sup>4)</sup>, Dakin bei der Behandlung von Ornithin mit Lebergewebe<sup>5)</sup>. Neben Cadaverin wurde es bei manchen Fällen von Cystinurie aus Harn und Kot gewonnen<sup>6)</sup>, auch aus dem Kot bei Diarrhöe<sup>7)</sup>. Im normalen Harn ist es (neben Cadaverin) höchstens in Spuren vorhanden<sup>8)</sup>. Bei perniziöser Anämie und bei Malaria konnten sehr geringe Mengen nachgewiesen werden<sup>9)</sup>. Loewy und Neuberg<sup>10)</sup> beobachteten es im Harn eines Cystinurikers nach Eingabe von Arginin. Ackermann wies es im Extrakt von Maikäfern nach<sup>11)</sup>. — Es ist nicht giftig.

Wurde dargestellt durch Reduktion von Äthylencyanid<sup>12)</sup> oder Succindiald-Synthese. oxim<sup>13)</sup>.

Es bildet Krystalle vom Fp. 27°, vom Kp. 158—160°. Riecht stark nach Sperma. Mit Wasserdämpfen ist es wenig flüchtig. Aus der Luft zieht es Kohlensäure an. In Alkohol und Wasser löst es sich leicht, in Äther wenig.  $C_4H_{12}N_2 \cdot 2 HCl$ : Schwerlöslich in Alkohol.  $C_4H_{12}N_2 \cdot H_2PtCl_6$ : Nadeln oder Blättchen, schwerlöslich in Wasser, doch leichter als das Cadaverinsalz.  $C_4H_{12}N_2 \cdot 2 H_2O$ : Schwerer löslich in Wasser als das Cadaverinsalz. Fp. 230—240°. Das Pikrat und Pikrolonat ist in Wasser schwerlöslich, ersteres zeigt einen unscharfen Zersetzungspunkt von 250—260°, letzteres von 263°<sup>14)</sup>. Dibenzoylputrescin  $C_4H_8(NH \cdot CO \cdot C_6H_5)_2$  (s. unten): Nadeln vom Fp. 175—176°, unlöslich in Wasser und Äther, löslich in Alkohol, aus dem es durch Zusatz von Äther abgeschieden werden kann (Unterschied vom Dibenzoylcadaverin). Phenylisocyanatputrescin  $C_4H_8(NH \cdot CO \cdot NH \cdot C_6H_5)_2$ : Aus der freien Base mit Phenylisocyanat in Äther unter Kühlung. Krystalle vom Fp. 240° (korr.), fast unlöslich in Wasser, kaltem Alkohol und Aceton, Benzol und Schwefelkohlenstoff, löslich in Nitrobenzol und Pyridin<sup>15)</sup>. — Phosphorwolframsäure, Phosphormolybdänsäure, Kaliumquecksilberjodid, Kaliumwismutjodid und Jod-Jodkalium geben mit Putrescin Niederschläge.

Isolierung und Trennung s. bei Cadaverin und § 185.

**Cadaverin (Pentamethyldiamin)  $C_5H_{14}N_2$ .** Wurde mit Putrescin von Brieger<sup>16)</sup> aus gefaultem Fleisch gewonnen. Es entsteht bei der bakteriellen

<sup>1)</sup> Lawrow: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 33, S. 312. 1901.

<sup>2)</sup> Kutscher u. Lohmann: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 41, S. 332. 1904; Bd. 44, S. 382. 1905.

<sup>3)</sup> Winterstein u. Thöny: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 36, S. 28. 1902. — van Slyke u. Hart: Chem. Zentralbl. 1903, I, S. 657, II, S. 133.

<sup>4)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 31, 3, S. 3183. 1898; Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 29, S. 334. 1900; s. dagegen Ackermann: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 60, S. 482. 1909 u. Ellinger: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 65, S. 394. 1910.

<sup>5)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 1, S. 171. 1906.

<sup>6)</sup> Baumann u. Udránszky: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 21, 3, S. 2744. 1888; Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 13, S. 562. 1889. — Bödtker: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 45, S. 393. 1905. — Loewy u. Neuberg: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 43, S. 338. 1904/05; s. dagegen Garrod u. Hurlley: Journ. of physiol. Bd. 34, S. 217. 1906.

<sup>7)</sup> Roos: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 16, S. 192. 1892.

<sup>8)</sup> Dombrowski: Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 135, S. 244. 1902; ref. Chem. Zentralbl. 1902, II, S. 666.

<sup>9)</sup> Roos: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 16, S. 123. 1892. <sup>10)</sup> L. c.

<sup>11)</sup> Zeitschr. f. Biol. Bd. 71, S. 197. 1920.

<sup>12)</sup> Ladenburg: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 19, 1, S. 780. 1886.

<sup>13)</sup> Willstätter u. Heubner: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 40, 3, S. 3869. 1907.

<sup>14)</sup> Wrede u. Banik, Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 131, S. 38. 1923.

<sup>15)</sup> Loewy u. Neuberg: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 43, S. 356. 1904.

<sup>16)</sup> Literatur s. bei Putrescin.

Eigenschaften.

Verbindungen:

mit Salzsäure

mit Platinchlorid

mit Goldchlorid

mit Pikrin- und

Pikrolonsäure

mit Benzoesäure

mit Phenylisocyanat.

Vorkommen.

$CH_2-NH_2$

$(CH_2)_3$

$CH_2-NH_2$

Zersetzung des Lysins<sup>1)</sup>, auch bei dessen trockener Destillation<sup>2)</sup>. Neben Putrescin wurde es gefunden im Käse, im Autolysat von Schweinemagen<sup>3)</sup>, bei der peptischen Verdauung von Ovalbumin<sup>4)</sup>, im frischen Pankreas<sup>5)</sup>, in geringer Menge im Harn<sup>6)</sup>. Nach Guggenheim ist es wohl identisch mit Gerontin, Saprin und Neuridin<sup>7)</sup>, nach Wrede mit der von Kunz<sup>8)</sup> aus Cholerakulturen isolierten Base, die Kunz für Spermin ansprach<sup>9)</sup>. — Es ist nicht giftig.

Synthese. Es kann gewonnen werden durch Reduktion von Trimethylencyanid<sup>10)</sup> oder aus Piperidin<sup>11)</sup>.

Eigenschaften. Stark basischer Sirup, der im Kältegemisch erstarrt. Riecht nach Sperma.

Verbindungen: Kp. 178—179°. Siedet unzersetzt über Kalihydrat. Ist leichtlöslich in Wasser und Alkohol, wenig in Äther.  $C_5H_{14}N_2 \cdot 2 HCl$ : Unlöslich in absolutem Alkohol. mit Platinchlorid  $C_5H_{14}N_2 \cdot H_2PtCl_6$ : Prismen oder Nadeln, löslich in ca. 100 Teilen Wasser, mit Goldchlorid Zersp. 215—275°, je nach Erhitzen<sup>12)</sup>.  $C_5H_{14}N_2 \cdot 2 HAuCl_4$ : Nadeln oder Würfel vom Fp. 186—188°, leichtlöslich in Wasser (s. dagegen Putrescin). Pikrat ist mit Pikrinsäure fast unlöslich in Wasser, bildet Nadeln oder Tafeln vom Fp. 221°. Pikrolonat mit Pikrolonsäure  $C_5H_{14}N_2 \cdot 2 C_{10}H_8N_4O_5$ : Nadeln oder Tafeln, schwerlöslich in Wasser oder Alkohol, doch löslicher als das Putrescinsalz. Zersp. 250°<sup>13)</sup>. Dibenzoylcadaverin  $C_5H_{10}(NH \cdot C_6H_5 \cdot CO)_2$  (s. unten), unlöslich in Wasser und Äther, löslich in Alkohol, aber aus Alkohol nicht durch Äther fällbar (s. dagegen Putrescin); mit Benzoesäure Fp. 130°. Phenylisocyanatcadaverin  $C_5H_{10}(NH \cdot CO \cdot NHC_6H_5)_2$ , wie die entsprechende Putrescinverbindung, doch löslicher in Pyridin, Fp. 208—209° (korr.). — Alkaloidreagenzien geben Fällungen ähnlich wie mit Putrescin (s. dort).

Darstellung und Trennung von Cadaverin und Putrescin. Nach der Trennungsmethode von Kossel und Kutscher finden sich die Diamine, die Diaminosäuren, Cholin und Betain sowie die aromatischen Basen in der sog. Lysinfraktion (§ 165). Cholin und Betain werden als lösliche Pikrate entfernt (s. bei Cholin § 151). Sind aromatische Basen vorhanden (evtl. Millon's Reaktion ausführen), so ist deren Abtrennung schwierig (s. dort). Die Trennung der Diamine von den Diaminocarbonsäuren geschieht nach Udránszky und Baumann<sup>14)</sup> auf Grund der Schwerlöslichkeit der Diaminobenzoylverbindungen in Alkali. Das Benzoylputrescin läßt sich vom Benzoylcadaverin vermöge der verschiedenen Löslichkeit in Alkohol-Äther abscheiden. — Auch wäre eine Trennung der Chloride mit Alkohol möglich, in dem das Putrescinsalz schwerer löslich ist als das Cadaverinsalz. Ebenfalls eignen sich die Chloroplatinate und Chloroaurate zur fraktionierten Krystallisation. Bei Anwesenheit größerer Mengen Diamine kann auch fraktionierte Destillation zum Ziele führen.

<sup>1)</sup> Ellinger: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 29, S. 334. 1900; s. dagegen Ackermann: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 60, S. 482. 1909. — Ellinger: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 65, S. 394. 1910.

<sup>2)</sup> Neuberg: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 45, S. 118. 1905.

<sup>3)</sup> Literatur s. bei Putrescin.

<sup>4)</sup> Langstein: Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 2, S. 229. 1902.

<sup>5)</sup> Werigo: Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 51, S. 362. 1892. — Steyrer: Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 1, S. 506; Bd. 2, S. 288. 1902; s. dagegen Kutscher u. Lohmann: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 41, S. 332. 1904.

<sup>6)</sup> Literatur s. bei Putrescin.

<sup>7)</sup> Die biogenen Amine.

<sup>8)</sup> Monatshefte f. Chemie Bd. 9, S. 372. 1888; Sitzungsber. d. Akad. d. Wiss. Wien Bd. 97, S. 358. 1888.

<sup>9)</sup> Wrede u. Banik: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 131, S. 38. 1923.

<sup>10)</sup> Ladenburg: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 16, 1, S. 1151. 1883; Bd. 18, 2, S. 2957 u. 3100. 1885; Bd. 19, 1, S. 780 u. 2, S. 2586. 1886; Bd. 20, 2, S. 2216. 1887.

<sup>11)</sup> v. Braun: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 37, 3, S. 3583. 1904.

<sup>12)</sup> Wrede s. bei <sup>9)</sup>.

<sup>13)</sup> Otori: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 43, S. 305. 1904/05.

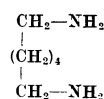
<sup>14)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 13, S. 562. 1889.



Beispiel: Isolierung der Diamine aus (Cystin-) Harn, Faeces (bei Cystinurie) und faulenden Substanzen nach Udránszky und Baumann<sup>1)</sup>: 1500 ccm Harn werden mit 200 ccm 10proz. Natronlauge und 20 ccm Benzoylchlorid geschüttelt, bis der Geruch nach Benzoylchlorid verschwunden ist. Faeces und faulende Substanzen werden zunächst mit schwefelsäurehaltigem Alkohol digeriert, der Auszug wird verdunstet, der Rückstand wird in Wasser gelöst, die filtrierte Lösung wird in der oben angegebenen Weise benzyliert. Der größere Teil der Diaminbenzoylverbindungen scheidet sich ab (Aufarbeitung der Mutterlauge s. im Original). Sie werden abfiltriert und in Alkohol aufgenommen. Die Lösung wird nach dem Einengen in die 30fache Menge Wasser gegossen, die ausgefallenen Krystalle werden mit Wasser gewaschen, in Alkohol gelöst und wieder mit Wasser ausgefällt. Sie werden dann in wenig warmem Alkohol gelöst und in das 20fache Volum Äther gegeben: Die Putrescinverbindung krystallisiert aus, die Cadaverinverbindung bleibt in Lösung. — Zur Isolierung der Diamine aus Faeces usw. wird die Masse mit schwefelsäurehaltigem Alkohol digeriert. Das Extrakt wird verdunstet, mit Wasser aufgenommen und wie oben benzyliert. — Ein anderes Verfahren beruht auf der Abscheidung der Diamine als Phenylisocyanatverbindungen<sup>2)</sup>. — Isolierung nach Brieger und nach Ackermann s. § 165.

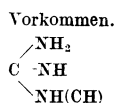
Isolierung der  
Diamine nach  
Udránszky und  
Baumann.

**Hexamethyldiamin**  $C_6H_{16}N_2$ . Ist vielleicht aus faulem Pferdefleisch isoliert worden<sup>3)</sup>. Synthetisches Hexamethyldiamin<sup>4)</sup> ist nicht mit der von Garcia gewonnenen Verbindung identisch.



#### Guanidinderivate\*).

**154. Methylguanidin**  $C_2H_7N_3$ . Ist nachgewiesen in menschlicher Muskulatur zu 0,04%<sup>5)</sup>, in faulem Pferdefleisch, in einer Kommabacillenkultur<sup>6)</sup>, im Fleisch von an Septicämieinfektion verendeten Kaninchen<sup>7)</sup>, im Fleischextrakt<sup>8)</sup>, im Fischfleisch<sup>9)</sup>, im Schweinefleisch (zu etwa 0,03%<sup>10)</sup>, im Harn von Mensch, Pferd und Hund<sup>11)</sup>, im Paralytikerharn<sup>12)</sup>, im Harn parathyreoidektomierter Hunde<sup>13)</sup>, im Fleisch vom Riesensalamander *Cryptobranchus japonicus*<sup>14)</sup>. Die Befunde sind jedenfalls zum Teil mit Vorsicht aufzunehmen, da Methylguanidin



\*) Guanidin, Kreatin, Kreatinin s. § 128, 129, 130.

1) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 21, 3, S. 2744 u. 2938. 1888; Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 13, S. 562. 1889.

2) Loewy u. Neuberger: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 43, S. 338. 1904/05.

3) Garcia: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 17, S. 543. 1892.

4) Curtius u. Clemm: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 29, 2, S. 1166. 1896. — Gulewitsch: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 20, S. 287. 1895.

5) Smorodinzew: Journ. d. russ. phys.-chem. Ges. Bd. 49, S. 263. 1917; ref. Chem. Zentralbl. 1923, II, S. 946.

6) Brieger: Ptomaine. Berl. klin. Wochenschr. Jg. 1887, S. 819.

7) Hoffa: Sitzungsber. d. Physiol.-med. Ges. Würzburg 1889, S. 96.

8) Kutscher: Zeitschr. f. Untersuch. d. Nahrungs- u. Genußmittel Bd. 10, S. 528. 1903; Zentralbl. f. Physiol. Bd. 19, S. 504. 1905. — Gulewitsch: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 47, S. 471. 1906. — Engeland: Zeitschr. f. Untersuch. d. Nahrungs- u. Genußmittel Bd. 16, S. 658. 1908. — Krimberg: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 48, S. 412. 1906. — Skworzow: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 68, S. 26. 1910. — Smorodinzew: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 92, S. 414. 1914.

9) Yoshimura u. Kanai: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 88, S. 346. 1913. — Suwa: Zentralbl. f. Physiol. Bd. 22, S. 307. 1908.

10) Smorodinzew: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 123, S. 116. 1922.

11) Achelis: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 50, S. 10. 1906/07. — Kutscher u. Lohmann: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 49, S. 81. 1906. — Engeland: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 57, S. 49. 1908.

12) Allers: Biochem. Zeitschr. Bd. 96, S. 106. 1919.

13) Koch: Journ. of biol. chem. Bd. 15, S. 43. 1913.

14) Reuter: Zeitschr. f. Biol. Bd. 72, S. 129. 1920.

während der Aufarbeitung leicht aus Kreatin und Kreatinin entstehen kann, z. B. bei Gegenwart von alkalischer Silbernitratlösung, aber auch bei Anwesenheit von Quecksilbersalzen<sup>1)</sup>. — Die Giftigkeit ist gering.

Isolierung und Trennung s. § 155, § 165, aus Harn § 586, aus Organen s. § 722 u. 723.

Synthese. Es bildet sich aus Methylamin und Cyanamid<sup>2)</sup> oder auch aus Thioharnstoff und Methylamin<sup>3)</sup>. Darstellung aus Kreatin und Kreatinin durch Oxydation mit Quecksilberoxyd, Silberoxyd oder anderen Oxydationsmitteln s. bei Gulewitsch<sup>4)</sup> und Ewins<sup>5)</sup>.

Eigenschaften. Methylguanidin bildet hygroskopische Krystalle von stark alkalischer Reaktion.  $C_2H_7N_3 \cdot HNO_3$ : Rhombische Täfelchen, schwerlöslich in kaltem Wasser und Alkohol, leichtlöslich in heißem Wasser, Fp. 155°. Pikrat  $C_2H_7N_3 \cdot C_6H_2(NO_2)_3OH$ : mit Pikrinsäure Krystallisiert in zwei Formen vom Fp. 201°<sup>6)</sup>. Pikrolonat  $C_2H_7N_3 \cdot C_{10}H_8N_4O_5$ : mit Pikrolonsäure Löslichkeit in Wasser 0,06 : 100, Fp. 270—291°<sup>7)</sup>.  $C_2H_7N_3 \cdot HAuCl_4$ : Mäßig mit Goldchlorid löslich in Wasser und Alkohol, leichtlöslich in Äther, Fp. ca. 200°. Benzolsulfo- methylguanidin: Durch Schütteln von Methylguanidin, Benzolsulfochlorid und Natronlauge; Krystalle vom Fp. 184°; Löslichkeit in Wasser 0,04 : 100<sup>8)</sup>. — mit Benzolsulfosäure. Methylguanidin wird durch Phosphorwolframsäure und durch barytalkalische Silbernitratlösung gefällt, nicht gefällt durch ammoniakalisches Silbernitrat und durch Gerbsäure.

Vorkommen. **1,1-Dimethylguanidin**  $C_3H_9N_3$ . Wurde nachgewiesen im Harn<sup>9)</sup>, in den Faeces und im Urin bei idiopathischer Tetanie<sup>10)</sup>, im Harn parathyreoidektomierter Hunde<sup>11)</sup> und im Harn von Tieren, die mit Fleischextrakt oder Carnitin gefüttert waren<sup>12)</sup>. Es bildet sich wohl aus Kreatin durch Decarboxylierung.

Isolierung und Trennung s. § 155, aus Harn s. § 586.  
Synthese. Es wurde dargestellt und mit dem Naturprodukt verglichen von Wheeler und Jamieson<sup>13)</sup> und Schenk<sup>14)</sup>.

Eigenschaften. Pikrat  $C_3H_9N_3 \cdot C_6H_2(NO_2)_3OH$ : Prismen vom Fp. 230°. Pikrolonat  $C_3H_9N_3 \cdot C_{10}H_8N_4O_5$ : Prismen oder Säulen, Zersp. 278°.  $C_3H_9N_3 \cdot HAuCl_4$ : Tafeln vom Fp. 248°. Chloroplatinat: Nadeln vom Fp. 225°<sup>15)</sup>.

Vorkommen. **Agmatin (Guanidobutylamin)**  $C_5H_{14}N_4$ . Wurde von Kossel aus dem Hydrolysat des Heringspermas isoliert<sup>16)</sup>, ferner von Kutscher und Engeland aus dem Mutterkornextrakt<sup>17)</sup>. Auch wurde es in der Zwischenflüssigkeit der



<sup>1)</sup> Baumann u. Ingvaldsen: Journ. of biol. chem. Bd. 35, S. 277. 1918; ref. Chem. Zentralbl. 1919, I, S. 351. — Greenwald: Journ. of the Americ. chem. soc. Bd. 41, S. 1109; ref. Chem. Zentralbl. 1919, III, S. 781.

<sup>2)</sup> Erlenmeyer: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 3, S. 896. 1870.

<sup>3)</sup> Wheeler u. Jamieson: Journ. of biol. chem. Bd. 4, S. 111. 1908.

<sup>4)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 47, S. 471. 1906.

<sup>5)</sup> Ewins: Biochem. journ. Bd. 10, S. 102. 1916.

<sup>6)</sup> Gulewitsch: l. c. <sup>7)</sup> Wheeler u. Jamieson: l. c.

<sup>8)</sup> Ackermann: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 48, S. 382. 1906.

<sup>9)</sup> Achelis u. Engeland: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 50, S. 10. 1906. — Engeland: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 57, S. 49. 1908.

<sup>10)</sup> Sharpe: Biochem. journ. Bd. 14, S. 46. 1920. — Findley u. Sharpe: Ber. d. ges. Physiol. Bd. 4, S. 505. 1920.

<sup>11)</sup> Koch: Journ. of biol. chem. Bd. 15, S. 43. 1913.

<sup>12)</sup> Kutscher u. Lohmann: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 48, S. 422; Bd. 49, S. 81. 1906. — Engeland: Zeitschr. f. Untersuch. d. Nahrungs- u. Genußmittel Bd. 16, S. 664. 1908.

<sup>13)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 4, S. 111. 1908.

<sup>14)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 77, S. 328. 1912.

<sup>15)</sup> Schenk: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 77, S. 328, 1912.

<sup>16)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 66, S. 257. 1910.

<sup>17)</sup> Zentralbl. f. Physiol. Bd. 24, S. 479. 1910; Sitzungsber. d. Ges. d. Naturwiss. Marburg 1910.

Heringstestikel in freiem Zustande nachgewiesen<sup>1)</sup>, ebenso in gewissen Käsesorten<sup>2)</sup>.

Isolierung und Trennung s. § 155.

Es wurde von Kossel künstlich dargestellt aus Tetramethyldiamin und Cyanamidsilber<sup>3)</sup>.

4 kg Heringsmilch werden mit 800 ccm Wasser und 40 ccm konzentrierter Schwefelsäure 10 Stunden bei 4 Atm. im Autoklaven erhitzt. Es wird filtriert, nach dem Filtrieren werden mit Quecksilbersulfat Verunreinigungen entfernt. Das Filtrat wird mit Quecksilbernitrat versetzt, bis eine Tüpfelprobe mit Natriumcarbonat einen gelben Niederschlag gibt. Dann wird mit Baryt gesättigt. Der Niederschlag wird mit Wasser ausgewaschen und in schwach schwefelsaurer Lösung mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Die Schwefelsäure wird mit Baryt entfernt. Dann wird mit Salpetersäure angesäuert und mit Silbernitrat versetzt, bis eine Tüpfelprobe mit Barytwasser eine braune Färbung gibt. Das Filtrat wird nun nochmals mit etwas Silbernitrat versetzt und mit Baryt gesättigt. Der Niederschlag wird abzentrifugiert, gut ausgewaschen und in schwach schwefelsaurer Lösung mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Im Filtrat wird die Schwefelsäure durch Baryt, dieser durch Kohlensäure entfernt. Jetzt wird mit Pikrinsäure gefällt. Die ersten amorphen Abscheidungen werden verworfen. Die krystallisierten Pikrate werden durch Umkrystallisieren gereinigt und mit verdünnter Schwefelsäure ins Sulfat übergeführt, wobei die freie Pikrinsäure mit Äther entfernt wird. Das Sulfat wird mit Baryt und Kohlensäure in das Carbonat verwandelt. Das Carbonat scheidet sich aus konzentrierter Lösung in kreydigen Massen ab; nach mehrfachem Umkrystallisieren bildet es feine Krystallblätter oder rosettenförmige Krystalle.

Sulfat  $C_5H_{14}N_4 \cdot H_2SO_4$ : Leichtlöslich in Wasser, schwerlöslich in Alkohol, Nadeln vom Fp. 224—225°. Chloroplatinat und Chloraurat sind leichtlöslich in Wasser. Das Pikrat ist schwerlöslich.

Bei der Oxydation bildet sich Guanidin, Bernsteinsäure und Guanidobuttersäure<sup>4)</sup>.

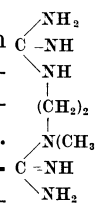
Vitiatin  $C_5H_{14}N_6$ . Hat vielleicht nebenstehende Formel. Es wurde von Kutscher und Engeland aus Fleischextrakt gewonnen<sup>5)</sup>. Es ist durch alkoholische Sublimatlösung nicht fällbar. Chloraurat  $C_5H_{14}N_6 \cdot 2 HAuCl_4$ : Blättchen vom Fp. 167° (unscharf). Isolierung aus Harn § 586, aus Organen § 723.

Methylguanidinpropylamin (Guanidinbutylamin?)  $C_5H_{14}N_4$ , und sym. Dimethylguanidin  $C_3H_9N_3$ . Beide Basen glaubt Koch<sup>6)</sup> im Harne parathyreoidektomierter Hunde nachgewiesen zu haben.

155. Die Guanidinbasen finden sich nach der Trennungsmethode von Kossel und Kutscher (§ 165) in der Argininfraktion (Fällung mit barytalkalischer Silbernitratlösung). Die Silberverbindung des Methylguanidins fällt bei Gegenwart von Ammoniak nicht mit aus; auf Grund dieser Eigenschaft ließe sich vielleicht eine Abtrennung erzielen<sup>7)</sup>. Auch kann die Schwerlöslichkeit des Methyl-

Verbindungen:  
mit Schwefelsäure  
mit Platinchlorid  
mit Pikrinsäure.

Oxydation.



Darstellung und  
Trennung der  
Guanidinbasen.

<sup>1)</sup> Steudel u. Suzuki: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 127, S. 1, 1923.

<sup>2)</sup> Winterstein: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 105, S. 25. 1919.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 68, S. 170. 1910; Sitzungsber. d. Heidelberg. Akad. d. Wiss. 1910; s. auch Kiesel: Chem. Zentralbl. 1916, I, 1018.

<sup>4)</sup> Engeland u. Kutscher: l. c.

<sup>5)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 51, S. 457. 1907; Bd. 57, S. 49. 1908; Zeitschr. f. Untersuch. d. Nahrungs- u. Genußmittel Bd. 16, S. 658. 1908; Zentralbl. f. Physiol. Bd. 21, S. 586. 1908; s. auch Johnson: Journ. of the Americ. chem. soc. Bd. 38, S. 2135. 1916; ref. Chem. Zentralbl. 1917, I, S. 484.

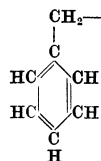
<sup>6)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 15, S. 54. 1913.

<sup>7)</sup> Gulewitsch: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 47, S. 471. 1906.

guanidinnitrats benutzt werden, um es abzuscheiden. Arginin (s. dort) läßt sich evtl. als Kupfernitrattoppelsalz isolieren. Im übrigen erfolgt die Scheidung wohl hauptsächlich durch fraktionierte Krystallisation etwa der Chloroplatinate oder Chloraurate. Zu bedenken ist immer, daß bei Anwesenheit von Kreatin und Kreatinin durch Oxydationsmittel Methylguanidin gebildet werden kann (s. oben). Kreatinin und Methylguanidin lassen sich durch Behandeln mit Benzolsulfochlorid trennen<sup>1)</sup>. — Zum qualitativen Nachweis von Guanidinderivaten eignet sich mitunter Diacetyl<sup>2)</sup>, das in alkalischer Lösung eine rotviolette Färbung mit Fluorescenz entstehen läßt. Guanidin und Methylguanidin gibt die Probe nicht, Eiweißkörper, die Arginingruppen enthalten, reagieren positiv.

*Aromatische und heterocyclische Amine.*

Vorkommen. **156. Phenyläthylamin**  $C_8H_{11}N$ . Es wurde zuerst von Nencki aus faulem Leim gewonnen<sup>3)</sup>. Später wurde es vielfach in bakteriell zersetzten Massen nachgewiesen<sup>4)</sup>. Es entsteht durch Decarboxylierung des Phenylalanins. — Über das Vorkommen von Phenyläthylamin in der Schilddrüse s. die Arbeit von Sarmartino<sup>5)</sup>. — Spiro wies die Identität der in der Natur gefundenen Base mit synthetischem Phenyläthylamin nach. — Es ist kaum giftig.

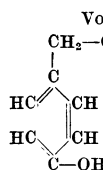


Isolierung und Nachweis s. § 158.

Synthese. Es entsteht aus Benzylcyanid durch Reduktion mit Natrium<sup>6)</sup>.

Eigenschaften. Farbloses Öl, leichtlöslich in Wasser mit starkbasischer Reaktion, leichtlöslich in Alkohol und Äther. Kp.  $198^\circ$  ohne Zersetzung. Mit Wasserdämpfen ist es flüchtig.  $C_8H_{11}N \cdot HCl$ : Blättchen vom Fp.  $217^\circ$ , löslich in Wasser ca. 80 : 100, auch löslich in Alkohol.  $C_8H_{11}N \cdot H_2PtCl_6$ : Blättchen, sehr wenig löslich in Wasser, schwärzt sich bei  $225^\circ$ , zersetzt sich bei  $246-248^\circ$ .  $C_8H_{11}N \cdot HAuCl_4$ : Nadeln vom Fp.  $98-100^\circ$ , leichtlöslich in Alkohol<sup>7)</sup>. Pikrat: Prismen vom Fp.  $171-174^\circ$  (korr.).

Vorkommen. **p-Oxyphenyläthylamin (Tyramin)**  $C_8H_{11}NO$ . Wurde dargestellt aus faulem Fleisch und Typhuskulturen<sup>8)</sup>, aus fauler Fischleber<sup>9)</sup>, aus Pankreasautolysat und aus dem Produkt der peptischen Verdauung von Ovalbumin<sup>10)</sup>. Es ist jedoch nicht sicher, ob bei letzteren Vorgängen Bakterien ganz ausgeschlossen waren. Ackermann wies es im Maikäferextrakt<sup>11)</sup> sowie bei der Fäulnis von hydrolysiertem Casein<sup>12)</sup> nach, Henze im Speichel der Tintenfische<sup>13)</sup>. Auch aus Käse wurde Tyramin gewonnen, und zwar 1 g aus ca. 1,8 kg Emmentaler Käse<sup>14)</sup>. Über



<sup>1)</sup> Ackermann: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 48, S. 382. 1906.

<sup>2)</sup> Harden u. Norris: Journ. of physiol. Bd. 42, S. 332. 1911.

<sup>3)</sup> Monatshefte f. Chemie 1889, S. 524.

<sup>4)</sup> Emmerling: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 30, 2, S. 1863. 1897. — Gautier: Bull. de la soc. de chim.-biol. de Paris [3], Bd. 35, S. 1195. 1906. — Oechsner de Coninck: Bull. de l'assoc. franç. pour l'acad. des sciences cpt. rend. 15, Nancy I, Bd. 112, S. 1886; Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 108, S. 58. 1889; Bd. 126, S. 651. 1898. — Barger u. Walpole: Journ. of physiol. Bd. 38, S. 343. 1909. — Amatsu u. Tsudji: Chem. Zentralbl. 1920, III, S. 489.

<sup>5)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 131, S. 219. 1922.

<sup>6)</sup> Ladenburg: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 18, 2, S. 2956. 1885; Bd. 19, 1, S. 783. 1886. — Wohl u. Berthold: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 43, 2, S. 2175. 1910.

<sup>7)</sup> Emde: Chem. Zentralbl. 1910, II, S. 1478.

<sup>8)</sup> Brieger: Ptomaine. — Barger u. Walpole: Journ. of physiol. Bd. 38, S. 343. 1909.

<sup>9)</sup> Gautier: Bull. de la soc. de chim.-biol. de Paris [3], Bd. 35, S. 1195. 1906.

<sup>10)</sup> Emerson: Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 1, S. 501. 1902. — Langstein: Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 1, S. 507. 1902; Bd. 2, S. 229. 1902.

<sup>11)</sup> Zeitschr. f. Biol. Bd. 71, S. 199. 1920.

<sup>12)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 60, S. 495. 1909.

<sup>13)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 87, S. 51. 1913.

<sup>14)</sup> Winterstein u. Küng: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 59, S. 133. 1909. — van Slyke u. Hart: Chem. Zentralbl. 1903, II, S. 133. — Ehrlich u. Lange: Biochem. Zeitschrift Bd. 63, S. 156. 1914.

das Vorkommen von Tyramin in der Schilddrüse s. die Arbeit von Sammartino<sup>1)</sup>. — Reines Tyrosin wird durch Fäulniserreger in Tyramin übergeführt<sup>2)</sup>. Aus Käse wurde von Ehrlich und Lange<sup>3)</sup> ein Mikroorganismus gezüchtet, der diese Spaltung in Reinkulturen ausführt. — Tyramin ist vielleicht identisch mit Mydin (s. S. 215). — Es ist ziemlich giftig.

Isolierung und Nachweis s. § 158.

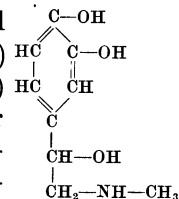
Tyramin entsteht aus Tyrosin durch Erhitzen über seinen Schmelzpunkt<sup>4)</sup>, Synthese. aus Oxybenzylcyanid durch Reduktion<sup>5)</sup> oder aus Tyrosin auf biologischem Wege<sup>6)</sup>.

Es bildet Nadeln oder Blättchen vom Fp. 160—161°, vom Kp. 160—163° bei 2 mm, 175—181° bei 8 mm. Es ist löslich in Alkohol, wenig löslich in Wasser und Äther. Die wässrige Lösung reagiert alkalisch. Es gibt mit Millons Reagens Rotfärbung, mit Tyrosinase (aus Weizenkleie) Dunkelfärbung<sup>7)</sup>.  $C_8H_{11}NO \cdot HCl$ : Krystalle, wenig löslich in Alkohol, Fp. 268—269° (unkorr.)<sup>8)</sup>. Pikrat  $C_8H_{11}NO \cdot C_6H_2(NO_2)_3OH$ : Fp. 200°. Chloroplatinat  $(C_8H_{11}NO)_2 \cdot H_2PtCl_6$ : Nadeln. Benzoylverbindung: aus Benzoylchlorid bei Gegenwart von Natronlauge. Krystalle vom Fp. 170°, kaum löslich in Wasser, löslich in Alkohol.

Colorimetrische Bestimmung s. in der Arbeit von Hanke und Koessler<sup>9)</sup>. Nachweis.

157. 1-Adrenalin (Suprarenin)  $C_9H_{13}NO_3$ . Findet sich im Markteil der Nebenniere bei sämtlichen Wirbeltieren. Es wurde zuerst von Takamine<sup>10)</sup> und Aldrich<sup>11)</sup> krystallisiert erhalten. Die empirische Formel wurde von Pauly<sup>12)</sup> festgestellt, die Konstitution von Abel<sup>13)</sup>, v. Fürth<sup>14)</sup>, Pauly und Stolz<sup>15)</sup> und Friedmann<sup>16)</sup>. Adrenalin wurde ferner im Speicheldrüsensekret einer Krötenart *Bufo aqua* nachgewiesen, und zwar zu ca. 5% des Trockenrückstandes<sup>17)</sup>. Nicht ganz sicher ist der Befund in dem Gift von chinesischen Kröten<sup>18)</sup>. Die menschliche Nebenniere enthält ungefähr 5 mg = 0,1% Adrenalin<sup>19)</sup>; sie gibt davon dauernd geringe Mengen an das Blut ab. Die Entstehung des Adrenalins im Körper ist noch nicht geklärt, vielleicht ist das Tyrosin die Muttersubstanz. — Adrenalin wirkt äußerst heftig auf den Organismus.

Vorkommen.



Isolierung und Nachweis s. § 158. Nachweis in Organen s. § 746.

Die Racemverbindung wurde von Stolz aus Chloracetobrenzcatechin dargestellt<sup>20)</sup>. Die Spaltung derselben mit Weinsäure gelang Flächer<sup>21)</sup>. Synthese.

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 131, S. 219. 1922.

<sup>2)</sup> Barger u. Walpole: l. c. — Sasaki: Biochem. Zeitschr. Bd. 59, S. 429. 1914; Journ. of biol. chem. Bd. 32, S. 527. 1917. <sup>3)</sup> L. c. bei <sup>14)</sup> auf Seite 206.

<sup>4)</sup> Schmidt u. Nasse: Liebigs Annalen d. Chemie Bd. 133, S. 214. 1865.

<sup>5)</sup> Barger: Journ. of the Americ. chem. soc. Bd. 95, S. 1123 u. 1720. 1909. — Koessler u. Hanke: Journ. of biol. chem. Bd. 39, S. 585. 1919.

<sup>6)</sup> Ehrlich u. Pitschimuka: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 45, 1, S. 1006. 1912.

<sup>7)</sup> Bertrand: Cpt. rend. des séances de l'acad. des sciences Bd. 145, S. 1352. 1907.

<sup>8)</sup> Sasaki: Biochem. Zeitschr. Bd. 59, S. 429. 1914.

<sup>9)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 50, S. 235 u. 271. 1922.

<sup>10)</sup> Americ. journ. of pharmacy Bd. 73, S. 523. 1901; ref. Chem. Zentralbl. 1901, II, S. 1354.

<sup>11)</sup> Journ. of physiol. Bd. 5, S. 457. 1901.

<sup>12)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 36, 3, S. 2944. 1903; Bd. 37, 2, S. 1388. 1904.

<sup>13)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 36, 2, S. 1839. 1903; Bd. 37, 1, S. 368. 1904.

<sup>14)</sup> Monatshefte f. Chemie Bd. 24, S. 261. 1903.

<sup>15)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 37, 4, S. 4149. 1904.

<sup>16)</sup> Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 8, S. 95. 1906.

<sup>17)</sup> Abel u. Macht: Journ. of the Americ. med. assoc. Bd. 56, S. 1531. 1911; Journ. of pharmacol. a. exp. therap. Bd. 4, S. 319. 1912.

<sup>18)</sup> Shimuza: Chem. Zentralbl. 1916, II, S. 749; s. a. Novaro: Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. Bd. 87, S. 824. 1922.

<sup>19)</sup> Ingier u. Schmorl: Arch. f. klin. Med. Bd. 104, S. 125. 1911; s. auch Elliot: Journ. of physiol. Bd. 44, S. 374. 1912; Bd. 46, Proz. 15. 1913.

<sup>20)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 37, 4, S. 4149. 1904.

<sup>21)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 58, S. 189. 1908/09.

**Darstellung.** Die zerkleinerten Drüsen werden nach v. Fürth<sup>1)</sup> mit angesäuertem Wasser unter Zusatz von etwas Zinkstaub mehrfach ausgekocht. Die Filtrate werden im Vakuum (Kohlensäureatmosphäre) eingeengt, mit dem mehrfachen Volum Methylalkohol und mit neutralem Bleiacetat versetzt, solange noch ein Niederschlag entsteht. Im Filtrat wird das Blei mit Schwefelwasserstoff entfernt, dann wird stark im Vakuum eingeengt und mit konzentriertem Ammoniak versetzt. Der entstehende krystallinische Niederschlag wird mit Wasser, Alkohol und Äther gewaschen. Dann wird er in verdünnter Salzsäure gelöst und mit Ammoniak gefällt. Dies Lösen und Fällen wird mehrfach wiederholt. — Eine andere Darstellungsmethode ist von Abel<sup>2)</sup> angegeben.

**Eigenschaften.** Mikroskopische Nadelchen oder Blättchen vom Zersp. 212° (korr. 216°),  $[\alpha]_D = -51,4^\circ$  (5proz. Lösung in n-Salzsäure<sup>3)</sup>). Es ist wenig löslich in kaltem Wasser (0,027 : 100), Alkohol und Äther. Die wässrige Lösung reagiert alkalisch, sie oxydiert sich rasch an der Luft. Die Oxydationsfähigkeit ist bei saurer Reaktion der Lösung stark herabgesetzt. Adrenalin löst sich leicht in Säuren oder Alkalien, jedoch nicht in Ammoniak und Alkalicarbonat. Alkaloidreagenzien fällen es nicht<sup>4)</sup>.

**Nachweis.** Mit Eisenchlorid entsteht eine smaragdgrüne Färbung, die auf Zusatz von Alkali in Rot übergeht, beim Ansäuern aber sich wieder ausbildet (noch in Verdünnung 1 : 100 000 feststellbar). Auch die Färbung mit Oxydationsmitteln kann zum qualitativen Nachweis benutzt werden<sup>5)</sup>. Mit Phosphorwolframsäure entsteht eine intensive Blaufärbung, die auch zur colorimetrischen quantitativen Bestimmung verwandt werden kann<sup>6)</sup>. Diese Proben sind aber nicht spezifisch für Adrenalin. Sehr scharf, jedoch auch nur mit gewissen Vorsichtsmaßregeln brauchbar ist der biologische Nachweis. — Über den Nachweis des Adrenalins in den Handelspräparaten s. die Arbeit von Johannesson<sup>7)</sup>.

**Darstellung und Nachweis der Phenylalkylamine.** 158. Darstellung und Nachweis der Phenylalkylamine. Adrenalin kann nicht in der üblichen Weise aus einem Basengemisch gefällt werden, da es zu leicht oxydiert wird. Phenyläthylamin und Tyramin würden sich bei der Trennung nach der Methode von Kossel und Kutscher (§ 165) in der Lysinfraktion finden<sup>8)</sup>. Zur weiteren Isolierung könnte das Basengemisch in alkoholischer Lösung mit Sublimat versetzt werden, wobei die Phenylalkylamine nicht gefällt werden<sup>9)</sup>. Phenyläthylamin kann vielleicht auf Grund seiner Eigenschaft, mit Wasserdämpfen flüchtig zu sein, abgetrennt werden. Auch kann zuerst bei Gegenwart von einem Überschuß an Natronlauge mit Amylalkohol das Phenyläthylamin ausgeschüttelt werden, dann bei sodaalkalischer Reaktion (nachdem vorher neutralisiert war) mit neuem Amylalkohol das Tyramin. — Über colorimetrische

<sup>1)</sup> v. Fürth: Monatshefte f. Chemie Bd. 24, S. 261. 1903.

<sup>2)</sup> Ber. a. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 36, 2, S. 1839. 1903; s. auch Abderhalden u. Bergell: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 37, 2, S. 2022. 1904.

<sup>3)</sup> Flächen: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 58, S. 193. 1908/09.

<sup>4)</sup> Takamine: l. c.

<sup>5)</sup> Ewins: Journ. of physiol. Bd. 40, S. 316. 1910. — Denigès: Bull. de la soc. de chim.-biol. [4], Bd. 19, S. 308. — Comesatti: Zentralbl. f. Physiol. Bd. 23, S. 175. 1909. — Fränkel u. Allers: Biochem. Zeitschr. Bd. 18, S. 40. 1909.

<sup>6)</sup> Folin u. Denis: Journ. of biol. chem. Bd. 13, S. 477. 1913; Chem. Zentralbl. 1913, I, S. 965; s. dazu die Kritik von Maiweg: Biochem. Zeitschr. Bd. 134, S. 292. 1922 und Frowein: Biochem. Zeitschr. Bd. 134, S. 559. 1922. — Seidell: Journ. of biol. chem. Bd. 15, S. 197. 1913. — Scoville: Chem. Zentralbl. 1920, I, S. 669. — Takata: Chem. Zentralbl. 1921, IV, S. 1198. — Autenrieth u. Quantmeyer: Münch. med. Wochenschr. Bd. 68, S. 1007. 1921.

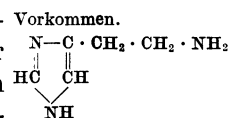
<sup>7)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 76, 377. 1916.

<sup>8)</sup> Guggenheim: Die biogenen Amine.

<sup>9)</sup> S. auch E. Schulze: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 60, 160. 1909.

Methoden zur Bestimmung der aromatischen Amine s. die Arbeit von Hanke und Koessler<sup>1)</sup>.

159. **Histamin (Aminoäthylimidazol)**  $C_5H_9N_3$ . Es wurde isoliert aus der Darmwand<sup>2)</sup>, aus Harn und Kot<sup>3)</sup>, aus Muskulatur bei Gasbrand<sup>4)</sup> und aus der Hypophyse<sup>5)</sup>. Der letztere Befund wird von anderer Seite bestritten<sup>6)</sup>. Über sein Vorkommen in Schilddrüsensubstanz s. die Arbeit von Sammartino<sup>7)</sup>. Weiterhin wurde es aus dem Mutterkorn dargestellt<sup>8)</sup>. Es entsteht aus Histidin durch bakterielle Decarboxylierung, soll sich aber auch aus Eiweißstoffen ohne Mitwirkung von Mikroorganismen bilden können<sup>9)</sup>. Es ist eine große Anzahl von Bakterien beschrieben worden, die Histamin bilden können<sup>10)</sup>. — Histamin ist pharmakologisch sehr wirksam.



Trennung und Nachweis s. § 161.

Künstlich dargestellt wurde es von Windaus und Vogt<sup>11)</sup> sowie von Pyman<sup>12)</sup> und Koessler und Hanke<sup>13)</sup>.

Eine Nährlösung mit etwa 1% Histidingehalt wird bei schwach alkalischer Reaktion 8—10 Tage bei 37° der Wirkung einer Reinkultur von histaminbildenden Bakterien ausgesetzt<sup>14)</sup>. Das gebildete Histamin kann ohne weiteres als Pikrat ausgefällt werden, das dann durch Umkrystallisieren gereinigt wird. Nach Ackermann<sup>15)</sup> ist die Bildung von Histamin auch mit einer mischinfizierten, histidinhaltenen Nährlösung zu erzielen<sup>16)</sup>.

Es bildet weiße, zerfließliche Nadeln vom Fp. 83—84°, Kp. 209° bei 18 mm. Es reagiert stark alkalisch, zieht Kohlensäure an, ist leichtlöslich in Wasser, Alkohol und heißem Chloroform, unlöslich in Äther. Das Pikrat und Pikrolonat ist sehr wenig in Wasser löslich, eignet sich deshalb gut zur Isolierung. — Monopikrat  $C_5H_9N_3 \cdot C_6H_3N_3O_7$ : Nadeln vom Fp. 233—234°. Dipikrat  $C_5H_9N_3 \cdot 2 C_6H_3N_3O_7$ : Prismen vom Zersp. 239°. Dipikrolonat  $C_5H_9N_3 \cdot 2 C_{10}H_8N_4O_5$ : Nadeln vom Zersp. 266°. Benzoylderivate, die sich unter Umständen zur Isolierung eignen, sind von Gerngroß beschrieben<sup>17)</sup>.

<sup>1)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 50, S. 235 u. 271. 1922.

<sup>2)</sup> Barger u. Dale: Journ. of physiol. Bd. 41, S. 499. 1911.

<sup>3)</sup> Koch: Journ. of biol. chem. Bd. 15, S. 45. 1913. — Meakins u. Harington: Journ. of pharmacol. a. exp. therap. Bd. 18, S. 455. 1922.

<sup>4)</sup> Zunz: Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 82, S. 1078; ref. Chem. Zentralbl. 1920, I, S. 181.

<sup>5)</sup> Abel u. Kubota: Journ. phys. a. exp. Th. Bd. 13, 243; ref. Chem. Zentralbl. 1919, III, S. 763; Abel u. Nagayama: ebd. Bd. 15, S. 347; ref. Chem. Zentralbl. 1920, III, S. 521.

<sup>6)</sup> Hanke u. Koessler: Journ. of biol. chem. Bd. 43, S. 557. 1920; s. auch Dale u. Dudley: Journ. of pharmacol. a. exp. therap. Bd. 18, S. 27. 1921; ref. Chem. Zentralbl. 1922, I, S. 773.

<sup>7)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 131, S. 219. 1922.

<sup>8)</sup> Barger u. Dale: Journ. of the Americ. chem. soc. Bd. 97, S. 2592. 1910; ref. Zentralbl. f. Physiol. Bd. 24, S. 885. 1910. — Kutscher: Zentralbl. f. Physiol. Bd. 24, S. 163. 1910.

<sup>9)</sup> Abel, Kubota u. Nagayama: l. c. bei <sup>5)</sup>.

<sup>10)</sup> Berthelot u. Bertrand: Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 154, S. 1643. 1912; Bd. 156, S. 1027. 1913. — Mellanby u. Twort: Journ. of physiol. Bd. 45, S. 53. 1912. — Hanke u. Koessler: Journ. of biol. chem. Bd. 50, S. 131. 1922; s. dagegen Popielski: Chem. Zentralbl. 1921, I, S. 337.

<sup>11)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 40, 3, S. 3691. 1907.

<sup>12)</sup> Journ. of the Americ. chem. soc. Bd. 99, S. 668 u. 1386. 1911; ref. Chem. Zentralbl., 1911, II, S. 30.

<sup>13)</sup> Journ. of the Americ. chem. soc. Bd. 40, S. 1716. 1918; ref. Chem. Zentralbl. 1919, I, S. 648.

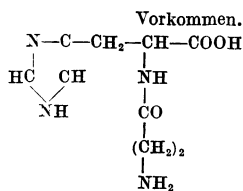
<sup>14)</sup> Mellanby u. Twort: l. c. bei <sup>10)</sup>.

<sup>15)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 65, S. 504. 1910.

<sup>16)</sup> S. auch Patent von Bayer & Co., Chem. Zentralbl. 1912, II, S. 882. — Koessler u. Hanke: Journ. of biol. chem. Bd. 39, S. 521 u. 539. 1919.

<sup>17)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 108, S. 50. 1919.

Über die quantitative colorimetrische Bestimmung und Trennung des Histamins von Histidin und Methylimidazol s. die Arbeiten von Hanke und Koessler<sup>1)</sup>.



Vorkommen.

160. Carnosin.  $\beta$ -Alanylhistidin  $\text{C}_9\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_3$ . Es wurde gefunden in den Muskeln der meisten Wirbeltiere, dagegen nicht im Harn<sup>2)</sup>. Auch im Carcinomgewebe ist es nachgewiesen<sup>3)</sup>. Im Rindfleisch sind etwa 0,26% enthalten, im Schweinefleisch etwa 0,3%, im Froschfleisch etwa 0,1—0,3%<sup>4)</sup>. Bei der Hydrolyse mit Baryt liefert es  $\beta$ -Alanin und Histidin<sup>5)</sup>. Betreffs der Konstitutionsformel s. die Arbeiten von Kossel und Edlbacher<sup>6)</sup>, Baumann und Ingvaldsen<sup>7)</sup> und Barger und Tutin<sup>8)</sup>. — Carnosin ist wohl identisch mit Ignotin<sup>9)</sup> (§ 164). — Es ist pharmakologisch wenig wirksam.

Trennung und Nachweis s. § 161. Isolierung aus Organen § 722 u. 723.

Synthese.

Es wurde künstlich dargestellt aus Histidin und Jodpropionylchlorid<sup>10)</sup>.

Darstellung<sup>11)</sup>.

8 kg zerhackte Kalbsmuskeln werden 3 mal mit Wasser je 1½ Stunde bei 80—90° extrahiert. Die abgepressten Extrakte werden eingengt und mit Bleiessig in geringem Überschuß ausgefällt. Das Filtrat wird mit Soda neutralisiert. Es wird wieder filtriert, dann mit Schwefelsäure das Blei entfernt. Die Schwefelsäure wird mit Baryt genau neutralisiert. Es wird nun auf 1 l eingengt und mit Alkohol bis zur Trübung versetzt (etwa 2 l Alkohol). In der Flüssigkeit wird etwas Äther gelöst, dann eine gesättigte Lösung von Mercurisulfat in 5proz. Schwefelsäure zugegeben. Der entstehende Niederschlag wird mit 5proz. Schwefelsäure gewaschen und mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Der Schwefelwasserstoff wird entfernt. Dann wird Barytwasser im Überschuß zugegeben und filtriert. Das Filtrat wird mit Kohlensäure vom Baryt befreit und eingedampft. Beim Stehen krystallisiert Carnosin aus. Es wird mit 80proz. Alkohol gewaschen. Ausbeute ca. 30 g (Dietrich). Nach neueren Erfahrungen empfiehlt es sich, die Bleifällung fortzulassen und nach § 722 zu verfahren.

Eigenschaften.

Carnosin bildet mikroskopische Nadeln vom Zersp. 241—245°. Es löst sich leicht in Wasser, scheidet sich auf Zusatz von Alkohol wieder ab.  $[\alpha]_D = +25,0^\circ$  (13proz. Lösung<sup>12)</sup>.  $\text{C}_9\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_3 \cdot \text{HNO}_3$ : Sternförmige Drusen vom Fp. 213°, leichtlöslich in Wasser. Carnosin wird durch barytalkalische Silbernitratlösung und auch durch Phosphorwolframsäure ausgefällt, unter Umständen auch durch

<sup>1)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 39, S. 521. 1919; ref. Chem. Zentralbl. 1920, IV, S. 552; Journ. biol. chem. Bd. 43, S. 543. 1920; ref. Chem. Zentralbl. 1921, II, S. 4.

<sup>2)</sup> Gulewitsch u. Admirazibi: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 30, S. 565. 1900; Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 33, 2, S. 1902. 1900. — Krimberg: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 48, S. 415. 1906. — Suzuki u. Yoshimura: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 62, S. 1. 1909. — Skworzow: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 68, S. 26. 1910. — Mauthner: Monatshefte f. Chemie Bd. 34, S. 883. 1913. — Dietrich: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 92, S. 212. 1914. — Smorodinzew: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 92, S. 214 u. 221. 1914; Journ. d. russ. physiol. chem. Ges. Bd. 49, S. 263, 1917; ref. Chem. Zentralbl. 1923, II, S. 946. — v. Fürth u. Hryntschak: Biochem. Zeitschr. Bd. 64, S. 172. 1914. — Engeland: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 54, 2, S. 2208. 1921. — Clifford: Biochem. Journ. Bd. 15, S. 725. 1921. — Literaturzusammenstellung s. Baumann u. Ingvaldsen: Journ. of biol. chem. Bd. 35, S. 263. 1918.

<sup>3)</sup> Drummond: Biochem. Journ. Bd. 11, S. 246. 1917; ref. Chem. Zentralbl. 1918, II, S. 64.

<sup>4)</sup> Hunter, Biochem. Journ. Bd. 16, S. 640, 1922.

<sup>5)</sup> Gulewitsch: l. c. u. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 50, S. 535. 1907; Bd. 73, S. 434. 1911.

<sup>6)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 93, S. 396. 1915. <sup>7)</sup> l. c.

<sup>8)</sup> Biochem. Journ. Bd. 12, S. 402. 1918; ref. Chem. Zentralbl. 1919, I, S. 849.

<sup>9)</sup> Gulewitsch: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 50, S. 204. 1906/07.

<sup>10)</sup> Baumann u. Ingvaldsen: l. c. — Barger u. Tutin: l. c.

<sup>11)</sup> Dietrich: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 92, S. 212. 1914.

<sup>12)</sup> Gulewitsch: l. c.



Tannin<sup>1)</sup>). Das Silbersalz löst sich in überschüssigem Ammoniak. Carnosin-kupfer: Tiefblaue Krystalle, schwerlöslich in Wasser.

Über quantitative Bestimmung auf Grund colorimetrischer Methoden s. die Arbeiten von v. Fürth und Hryntschak<sup>2)</sup>, Bubanović<sup>3)</sup>, Clifford<sup>4)</sup> und Hunter<sup>5)</sup>.

161. Darstellung, Trennung und Nachweis der Imidazolderivate. Nach dem Verfahren von Kossel und Kutscher (§ 165) fallen die Histidinverbindungen mit Phosphorwolframsäure und dann mit barytalkalischer Silbernitratlösung aus, und zwar bei einer geringeren Alkalität, als zur Ausfällung der Arginingruppe notwendig ist<sup>6)</sup>: Die mit Silbernitrat versetzte und filtrierte Lösung der Basen wird mit Baryt neutralisiert, mit Bariumcarbonat im Überschuß versetzt und kurze Zeit aufgeköcht (oder es wird auch so lange Barytwasser zugesetzt, bis eine Probe mit ammoniakalischer Silbernitratlösung versetzt kaum noch eine Trübung gibt<sup>7)</sup>). — Über die Trennung von Histamin und Histidin s. bei Histamin (§ 159).

Qualitativ können die Imidazolverbindungen mit diazotierter Sulfanilsäure (auch neben Tyrosin) nachgewiesen werden, wobei Rotfärbung entsteht<sup>8)</sup>. Die Diazoreaktion ist auch zur quantitativen Bestimmung verwandt worden<sup>9)</sup>.

162.  $\gamma$ -Picolin  $C_6H_7N$ . Wurde von Achelis und Kutscher aus Pferdeharn isoliert<sup>10)</sup>. Es fällt mit Phosphorwolframsäure aus, mit barytalkalischer Silbernitratlösung jedoch nicht. Wahrscheinlich bildet es sich aus Pyridinkernen der Nahrung.

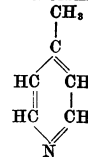
Flüssigkeit vom Kp. 142—144°.  $(C_6H_7N)_2 \cdot H_2PtCl_6$ : Blättchen vom Fp. 221 bis 239°.  $C_6H_7N \cdot HAuCl_4$ : Prismen, schwerlöslich in Wasser, Fp. 205°. Pikrat  $C_6H_7N \cdot C_6H_3O(NO_2)_3$ : Nadeln vom Fp. 167°, schwerlöslich in Wasser.

Methylpyridiniumhydroxyd  $C_6H_9NO$ . Ist gefunden im Harn von Hund, Schwein, Ziege, Huhn und Frosch nach Eingabe von Pyridin<sup>11)</sup>. Im normalen Harn kommt es ebenfalls vor<sup>12)</sup>, ferner im Krabbenextrakt<sup>13)</sup> und in der Miesmuschel<sup>14)</sup>. Aus 100 l Harn wurden ca. 2,6 g des Chloroaurats isoliert. Vermutlich entsteht es beim Menschen aus Nahrungsbestandteilen (Tabak, Kaffee usw.).

Es stellt eine farb- und geruchlose Flüssigkeit von stark alkalischer Reaktion dar.  $C_6H_8N \cdot AuCl_4$ : Nadeln vom Fp. 252°, in heißem Wasser und Alkohol leicht-, in kaltem schwerlöslich.  $(C_6H_8N)_2PtCl_6$ : Tafeln vom Zersp. 205—211°. Pikrat

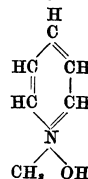
Darstellung, Trennung  
und Nachweis der  
Imidazolderivate.  
Basen.

Vorkommen.



Eigenschaften.

Vorkommen.



Eigenschaften.

<sup>1)</sup> Gulewitsch: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 50, S. 208. 1916.

<sup>2)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 64, S. 172. 1914. <sup>3)</sup> desgl. Bd. 92, S. 125. 1918.

<sup>4)</sup> Biochem. Journ. Bd. 15, S. 400; ref. Chem. Zentralbl. 1921, IV, S. 1257.

<sup>5)</sup> Biochem. Journ. Bd. 15, S. 689. 1921 u. Bd. 16, S. 640, 1922.

<sup>6)</sup> Guggenheim: Die biogenen Amine. S. 207.

<sup>7)</sup> Kossel u. Pringle: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 49, S. 318. 1906. — Weiß: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 52, S. 110. 1907.

<sup>8)</sup> Pauly: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 42, S. 508. 1905; Bd. 94, S. 284. 1915. — Inaue: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 83, S. 79. 1912. — Totani: Biochem. Journ. Bd. 9, S. 385. 1915; ref. Chem. Zentralbl. 1916, II, S. 1014.

<sup>9)</sup> Weiß u. Ssobolew: Biochem. Zeitschr. Bd. 58, S. 119. 1913. — v. Fürth u. Hryntschak: l. c.

<sup>10)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 52, S. 91. 1907.

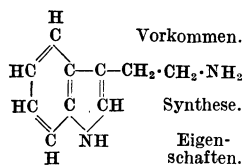
<sup>11)</sup> His: Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 22, S. 253. 1887. — Cohn: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 18, S. 112. 1894. — Hoshiai: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 62, S. 118. 1909. — Totani u. Hoshiai: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 68, S. 85. 1910. — Mayeda u. Ogata: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 89, S. 251. 1914; s. aber auch Abderhalden, Brahm u. Schittenhelm: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 59, S. 32; Bd. 62, S. 133. 1909.

<sup>12)</sup> Kutscher u. Lohmann: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 49, S. 81. 1906; Zeitschr. f. Untersuch. d. Nahrungs- u. Genußmittel Bd. 13, S. 177. 1907.

<sup>13)</sup> Kutscher u. Ackermann: Zeitschr. f. Untersuch. d. Nahrungs- u. Genußmittel Bd. 14, S. 687. 1907.

<sup>14)</sup> Ackermann: Zeitschr. f. Biol. Bd. 74, S. 67. 1921.

$C_6H_5NO \cdot C_6H_2(NO_2)_3$ : Nadeln vom Fp.  $212^\circ$  (unkorr.). Löslichkeit in Wasser ca. 1:100, in Alkohol 0,37:100, in Äther kaum löslich. Isolierung aus Harn § 586.



163. Indoläthylamin  $C_{10}H_{12}N_2$ . Es entsteht aus Tryptophan bei der Einwirkung von gewissen Mikroorganismen<sup>1)</sup>. — Ist nur wenig giftig.

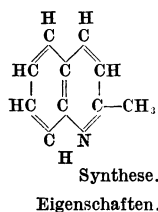
Es wurde von Ewins künstlich dargestellt<sup>2)</sup>.

Weißer Nadeln vom Fp.  $145^\circ$ , leichtlöslich in Alkohol, fast unlöslich in Wasser, Äther und Chloroform. Es gibt mit Glyoxylsäure und Schwefelsäure eine blauviolette Färbung.  $C_{10}H_{12}N_2 \cdot HCl$ : Prismen vom Fp.  $246^\circ$ , mäßig löslich in Wasser. Pikrat  $C_{10}H_{12}N_2 \cdot C_6H_3O_7N_3$ : Krystalle vom Zersp.  $242-243^\circ$ , fast unlöslich in Wasser, wenig löslich in Alkohol, leichtlöslich in Aceton. Pikrolonat: Fp.  $231^\circ$ . Benzoylderivat: Prismen vom Fp.  $137-138^\circ$ .

$\alpha$ -Methylchinolin  $C_{10}H_9N$ . Findet sich in erheblicher Menge in der Analdrüse des Stinktiers (*Mephitis mephitis*)<sup>3)</sup>.

Es wurde künstlich dargestellt aus Paraldehyd und Anilin<sup>4)</sup>.

Die Base bildet ein farbloses Öl, das mit Wasserdämpfen leicht flüchtig ist. Sie löst sich kaum in Wasser, leicht dagegen in Äther, Chloroform und Alkohol.  $C_{10}H_9N \cdot H_2PtCl_6$ : Krystalle, löslich in Wasser und Alkohol, Zsp.  $226-230^\circ$ .  $C_{10}H_9N \cdot HAuCl_4$ : Krystalle vom Zsp.  $153^\circ$ , löslich in Wasser und in Alkohol. Pikrat  $C_{10}H_9N \cdot C_6H_2(NO_2)_3OH$ : Krystalle vom Fp.  $177-194^\circ$ , kaum löslich in kaltem Wasser und in kaltem Alkohol.  $C_{10}H_9N \cdot H_2ZnCl_4$ : Sehr geeignet zur Abscheidung der Base, Krystalle vom Zersp.  $230-240^\circ$ , schwerlöslich in kaltem Wasser und in kaltem Alkohol. Bichromat  $(C_{10}H_9N)_2 \cdot H_2Cr_2O_7$ : Krystalle, schwerlöslich in kaltem Wasser, Zersp.  $130-140^\circ$ .



#### Basen mit unbekannter Konstitution.

164.  $C_2H_5N$  (?). Von Kunz<sup>5)</sup> aus Cholerakulturen gewonnen und nach ihm identisch mit Spermin<sup>6)</sup> (s. dieses S. 213). Die von Kunz isolierte Base war ganz offenbar verunreinigtes Pentamethyldiamin<sup>7)</sup> (§ 153).

$C_2H_8N_2$ . Aus gefaultem Dorsch und faulem Leim isoliert<sup>8)</sup>; destilliert mit Natriumhydroxyd unzersetzt; ist nicht identisch mit Äthylendiamin. Das salzsaure Salz ist leicht löslich, das Chloroplatinat wasserlöslich.

$C_3H_5NO_2$ . Aus Harn dargestellt<sup>9)</sup>.

$C_3H_6N_2$ , Anthracin. In Leichen von Kaninchen gefunden, die mit *Bac. anthracis* infiziert waren<sup>10)</sup>.

$C_3H_6N_2O$ . Aus faulem Pankreas<sup>11)</sup>.

$C_3H_8N_2$ . Aus Cholerakulturen<sup>12)</sup>.

$C_3H_8N_2O$ . Gelegentlich im Hunde- und Menschenharn gefunden<sup>13)</sup>. Schwerlöslich in kaltem Wasser und Alkohol, unlöslich in Äther. Krystalle vom Fp.  $250^\circ$ . Gibt mit Salpetersäure eine

<sup>1)</sup> Ewins u. Laidlaw: Proc. of the chem. soc. Bd. 26, S. 343. 1910.

<sup>2)</sup> Journ. of the Americ. chem. soc. Bd. 99, S. 270. 1911; ref. Chem. Zentralbl. 1911, I, S. 1061.

<sup>3)</sup> Aldrich: Journ. of exp. med. Bd. I, S. 323. 1896. — Aldrich u. Jones: desgl. Bd. 2, S. 439. 1897.

<sup>4)</sup> Döbner u. v. Miller: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 15, S. 3075. 1882; Bd. 16, S. 2465. 1883; s. a. Fischer u. Kuzel: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 16, S. 165. 1883.

<sup>5)</sup> Monatshefte f. Chemie Bd. 9, S. 372. 1888; Sitzungsber. d. Akad. d. Wiss. Wien Bd. 97, S. 358. 1888.

<sup>6)</sup> Schreiner: Liebigs Ann. d. Chemie Bd. 194, S. 68. 1878.

<sup>7)</sup> Wrede u. Banik: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 131, S. 38. 1923.

<sup>8)</sup> Brieger: Ptomaine I, S. 44; II, S. 2.

<sup>9)</sup> Pouchet: Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 97, S. 1560. 1883.

<sup>10)</sup> Hoffa: Sitzungsber. d. physiol.-med. Ges. Würzburg 1889, S. 96.

<sup>11)</sup> Ackermann: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 54, S. 1. 1907/08. — Ackermann u. Mey: Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh. Bd. 42, S. 629. 1906.

<sup>12)</sup> Brieger: Berl. klin. Wochenschr. 1887, Nr. 44.

<sup>13)</sup> Baumstark: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 6, S. 883. 1873. Liebigs Ann. d. Chemie Bd. 173, S. 342. 1874.

Milchsäure. Mit Barytwasser gekocht geht die Hälfte des Stickstoffs als Ammoniak, die andere Hälfte als Äthylamin fort<sup>1)</sup>.

$C_3H_{10}N_2$  ist wohl gleich  $C_3H_8N_2$  (s. o).

$C_5H_7NO_6$ . Aus Harn gewonnen<sup>2)</sup>.

$C_5H_{11}N$ , Tetanotoxin. Aus einer Tetanuskultur dargestellt<sup>3)</sup>. Kp. ca. 100°. Gibt Isonitril- und Senfölsäure. Salzsaures Salz: Fp. 205°. Chloroplatinat: Zersp. 240°, schwerlöslich.

$C_5H_{11}N_3O_2$ . Aus Histidin durch Einwirkung gewisser Arten von *Bact. coli*<sup>4)</sup>.

$C_5H_{12}N_2O_4$ . Aus faulen Massen dargestellt<sup>5)</sup>. Chloroplatinat in Alkohol ziemlich löslich.

$C_5H_{12}N_2SO_3$ , Melolonthin. Aus Maikäfern gewonnen<sup>6)</sup>. Farblose, seidenglanzende Krystalle, schwerlöslich in kaltem Wasser und Alkohol. Die Lösung reagiert neutral. Beim Kochen mit alkalischer Bleilösung entsteht Schwefelblei. Wird durch Bleiessig gefällt.

$C_5H_{14}N_2$ , Spermin. Soll nach Schreiner<sup>7)</sup> als schwerlösliches Phosphat aus menschlichem Sperma, aber auch aus menschlichen und tierischen Organen und Exkreten zu gewinnen sein. Nach Schreiner kommt ihm die Formel  $C_2H_5N$  oder  $C_4H_{10}N_2$  zu. Wrede und Banik<sup>8)</sup> konnten nach der Vorschrift von Schreiner das für Spermin typische Phosphat nicht wieder gewinnen. Bei sorgfältiger Aufarbeitung von frischem menschlichen Sperma wurde von ihnen eine Base erhalten, die ein in Wasser schwerlösliches, in Alkohol leichtlösliches Chloraurat vom Zersp. 216—218° gibt, dessen Analyse für die Formel  $C_5H_{14}N_2 \cdot 2HAuCl_4 + 2H_2O$  passen würde. Aus dem Chloraurat wurde ein gut krystallisierendes Chloroplatinat  $C_5H_{14}N_2 \cdot H_2PtCl_6 + 2H_2O_2$  vom Zersp. 242° gewonnen, das schwerlöslich in Wasser, unlöslich in Alkohol ist. Die Base gibt krystallisierte Verbindungen mit Phosphorwolframsäure, Pikrinsäure und Pikrolonsäure. Mit *m*-Nitrobenzoylchlorid in alkalischer Lösung entsteht eine in Alkohol schwerlösliche Verbindung  $C_{19}H_{20}N_4O_6$  vom Fp. 171°, deren Molekulargewicht zu etwa 800 gefunden wurde. Danach dürfte die zugrunde liegende Base die Formel  $C_{10}H_{28}N_4$  haben.

$C_5H_{14}N_2O_2$ , Sepsin. Aus fauler Hefe und aus Kulturen von *Bact. sepsinogenes* dargestellt<sup>9)</sup>. Zersetzliche Base, die unter Umständen in Cadaverin sich verwandelt.

$C_5H_{14}N_2$ , Neuridin. Ist wohl mit Cadaverin (§ 153) identisch<sup>10)</sup>. Aus frischem Gehirn und Eiern, auch aus faulem Fleisch, Käse und Leim, sowie aus einer Typhuskultur gewonnen<sup>11)</sup>. Die Base ist leichtlöslich in Wasser, unlöslich in Alkohol und Äther. Salzsaures Salz: Nadeln, unlöslich in Alkohol. Gibt keine Isonitrilreaktion. Beim Kochen mit Natronlauge bilden sich Di- und Trimethylamin.

$C_5H_{14}N_2$ , Gerontin. Vielleicht identisch mit Cadaverin<sup>12)</sup> (§ 153). Aus der Leber alter Hunde isoliert<sup>13)</sup>.

$C_5H_{14}N_2$ , Saprin. Ist wohl nicht ganz reines Cadaverin<sup>14)</sup> (§ 153). Wurde aus faulen Leichenteilen gewonnen<sup>15)</sup>. Chloroplatinat ist wasserlöslich.

$C_5H_{14}N_4$  = Guanidinbutylamin s. S. 205.

$C_6H_{13}NO_2$ , Mydatoxin. Wurde aus gefaulten Leichenteilen isoliert<sup>16)</sup>. Krystalle, in Alkohol und Äther unlöslich. Chloroplatinat in Wasser löslich, Fp. 193°. Ist vielleicht  $\epsilon$ -Aminocapronsäure  $C_6H_{13}NO_2$ <sup>17)</sup>.

$C_6H_{14}N_2O_2$ . Aus Fleischextrakt<sup>18)</sup>.  $C_6H_{14}N_2O_2 \cdot HAuCl_4$ : Fp. 126—128°.

1) Neubauer-Huppert: Analyse des Harns, 11. Aufl., S. 707. 1910.

2) Ewald u. Jacobson: Berl. klin. Wochenschr. Bd. 31, S. 25. 1894.

3) Brieger: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 19, 2, S. 3119. 1886; Dtsch. med. Wochenschr. 1887, S. 304.

4) Hanke u. Koessler: Journ. of biol. chem. Bd. 50, S. 131. 1922.

5) Pouchet: Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. de sciences Bd. 97, S. 1560. 1883.

6) Schreiner: Liebigs Ann. d. Chemie Bd. 161, S. 252. 1872; s. auch Ackermann: Zeitschr. f. Biol. Bd. 71, S. 194. 1920.

7) Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 194, S. 68. 1878; s. a. die Zusammenfassung bei A. Pöhl: Die physiologisch-chemischen Grundlagen der Spermintheorie usw. St. Petersburg 1898. — M. Chr. Rosenheim: Journ. of Physiol. Bd. 51, Proc. S. 6. 1917.

8) Wrede u. Banik: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 131, S. 38. 1923; z. T. noch unveröffentlichte Untersuchungen.

9) Faust: Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 51, S. 248. 1904. — Fernet u. Heubner: obd. 1908, Suppl.-Bd. S. 176.

10) Ackermann: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. biol. Chem. Bd. 54, S. 1. 1907.

11) Brieger: Ptomaine I, S. 20; s. auch Gulewitsch: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 27, S. 50, 1890.

12) Guggenheim: Die biogenen Amine.

13) Grandis: Rendiconti atti d. Reale accad. dei Lincei Bd. 6, S. 230. 1890.

14) Guggenheim: Die biogenen Amine.

15) Brieger: Ptomaine II, S. 46.

16) Brieger: Ptomaine III, S. 32.

17) Ackermann: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 69, S. 273. 1910.

18) Krimberg: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 55, S. 476. 1908.

$C_6H_{14}N_2O_2$ , Kanirin. Aus Krabben- und Taiffleisch gewonnen<sup>1)</sup>. Nicht identisch mit Lysin<sup>2)</sup>. Pikrat  $C_6H_{14}N_2O_2 \cdot 2 C_6H_3O_7N_3$ : Prismen vom Fp. 188°, wenig löslich in Wasser. Salzsaurer Salz: Prismen vom Fp. 204—207°.  $C_6H_{14}N_2O_2 \cdot H_2PtCl_6$ : Prismen vom Zersp. 227—229°, löslich in Wasser, unlöslich in Alkohol.

$C_6H_{15}NO_2$ , Mytilotoxin. Aus giftigen Miesmuscheln erhalten<sup>3)</sup>. Chloraurat: Fp. 182°. Mit Kalihydrat erhitzt bildet sich Trimethylamin.

$C_6H_{17}NO_2$ , Neosin. Wurde aus Fleischextrakt, aus Krabbenfleisch und aus menschlichen Muskeln gewonnen<sup>4)</sup> (§ 723).  $C_6H_{16}NOCl \cdot AuCl_3$ : Blättchen, schwerlöslich in kaltem Wasser, löslich in Alkohol. Sintert bei 205°, schmilzt bei 244—245° (Engel and und Biehler). Beim Erhitzen mit Baryt entsteht Trimethylamin.

$C_7H_5NO$ . Aus fauler Fischleber<sup>5)</sup>. Ist isomer mit Tyramin (§ 157).

$C_7H_{11}N$ . Im Lebertran gefunden<sup>6)</sup>. Flüssigkeit, wenig löslich in Wasser; Kp. 199°. Ist vielleicht Dihydrodimethylpyridin.

$C_7H_{12}N_4O_2$  ( $C_7H_{14}N_4O_2$ ?). Aus normalem Harn<sup>7)</sup>. Krystalle.

$C_7H_{15}NO_2$  ( $\gamma$ -Butyrobetain?). Aus faulem Fibrin<sup>8)</sup>.

$C_7H_{15}NO_2$ . Von Dombrowski aus Harn isoliert. Ist wohl identisch mit Carnitin (§ 152).

$C_7H_{17}NO_2$ , Gadenin. Aus gefaultem Dorsch und Leim<sup>9)</sup>. Chloroplatinat ist schwerlöslich. Ist vielleicht  $\gamma$ -Butyrobetain.

$C_7H_{17}NO_2$ , Typhotoxin. Aus Typhuskulturen<sup>10)</sup>. Chloroplatinat ist leichtlöslich. Chloraurat: schwerlöslich, Fp. 176°. Ist vielleicht  $\gamma$ -Butyrobetain (§ 152).

$C_7H_{17}NO_2$ , Reductonovain. Wurde aus normalem Frauenharn isoliert<sup>11)</sup> (§ 586).  $C_7H_{16}NOCl \cdot AuCl_3$ : Fp. unscharf 155—180°. Gibt mit Baryt destilliert Trimethylamin. Vielleicht identisch mit  $\gamma$ -Butyrobetain (§ 152). Soll eine Doppelbindung enthalten.

$C_7H_{18}N_2O_6$ . Aus faulen Massen<sup>12)</sup>. Chloroplatinat ist in Alkohol unlöslich.

$C_7H_{19}NO_3$ , Novain. Ist wohl identisch mit Carnitin<sup>13)</sup> (§ 152). Es wurde gewonnen aus Harn, aus Fleischextrakt und aus den bakteriellen Zersetzungsprodukten des Oblitins<sup>14)</sup>. Kutscher gibt ihm die Formel:  $(CH_3)_3N(OH) \cdot (CH_2)_2 \cdot CH(OH)_2$ <sup>15)</sup>.

$C_8H_{11}N$  (vielleicht Kollidin). Aus faulem Octopusfleisch<sup>16)</sup>, aus faulem Leim<sup>17)</sup>, aus Streptokokkukulturen auf Fibrin<sup>18)</sup>.

<sup>1)</sup> Suzuki: Journ. op. the cou. agric. Tokio Bd. 5, S. 1. 1912; ref. Chem. Zentralbl. 1913, I, S. 1042.

<sup>2)</sup> S. auch Thomas, Kapfhammer u. Flaschenträger: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 124, S. 75. 1922.

<sup>3)</sup> Brieger: Ptomaine III, S. 76; Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. Bd. 115, S. 483. 1889; s. dagegen Ackermann: Zeitschr. f. Biol. Bd. 74, S. 67. 1921.

<sup>4)</sup> Kutscher: Zeitschr. f. Untersuch. d. Nahrungs- u. Genußmittel Bd. 10, S. 528. 1905; Zentralbl. f. Physiol. Bd. 19, S. 504. 1905; Zeitschr. f. Biol. Bd. 64, S. 240. 1914; Kutscher u. Ackermann: Zeitschr. f. Untersuch. d. Nahrungs- u. Genußmittel Bd. 14, S. 687. 1907; Berlin: Zeitschr. f. Biol. Bd. 57, S. 47, 1911. — Engel and: Zeitschr. f. Untersuch. d. Nahrungs- u. Genußmittel Bd. 16, S. 658. 1908; Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 54, 2, S. 2208. 1921. — Engel and u. Biehler: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 123, S. 290, 1922.

<sup>5)</sup> Gautier: Bull. de la soc. chim. de Paris [3], Bd. 35, S. 1195. 1906.

<sup>6)</sup> Gautier u. Mourgues Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 107, S. 110 u. 254. 1888.

<sup>7)</sup> Pouchet: Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 97, S. 1560. 1883.

<sup>8)</sup> E. u. H. Salkowski: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 16, 1, S. 1191. 1883.

<sup>9)</sup> Brieger: Ptomaine I, S. 49. Dtsch. med. Wochenschr. 1889, S. 469.

<sup>10)</sup> Brieger: Ptomaine III, S. 86.

<sup>11)</sup> Kutscher: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 51, S. 457. 1907.

<sup>12)</sup> Pouchet: Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 97, S. 1560. 1883.

<sup>13)</sup> Jona: Chem. Zentralbl. 1912, I, S. 1134. — Kutscher: Zeitschr. f. Untersuch. d. Nahrungs- u. Genußmittel Bd. 10, S. 528. 1905; Bd. 11, S. 582. 1906. — Kutscher u. Lohmann: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 48, S. 1. 1906. — Kutscher: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 48, S. 331. 1906.

<sup>14)</sup> Kutscher: Zeitschr. f. Untersuch. d. Nahrungs- u. Genußmittel Bd. 10, S. 528. 1905; Bd. 11 S. 582. 1906. — Kutscher u. Lohmann: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 48, S. 331. 1906.

<sup>15)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 49, S. 47. 1906; Bd. 49, S. 484. 1906; Bd. 50, S. 250. 1906/07.

<sup>16)</sup> Oechsner de Coninck: Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 106, S. 160 u. 858. 1888; Bd. 108, S. 58 u. 809. 1889; Bd. 126, S. 651. 1898.

<sup>17)</sup> Nencki: Journ. f. prakt. Chemie, N. F., Bd. 26, S. 49. 1882.

<sup>18)</sup> Emmerling: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 30, 2, S. 1863. 1897.

$C_8H_{13}N$ . Aus faulem Fleisch und faulen Makrelen isoliert<sup>1)</sup>. Soll identisch sein mit Hydrokollidin. Vielleicht ist es aber auch Phenyläthylamin. — Flüssigkeit vom Kp. 210°. Chloroplatinat ist wenig löslich, Chloraurat ziemlich löslich.

$C_8H_{11}NO$ , Mydin. Wurde gewonnen aus faulem Fleisch und aus Typhuskulturen<sup>2)</sup>. Zersetzt sich beim Destillieren. Chloroplatinat ist sehr löslich. Pikrat: Fp. 195°. Ist vielleicht identisch mit Tyramin.

$C_8H_{12}N_2O_3$ , Viridinin. Aus gefaultem Pankreas<sup>3)</sup>.

$C_8H_{14}N_4O_8$  (?). Aus Schweinecholerakulturen<sup>4)</sup>.

$C_8H_{19}N_3$ , Marcitin. Aus faulem Pankreas<sup>5)</sup>.  $C_8H_{19}N_3 \cdot 2 H Au Cl_4$ : Fp. 175—178°.

$C_9H_{13}N$ . Aus faulem Fleisch und Makrelen<sup>6)</sup>. Flüssigkeit vom Kp. ca. 200°, löslich in Wasser, Alkohol und Äther. Chloroplatinat wenig löslich, Chloraurat löslich. Ist vielleicht identisch mit Parvolin.

$C_9H_{13}NO$ . Aus fauler Fischleber erhalten<sup>7)</sup>.

$C_9H_{14}N_4O_3$ , Ignotin. Ist wohl identisch mit Carnosin<sup>8)</sup> (§ 160). Wurde aus Fleischextrakt isoliert<sup>9)</sup>. Nadeln vom Zersp. 248°.

$C_{10}H_{13}N$ , Coridin. Aus faulem Fibrin erhalten<sup>10)</sup>. Öl, wenig löslich in Wasser, von leichtem Pyridingeruch. Kp. ca. 200°. Chloroplatinat fast unlöslich in Wasser und Alkohol. Ist vielleicht ein Homologes des Phenyläthylamins.

$C_{10}H_{15}N$ . Aus faulem Octopusfleisch<sup>11)</sup>. Gelbliche Flüssigkeit vom Kp. 230° (unter Zersetzung), bräunt sich an der Luft. Löslich in Alkohol und Äther, wenig löslich in Wasser. Chloroplatinat ist in Wasser fast unlöslich. Mit Kaliumpermanganat bildet sich Nicotinsäure.

$C_{10}H_{16}N_2O_2$ , Skatosin. Aus Pankreasautolysat<sup>12)</sup>. Salzsäures Salz: Blättchen vom Fp. 345—355°. Tetrabenzoylverbindung  $C_{10}H_{12}N_2O_2(C_6H_5CO)_4$ : Fp. 169°.

$C_{10}H_{17}N$ . Aus Kulturen vom Bact. alii<sup>13)</sup>. Nadeln, löslich in Wasser, Chloroform, Alkohol und Äther. Chloroplatinat ist wenig löslich in kaltem Wasser. Ist vielleicht Hydrocorindin.

$C_{10}H_{26}N_4$  s. bei  $C_5H_{14}N_2$  (S. 213).

$C_{11}H_{22}N_2O_3$ , Mirgelin<sup>14)</sup>. Wurde aus menschlichem Muskel isoliert (§ 723). Gibt ein kristallisiertes Chloraurat  $C_{11}H_{22}N_2O_3 \cdot H Au Cl_4$ .

$C_{11}H_{26}N_2O_3$ , Putrin. Aus faulem Pankreas<sup>15)</sup>. Entsteht vielleicht durch Kohlensäureabspaltung aus Diaminotrioxydodekansäure<sup>16)</sup>.

$C_{11}H_{26}N_3O_4$ , Kreatosin. Aus Liebig's Fleischextrakt isoliert<sup>17)</sup>. Chloraurat  $C_{11}H_{26}N_3O_4 Au_2 Cl_8$ : Krystalle vom unscharfen Fp. 129°.

$C_{12}H_9N_4O_4$ . Findet sich im Harn des Coyoten (Canis ochropus Esch.<sup>18)</sup>.

$C_{13}H_{18}N_2O_2$ , Mingin. Aus normalem Harn<sup>19)</sup>.  $C_{13}H_{18}N_2O_2 \cdot 2 H Au Cl_4$ : Krystalle vom Fp. 194°. Isolierung aus Harn s. § 586.

<sup>1)</sup> Gautier u. Etard: Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 94, S. 1600. 1882; Bd. 97, S. 264. 1883; Bull. de l'acad. de méd. [2], Bd. 15, S. 18. 1886.

<sup>2)</sup> Brieger: Ptomaine III, S. 26.

<sup>3)</sup> Ackermann: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 57, S. 28. 1908.

<sup>4)</sup> Novy: Med. News, Sept. 1890, S. 23.

<sup>5)</sup> Ackermann: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 54, S. 20. 1907/08.

<sup>6)</sup> Gautier u. Etard: Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 94, S. 1600. 1882; Bd. 97, S. 264. 1883; Bull. de l'acad. de méd. [2], Bd. 15, S. 80. 1886.

<sup>7)</sup> Gautier: Bull. de la soc. chim. de Paris [3], Bd. 35, S. 1195. 1906.

<sup>8)</sup> Jona: Chem. Zentralbl. 1912, I, S. 1134. — Polemik zwischen Gulewitsch u. Kutscher: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 50, S. 204 u. 445. 1906/07; Bd. 51, S. 258 u. 545. 1907; Bd. 52, S. 527. 1907; Bd. 53, S. 427. 1907.

<sup>9)</sup> Kutscher: Zeitschr. f. Untersuch. d. Nahrungs- u. Genußmittel Bd. 10, S. 528. 1905; Bd. 11, S. 582. 1906; Zentralbl. f. Physiol. Bd. 19, S. 504. 1905.

<sup>10)</sup> Guareschi u. Mosso: Journ. f. prakt. Chemie, N. F., Bd. 27, S. 425. 1883; Ann. di chim. e di farmacol. [4], Bd. 6, S. 267. 1887.

<sup>11)</sup> Oechsner de Coninck: Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 106, S. 858. 1888; Bd. 110, S. 1339. 1890; Bd. 112, S. 534. 1891; Bd. 117, S. 1097. 1893.

<sup>12)</sup> Baum: Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 3, S. 439. 1903. — Swain: ebd. Bd. 3, S. 442. 1903.

<sup>13)</sup> Griffiths: Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 110, S. 416. 1890.

<sup>14)</sup> Engeland u. Biehler: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 123, S. 290. 1922.

<sup>15)</sup> Ackermann: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 54, S. 20. 1907/08.

<sup>16)</sup> Barger: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 61, S. 188. 1909.

<sup>17)</sup> Krimberg u. Israillsky: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 88, S. 324. 1913.

<sup>18)</sup> Swain: Americ. Journ. of physiol. Bd. 13, S. 30. 1905; s. dagegen Hunter u. Givens: Journ. of biol. chem. Bd. 8, S. 449. 1910.

<sup>19)</sup> Kutscher: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 51, S. 457. 1907.

$C_{13}H_{20}N_2O_4$ , Crangitin. Aus Krabbenextrakt isoliert<sup>1)</sup> (§ 723).  $C_{13}H_{20}N_2O_4 \cdot 2HAuCl_4$ : Säulen, schwerlöslich in Wasser. Die Base fällt aus alkoholischer Lösung mit Sublimat aus. Ist vielleicht identisch mit einer Base, die aus dem Harn von Hunden, die mit Phosphor vergiftet waren, gewonnen wurde<sup>2)</sup>.

$C_{13}H_{26}N_2O_3$ , Crangonin. Aus Krabbenextrakt<sup>3)</sup> (§ 723). Chloraurat: Krystalle vom Fp. 130°.

$C_{13}H_{26}N_2O_3$  und  $C_{13}H_{26}N_2O_5$ . Aus dem Harn von Hunden, die mit Phosphor vergiftet waren<sup>4)</sup>.

$C_{13}H_{26}N_4O_4$ , Kynosin. Aus normalem Hundeharn<sup>5)</sup>.

$C_{13}H_{30}N_2O_4$ , Tetanin. Stoffwechselprodukt von Tetanusbacillen. Auch aus faulen Leichenteilen gewonnen<sup>6)</sup>. Chloroplatinat ist in Wasser ziemlich schwer löslich.

$C_{14}H_{12}N_2O_2$ . Aus faulem Fibrin<sup>7)</sup>. Tafeln, löslich in Wasser und Alkohol, Fp. 248—250°.

$C_{14}H_{14}N_2O_2$ , Pyocyanin s. § 322.

$C_{15}H_{36}N_8O_{13}$ . Aus Harn<sup>8)</sup>. Gibt die Diazoreaktion, beim Erwärmen auch die Biuretreaktion, aber keine Millonreaktion.

$C_{16}H_{24}N_2O_4$ . Aus Schafkäse dargestellt<sup>9)</sup>. Wenig löslich in Wasser, löslich in Alkohol. Das salzsaure Salz bildet große Nadeln, die leichtlöslich in Wasser sind.

$C_{17}H_{20}N_2O_7$ , „Vitamin“. Wurde aus Reisschalen und Hefe, aber auch aus Milch, Hirn und Leim gewonnen<sup>10)</sup>. Es soll ein Pyrimidinderivat sein. Das Nitrat krystallisiert, Fp. 223°.

$C_{17}H_{38}N_4$ . Aus faulen Makrelen<sup>11)</sup>. Chloroplatinat ist löslich in Wasser, Zersp. ca. 100°.

$C_{18}H_{38}N_2O_5$ , Oblitin = Carnitinäthylester s. § 152.

$C_{19}H_{23}N_3O_8$ , Gynesin. Wurde aus menschlichem Harn isoliert<sup>12)</sup> (§ 586).  $C_{19}H_{23}N_3O_8 \cdot 2HAuCl_4$ : Nadelchen, die zwischen 180—210° schmelzen.

$C_{19}H_{27}N_3$ , Morrhuin. Aus Lebertran erhalten<sup>13)</sup>. Öl, wenig löslich in Wasser, löslich in Alkohol und Äther. Gibt ein lösliches Chloroplatinat.

$C_{20}H_{31}NO$ , Samandaridin. Wurde aus dem Hautsekret von *Salamandra maculosa* isoliert<sup>14)</sup>.  $(C_{20}H_{31}NO)_2 \cdot H_2SO_4$ : rhombische Blättchen oder Tafelchen, schwerlöslich in Wasser oder Alkohol. Ist optisch inaktiv. Ist nicht fällbar durch basisches Bleiacetat, aber fällbar durch Phosphorwolframsäure. Bei der trockenen Destillation mit Zinkstaub entsteht Isochinolin, beim einfachen Erhitzen Pyrrol. Das Chloraurat krystallisiert. — Es ist giftig.

$C_{21}H_{37}N_2O_3$  (?), Samandatin. Wurde aus *Salamandra atra* isoliert<sup>15)</sup>. Ist löslich in Äther, schwerlöslich in Wasser und Alkohol.  $(C_{21}H_{37}N_2O_3)_2 \cdot H_2SO_4$ : Lange Nadeln, in Wasser schwerlöslich. Gibt beim Erhitzen die Fichtenspanreaktion.

$C_{25}H_{32}N_4$ , Asellin. Ist aus Lebertran dargestellt<sup>16)</sup>. Amorphe Masse, unlöslich in Wasser, löslich in Alkohol und Äther. Chloroplatinat ist unlöslich in kaltem Wasser.

$C_{26}H_{40}N_2O$ , Samandarin. Wurde aus *Salamandra maculosa* neben Samandaridin gewonnen<sup>17)</sup>. Gelbliches Öl, das in Wasser löslich ist.  $(C_{26}H_{40}N_2O)_2 \cdot H_2SO_4$ : Nadeln, löslich in Alkohol, schwerlöslich in Wasser.  $[\alpha]_D = -53,7^\circ$  (ca. 5proz. Lösung). — Ist giftig.

<sup>1)</sup> Kutscher u. Ackermann: Zeitschr. f. Untersuch. d. Nahrungs- u. Genußmittel Bd. 14, S. 687. 1907. Ackermann: Zeitschr. f. Biol. Bd. 74, S. 73. 1921.

<sup>2)</sup> Takeda: Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 133, S. 365. 1910.

<sup>3)</sup> Kutscher u. Ackermann: Zeitschr. f. Untersuch. d. Nahrungs- u. Genußmittel Bd. 14, S. 687. 1907; Ackermann: Zeitschr. f. Biol. Bd. 74, S. 73. 1921.

<sup>4)</sup> Takeda: Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 133, S. 373 u. 380. 1910; Chem. Zentralbl. 1910, II, S. 674.

<sup>5)</sup> Kutscher u. Lohmann: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 48, S. 4. 1906; Bd. 49, S. 88. 1906.

<sup>6)</sup> Brieger: Ptomaine III, S. 95. Berl. klin. Wochenschr. 1888, S. 329; Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 19, S. 3191. 1886; Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. Bd. 112, S. 549. 1888.

<sup>7)</sup> Guareschi: Ann. di farmacol. e chim. [4], Bd. 6, S. 237. 1887; Gazz. chim. ital. Bd. 17, S. 503. 1887.

<sup>8)</sup> Engeland: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 57, S. 49. 1908.

<sup>9)</sup> Lepierre: Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 118, S. 476. 1894.

<sup>10)</sup> Funk: Journ. of physiol. Bd. 43, S. 395; Bd. 45, S. 75. 1912; ref. Chem. Zentralbl. 1912, I, S. 1239, II, S. 1669.

<sup>11)</sup> Gautier: Bull. de l'acad. de méd. [2], Bd. 15, S. 82. 1886.

<sup>12)</sup> Kutscher u. Lohmann: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 49, S. 81. 1906.

<sup>13)</sup> Gautier u. Mourgues: Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 107, S. 110 u. 626. 1888.

<sup>14)</sup> Zalesky: Medizinisch-chemische Untersuchungen. Herausgeg. v. Hoppe-Seyler. Heft 1, S. 85. 1866. — Faust: Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 41, S. 229. 1898; B. 43, S. 84. 1900.

<sup>15)</sup> Netolitzky: Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 51, S. 118. 1904.

<sup>16)</sup> Gautier u. Mourgues: Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 107, S. 110 u. 626. 1888.

<sup>17)</sup> Zalesky, Faust s. bei Samandaridin.

Außerdem sind noch eine Anzahl Basen beschrieben<sup>1)</sup>, deren Existenz durch weitere Untersuchung noch genauer festzustellen ist.

*Allgemeine Methodik zur Isolierung von Basen.*

165. I<sup>2)</sup>. Die Flüssigkeit (filtrierte Fäulnisprodukte usw.) wird bei schwach salzsaurer Reaktion zum Sirup eingedampft. Dieser wird mit absolutem Alkohol ausgezogen. Das Extrakt wird eingedampft und wieder mit absolutem Alkohol aufgenommen. Evtl. bleiben jetzt (oder bei weiterem Eindampfen und Wiederaufnehmen in Alkohol, wobei die alkoholische Lösung ja immer wasserärmer wird) schwerlösliche Basenchloride, z. B. Neuridinchlorid, zurück. Der Rückstand, der durch Abdampfen des Alkohols erhalten ist, kann nun in Wasser gelöst und mit Pikrinsäure versetzt werden: Neuridin- und Cholinpikrat fallen aus. Oder die alkoholische Basenchloridlösung kann mit alkoholischer Quecksilberchloridlösung versetzt werden: Nach 24 Stunden wird abgesaugt, der Rückstand wird mit Wasser ausgekocht. Beim Erkalten des filtrierten Extraktes scheidet sich evtl. das Quecksilberdoppelsalz des Cholins aus, in der Extraktlösung bleiben Diamine, Saprin und Mydalein. — Im Filtrat von der Quecksilberchloridfällung finden sich Alkylamine, auch Methylguanidin. — Über die Trennung der einzelnen Basen voneinander s. bei diesen.

II<sup>3)</sup>. Die gefaulte Flüssigkeit wird mit Oxalsäure angesäuert, filtriert und destilliert, bis das Destillat klar abläuft (Phenole, Indolderivate, Fettsäuren und ein Teil des Ammoniaks destillieren so ab), dann wird mit Kalkmilch alkalisch gemacht, filtriert und im Vakuum zur Trockne destilliert. Das in verdünnter Schwefelsäure aufgefangene Destillat wird mit Lauge neutralisiert und eingedampft. Der Rückstand wird nach Entfernen von evtl. Ammoniumsulfatkrystallen mit absolutem Alkohol aufgenommen. Die Lösung wird eingedampft, der Rückstand wird mit Natronlauge versetzt. Die Basen werden dann nacheinander mit Äther, Petroläther und Chloroform extrahiert.

III<sup>4)</sup>. Die weitgehend gefaulte Masse<sup>5)</sup> wird durch ein grobmaschiges Sieb gegeben. Die Flüssigkeit wird auf etwa die Hälfte eingedampft. (Dabei können bei basischer Reaktion flüchtige Basen und Ammoniak mit dem Destillat aufgefangen werden.) Evtl. wird auch im Vakuum destilliert. Nun wird mit Phosphorsäure angesäuert und mit gesättigter Tanninlösung ausgefällt. (Siehe dazu § 723.) Die abfiltrierte Flüssigkeit wird mit heiß-, zuletzt mit kaltgesättigter Barytlösung versetzt, bis der beim Umrühren sich bildende Schaum einen roten Farbenton annimmt. Dann wird abgesaugt (Nutsche nach Kossel). Das Filtrat wird mit Schwefelsäure deutlich sauer gemacht, mit einem Überschuß von Bleioxyd versetzt und filtriert. Es wird nun auf etwa  $\frac{1}{50}$  des Volumens eingedampft. Dann wird, nach Zusatz von etwa 5 Vol.-% Schwefelsäure, mit Phosphorwolframsäure gefällt. Der Niederschlag wird abgesaugt, mit 5 proz. Schwefelsäure nachgewaschen und mit festem Baryt oder Barytwasser zerlegt. Das Filtrat wird mit Kohlensäure vom Barium befreit. Die filtrierte Flüssigkeit wird mit Salpetersäure angesäuert, durch Zusatz von Silbernitrat von den Chloriden (und evtl. Purinbasen) befreit und dann mit so viel Silbernitrat versetzt, bis eine Probe mit Barytwasser einen braunen Niederschlag ( $\text{Ag}_2\text{O}$ ) gibt.

<sup>1)</sup> Beschrieben von Griffiths: Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 113 bis 118, 120; Chem. news Bd. 70.

<sup>2)</sup> Brieger: Ptomaine II, S. 53 u. 122. 1886.

<sup>3)</sup> Gautier: Bull. de l'acad. de méd. [2], Bd. 15, S. 75. 1886.

<sup>4)</sup> S. dazu Kutscher: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 39, S. 159. 1903; Zeitschr. f. Untersuch. d. Nahrungs- u. Genußmittel Bd. 10, S. 528. 1905; Bd. 11, S. 582. 1906. — Ackermann: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 54, S. 1. 1907/08.

<sup>5)</sup> Ackermann (l. c.) ließ 22 kg Pankreas mit 44 l Wasser 2 Sommermonate hindurch faulen. Zur Fällung brauchte er 4 kg Phosphorwolframsäure.

a) Bei Abwesenheit von Ammoniak kann evtl. nun das Basengemisch in 3 Fraktionen zerlegt werden<sup>1)</sup>:

Fraktion 1: Fällt bei ganz schwach alkalischer Reaktion aus. Näheres s. bei Imidazolderivaten, § 161.

Fraktion 2: Fällt bei stark barytalkalischer Reaktion aus (s. bei Arginin-derivaten, § 155).

Fraktion 3: In der Mutterlauge sind die Diamine (die als Pikrate abgeschieden werden können, s. § 153) Cholin, Betaine (die in alkoholischer Lösung mit Sublimat fällbar sind), evtl. auch die aromatischen Basen (die mit Sublimat nicht fällbar sind, s. § 158) enthalten.

b) Es kann nach Zusatz des Silbernitrats auch so weiterverfahren werden, daß mit Barytwasser sofort stark alkalisch gemacht wird. Der braune Niederschlag wird abfiltriert, das Filtrat wird mit Schwefelsäure und Salzsäure stark angesäuert, wieder filtriert und aufs neue mit Phosphorwolframsäure ausgefällt. Der mit 5proz. Schwefelsäure ausgewaschene Niederschlag wird mit Baryt zerlegt. Die Basenlösung wird zum Sirup eingedampft, in Alkohol aufgenommen und mit Pikrinsäure gefällt. Nach einigen Stunden wird filtriert. Die Diamine sind zum größten Teil als Pikrate ausgefallen (Trennung s. § 153). Der Rückstand des Filtrats wird nach Ausäthern der Pikrinsäure in absolut-alkoholische Lösung gebracht und mit alkoholischer Sublimatlösung gefällt. Es fallen aus die Quecksilberverbindungen von Cadaverin, Marcitin und Putrin, die als Chloraurate dann trennbar sind. In der alkoholischen Mutterlauge der Sublimatfällung finden sich unter anderem Putrescin und  $\delta$ -Aminovaleriansäure.

Andere Methoden s. bei Engeland<sup>2)</sup>, Kutscher<sup>3)</sup> sowie bei den Kapiteln dieses Buches: Isolierung von organischen Basen aus Harn (§ 586), Trennung von Basen in autolysierten Organen (§ 724), Untersuchung von Fäulnisprodukten (§ 229), Isolierung von Basen aus Organen (§§ 722, 723, 724).

### $\alpha$ -Aminosäuren.

#### *Allgemeines.*

**Vorkommen.** 166.  $\alpha$ -Aminosäuren sind in großer Zahl an dem Aufbau der Proteinstoffen beteiligt und werden bei der hydrolytischen Spaltung dieser Verbindungen (durch Kochen mit Säuren, Alkalien, durch Fermente, Mikroorganismen) frei. Im freien Zustande finden sie sich normalerweise als Stoffwechselprodukte in den tierischen Geweben, Blut<sup>4)</sup>, Milch<sup>5)</sup>, Harn, Exsudaten<sup>6)</sup>, im Darminhalt; auch in Keimlingen sind sie gefunden worden (E. Schulze<sup>7)</sup> und im Boden (Potter und Snyder<sup>8)</sup>, Lathrop<sup>9)</sup>).

**Eigenschaften.** Sie krystallisieren, reagieren in wässriger Lösung fast neutral, in alkoholischer sauer gegen Phenolphthalein. Sie lassen sich in alkoholischer Lösung (Alkoholkonzentration etwa 97%) oder auch in wässriger Acetonlösung (Acetonkonzentration 80—85%) mit alkoholischer Normallauge und Benutzung von

<sup>1)</sup> Kossel u. Kutscher: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 31, S. 165. 1900.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. Untersuch. d. Nahrungs- u. Genußmittel Bd. 16, S. 658. 1908.

<sup>3)</sup> Zeitschr. f. Untersuch. d. Nahrungs- u. Genußmittel Bd. 13, S. 180. 1910; Bd. 14, S. 687. 1907.

<sup>4)</sup> Abderhalden: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 88, S. 478. 1913.

<sup>5)</sup> Pichon-Vendeuil: Chem. Zentralbl. 1922, I, S. 55. — Viale: desgl. 1922, III, S. 304.

<sup>6)</sup> Wiener: Biochem. Zeitschr. Bd. 41, S. 149. 1912.

<sup>7)</sup> Journ. f. prakt. Chem. N. F. Bd. 27, S. 337. 1883; Bd. 32, S. 433. 1885. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 17, S. 193. 1892/93; Bd. 20, S. 306. 1895; Bd. 22, S. 411. 1896/97; Bd. 24, S. 18. 1898; Bd. 30, S. 241. 1900; Bd. 33, S. 574. 1901; Bd. 35, S. 299. 1902; Bd. 38, S. 199. 1903; Bd. 45, S. 38. 1905; Bd. 65, S. 431. 1910.

<sup>8)</sup> Chem. Zentralbl. 1916, I, S. 76 u. 520. <sup>9)</sup> desgl. 1917, II, S. 560.



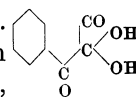
Phenolphthalein titrieren. Nur Prolin und die zweibasischen Aminosäuren geben in alkoholischer Lösung zu niedrige Resultate (Foreman<sup>1</sup>), Willstätter und Waldschmidt-Leitz<sup>2</sup>). Über diese Titration s. § 489.

Sie bilden mit Säuren und Basen krystallisierende Verbindungen.

Sie werden nach Neuberg und Kerb<sup>3</sup>) aus wässrigen Lösungen durch gemeinsame Einwirkung von Mercuriacetat und Natriumcarbonat (vollständiger auf nachträglichen Zusatz von Alkohol) als Quecksilberverbindungen von Carba-  
Fällbarkeit durch Mercuriacetat und Natriumcarbonat.  
 minsäuren gefällt und lassen sich so von gleichzeitig vorhandenen anderen Stoffen, z. B. anorganischen Salzen, Zuckerarten trennen, aber nicht von Peptiden und Peptonen, die ebenfalls gefällt werden. Man benutzt eine 25proz. in der Kälte oder bei höchstens 40° bereitete Mercuriacetat- und eine gesättigte oder 10proz. Natriumcarbonatlösung und verfährt so:

Zu der 10—20proz. oder auch verdünnteren Lösung, die mit Natriumcarbonat deutlich alkalisch gemacht ist, fügt man vorsichtig kleine Mengen der Quecksilberlösung. Der erste einfallende Tropfen erzeugt bisweilen eine gelbliche Fällung, die beim Umschütteln verschwindet und einem weißen Niederschlag Platz macht. Häufig muß man verhältnismäßig reichliche Mengen der beiden Reagenzien zufügen, bis die Ausscheidung beginnt. Man gibt abwechselnd von beiden solange hinzu, als der Niederschlag sich noch vermehrt und weiß bleibt, und dann weiter, bis eine auch beim Durchrühren bleibende Gelbrotfärbung eingetreten ist. Nach Zufügen von 5—8 Vol. 98proz. Alkohols (zur Vervollständigung der Fällung und Beseitigung von Schaumbildung) und häufigem Umrühren erhält man über schwach gelbroter voluminöser Fällung eine farblose Flüssigkeit, welche neutral oder schwach alkalisch, aber nicht sauer sein darf, und in der auf erneuten Zusatz von je 1 Tropfen verdünnter Sodalösung und Mercuriacetatlösung kein weißer Niederschlag, sondern nur gelbrotes Mercuricarbonat ausfallen darf. Man saugt jetzt ab (wobei man die ersten Anteile des Filtrats wieder auf das Filter geben muß, um klares Filtrat zu erhalten), wäscht mit 80proz. Alkohol gründlich aus und zerlegt den noch feuchten mit Wasser verriebenen Niederschlag mit Schwefelwasserstoff. Erhitzt man jetzt kurze Zeit auf dem Wasserbad und leitet noch etwas Schwefelwasserstoff durch, so setzt sich das Mercurisulfid gut ab. Man filtriert und entfernt etwa mit durchgegangene Spuren von Mercurisulfid durch Einengen und abermaliges Filtrieren.

Ninhydrinreaktion. Beim Kochen einer neutralen Lösung von  $\alpha$ -Aminosäuren mit Ninhydrin (Triketohydrindenhydrat) entsteht Blaufärbung (Ruhemann<sup>4</sup>). Nimmt man 10 ccm der Aminosäurelösung, 0,2 ccm einer 1proz. wässrigen Ninhydrinlösung und kocht 1 Minute, so fällt die Reaktion noch positiv aus bei folgenden Verdünnungen: Glykokoll 1 : 65 000, d-Alanin 1 : 26 000, d-Valin 1 : 15 000, l-Leucin 1 : 25 000, d-Glutaminsäure 1 : 22 000, l-Asparagin 1 : 19 000, d,l-Phenylalanin 1 : 26 000, l-Histidin 1 : 79 000,  $\alpha$ -Aminobuttersäure 1 : 16 000 (Abderhalden und Schmidt<sup>5</sup>). Es ist zu bemerken, daß außer Eiweiß und den Produkten der Eiweißhydrolyse nach Neuberg<sup>6</sup>) auch Amine, Aminoaldehyde, Allantoin (mit rotstichigem Farbenton), Taurin, Ammoniaksalze von Aldehyd- und Ketosäuren, von Milchsäure und anderen organischen Säuren, und andere Substanzen eine positive Reaktion geben. Auch



Ninhydrin.

<sup>1</sup>) Biochem. Journ. Bd. 14, S. 451; ref. Chem. Zentralbl. 1920, IV, S. 458.

<sup>2</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 54, 2, S. 2988. 1921.

<sup>3</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 40, S. 498. 1912; Bd. 67, S. 119. 1914.

<sup>4</sup>) Journ. of the chem. soc. (London) Bd. 97, 2, S. 2025. 1910.

<sup>5</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 72, S. 37. 1911; Bd. 85, S. 143. 1913.

<sup>6</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 56, S. 500. 1913.

Harding<sup>1)</sup> findet, daß Ammoniums Salze organischer Säuren in 1proz. Lösung und Ammoniums Salze starker Mineralsäuren in sehr hoher Konzentration sowie manche organische Basen positiv reagieren. Indessen ist die Reaktion für Aminosäuren besonders empfindlich, so daß sie die Anwesenheit von Aminosäuren anzeigt, wenn sie bei 20 Minuten langem Erhitzen von 1 ccm einer Lösung, die nicht mehr als 5 mg Stickstoff in 100 ccm enthält, mit 1 ccm einer 1proz. Ninhydrinlösung im kochenden Wasserbad positiv ausfällt, vorausgesetzt, daß nicht größere Mengen von Phosphaten zugegen sind (Harding). Nach Ssadikow und Zelinsky<sup>2)</sup> läßt sich der Farbstoff, wenn Aminosäuren vorliegen, mit Amylalkohol ausschütteln, was nicht der Fall ist, wenn es sich um aldehyd- oder ketonartige Verbindungen handelt.

Eine andere Farbenreaktion mit  $\beta$ -naphthochinonsulfosaurem Natrium ist kürzlich von Folin<sup>3)</sup> angegeben worden.

Im folgenden werden eine Reihe von Verbindungen der Aminosäuren beschrieben, welche in manchen Fällen auch zur Isolierung und zur Trennung von Gemischen, im wesentlichen aber zur Identifizierung der einzelnen Aminosäuren geeignet sind.

**Verbindungen mit:** Verbindungen mit Neutralsalzen. Die  $\alpha$ -Aminosäuren geben mit  
**Neutralsalzen** manchen Neutralsalzen (Alkali- und Erdalkalisalze) gut krystallisierte, chemisch einheitliche Molekularverbindungen, welche auch in wässrigen Lösungen bestehen, und von denen besonders die mit Glykokoll und Alanin untersucht worden sind (Pfeiffer<sup>4)</sup>). Die Aminosäuren verhalten sich in wässrigen Lösungen gegen Neutralsalze individuell verschieden, indem manche (Glykokoll, Asparagin- und Glutaminsäure) fast nur Löslichkeitserhöhungen erfahren, andere (Leucin, Phenylalanin) daneben auch erhebliche Aussalzungen.

Für Glykokoll bewirken fast sämtliche Neutralsalze Löslichkeitserhöhungen (die Alkalisalze weniger als die Erdalkalisalze), für d, l-Leucin nur die Erdalkalisalze, wenn auch weniger als für Glykokoll, für Asparagin- und Glutaminsäure Alkali- und Erdalkalisalze, und zwar in erheblichem Grade. d, l-Leucin und d, l-Phenylalanin werden aus ihren gesättigten Lösungen durch Ammonsulfat zu 80% gefällt, aber auch, wenn auch weniger reichlich, durch Natrium- und Kaliumchlorid, Natrium- und Magnesiumsulfat, Natrium- und Kaliumacetat, Kaliumoxalat, und zwar in krystallisierter Form. Mit Kaliumsulfat, Ammoniumchlorid, Calcium- und Barium-, Magnesium- und Aluminiumchlorid, Bariumchlorid, Aluminiumsulfat gibt Phenylalanin keine Fällung. Erdalkalien fällen Leucin nicht. Glykokoll, Tyrosin, Asparaginsäure werden aus ihren gesättigten Lösungen durch Salze nicht gefällt, Alanin nur durch Ammonsulfat zu etwa 19% (Pfeiffer<sup>5)</sup>).

Die Salzverbindungen lassen sich auch zur Trennung der Aminosäuren voneinander benutzen. So ist z. B. Calciumchlorid-Alanin in wässrigem Alkohol löslich, Calciumchlorid-Glykokoll schwerlöslich (Pfeiffer und Wittka<sup>6)</sup>), andererseits kann man Phenylalanin und Glykokoll weitgehend voneinander trennen mit Ammonsulfat, ebenso auch l-Leucin und Glykokoll (Pfeiffer und Wittka<sup>6)</sup>).

**Kupfersalze** Kupfersalze. Sie scheiden sich aus der mit frisch gefälltem Kupferhydroxyd gekochten, filtrierten und evtl. eingengten blauen Flüssigkeit beim

<sup>1)</sup> Harding u. Warneford: Journ. of biol. chem. Bd. 25, S. 319. 1916. — Harding u. Mac Lean: desgl. Bd. 25, S. 337. 1916.

<sup>2)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 141, S. 105. 1923.    <sup>3)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 51, S. 377. 1922.

<sup>4)</sup> Pfeiffer u. v. Modelski: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 81, S. 329. 1912; Bd. 85, S. 1. 1913. — Pfeiffer u. Wittka: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 48, 2, S. 1289. 1915. — Pfeiffer: desgl. Bd. 48, 2, S. 1938. 1915. — King u. Palmer: Biochem. Journ. Bd. 14, S. 574; Ref. Chem. Zentralbl. 1921, I, S. 10. Siehe darüber weiter Pfeiffer: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. 133, 22. 1924. (Anmerkg. bei der Korrektur.)

<sup>5)</sup> Pfeiffer u. Wittka: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 48, 1, S. 1041. 1915. — Pfeiffer u. Würzler: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 97, S. 128. 1916. Siehe dazu weiter Pfeiffer u. Angern: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. 133, 180. 1924. (Anmerkg. bei der Korrektur.)

<sup>6)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 48, 1, S. 1041. 1915. S. dazu weiter Pfeiffer u. Angern: a. a. O.

Erkalten aus. Kober und Sugiura<sup>1)</sup> empfehlen, die Kupfersalze mit Hilfe von Kupferhydroxyd in der Kälte herzustellen, und geben eine genaue Vorschrift. Beim Kochen der Lösung der Kupfersalze mit ein wenig Lauge wird alles Kupfer als Kupferoxyd abgeschieden, während die Kupfersalze der Peptone und Polypeptide dabei beständig sind (Kober<sup>2)</sup>. Zur Erkennung von Aminosäuren neben Peptiden und Peptonen und zur Trennung geeignet.

Silbersalze. Man versetzt die wässrige Lösung mit konzentrierter Silbernitratlösung (auf 1 Mol. etwas mehr als 1 Mol. Silbernitrat) und fügt unter Umrühren klares, kaltgesättigtes Barytwasser hinzu, bis die Flüssigkeit einen gelblichen Farbenton (Silberoxyd) annimmt. Ist die Silberverbindung der Aminosäure schwerlöslich, so beginnt während des Zusatzes des Barytwassers ihre krystallinische Abscheidung (Kutscher<sup>3)</sup>.

Phosphorwolframate. Durch Phosphorwolframsäure, welche ein gutes Fällungsmittel für Diaminosäuren ist, werden Monaminosäuren im allgemeinen nur aus konzentrierter Lösung und durch konzentrierte Phosphorwolframsäurelösung gefällt. Indessen ist zu bemerken, daß z. B. Glykokoll und Alanin selbst in nur 2proz. Lösungen bei Gegenwart von 10% Schwefelsäure mit sehr konzentrierter Phosphorwolframsäure bei längerem Stehen geringen krystallinischen Niederschlag geben (E. Fischer<sup>4)</sup>, und daß auch Phenylalanin noch bei starker Verdünnung, z. B. in 0,25proz. Lösung nach etwa 10 Minuten krystallinische Fällung gibt (E. Schulze und Winterstein<sup>5)</sup>. Es ist auch zu beachten, daß verschiedene Phosphorwolframsäurepräparate sich den einzelnen Aminosäuren gegenüber verschieden verhalten.

Über die Fällung von Aminosäuren durch Phosphorwolframsäure s. Levene und Beatty<sup>6)</sup>, über Phosphorwolframate einiger Aminosäuren (Drummond<sup>7)</sup>.

Pikrate. Zur Trennung mancher Aminosäuren geeignet.

Pikrolonate sind schwerlöslich und leicht krystallisierbar, verhalten sich aber einander ähnlich, so daß sie zur Trennung sich nicht eignen (Abderhalden und Weil<sup>8)</sup>, Levene und v. Slyke<sup>9)</sup>, während die Diaminosäuren mit Hilfe von Pikrolonsäure sich trennen lassen (Steudel<sup>10)</sup>. Man erhält sie durch Zusatz von gesättigter alkoholischer Pikrolonsäurelösung zu kochender wässriger Aminosäurelösung.

Äthylester. Man übergießt die Aminosäure mit absolutem Alkohol, bringt sie durch Einleiten von gasförmiger Salzsäure in Lösung, kocht noch 1 Stunde am Rückflußkühler und dampft dann unter stark vermindertem Druck bei einer 35° nicht übersteigenden Temperatur ein (siehe § 477a). Der Rückstand wird mit wenig Wasser versetzt, mit Äther überschichtet und nach sorgfältiger Kühlung in einer Kältemischung mit soviel starker Natronlauge versetzt, daß die freie Salzsäure ungefähr neutralisiert ist und darauf unter fortgesetzter Kühlung und Umschütteln mit soviel trockenem gekörnten Kaliumcarbonat, daß sich die wässrige Schicht in einen dicken Brei verwandelt. Nach kräftigem Umschütteln wird die ätherische Lösung abgegossen, der Rückstand noch 2- bis 3mal mit wenig Äther durchgeschüttelt und die vereinigte ätherische Lösung nach der Filtration zuerst etwa 10 Minuten mit trockenem Kaliumcarbonat,

<sup>1)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 13, S. 1. 1912/13.    <sup>2)</sup> desgl. Bd. 10, S. 9. 1911/12.

<sup>3)</sup> Sitzungsber. d. preuß. Akad. a. Wiss. Bd. 26, S. 588. 1902.

<sup>4)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 33, I, S. 546. 1906.

<sup>5)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 35, S. 213. 1902.

<sup>6)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 47, S. 149. 1906.

<sup>7)</sup> Biochem. Journ.. Bd. 12, S. 5; ref. Chem. Zentralbl. 1918, II, S. 944.

<sup>8)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 78, S. 150. 1912.

<sup>9)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 12, S. 127. 1912.

<sup>10)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 37, S. 219. 1902/03; Bd. 44, S. 157. 1905.

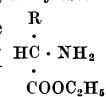
Silbersalze

Phosphorwolframate

Pikrate

Pikrolonate

Äthylester.

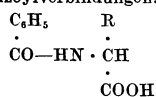


und dann mit etwas Natriumsulfat mehrere Stunden unter öfterem Umschütteln stehen gelassen. Beim Abdampfen des Äthers hinterbleibt der Ester.

Über andere Arten der Gewinnung der Ester aus ihren Chlorhydraten s. § 477b. Um die trotz der niedrigen Temperatur unvermeidliche teilweise Hydrolyse der Ester auszuschließen, ist empfohlen worden, nach Entfernung des Alkohols im Vakuum die möglichst gut getrockneten Salze der Ester mit Bleihydroxyd zu vermischen und unter allmählicher Steigerung der Temperatur des Ölbadens im Vakuum die Ester zu destillieren<sup>1)</sup>. Abderhalden und Weil<sup>2)</sup> fanden dieses Verfahren nicht empfehlenswert.

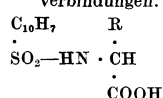
Die Ester der Aminosäuren sind alkalisch reagierende Flüssigkeiten, in Wasser (mit steigendem Molekulargewicht abnehmend) löslich, leichtlöslich in Alkohol, Äther, Benzol. Sie destillieren sämtlich unter vermindertem Druck unzersetzt. Die Pikrate krystallisieren meist schön. Durch Kochen mit Wasser bzw. Barythydrat werden sie gespalten (E. Fischer<sup>3)</sup>, Curtius<sup>4)</sup>.

Benzoylverbindungen.

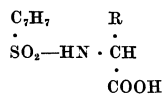


Benzoylverbindungen. Man erhält sie in den meisten Fällen am besten, indem man die Aminosäure in wässriger Lösung bei Gegenwart von viel Natriumbicarbonat mit einem großen Überschuß von Benzoylchlorid, das portionsweise zugegeben wird, schüttelt, bis der Geruch nach Benzoylchlorid verschwunden ist, nach dem Filtrieren mit Salzsäure ansäuert, den entstehenden Niederschlag nach Stehen in Eiswasser filtriert und nach dem Trocknen zur Entfernung der Benzoesäure wiederholt mit Ligroin (Kp. 65—72°) auskocht. Umkrystallisieren aus heißem Wasser. (Modifiziertes Schotten-Baumannsches Verfahren, E. Fischer<sup>5)</sup>).

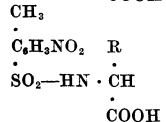
Naphthalinsulfoverbindungen.



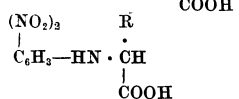
$\beta$ -Naphthalinsulfoverbindungen. 2 Molekulargewichte  $\beta$ -Naphthalinsulfochlorid (Fp. 78°) werden in Äther gelöst. Dazu fügt man die Lösung der Aminosäure in der für 1 Mol. berechneten Menge Normalnatronlauge und schüttelt in der Maschine bei gewöhnlicher Temperatur. In Zwischenräumen von 1—1½ Stunden fügt man noch 3 mal die gleiche Menge Normalalkali hinzu. Die wässrige Lösung wird in einem Scheidetrichter von der ätherischen getrennt, filtriert (wenn nötig nach Klärung mit Tierkohle) und mit Salzsäure übersättigt. Die schwerlösliche Naphthalinsulfoverbindung fällt aus, und zwar in der Regel als Öl, welches bald oder nach einiger Zeit krystallinisch wird. Umkrystallisieren aus Wasser bzw. verdünntem Alkohol (E. Fischer und Bergell<sup>6)</sup>). Asparagin- und Glutaminsäure geben keine schwerlöslichen Derivate (Bergell<sup>7)</sup>).



p-Toluolsulfoverbindungen werden in derselben Weise mit p-Toluolsulfochlorid dargestellt (E. Fischer und Bergmann<sup>8)</sup>, E. Fischer und Lipschitz<sup>9)</sup>). Die Abspaltung der Arylsulfogruppe gelingt durch vielstündiges Erhitzen mit starker Salzsäure, rascher und glatter durch rauchende Jodwasserstoffsäure und Jodphosphonium im geschlossenen Gefäß bei 70—100°, wobei die Sulfogruppe in die Mercaptogruppe übergeht (E. Fischer<sup>10)</sup>).



4-Nitrotoluol-2-sulfoverbindungen werden in ähnlicher Weise hergestellt. Ebenfalls in Wasser schwer löslich (Siegfried<sup>11)</sup>).



2,4-Dinitrophenylverbindungen werden mit Hilfe von Dinitrochlorbenzol gewonnen (Abderhalden und Blumberg<sup>12)</sup>).

<sup>1)</sup> Zelinsky, Annenkoff u. Kulikoff: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 73, S. 459. 1911.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 81, S. 226. 1912.

<sup>3)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 34, S. 433. 1901. <sup>4)</sup> desgl. Bd. 16, S. 753. 1883.

<sup>5)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 32, 2, S. 2451. 1899. <sup>6)</sup> desgl. Bd. 35, 3, S. 3779. 1902.

<sup>7)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 89, S. 465. 1914.

<sup>8)</sup> Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 398, S. 117. 1913.

<sup>9)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 48, 1, S. 360. 1915.

<sup>10)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 48, 1, S. 93. 1915.

<sup>11)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 43, S. 68. 1904/05.

<sup>12)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 65, S. 318. 1910.

Uraminosäuren. Beim Kochen von Aminosäuren mit Harnstoff im Überschuß mit Barytwasser<sup>1)</sup>, ebenso auch mit Harnstoff und Wasser allein<sup>2)</sup> entstehen Uraminosäuren (im ersten Fall unter Racemisierung). Sie sind im allgemeinen bei Gegenwart verdünnter Mineralsäure weniger löslich als die Aminosäuren und in Alkohol löslicher als diese, manche lassen sich mit Äther extrahieren. Die Salze sind größtenteils in Wasser sehr leicht löslich, in Alkohol sehr wenig. In neutraler Lösung und bei Abwesenheit von Chloriden geben sie noch bei sehr großer Verdünnung mit Mercurinitrat amorphe Fällungen, die sich in Säure und in Alkali lösen. Genauere Angaben über die Darstellung, Eigenschaften, Salze usw. der einzelnen Uraminosäuren s. bei Lippich<sup>3)</sup>. Auch die Überführung in die Hydantoine durch Kochen mit Säuren und deren Ätherlöslichkeit kann zur Isolierung der Aminosäuren verwendet werden, s. darüber näheres bei Lippich<sup>4)</sup> und Dakin<sup>5)</sup>. Auf die Überführung in Uraminosäuren und die Fällbarkeit dieser durch Mercurinitrat gründet Lippich<sup>6)</sup> eine Reaktion zur Erkennung sehr kleiner Mengen von Aminosäuren.

Phenylisocyanatverbindungen. Man löst die Säure in der zur Neutralisation nötigen Menge Normallauge, fügt unter starker Abkühlung und Schütteln die erforderliche Menge Phenylisocyanat allmählich hinzu, schüttelt weiter bis zum Verschwinden des Cyanatgeruches, zuletzt unter Zusatz von Tierkohle, filtriert und säuert an. Dabei fällt eine meist harzige Masse aus, die allmählich krystallinisch wird und aus Wasser bzw. verdünntem Alkohol umkrystallisiert wird. Kocht man diese Phenylisocyanatverbindung mit 25 proz. Salzsäure und dampft dann ein, so scheidet sich das Hydantoin krystallinisch aus (Paal<sup>7)</sup>, E. Fischer<sup>8)</sup>, Mouneyrat<sup>9)</sup>.

$\alpha$ -Naphthylisocyanatverbindungen. Man löst die Aminosäure in Wasser, neutralisiert mit Normallauge, fügt Naphthylisocyanat (auf 1 Mol.  $\frac{5}{4}$  Mol.) hinzu, schüttelt mehrmals je 2—3 Minuten (nach jedem Schütteln Öffnen des Stopfens), läßt  $\frac{1}{2}$ — $\frac{3}{4}$  Stunde stehen, filtriert und säuert mit Salzsäure an. Die Naphthylisocyanatverbindungen scheiden sich krystallinisch und quantitativ ab. Umkrystallisieren aus verdünntem Alkohol. Sie bilden Salze mit Schwermetallen, z. B. mit Kupfer und Silber, zu deren Herstellung man sie in heißem Ammoniak löst, die Lösung durch Kochen von überschüssigem Ammoniak befreit und mit Kupferacetat oder Silbernitrat fällt. Die Niederschläge werden abgesaugt, mit Wasser, Alkohol und Äther gewaschen. Durch Erhitzen mit Barytwasser lassen sich die Aminosäuren aus ihren  $\alpha$ -Naphthylisocyanatverbindungen zurückgewinnen (Neuberg und Manasse<sup>10)</sup>, Neuberg und Rosenberg<sup>11)</sup>.

1-Phenyl-2-Thiohydantoine werden erhalten, indem man die Aminosäuren mit äquimolekularer Menge Ätzkali in Wasser löst, die molekulare Menge Phenylsenföls in alkoholischer Lösung zufügt und auf dem Sandbade am Rückflußkühler unter häufigem Schütteln erhitzt. In weniger als einer Stunde ist die Reaktion beendet (Verschwinden des Senföls). Nach Einengen der Lösung zur Entfernung des Alkohols wird Salzsäure im Überschuß zugefügt und zur Trockne verdunstet. Die sich dabei gewöhnlich krystallinisch abscheidenden Hydantoine zerreibt man mit

<sup>1)</sup> Lippich: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 41, 2, S. 2953. 1908.

<sup>2)</sup> Lippich: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 41, 2, S. 2974. 1908.

<sup>3)</sup> a. a. O., s. auch Dakin: Journ. of biol. chem. Bd. 44, S. 517. 1920; Weiland: Biochem. Zeitschr. Bd. 38, S. 385. 1912.

<sup>4)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 90, S. 138ff. 1914.

<sup>5)</sup> a. a. O.

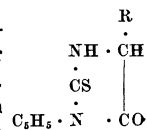
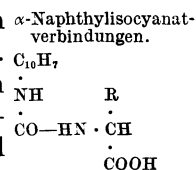
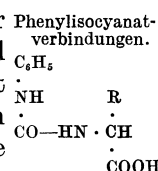
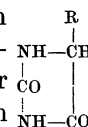
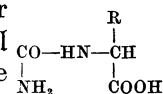
<sup>6)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 90, S. 132ff. 1914.

<sup>7)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 27, 1, S. 974. 1894. <sup>8)</sup> desgl. Bd. 33, 2, S. 2381 u. 2386. 1900.

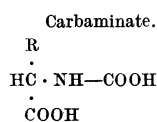
<sup>9)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 33, 2, S. 2393. 1900.

<sup>10)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 38, 2, S. 2359. 1905.

<sup>11)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 5, S. 456. 1907.

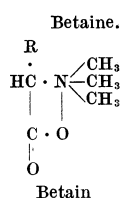


kaltem Wasser zur Entfernung des Kaliumchlorids. Ausbeute fast immer quantitativ (Marckwald, Neumark und Stelzner<sup>1</sup>), Brautlecht<sup>2</sup>).

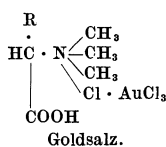


Erdalkalisalze der Carbaminosäuren (Siegfried<sup>3</sup>). Zur Darstellung der Kalksalze sättigt man die wässrige Lösung der Aminosäure unter Kühlung mit Eiswasser mit Kohlensäure, fügt Kalkmilch hinzu, die sich zunächst auflöst, leitet wieder Kohlensäure ein, wiederholt dieses noch einige Male, gibt dann noch Kalkmilch und krystallisiertes Calciumcarbonat hinzu, schüttelt und filtriert. Während des ganzen Versuchs wird gut mit Eiswasser gekühlt. Als Reaktionsgefäß verwendet man am besten ein Pulverglas mit eingeriebenem Stopfen. Aus dem völlig klaren Filtrat, in dem sich die Aminosäuren quantitativ als Calciumcarbaminat befinden (Siegfried und Neumann<sup>4</sup>) (cystincarbonsaures Calcium ist in Wasser sehr schwerlöslich, Liebermann<sup>5</sup>), scheiden sich die Kalksalze nach Zusatz von gekühltem Alkohol bis zur starken Trübung in äußerst kleinen, krystallinischen Körnchen aus, oft sehr voluminös. Nach dem Absaugen und Waschen mit Alkohol (zunächst verdünntem, dann absolutem) und Äther sind sie in der Regel rein. Sie lösen sich in Wasser leicht und klar (cystincarbonsaures Calcium sehr schwer), beim Erwärmen trübt sich die Lösung durch sich abscheidendes Calciumcarbonat, wobei die Aminosäuren wieder erhalten werden.

Die Bariumsalze werden in analoger Weise dargestellt. Sie zeigen Unterschiede in der Löslichkeit. So ist das Bariumcarbaminat des d,l-Alanin und der d,l- $\alpha$ -Aminovaleriansäure leichter löslich als das des Phenylalanin und des Tyrosin, und diese wieder leichter als das des l-Leucin. Fast unlöslich sind die Bariumcarbaminat des Glykokoll, der Asparagin- und Glutaminsäure (Siegfried<sup>6</sup>), Siegfried und Schutt<sup>7</sup>).



Betaine der Aminosäuren. Man erhält sie nach Engeland<sup>8</sup>) und Novák<sup>9</sup>) am besten mit Hilfe von Dimethylsulfat. Sie sind mittels Sublimat, Gold- und Platinchlorid voneinander trennbar. Besonders scheint das Verfahren zur Isolierung von Prolin sich zu eignen. Es geht bei der Methylierung in n-Methylhygrinsäure über, die mit Sublimat ausfällt und ein gut charakterisiertes Platinat und Goldaurat gibt. Asparaginsäure geht dabei in Fumarsäure über (Novák).



Einwirkung von salpetriger Säure (Reaktion v. Slyke).

Einwirkung von salpetriger Säure. Aliphatische Aminogruppen reagieren mit salpetriger Säure nach der Gleichung  $\text{RNH}_2 + \text{HNO}_2 = \text{ROH} + \text{H}_2\text{O} + \text{N}_2$ . Auf diese Reaktion hat v. Slyke<sup>10</sup>) eine Methode der quantitativen Bestimmung der Aminosäuren, beruhend auf der Messung des entwickelten Stickstoffs, begründet. Bei Benutzung des von v. Slyke angegebenen Apparates und Einhaltung der von ihm angegebenen Bedingungen entwickeln Glykokoll, Alanin, Valin, Leucin, Phenylalanin, Tyrosin, Asparagin- und Glutaminsäure, Cystin in 5—6 Minuten, Lysin in 30 Minuten ihren gesamten Stickstoff. Arginin,

<sup>1</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 24, 2, S. 3278. 1891.

<sup>2</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 10, S. 139. 1911/12.

<sup>3</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 44, S. 85. 1905; Bd. 46, S. 401. 1905; s. dazu auch Buston u. Schryver: Biochem. Journ. Bd. 15, S. 636. 1921.

<sup>4</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 54, S. 423. 1907/08.

<sup>5</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 58, S. 84. 1908/09.

<sup>6</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 39, 1, S. 397. 1906.

<sup>7</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 81, S. 260. 1912.

<sup>8</sup>) Zeitschr. f. Biol. Bd. 63, S. 470. 1914. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 120, S. 130. 1922. Ferner Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 42, 3, S. 2962. 1909 u. Bd. 43, 3, S. 2662 1910. — Engeland u. Kutscher: Zeitschr. f. Biol. Bd. 59, S. 415. 1913.

<sup>9</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 45, 1, S. 834. 1912.

<sup>10</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 43, 3, S. 3170. 1910. Journ. of biol. chem. Bd. 9, S. 185. 1911 u. Bd. 12, S. 275. 1912.

und Knoop<sup>1)</sup> erbracht worden. Es tritt bei der Säurespaltung und tryptischen Verdauung der Proteinstoffe auf, ferner bei der Spaltung des Carnosin mit Ätzbaryt (Gulewitsch<sup>2)</sup>. Es ist auch im Blut (Abderhalden<sup>3)</sup>, im normalen menschlichen Harn (Engeland<sup>4)</sup>, im Gehirn (Rieländer<sup>5)</sup>, im Fischfleisch (Suzuki<sup>3)</sup>, im Käse (Winterstein und Thöny<sup>7)</sup>, in Keimpflanzen (E. Schulze<sup>8)</sup> und Kartoffelknollen (E. Schulze), in Pollen von *Pinus silvestris* (Kiesel<sup>9)</sup> nachgewiesen worden. Das erhaltene Histidin ist optisch aktiv (l-Histidin), nur bei der Spaltung der Eiweißstoffe mit Jodwasserstoff bei Gegenwart von phosphoriger Säure wurde ein Histidin gewonnen, dessen salzsaures Salz optisch inaktiv war (Kossel und Kutscher<sup>10)</sup>.

d,l-Histidin wurde von Pyman<sup>11)</sup> von 4 (5)-Chlormethylimidazol aus über 4 (5)-Imidazolyl-methylchlormalonester und d,l- $\alpha$ -Chlor- $\beta$ -Imidazolyl-4 (5)-propionsäure dargestellt. Es läßt sich mittels Weinsäure in die aktiven spalten (Pyman, Abderhalden und Weil<sup>12)</sup>. Darstellung.

d-Histidin entsteht bei der Vergärung von d,l-Histidin mit Zucker und Hefe (F. Ehrlich<sup>13)</sup> und erscheint im Harn (von Kaninchen) nach Eingabe von d,l-Histidin (Abderhalden und Weil). Die Racemisation des aktiven Histidin erfolgt am besten und fast quantitativ beim 20stündigen Erhitzen im Autoklaven auf 150—160° mit überschüssigem Barytwasser (F. Ehrlich, Abderhalden und Weil).

Über die Isolierung aus der Zersetzungsflüssigkeit der Proteine siehe §§ 483, 488, 494, über quantitative Bestimmung in dieser Zersetzungsflüssigkeit siehe §§ 498 bis 499. Zur Darstellung von l-Histidin benutzt man am besten Blut und verfährt unter Benutzung der Angaben von S. Fränkel<sup>14)</sup>, Pauly, Knoop und Abderhalden und Weil) so:

Der aus defibriertem Pferdeblut durch Senkung oder Zentrifugieren erhaltene Blutkörperchenbrei wird mit der 3fachen Menge rauchender Salzsäure in einem Rundkolben versetzt und nach Einleiten von Salzsäuregas bis zur Sättigung auf dem Baboblech am Rückflußkühler 6 Stunden lang gekocht. Man destilliert im Vakuum zur Trockne, nimmt den Rückstand in Wasser auf, destilliert wieder, wiederholt dasselbe noch 2 mal, nimmt wieder mit Wasser auf, neutralisiert mit Natronlauge bis zur amphoteren Reaktion und filtriert. Das hell- bis dunkelgelbe Filtrat wird mit Soda deutlich alkalisch gemacht und mit einer gesättigten alkoholischen Sublimatlösung (Kossel) bei anhaltend schwach sodaalkalischer Reaktion ausgefällt. Der Niederschlag wird in einem Minimum von verdünnter Salzsäure gelöst, die Lösung filtriert und wieder vorsichtig unter Zugabe von Soda und viel Wasser mit wenig Sublimat gefällt, der Niederschlag abfiltriert, gut ausgewaschen und mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Aus dem Filtrat scheidet sich nach Entfernung des Schwefelwasserstoffs durch Durchleiten von Luft und Einengen Histidinmonochlorid aus, aus den letzten Mutterlaugen das Dichlorid. Aus 10 l Blut etwa 80 g. Aus dem salzsauren Salz gewinnt man die freie Base durch Zufügen der berechneten Menge von n-Lithiumhydroxydlösung, Verdampfen Darstellung aus Blut.

<sup>1)</sup> Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 10, S. 111. 1907.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 50, S. 535. 1906/07.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 88, S. 478. 1913. <sup>4)</sup> desgl. Bd. 57, S. 49. 1908.

<sup>5)</sup> Zentralbl. f. Physiol. Bd. 22, S. 377. 1909.

<sup>6)</sup> Chem. Zentralbl. 1913, I, S. 1042.

<sup>7)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 36, S. 28. 1902 u. Bd. 41, S. 485. 1904.

<sup>8)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 28, S. 465. 1899 u. Bd. 38, S. 199. 1903.

<sup>9)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 120, S. 85. 1922. <sup>10)</sup> desgl. Bd. 31, S. 179. 1901.

<sup>11)</sup> Journ. of the chem. soc. (London) Bd. 99, S. 1386; ref. Chem. Zentrbl. 1911, II, S. 760.

<sup>12)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 77, S. 435. 1912.

<sup>13)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 63, S. 379. 1914.

<sup>14)</sup> Monatshefte f. Chem. Bd. 24, S. 229. 1903.

zur Trockne im Vakuum bei 50° und Auskochen mit wenig absolutem Alkohol. Histidin bleibt zurück und wird aus Wasser umkrystallisiert. Oder am einfachsten man leitet in die möglichst konzentrierte Lösung des Chlorids Ammoniakgas bis zur schwachen Übersättigung ein und engt auf dem Wasserbad ein. Es scheidet sich Histidin ab, das aus Wasser umkrystallisiert wird.

Ein etwas anderes Verfahren ist § 488 beschrieben.

**Eigenschaften.** l- und d-Histidin, lange schmale, 6eckige Tafeln (Schmelzpunkt bei etwa 280° unter Zersetzung), in kaltem Wasser schwer löslich, leicht in heißem (etwa 1 : 10), fast unlöslich in organischen Lösungsmitteln, von alkalischer Reaktion. l-Histidin schmeckt fade, d-Histidin süß. d,l-Histidin, 4seitige Tafeln (von demselben Zersetzungspunkt) in kaltem Wasser schwer löslich, in kochendem etwa 1 : 20, unlöslich in organischen Lösungsmitteln, von schwach süßem Geschmack (Pym an, Abderhalden und Weil).

Histidin verbraucht etwas mehr als 2 Atome Brom (Siegfried und Reppin<sup>1</sup>). Die Lösungen werden durch Phosphorwolframsäure bei Vermeidung eines Überschusses gefällt. Versetzt man die Lösung der freien Base oder des Nitrates mit Silbernitrat und vorsichtig mit Ammoniak, Natronlauge oder Barytwasser, so entsteht im überschüssigen Ammoniak leicht löslicher amorpher Niederschlag, der ausgewaschen und bei 100° getrocknet die Zusammensetzung  $C_6H_7Ag_2N_3O_2 \cdot H_2O$  hat (Hedin). Die Lösungen seiner Salze werden durch Phosphorwolframsäure gefällt, ferner durch Quecksilberchlorid bei Gegenwart von Barytwasser und auch durch Mercurisulfat aus schwefelsaurer Lösung (Kossel und Patten<sup>2</sup>); (s. dazu auch Onslo<sup>3</sup>), aber nicht durch Bleiessig oder Gerbsäure. Das kohlen saure Salz wird bei Abwesenheit von neutralen Alkalisalzen noch in sehr verdünnter Lösung durch Sublimat gefällt. Histidin wird auch gefällt durch Dinitronaphtholsulfosäure (1-Naphthol-2, 3-dinitro-7-sulfosäure). Der Niederschlag (molekulare Verbindung) löst sich zu 0,146%, ist löslicher wie die entsprechende Argininverbindung, weniger löslich wie die Guanidin- und Lysinverbindungen (Kossel und Groß<sup>4</sup>). Histidin ist ziemlich beständig beim Kochen mit Barytwasser (Onslo<sup>3</sup>). Ninhydrinreaktion S. 219, Reaktion nach v. Slyke S. 224.

**Verbindungen:**  
mit Salzsäure

l-Monochlorhydrat  $C_6H_9N_3O_2 \cdot HCl + H_2O$  (Fp. 251—252°, nach anderer Angabe bei 255°), bildet in Wasser ziemlich leicht lösliche, in Alkohol und Äther unlösliche, glashelle rhombische Tafeln. Über Krystallform s. Bauer<sup>5</sup>). Das Krystallwasser wird erst bei längerem Erhitzen auf 165° im Vakuum abgegeben (Abderhalden und Einbeck<sup>6</sup>). Löst man das salzsaure Salz in wenig heißer konzentrierter Salzsäure, fällt mit Alkohol-Äther, wiederholt dieses Verfahren mehrmals und löst dann in verdünnter Salzsäure, so scheidet sich bei langsamem Verdunsten  $C_6H_9N_3O_2 \cdot 2 HCl$  in großen, glashellen Tafeln, die bei 231—233° unter Zersetzung schmelzen und in konzentrierter Salzsäure kaum löslich sind, ab (Kutscher<sup>7</sup>). Auch bei 4stündigem Erhitzen auf 180° wird das Chlor fast vollständig festgehalten (Abderhalden und Einbeck<sup>6</sup>). d,l-Monochlorhydrat + 2 H<sub>2</sub>O (Fp. 117—119° korr.) verliert bei 100° etwa 1½ Mol. H<sub>2</sub>O; leicht in Wasser löslich (Pym an). d,l-Dichlorhydrat zersetzt sich bei 235—236° (korr.) (Pym an), nach Abderhalden und Weil bei gegen 250—255°.

mit Salpetersäure

Gut krystallisierendes Nitrat  $C_6H_9N_3O_2 \cdot 2 HNO_3$  (Kossel<sup>8</sup>).

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 95, S. 18. 1915.    <sup>2</sup>) desgl. Bd. 38, S. 39. 1903.

<sup>3</sup>) Biochem. Journ. Bd. 15, S. 383. 1921.    <sup>4</sup>) Ref. Chem. Zentralbl. 1923, III, S. 1151.

<sup>5</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 22, S. 182 u. 285. 1896/97.

<sup>6</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 62, S. 322. 1909.

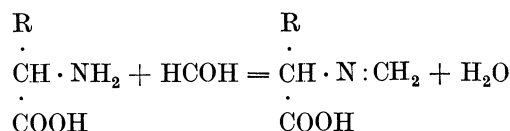
<sup>7</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 28, S. 383. 1899; s. a. Bd. 29, S. 492. 1900.

<sup>8</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 28, S. 382. 1899.



Histidin, Tryptophan, Asparagin reagieren nur mit je einem Stickstoff (dem in der  $\alpha$ -Stellung), Prolin und Oxyprolin, auch Sarkosin gar nicht. Die Resultate sind mit allen Aminosäuren mit Ausnahme von Glykokoll und Cystin genau. Mit Glykokoll erhält man 103%, mit Cystin 107% der theoretischen Gasmenge. Eine genaue Beschreibung der Methode erfolgt § 492.

Einwirkung von Formaldehyd. Mit Formaldehyd reagieren die Aminosäuren (auch Sarkosin) nach der Gleichung Einwirkung von Formaldehyd.



Die so erhaltenen Verbindungen lassen sich in wässriger Lösung im Gegensatz zu den Aminosäuren mit Phenolphthalein als Indicator titrieren, und darauf beruht eine von Sørensen<sup>1)</sup> angegebene Methode (Formoltitration) zur quantitativen Bestimmung der Aminosäuren. Die Methode wird (§ 490 bis 491) beschrieben.

Einwirkung von Hefe. Durch überschüssige Hefe bei Gegenwart von Zucker werden die Aminosäuren vergoren unter Abspaltung von Ammoniak und Kohlensäure und Bildung der um 1 Kohlenstoffatom ärmeren Alkohole. Die Vergärung betrifft in den meisten Fällen nur die eine, und zwar die natürlich vorkommende Komponente, so daß der optische Antipode zurückbleibt und isoliert werden kann (Felix Ehrlich<sup>2)</sup>. Einwirkung von Hefe.

Einwirkung von Oxydationsmitteln. Durch Wasserstoffsperoxyd und Eisensalze entstehen aus Aminosäuren unter Abgabe von Ammoniak und Kohlensäure Aldehyde und weiter Säuren (Dakin<sup>3)</sup>. Ein Abbau unter Bildung von um einen Kohlenstoff ärmeren Aldehyden erfolgt auch durch Natriumhypochlorit (Langheld<sup>4)</sup>, ferner durch Sonnenlicht und Uransalze (Neuberg<sup>5)</sup> und durch elektrischen Gleichstrom (Neuberg<sup>6)</sup>. Bei der Oxydation mit an niederen Stickstoffoxyden reicher konzentrierter Salpetersäure entsteht Oxalsäure (C. Th. Mörner<sup>7)</sup>. Einwirkung von Oxydationsmitteln.

Über Nachweis und Bestimmung der Aminosäuren im Harn s. § 616ff., in serösen Flüssigkeiten §§ 650 und 651, in Organen §§ 725 und 744, in der hydrolytischen Zersetzungsflüssigkeit der Proteine § 475ff. Nachweis und Bestimmung.

#### Monaminosäuren.

167. Glykokoll (Glycin, Aminoessigsäure)  $\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$ . Glykokoll (Leimzucker) Vorkommen. entsteht bei der Spaltung vieler Proteinstoffe (besonders reichlich aus Fibroin, Spinnenseide, Elastin, Leim), ferner bei der Spaltung von Hippursäure, Glykocholsäure und anderen Gallensäuren, Harnsäure, Xanthin, Guanin, Adenin. Es findet sich im normalen Blut (Bingel<sup>8)</sup>, Abderhalden<sup>9)</sup>, in Blut und Ascitesflüssigkeit von Nephritikern (Neuberg und Strauss<sup>10)</sup>, in der Milch (Pichon-Vendeuil<sup>11)</sup>, im Harn phosphorvergifteter Menschen (Wohlgemuth<sup>12)</sup>, |  
CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>  
|  
COOH

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 7, S. 45. 1908.

<sup>2)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 1, S. 8. 1906; Bd. 8, S. 438. 1908; Bd. 63, S. 379. 1914.

<sup>3)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 1, S. 171. 1905/06 u. Bd. 4, S. 63. 1908.

<sup>4)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 42, 1, S. 392 u. Bd. 42, 2, S. 2360. 1909. — Engfeldt: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 121, S. 18. 1922.

<sup>5)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 13, S. 305. 1908. <sup>6)</sup> desgl. Bd. 17, S. 271. 1909.

<sup>7)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 95, S. 277. 1915.

<sup>8)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 57, S. 382. 1908. <sup>9)</sup> desgl. Bd. 88, S. 478. 1913.

<sup>10)</sup> Berlin. klin. Wochenschr. 1906, S. 258.

<sup>11)</sup> Chem. Zentralbl. 1922, I, S. 55.

<sup>12)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 44, S. 74. 1905.

Hunde (Abderhalden und Barker<sup>1</sup>) und Kaninchen (Abderhalden und Bergell<sup>2</sup>) sowie im Harn Gichtkranker (Ignatowski<sup>3</sup>). Vielleicht ist es auch in jedem normalen Harn enthalten (Embden und Marx<sup>4</sup>). Indessen konnte Oehler<sup>5</sup> es hier nicht nachweisen (s. auch Malfatti<sup>6</sup>). Es findet sich in den Muskeln von *Pecten irradians* (Chittenden<sup>7</sup>) und *Pecten opercularis* (Kelly<sup>8</sup>), in allen Organen von *Astropecten aurantiacus*, in den Testikeln von *Strungylocentrotus lividus* (Kossel und Edlbacher<sup>9</sup>), im Krabbenextrakt (Berlin<sup>10</sup>).

**Darstellung.** Glykokoll wird synthetisch durch Einwirkung von Ammoniak auf Monochloressigsäure erhalten (s. die Vorschrift von Drushel und Knapp<sup>11</sup>) oder aus Formaldehyd und Cyankalium über Methylenaminoacetonitril nach Klages<sup>12</sup>) und Ling und Nanji<sup>13</sup>). Siehe die Vorschriften bei Ling und Nanji.

Aus Hippursäure stellt man es in folgender Weise dar: 1 Tl. Hippursäure wird mit 4 Tl. verdünnter Schwefelsäure (1 Tl. konzentrierter Säure auf 6 Tl. Wasser) 10—12 Stunden am Rückflußkühler gekocht, nach 24 Stunden filtriert und mit kaltem Wasser gewaschen. Das Filtrat wird eingedampft, durch Ausschütteln mit Äther von Resten von Benzoesäure befreit, mit Wasser verdünnt und durch Kochen mit Bariumcarbonat neutralisiert. Aus dem eingedampften Filtrat scheidet sich Glykokoll ab.

Über die Isolierung des Glykokolls aus der hydrolytischen Zersetzungsflüssigkeit der Proteinkörper s. § 475 ff.

**Eigenschaften.** Es bildet farblose, oft große, harte, monokline Krystalle von rhomboedrischer Form oder 4seitige Prismen, welche süß schmecken, bei 228° sich bräunen und bei 232—236° unter Gasentwicklung schmelzen und sich zersetzen. Sie lösen sich in 4,3 Tl. kaltem Wasser, schwer in heißem Alkohol, sind unlöslich in kaltem Alkohol oder Äther, verhältnismäßig leicht in gesättigter Ammoniumsulfatlösung (Skraup und Hummelberger<sup>14</sup>). Die nicht zu verdünnte wässrige Lösung reagiert gegen Lackmus sauer (s. dazu Salkowski<sup>15</sup>) und färbt sich mit Eisenchlorid rot. Über Titration s. S. 218. Durch Tierkohle wird es nicht adsorbiert (Abderhalden und Fodor<sup>16</sup>). Es reduziert in alkalischer Lösung Methylenblau, was andere Aminosäuren nicht tun (Hasse<sup>17</sup>). Die wässrige Lösung wird durch Mercurinitrat oder Mercurichlorid nicht gefällt, ebenso nicht durch Phosphorwolframsäure (s. indessen S. 221), eine 8proz. durch Aceton (Weil<sup>18</sup>). Aus Flüssigkeiten, die gleichzeitig neutrale Alkalisalze enthalten, krystallisiert Glykokoll leicht mit diesen zusammen, z. B.  $C_2H_5NO_2 \cdot KCl$ . Ninhydrinreaktion S. 219. Reaktion nach v. Slyke S. 224.

Über das Verhalten zu Neutralsalzen s. S. 220.

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 42, S. 524. 1904. <sup>2</sup>) desgl. Bd. 39, S. 464. 1903.

<sup>3</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 42, S. 371. 1904.

<sup>4</sup>) Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 11, S. 308. 1908.

<sup>5</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 21, S. 484. 1909.

<sup>6</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 61, S. 499. 1909.

<sup>7</sup>) Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 178, S. 266. 1875.

<sup>8</sup>) Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 5, S. 380. 1904.

<sup>9</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 94, S. 271. 1915.

<sup>10</sup>) Zentralbl. f. Physiol. Bd. 24, S. 587. 1911.

<sup>11</sup>) Chem. Zentralbl. 1916, I. S. 144.

<sup>12</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 36, 2, S. 1506. 1903.

<sup>13</sup>) Biochem. Journ. Bd. 16, S. 702. 1922.

<sup>14</sup>) Monatshefte f. Chem. Bd. 29, S. 457. 1908.

<sup>15</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 101, S. 5. 1918.

<sup>16</sup>) Zeitschr. f. Fermentf. Bd. 2, S. 74. 1919.

<sup>17</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 98, S. 159. 1919.

<sup>18</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 65, S. 248. 1910.

Glycinchlorhydrat scheidet sich beim Abdampfen einer wässrigen Glykokoll-Verbindungen: lösung mit überschüssiger Salzsäure krystallinisch ab, in Wasser sehr leichtlöslich, mit Salzsäure in Alkohol wenig.

Glycinpikrat  $(C_2H_5NO_2)_2 \cdot C_6H_3N_3O_7$ , Zsp.  $202^\circ$ . Zur Trennung von Alanin mit Pikrinsäure geeignet, das beim Versetzen einer heißen wässrigen Lösung mit einer für beide Aminosäuren unzureichenden Menge Pikrinsäure beim Erkalten auf  $0^\circ$  in Lösung bleibt, während Glycinpikrat auskrystallisiert (Levene und v. Slyke<sup>1</sup>).

Glycinpikrolonat  $(C_2H_5NO_2) \cdot C_{10}H_8N_4O_5$ , Zsp.  $214^\circ$ .  $0,99\%$  in Wasser löslich mit Pikrolonsäure (Levene und v. Slyke<sup>2</sup>) oder auch unter Umständen  $(C_2H_5NO_2)_2 \cdot C_{10}H_8N_4O_5$  (Abderhalden und Weil<sup>3</sup>).

Pikrylglycin  $(NO_2)_3C_6H_2-NH-CH_2COOH$ , Fp.  $161^\circ$ , in Wasser zu  $0,116$ , mit Pikryl in Alkohol zu  $3,64\%$  löslich, leichtlöslich in Äther und in Natronlauge (Hirayama<sup>4</sup>).

Phosphorwolframat  $(C_2H_5NO_2)_3 \cdot H_3PO_4 \cdot 12 WO_3$  (S. 221) löst sich in Wasser mit Phosphorwolframsäure zu  $4,5\%$ , in absolutem Alkohol zu  $14,4\%$  (Barber<sup>5</sup>).

Glycinkupfer  $(C_2H_4NO_2)_2Cu + H_2O$  (S. 220), dunkelblaue Nadeln, löslich mit Kupfer in  $173,8$  Tl. Wasser bei  $15^\circ$ , unlöslich in Alkohol.

Glycinsilber (S. 221) schwer löslich. mit Silber

Glycinäthylester (S. 221) sehr unbeständiges, flüchtiges Öl, welches bei mit Alkohol  $10$  mm bei  $51,5-52,5^\circ$  destilliert und durch mehrstündiges Kochen mit Wasser am Rückflußkühler gespalten wird. Das Pikrat, aus warmem Wasser in quadratischen Prismen krystallisierend, schmilzt bei  $154^\circ$  ohne Zersetzung. Das Hydrochlorat scheidet sich beim Stehen seiner salzsauren alkoholischen Lösung im Eisschrank fast quantitativ ab (E. Fischer<sup>6</sup>), aus heißem absoluten Alkohol umkrystallisiert schmilzt es bei  $144^\circ$ . Um aus ihm Glycin zu gewinnen, kocht man mit Wasser und  $2$  Mol. Thalliumcarbonat  $10$  Minuten, dekantiert nach dem Erkalten, behandelt mit Schwefelwasserstoff, filtriert und dampft ein. Alkohol fällt aus dem Syrup reines Glycin (Freudenberg und Uthemann<sup>7</sup>).

Benzoylglycin (Hippursäure) (S. 222). Es wurde zuerst von Baum<sup>8</sup> durch mit Benzoesäure Schütteln mit Benzoylchlorid und Natronlauge erhalten.

$\beta$ -Naphthalinsulfoglycin (S. 222) krystallisiert aus heißem Wasser in feinen mit  $\beta$ -Naphthalinsulfosäure manchmal zugespitzten Blättern, die meist büschelförmig vereinigt sind. Es sintert bei  $151^\circ$ , schmilzt bei  $156^\circ$ , löst sich in  $2670$  Tl. Wasser von  $20^\circ$ , etwa  $90$  Tl. kochendem Wasser, leicht in absolutem Alkohol. Krystallform s. bei Kionka<sup>9</sup>). Das Bariumsalz ist in kaltem Wasser beträchtlich schwerer löslich als die Bariumsalze der Naphthalinsulfoverbindungen der meisten anderen Aminosäuren (Abderhalden und Bergell).

Nitrotoluolsulfoglycin (S. 222) krystallisiert aus heißem Wasser in langen mit Nitrotoluolsulfosäure Nadeln oder großen, dünnen Blättchen, Fp.  $177,5^\circ$ , schwer löslich in Wasser ( $1$  Tl. in  $742$  Tl. bei  $12^\circ$ ), löslich in Alkohol.

$2, 4$ -Dinitrophenylglycin (S. 222) goldgelbe Krystalle, in kaltem Wasser wenig mit Dinitrophenyl löslich, gut in heißem, sehr leicht in Aceton, löslich in Äthyl-, Methylalkohol und Eisessig, Fp.  $205^\circ$ .

<sup>1</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 12, S. 285. 1912.

<sup>2</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 12, S. 127. 1912.

<sup>3</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 78, S. 150. 1912.

<sup>4</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 59, S. 290. 1909.

<sup>5</sup>) Monatshefte f. Chem. Bd. 27, S. 379. 1906. — Levene u. Beatty: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 47, S. 149. 1906.

<sup>6</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 35, S. 227. 1902.

<sup>7</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 52, 2, S. 1509. 1919.

<sup>8</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 9, S. 465. 1885.

<sup>9</sup>) Zeitschr. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 5, S. 131. 1908.

- mit Phenylisocyanat Phenylisocyanatglycin (S. 223) lange, farblose Spieße, Fp. 195°. In kaltem Wasser sehr schwer löslich, in ca. 70 Tl. kochendem löslich.
- mit  $\alpha$ -Naphthylisocyanat  $\alpha$ -Naphthylisocyanatglycin (S. 223) krystallisiert aus verdünntem Alkohol in feinen Nadelchen, Fp. 190,5—191,5°, löst sich außer in Alkalien auch in Ammoniak und fällt aus der ammoniakalischen Lösung auf Zusatz von Bariumchlorid oder Barytwasser quantitativ als Bariumsalz in Nadeln aus (Trennung von den entsprechenden Verbindungen der anderen Aminosäuren, die ein viel leichter lösliches Bariumsalz geben).
- mit Harnstoff Uraminoessigsäure (S. 223) löst sich in Wasser 1 : 32, schäumt in geschlossenem Capillarrohr bei raschem Erhitzen bei 163°.
- mit Phenylsenföl 1 Phenyl-2-Thiohydantoin (S. 223) in kaltem Wasser unlöslich, aus Eisessig umzukrystallisieren, Fp. 240—242°.
- mit Kohlensäure. Glycincarbonsaures Calcium und Barium (S. 224). In Form der Bariumsalze ihrer Carbonsäuren läßt sich Alanin und Glycin trennen.
- Umwandlungen und Zersetzungen. Mit konzentrierter Salzsäure und Natriumnitrit liefert es Monochloressigsäure (Jochem<sup>1</sup>). Gegen Kochen mit verdünnten Säuren und Alkalien ist es widerstandsfähig. Beim Erhitzen mit Phosphorsäure auf 150° bleibt es unverändert, beim Erhitzen mit einer alkalischen Chlorbariumlösung auf 150° entstehen nur Spuren von Kohlensäure (Schöndorff). In der Hitze, besonders beim Erhitzen mit Ätzbaryt, zerfällt Glykokoll in Methylamin und Kohlensäure. Dieselbe Zersetzung scheint es auch durch Mikroorganismen erleiden zu können und nach Fränkel und Jellinek<sup>2</sup>) auch durch langdauernde Trypsinverdauung. Durch salpetrige Säure wird es in Glykolsäure, Stickstoff und Wasser zerlegt. Durch Wasserstoffsperoxyd bei Gegenwart von Ferrosulfat entstehen Kohlensäure, Ammoniak, Formaldehyd, Ameisensäure, Glyoxylsäure (Dakin<sup>3</sup>), durch Kaliumpermanganat in alkalischer Lösung Kohlensäure, Ammoniak, Oxalsäure, Salpetersäure (Denis<sup>4</sup>).
- Nachweis. Dem Nachweis muß die Isolierung vorangehen. Für diese benutzt man die Löslichkeit in Wasser, Unlöslichkeit in Alkohol und Äther, die Kupferverbindung, vor allem aber die Krystallisation des salzsauren Äthylesters (s. oben). In dieser Weise läßt sich das Glykokoll am besten von den anderen Aminosäuren trennen. Weiteres über diese Trennung s. § 477 a, § 479, § 482. Auch die Umwandlung in Hippursäure ist in manchen Fällen mit Erfolg für die Isolierung benutzt worden<sup>5</sup>). Man schüttelt mit Benzoylchlorid und Natronlauge, säuert an, schüttelt mit Essigäther aus und nimmt den Essigätherrückstand mit 5% Benzol enthaltendem Chloroform auf. Aus dieser Lösung fällt die Hippursäure aus. Zum Nachweis sehr geringer Mengen empfiehlt Spiro<sup>6</sup>) den Essigätherrückstand mit Hilfe der Lactimidprobe auf Hippursäure zu prüfen. Zur Identifizierung des isolierten Glykokolls dienen die oben aufgeführten Eigenschaften, der süße Geschmack usw., besonders auch das Verhalten des Äthylesters, des salzsauren und pikrinsauren Äthylesters sowie der Phenylisocyanatverbindung. Ferner folgende Reaktion: Befeuchtet man einige Milligramm auf stark holzschliffhaltigem Papier mit 1 Tropfen Formalin, so tritt innerhalb 1 Minute eine merkbare, nach 3—4 Minuten sehr deutliche Grüngelbfärbung an der durchnäßten Stelle auf (Krause<sup>7</sup>).

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 31, S. 119. 1900/01.

<sup>2</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 130, S. 592. 1922.

<sup>3</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 1, S. 171. 1906. S. auch Efront: Chem. Zentralbl. 1912, I, S. 2036.

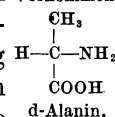
<sup>4</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 9, S. 365. 1911.

<sup>5</sup>) Ch. Fischer: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 19, S. 164. 1894. — Gonnermann: Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 59, S. 42. 1895.

<sup>6</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 28, S. 174. 1899.

<sup>7</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 51, 2, S. 1556. 1918.

168. Alanin ( $\alpha$ -Aminopropionsäure)  $C_3H_7NO_2$ . Von den 3 Modifikationen Vorkommen. ist das d-Alanin unter den hydrolytischen Spaltungsprodukten vieler Protein-  
 stoffe aufgefunden worden, am reichlichsten (21%) entsteht es bei der Spaltung  
 des Fibroins (E. Fischer und Skita<sup>1</sup>). Aus Seide wurde es auch zuerst von  
 Weyl<sup>2</sup>) erhalten. Es findet sich normalerweise im Blut (Abderhalden<sup>3</sup>), wurde  
 aus menschlichem Harn nach Phosphorvergiftung isoliert (Wohlgemuth<sup>4</sup>) und  
 im Fleischextrakt nachgewiesen (Micko<sup>5</sup>) sowie in Fischen (Suzuki und  
 Joshimura<sup>6</sup>) und in Krabben (Suzuki<sup>7</sup>).



Synthetisch gewinnt man d,l-Alanin aus Salmiak, Acetaldehyd und Kaliumcyanid und Kochen Darstellung.  
 mit Salzsäure (Zelinsky und Stadnikoff<sup>8</sup>), oder aus methylmalonhydrazidsaurem Kalium  
 (Curtius und Sieber<sup>9</sup>).

Die Benzoylverbindung des d,l-Alanin läßt sich mit Hilfe von Brucin  
 und Strychnin in l- und d-Benzoylalanin zerlegen, aus denen durch Kochen mit  
 Salzsäure l- und d-Alanin gewonnen werden können (E. Fischer<sup>10</sup>). d-Alanin  
 wird auch erhalten durch Einwirkung von Hefe auf eine Lösung von Zucker  
 und d,l-Alanin (F. Ehrlich<sup>11</sup>). Durch Erhitzen auf 180° mit überschüssigem  
 Barytwasser wird aktives Alanin völlig racemisiert (E. Fischer<sup>12</sup>). E. Fischer  
 und Raske<sup>13</sup>) führten l-Serin in d-Alanin über.

Zur Darstellung von d-Alanin benutzt man am besten die Abfälle der  
 Mailänder Grège, welche 10% Ausbeute geben (E. Fischer<sup>14</sup>).

Über die Isolierung von d-Alanin aus der hydrolytischen Zersetzungsflüssig-  
 keit der Proteine s. § 475ff.

Die Alanine schmecken süß, lösen sich sehr leicht in heißem Wasser und Eigenschaften.  
 krystallisieren bei genügender Konzentration in der Kälte. Über Krystallform  
 des d-Alanin s. E. Fischer<sup>14</sup>). d,l-Alanin löst sich in 4,6 Tl. Wasser bei 17°  
 und ist in Alkohol schwer löslich. Durch Aceton wird es aus 8proz. Lösungen  
 sofort oder nach mehreren Tagen gefällt (Weyl<sup>15</sup>). Über die Löslichkeit in  
 Acetonwasser s. Levene und v. Slyke<sup>16</sup>). Über Titration s. S. 218. Durch  
 Kohle wird es wenig adsorbiert (Abderhalden und Fodor<sup>17</sup>). Rasch erhitzt,  
 zersetzt es sich bei 293°, d- und l-Alanin zersetzen sich bei 297°. Ninhydrin-  
 reaktion S. 219. Reaktion nach v. Slyke S. 224.

Über das Verhalten zu Neutralsalzen s. S. 220.

d,l-Alaninkupfer  $(C_3H_6NO_2)_2Cu + H_2O$  oder  $+ 3 H_2O$ , dunkelblaue Nadeln Verbindungen:  
 (S. 220), ist in Wasser viel leichter löslich (etwa 7%) als d,l- $\alpha$ -aminobutter-  
 saures Kupfer, welches in Wasser schwer löslich, in Methylalkohol, auch heißem,  
 unlöslich ist (Meisenheimer<sup>18</sup>). d-Alaninkupfer  $(C_3H_6NO_2)_2Cu$  ohne Krystall-  
 mit Kupfer

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 33, S. 177. 1901.

<sup>2</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 21, S. 1529. 1888.

<sup>3</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 88, S. 478. 1913.

<sup>4</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 44, S. 80. 1905. Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 39, S. 462. 1906.

<sup>5</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 56, S. 180. 1908. <sup>6</sup>) desgl. Bd. 62, S. 1. 1909.

<sup>7</sup>) Chem. Zentralbl. 1913, I, S. 1042.

<sup>8</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 41, 2, S. 2061. 1908. <sup>9</sup>) desgl. Bd. 54, 1, S. 1430. 1921.

<sup>10</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 32, S. 2451. 1899. — Pope u. Gibson: Journ. of the chem. soc. (London) Bd. 101, S. 939. 1912.

<sup>11</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 1, S. 8. 1906.

<sup>12</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 36, S. 468. 1903.

<sup>13</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 40, 3, S. 3717. 1907 u. Bd. 41, 1, S. 893. 1908

<sup>14</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 39, S. 462. 1906.

<sup>15</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 65, S. 248. 1910.

<sup>16</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 16, S. 116. 1913/14.

<sup>17</sup>) Zeitschr. f. Fermentf. Bd. 2, S. 74. 1919.

<sup>18</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 104, S. 275. 1919.

- wasser, tiefblaue Nadeln oder rhombische Prismen, in Wasser ziemlich leicht löslich, in Alkohol fast unlöslich, in Methylalkohol löslich.
- mit Silber Alaninsilber (S. 221), leicht löslich in Wasser.
- mit Phosphorwolframsäure d-Alaninphosphorwolframat ( $C_3H_7NO_2$ )<sub>3</sub> · H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> · 12 WO<sub>3</sub> (S. 221) löst sich in Wasser zu 15,7%, in absolutem Alkohol zu 19,4% (Barber<sup>1</sup>).
- mit Pikrolonsäure Alaninpikrolonat (S. 221) C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub> · C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub> u. (C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub>)<sub>2</sub> · C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>.
- mit Alkohol d,l-Alaninäthylester (S. 221) unter 11 mm Druck bei 48° siedend. Sein Pikrat (feine gelbe, in warmem Wasser ziemlich leicht lösliche Nadeln) schmilzt bei 168°. Der Ester wird bei mehrstündigem Kochen mit der 10fachen Menge Wasser am Rückflußkühler quantitativ gespalten. Die Ester der aktiven Alanine haben den gleichen Siedepunkt (E. Fischer<sup>2</sup>).
- mit Benzoesäure d,l-Benzoylalanin (S. 222) schmilzt bei 162—163°, l- und d-Benzoylalanin bei 147—148°.
- mit Naphthalinsulfosäure d,l-β-Naphthalinsulfalanin (S. 222), Öl, bald in feinen meist zu eigentümlichen Aggregaten verwachsenen Nadeln, die mikroskopisch Papierfasern gleichen, krystallisierend. Fp. 150—151°. Löslichkeit ähnlich wie bei der Glycinverbindung. Krystallform s. Kionka, a. a. O. d-β-Naphthalinsulfalanin, Öl, langsam krystallisierend in feinen meist büschelförmig verwachsenen Nadelchen mit Krystallwasser. Die krystallwasserfreie Verbindung sintert von 117° ab und schmilzt bei 122—123°. Analyse gibt keine scharfen Zahlen.
- mit Toluolsulfosäure p-Toluolsulfo-d-Alanin (S. 222), Fp. 134—135° (korr.),  $[\alpha]_D^{20} = -7,26^\circ$  (alkoholische Lösung).
- mit Nitrotoluolsulfosäure d,l-Nitrotoluolsulfalanin (S. 222), lange wollige Nadeln, Fp. 96°, löslich in Wasser bei 12° 1 : 690, löslich in Alkohol.
- mit Harnstoff d,l-Uraminopropionsäure (S. 223), löslich in Wasser bei 20° 1 : 46, schmilzt im geschlossenen Capillarrohr, rasch erhitzt, bei 157°.
- mit Phenylisocyanat d,l-Phenylisocyanatalanin (S. 223), Fp. 169°, etwas leichter löslich als die entsprechende Glycinverbindung.
- mit α-Naphthylisocyanat d,l-α-Naphthylisocyanatalanin (S. 223), kleine Nadeln, Fp. 198°. l-α-Naphthylisocyanatalanin, Fp. 202° unter Aufschäumen.
- mit Kohlensäure. Alanincarbonsaures Calcium (S. 224).
- Betain. d,l-Alaninbetain (S. 224) (Ackermann u. Kutscher<sup>3</sup>).
- Optische Eigenschaften. d-Alanin in 10proz. wässriger Lösung  $[\alpha]_D^{22} = +2,7^\circ$  (E. Fischer und Raske<sup>4</sup>), salzsaures d-Alanin in ungefähr 10proz. wässriger Lösung im Mittel  $[\alpha]_D^{20} = +10,3^\circ$ . Dieser Wert wird aber nur erhalten, wenn die freie Säure aus Wasser sehr sorgfältig umkrystallisiert ist. Die bei der hydrolytischen Spaltung der Proteinstoffe erhaltenen Präparate zeigen in der Regel um 1—2° niedrigere Werte, da durch das Kochen mit Säure stets eine teilweise Racemisierung stattfindet (E. Fischer<sup>5</sup>).
- Umwandlungen und Zersetzungen. Beim Erhitzen mit Phosphorsäure und mit alkalischer Chlorbariumlösung verhält sich Alanin wie Glykokoll (S. 228). Salpetrige Säure wandelt d-Alanin in d-Milchsäure um (E. Fischer und Skita). Durch Wasserstoffsuperoxyd bei Gegenwart von etwas Ferrosulfat entstehen Kohlensäure, Ammoniak, Acetaldehyd und Essigsäure (Dakin<sup>6</sup>). Durch Oxydation mit Kaliumpermanganat in alkalischer Lösung Ammoniak, Kohlensäure, Oxalsäure, Essigsäure und Salpetersäure (Denis<sup>7</sup>).

<sup>1</sup>) Monatshefte f. Chem. Bd. 27, S. 379. 1906. — Levene u. Beatty: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 47, S. 149. 1906. Levene und v. Slyke: Journ. of biol. chem. Bd. 16, S. 103. 1913/14.

<sup>2</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 34, S. 443. 1901.

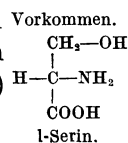
<sup>3</sup>) Zeitschr. f. Biol. Bd. 72, S. 177. 1920.

<sup>4</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 40, 3, S. 3721. 1907. <sup>5</sup>) desgl. Bd. 39, 1, S. 464. 1906.

<sup>6</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 1, S. 171. 1906. <sup>7</sup>) desgl. Bd. 10, S. 73. 1911/12.

Dem Nachweis muß die Isolierung vorausgehen. Über die Trennung von anderen Aminosäuren s. § 479. Die Trennung von der Aminobuttersäure kann in Form der Kupfersalze der inaktiven Säuren geschehen (s. oben). Für die Identifizierung dient die Analyse der freien Säure, des Kupfersalzes oder der Benzoylverbindung.

169. Serin ( $\alpha$ -Amino- $\beta$ -oxypropionsäure)  $C_3H_7NO_3$  ist zuerst unter den Spaltungsprodukten des Seidenleims von Cramer<sup>1)</sup>, dann auch in vielen anderen Proteinen nachgewiesen worden. Es findet sich auch im Gehirn (Shimizu<sup>2)</sup> und im menschlichen Schweiß (Embden und Tachau<sup>3)</sup>.



Synthetisch wurde es von E. Fischer und Leuchs<sup>4)</sup> durch Einwirkung von Ammoniak und Blausäure auf Glykolaldehyd dargestellt. Eine andere Synthese ist von Erlenmeyer<sup>5)</sup> angegeben. Für die präparative Bereitung eignet sich am besten ein Verfahren, welches vom käuflichen Chloracetal ausgeht (Leuchs und Geiger<sup>6)</sup>.)

Darstellung.

Das synthetische Serin ist das inaktive. Aus den Proteinen erhielt man ebenfalls das inaktive. Daß aber in den Proteinen ursprünglich l-Serin vorhanden ist, welches erst bei der Hydrolyse und Isolierung racemisiert wird, ergibt sich daraus, daß E. Fischer<sup>7)</sup> aus den Spaltungsprodukten der Seide bei der Trennung mittels der Ester neben inaktivem l-Serinanhydrid isolieren konnte, welches nur aus dem Ester des l-Serins entstanden sein kann. Aus der p-Nitrobenzoylverbindung des d,l-Serins lassen sich mittels der Chinin- und Brucin-salze die aktiven Formen rein gewinnen, worauf die Abspaltung der Nitrobenzoylgruppe durch Hydrolyse mit Bromwasserstoff bewirkt wird (E. Fischer und Jacobs<sup>8)</sup>). Hefe vergärt bei Gegenwart von Zucker das d,l-Serin partiell und läßt d-Serin zurück (Ehrlich<sup>9)</sup>).

Über die Darstellung von Serin aus der hydrolytischen Zersetzungsflüssigkeit der Proteine § 475 ff.

Das d,l-Serin krystallisiert aus Wasser in sehr dünnen, unregelmäßig gestalteten Blättchen, die bei raschem Erhitzen gegen 245° unter Gasentwicklung schmelzen. Es löst sich in Wasser von 20° im Verhältnis 1 : 23,13, leichter in heißem, nicht in Alkohol oder Äther, schmeckt süß. d-Serin krystallisiert in mikroskopischen Nadeln oder Prismen, in Wasser viel leichter löslich als der Racemkörper. Beim raschen Erhitzen zersetzt es sich unter Gasentwicklung gegen 223°. Es schmeckt süßer als d,l-Serin. l-Serin verhält sich ebenso, schmeckt aber weniger süß. Ninhydrinreaktion S. 219.

Eigenschaften.

d,l-Serin verbindet sich leicht mit Kupferoxyd oder Silberoxyd und gibt mit Säure schwierig krystallisierende, sauer reagierende Salze.

Verbindungen:  
mit Kupfer und  
mit Silber

d,l-Serinmethylester geht leicht in Serinanhydrid über (E. Fischer und Suzuki<sup>10)</sup>), ebenso der l-Serinmethylester in das l-Serinanhydrid, dünne, farblose Nadeln, beim raschen Erhitzen bei 247° (korr.) unter Zersetzung schmelzend und viel löslicher in Wasser als das Anhydrid des d,l-Serin (Fischer und Jacobs).

mit Methylalkohol

d,l-Serinäthylester (S. 221), in Wasser leicht löslich, in Petroläther unlöslich.

mit Äthylalkohol

d,l-Monobenzoylserin (S. 222), Fp. 171°, in kaltem Wasser schwer, in warmem ziemlich leicht löslich, in Alkohol, Aceton, Essigäther leicht, in Äther, Chloroform, Benzol schwer oder unlöslich.

mit Benzoesäure

<sup>1)</sup> Journ. f. prakt. Chem. Bd. 96, S. 76. 1865.

<sup>2)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 117, S. 252. 1921.    <sup>3)</sup> desgl. Bd. 28, S. 230. 1910.

<sup>4)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 35, 3, S. 3787. 1902.

<sup>5)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 35, 3, S. 3769. 1902. Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 337, S. 236. 1905.

<sup>6)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 39, 3, S. 2644. 1906.    <sup>7)</sup> desgl. Bd. 40, 2, S. 1501. 1907.

<sup>8)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 39, 3, S. 2942. 1906.

<sup>9)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 8, S. 438. 1908.

<sup>10)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 38, 4, S. 4173. 1905.

d,l-Dibenzoylserin, Fp. 124°, in kaltem Wasser unlöslich, in kochendem schwer löslich, in Alkohol, Aceton, Essigäther, Chloroform leicht, in Äther schwer löslich (Sörensen und Andresen<sup>1</sup>).

mit  $\beta$ -Naphthalin-  
sulfosäure d,l- $\beta$ -Naphthalinsulfoserin (S. 222) fällt aus der alkalischen Lösung durch Salzsäure als weiße, amorphe Masse, löslich in 70—80 Tl. kochendem Wasser; aus heißem Alkohol in winzigen Nadelchen vom Fp. 210° krystallisierend. Die geringe Löslichkeit in kaltem Alkohol unterscheidet es von den entsprechenden Derivaten anderer Aminosäuren.

mit Nitrobenzoe-  
säure p-Nitrobenzoyl-d,l-serin, hellgelbe Nadeln, Schmelzpunkt bei raschem Erhitzen bei 206—207° (korr.) unter Gasentwicklung, in 300—400 Tl. kaltem Wasser löslich, reichlicher in heißem, in kaltem Alkohol und Eisessig ziemlich schwer löslich, in Äther und Petroläther fast unlöslich. p-Nitrobenzoyl-d- und l-serin schwach gelbe, glänzende Plättchen, Schmelzpunkt bei raschem Erhitzen bei 189,5° (korr.) unter Zersetzung, in den meisten Lösungsmitteln leichter löslich als der Racemkörper; in wässrig-alkalischer Lösung  $[\alpha]_D^{20} = +$  bzw.  $- 43,74^\circ$  (Fischer und Jacobs).

mit Phenylisocyanat d,l-Phenylisocyanatserin (S. 223), feine Nadeln vom Fp. 165—168°, leicht löslich in Alkohol, auch erheblich in Wasser (E. Fischer und Leuchs).

mit  $\alpha$ -Naphthyliso-  
cyanat. d,l- $\alpha$ -Naphthylisocyanatserin (S. 223), Nadeln vom Fp. 192° (Neuberg und Rosenberg<sup>2</sup>).

Betain. d,l-Serinbetain (S. 224) (Ackermann u. Kutscher<sup>3</sup>).

Optische Eigen-  
schaften. d-Serin (in 10 proz. wässriger Lösung)  $[\alpha]_D^{20} = + 6,87^\circ$ , in 10 proz. Lösung in n-Salzsäure  $[\alpha]_D^{20} = - 14,32^\circ$ . Das l-Serin zeigte dasselbe Drehungsvermögen im umgekehrten Sinne (E. Fischer und Jacobs).

Oxydationen und  
Reduktionen.  
Umwandlungen. d,l-Serin geht durch salpetrige Säure in Glycerinsäure und durch Reduktion mit Jodwasserstoff in Alanin über (E. Fischer und Leuchs). Aus d-Serin entsteht durch salpetrige Säure l-Glycerinsäure (E. Fischer und Jacobs) und Acetaldehyd (Neuberg und Rewald<sup>4</sup>). Über eine andere Art der Umwandlung des d,l-Serin in Alanin, welche auch zur Überführung von l-Serin in d-Alanin geeignet ist, s. E. Fischer und Raske<sup>5</sup>). Über die Umwandlung des Serin in Cystin s. E. Fischer und Raske<sup>6</sup>). Durch Wasserstoffsperoxyd + Ferrosulfat sowie durch Elektrolyse entstehen Ammoniak und Glykolaldehyd (Neuberg<sup>7</sup>), durch 60 proz. Salpetersäure Oxalsäure (C. Th. Mörner<sup>8</sup>), durch Fäulnisbakterien Propionsäure und Ameisensäure (Brasch<sup>9</sup>), durch Fäulnis bei Luftabschluß Aminoäthylalkohol (Nord<sup>10</sup>).

Nachweis. Dem Nachweis muß die Isolierung (§ 479, § 481) vorangehen. Zur Identifizierung dient die Analyse und der Schmelzpunkt sowie die Darstellung der  $\beta$ -Naphthalinsulfo- und p-Nitrobenzoylverbindungen.

Vorkommen. 170. **Aminobuttersäure**  $C_4H_9NO_2$ . Eine rechtsdrehende Säure dieser Zusammensetzung ist aus einer ganzen Reihe von Proteinen erhalten worden (Foreman<sup>11</sup>), Abderhalden<sup>12</sup>), Meisenheimer<sup>13</sup>), und es ist wohl nicht zu bezweifeln, daß es sich um  $\alpha$ -Aminosäure handelt. Die Angabe von Foreman, daß es  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure ist, ist nicht bewiesen, wenn auch die Anwesenheit

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 56, S. 297. 1908. <sup>2</sup>) desgl. Bd. 5, S. 456. 1907.

<sup>3</sup>) Zeitschr. f. Biol. Bd. 72, S. 177. 1920.

<sup>4</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 67, S. 127. 1914.

<sup>5</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 40, 3, S. 3717. 1907. <sup>6</sup>) desgl. Bd. 41, 1, S. 893. 1908.

<sup>7</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 20, S. 531. 1909 u. Bd. 24, S. 152. 1910.

<sup>8</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 95, S. 263. 1915.

<sup>9</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 22, S. 403. 1909. <sup>10</sup>) desgl. Bd. 95, S. 281. 1919.

<sup>11</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 56, S. 1. 1913.

<sup>12</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 88, S. 275. 1913.

<sup>13</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 104, S. 272. 1919.



dieser Säure im Eiweiß dadurch wahrscheinlich gemacht wird, daß durch Salpetersäure aus ihm  $\alpha$ -Oxyisobuttersäure entsteht (C. Th. Mörner<sup>1</sup>).

Synthetisch gewinnt man d,l- $\alpha$ -Aminobuttersäure aus  $\alpha$ -Brombuttersäure (E. Fischer und Mouneyrat<sup>2</sup>), durch Einwirkung von Kaliumcyanid und Ammoniumchlorid auf Propionaldehyd und Verseifung des Reaktionsproduktes (Zelinsky und Stadnikoff<sup>3</sup>), aus dem Kaliumsalz der Äthylmalonhydrazidsäure (Curtius und Sieber<sup>4</sup>).

Aus der d,l-Säure erhält man die aktiven Säuren über die Benzoylverbindungen mit Hilfe von Morphin und Brucin und nachheriger Spaltung mit Salzsäure (E. Fischer und Mouneyrat), oder über die Formylverbindungen mit Hilfe der Brucinsalze und nachfolgender Verseifung (Abderhalden<sup>5</sup>).

d,l-Säure, Blättchen, süßschmeckend, in kaltem Wasser löslich, wenig in heißem Alkohol, schmilzt in geschlossener Capillare rasch erhitzt gegen 307° (korr.) unter Zersetzung, d- und l-Säure, in Wasser leicht löslich, schmelzen unter denselben Bedingungen gegen 303° (korr.). Ninhydrinreaktion S. 219. Mit Eisenchlorid färbt sich die wässrige Lösung dunkelbraunrot.

d,l-Benzoylverbindung (S. 222), Fp. 145—146° (korr.), d- und l-Benzoylverbindung, Fp. 120—121° (korr.), d,l-Formylverbindung, Fp. gegen 153°, d- und l-Formylverbindung zersetzen sich im geschlossenen Capillarrohr bei 126° (korr.).

Kupfersalz (S. 220) der d,l-Säure hellblaue Nadeln ohne Krystallwasser, in Wasser schwer löslich, in Methylalkohol, auch heißem, unlöslich, fällt aus wässriger Lösung der Säure durch Kupferacetat. Die Kupfersalze der aktiven Säuren ebenfalls schwer löslich.

1-Phenyl-4-Äthyl-2-Thiohydantoin aus der d,l-Säure (S. 223), schwer löslich in kochendem Wasser, Fp. 190—192°.

$\alpha$ -Aminobuttersäurecarbonsaures Barium (S. 224).

$[\alpha]_D^{20} = +8,0^\circ$  bzw.  $-7,92^\circ$ , 5—6proz. wässrige Lösung (E. Fischer und Mouneyrat). Naheliegende Werte fanden Abderhalden, Chang und Wurm.

Beim Kochen mit konzentrierter Salzsäure wird etwas Ammoniak abgespalten, aber nur wenig (Abderhalden und Wurm).

171. Valin ( $\alpha$ -Aminoisovaleriansäure)  $C_5H_{11}NO_2$ . d-Valin, zuerst von Gorup-Besanez<sup>6</sup>) aus der Pankreasdrüse, dann von E. Schulze und Barbieri<sup>7</sup>) aus verschiedenen Keimlingen isoliert, wurde bei der Hydrolyse des Caseins (E. Fischer<sup>8</sup>) und Hornes (E. Fischer und Dörpinghaus<sup>9</sup>) erhalten. Es tritt bei der Säurehydrolyse vieler pflanzlicher und tierischer Eiweißstoffe, besonders Fischbein (Abderhalden und Landau<sup>10</sup>) auf. Auch bei der Autolyse von Leber und Pankreas (Levene<sup>11</sup>) und Hefe (Ehrlich und Wendel<sup>12</sup>), Meisenheimer<sup>13</sup>), aus Leukocyten der Thymus (Lilienfeld<sup>14</sup>), Käse (Winterstein<sup>15</sup>) ist es erhalten. Es findet sich normalerweise im Blut (Abderhalden<sup>16</sup>).

Verbindungen:  
mit Benzoesäure  
mit Ameisensäure

mit Kupfer

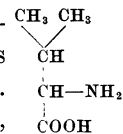
mit Phenylsenföl

mit Kohlensäure.

Optische Eigenschaften.

Umwandlungen.

Vorkommen.



<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 98, S. 89. 1916/17.

<sup>2</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 33, 2, S. 2383. 1900. <sup>3</sup>) desgl. Bd. 41, 2, S. 2061. 1908.

<sup>4</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 55, 1, S. 1543. 1922.

<sup>5</sup>) Abderhalden, Lang Chang u. Wurm: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 72, S. 24. 1911. — Abderhalden u. Wurm: desgl. Bd. 82, S. 167. 1912.

<sup>6</sup>) Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 98, S. 1. 1856.

<sup>7</sup>) Journ. f. prakt. Chem., N. F. Bd. 27, S. 337. 1883. — E. Schulze: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 24, S. 49. 1898. — E. Schulze u. Winterstein: desgl. Bd. 35, S. 300. 1902. — E. Schulze u. Castoro: desgl. Bd. 38, S. 230. 1903.

<sup>8</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 33, S. 159 u. 165. 1901.

<sup>9</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 36, S. 470. 1902. <sup>10</sup>) desgl. Bd. 71, S. 455. 1911.

<sup>11</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 41, S. 395 u. 399. 1904.

<sup>12</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 8, S. 399. 1908.

<sup>13</sup>) Chem. Zentralbl. 1915, II, S. 1259.

<sup>14</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 18, S. 476. 1894.

<sup>15</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 41, S. 500. 1904. <sup>16</sup>) desgl. Bd. 88, S. 478. 1913.

Bei protrahierter tryptischer Verdauung des Casein entsteht neben d-Valin auch d,l-Valin (Fränkel und Gallia<sup>1</sup>).

**Darstellung.** Synthetisch wird d,l-Valin nach Clark und Fittig<sup>2</sup>) und nach Slimmer<sup>3</sup>) aus der  $\alpha$ -Bromisovaleriansäure erhalten.

Die aktiven Valine lassen sich aus der Formylverbindung des synthetischen Valins (welche man durch Erhitzen mit wasserfreier Ameisensäure bei 100° darstellt) mit Hilfe der Brucinsalze und nachträglicher Abspaltung der Formylgruppe mittels Bromwasserstoffsäure erhalten (E. Fischer<sup>4</sup>). l-Valin entsteht auch bei der Einwirkung von Hefe auf eine wässrige Lösung der d,l-Säure und Zucker (Ehrlich<sup>5</sup>). Auch Fäulnisbakterien greifen Valin asymmetrisch an, so daß etwas l-Valin entsteht (Neuberg und Karczag<sup>6</sup>).

Für die Darstellung des d-Valin empfiehlt sich besonders Fischbein (Abderhalden und Landau), indessen ist der Weg über die synthetische Säure vorläufig besser als die Isolierung aus der Zersetzungslüssigkeit der Proteine. Für die Gewinnung eignen sich auch 2—3wöchige etiolierte Keimpflanzen von *Lupinus luteus* (E. Schulze und Winterstein<sup>7</sup>).

Über die Isolierung des d-Valin aus den Zersetzungslüssigkeiten der Proteine s. § 475ff.

- Eigenschaften.** d,l-Valin, farblose Blättchen, dem Leucin gleich, von schwach süßem Geschmack, Fp. 298° (korr.), löslich in Wasser (1 : 14,1 bei 25°), fast unlöslich in kaltem Alkohol und Äther. Es sublimiert in Flocken, bei vorsichtigem Erhitzen ohne Zersetzung. d-Valin und l-Valin feine, silberglänzende, meist sechseckige Blättchen. Schmelzpunkt im geschlossenen Capillarrohr bei 306°. Starkes Sublimieren beim Erhitzen unter teilweiser Anhydridbildung. Löslichkeit in Wasser bei 25° 1 : 17,1. Über Löslichkeit von d-Valin in Acetonwasser s. Levene und v. Slyke<sup>8</sup>). d-Valin ganz schwach süß und etwas bitter, l-Valin ziemlich stark süß. Ninhydrinreaktion S. 219. Reaktion nach v. Slyke S. 224.
- Verbindungen:**  
**mit Kupfer** d,l-Valinkupfer (S. 220), in kaltem Wasser sehr wenig, auch in heißem schwer lösliche Schuppen, in konzentriertem Methylalkohol löst es sich bei 20° 1 : 3644, in Äthylalkohol bei 21° 1 : 9230 (Ehrlich und Wendel<sup>9</sup>). d-Valinkupfer (mit Krystallwasser) in Wasser viel leichter löslich als Leucinkupfer, in Methylalkohol ebenso leicht löslich wie Isoleucinkupfer 1 : 52 bei 18° (E. Schulze und Winterstein<sup>10</sup>).
- mit Pikrolonsäure** d,l- und d-Valinpikrolonat (S. 221).
- mit Pikryl** Pikryl-d-Valin  $(\text{NO}_2)_3\text{C}_6\text{H}_2 - \text{NH} - \text{C}_4\text{H}_8 \cdot \text{COOH}$ , Fp. 171°, zu 0,029% in Wasser löslich, leicht in Alkohol, Äther, Natronlauge (Hirayama<sup>11</sup>).
- mit Alkohol** d,l-Valinäthylester (S. 221) siedet bei 8 mm bei 63,5°, sehr unbeständig. Pikrat ist in kaltem Wasser schwer löslich und schmilzt bei 139,5°.
- mit Benzoesäure** d,l-Benzoylvalin (S. 222), in Äther und Alkohol ziemlich leicht, in Wasser, auch heißem, sehr schwer löslich, krystallisiert aus Äther auf Zusatz von Ligroin in schönen Blättchen vom Fp. 132,5° (korr.).
- mit Phenylisocyanat** d,l-Phenylisocyanatvalin (S. 223), farblose Blättchen, Fp. 163,5° (korr.) unter Zersetzung; in heißem Alkohol ziemlich leicht, in Äther recht schwer

<sup>1</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 134, S. 308. 1923.

<sup>2</sup>) Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 139, S. 200. 1866.

<sup>3</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 35, 1, S. 400. 1902. — Neuberg: Biochem. Zeitschr. Bd. 18, S. 435. S. 1909.

<sup>4</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 39, 2, S. 2320. 1906.

<sup>5</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 1, S. 8. 1906.

<sup>6</sup>) desgl. Bd. 18, S. 435. 1909.

<sup>7</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 35, S. 312. 1902.

<sup>8</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 16, S. 103. 1913/14.

<sup>9</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 8, S. 426. 1908.

<sup>10</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 45, S. 40. 1903. <sup>11</sup>) desgl. Bd. 59, S. 290. 1909.

löslich. Das Hydantoin schmilzt bei 124—125° (korr.) und ist in heißem Wasser recht schwer, in Alkohol und Äther leicht löslich. d-Phenylisocyanatvalin, kleine Prismen, beginnt bei raschem Erhitzen gegen 140° zu erweichen und schmilzt völlig bis 145° unter schwachem Aufschäumen. Das Hydantoin schmilzt bei 131—133° (korr.) und zeigt  $[\alpha]_D^{20} = -97,5^\circ$  (etwa 6proz. alkoholische Lösung).

2, 4-Dinitrophenyl-d,l-Valin (S. 221), goldgelbe Blättchen, Fp. 185°, auch mit Dinitrobenzol in heißem Wasser nur wenig löslich, löslich in Alkohol.

Uramino-d,l-Valin (S. 223), in Wasser 1 : 213 bei 20° löslich, schmilzt in mit Harnstoff geschlossenem Capillarrohr rasch erhitzt bei 176° unter Aufschäumen.

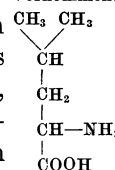
1-Phenyl-4-isopropyl-2-thiohydantoin (S. 223), in Alkohol schwerlöslich, mit Phenylsenfö. Fp. 206—208°.

Bei der Oxydation mit Wasserstoffsperoxyd bei Gegenwart von etwas Zersetzungen. Ferrosulfat entstehen Ammoniak, Kohlensäure, Isobutylaldehyd, Isobuttersäure, Aceton (Dakin<sup>1</sup>), bei der Fäulnis Valeriansäure (und zwar wahrscheinlich Isovaleriansäure) und Butylamin (Neuberg und Karczag<sup>2</sup>). Durch Hefe entsteht aus d,l-Valin, und zwar aus der d-Komponente, bei Gegenwart von Zucker Isobutylalkohol (Ehrlich).

d-Valin zeigt in etwa 3—5proz. Lösung  $[\alpha]_D^{20} = +6,42^\circ$ , in 3proz. Lösung in 20proz. Salzsäure  $[\alpha]_D^{20} = +28,8^\circ$ . Für l-Valin wurde in salzsaurer Lösung derselbe Wert im umgekehrten Sinne erhalten (E. Fischer). Für l-Valin (durch Gärung aus racemischem gewonnen) erhielt Ehrlich<sup>3</sup>) genau dieselben Werte. Optische Eigenschaften.

Dem Nachweis muß die Isolierung vorangehen. Wegen Trennung von anderen Aminosäuren s. § 479. Für die Identifizierung dient die Elementaranalyse und das Drehungsvermögen in salzsaurer Lösung, ferner die Darstellung des Phenylhydantoin. Nachweis.

172. Leucin ( $\alpha$ -Aminoisobutylessigsäure)  $C_6H_{13}NO_2$ . Es tritt bei der hydrolytischen Zersetzung der allermeisten Proteinstoffe auf. Es findet sich in kleinen Mengen im Blut (Abderhalden<sup>4</sup>), in vielen Organen (in der Leber besonders nach Phosphorvergiftung), oft im Eiter, in Atherombälgen, in Ichthyosisschuppen, ferner im Schmutz der Haut und in der Schafwolle (hier durch bakterielle Zersetzung entstanden). Weiter ist es nachgewiesen im Harn in bestimmten Fällen von Lebererweichung, bei Cystinurie (Abderhalden und Schittenhelm<sup>5</sup>), bei einem Erysipelkranken (Kirkbride<sup>6</sup>), im Hundeharn nach Phosphorvergiftung (Abderhalden und Barker<sup>7</sup>), im Pferdeharn bei Peritonealsarkom (Christiani<sup>8</sup>), in der Milch (Pichon-Vendeuil<sup>9</sup>). Bei Insekten, Spinnen, Krebsen, Krabben, Fischen (Suzuki und Joshimura<sup>10</sup>), Maikäfern (Ackermann<sup>11</sup>) ist sein Vorkommen festgestellt, auch in Pflanzen ist es gefunden, z. B. in der Hefe, in *Secale cornutum*, in vielen Keimpflanzen (E. Schulze<sup>12</sup>), in der Sorghumpflanze, in der Rübenmelasse. Vorkommen.



Das natürlich vorkommende und das durch Spaltung der Proteinstoffe erhaltene ist meist l-Leucin. Wird die Spaltung durch Barytwasser (mehrtägiges Erhitzen bei 150—160°) vorgenommen, so entsteht d,l-Leucin (E. Schulze und

<sup>1</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 4, S. 91. 1908.

<sup>2</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 18, S. 435. 1909. <sup>3</sup>) desgl. Bd. 8, S. 438. 1908.

<sup>4</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 88, S. 478. 1913. <sup>5</sup>) desgl. Bd. 45, S. 468. 1905.

<sup>6</sup>) Zentralbl. f. inn. Med. Bd. 18, S. 1057. 1897.

<sup>7</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 42, S. 524. 1904.

<sup>8</sup>) Ref. Biol. Zentralbl. Bd. 2, S. 440. 1904. <sup>9</sup>) Chem. Zentralbl. 1922, I, S. 55.

<sup>10</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 62, S. 1. 1909 u. Chem. Zentralbl. 1913, I, S. 1042.

<sup>11</sup>) Zeitschr. f. Biol. Bd. 71, S. 193. 1920.

<sup>12</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 24, S. 49. 1898; Bd. 35, S. 304. 1902. Bd. 38, S. 199. 1903.

Likiernik<sup>1)</sup>. Aus zersetztem Käse wurde einmal d,l-Leucin erhalten (E. Schulze und Likiernik<sup>2)</sup>).

**Darstellung.** Synthetisch gewinnt man d,l-Leucin aus Isovaleraldehyd, Ammoniak und Blausäure<sup>3)</sup>. Eine andere Methode mit guter Ausbeute (von der Isobutylmalonsäure aus) ist von E. Fischer und Schmitz<sup>4)</sup> angegeben.

Aus dem durch Benzoylierung des inaktiven Leucin erhaltenen Benzoyl-leucin läßt sich mit Hilfe des Cinchonin- und Chinidinsalzes d- und l-Benzoyl-leucin gewinnen, welche durch hydrolytische Spaltung d- und l-Leucin liefern, allerdings in nicht reinem Zustande, da ihnen kleine Mengen der durch teilweise Racemisierung entstandenen inaktiven Modifikation beigemischt sind (E. Fischer<sup>5)</sup>). Zweckmäßiger ist die Gewinnung des aktiven Leucin aus dem Formylleucin mit Hilfe der Brucinsalze (s. Valin) (E. Fischer und Warburg<sup>5)</sup>). d-Leucin entsteht aus dem inaktiven auch durch Einwirkung von *Penicillium glaucum* (E. Schulze<sup>6)</sup>), anderen Schimmelpilzen und Bakterien (Pringsheim<sup>7)</sup>), ferner auch durch Einwirkung von Hefe auf eine Lösung von inaktivem Leucin und Zucker, während hierbei aus dem l-Leucin inaktiver Amylalkohol wird (F. Ehrlich<sup>8)</sup>). Bei 24stündigem Erhitzen von aktivem Leucin mit Barytwasser (auf 1 Tl. Leucin 20 Tl. Wasser und 2—3 Tl. Ätzbaryt) auf 170—175° findet völlige Racemisierung statt, während beim Erhitzen mit Säuren keine Racemisierung erfolgt (Ehrlich und Wendel<sup>9)</sup>).

Über die Isolierung von l-Leucin aus der hydrolytischen Zersetzungsflüssigkeit der Proteine s. § 475ff.

**Eigenschaften.** Reines Leucin bildet glänzend weiße, außerordentlich dünne und leichte Krystallblättchen, die sich mit Wasser nur sehr langsam benetzen. Das inaktive Leucin schmeckt ganz schwach süß, das d-Leucin süß, das l-Leucin fade und ganz schwach bitter (E. Fischer und Warburg).

Vorsichtig erhitzt sublimieren sie größtenteils unzersetzt in weißen, wolligen Flocken unter Bildung eines eigentümlichen Geruches (Isoamylamin); im geschlossenen Capillarrohr rasch erhitzt schmelzen sie unter Zersetzung und Gasentwicklung bei 293—295° (korr.) (E. Fischer). l- und d-Leucin lösen sich bei 20° in 44—48 Tl. Wasser (Ehrlich<sup>10)</sup>), leichter in heißem, sehr schwer in kaltem, etwas leichter in siedendem Alkohol. Das d,l-Leucin löst sich schwerer in Wasser, in ungefähr 106 Tl. bei Zimmertemperatur. Solange das Leucin unrein ist, ist es sehr viel löslicher in Wasser und besonders auch in Alkohol und krystallisiert in runden Kugeln und Knollen, die ziemlich schwach lichtbrechend sind und sich dadurch von den sonst ähnlichen, aber dunkel und scharf konturierten Abscheidungen harnsaurer Salze unterscheiden. Diese Kugeln und Knollen erscheinen entweder ganz hyalin oder radial gestreift, oder auch aus deutlich radial gruppierten, sehr dünnen Blättchen zusammengesetzt. In Alkalien, auch in Ammoniak, ebenso in verdünnten Säuren lösen sich die Leucine leicht auf, in konzentrierter Schwefelsäure oder Salzsäure lösen sie sich ohne Zersetzung.

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 9, S. 63. 1885.    <sup>2)</sup> desgl. Bd. 17, S. 513. 1893.

<sup>3)</sup> Hüfner: Journ. f. prakt. Chem. N. F. Bd. 1, S. 6. 1870. — Über die beste Methode der Darstellung s. Schulze u. Likiernik: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 17, S. 513. 1893; E. Fischer: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 33, 2, S. 2370. 1900 u. Anleitung zur Darstellung org. Präparate. 1920, S. 91.

<sup>4)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 39, 1, S. 351. 1906.    <sup>5)</sup> desgl. Bd. 38, 4, S. 3997. 1905.

<sup>6)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 10, S. 134. 1886 u. Bd. 17, S. 513. 1893.

<sup>7)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 65, S. 96. 1910.

<sup>8)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 1, S. 8. 1906. Zeitschr. d. Ver. d. dtsch. Zuckerind. Bd. 55, S. 539. Autoref. Biol. Zentralbl. Bd. 4, S. 228. 1905/06.

<sup>9)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 8, S. 399. 1908.

<sup>10)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 1, S. 8. 1906; Bd. 8, S. 399. 1908; s. auch E. Schulze u. Likiernik: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 17, S. 513. 1893.

Eisessig löst Leucin weit besser als Tyrosin, was zur Trennung beider benutzt werden kann (Habermann und Ehrenfeld<sup>1</sup>). Über Titration s. S. 218. Durch Kohle wird es reichlich adsorbiert (Abderhalden und Fodor<sup>2</sup>). Ninhydrinreaktion s. S. 219. Reaktion nach v. Slyke S. 224.

Durch Phosphorwolframsäure (S. 221) wird Leucin aus verdünnten Lösungen nicht gefällt, auch läßt sich kein krystallisiertes Phosphorwolframat erhalten (Barber<sup>3</sup>). Trotzdem findet man gelegentlich Leucin in den Phosphorwolframsäurefällungen hydrolysierter Proteinlösungen. Aus 10proz. Lösung wird es ölartig gefällt, löst sich aber beim geringsten Überschuß des Fällungsmittels (Levene und Beatty<sup>4</sup>).

Über das Verhalten zu Neutralsalzen S. 220.

d,l- und l-Leucinpikrolonat (S. 221).  $C_6H_{13}NO_2 \cdot C_{10}H_8N_4O_5$  Fp. etwa 150°. Verbindungen:  
mit Pikrolonsäure

l-Leucinkupfer  $(C_6H_{12}NO_2)_2Cu$  (S. 220), blaßblaue Schüppchen (rhombische Tafeln), in Wasser sehr schwer löslich (Hofmeister<sup>5</sup>), in Methylalkohol unlöslich. Man gewinnt es auch, indem man konzentrierte Lösung von Leucin und Kupferchlorid vorsichtig mit Barytwasser versetzt (Kutscher<sup>6</sup>). mit Kupfer

Leucinsilber (S. 221), feine, in Wasser schwer lösliche Nadelchen. mit Silber

Leucinäthylester (S. 221) (E. Fischer<sup>7</sup>) stellt eine alkalisch reagierende Flüssigkeit von eigentümlichem Geruche dar, die unter 12 mm Druck bei 83,5°, unter 18 mm bei 88° und unter 761 mm bei 196° siedet (d,l-Leucinester ebenso wie l-Leucinester), in 23 Tl. Wasser von Zimmertemperatur löslich ist (d,l-Leucinester) und durch konzentriertes Alkali oder Salze wieder abgeschieden wird; in verdünnten Mineralsäuren ist er sehr leicht löslich, mit Alkohol, Äther, Benzol mischt er sich in jedem Verhältnis. Das Pikrat des d,l-Leucinesters bildet gelbe, oft garbenförmig gruppierte, in heißem Wasser schwer lösliche Nadeln vom Fp. 134°, das Pikrat des l-Leucinesters wirt durcheinander gewachsene Nadelchen vom Fp. 128°. Der l-Leucinester dreht rechts  $[\alpha]_D^{20} = +13,1^\circ$ . Durch mehrstündiges Kochen mit der 20fachen Menge Wasser am Rückflußkühler wird er gespalten. Der d,l-Leucinester wird durch Pankreasferment asymmetrisch verseift, wobei l-Leucin und d-Leucinester entstehen (Warburg<sup>8</sup>). mit Alkohol

Benzoylleucin (S. 222) scheidet sich aus heißer, wässriger Lösung als bald krystallinisch werdendes Öl ab, ist in Alkohol und Äther löslich, in Ligroin auch in der Wärme sehr schwer löslich. d,l-Benzoylleucin schmilzt bei 135—139°, l-Benzoylleucin bei 104—106° (E. Fischer<sup>9</sup>). mit Benzoesäure

Formylleucin (E. Fischer und Warburg).

d,l-β-Naphthalinsulfoleucin (S. 222) bald krystallinisch werdendes Öl, aus heißem verdünnten Alkohol farblose, glänzende Blättchen ohne Krystallwasser, Fp. 145—146°, löst sich in ungefähr 500 Tl. Wasser, sehr leicht in Alkohol und Äther. l-β-Naphthalinsulfoleucin, langsam krystallisierendes Öl, aus verdünntem Alkohol lange, dünne, spießartige Prismen mit 1 Mol. Wasser. Es sintert bei 60° und ist bei 67° geschmolzen. Sehr schwer in Wasser (in etwa 400 Tl. kochendem), leicht in Alkohol und Äther löslich. mit Ameisensäure  
mit β-Naphthalin-  
sulfosäure

p-Toluolsulfo-l-leucin (S. 222), schwer löslich in heißem Wasser, leicht löslich in Alkohol, Äther, Aceton, unlöslich in Petroläther, Fp. 124° (korr.),  $[\alpha]_D^{20} = +4,5^\circ$  (alkoholische Lösung). mit p-Toluolsulfo-  
säure

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 37, S. 18. 1903.

<sup>2</sup>) Zeitschr. f. Fermentf. Bd. 2, S. 74. 1919.

<sup>3</sup>) Monatshefte f. Chem. Bd. 27, S. 379. 1906.

<sup>4</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 47, S. 149. 1906.

<sup>5</sup>) Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 189, S. 6. 1877.

<sup>6</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 38, S. 120. 1903.

<sup>7</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 34, 1, S. 433. 1901. <sup>8</sup>) desgl. Bd. 38, 1, S. 187. 1905.

<sup>9</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 33, 2, S. 2370. 1900.

- mit Dinitrobenzol 2, 4-Dinitrophenyl-d,l-Leucin (S. 222), gelbe Krystalle mit grünlichem Schimmer, in Wasser schwer löslich, in Äthyl-, Methylalkohol, Eisessig löslich, in Aceton leicht löslich, Fp. 203°.
- mit Phenylsenföl 1-Phenyl-4-Isobutyl-2-Thiohydantoin (S. 223). Fp. 176—179°.
- mit Phenylisocyanat d,l-Phenylisocyanatleucin (S. 223), Fp. 165° (korr.), Hydantoin schmilzt bei 125° (korr.) (E. Fischer<sup>1</sup>).
- mit  $\alpha$ -Naphthylisocyanat 1- $\alpha$ -Naphthylisocyanatleucin (S. 223), lange, spießige Krystalle, Fp. 163,5° (doch war das Präparat vielleicht nicht ganz rein).
- mit Harnstoff l-Leucिनuraminsäure (S. 223) löst sich bei 20° in etwa 1700 Tl. Wasser, schäumt im geschlossenen Capillarrohr rasch erhitzt bei etwa 189—190° Fp. im offenen Capillarrohr 202°. Sie läßt sich wässerigen Lösungen durch längeres Extrahieren mit Äther entziehen (Weiland<sup>2</sup>). d,l-Leucिनuraminsäure, Fp. im offenen Capillarrohr 189—190° (Weiland).
- mit Kohlensäure. l-Leucincarbonates Calcium und Barium (S. 224).
- Optische Eigenschaften. Es wurden gefunden für l-Leucin (aus synthetischem Leucin über das Brucinsalz der Formylverbindung gewonnen) 3—5proz. Lösung in 20proz. Salzsäure  $[\alpha]_D^{20} = +15,6^\circ$  (E. Fischer und Warburg), (aus hydrolysiertem Ovalbumin, hydrolysiertem Casein, aus Hefeselbstverdauung gewonnen) in 2—3proz. wässriger Lösung  $[\alpha]_D^{20} = -10,35^\circ$  bis  $-10,8^\circ$ , in 3—4proz. Lösung in 20proz. Salzsäure  $[\alpha]_D^{20} = +15,46^\circ$  bis  $+15,77^\circ$  (Ehrlich, Ehrlich und Wendel).
- Für d-Leucin (aus synthetischem Leucin über das Brucinsalz der Formylverbindung) in 3—5proz. Lösung in 20proz. Salzsäure  $[\alpha]_D^{20} = -15,6^\circ$  (E. Fischer und Warburg), (aus synthetischem durch Spaltung mittels Hefe und Zucker) in 2proz. wässriger Lösung  $[\alpha]_D^{20} = +10,34^\circ$ , in 3—4proz. Lösung in 20proz. Salzsäure  $[\alpha]_D^{20} = -15,40^\circ$  (Ehrlich). Die in der Literatur angegebenen höheren Werte sind mit unreinem Leucin gewonnen. In alkalischer Lösung dreht l-Leucin rechts (Mauthner<sup>3</sup>). Über den Einfluß von Säuren und Alkalien auf die Drehung s. Wood<sup>4</sup>).
- Zersetzungen und Oxydationen. Beim Erhitzen mit Phosphorsäure und mit alkalischer Chlorbariumlösung verhält es sich wie Glykokoll (S. 228), durch salpetrige Säure wird Leucin in  $\alpha$ -Oxyisobutylessigsäure, Wasser und Stickstoff zerlegt (E. Schulze und Likiernik<sup>5</sup>). Durch Wasserstoffsperoxyd bei Gegenwart von etwas Ferrosulfat entstehen Kohlensäure, Ammoniak, Isovaleraldehyd, Isovaleriansäure, Aceton (Dakin<sup>6</sup>), durch Schmelzen mit Ätzkali Isovaleriansäure, Wasserstoff und Ammoniak. Durch Proteus vulgaris entsteht aus l-Leucin d-Leucinsäure und Isoamylamin, durch Bac. subt. l-Leucinsäure (Arai<sup>7</sup>), durch Hefe aus d,l-Leucin, und zwar aus der l-Komponente, in einer Traubenzuckerlösung Amylalkohol (Ehrlich), ebenso auch durch verschiedene Pilze (Mucor racem. u. a.) (Pringsheim<sup>8</sup>).
- Nachweis. Dem Nachweis muß die Isolierung vorangehen. Wegen der Trennung von Aminosäuren s. § 479. Dazu noch folgendes: Um Leucin von Asparagin- und Glutaminsäure zu trennen, macht man die Lösung mit Natronlauge gegen Lackmus neutral, worauf Leucin krystallisiert (Osborne und Liddle<sup>9</sup>). Zur

<sup>1</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 33, 2, S. 2381. 1900. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 33, S. 187. 1901.

<sup>2</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 38, S. 385. 1912.

<sup>3</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 7, S. 223. 1882/83.

<sup>4</sup>) Journ. of the chem. soc. (London) Bd. 105, S. 1988; Chem. Zentralbl. 1914, II, S. 1302.

<sup>5</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 17, S. 513. 1893. — Gmelin: desgl. Bd. 18, S. 21. 1894.

<sup>6</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 1, S. 171. 1906 u. Bd. 4, S. 63. 1908.

<sup>7</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 122, S. 251. 1921. <sup>8</sup>) desgl. Bd. 8, S. 128. 1908.

<sup>9</sup>) Americ. journ. of physiol. Bd. 26, S. 420. 1910.

Trennung des Leucin von Tyrosin erhitzt man mit einem Gemisch gleicher Teile Eisessig und 95proz. Alkohol zum beginnenden Sieden (z. B. 0,4 g Leucin, 0,36 g Tyrosin, 10 ccm Eisessig, 10 ccm Alkohol), wobei Leucin in Lösung geht, während Tyrosin ungelöst bleibt (Habermann und Ehrenfeld<sup>1</sup>).

Die Reinheit ist mit Hilfe der spezifischen Drehung zu kontrollieren. Weiter ist es zweckmäßig, das Leucin in das schwerer lösliche inaktive Leucin überzuführen und dieses durch Herstellung des Phenylhydantoin oder der Benzoylverbindung und Bestimmung des Schmelzpunktes dieser Derivate zu identifizieren.

Beim Erhitzen einiger Zentigramme einer Substanz, welche Leucin enthält, mit 2 ccm verdünnter Schwefelsäure (1 Vol. konz. Schwefelsäure und 3 Vol. Wasser) und einigen Körnchen Kaliumbichromat entsteht starker und anhaltender Geruch von Isovaleriansäure (C. Th. Mörner<sup>2</sup>).

Zur Erkennung sehr kleiner Mengen Leucin (mg) empfiehlt Lippich<sup>3</sup>) folgende Reaktion: In ein kleines Reagensglas von 10—12 ccm Inhalt und 10—12 mm Durchmesser wiegt man einige Milligramme der Substanz ab, fügt die mehrfache Menge Harnstoff und je nach der Substanzmenge 0,5—2 ccm Wasser hinzu, kocht bei aufgesetztem Steigrohr  $\frac{1}{4}$ — $1\frac{1}{2}$  Stunde und säuert nach dem Abkühlen vorsichtig mit verdünnter Mineralsäure an. Es krystallisiert Leucinuraminosäure (Fp. im geschlossenen Capillarrohr 189—190°) in Nadelbüscheln, manchmal erst nach mehrstündigem Stehen. Es ist zweckmäßig zu impfen. Großer Überschuß von Harnstoff ist zu vermeiden.

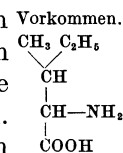
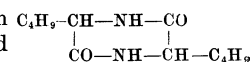
**Leucinimid**  $C_{12}H_{22}N_2O_2$  wurde zuerst von Bopp<sup>4</sup>) aus faulenden Proteinstoffen, dann von Ritthausen<sup>5</sup>) bei der Spaltung von Proteinstoffen mit Schwefelsäure, von R. Cohn<sup>6</sup>) und von Abderhalden und Funk<sup>7</sup>) bei der Säurespaltung des Caseins in geringer Menge erhalten und von Cohn genauer untersucht. Salaskin<sup>8</sup>) glaubt es unter den peptischen und tryptischen Verdauungsprodukten des Hämoglobins gefunden zu haben.

Das inaktive Leucinimid, am besten durch 24stündiges Erhitzen von inaktivem Leucinester in geschlossenem Rohr auf 180—190° dargestellt, schmilzt bei 271° (korr.) (E. Fischer<sup>9</sup>), das l-Leucinimid (leicht aus dem Methylester des l-Leucyl-l-leucin zu erhalten, E. Fischer<sup>10</sup>) etwas höher bei 277° (korr.). Letzteres krystallisiert aus heißem Wasser, in dem es schwer löslich ist, in mikroskopischen Nadeln und dünnen Prismen, die häufig büschelförmig verwachsen sind. Leichter löslich ist es in Methylalkohol, ziemlich leicht in kochendem Alkohol, wenig in Äther, viel leichter in Essigäther, leicht in Eisessig. Es sublimiert außerordentlich leicht, das ganze Lumen des Glases anfüllend, löst sich in kalter und warmer konz. Schwefelsäure unzersetzt und fällt beim Verdünnen mit Wasser unverändert aus.

Synthetisches l-Leucinimid zeigte in eisessigsaurer Lösung  $[\alpha]_D^{20} = -42,5$  bis  $-42,87^\circ$  (E. Fischer<sup>10</sup>), das aus hydrolysiertem Casein gewonnene  $[\alpha]_D^{20} = -42,3^\circ$  (Abderhalden und Funk).

Tyroleucin, Leuceine. Diese von Schützenberger<sup>11</sup>) aus den Produkten der Zersetzung Tyroleucin, Leuceine. von Eiweiß durch Ätzbaryt isolierten Körper sind Gemenge. Vgl. darüber E. Schulze<sup>12</sup>) und E. Fischer<sup>13</sup>), Hugounenq und Morel<sup>14</sup>).

**173. Isoleucin ( $\alpha$ -Amino- $\beta$ -methyläthylpropionsäure)**  $C_6H_{13}NO_2$  wurde von F. Ehrlich<sup>15</sup>) zuerst in der Melasseschlempe der Zuckerfabrikation aufgefunden und weiterhin als eine ganz allgemein bei der Hydrolyse der Proteine auftretende Substanz erkannt. Kossel und Edlbacher<sup>16</sup>) fanden es in Echinodermen. Es entsteht bei der Autolyse der Hefe, bei der Käseerifung (Winterstein und Bissegger<sup>17</sup>) und findet sich in den Keimlingen (E. Schulze und Winterstein<sup>18</sup>). Das natürlich vorkommende ist das d-Isoleucin.



<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 37, S. 18. 1902/03.

<sup>2</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 88, S. 153. 1913. <sup>3</sup>) desgl. Bd. 90, S. 125. 1914.

<sup>4</sup>) Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 49, S. 16. 1844.

<sup>5</sup>) Die Eiweißkörper der Getreidearten usw. Bonn 1872.

<sup>6</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 22, S. 166. 1896/97; Bd. 29, S. 283. 1900.

<sup>7</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 53, S. 19. 1907.

<sup>8</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 32, S. 592. 1901; Bd. 38, S. 573. 1903.

<sup>9</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 34, 1, S. 433. 1901. <sup>10</sup>) desgl. Bd. 39, 3, S. 2893. 1906.

<sup>11</sup>) Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 84, S. 124. 1885.

<sup>12</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 9, S. 122. 1895. <sup>13</sup>) desgl. Bd. 33, S. 412. 1901.

<sup>14</sup>) Ref. Biol. Zentralbl. Bd. 6, S. 211. 1907.

<sup>15</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 37, 2, S. 1809. 1904.

<sup>16</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 94, S. 264. 1915. <sup>17</sup>) desgl. Bd. 47, S. 28. 1906.

<sup>18</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 45, S. 38. 1905.

**Darstellung.** Synthetisch stellt man d,l-Isoleucin am einfachsten vom Malonsäureester und sekundärem Butyljodid ausgehend dar (F. Ehrlich<sup>1</sup>), Brasch und Friedmann<sup>2</sup>).

Die Zerlegung des d,l-Isoleucin in die aktiven Formen gelang mittels der Brucinsalze der Formylverbindung und Abspaltung der Formylgruppe durch Salzsäure (Locquin<sup>3</sup>). Bei der Vergärung mit Hefe und Zucker entsteht aus d,l-Isoleucin l-Isoleucin (F. Ehrlich<sup>4</sup>).

Es wurde von Ehrlich<sup>5</sup>) auch aus d-Amylalkohol bzw. d-Valeraldehyd mit Hilfe der Cyanhydrinreaktion erhalten. Doch bildet sich dabei ungefähr in derselben Menge d<sup>1</sup>-Allo-Isoleucin, durch sterische Umlagerung aus dem d-Isoleucin entstanden. Ein fast gleich zusammengesetztes Gemisch dieser beiden stereoisomeren Substanzen erhält man beim Behandeln des d-Isoleucins mit Bariumhydroxyd unter Druck. Aus diesem Gemisch kann man das d<sup>1</sup>-Allo-Isoleucin isolieren durch Vergären mit Hefe bei Gegenwart von Zucker, wobei das d-Isoleucin in (linksdrehenden) d<sup>1</sup>-Amylalkohol übergeht. Eine Isolierung des d-Isoleucins ist dabei noch nicht gelungen.

Über die Darstellung von d-Isoleucin aus Melasseschlempe s. Ehrlich<sup>6</sup>). Über die Isolierung aus den hydrolytischen Zersetzungsprodukten der Proteine s. § 475ff.

**Eigenschaften.** Bitterschmeckende, dem Leucin ähnliche Blättchen mit stark elektrischen Eigenschaften, sich mit Wasser schwer benetzend. Es sublimiert anfangs in wolligen Flocken, zersetzt sich dann unter Bildung von Ammoniak, Kohlensäure und einem stark basischen Öl (d-Amylamin); im geschlossenen Capillarrohr schnell erhitzt schmilzt es bei 280° unter Schäumen. Es löst sich bei Zimmertemperatur in 25,8 Tl. Wasser, also leichter als l-Leucin, merklich in heißem Methylalkohol, leicht löslich in heißem Eisessig. Mit Säure und Alkalien bildet es in Wasser sehr leicht lösliche Salze. Durch Phosphorwolframsäure, Bleiessig, Pikrinsäure, Gerbsäure, Mercurio- und Mercurinitrat wird es auch aus konzentrierten Lösungen nicht gefällt. Durch konzentrierte Salpetersäure wird es auch bei Wasserbadtemperatur und längerdauernder Einwirkung nicht angegriffen. Ninhydrinreaktion S. 219.

**Verbindungen:**  
mit Kupfer

d-Isoleucinkupfer (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>NO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>Cu (S. 220), blaue Blättchen ohne Krystallwasser, löst sich in kaltem Wasser 1 : 278, in Äthylalkohol bei 18° 1 : 476, viel leichter in heißem Wasser und etwa ebenso leicht in heißem Äthylalkohol, spielend leicht mit dunkelblauer Farbe in konzentriertem Methylalkohol schon bei gewöhnlicher Temperatur (1 : 55) und fast ebenso leicht in reinem konzentrierten Benzylalkohol (Fp. 206°) (charakteristische Eigenschaft, die zur Trennung dient).

mit Nickel

d-Isoleucinnickel, bläulichgrüne Blättchen, schwerer in Wasser löslich als das Kupfersalz, gegen die anderen Lösungsmittel sich ähnlich verhaltend wie dieses.

mit Pikrolonsäure

d-Isoleucinpikrolonat (S. 221), C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub> · C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub> Schmelzpunkt unscharf bei 170° ohne Zersetzung.

mit Benzoesäure

d-Benzoylsoleucin (S. 222), zur Entfernung der Benzoesäure schüttelt man in der Kälte statt mit Ligroin, in dem sich die Verbindung ziemlich löst, mit Benzol. In Alkohol und Äther leicht, in kaltem Wasser sehr schwer lösliche Nadelchen. Es sintert bei 114° und schmilzt bei 116—117°.

mit Phenylisocyanat

d-Isoleucinphenylisocyanat (S. 223), weiße, glänzende Blättchen, unlöslich in kaltem, leicht in heißem Wasser, in Alkohol und Äther. Fp. 119—120° unter Schäumen. Das Hydantoin, seideglänzende Nadeln, löst sich nur sehr schwer in kaltem Wasser, leicht in Alkohol und Äther. Fp. 78—79°.

<sup>1</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 41, 1, S. 1453. 1908.

<sup>2</sup>) Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 11, S. 376. 1908.

<sup>3</sup>) Bull. de la soc. chim. de Paris [4], Bd. 1, S. 595 u. 601; Ref. Chem. Zentralbl. 1907, II, S. 895 u. 896.

<sup>4</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 63, S. 379. 1914.

<sup>5</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 40, 2, S. 2538. 1907. <sup>6</sup>) desgl. Bd. 37, 2, S. 1809. 1904.



d- $\alpha$ -Naphthylisocyanatsoleucin (S. 223), weiße Nadeln, Fp. 178° unter Aufschäumen. mit  $\alpha$ -Naphthylisocyanat.

d-Isoleucin (aus synthetischem) zeigte in 3,1proz. wässriger Lösung  $[\alpha]_D^{20} = +11,29^\circ$ , in 4,6proz. salzsaurer Lösung (20 g rauchende HCl + 80 g Wasser)  $[\alpha]_D^{20} = +40,61^\circ$ . Optische Eigenschaften.

l-Isoleucin (aus synthetischem) zeigte in 3,1proz. wässriger Lösung  $[\alpha]_D^{20} = -10,55^\circ$ , in 4,1proz. salzsaurer Lösung (20 g rauchende HCl + 80 g Wasser)  $[\alpha]_D^{20} = -31,37^\circ$ , in 4,18proz. salzsaurer Lösung (20 g HCl-Gas + 80 g Wasser)  $= -40,86^\circ$  (Locquin).

Ehrlich<sup>1)</sup> fand für mittels Hefegärung gewonnenes l-Isoleucin in 3,9proz. wässriger Lösung  $[\alpha]_D^{20} = -12,72^\circ$ , in 4,57prozentiger in 20proz. Salzsäure  $[\alpha]_D^{20} = -40,07^\circ$ .

Bei der Vergärung mit Hefe und Zucker entsteht aus d-Isoleucin d-Amylalkohol (Ehrlich<sup>2)</sup>. Bei der Fäulnis entsteht aus d-Isoleucin d-Valeriansäure und d-Capronsäure (Neuberg<sup>3)</sup>). Umwandlungen.

Dem Nachweis muß die Isolierung vorangehen. Wegen Trennung von anderen Aminosäuren s. § 479. Zur Charakterisierung dient besonders die leichte Löslichkeit des Kupfersalzes in Methylalkohol. Nachweis.

174. Norleucin (n- $\alpha$ -Aminocapronsäure)  $C_6H_{13}NO_2$ . d-Norleucin wurde von Abderhalden und Weil<sup>4)</sup> aus hydrolysierten Eiweißstoffen der Nervensubstanz erhalten. Vorkommen.

Aus der aus  $\alpha$ -Bromcapronsäure dargestellten inaktiven Aminosäure lassen sich die aktiven Formen gewinnen mittels der Benzoylverbindungen und ihrer Cinchoninsalze (E. Fischer<sup>5)</sup>, E. Fischer und Hagenbach<sup>6)</sup> oder mittels der Formylverbindungen und ihrer Brucinsalze (Abderhalden, Fröhlich und Fuchs<sup>7)</sup> und nachträglicher Abspaltung der Benzoyl- bzw. Formylgruppe durch Salzsäure. Eine linksdrehende Säure wurde von Schulze und Likiernik<sup>8)</sup> durch Einwirkung von Penic. glaucum auf die Racemverbindung erhalten. Darstellung.

Beide aktiven Säuren krystallisieren in glänzenden Blättchen, sehr schwer löslich in Wasser, bei 23° zu 1,74% (die inaktive bei derselben Temperatur zu 1,15%) (Kudielka<sup>9)</sup>). In Alkohol ebenfalls sehr schwer löslich. Im Capillarrohr erhitzt findet bei 275–280° Sintern und Sublimieren, bei 301° Schmelzen statt (Abderhalden, Fröhlich und Fuchs). Die d-Säure schmeckt fad süß, die l-Säure bitter. Ninhydrinreaktion S. 219. Eigenschaften.

Kupfersalz  $(C_6H_{12}NO_2)_2Cu$  lichtblaue Blättchen. Bei 23° zu etwa 0,005% löslich (das der inaktiven zu etwa 0,004%) (Kudielka). Verbindungen: mit Kupfer

$\beta$ -Naphthalinsulfo-d-Säure (S. 222), fast unlöslich in Wasser, leichtlöslich in absolutem Alkohol und Äther. In kochendem 20proz. Alkohol zu etwa 1% löslich. Fp. 149°.  $[\alpha]_D^{20} = -22,54^\circ$  (Abderhalden und Weil<sup>10)</sup>. mit Naphthalinsulfosäure.

$[\alpha]_D^{20}$  in wässriger Lösung  $+4,5^\circ$ , in 20proz. Salzsäure  $+21^\circ$ . Die Werte sind etwas zu niedrig wegen Beimengung von Racemkörper. Für die aus der inaktiven Säure durch Penic. glaucum erhaltene l-Säure fanden Schulze und Likiernik in 20proz. Salzsäure  $[\alpha]_D^{17} = -26,5^\circ$ . Optische Eigenschaften.

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 63, S. 390. 1914.

<sup>2)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 40, 2, S. 2551. 1907.

<sup>3)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 37, S. 501. 1911.

<sup>4)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 81, S. 207. 1912; Bd. 84, S. 39. 1913; Bd. 88, S. 272. 1913.

<sup>5)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 33, 2, S. 2370. 1900. <sup>6)</sup> desgl. Bd. 34, 3, S. 3764. 1901.

<sup>7)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 86, S. 454. 1913.

<sup>8)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 17, S. 523. 1893.

<sup>9)</sup> Monatshefte f. Chem. Bd. 29, S. 351. 1908.

<sup>10)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 88, S. 272. 1913.

- Vorkommen. **175. Asparaginsäure (Aminobernsteinsäure)  $C_4H_7NO_4$ .** Sie entsteht bei der hydrolytischen Spaltung vieler Proteine. Sie findet sich im Blut (Abderhalden<sup>1)</sup>), in der Milch (Pichon-Vendeuil<sup>2)</sup>), im Sekret der Drüse von Tritonium nodosum (Henze<sup>3)</sup>), in der Melasse, in Maulbeerblättern (Mimuroto<sup>4)</sup>), in autolyserter Hefe (Meisenheimer<sup>5)</sup>), in Secale cornutum. Die natürlich vorkommende und die durch Kochen von Proteinstoffen mit Säuren erhaltene ist l-Asparaginsäure.
- Darstellung. Die synthetisch durch Erhitzen von Fumarsäure mit alkoholischem Ammoniak gebildete ist die inaktive Form. Die Darstellung geschieht am besten durch Kochen von Asparagin mit Salzsäure (Schiff<sup>6)</sup>), und zwar entsteht auf diese Weise aus l-Asparagin die l-Säure und aus d-Asparagin die d-Säure. Salzsäure l-Asparaginsäure wird durch Erhitzen ihrer wässrigen Lösung auf 170—180° in die inaktive übergeführt (Michael und Wing<sup>7)</sup>). Beim Kochen mit Mineralsäure findet keine Racemisierung statt (F. Ehrlich<sup>8)</sup>). Die d,l-Benzoylasparaginsäure läßt sich mit Hilfe der Brucinsalze in l- und d-Benzoylasparaginsäure trennen, aus denen durch Kochen mit Salzsäure l- und d-Asparaginsäure gewonnen werden können (E. Fischer<sup>9)</sup>). Durch Einwirkung von Hefe auf eine Lösung von d,l-Asparaginsäure und Zucker werden beide Komponenten gleichmäßig vergoren (F. Ehrlich<sup>8)</sup>).  
Über die Darstellung der l-Säure aus der hydrolytischen Zeretzungsflüssigkeit der Proteinstoffe s. § 475 ff.
- Eigenschaften. l-Asparaginsäure krystallisiert in rhombischen Prismen, hat stark sauren Geschmack, ist in kaltem Wasser ziemlich schwer löslich (1 Tl. in 256 Tl. bei 10°), viel leichter in heißem Wasser (1 Tl. in 18,6 Tl. bei 100°) und auch in Salzlösungen (Schiff), unlöslich in kaltem Eisessig. Ninhydrinreaktion S. 219. Reaktion nach v. Slyke S. 224. Beim Titrieren verhält sie sich wie eine einbasische Säure s. S. 218. Durch Phosphorwolframsäure wird sie nicht gefällt. Durch Kochen mit Bleioxid wird sie nahezu völlig gefällt (Levene und v. Slyke<sup>10)</sup>).  
Über das Verhalten zu Neutralsalzen s. S. 220.
- Verbindungen:  
mit Kupfer l-asparaginsäures Kupfer  $C_4H_5NO_4Cu + 5 H_2O$  (S. 220), blaue glänzende Nadeln, löslich in kochendem, fast unlöslich in kaltem Wasser (Hofmeister<sup>11)</sup>). Das Krystallwasser wird erst bei 140—150° im Vakuum völlig abgegeben (Abderhalden und Weil<sup>12)</sup>).  
mit Silber Silbersalz (S. 221) (Kutscher<sup>13)</sup>) ist sehr schwer löslich in Wasser.  
mit Zink Zinksalz ist in Wasser leicht löslich und konnte nicht krystallisiert erhalten werden. Diese leichte Löslichkeit dient zur Trennung von der Glutaminsäure, deren Zinksalz sehr schwer löslich ist (Kutscher).  
mit Calcium l-asparaginsäures Calcium in wässrigem Alkohol unlöslich, ebenso wie das Calciumsalz der Glutaminsäure, des Cystins und Tyrosins, während die anderen Aminosäuren lösliche Calciumsalze bilden (Foreman<sup>14)</sup>).

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 88, S. 478. 1913.

<sup>2)</sup> Chem. Zentralbl. 1922, I, S. 55.

<sup>3)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 34, 1, S. 348. 1901.

<sup>4)</sup> Chem. Zentralbl. 1913, I, S. 1036.

<sup>5)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 104, S. 229. 1919.

<sup>6)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 17, 2, S. 2929. 1884. <sup>7)</sup> desgl. Bd. 17, 2, S. 2984. 1884.

<sup>8)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 63, S. 379. 1914.

<sup>9)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 32, 2, S. 2451. 1899.

<sup>10)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 8, S. 285. 1910/11.

<sup>11)</sup> Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 189, S. 6. 1877.

<sup>12)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 72, S. 22. 1911.

<sup>13)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 38, S. 114. 1903.

<sup>14)</sup> Biochem. Journ. Bd. 8, S. 463; Ref. Chem. Zentralbl. 1916, I, S. 1097.

Das saure Bariumsalz (frei von neutralem) entsteht beim Einleiten von Kohlensäure in die mit überschüssigem Barytwasser versetzte wässrige Lösung, Aufkochen, Filtrieren, Eindampfen und Trocknen zunächst bei 100°, dann bei 110° (Siegfried<sup>1</sup>).

Phosphorwolframat (S. 221) (Barber<sup>2</sup>), Levene und Beatty<sup>3</sup>), Drummond<sup>4</sup>). mit Phosphorwolframsäure

Pikrolonat (S. 221) (Levene und v. Slyke<sup>5</sup>).

mit Pikrolonsäure

Pikrylasparaginsäure  $(\text{NO}_2)_3\text{C}_6\text{H}_2 - \text{NH} - \text{C}_2\text{H}_3\text{COOH}$  wenig in Wasser löslich, löslich in Lauge, Äther, Alkohol (Hirayama<sup>6</sup>). mit Pikryl

l-Asparaginsäurediäthylester (S. 221) siedet unter 11 mm Druck bei 126,5°, er wird nicht durch Kochen mit Wasser, wohl aber durch 1—2stündiges Erhitzen mit überschüssigem Barytwasser auf dem Wasserbad gespalten. mit Alkohol

l-Benzoylasparaginsäure (S. 222), Nadeln oder Blättchen, schwer löslich in kaltem Wasser, Fp. 180—181°. mit Benzoesäure

l- $\beta$ -Naphthalinsulfoasparaginsäure (S. 222), Fp. 153°.

mit  $\beta$ -Naphthalinsulfosäure

l- $\alpha$ -Naphthylisocyanatasparaginsäure (S. 223) scheidet sich zuerst gallertartig ab, bei wiederholtem Umkrystallisieren aus verdünntem Alkohol undeutliche Nadelchen. Fp. 115° unter Aufschäumen. mit  $\alpha$ -Naphthylisocyanat

1-Phenyl-2-thiohydantoin-4-essigsäure (S. 223), in Wasser wenig löslich (etwa 1 : 1747 bei 25°), Fp. 233—234°. mit Phenylsenföhl

Urami obersteinsäure (S. 223) löst sich bei 20° in Wasser 1 : 270, schäumt im geschlossenen Capillarrohr rasch erhitzt bei 162°. mit Harnstoff

Asparaginsäurecarbonsaures Calcium (S. 224).

mit Kohlensäure.

Die l-Asparaginsäure ist in wässriger Lösung bei gewöhnlicher Temperatur schwach rechtsdrehend, bei 75° inaktiv, von da an zunehmend linksdrehend (Cook<sup>7</sup>). Bei Gegenwart von Säure ist Rechtsdrehung vorhanden, und zwar beträgt in ungefähr 4proz. Lösung bei Gegenwart von 3 Mol. Salzsäure  $[\alpha]_D^{20} = +25,7^\circ$ , bei Gegenwart von Alkali Linksdrehung, und zwar beträgt in ungefähr 3,3proz. Lösung bei Gegenwart von 3 Mol. Natriumhydroxyd  $[\alpha]_D^{20} = -2,37^\circ$ . Die d-Asparaginsäure zeigt bei Gegenwart von Salzsäure unter denselben Verhältnissen  $[\alpha]_D^{20} = -25,5^\circ$  (E. Fischer). Optische Eigenschaften.

Die Lösung der Alkalisalze der l-Asparaginsäure dreht links, durch Bleiessig entsteht Rechtsdrehung (Pellet<sup>8</sup>). Über Einfluß von Säuren und Alkalien auf die Drehung s. Wood<sup>9</sup>).

Beim Erhitzen mit Phosphorsäure auf 150° gibt sie nur Spuren von Stickstoff, beim Erhitzen mit alkalischer Chlorbariumlösung auf 150° nur Spuren von Kohlensäure ab (Schöndorf). Bei der Einwirkung von salpetriger Säure auf in Salpetersäure gelöste Asparaginsäure erhält man Äpfelsäure. Durch Einwirkung von Natriumnitrit auf in Salzsäure gelöste Asparaginsäure entsteht Monochlorbernsteinsäure (Fp. 174°) (Jochem<sup>10</sup>), durch Wasserstoffsperoxyd Ammoniak, Kohlensäure, Acetaldehyd, Malonsäure (Dakin<sup>11</sup>).

Umwandlungen.

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 45, S. 257. 1905.

<sup>2</sup>) Monatshefte f. Chem. Bd. 27, S. 379. 1906.

<sup>3</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 47, S. 149. 1906.

<sup>4</sup>) Biochem. Journ. Bd. 12, S. 5; Ref. Chem. Zentralbl. 1918, II, S. 944.

<sup>5</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 12, S. 127. 1912.

<sup>6</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 59, S. 290. 1909.

<sup>7</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 30, I, S. 294. 1897.

<sup>8</sup>) Chem. Zentralbl. 1911, I, S. 1766.

<sup>9</sup>) Journ. of the chem. soc. (London) Bd. 105, S. 1988; Chem. Zentralbl. 1914, II, S. 1302.

<sup>10</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 31, S. 119. 1900/01.

<sup>11</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 5, S. 409. 1908/09.

Bei der Fäulnis entsteht aus l- und auch aus d,l-Asparaginsäure Bernstein-, Propion-, Ameisensäure, Ammoniak (Borchardt<sup>1</sup>), Neuberg und Cappezzuoli<sup>2</sup>), Brasch<sup>3</sup>), Abderhalden und Fodor<sup>4</sup>), gelegentlich neben Bernsteinsäure auch  $\beta$ -Alanin (Ackermann<sup>5</sup>). *Penicillium glaucum* und der *Bacillus* der Hühnercholera zerstören vorwiegend l-Asparaginsäure (Condelli<sup>6</sup>). Durch gärende Hefe wird d,l-Asparaginsäure symmetrisch abgebaut (Ehrlich<sup>7</sup>).

**Nachweis.** Dem Nachweis muß die Isolierung vorangehen. Wegen Trennung von anderen Aminosäuren s. § 479 u. § 482. Dazu noch folgendes: Zur Trennung von Leucin macht man die Lösung mit Natronlauge gegen Lackmus neutral, worauf Leucin auskrystallisiert (Osborne und Liddle<sup>8</sup>). Zur Trennung von manchen anderen Aminosäuren kann die Unlöslichkeit des Calciumsalzes in wässrigem Alkohol dienen (s. oben).

Zum Nachweis dient die Analyse der freien Säure oder ihres schwer löslichen Kupfersalzes und die Bestimmung der spezifischen Drehung. Auch der ausgesprochen saure Geschmack unterscheidet sie von der Glutaminsäure und den einbasischen Aminosäuren.

**Vorkommen.** 176. **Glutaminsäure ( $\alpha$ -Aminoglutarinsäure)  $C_5H_9NO_4$ .** Sie entsteht bei der hydrolytischen Spaltung der Proteinstoffe und wurde zuerst aus diesen von Ritthausen, Hlasiwetz und Habermann erhalten. Es handelt sich um die d-Glutaminsäure. Diese ist auch im Blut (Abderhalden<sup>9</sup>), im Fleischextrakt (Micko<sup>10</sup>), in der Milch (Pichon u. Vendeuil<sup>11</sup>), in der Melasse nachgewiesen.

**Darstellung.** Die synthetisch durch Reduktion von  $\alpha$ -Isonitrosoglutarinsäure gewonnene (Wolff<sup>12</sup>) ist die inaktive Form. Die Zerlegung der inaktiven in die aktive gelingt mittels der Strychninsalze der d,l-Benzoylglutaminsäure und Abspaltung der Benzoylgruppe durch Kochen mit Salzsäure (E. Fischer<sup>13</sup>). Durch Einwirkung von Hefe auf eine Lösung von d,l-Glutaminsäure und Zucker entsteht l-Glutaminsäure (F. Ehrlich<sup>14</sup>) und ebenso durch Einwirkung von *Penicillium glaucum* (E. Schulze und Bosshard<sup>15</sup>). Beim 9stündigen Kochen von d-Glutaminsäure mit der 4fachen Menge Ätzbaryt und der 20fachen Menge Wasser in einem Porzellantopf im Autoklaven auf 160—170° entsteht d,l-Glutaminsäure (E. Fischer, Kropf und Stahlschmidt<sup>16</sup>). Die daneben entstehende Pyrrolidincarbonsäure bleibt bei Umkrystallisation in der Mutterlauge.

d-Glutaminsäure stellt man dar aus Proteinstoffen, z. B. Casein oder Kleber (etwa 17% Ausbeute), s. § 475 ff., § 484, oder aus der bei der Melasseentzuckerung entstehenden Abfallauge nach Andriik<sup>17</sup>).

**Eigenschaften.** Die d-Säure krystallisiert in klaren, farblosen, diamantglänzenden rhombischen Oktaedern und Tetraedern oder auch in kleinen, glänzenden Blättchen, schmeckt fade und sehr schwach sauer, ist in 100 Tl. Wasser von 16° und in

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 59, S. 96. 1909.

<sup>2</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 18, S. 424. 1909 u. Chem. Zentralbl. 1910, I, S. 1129.

<sup>3</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 22, S. 403. 1909.

<sup>4</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 85, S. 112. 1913.

<sup>5</sup>) Zeitschr. f. Biol. Bd. 56, S. 87. 1911.

<sup>6</sup>) Gazz. chim. ital. Bd. 51, 2, S. 309; ref. Chem. Zentralbl. 1922, I, S. 1202.

<sup>7</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 63, S. 379. 1914.

<sup>8</sup>) Americ. Journ. of physiol. Bd. 26, S. 420; Ref. Chem. Zentralbl. 1910, II, S. 1204.

<sup>9</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 88, S. 478. 1913. <sup>10</sup>) desgl. Bd. 56, S. 180. 1908.

<sup>11</sup>) Chem. Zentralbl. 1922, I, S. 55.

<sup>12</sup>) Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 260, S. 79. 1900.

<sup>13</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 32, 2, S. 2451. 1899.

<sup>14</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. I, S. 30. 1906 u. Bd. 63, S. 379. 1914.

<sup>15</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 10, S. 143. 1886.

<sup>16</sup>) Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 365, S. 181. 1909. <sup>17</sup>) Chem. Zentralbl. 1915, II, S. 265.

1500 Tl. 80 proz. Alkohol löslich, in Äther und kaltem Eisessig unlöslich und schmilzt bei raschem Erhitzen unter Zersetzung bei 208° (E. Fischer). Abderhalden und Kautzsch<sup>1)</sup> fanden 221—222°, Siegfried und Schutt<sup>2)</sup> 222—223° (korr.). Die Geschwindigkeit des Erhitzens ist von Einfluß auf den Schmelzpunkt. Die d,l-Säure löst sich in 66,7 Tl. Wasser von 20° (Wolff) und schmilzt gegen 199° (korr.) (E. Fischer, Kropp u. Stahlschmidt). Bei der Titration mit Phenolphthalein verbraucht sie etwas mehr Natronlauge, als für einbasische Säure berechnet. Siehe auch S. 218. Ninhydrinreaktion S. 219. Reaktion nach v. Slyke S. 224. Durch Phosphorwolframsäure wird sie nicht gefällt. Mercuriacetat ruft Fällung hervor (Abderhalden und Kautzsch<sup>3)</sup>).

Über das Verhalten zu Neutralsalzen S. 220.

Sie bildet mit Säuren und Basen krystallisierende Salze.

Verbindungen:

Kupfersalz  $C_5H_7NO_4Cu + 2\frac{1}{2} H_2O$  (S. 220) krystallisiert aus seinen Lösungen mit Kupfer nach dem Einengen schon in der Wärme als schweres, blaues Krystallpulver (Hofmeister<sup>4)</sup>). Ein ebensolches, aber in Wasser noch schwerer lösliches Kupfersalz gibt die d,l-Säure (Wolff). Nach Ritthausen existieren noch Kupfersalze mit anderem Krystallwassergehalt.

Silbersalz (S. 221) (Kutscher<sup>5)</sup>) in Wasser schwer löslich.

mit Silber

Zinksalz krystallisiert mit 2 Mol. Wasser in glänzenden, zu Drusen vereinigten Säulen oder feinen Nadeln, in Wasser schwer löslich, und zwar 0,064 : 100 (Unterschied von dem leicht löslichen asparaginsaurem Zink) (Kutscher).

mit Zink

Das Calciumsalz wird aus seinen konzentrierten Lösungen quantitativ durch mit Calcium Alkohol gefällt. S. asparaginsaures Calcium (§ 175).

Über andere Salze s. Abderhalden und Kautzsch<sup>6)</sup> und Hugouenq und Florence<sup>7)</sup>, über Strychnin- und Brucinsalze s. Dakin<sup>8)</sup>.

Salzsaure d-Glutaminsäure scheidet sich beim Sättigen einer wässrigen mit Salzsäure Lösung mit Salzsäuregas in schönen Krystallen ab, ist in konzentrierter Salzsäure unlöslich und deswegen zur Isolierung geeignet, schmilzt bei raschem Erhitzen bei etwa 210°. Noch leichter und schöner krystallisiert das bromwasserstoffsäure Salz.

Um aus dem salzsauren Salz Glutaminsäure zu erhalten, leitet man in die Lösung Ammoniak bis zur alkalischen Reaktion, verdampft zur Trockne und krystallisiert aus heißem Wasser um (Abderhalden<sup>9)</sup>) (das glutaminsaure Ammonium verliert bei wiederholtem Eindampfen seiner Lösung auf dem Wasserbade alles Ammoniak (Schulze und Trier<sup>10)</sup>) oder man dampft 2 Tl. mit 1 Tl. Anilin und 5 Tl. 95 proz. Alkohol bis zur breiartigen Konsistenz ein, entzieht dem Rückstand das salzsaure Anilin mit kaltem Alkohol und krystallisiert aus heißem Wasser (Hugouenq und Florence<sup>7)</sup>).

Phosphorwolframat (S. 221) (Barber<sup>11)</sup>).

mit Phosphor-

Pikrolonat der d- und d,l-Säure (S. 221) Fp. 184°.

wolframsäure  
mit Pikrolonsäure

d-Glutaminsäurediäthylester (S. 221) siedet bei 10 mm bei 139—140°. Er mit Alkohol geht bei der Destillation und bei der Verseifung durch Kochen mit Wasser zum größten Teil in Pyrrolidoncarbonsäureester bzw. Pyrrolidoncarbonsäure über (E. Fischer und Boehner<sup>12)</sup>, Abderhalden und Weil<sup>13)</sup>).

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 64, S. 450. 1910. <sup>2)</sup> desgl. Bd. 81, S. 266. 1912.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 78, S. 333. 1912.

<sup>4)</sup> Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 189, S. 6. 1877.

<sup>5)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 38, S. 114. 1903.

<sup>6)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 64, S. 447. 1910 u. Bd. 68, S. 487. 1910.

<sup>7)</sup> Bull. de la soc. chim. de France [4], Bd. 27, S. 750; ref. Chem. Zentralbl. 1920, III, S. 878.

<sup>8)</sup> Biochem. Journ. Bd. 13, S. 398; ref. Chem. Zentralbl. 1920, I, S. 679.

<sup>9)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 77, S. 75. 1912.

<sup>10)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 45, 1, S. 257. 1912.

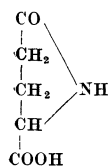
<sup>11)</sup> Monatshefte f. Chem. Bd. 27, S. 379. 1906.

<sup>12)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 44, 2, S. 1332. 1911.

<sup>13)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 74, S. 445. 1911.

- mit Benzoesäure Bei der Benzoylierung (S. 222) der d-Glutaminsäure entsteht ein Gemisch von aktiver und inaktiver Benzoylglutaminsäure mit inkonstantem Schmelzpunkt. Der bei der Benzoylierung von d,l-Glutaminsäure entstehende Körper schmilzt bei 152—154°, ist in Wasser schwer löslich (1 : 124), in Alkohol leicht.
- mit Naphthalin-sulfosäure  $\beta$ -Naphthalinsulfo-d-glutaminsäure (S. 222 und Bergell<sup>1</sup>) krystallisiert schwierig, zur Abscheidung und Identifizierung weniger geeignet. Dasselbe gilt von Toluolsulfo-glutaminsäure (S. 222 und Bergell<sup>1</sup>).
- mit Nitrotoluol-sulfosäure d,l-Nitrotoluolsulfo-glutaminsäure (S. 222), lange, häufig zu Drusen vereinigte Nadeln, schwer löslich in Wasser (1 : 102), löslich in Alkohol. Fp. 158—159°.
- mit  $\alpha$ -Naphthyl-isocyanat d- $\alpha$ -Naphthylisocyanatglutaminsäure (S. 223) krystallisiert aus 90 proz. Alkohol in langen, verfilzten Nadelchen vom Fp. 236—237°.
- mit Harnstoff Uramino-d-glutarsäure (S. 223) löst sich in Wasser bei 20° 1 : 48, schäumt im geschlossenen Capillarrohr rasch erhitzt bei 150°.
- mit Phenylsenföl 1-Phenyl-2-thiohydantoin-4-propionsäure (S. 223), Fp. 169—170°, löslich in Wasser 1 zu etwa 556, löslich in Alkohol.
- mit Kohlensäure. d-Glutaminsäurecarbonsaures Calcium (S. 224).
- Betain Glutaminsäurebetain (S. 224) (Ackermann u. Kutscher<sup>2</sup>).
- Optische Eigenschaften. Die d-Glutaminsäure zeigt in Lösungen, die 5% Glutaminsäure und 9% Salzsäure enthalten,  $[\alpha]_D = +31,7^\circ$  (E. Schulze<sup>3</sup>); in Lösungen, die 5—6% Glutaminsäure und äquimolekulare Mengen Salzsäure enthalten,  $[\alpha]_D^{20} = +30,45^\circ$  (E. Fischer); eine entsprechend hergestellte l-Glutaminsäurelösung  $[\alpha]_D^{20} = -30,05^\circ$  (E. Fischer). E. Schulze und Boßhard fanden für l-Glutaminsäure (4—5% in 8—9 proz. Salzsäure)  $[\alpha]_D = -31,1^\circ$ . Siegfried und Schutt<sup>4</sup> fanden für eine Lösung, die 1,5% d-Glutaminsäure und 10% Salzsäure enthält,  $[\alpha]_D^{20} = +34,89^\circ$ . Die Lösungen der Alkalisalze der d-Glutaminsäure drehen links. Über den Einfluß von Säuren und Alkalien auf die Drehung s. Wood<sup>5</sup>).

## Umwandlungen.



Beim Erhitzen auf 180—190° entsteht unter Entwicklung von Wasser Pyrrolidoncarbonsäure  $\text{C}_5\text{H}_7\text{NO}_3$  (s. darüber bei Abderhalden und Kautzsch<sup>6</sup>), bei stärkerem Erhitzen Pyrrol (Haitinger<sup>7</sup>). Pyrrolidoncarbonsäure ist auch als sekundäres, aus Glutaminsäure entstandenes Produkt unter den Spaltungsprodukten der Proteine gefunden (E. Fischer und Dörpinghaus<sup>8</sup>). Auch schon bei längerem Kochen wässriger Glutaminsäurelösungen, ja schon beim Verdampfen auf dem Wasserbad findet Umwandlung in l-Pyrrolidoncarbonsäure statt, in geringerem Grade auch schon beim Kochen der Lösungen glutaminsaurer Salze. Die Umwandlung erfolgt nicht bei Überschuß der salzbildenden Base oder bei Gegenwart von Mineralsäuren (3% Salzsäure). Zur Trennung von Pyrrolidoncarbonsäure und Glutaminsäure kann man Eisessig benutzen, in dem letztere unlöslich ist (Foreman<sup>9</sup>); ferner ist die Pyrrolidoncarbonsäure leicht in Wasser löslich. Auch mit Hilfe der Carbaminosäurereaktion von Siegfried läßt sich eine Trennung bewirken (Abderhalden und Kautzsch). Beim Kochen mit starker Salzsäure wird l-Pyrrolidoncarbonsäure wieder in d-Glutaminsäure verwandelt, die Spaltung vollzieht sich auch schon durch verdünnte Salzsäure bei 37° in einigen Tagen (Abderhalden und Kautzsch).

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 104, S. 182. 1919.

<sup>2</sup>) Zeitschr. f. Biol. Bd. 72, S. 177. 1920.

<sup>3</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 9, S. 99 u. 258. 1885.

<sup>4</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 81, S. 266. 1912.

<sup>5</sup>) Journ. of the chem. soc. (London) Bd. 105, S. 1988; Ref. Chem. Zentralbl. 1914, II, S. 1302.

<sup>6</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 68, S. 487. 1910.

<sup>7</sup>) Monatshefte f. Chem. Bd. 3, S. 228. 1882.

<sup>8</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 36, S. 476. 1902.

<sup>9</sup>) Biochem. Journ. Bd. 8, S. 481; Ref. Chem. Zentralbl. 1916, I, S. 1098. — Skola: Chem. Zentralbl. 1920, III, S. 619.

Die leichte Umwandlung der Glutaminsäure in Pyrrolidoncarbonsäure ist bei dem Arbeiten mit Glutaminsäure zu berücksichtigen.

Durch Einwirkung von Natriumnitrit auf die salzsaure Lösung der Säure entsteht  $\alpha$ -Chlorglutarsäure (Jochem<sup>1</sup>). In verdünnter Salpetersäure gelöst gibt sie bei Einleiten von salpetriger Säure die der Äpfelsäure homologe Oxyglutarsäure  $C_5H_8O_5$ . Durch Wasserstoffsperoxyd entstehen Bernsteinsäure, Kohlensäure und Ammoniak (Dakin<sup>2</sup>). Beim Erhitzen mit Zinkstaub gibt sie die Pyrrolreaktion (Neuberg<sup>3</sup>). Bei der Fäulnis entsteht aus d- und d,l-Glutaminsäure: Butter-, Bernstein-, Ameisensäure, Ammoniak und Kohlensäure (Brasch und Neuberg<sup>4</sup>), Borchardt<sup>5</sup>), gelegentlich auch  $\gamma$ -Aminobuttersäure (Ackermann<sup>6</sup>), Engeland und Kutscher<sup>7</sup>), Abderhalden<sup>8</sup>). Bei der alkoholischen Zuckergärung wird aus d-Glutaminsäure Bernsteinsäure (F. Ehrlich<sup>9</sup>).

Der Nachweis der stets als salzsaures Salz isolierten (§ 479, § 482) Glutaminsäure beruht auf der Analyse der freien Säure oder ihres Hydrochlorats und der Bestimmung der spezifischen Drehung. Auch ihr eigenartiger fader und sehr schwach saurer Geschmack kann zur Erkennung dienen.

177.  $\beta$ -Oxyglutaminsäure  $C_5H_9NO_5$  zuerst von Dakin<sup>10</sup>) aus hydrolysiertem Casein, dann auch aus Glutenin, Gliadin erhalten, auch aus hydrolysiertem Lactalbumin gewonnen (Jones und Johns<sup>11</sup>). Es ist die d-Form.

Die inaktive Form wurde von Dakin von der Glutaminsäure aus über die  $\alpha$ -Uraminoglutaminsäure, Hydantoinpropionsäure und Hydantoinacrylsäure dargestellt.

Über die Darstellung aus hydrolysierten Proteinen s. § 475 ff., § 482.

In Wasser sehr leicht löslich, nur langsam in dicken Prismen krystallisierend, leicht löslich in Eisessig, wenig in Methylalkohol, fast unlöslich in Alkohol, Äther, Essigäther. Sie hat keinen scharfen Schmelzpunkt, wird aber, schnell erhitzt, bei 140—150° zu klarer, glasartiger Masse (wahrscheinlich teilweise in Oxy-pyrrolidoncarbonsäure übergehend). Durch Mercuriacetat + Natriumcarbonat oder Silbernitrat + Natronlauge erfolgt Fällung, durch Phosphorwolframsäure nicht. Kupfer-, Blei-, Zink-, Cadmium-, Barium-, Calciumsalze in Wasser leicht löslich.

Strychninsalz der d-Säure, aus Butylalkohol mit wenig Wasser krystallisierend, wird bei 165—175° wachstartig und bei etwa 245° zu einem Öl.  $[\alpha]_D^{21} = -26,3^\circ$  (c = 1,67).

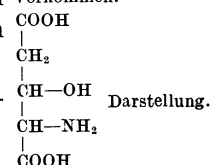
Brucinsalz der d-Säure krystallisiert aus Wasser in wasserhaltigen Nadeln, bei 90° erweichend, bei etwa 110° schmelzend, aus trockenem Methylalkohol in wasserfreien Nadeln, die oberhalb 200° sich zersetzen, in Wasser und Alkohol sehr leicht löslich, in Aceton fast unlöslich.  $[\alpha]_D^{20} = -25^\circ$  (c = 1).

$\beta$ -Naphthalinsulfoderivat (s. S. 222), Öl, das nach langem Stehen unter Umständen krystallinisch wird; wenig löslich in Wasser, leicht in Alkohol und Aceton.

$[\alpha]_D$  in 4proz. Lösung gleich etwa  $+0,8^\circ$ , in 2proz. in 20proz. Salzsäure =  $+16,3^\circ$ .

Nachweis.

Vorkommen.



Darstellung.

Eigenschaften.

Verbindungen:

mit Strychnin

mit Brucin

mit Naphthalinsulfosäure

Optische Eigenschaften.

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 31, S. 119. 1900/01.

<sup>2</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 5, S. 409. 1908/09.

<sup>3</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 31, S. 574. 1900/01.

<sup>4</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 13, S. 299. 1908. — Brasch: desgl. Bd. 18, S. 380. 1909. — Neuberg: desgl. Bd. 18, S. 431. 1909.

<sup>5</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 59, S. 96. 1909. <sup>6</sup>) desgl. Bd. 69, S. 273. 1910.

<sup>7</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 69, S. 282. 1910. <sup>8</sup>) desgl. Bd. 85, S. 131. 1913.

<sup>9</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 18, S. 391. 1909.

<sup>10</sup>) Biochem. Journ. Bd. 12, S. 290; Ref. Chem. Zentralbl. 1919, I, S. 817 u. Bd. 13, S. 398; Ref. Chem. Zentralbl. 1920, I, S. 679.

<sup>11</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 48, S. 347. 1921.

**Umwandlungen.** Beim Erhitzen mit Zinkstaub entsteht Pyrrol, bei der Reduktion mit rauchender Jodwasserstoffsäure bei  $150^\circ$  unter anderem Glutaminsäure, bei der Oxydation mit Toluolnatriumsulfochloramid (Chloramin-T) entsteht Aldehyd, der mit p-Nitrophenylhydrazin ein Osazon (rotbraune Nadeln) gibt, das bei  $297\text{--}299^\circ$  schmilzt und in alkoholischer Lösung durch Natronlauge tiefblau gefärbt wird.

**Nachweis.** Dem Nachweis muß die Isolierung vorausgehen. Wegen der Trennung von anderen Aminosäuren s. § 482.

Wenige Tropfen einer verdünnten wässrigen Lösung geben mit wenig Resorcin und konzentrierter Schwefelsäure hellrötlichpurpurne Färbung, mit anderen Phenolen andere Färbungen. Beim Erwärmen mit Diazobensulfosäure in Gegenwart von Natronlauge entsteht rote Färbung.

**Vorkommen.** 178. d-Glutamin (d-Glutaminsäureamid)  $C_5H_{10}N_2O_3$ , von Schulze und Barbieri<sup>1)</sup> in Kürbiskeimlingen entdeckt, findet sich, wie das Asparagin, in Keimpflanzen, Wurzeln und Knollen, auch Sprossen und Blättern. In manchen Familien überwiegt Asparagin, in anderen Glutamin, in manchen finden sich beide in etwa gleicher Menge (s. Stieger<sup>2)</sup>). Es spricht manches dafür, daß die bei der Hydrolyse der Proteine auftretende Glutaminsäure aus im Eiweiß vorgebildeten Glutamin stammt (Osborne, Thierfelder). Nach Phenyllessigsäure erscheint im Harn des Menschen Phenylacetylglutamin (Thierfelder und Sherwin<sup>3)</sup>).

**Darstellung.** Zur Darstellung von Glutamin fällt man Runkelrübensaft mit Bleiessig und nach Abfiltrieren des Niederschlages das Filtrat mit möglichst neutraler Lösung von Mercurinitrat. Der Niederschlag wird abfiltriert, ausgewaschen und mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Aus dem mit Ammoniak neutralisierten und eingeeengten Filtrat krystallisiert Glutamin aus (Schulze und Bosshard<sup>4)</sup>). Feine, mattweiße Nadeln ohne Krystallwasser, löst sich bei  $16^\circ$  in 25,7 Tl. Wasser, in Alkohol unlöslich. Die wässrige Lösung reagiert sauer. Zum Umkrystallisieren benutzt man wässrigen heißen Alkohol.

**Verbindungen:**  $(C_5H_9N_2O_3)_2Cu$  blauviolette, in Wasser sehr schwer lösliche Krystalle, welche man erhält, indem man die Glutaminlösung in der Wärme mit Kupferhydroxyd sättigt und die lasurblaue Lösung erkalten läßt.  $(C_5H_9N_2O_3)_2Cd$  gut krystallisierend.

**Optische Eigenschaften.** In etwa 4proz. wässriger Lösung  $[\alpha]_D^{30} = +6$  bis  $+7^\circ$ , in 7—8proz. Lösung in 5proz. Salzsäure  $[\alpha]_D^{30} = +31$  bis  $+32^\circ$  (Schulze und Trier<sup>5)</sup>).

**Umwandlungen.** Durch Kochen mit Alkalien, Barytwasser, Magnesiumoxyd, Säuren, ja schon durch Kochen mit Wasser wird es unter Abspaltung von Ammoniak in Glutaminsäure übergeführt. Bei der Destillation seiner wässrigen Lösung mit Magnesiumoxyd im Vakuum bei  $40^\circ$  wird es nicht angegriffen, wenn nicht bis zur Trockne eingedampft wird. Eine wässrige Lösung, mit Natronlauge und Neßlerschem Reagens versetzt, färbt sich bald gelb und gibt braunroten Niederschlag. Bei der Reaktion nach v. Slyke reagieren beide  $NH_2$ -Gruppen<sup>6)</sup>.

Eine Säure  $C_{12}H_{26}N_2O_5$  wurde von E. Fischer und Abderhalden<sup>7)</sup> unter den hydrolytischen Zersetzungsprodukten des Caseins aufgefunden und ist wahrscheinlich identisch mit der Caseinsäure von Skraup<sup>8)</sup>. Sie findet sich dem Rohtyrosin beigemischt und läßt sich aus der Mutterlauge des umkrystallisierten Rohtyrosins durch Phosphorwolframsäure fällen. Sie wurde für eine Diaminotrioxydodecansäure gehalten. Nach Abderhalden und Weil<sup>9)</sup> scheint ein sekundär entstandenes Produkt vorzuliegen, dem auch eine andere Strukturformel zukommt. S. auch E. Fischer und Bergmann<sup>10)</sup>.

<sup>1)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 10, 1, S. 199. 1877.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 86, S. 245. 1913.

<sup>3)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 47, 3, S. 2630. 1914. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 94, S. 1. 1915. — Sherwin, Wolf u. Wolf: Journ. of biol. chem. Bd. 37, S. 113. 1919.

<sup>4)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 16, 1, S. 312. 1883. — Schulze: Landwirtschaftl. Versuchsstat. Bd. 65, S. 237; ref. Chem. Zentralbl. 1907, I, S. 462. — Schulze u. Godet: Ebenda Bd. 67, S. 313; ref. Chem. Zentralbl. 1907, II, S. 1736.

<sup>5)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 45, 1, S. 257. 1912.

<sup>6)</sup> Thierfelder u. v. Cramm: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 105, S. 58. 1919.

<sup>7)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 42, S. 540. 1904.

<sup>8)</sup> Monatshefte f. Chem. Bd. 26, S. 1343. 1905.

<sup>9)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 81, S. 207. 1912.

<sup>10)</sup> Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 398, S. 99. 1913.



Krystallform nicht charakteristisch, meist leichte Blättchen, die in der Regel zu Rosetten oder kugeligen Aggregaten verwachsen sind. Sie reagiert auf Lackmus nur ganz schwach sauer und schmeckt sehr schwach bitter, schmilzt gegen 255° unter Zersetzung. Leicht löslich in verdünnten Säuren. Das salzsaure Salz ist in starker Salzsäure recht schwer löslich und krystallisiert aus heißer Salzsäure in feinen Nadelchen.

Kupfersalz  $C_{12}H_{24}N_2O_5Cu$  blaßblaue Blättchen, welche in kaltem Wasser ziemlich schwer löslich sind.

Aus verdünnter Lösung wird sie durch Phosphorwolframsäure gefällt, aber nicht mehr aus der Verdünnung, bei der Lysin und Arginin ausfallen.

Die spezifische Drehung beträgt bei 5proz. Lösungen etwa  $-9^\circ$ .

**Tetraoxyaminocaprinsäure**  $C_6H_{13}NO_6$  wurde von Neuberg und Orgler<sup>1)</sup> durch Einwirkung von Ätzbaryt auf Chondrosin erhalten.

Farbloser Sirup von fadem Geschmack. Die wässrige Lösung wird durch Bleiessig und Ammoniak gefällt.

Kupfersalz lasurblaue Nadeln, Cadmiumsalz ebenfalls krystallisierend.

Sie dreht schwach rechts.

Beim Kochen mit Barytwasser spaltet sie Ammoniak ab. Sie gibt die Pyrrolreaktion, d. h. sie entwickelt beim Erhitzen direkt fichtenspanrötende Dämpfe. Die Farbenreaktionen der Kohlenhydrate fallen negativ aus.

Folgende in diese Klasse gehörige Säuren bedürfen weiterer Untersuchung bzw. Bestätigung und sollen nur aufgeführt werden: Andere Oxyamino-säuren.

Oxyaminobernsteinsäure  $C_4H_7NO_5$ , von Neuberg und Silbermann<sup>2)</sup> synthetisch dargestellt,

Dioxydiaminokorksäure  $C_8H_{16}N_2O_6$ ,

Caseinsäure  $C_9H_{16}N_2O_6$ ,

Leimsäure  $C_{12}H_{25}N_5O_{10}$ , welche von Skraup<sup>3)</sup> aus den hydrolytischen Zersetzungsprodukten des Caseins bzw. Leims isoliert wurden.

Oxydiaminosebazinsäure  $C_{10}H_{20}N_2O_5$ , welche Wohlgemuth<sup>4)</sup> aus den hydrolytischen Zersetzungsprodukten eines Leberproteids erhalten hat.

Phenylalanin s. § 210, Oxyphenylalanin (Tyrosin) s. § 213, Indolalanin (Tryptophan) s. § 225.

#### *Schwefelhaltige Aminosäuren.*

179. **Taurin (Aminoäthylsulfosäure)**  $C_2H_7NSO_3$  wurde zuerst als Zersetzungsprodukt der Taurocholsäure erhalten. Es findet sich auch in dem Saft der Lunge und Niere von Rindern sowie bei verschiedenen besonders kaltblütigen Tieren in der Muskelflüssigkeit. Es wurde in Heringen (Berner<sup>5)</sup>, Fischrogen (König und Großfeld<sup>6)</sup>, Echinodermen (Kossel und Edlbacher<sup>7)</sup>, Mollusken (Valenciennes und Frémy<sup>8)</sup>, Pecten opercularis und Mytilus edulis (Kelly<sup>9)</sup>, Jansen<sup>10)</sup>, Austern (Suzuki<sup>11)</sup>, verschiedenen Seegastropoden (Mendel<sup>12)</sup>, Octopus (Valenciennes und Frémy, Henze<sup>13)</sup>, Quallen (Haurowitz<sup>14)</sup>) nachgewiesen, ferner auch im Fleischextrakt (Micko<sup>15)</sup>,

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 37, S. 407. 1902/03.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 44, S. 147. 1905.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 42, S. 274. 1904. Monatshefte f. Chem. Bd. 26, S. 243, 683. 1905.

<sup>4)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 37, 4, S. 4362. 1904. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 44, S. 537. 1905.

<sup>5)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 110, S. 172. 1920.

<sup>6)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 54, S. 351. 1913.

<sup>7)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 94, S. 270. 1915.

<sup>8)</sup> Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 41, S. 739. 1855.

<sup>9)</sup> Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 5, S. 380. 1904.

<sup>10)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 85, S. 231. 1913.

<sup>11)</sup> Chem. Zentralbl. 1913, I, S. 1042.

<sup>12)</sup> Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 5, S. 582. 1904.

<sup>13)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 43, S. 477. 1904/05.

<sup>14)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 122, S. 145. 1922. <sup>15)</sup> desgl. Bd. 56, S. 180. 1908.

Jona<sup>1)</sup>. Seine Muttersubstanz ist das Cystin, aus dem es von Friedmann<sup>2)</sup> erhalten worden ist.

Darstellung. Synthetisch erhält man es beim Erhitzen von chloräthylsulfosaurem Silber mit Ammoniak (Kolbe<sup>3)</sup>) oder auch durch Verdampfen einer Lösung von Vinylamin mit überschüssiger schwefliger Säure auf dem Wasserbad (Gabriel<sup>4)</sup>). Es sind noch weitere Synthesen angegeben, z. B. von Auzies<sup>5)</sup>.

Ein sehr geeignetes Material zur Gewinnung von Taurin ist das Seeohr (Haliotis). Über das Verfahren s. Schmidt und Watson<sup>6)</sup>.

Darstellung aus Galle. Aus der Rindergalle gewinnt man es am reichlichsten durch mehrstündiges Kochen der Galle mit verdünnter Salzsäure, Abfiltrieren der wässrigen Flüssigkeit von den harzartig ausgeschiedenen Gallensäureanhydriden, Einengen auf dem Wasserbad bis auf ein kleines Volumen, Abfiltrieren der warmen Flüssigkeit von Kochsalz und anderen Ausscheidungen, Eindampfen zur Trockne, Lösen des Rückstandes in 5 proz. Salzsäure und Fällen mit dem 10fachen Volumen Alkohol von 95 Vol.-% (Hammarsten<sup>7)</sup>). Es scheidet sich Taurin ab, während salzsaures Glykokoll in Lösung bleibt. Das Taurin wird nochmals in Salzsäure gelöst, wieder durch Alkohol gefällt und dann durch Umkrystallisieren aus warmem Wasser gereinigt.

Über Isolierung aus Organen s. § 721.

Eigenschaften. Es krystallisiert in farblosen, oft sehr großen, lebhaft glänzenden 4- oder meist 6seitigen Prismen und 4seitigen Pyramiden an beiden Enden der Prismen, löst sich in 15—16 Tl. kaltem, viel leichter in heißem Wasser, ist unlöslich in absolutem Alkohol oder Äther, wenig löslich in kaltem, leichter in heißem Alkohol. Seine Lösungen reagieren neutral. In Alkalien ist es löslicher als in reinem Wasser. Ninhydrinreaktion S. 219.

Verbindungen: mit Quecksilber Durch Metallsalze wird es aus seinen Lösungen nicht gefällt, ebensowenig durch Phosphormolybdänsäure. Es bildet mit Säuren keine Salze. Feuchtes Quecksilberoxyd in siedende Lösung von Taurin portionsweise eingetragen, fällt dasselbe als Taurinquecksilberoxyd, wenig löslich in kaltem und heißem Wasser, unlöslich in Alkohol (Lang<sup>8)</sup>). Bequemer läßt es sich erhalten, wenn man eine Lösung von Taurin und Quecksilberchlorid vorsichtig mit Barytwasser versetzt. Es fällt aus, löst sich aber in überschüssigem Barytwasser leicht auf (Kutscher<sup>9)</sup>).

mit Naphthalinsulfosäure Natriumsalz des  $\beta$ -Naphthalinsulfotaurin (S. 222), aus 85 proz. Alkohol umkrystallisiert, schmilzt es bei 244°, in der mehrfachen Menge kochenden Wassers und in der 8fachen Menge Wasser von gewöhnlicher Temperatur, in der 40fachen Menge kochenden Alkohols löslich. In Essigäther, Aceton, Äther, Benzol schwerlöslich oder unlöslich, in Tetrachlorkohlenstoff löslich (Bergell<sup>10)</sup>).

mit Kohlensäure Taurin gibt auch die Carbaminoreaktion (S. 224), und zwar reagiert es quantitativ mit 1 Mol. Kohlensäure (Liebermann<sup>11)</sup>).

mit Phenylisocyanat. Die Phenylisocyanatverbindung (S. 223) ist in Wasser leicht löslich, gibt aber ein schwerer lösliches Bariumsalz. Ein Hydantoin ließ sich nicht erhalten (Paal und Zitelmann<sup>12)</sup>).

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 83, S. 458. 1913.

<sup>2)</sup> Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 3, S. 1. 1903.

<sup>3)</sup> Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 122, S. 33. 1862.

<sup>4)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 21, 2, S. 2667. 1888.

<sup>5)</sup> Chem. Zentralbl. 1911, II, S. 1433.

<sup>6)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 33, S. 499. 1918.

<sup>7)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 32, S. 456. 1901.

<sup>8)</sup> Ref. Malys Jahresber. d. Tierchem. 1876, S. 74.

<sup>9)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 38, S. 120. 1903. <sup>10)</sup> desgl. Bd. 97, S. 260. 1916.

<sup>11)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 58, S. 84. 1908/09.

<sup>12)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 36, 3, S. 3343. 1903.

Beim Erhitzen zersetzt es sich nicht unter  $240^{\circ}$ , kann mit schwacher Alkali-  
lauge oder Säure, selbst konzentrierter Salzsäure, ohne Zersetzung gekocht  
werden. Durch Einwirkung von salpetriger Säure wird es zu Isäthionsäure,  
Stickstoff und Wasser oxydiert; beim Kochen mit starker Kalilauge liefert es  
Essigsäure und schweflige Säure, keinen Schwefelwasserstoff. Durch Fäulnis-  
bakterien entsteht aus Taurin Thiosulfat (Neuberg und Rubin<sup>1</sup>). Schwefel-  
wasserstoff bilden Bakterien aus Taurin nicht (Sasaki und Otsuka<sup>2</sup>).

Eine Trennung des Taurins von anderen Körpern sowie sein Nachweis  
sind trotz des Mangels eigentlicher charakteristischer Reaktionen wegen der  
Nichtfällbarkeit dieses Stoffes durch Metallsalze, wegen seiner Schwerzersetzlich-  
keit und wegen des reichen Gehalts an Schwefel meist nicht schwierig. Die  
Verbindung mit Quecksilberoxyd kann zur Isolierung dienen, ebenso die Reaktion  
mit  $\beta$ -Naphthalinsulfochlorid.

**Taurocarbaminsäure**  $C_3H_8N_2SO_4$  findet sich im menschlichen Harne nach Einnahme von  
Taurin, wahrscheinlich in geringer Menge auch im normalen Harne ohne Taurineinnahme.

Sie wird künstlich erhalten durch Erwärmen von Taurin in konzentrierter wässriger Lösung  
mit der hinreichenden Menge cyansaurem Kali und Fällung durch Alkohol, oder einfacher durch  
Kochen von Taurin und Harnstoff mit Barytwasser (Lippich<sup>3</sup>). Um sie aus Harn darzustellen,  
fällt man ihn zunächst mit Bleiessig aus, filtriert nach 24stündigem Stehen, entfernt aus dem  
Filtrat das Blei durch Schwefelwasserstoff und dampft stark ein. Wenn nötig, muß dieses Reinigungs-  
verfahren mehrmals wiederholt werden, dann wird mit absolutem Alkohol ausgefällt, der Nieder-  
schlag in Wasser gelöst, die Lösung mit Tierkohle entfärbt, eingeengt und die Fällung mit Alkohol  
wiederholt. Aus dem hierbei resultierenden rohen Alkali- oder Kalksalz wird die Säure durch Be-  
handlung mit Alkohol und Schwefelsäure frei gemacht und durch Abdampfen bei niederer Tem-  
peratur als Sirup erhalten, aus dem sie sich in krümeliger Masse abscheidet. Hinsichtlich der  
Reinigung der Säure vgl. die Arbeiten von Salkowski<sup>4</sup>.

Die reine Säure krystallisiert wasserfrei in glänzenden, quadratischen Blättchen; sie ist leicht  
löslich in Wasser, schwer in Alkohol, unlöslich in Äther. Das Barytsalz krystallisiert aus heißem  
Alkohol in kleinen, stark glänzenden, zu Drusen vereinigten rhombischen Tafeln, das Silbersalz  
in schönen Nadeln. Die freie Säure beginnt bei  $182^{\circ}$  allmählich aufzuschäumen (Lippich). Die  
Lösungen der Salze geben noch bei sehr starker Verdünnung mit Mercurinitrat eine Fällung,  
während sie durch Phosphorwolframsäure und Alkohol nicht gefällt werden (Philosoph<sup>5</sup>). Mit  
Barytwasser auf  $140^{\circ}$  erhitzt zersetzt sich die Säure in Taurin, Kohlensäure und Ammoniak.

180. **Cystein** ( $\alpha$ -Amino- $\beta$ -Thiomilchsäure)  $C_3H_7NSO_2$  entsteht aus Cystin durch Reduktion  
mit Zinn und Salzsäure (Baumann<sup>6</sup>). Entfernt man das Zinn durch Schwefelwasserstoff, ver-  
dunstet schnell, löst den Trockenrückstand in Alkohol und neutralisiert die Lösung mit Ammoniak,  
so scheidet es sich als feinkörniger, in Wasser ziemlich leicht, auch in Ammoniak, Mineralsäuren  
und Essigsäure löslicher Niederschlag ab. Mörner erhielt es auch krystallisiert. Es entsteht in  
geringer Menge neben Cystin bei über eine Woche fortgesetzter Spaltung der Proteinstoffe  
(Mörner<sup>7</sup>). Vgl. dazu Embden<sup>8</sup>). Es ist nach Mörner kein primäres Proteinspaltungsprodukt.  
Embdens<sup>8</sup>) erhielt es beim Kochen mit konzentrierter Salzsäure aus Eiweißstoffen. Hopkins<sup>9</sup>)  
gewann aus Hefe, Muskeln und Säugetierleber ein aus Cystein und Glutaminsäure bestehendes  
Dipeptid (Glutathion § 411), das die nach Arnold<sup>10</sup>) von den tierischen Geweben gegebene  
Farbenreaktion mit Nitroprussidnatrium (s. unten) verursacht.

Cystein zeigt schwache Linksdrehung. Inaktives Cystein wurde von Erlenmeyer<sup>11</sup>) syn-  
thetisch und von Neuberg und Mayer<sup>12</sup>) durch Reduktion von racemisiertem, natürlichem Cystin  
erhalten.

<sup>1</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 67, S. 82. 1914.      <sup>2</sup>) Ebenda Bd. 39, S. 208. 1912.

<sup>3</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 41, 2, S. 2968. 1908 u. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol.  
Chem. Bd. 68, S. 292. 1910.

<sup>4</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 6, S. 744 u. 1191. 1873.

<sup>5</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 26, S. 131. 1910.

<sup>6</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 8, S. 299. 1883/84. Ber. d. Dtsch. Chem.  
Ges. Bd. 18, S. 258. 1885.

<sup>7</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 28, S. 595. 1899 u. Bd. 34, S. 207. 1901/02.

<sup>8</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 32, S. 94. 1901.

<sup>9</sup>) Biochem. Journ. Bd. 15, S. 286. 1921.

<sup>10</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 70, S. 314. 1910/11.

<sup>11</sup>) Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 337, S. 236. 1905.

<sup>12</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 44, S. 508. 1905.

Umwandlungen.

Nachweis.

Vorkommen.

$$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}_2 \\ | \\ \text{CH}_2-\text{SO}_2-\text{OH} \end{array}$$

Darstellung.

Eigenschaften.

Vorkommen und

Bildung.

$$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{SH} \\ | \\ \text{H}-\text{C}-\text{NH}_2 \\ | \\ \text{COOH} \end{array}$$

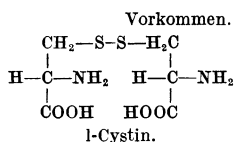
l-Cystein.

**Eigenschaften.** Cystein wird in wässriger oder schwach salzsaurer Lösung durch Sublimat gefällt, unvollständig durch Phosphorwolframsäure. Über Derivate s. Shiple und Sherwin<sup>1</sup>). In wässriger Lösung geht es an der Luft bald in krystallinisches Cystin über. Dieselbe Umwandlung erfolgt schnell durch Jod und wird auch durch Eisenchlorid sehr beschleunigt (Mathews und Walker<sup>2</sup>). Durch Oxydation mit Salpetersäure entsteht Isäthionsäure. Beim Schütteln einer wässrigen Lösung mit Kohle und Sauerstoff bei 40° entsteht Ammoniak, Schwefelsäure und Kohlensäure (Warburg und Negelein<sup>3</sup>).

**Nachweis.** Zum Nachweis des Cysteins dienen folgende Reaktionen, welche man mit wässrigen Lösungen anstellt:

1. Schwarzfärbung beim Kochen mit Alkali und Bleiacetat (wie Cystin).
2. Vorübergehende Violettfärbung auf Zusatz von Kupfersulfat (Suter<sup>4</sup>).
3. Indigoblaue, fast augenblicklich verschwindende, beim Schütteln wiederkehrende Färbung auf Zusatz von Eisenchlorid.
4. Starke purpurrote Färbung auf Zusatz von Nitroprussidnatrium und Natronlauge. Dieselbe geht bald in Rotbraun über und verschwindet. Fügt man jetzt Essigsäure hinzu und kocht, so entsteht Berlinerblau. Diese Reaktion tritt noch ein bei einer Verdünnung von 1 : 50 000.

Weitere Reaktionen s. bei Arnold.



181. Cystin  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{S}_2\text{O}_4$ . Cystin, das Disulfid des Cysteins (§ 180), entsteht, wie K. A. H. Mörner<sup>5</sup>) fand, bei der Säurespaltung von Keratin- und Eiweißsubstanzen, ebenso bei der tryptischen Verdauung von Fibrin (R. Kütz<sup>6</sup>). Es ist aus der Leber vom Delphin und Pferd (Drechsel<sup>7</sup>) und in Spuren aus der Rinderniere (Cloetta<sup>8</sup>) und der Niere eines Säufers (Scherer<sup>9</sup>) isoliert worden. In einem Fall von Cystinurie fanden sich die inneren Organe mit Cystinkrystallen durchsetzt (Abderhalden<sup>10</sup>). In geringer Menge wurde Cystin oder ein cystinähnlicher Körper im normalen Harn von Menschen und Hunden, reichlicher bei Phosphorvergiftung gefunden (Goldmann und Baumann<sup>11</sup>). In größerer Quantität erscheint es in seltenen Fällen in diesen Harnen, und zwar entweder in gelöster Form und beim Stehen als krystallinisches, grauweißes Sediment sich abscheidend oder als einziger oder hauptsächlicher Bestandteil von Blasensteinen. Auch Nierensteine bestehen zuweilen im wesentlichen oder ausschließlich aus Cystin, nach Spiegel<sup>12</sup>) finden sich in ihnen häufig geringe Mengen. Das natürlich vorkommende ist l-Cystin.

**Darstellung.** d,l-Cystin wurde zuerst von Erlenmeyer<sup>13</sup>) synthetisch dargestellt (Umwandlung von Benzoylserin in Benzoylcystein durch Schmelzen mit Phosphorpentasulfid und Überführung der Benzoylverbindung in Cystin). Ein etwas anderes Verfahren, welches vom Serinester ausgeht und über die  $\alpha$ -Amino- $\beta$ -chlorpropionsäure und das Cystein führt, ist von E. Fischer und Raske<sup>14</sup>) angegeben. Es hat den Vorzug, daß alle Verwandlungen bei verhältnismäßig niedriger Temperatur rasch verlaufen und deshalb auch mit den aktiven Substanzen ohne wesentliche Racemisierung durchgeführt werden können.

Durch 12—15stündiges Erhitzen mit der 15—20fachen Menge Salzsäure (1,124 spez. Gew.) auf 165° wird l-Cystin in inaktives übergeführt. Aus diesem

<sup>1</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 55, S. 671. 1923.

<sup>2</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 6, S. 299. 1909. S. auch Bd. 6, S. 21 u. 29. 1909.

<sup>3</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 113, S. 257. 1921.

<sup>4</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 20, S. 564. 1895.

<sup>5</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 28, S. 595. 1899 u. Bd. 34, S. 207. 1901/02.

<sup>6</sup>) Zeitschr. f. Biol. Bd. 27, S. 415. 1890.

<sup>7</sup>) Zeitschr. f. Biol. Bd. 33, S. 85. 1896. Arch. f. Anat. u. Physiol., physiol. Abt., 1891, 243.

<sup>8</sup>) Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 99, S. 299. 1856.

<sup>9</sup>) Jahresber. üb. d. Fortsch. d. Chem. 1857, S. 561.

<sup>10</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 38, S. 557. 1903.

<sup>11</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 12, S. 254. 1888. — Brenzinger: desgl. Bd. 16, S. 552. 1892.

<sup>12</sup>) Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. Bd. 166, S. 364. 1901.

<sup>13</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 36, S. 2720. 1903 u. Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 337, S. 236. 1905.

<sup>14</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 41, S. 893. 1908.

ist durch Einwirkung von *Aspergillus niger* d-Cystin, wenn auch nicht ganz rein, erhalten worden (Neuberg und Mayer<sup>1</sup>).

Seine Darstellung aus Keratin oder Eiweißsubstanzen (am besten eignen sich ihrer reichen Ausbeute wegen Menschenhaare oder auch Hornspäne) geschieht nach Mörner in folgender Weise mit einer Ausbeute von 11% aus Haaren und 4 bis 5% aus Horn: Darstellung aus Haaren oder Horn.

Einige hundert Gramm des mit Äther und Salzsäure extrahierten Materials werden mit der fünffachen Menge einer etwa 13proz. Salzsäure auf dem Wasserbad am Rückflußkühler bei 90—95° 6—7 Tage erhitzt\*). Die filtrierte und mit Tierkohle entfärbte Flüssigkeit wird im Vakuum eingengt, der Rückstand mit 60—70proz. Alkohol aufgenommen und die Lösung durch Neutralisation mit Natronlauge ausgefällt. Der abfiltrierte Niederschlag besteht hauptsächlich aus Tyrosin und Cystin. Man trennt das Gemenge durch fraktionierte Krystallisation aus Ammoniak. Überwiegt das Tyrosin, so stellt man eine nicht zu verdünnte Lösung her und entfernt den größten Teil des Ammoniaks durch Verdunsten im Vakuum: es scheidet sich dann das Tyrosin zum größten Teil ab, während das Cystin fast vollständig in Lösung bleibt. Enthält das Gemenge nur wenig Tyrosin, so bereitet man eine verdünntere Lösung: beim Einengen im Vakuum krystallisiert das Cystin zunächst aus. Für die Beurteilung der fortschreitenden Reinheit des Präparates ist die Millonsche Reaktion von Nutzen: eine heiße Tyrosinlösung gibt mit einigen Tropfen Millons Reagens keine Fällung, aber beim Kochen Rotfärbung und Trübung; eine heiße Cystinlösung bei der gleichen Behandlung reiche weiße Fällung und beim Kochen keine Färbung. Man kann auch aus der ammoniakalischen Lösung durch Zusatz von Essigsäure das Cystin fällen und Lösung und Fällung mehrmals wiederholen. Embden<sup>2</sup>) empfiehlt zur Trennung von Tyrosin und Cystin verdünnte Salpetersäure, in der sich letzteres sehr schwer, ersteres sehr leicht löst. Auch mit Hilfe von Quecksilbersulfat in schwefelsaurer Lösung oder von Phosphorwolframsäure lassen sich beide voneinander trennen, am besten aber nach Plimmer<sup>3</sup>) durch Veresterung mit gasförmiger Salzsäure in absolutem Alkohol, wobei das Tyrosin als Ester in Lösung geht und durch Verdünnen mit Wasser, achtstündiges Kochen und Neutralisieren mit Ammoniak gewonnen wird, während das nicht veresterte Cystin in salzsäurehaltigem Alkohol unlöslich ist. Es wird in verdünnter Salzsäure gelöst und scheidet sich nach Neutralisieren mit Ammoniak krystallinisch ab.

Sehr viel einfacher ist das Verfahren von Folin<sup>4</sup>):

50—500 g Wolle oder Haare werden mit konzentrierter Salzsäure (200 ccm für je 100 g) in einem Jenaer Rundkolben mit langem Steigrohr bis zum Verschwinden der Biuretreaktion gekocht (3—5 Stunden). Man fügt zu der noch heißen Lösung festes Natriumacetat bis zum negativen Ausfall der Kongoreaktion. Der dabei entstehende das Cystin enthaltende Niederschlag wird nach einigen Stunden abfiltriert, mit kaltem Wasser gewaschen, in kochender 3—5proz. Salzsäure gelöst und die Lösung nach Zusatz von guter calciumphosphatfreier Tierkohle heiß filtriert. Das Filtrat soll wasserhell sein, andernfalls muß die Behandlung mit Tierkohle wiederholt werden. Es wird zum Kochen erhitzt und langsam mit heißer konzentrierter Natriumacetatlösung versetzt, worauf Cystin auskrystallisiert. Gibt es noch die Millonsche Reaktion (Tyrosinbeimengung), so löst man es in 10proz. Ammoniak und fügt vorsichtig Eisessig hinzu. Es fällt reines Cystin aus.

Über Isolierung aus hydrolysierten Proteinen s. auch § 486. Über quantitative Bestimmung in der hydrolysierten Proteinlösung s. § 494 u. 495.

Aus Cystinsteinen oder Harnsedimenten gewinnt man Cystin durch Lösen in Ammoniak und Verdunstenlassen bei gewöhnlicher Temperatur in schönen, stets farblosen Krystallen. Darstellung aus Cystinsteinen oder Sedimenten.

\*) Man kann auch kürzere Zeit (4 Stunden) mit konz. Salzsäure kochen. Doch liefert nach Mörner sein Verfahren eine bessere Ausbeute. Jedenfalls ist Schwefelsäure weniger zu empfehlen als Salzsäure.

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 44, S. 504. 1905.

<sup>2</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 32, S. 94. 1901.

<sup>3</sup>) Biochem. Journ. Bd. 7, S. 311; ref. Chem. Zentralbl. 1914, I, S. 575.

<sup>4</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 8, S. 9. 1910/11.

**Eigenschaften.** Das l-Cystin ist in kaltem Wasser nur wenig löslich (1 : 9000 bei 17°), in heißem etwas reichlicher, unlöslich in Alkohol und Äther, leicht löslich in Alkalien, Ammoniak und kohlen-sauren Alkalien, aber nicht in kohlen-saurem Ammoniak. In Mineralsäuren und Oxalsäure löst es sich, in Essigsäure oder Weinsäure nicht. Aus ammoniakalischen Lösungen krystallisiert es in 6seitigen Tafeln oder Rhomboedern, solange es unrein ist auch oft in Kugeln. Aus der mit Essigsäure versetzten ammoniakalischen Lösung scheidet es sich auch in 6seitigen Tafeln ab, aber auch in kurzen, scheinbar rechteckigen Prismen oder auch flächenreichen Krystallen. Das d,l-Cystin ist in Wasser und wässrigem Ammoniak etwas löslicher und wird auch aus der alkalischen Lösung durch Essigsäure weniger leicht abgeschieden. Es krystallisiert in langen, oft zu Büscheln vereinigten Nadeln wie Tyrosin oder in langen, schmalen Blättchen (Mörner, E. Fischer und Raske).

In der Hitze hergestellte und abgekühlte Lösungen geben reichliche Niederschläge mit Mercurinitrat und Millons Reagens. Auch Quecksilbersulfat in schwefelsaurer Lösung fällt ebenfalls, vollständiger noch Mercuriacetat bei Gegenwart von Essigsäure, weniger vollständig Sublimat aus salzsaurer Lösung. Geringe Trübungen entstehen mit Kupferacetat, Bleiessig, Silbernitrat. Phosphorwolframsäure ruft in der schwefelsauren Cystinlösung eine allmählich entstehende krystallinische Fällung hervor (Winterstein<sup>1</sup>). Ninhydrinreaktion S. 219. Reaktion nach v. Slyke S. 224.

**Verbindungen:**  
mit Salzsäure

Mit Mineralsäuren und Basen bildet es krystallisierende Salze, von denen die ersteren leicht zersetzlich sind. Das salzsaure Salz  $C_6H_{12}N_2S_2O_4 \cdot 2 HCl$  krystallisiert in Prismen (Mauthner<sup>2</sup>), in konzentrierter Salzsäure sehr schwer löslich, das salpetersaure in 30—45 proz. Salpetersäure schwer löslich (C. Th. Mörner<sup>3</sup>). Beim Kochen von Cystin in wässriger Suspension mit Cuprihydroxyd oder auch beim Versetzen einer salzsauren Lösung mit einem kleinen Überschuß von Kupferacetat erhält man in Kügelchen und himmelblauen Nadelbüscheln krystallisierendes Cystinkupfer  $C_6H_{10}N_2S_2O_4Cu$  (Embden, Mauthner). Auch nichtgelöstes Cystin geht, mit Kupferacetat zusammengebracht, fast ganz in die krystallisierende Kupferverbindung über (vermutlich zum mikrochemischen Nachweis geeignet). Dieses Salz, ebenso wie das normale Silber-, Quecksilber-, Blei-, Cadmiumsalz, erhält man auch, indem man in Wasser suspendiertes Cystin mit etwas weniger als der berechneten Menge n-Natronlauge versetzt, kurze Zeit schüttelt, filtriert und das Filtrat sofort mit einem Überschuß des betreffenden Metallsalzes versetzt. Das Cystinsalz fällt quantitativ aus und ist nach dem Auswaschen rein (Neuberg und Mayer<sup>4</sup>). Das Calciumsalz ist in wässrigem Alkohol unlöslich. Siehe asparaginsaures Calcium (§ 175).

mit Salpetersäure  
mit Kupfer

mit anderen Schwermetallen

mit Alkoholen

Der l-Cystindiäthylester ist von Friedmann<sup>5</sup>), der l-Cystindimethylester von E. Fischer und Suzuki<sup>6</sup>) gewonnen worden, letzterer stellt einen alkalischen Sirup dar, welcher aber schön krystallisierende und zur Identifizierung des Cystins geeignete Salze bildet.

mit Benzoesäure

Beim Schütteln mit Natronlauge und Benzoylchlorid (S. 222) scheidet sich das Natronsalz des l-Dibenzoylcystins  $C_6H_5N_2S_2O_4Na_2 \cdot 2 C_6H_5CO$  als voluminöser Niederschlag von seidenglänzenden Nadeln ab. Die aus der verdünnten Lösung dieser Verbindung auf Zusatz stärkerer Säuren gallertartig ausfallende freie

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 34, S. 153. 1902.

<sup>2</sup>) Zeitschr. f. Biol. Bd. 42, S. 176. 1901.

<sup>3</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 93, S. 203. 1914/15.

<sup>4</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 44, S. 498. 1905.

<sup>5</sup>) Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 3, S. 16. 1903.

<sup>6</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 45, S. 405. 1903.

Säure krystallisiert aus Alkohol in zu blumenkohlartigen Massen vereinigten feinen Nadeln vom Fp. 180—181° (Goldmann und Baumann, Brenzinger).

l- $\beta$ -Naphthalinsulfocystin (S. 223), in Wasser und kaltem Alkohol schwer löslich, scheidet sich aus heißem, absolutem Alkohol in flachen, zum Teil verbogenen Nadeln aus. Bei 100° getrocknet zersetzt es sich bei 214° zu braunem Öl. Ein Präparat aus Steincystin schmelz bei 226—230° (Abderhalden<sup>1</sup>). mit  $\beta$ -Naphthalinsulfosäure

l-Phenylisocyanatcystin (S. 223), Fp. 160° (korr.) unter Aufschäumen (Loewy und Neuberger<sup>2</sup>), Patten<sup>3</sup>), Neuberger und Mayer<sup>4</sup>). Es geht beim Kochen mit Salzsäure in das bei 117° schmelzende Hydantoin über. mit Phenylisocyanat

l- $\alpha$ -Naphthylisocyanatcystin (S. 223) fällt wegen Schwerlöslichkeit des Kalium- und besonders des Natriumsalzes schon aus der alkalischen Lösung zusammen mit Dinaphthylharnstoff aus. Durch Auskochen mit Wasser kann es abgetrennt werden. mit  $\alpha$ -Naphthylisocyanat

Cystincarbonsaures Calcium (S. 224), in Wasser sehr wenig löslich (Liebermann<sup>5</sup>). mit Kohlensäure.

Weitere Derivate siehe bei Shipley u. Sherwin<sup>6</sup>).

Cystin zeigt starke linksseitige Zirkumpolarisation. Für aus Harnsteinen dargestellte Präparate fanden in ammoniakalischer Lösung Küllz<sup>7</sup>)  $[\alpha]_j = -142^\circ$ , in salzsaurer Lösung Mauthner<sup>8</sup>) (0,8—2proz. Lösungen)  $[\alpha]_D = -205,86^\circ$ , Baumann<sup>9</sup>) (2proz. Lösung)  $[\alpha]_D = -214^\circ$ , E. Fischer und Suzuki (etwa 2proz. normalsalzsaure Lösung)  $[\alpha]_D^{20^\circ} = -223,6^\circ$ . Für ein aus Keratin dargestelltes Präparat in salzsaurer Lösung fanden Mörner (1,8proz. Lösung)  $[\alpha]_D = -224,3^\circ$ , E. Fischer und Suzuki (3—4proz. normalsalzsaure Lösung)  $[\alpha]_D^{20^\circ} = -221,9^\circ$ . Optische Eigenschaften.

Beim Erhitzen zersetzt sich Cystin unter Bildung eines übelriechenden Öls, indem unter Kohlensäureabspaltung Aminoäthandisulfid entsteht (Neuberger und Ascher<sup>10</sup>). Die sich entwickelnden Dämpfe geben die Pyrrolreaktion (Neuberger<sup>11</sup>). Beim Kochen mit Alkalien oder Barytwasser bildet sich Schwefelmetall, Ammoniak, Kohlensäure, Oxalsäure und Uvitinsäure (Baumann<sup>12</sup>). Die Abspaltung von Schwefelwasserstoff geht aber nur langsam vor sich und ist nicht vollständig. Bei 7- bis 8stündigem Kochen mit 50 g Natriumhydroxyd, 10 g Bleiacetat und 200 ccm Wasser und einem ganz kleinen Stückchen Zink am Rückflußkühler wird die maximale Menge Schwefel als Schwefelwasserstoff abgespalten, d. h. 75% der Gesamtschwefelmenge (Mörner). Durch längeres Kochen mit Salzsäure wird es langsam zersetzt (Denis<sup>13</sup>), Hoffman und Gortner<sup>14</sup>). Zersetzungen.

Eine ganze Reihe von Bakterien bilden aus Cystin Schwefelwasserstoff, andere nicht. Mercaptan wurde dabei nicht gebildet (Sasaki und Otsuka<sup>15</sup>), Bürger<sup>16</sup>). Nach Kondo<sup>17</sup>) machen Proteusbacillen aus l-Cystin bei Gegenwart von Zucker, Glycerin oder Histidin Schwefelwasserstoff und Mercaptan,

1) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 38, S. 558. 1903.

2) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 43, S. 347. 1904/05.

3) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 39, S. 354. 1903. 4) desgl. Bd. 44, S. 487. 1905.

5) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 58, S. 84. 1908/09.

6) Journ. of biol. Chem. Bd. 55, S. 671. 1923.

7) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 15, 1, S. 1401. 1882.

8) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 7, S. 225. 1883. 9) desgl. Bd. 8, S. 303. 1884.

10) Biochem. Zeitschr. Bd. 5, S. 451. 1907.

11) Salkowski-Festschrift. Berlin: Hirschwald 1904, S. 271.

12) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 15, 2, S. 1731. 1882.

13) Journ. of biol. chem. Bd. 9, S. 365. 1911.

14) Journ. of the Americ. chem. soc. Bd. 44, S. 341; ref. Chem. Zentralbl. 1922, III, S. 346.

15) Biochem. Zeitschr. Bd. 39, S. 208. 1912.

16) Arch. f. Hyg. Bd. 82, S. 201. 1914.

17) Biochem. Zeitschr. Bd. 136, S. 198. 1923.

bei Abwesenheit dieser Stoffe nur Schwefelwasserstoff. Ebenso bildet Hefe Schwefelwasserstoff (Tanner<sup>1</sup>). Wohlgemuth<sup>2</sup>) fand als Produkte bakterieller Zersetzung unterschweflige Säure, Methylmercaptan, Äthylsulfid, Schwefelwasserstoff.

Oxydationen und  
Reduktionen.

Durch die Einwirkung von salpetriger Säure bei Gegenwart von Salzsäure entsteht aus Cystin Dichlordithiodilactylsäure und aus dieser durch Reduktion  $\beta$ -Thiomilchsäure (Friedmann<sup>3</sup>). Über das Verhalten zu salpetriger Säure nach v. Slyke S. 224. Mörner<sup>4</sup>) erhielt durch Erhitzen einer wässrigen Lösung von salzsaurem Cystein (aus Cystin durch Zinn- und Salzsäure erhalten) auf  $140^\circ$   $\alpha$ -Thiomilchsäure (vielleicht auch ganz wenig  $\beta$ -Thiomilchsäure), Alanin, Ammoniak und Schwefelwasserstoff, Mauthner<sup>5</sup>) bei der Behandlung einer ammoniakalischen Lösung mit Zink und Bleioxyd racemisches Alanin.

Bei der Oxydation mit Brom entsteht aus Cystin die Sulfosäure des Cysteins (Cysteinsäure) (Friedmann<sup>3</sup>), bei der Oxydation mit Wasserstoffsperoxyd unterschweflige Säure (Spiegel), bei der Oxydation mit 60proz. Salpetersäure Oxalsäure (C. Th. Mörner<sup>6</sup>), bei der Oxydation mit alkalischer Permanganatlösung Oxalsäure, Essigsäure, Schwefel-, Kohlen-, Salpetersäure, Ammoniak, Schwefel (Denis), beim Schütteln einer wässrigen Lösung mit Kohle und Sauerstoff bei  $40^\circ$  Ammoniak, Schwefel- und Kohlensäure (Warburg und Negelein<sup>7</sup>).

Bei der Reduktion mit Zinn und Salzsäure oder auch mit Schwefelwasserstoff entsteht Cystein. Schon in Wasser suspendiertes Cystin erfährt durch Schwefelwasserstoff langsam diese Umwandlung.

Nachweis.

Zum Nachweis dienen außer der Krystallform und den Löslichkeitsverhältnissen folgende Reaktionen:

1. Kocht man etwas Cystin mit ein paar Tropfen Natronlauge auf einem Silberblech, so entsteht ein nicht wegzuwaschender brauner oder schwarzer Fleck von Schwefelsilber.

2. Kocht man Cystin mit Alkalilauge bei Gegenwart von Bleiacetat, so tritt Schwarzfärbung durch gebildetes Schwefelblei ein. Proteinkörper, welche diese Reaktion auch geben, dürfen nicht zugegen sein.

Nach Neuberg und Mayer<sup>8</sup>) kommt in manchen Cystinsteinen ein von dem gewöhnlichen Cystin verschiedenes isomeres, das Steincystin, vor. Weitere Untersuchungen ergaben keine Bestätigung dieser Annahme. S. dazu E. Fischer und Suzuki<sup>9</sup>), Neuberg<sup>10</sup>), Abderhalden<sup>11</sup>).

Über eine colorimetrische Methode zur Bestimmung des Cystins s. Folin und Looney<sup>12</sup>).

**Aminosäure  $C_5H_{11}SNO_2$**  wurde von Mueller<sup>13</sup>) unter den Produkten der Schwefelsäurehydrolyse von Casein, Eialbumin, Edestin, Wolle, Gelatine und unter den Produkten der Alkalihydrolyse des Casein aufgefunden und ist wahrscheinlich als ein in dem Eiweiß vorgebildeter Atomenkomplex anzusehen. Die Struktur ist noch nicht ermittelt, doch handelt es sich nicht um ein Äthylcystein.

<sup>1</sup>) Journ. of the Americ. chem. soc. Bd. 40, S. 663; ref. Chem. Zentralbl. 1918, II, S. 377.

<sup>2</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 43, S. 469. 1904/05.

<sup>3</sup>) Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 3, S. 1. 1903.

<sup>4</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 42, S. 349. 1904; s. auch Friedmann u. Baer: Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 8, S. 326. 1906.

<sup>5</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 78, S. 28. 1912. <sup>6</sup>) desgl. Bd. 95, S. 263. 1915.

<sup>7</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 113, S. 257. 1921.

<sup>8</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 44, S. 472. 1905. <sup>9</sup>) desgl. Bd. 45, S. 405. 1905.

<sup>10</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 2, S. 452, Fußnote 2. 1907.

<sup>11</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 104, S. 129. 1919.

<sup>12</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 51, S. 427. 1922.

<sup>13</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 56, S. 157. 1923; Bd. 58, S. 373. 1924.



Die Isolierung beruht auf der Fällung mit Mercurisulfat und der Extraktion Darstellung. des Niederschlags mit Barytwasser. Die weitere Reinigung erfolgt durch Fällung mit Mercurichlorid. Wegen der Einzelheiten des umständlichen Verfahrens muß auf die Originalarbeit verwiesen werden. Die Ausbeute aus Casein schwankte zwischen 0,2—0,4%, ist aber jedenfalls nicht quantitativ.

Weiß, leucinähnliche Krystalle, mikroskopisch hexagonale Platten, leicht Eigenschaften. löslich in kaltem Wasser. Zersetzungspunkt scharf bei 283°. Aller Stickstoff ist als NH<sub>2</sub>-Stickstoff vorhanden.

Kupfersalz (C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>SNO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>Cu, hellblaue, kleine, hexagonale Platten, fast unlöslich in kaltem, wenig in kochendem Wasser löslich.

Quecksilberchloridverbindung ziemlich löslich in kochendem Wasser, scheidet sich aus der heißen Lösung als zähes Öl ab, das beim Erkalten spröde wird, aus verdünnter als körnige Masse.

Die Naphthylisocyanatverbindung (S. 223) ist krystallinisch, in kaltem Aceton und in Alkohol mäßig löslich, mehr in heißem, kaum löslich in kaltem und heißem Wasser, Benzol, Äther, Chloroform.

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -7,2°, doch ist eine teilweise Racemisation nicht ausgeschlossen. Optische Eigenschaften.

Beim Kochen mit 2—3proz. Natronlauge findet keine Zersetzung statt. Zersetzungen. Beim Erhitzen wird Kohlensäure entwickelt und gleichzeitig ein schwefelhaltiger Komplex abgespalten, welcher nach gekochtem Kohl riecht und eine starke Reaktion mit Nitroprussidnatrium und Natronlauge gibt. Nach seiner Einführung in den Körper wird die anorganische Schwefelsäure im Harn vermehrt.

#### *Diaminosäuren* \*).

**Säure C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** Sie wurde von Drechsel<sup>1)</sup> unter den Säurespaltungsprodukten des Caseins aufgefunden und als Diaminoessigsäure angesprochen. Daß ihr diese Konstitution zukommt, ist nach den Untersuchungen von Willstätter<sup>2)</sup> sehr unwahrscheinlich. Sie krystallisiert in flachen Prismen, ist in Wasser leicht löslich, in Alkohol unlöslich und bildet beim Schütteln mit Benzoylchlorid und Natronlauge eine in farblosen Prismen krystallisierende Monobenzoylverbindung, die sich in kaltem Wasser wenig, in kochendem leicht, in Alkohol fast gar nicht löst und bei 227° schmilzt. Diese Verbindung, welche zur Isolierung der Säure diente, zerfällt beim Erhitzen mit Salzsäure und Alkohol im Rohr auf 140° in Benzoesäureäthylester und das in Täfelchen krystallisierende Chlorhydrat C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> · HCl.

**182. Ornithin (α, δ-Diaminovaleriansäure) C<sub>5</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** d- und d,l-Ornithin Vorkommen. sind bekannt. In Form der Phenylisocyanat- und der Dibenzoylverbindungen  $\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{NH}_2 \\ | \\ \text{CH}_2 \\ | \\ \text{CH}_2 \\ | \\ \text{CH}-\text{NH}_2 \\ | \\ \text{COOH} \end{array}$  (s. Ornithursäure, § 207) sind beide aktiven Formen bekannt. d-Ornithin wurde zuerst von Jaffe<sup>3)</sup> aus Ornithursäure und Pyromucinornithursäure durch Kochen mit Salzsäure dargestellt. Es entsteht ferner aus d-Arginin beim Kochen mit Barytwasser (E. Schulze und Winterstein<sup>4)</sup>) und aus d- und d,l-Arginin durch Arginase (Kossel und Dakin<sup>5)</sup>, Rießer<sup>6)</sup>). Ornithin scheint auch im Emmentaler Käse vorzukommen (Winterstein<sup>7)</sup>).

Das synthetisch von E. Fischer<sup>8)</sup> (von γ-Phthalimidpropylmalonsäureester Darstellung. ausgehend) und später auch von Sörensen<sup>9)</sup> dargestellte Ornithin ist das inaktive.

\*) Die hierher gehörigen Verbindungen Lysin und Arginin sowie das Histidin (§ 185) faßt man unter dem Namen **Hexonbasen** zusammen (Kossel).

<sup>1)</sup> Ber. d. k. sächs. Ges. d. Wiss. Bd. 44, S. 115. 1892.

<sup>2)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 35, 2, S. 1378. 1902.

<sup>3)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 10, 2, S. 1926. 1877 u. Bd. 11, 1, S. 406. 1878. — Jaffe u. Cohn: desgl. Bd. 21, S. 3461. 1888.

<sup>4)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 26, S. 1. 1898/99. Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 32, S. 3191. 1890. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 34, S. 128. 1901/02.

<sup>5)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 41, S. 321. 1902 u. Bd. 42, S. 181. 1902/03.

<sup>6)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 49, S. 238. 1906. <sup>7)</sup> desgl. Bd. 105, S. 25. 1919.

<sup>8)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 34, 1, S. 454. 1901.

<sup>9)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 44, S. 450. 1905.

Am bequemsten gewinnt man es wohl nach E. Fischer und Zemplén<sup>1)</sup> als Monobenzoylornithin, indem man Benzoylpiperidin mit Permanganat zu Benzoyl- $\delta$ -aminovaleriansäure oxydiert, diese mit Brom und Phosphor in Benzoyl- $\delta$ -amino- $\alpha$ -bromvaleriansäure überführt, aus der durch Ammoniak Monobenzoylornithin entsteht.

Das inaktive Ornithin entsteht auch neben d,l-Arginin beim Erhitzen des d-Arginin in schwefelsaurer Lösung unter Druck (Rießer) oder durch kurzes Erhitzen des d-Ornithin mit konzentrierter Schwefelsäure. Ackermann<sup>2)</sup> erhielt d,l-Ornithin bei der Fäulnis des d-Arginin. d-Ornithin selbst wird bei der Fäulnis nicht racemisiert (Neuberg<sup>3)</sup>).

**Eigenschaften.** Ornithin krystallisiert nicht. Die wässrige Lösung reagiert stark alkalisch. Sie löst Kupferoxydhydrat und Quecksilberoxyd. Sie wird gefällt durch Phosphorwolframsäure, und zwar am vollständigsten, wenn sie möglichst konzentriert und neutral ist, die Phosphorwolframsäure in großem Überschuß angewendet wird, die Filtration erst nach einiger Zeit erfolgt und das Auswaschen mit Phosphorwolframsäure geschieht und nicht mit Schwefelsäure (Kiesel<sup>4)</sup>). Sie wird weiter gefällt durch Wolframsäure (Kiesel), Sublimat, Sublimat + Natriumacetat in alkoholischer Lösung, Mercurinitrat, Goldchlorid, Kaliumwismutjodid, wenn nicht zu verdünnt auch durch Pikrinsäure; nicht gefällt durch Kaliumquecksilberjodid, Neßlers Reagens und auch nicht durch Silbernitrat und Barytwasser (Unterschied von Arginin und zur Trennung beider Basen zu benutzen).

**Verbindungen:** Die Salze, welche in Wasser leicht löslich, in Alkohol fast unlöslich sind, werden durch Versetzen ihrer wässrigen konzentrierten Lösungen mit Alkohol meist zum Krystallisieren gebracht. d-Ornithinnitrat  $C_5H_{12}N_2O_2 \cdot HNO_3$  bildet breite, mit Salzsäure farblose Krystallblätter, das salzsaure Salz (1—2 Mol. Salzsäure auf 1 Mol. Ornithin) mikroskopische Blättchen, die in Methylalkohol leicht löslich sind. mit Platinchlorid d-Ornithinplatinchlorid  $C_5H_{12}N_2O_2 \cdot 2 HCl \cdot PtCl_4$  ist in Wasser leicht löslich. mit Goldchlorid d,l-Ornithinchloraurat  $C_5H_{12}N_2O_2 \cdot 2 HCl \cdot 2 AuCl_3 + H_2O$  (Zsp. 173—175°) mit Schwefelsäure (Ackermann). d,l-Ornithinsulfat  $(C_5H_{12}N_2O_2)_2 \cdot H_2SO_4$  (Fp. 213°), in Wasser mit Essigsäure leicht löslich, fast unlöslich in Alkohol und Äther. d-Ornithinacetat Fp. 161—162° (Kossel und Weiß<sup>5)</sup>). Vom Sulfat ausgehend sind über das Carbonat (ein leicht zersetzlicher Sirup, der aber auch krystallisieren kann Kiesel<sup>6)</sup> von Weiß<sup>7)</sup>) eine ganze Reihe der d,l-Ornithinsalze dargestellt und eingehend untersucht worden.

mit Pikrinsäure Die Pikrate (besonders die des d,l-Ornithin) sind in Methylalkohol leichter löslich als die des Lysin und deshalb zur Trennung der beiden Basen geeignet (Kossel und Weiß<sup>8)</sup>). Krystallographie des inaktiven Ornithinpikrat s. Reiner<sup>9)</sup>.

mit  $\beta$ -Naphthalin-sulfosäure d- $\beta$ -Naphthalinsulfoornithin (S. 222), Fp. 189°, die d,l-Ornithinverbindung schmilzt bei 195—196° (Rießer).

mit Benzoesäure Beim Schütteln mit Benzoylchlorid und Natronlauge geht Ornithin in Dibenzoylornithin (Ornithursäure, § 207) über.

mit Phenylisocyanat. Das Hydantoin des d-Phenylisocyanatornithin (S. 223)  $C_{19}H_{20}N_4O_3$  schmilzt, aus einem Gemisch von Alkohol und Aceton (7 : 1) umkrystallisiert, bei 191—192° (Herzog<sup>10)</sup>). Fast denselben Schmelzpunkt zeigen die l- und d,l-Hydantoine (Sörensen<sup>11)</sup>). l- und d-Phenylisocyanatornithin krystallisieren nur schwierig. l,d-Phenylisocyanatornithin krystallisiert leicht (Sörensen).

<sup>1)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 42, 1, S. 1022. 1909.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 56, S. 305. 1908.

<sup>3)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 37, S. 507. 1911.

<sup>4)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 118, S. 254. 1922. <sup>5)</sup> desgl. Bd. 59, S. 492. 1909.

<sup>6)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 118, S. 256. 1922. <sup>7)</sup> desgl. Bd. 59, S. 499. 1909.

<sup>8)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 68, S. 160. 1910. <sup>9)</sup> desgl. Bd. 73, S. 192. 1911.

<sup>10)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 34, S. 525. 1902.

<sup>11)</sup> Cpt. rend. des trav. du Lab. de Carlsberg Bd. 6, S. 1. 1903; Bd. 6, S. 209. 1905.

Das salzsaure Ornithin zeigt in 5proz. Lösung  $[\alpha]_D = +16,8^\circ$ .

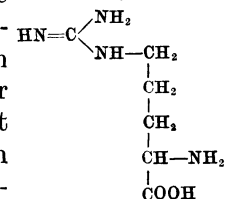
Optische Eigenschaften.

Bei der trockenen Destillation scheint Pyrrolidin zu entstehen. Mit Natronlauge erwärmt entwickelt sich spermaähnlicher Geruch. Fäulnisbakterien bilden aus Ornithin bei Abschluß der Luft Tetramethyldiamin (Ellinger<sup>1</sup>), ebenso Lebergewebe (Dakin<sup>2</sup>).

Umwandlungen.

183. Arginin ( $\delta$ -Guanido- $\alpha$ -Aminovaleriansäure)  $C_6H_{14}N_4O_2$ . Von E. Schulze und Steiger<sup>3</sup>) in den Kotyledonen der Lupinensamen und etiolierten Kürbiskeimlingen entdeckt, wurde es von Hedin<sup>4</sup>) zuerst unter den Spaltungsprodukten der Proteine aufgefunden. Seitdem ist es als ein allgemein vorkommender Bestandteil der Proteine erkannt worden. In besonders reichlicher Menge findet es sich in den Protaminen. Aberhalden<sup>5</sup>) fand es im Blut, Gulewitsch<sup>6</sup>) in der Rindermilz, Rieländer<sup>7</sup>) im Gehirn, Totani und Katsuyama<sup>8</sup>) im Stierhoden, Ackermann und Kutscher<sup>9</sup>) im Krabbenextrakt und Extrakt von *Eledone moschata*, Suzuki und Joshimura<sup>10</sup>) in Fischen, Ackermann<sup>11</sup>) in Maikäfern. Ferner ist es in Knollen, Wurzeln, Blättern, in ungekeimten Samen und Keimlingen meist in Begleitung von Asparagin, weniger von Glutamin, aber auch ohne diese beiden (E. Schulze<sup>12</sup>), Schulze und Castoro<sup>13</sup>), Schulze und Trier<sup>14</sup>), Stieger<sup>15</sup>) und in Rübensäften (v. Lippmann<sup>16</sup>), in Pollen von *Pinus silvestris* (Kiesel<sup>17</sup>), *Mutilus edulis* (Ackermann<sup>18</sup>) gefunden worden.

Vorkommen.



In allen diesen Fällen handelt es sich um d-Arginin. Inaktives fand Kutscher<sup>19</sup>) (neben aktivem) bei der Trypsinverdauung des Fibrins und Cathcart<sup>20</sup>) bei der Spaltung des koagulierten Blutserums durch Milz- $\alpha$ -Protease und des Fibrins durch Urotrypsin.

Synthetisch wurde Arginin von E. Schulze und Winterstein<sup>21</sup>) hergestellt durch Verdunsten einer mit Cyanamid und einigen Tropfen Barytwasser versetzten Ornithinlösung über Schwefelsäure. Dieses mit Hilfe von aktivem Ornithin gewonnene Arginin ist optisch aktiv. Sörensen<sup>22</sup>) erhielt d,l-Arginin, indem er Ornithursäure (§ 207) durch Erwärmen mit  $\frac{1}{5}$  Barytwasser in  $\alpha$ -Monobenzoylornithin überführte, dieses durch Cyanamidaddition in  $\alpha$ -Monobenzoyl-amino- $\delta$ -guanidovaleriansäure, welche durch Kochen mit Salzsäure Arginin gibt.

Darstellung.

- 1) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 29, S. 334. 1900.
- 2) Journ. of biol. chem. Bd. 1, S. 171. 1906.
- 3) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 11, S. 43. 1887.
- 4) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 20, S. 186. 1895; Bd. 21, S. 155. 1895/96.
- 5) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 88, S. 478. 1913.
- 6) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 30, S. 533. 1900.
- 7) Zentralbl. f. Physiol. Bd. 22, S. 377. 1909.
- 8) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 64, S. 345. 1910.
- 9) Zeitschr. f. Untersuch. d. Nahrungs- u. Genußmittel Bd. 13, S. 180 u. 610. 1907 u. Zeitschr. f. Biol. Bd. 77, S. 241. 1923.
- 10) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 62, S. 1. 1909.
- 11) Zeitschr. f. Biol. Bd. 73, S. 319. 1921.
- 12) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 22, S. 435. 1896/97 u. Bd. 24, S. 48. 1898. Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 29, 1, S. 352. 1896.
- 13) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 38, S. 220. 1903 u. Bd. 41, S. 455. 1904.
- 14) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 81, S. 53. 1912.
- 15) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 86, S. 245. 1913.
- 16) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 29, 3, S. 2645. 1896.
- 17) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 120, S. 85. 1922.
- 18) Zeitschr. f. Biol. Bd. 74, S. 67. 1922.
- 19) Sitzungsber. z. Bef. d. ges. Naturw. zu Marburg 1899, Nr. 6. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 28, S. 90. 1899 u. Bd. 32, S. 476. 1901.
- 20) Journ. of physiol. Bd. 32, S. 299 u. Bd. 32, XV. 1905.
- 21) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 32, 3, S. 3191. 1899 u. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 34, S. 128. 1901/02.
- 22) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 43, 1, S. 643. 1910 u. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 76, S. 44. 1911/12.

Durch Erhitzen des Nitrats oder Erhitzen mit starker Schwefelsäure wird d-Arginin in d,l-Arginin übergeführt (Kutscher). Über die günstigen Bedingungen für diese Racemisierung durch Schwefelsäure s. Rießer<sup>1)</sup>. Durch Arginase (Leberpreßsaft) entsteht aus d,l-Arginin l-Arginin, während d-Arginin in d-Ornithin und Harnstoff zerfällt (Rießer).

Über die Darstellung des d-Arginins aus der hydrolytischen Zersetzungsflüssigkeit der Proteine und seine Bestimmung s. § 483 und § 494. Abgekürzte Verfahren für die Darstellung aus dem argininreichen Edestin sind von E. Fischer und Suzuki<sup>2)</sup> (Ausbeute etwa 10% reines Methylesterchlorhydrat) und Rießer beschrieben. E. Schulze und Winterstein<sup>3)</sup> empfehlen zur Darstellung größerer Mengen etiolierte Keimlinge von *Lupinus luteus* zu benutzen. Noch reicher an Arginin ist Excelsin.

- Eigenschaften.** Das aktive Arginin krystallisiert in rosettenartigen Drusen von rechtwinkligen oder zugespitzten Tafeln und dünnen Prismen, reagiert stark alkalisch, bei genügendem Gehalt an Alkohol gegen Phenolphthalein neutral, zieht an der Luft Kohlensäure an und zersetzt sich bei 207—207,5°. Es ist in Wasser leicht löslich, in Alkohol fast unlöslich. Beim Kochen mit konzentrierter Salzsäure wird es nicht zersetzt. Es gibt mit Dinitronaphtholsulfosäure (1-Naphthol-2,3-dinitro-7-sulfosäure) einen besonders im Überschuß des Fällungsmittels so gut wie unlöslichen (0,0177 %) krystallinischen Niederschlag (1 Molekül Base mit 1 Molekül Säure). Zur quantitativen Bestimmung des Arginin geeignet (Kossel und Groß<sup>4)</sup>). Fällbarkeit des Arginin s. weiter unten bei Nitrat. Ninhydrinreaktion (S. 219,) positiv, Reaktion nach v. Slyke S. 224.
- Verbindungen:** d-Argininchlorid krystallisiert ohne Krystallwasser in tafelförmigen Krystallen oder auch mit 1 Mol. H<sub>2</sub>O. Die wässrige Lösung löst in der Wärme Kupferhydroxyd.
- mit Goldchlorid d-Arginingoldchlorid C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> + 1½ H<sub>2</sub>O schmilzt unscharf bei 160°. d,l-Goldchlorid + ½ H<sub>2</sub>O (Fp. 105—115), etwas schwerer löslich (Weiß<sup>5)</sup>).
- mit Schwefelsäure d-Argininsulfat krystallisiert schwierig (Weiß).
- mit Phosphorwolframsäure d-Argininphosphorwolframat (Drummond<sup>6)</sup>) ist in Acetonwasser reichlich löslich (Wechsler<sup>7)</sup>).
- mit Salpetersäure d-Argininnitrat C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> · HNO<sub>3</sub> + ½ H<sub>2</sub>O krystallisiert in feinen Nadeln, löst sich in 2 Tl. Wasser bei 16°, schwer in Alkohol und Äther, und beginnt, vorher längere Zeit bei 85° getrocknet, bei 175° zu schmelzen. Nach Rießer schmilzt es schon bei 126°. d,l-Argininnitrat krystallisiert in kleinen, glänzenden, 4seitigen Säulen oder Tafeln ohne Krystallwasser, löst sich in 17 Tl. Wasser bei 20° und schmilzt bei 211° (nach Rießer bei 216°) unter Zersetzung. Die wässrige Lösung des Nitrats wird gefällt durch Phosphorwolframsäure, Phosphormolybdänsäure, Neßlers Reagens, nicht durch Bleiessig oder Gerbsäure. Die d-Nitratlösung löst in der Wärme Kupferhydroxyd, beim Erkalten scheiden sich blaue Prismen (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>)<sub>2</sub> · Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> + 3 H<sub>2</sub>O (Fp. 112—114°) ab. d,l-Arginin-Kupfernitratt krystallisiert nach Schenk<sup>8)</sup> mit 2 H<sub>2</sub>O (Fp. 226°) und ist in Wasser leicht löslich, nach Rießer mit 3 H<sub>2</sub>O (Fp. 228—229°). Nach Sörensen schwankt der Krystallwassergehalt. Mercurinitrat ruft in Nitrat-

1) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 49, S. 210. 1906.

2) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 38, 4, S. 4187. 1905.

3) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 35, S. 314. 1902.

4) Chem. Zentralbl. 1923, III, S. 1151.

5) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 72, S. 490. 1911.

6) Biochem. Journ. Bd. 12, S. 5; ref. Chem. Zentralbl. 1918, II, S. 944.

7) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 73, S. 138. 1911.

8) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 43, S. 72. 1904/05.

lösungen keinen Niederschlag hervor, wohl aber Mercurinitrat und Natronlauge, ebenso Mercurichlorid bei Gegenwart von Barytwasser.

Durch Silbernitrat wird die Nitratlösung nicht gefällt, fügt man aber mit Silber Natronlauge oder Barytwasser hinzu, so entsteht ein weißer Niederschlag  $C_6H_{12}Ag_2N_4O_2 \cdot H_2O$ ; der im Überschuß unlöslich ist. Zusatz von Ammoniak hat keine Abscheidung zur Folge (Unterschied von Histidin). Mit Silbernitrat bildet d-Arginin 2 Salze,  $C_6H_{14}N_4O_2 \cdot HNO_3 + AgNO_3$ , Nadeln, in Wasser leicht löslich (13,75 Tl. in 100 Tl. Wasser bei  $16^\circ$ ), und  $C_6H_{14}N_4O_2 \cdot AgNO_3 + \frac{1}{2} H_2O$ , Prismen, in Wasser ziemlich schwer löslich (1,13 Tl. in 100 Tl. Wasser von  $16^\circ$ ). Zum Umkrystallisieren ist das saure Salz besser geeignet, da das basische leicht reduziert wird. d,l-Arginin bildet  $(C_6H_{14}N_4O_2 \cdot HNO_3)_2 \cdot AgNO_3 + \frac{1}{2} H_2O$ .

d-Argininpikrat  $C_6H_{14}N_4O_2 \cdot C_6H_3N_3O_7 + 2 H_2O$ , Fp.  $205-206^\circ$ , Aggregate mit Pikrinsäure feiner Nadeln, etwas leichter löslich als das Pikrolonat und auch zur Abscheidung geeignet. d,l-Pikrat ohne Krystallwasser, Fp.  $200-201^\circ$ , schwerer löslich in Wasser.

d-Argininpikrolonat  $C_6H_{14}N_4O_2 \cdot C_{10}H_8N_4O_5 + H_2O$  (S. 221), schwefelgelbe, feine mit Pikrolonsäure Nadeln, in Wasser und Alkohol sehr wenig löslich. Fp. bei  $225^\circ$  unter Zersetzung (Steudefl<sup>1)</sup> (nach Rießer bei  $231^\circ$ ). Dieses Salz ist zur Isolierung und Reinigung sehr geeignet. d,l-Pikrolonat ohne Krystallwasser, Fp.  $248^\circ$ .

d-Argininmethylesterchlorhydrat, Fp. gegen  $195^\circ$  (korr.) unter Schäumen, mit Methylalkohol in Wasser sehr leicht löslich (E. Fischer und Suzuki).

Beim Schütteln mit Benzoylchlorid und Natronlauge entsteht Dibenzoyl- mit Benzoesäure arginin, in verdünnter Natronlauge leicht löslich, aus kochendem Wasser sich in Nadelchen (Fp.  $217-218^\circ$ ) abscheidend (Gulewitsch, Lawrow<sup>2</sup>).

$\beta$ -Naphthalinsulfoverbindung (Rießer) S. 222.

mit  $\beta$ -Naphthalin-  
sulfosäure

Arginincarbonsaures Calcium (S. 224).

mit Kohlensäure.

Über weitere Verbindungen s. bei E. Schulze und Steiger, Hedin, Andere Verbindungen. Gulewitsch<sup>3</sup>).

Das salzsaure Salz zeigt in 9—10proz. Lösung  $[\alpha]_D = +10,70^\circ$  (Gulewitsch<sup>4</sup>). Ähnliche Werte fanden auch E. Schulze und Steiger<sup>5</sup>). Bei Anwesenheit von 7 Mol. oder mehr freier Salzsäure beträgt  $[\alpha]_D = +21,25^\circ$ . Das salpetersaure Salz zeigt in 10proz. Lösung  $[\alpha]_D = +9,31^\circ$ . Mit diesen Werten stimmen die von Rießer für das l-Arginin erhaltenen im umgekehrten Sinne innerhalb der Fehlergrenze überein. Optische Eigen-  
schaften.

Beim Erhitzen von Arginin mit Barytwasser entsteht Harnstoff und Ornithin Umwandlungen. (E. Schulze und Likiernik<sup>6</sup>). Dieselbe Spaltung erfährt d-Arginin durch die Arginase (Kossel und Dakin<sup>7</sup>). Beim Kochen mit Kalilauge wird die Hälfte des Stickstoffs als Ammoniak entwickelt. Bei der Oxydation mit Bariumpermanganat entstehen Guanidinbuttersäure, Guanidin und Bernsteinsäure (Bénech und Kutscher<sup>8</sup>). Durch Bromlauge wird etwa  $\frac{1}{3}$  des Stickstoffs entwickelt (Stuhetz<sup>9</sup>). Als Fäulnisprodukte sind nachgewiesen Ornithin, Tetramethyldiamin und  $\delta$ -Aminovaleriansäure (Ackermann<sup>10</sup>).

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 37, S. 219. 1902/03 u. Bd. 44, S. 157. 1905.

<sup>2</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 28, S. 585. 1899. <sup>3</sup>) desgl. Bd. 27, S. 178. 1899.

<sup>4</sup>) a. a. O., Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 27, S. 368. 1899.

<sup>5</sup>) a. a. O., Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 29, S. 329. 1900.

<sup>6</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 24, S. 2701. 1891. — E. Schulze u. Winterstein: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 26, S. 1. 1898/99. — Sörensen u. Andersen: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 56, S. 245. 1908.

<sup>7</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 41, S. 321. 1904 u. Bd. 42, S. 181. 1904.

<sup>8</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 32, S. 278 u. 413. 1901.

<sup>9</sup>) Monatshefte f. Chem. Bd. 27, S. 601. 1906.

<sup>10</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 56, S. 305. 1908 u. Bd. 69, S. 273. 1910.

Nachweis. Dem Nachweis muß die Isolierung (§ 483) vorangehen. Zur Identifizierung eignen sich am besten das Nitrat und das Kupferniträt.

Vorkommen. 184. Lysin ( $\alpha, \epsilon$ -Diaminocapronsäure)  $C_6H_{14}N_2O_2$ . Von Drechsel<sup>1)</sup> als Spaltungsprodukt des Caseins entdeckt, entsteht es bei der hydrolytischen Spaltung der Proteinstoffe. Es ist auch im Blut (Abderhalden<sup>2)</sup>, Gehirn (Rieländer<sup>3)</sup>, in Maikäfern (Ackermann<sup>4)</sup>, Fischen (Suzuki und Joshimura<sup>5)</sup>, Krabben (Kutscher und Ackermann<sup>6)</sup>, im Harn eines Cystinurikers (Kutscher und Ackermann<sup>7)</sup>, ferner in Käse (Winterstein und Thöny<sup>8)</sup>, in Keimlingen, Kartoffelknollen gefunden worden. Es handelt sich um d-Lysin; nur das bei der Spaltung mit Barytwasser (60 stündiges Kochen) erhaltene war inaktiv (Steudel<sup>9)</sup>). Durch Erhitzen mit Barytwasser auf 150° geht das aktive in die inaktive Modifikation über (Siegfried<sup>10)</sup>, bequemer durch 15 stündiges Erhitzen in salzsaurer Lösung (20 proz. Salzsäure) auf 165—170° (E. Fischer und Weigert<sup>11)</sup>).

Darstellung. Synthetisch wurde d,l-Lysin zuerst von E. Fischer und Weigert gewonnen. v. Braun<sup>12)</sup> stellte es dar vom Piperidin ausgehend mit Hilfe der Chlorphosphoraufspaltung über das Nitril des Benzoyl- $\epsilon$ -Leucins.

Die Spaltung des inaktiven in die aktiven Formen mit Hilfe der Benzoyl- oder Formylverbindung ist noch nicht versucht worden.

Über die Darstellung aus der hydrolytischen Zersetzungsflüssigkeit der Proteinstoffe und seine Bestimmung s. § 483 und § 494. Will man nur Lysin ohne Rücksicht auf die anderen Basen isolieren, so kann man es direkt aus dem Phosphorwolframsäureniederschlag über das Pikrat und das Chlorid (siehe unter „Nachweis“, S. 264) erhalten (Szydowski<sup>13)</sup>). Es wurden so aus 1,3 kg Casein 50 g Pikrat erhalten. Besonders reich an Lysin ist das Cyprinin  $\alpha$  aus Karpfen (gegen 29%) (Kossel und Dakin<sup>14)</sup>).

Eigenschaften. Das Lysin ist bis jetzt nicht krystallisiert erhalten und zersetzt sich leicht. Saure Lösungen werden durch Mercurinitrat nicht gefällt, wohl aber durch Mercurinitrat und Natronlauge (Hedin<sup>15)</sup>, ebenso durch Quecksilberchlorid bei Gegenwart von Barytwasser; durch Silbernitrat und Barytwasser werden die wässerigen Lösungen seiner Salze nicht gefällt (Unterschied von Arginin und Histidin), ebenfalls nicht durch Bleiessig und Gerbsäure; durch Phosphorwolframsäure werden sie gefällt. Durch Dinitronaphtholsulfosäure (1-Naphthol-2, 3-dinitro-7-sulfosäure) wird es gefällt; der Niederschlag (mol. Verbindung) löst sich bis zu 1,862% und ist löslicher als die entsprechenden mit Arginin und Histidin (Kossel u. Gross<sup>16)</sup>). Über Reaktion mit Diazobenzolarsinsäure s. Pauly<sup>17)</sup>. Ninhydrinreaktion S. 219, Reaktion nach v. Slyke S. 224.

Verbindungen: mit Kohlensäure Carbonat  $(C_6H_{14}N_2O_2)_2 \cdot CO_2$  und Sulfat krystallisieren. Das salzsaure Salz mit Salzsäure  $C_6H_{14}N_2O_2 \cdot 2 HCl$  schmilzt bei 192—193°, verliert beim Umkrystallisieren aus

<sup>1)</sup> Arch. f. Anat. u. Physiol. 1891, S. 248; Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 25, S. 2454. 1892.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 88, S. 478. 1913.

<sup>3)</sup> Zentralbl. f. Physiol. Bd. 22, S. 377. 1909. <sup>4)</sup> Zeitschr. f. Biol. Bd. 71, S. 193. 1920.

<sup>5)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 62, S. 1. 1909.

<sup>6)</sup> Zeitschr. f. Untersuch. d. Nahrungs- u. Genußmittel Bd. 13, S. 180 u. 610. 1907.

<sup>7)</sup> Zeitschr. f. Biol. Bd. 57, S. 355. 1912.

<sup>8)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 36, S. 28. 1902. <sup>9)</sup> desgl. Bd. 35, S. 540. 1902.

<sup>10)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 24, S. 418. 1891 u. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 43, S. 363. 1904/05.

<sup>11)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 35, 3, S. 3772. 1902. <sup>12)</sup> desgl. Bd. 42, 1, S. 839. 1909.

<sup>13)</sup> Monatshefte f. Chem. Bd. 27, S. 821. 1906.

<sup>14)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 40, S. 565. 1903/04.

<sup>15)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 21, S. 297. 1895/96.

<sup>16)</sup> Ref. Chem. Zentralbl. 1923, III, S. 1151.

<sup>17)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 94, S. 284. 1915.

nichtsalzsäurehaltigen Lösungsmitteln leicht 1 Mol. Salzsäure, ist in kaltem absoluten Alkohol fast unlöslich. Das Chlorhydrat des d,l-Lysin schmilzt bei 183—186° (korr.) (E. Fischer und Weigert). Das Platinsalz des aktiven Lysin mit Platinchlorid krystallisiert aus Alkohol in feinen Nadeln, welche nach dem Trocknen über Schwefelsäure bis zum konstanten Gewicht 1 Mol. Alkohol enthalten,  $C_6H_{14}N_2O_2 \cdot H_2PtCl_6 + C_2H_6O$ . Das Platinat des inaktiven ist nach gleicher Behandlung krystallalkoholfrei (Siegfried<sup>1</sup>). Die Golddoppelsalze sind wesent- mit Goldchlorid lich schwerer löslich in Wasser als die Platinate. Aus stark salzsaurer Lösung abgeschieden entspricht das Chloraurat des aktiven Lysin der Formel  $(C_6H_{14}N_2O_2)_2 \cdot 4 HCl \cdot 3 AuCl_3 + 2 H_2O$  (Fp. 152—155°), das des d,l-Lysin der Formel  $C_6H_{14}N_2O_2 \cdot 2 HCl \cdot AuCl_3 + H_2O$  (Zersetzung bei 173—176° (Ackermann<sup>2</sup>)).

Lysin bildet 2 Silbersalze, die den Argininsalzen entsprechen, ein in Wasser mit Silber ziemlich schwer lösliches  $C_6H_{14}N_2O_2 \cdot AgNO_3$  von alkalischer Reaktion und ein in Wasser leicht lösliches, durch Alkohol abscheidbares, in Nadeln krystallisierendes von saurer Reaktion,  $C_6H_{14}N_2O_2 \cdot HNO_3 + AgNO_3$  (Hedin).

Das in Wasser ziemlich schwer lösliche Pikrat  $C_6H_{14}N_2O_2 \cdot C_6H_3N_3O_7$  scheidet mit Pikrinsäure sich auf Zusatz von Natriumpikrat zu einer nicht zu verdünnten Lösung des salzsauren Salzes oder von alkoholischer Pikrinsäure (unter Vermeidung eines Überschusses) zu einer konzentrierten wässerigen Lösung der freien Base ab (Kossel<sup>3</sup>). Das Pikrat explodiert im Schmelzröhrchen langsam erhitzt bei 252°. Das Pikrat des d- und des d,l-Lysin ist schwerer löslich in Methylalkohol (etwa 0,1%) als das des inaktiven Ornithin und kann zur Trennung beider Basen dienen (Kossel und Weiß<sup>4</sup>).

Pikrolonat (S. 221) leicht löslich in Wasser, weniger in Alkohol. Zsp. 246—252°. mit Pikrolonsäure

Phosphorwolframat (S. 221) (Drummond<sup>5</sup>) ist in Acetonwasser reichlich mit Phosphorwolframsäure löslich (Wechsler<sup>6</sup>).

d,l-Lysinmethylesterchlorhydrat (Zsp. unscharf gegen 218°) in Wasser sehr mit Methylalkohol leicht löslich (E. Fischer und Suzuki<sup>7</sup>), d-Methylesterchlorhydrat Fp. 208—210° (Suzuki und Joshimura).

Beim Schütteln von Lysin in alkalischer Lösung mit Benzoylchlorid im mit Benzoesäure Überschuß entsteht Dibenzoyllysin (Lysursäure), dessen schwer lösliches, saures Barytsalz zur Isolierung dienen kann (Drechsel<sup>8</sup>). Die Lysursäure löst sich nur sehr wenig in kaltem Wasser, Petroläther und bei Abwesenheit von Salzsäure auch in Äther, in Alkohol dagegen leicht. Sie fällt zunächst ölig aus, krystallisiert erst allmählich in Blättchen, sie krystallisiert schneller, wenn die kalte alkoholische Lösung sehr allmählich mit Wasser versetzt wird, Fp. 144—145°. Die entsprechende Verbindung des d,l-Lysin schmilzt bei 145—146° (korr.) (E. Fischer und Weigert). Über weitere Salze der Lysursäure s. bei Willdenow<sup>9</sup>). Durch Erhitzen mit einem Gemisch gleicher Teile konzentrierter Salzsäure und Alkohol auf 120—140° zerfällt sie in Lysin und Benzoesäure.

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 76, S. 234. 1911/12.

<sup>2</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 56, S. 305. 1908.

<sup>3</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 26, S. 586. 1898/99.

<sup>4</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 68, S. 160. 1910.

<sup>5</sup>) Biochem. Journ. Bd. 12, S. 5; ref. Chem. Zentralbl. 1918, II, S. 944.

<sup>6</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 73, S. 138. 1911.

<sup>7</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 38, 4, S. 4180. 1905.

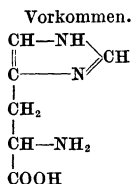
<sup>8</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 28, 3, S. 3189. 1895 und bei Gamgee: Phys. Chemie der Verdauung, deutsche Ausgabe u. Neubearbeitung von Asder u. Beyer, Deudicke 1897, S. 227; s. auch Lawrow: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 28, S. 585. 1899.

<sup>9</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 25, S. 523. 1898.

- mit Phenylisocyanat Das Hydantoin des Phenylisocyanatlysin  $C_{20}H_{22}N_4O_2$  (Fp. 183—184°) entsteht unter denselben Bedingungen wie die entsprechende Ornithinverbindung (Herzog<sup>1</sup>). Das entsprechende Hydantoin des d,1-Lysin schmilzt bei 196° (korr.) (E. Fischer und Weigert).
- mit Kohlensäure. Lysincarbonsaures Calcium (S. 224).
- Optische Eigenschaften. Das salzsaure Lysin ist rechtsdrehend, und zwar ist gefunden für 2—5proz. Lösung  $[\alpha]_D = +14-15,3^\circ$  (Henderson<sup>2</sup>),  $= +15,5^\circ$  (Szydłowski).
- Umwandlungen. Bei der Destillation geht das Lysin zum Teil in Pentamethyldiamin über (Neuberg<sup>3</sup>). Mit salpetriger Säure im Apparat von v. Slyke reagiert bei 0—1° und schwacher Konzentration nur 50% des Gesamtstickstoffes (wahrscheinlich nur die  $\alpha$ -Aminogruppe), bei 32° reagieren beide schon bei fünf Minuten langem Schütteln (Sure und Hart<sup>4</sup>). Bei der Oxydation mit Permanganat entstehen Cyanwasserstoff, Glutarsäure, Oxalsäure und wahrscheinlich auch Glutaminsäure (Zickgraf<sup>5</sup>). Durch Bakterienwirkung besonders bei Abwesenheit von Sauerstoff entsteht aus dem Lysin Pentamethyldiamin (Ellinger<sup>6</sup>), Ackermann<sup>7</sup>).
- Nachweis. Dem Nachweis muß die Isolierung (§ 483) vorangehen. Zur Identifizierung eignet sich am besten das Pikrat. Aus demselben läßt sich durch Schütteln seiner salzsauren Lösung mit Äther und Verdampfen der wässerigen Lösung das Chlorid gewinnen. Um es zu reinigen, löst man es in heißem Methylalkohol, verdunstet zum Sirup und versetzt den Rückstand mit wenig heißem absoluten Alkohol. Beim Erkalten krystallisiert das Chlorid. Auch die Goldsalze sind für die Identifizierung und Unterscheidung des aktiven und inaktiven Lysin geeignet.
- Isomere Verbindungen. Dem Lysin isomere Verbindungen sind von Winterstein<sup>8</sup>) aus hydrolysiertem Ricinussamen, von Krimberg<sup>9</sup>) aus Liebig's Fleischextrakt, von Suzuki<sup>10</sup>) aus Fischfleisch (Kanirin, S. 214) gewonnen. Vielleicht liegen Methylornithine vor. S. dazu auch E. Fischer und Bergmann<sup>11</sup>).
- Lysatin, Lysatinin. Lysatin  $C_6H_{13}N_3O_2$ , Lysatinin  $C_6H_{11}N_3O$ . Diese Basen wurden von Drechsel<sup>12</sup>) und seinen Mitarbeitern neben dem Lysin unter den hydrolytischen Zersetzungsprodukten von Eiweiß und Leim aufgefunden und als in schönen silberglänzenden, weißen, langen Nadeln krystallisierende Silberdoppelsalze erhalten. Nach Hedin<sup>13</sup>) lag höchstwahrscheinlich ein Gemenge der entsprechenden Lysin- und Argininsalze vor. Vgl. indessen dazu Siegfried<sup>14</sup>).

### Imidazolderivate.

Vorkommen. 185. Histidin ( $\beta$ -Imidazol- $\alpha$ -Aminopropionsäure)  $C_6H_9N_3O_2$ . Diese von Kossel<sup>15</sup>) unter den Spaltungsprodukten des Sturins entdeckte Base ist von Pauly<sup>16</sup>) als Imidazolverbindung erkannt worden. Der endgültige Beweis für die Konstitution ist durch die Untersuchungen von Knoop und Windaus<sup>17</sup>)



- <sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 34, S. 525. 1901/02.
- <sup>2</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 29, S. 320. 1900. — Lawrow: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 28, S. 388. 1899.
- <sup>3</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 45, S. 118. 1905.
- <sup>4</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 31, S. 527. 1917.
- <sup>5</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 35, 3, S. 3401. 1902.
- <sup>6</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 29, S. 334. 1900. <sup>7</sup>) desgl. Bd. 69, S. 273. 1910.
- <sup>8</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 45, S. 69. 1905. <sup>9</sup>) desgl. Bd. 55, S. 477. 1908.
- <sup>10</sup>) Chem. Zentralbl. 1913, I, S. 1042.
- <sup>11</sup>) Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 398, S. 96. 1913.
- <sup>12</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 23, 2, S. 3096. 1890. Arch. f. Anat. u. Physiol. 1891, S. 248.
- <sup>13</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 21, S. 297. 1895/96.
- <sup>14</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 35, S. 192. 1902.
- <sup>15</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 22, S. 176. 1896/97.
- <sup>16</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 42, S. 508. 1904.
- <sup>17</sup>) Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 7, S. 144. 1906 u. Bd. 8, S. 406. 1906.



Gut krystallisierende Platinchlorid- und Silbernitratdoppelsalze (Kossel<sup>1</sup>). mit Platinchlorid und Silbernitrat  
 l-Histidinimidazol, zu 0,67% in Wasser lösliche, in Alkohol unlösliche mit Imidazol-  
 Nadeln, die sich bei 253—254° zersetzen (Pauly und Ludwig<sup>2</sup>). dicarbonsäure

l-Histidincadmiumchlorid, wahrscheinlich  $C_6H_9N_3O_2 \cdot HCl \cdot CdCl_2$ , in kaltem mit Cadmiumchlorid  
 und heißem Alkohol nahezu unlöslich, in Wasser leicht löslich. Fp. 270—275°  
 unter Aufschäumen (Schenk<sup>3</sup>).

l-Histidinphosphorwolframat (S. 221) (Drummond<sup>4</sup>), reichlich in Aceton- mit Phosphor-  
 wasser löslich (Wechsler<sup>5</sup>). wolframsäure

l-Histidinmonopikrolonat  $C_6H_9N_3O_2 \cdot C_{10}H_8N_4O_5$  (S. 221) hellgelbe Nadeln, mit Pikrolonsäure  
 entsteht beim Zusammenbringen von Histidin und Pikrolonsäure in molekularen  
 Mengen. Schwer löslich in kochendem Wasser 1 : 80. Zersetzungspunkt 232°  
 (Steudel<sup>6</sup>), Brigl<sup>7</sup>).

l-Histidindipikrolonat, orangefarbene Krystalle, entsteht beim Zusammen-  
 bringen von 1 Mol. Histidin und 2 Mol. Pikrolonsäure, ferner wenn man von  
 Mono- und Dichlorhydrat ausgeht. In kochendem Wasser 1 : 150 löslich. Siehe  
 darüber bei Brigl<sup>7</sup>). Lysin bildet kein schwer lösliches Pikrolonat.

l-Histidin-Methylesterdichlorhydrat, flache, in Wasser sehr leicht lösliche mit Methylalkohol  
 Prismen, Fp. 196° (Pauly), E. Fischer und Cone<sup>8</sup>).

p-Nitrobenzoyl-l-Histidin, Nadeln, Fp. 251—252°, schwer in kaltem, leicht mit Nitrobenzoe-  
 in heißem Wasser löslich, nur spurenweise in kochendem Alkohol, in Basen und säure  
 Mineralsäuren löslich (Pauly<sup>9</sup>).

Di- $\beta$ -naphthalinsulfo-histidin  $C_6H_7N_3O_2 \cdot 2 C_{10}H_7SO_2$  (S. 222), atlasglänzende mit  $\beta$ -Naphthalin-  
 feine Nadelchen, fast unlöslich in Wasser, leicht löslich in Eisessig, schwerer in sulfosäure.  
 Alkohol, Fp. 149—150° (Pauly<sup>10</sup>).

Für l-Histidin  $[\alpha]_D = -39,74^\circ$ . Die salzsaure Lösung dreht rechts, und zwar Optische Eigen-  
 schaften.

bei 1 Mol. Base auf 1 Mol. HCl  $[\alpha]_D = +2,14^\circ$   
 „ 1 „ „ „ 2 „ „  $[\alpha]_D = +7,82^\circ$   
 „ 1 „ „ „ 4 „ „  $[\alpha]_D = +9,49^\circ$  (Kossel).

Für d-Histidin  $[\alpha]_D^{23} = +39,3^\circ$  (Pyman),  $[\alpha]_D^{20} = +40,15^\circ$  (Abder-  
 halden und Weil).

Durch Einwirkung von Silbernitrit entsteht aus Histidinchlorid Oxydes- Umwandlungen.  
 aminohistidin (Imidazolmilchsäure)  $C_6H_8N_2O_3 + H_2O$  (Fränkel); dieses gibt  
 mit Jodwasserstoff und Phosphor Imidazolpropionsäure (Knoop und Windaus),  
 mit Salpetersäure Imidazolglyoxyssäure, aus welcher durch Wasserstoffhyperoxyd  
 Imidazolcarbonsäure entsteht und mit Bariumpermanganat in saurer Lösung  
 unter bestimmten Bedingungen Imidazolessigsäure. Die Imidazolcarbonsäure  
 spaltet beim Erhitzen über 286° Kohlensäure ab und es entsteht Imidazol  
 (Knoop). Beim Erhitzen des Histidinmethylesters im Vakuum im Wasserbad  
 entsteht Histidinanhydrid (E. Fischer und Suzuki<sup>11</sup>), Pauly<sup>12</sup>). Beim Er-  
 hitzen mit Kalk entstehen Ammoniak und Dämpfe, welche mit einem Fichtenspan  
 und rauchender Salzsäure Pyrrolreaktion geben (Fränkel).

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 28, S. 382. 1899. <sup>2</sup>) desgl. Bd. 121, S. 165. 1922.

<sup>3</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 43, S. 72. 1904/05.

<sup>4</sup>) Biochem. Journ. Bd. 12, S. 5; ref. Chem. Zentralbl. 1918, II, S. 944.

<sup>5</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 73, S. 138. 1911.

<sup>6</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 37, S. 219. 1902/03 u. Bd. 44, S. 157. 1905.

<sup>7</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 64, S. 337. 1910.

<sup>8</sup>) Ann. d. Chem. Bd. 363, S. 108. 1908.

<sup>9</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 64, S. 75. 1910.

<sup>10</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 42, S. 508. 1904.

<sup>11</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 38, 4, S. 4184. 1905.

<sup>12</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 64, S. 75. 1910.

Bei der Oxydation mit Bariumpermanganat in neutraler oder alkalischer Lösung tritt Blausäure, Kohlensäure und Ammoniak auf (Herzog<sup>1</sup>).

Aus l-Histidin entsteht durch Hefe Histidol ( $\beta$ -Imidazoläthylalkohol) (Ehrlich<sup>2</sup>), durch Fäulnis Histamin (§ 159) und  $\beta$ -Imidazolpropionsäure (Ackermann<sup>3</sup>), durch Colibakterien Urocaninsäure (§ 186) (Raistrick<sup>4</sup>). Über Einwirkung von Bakterien auf Histidin s. weiter Hirai<sup>5</sup>) und Koeßler und Hanke<sup>6</sup>). Hunde führen Histidin in Urocaninsäure über (Kotake und Konishi<sup>7</sup>).

Nachweis. Zur Identifizierung des isolierten (§§ 483, 488) Histidin eignet sich wohl am besten das salzsaure Salz, außerdem die Silberverbindung. Ferner gibt das Histidin folgende Reaktionen:

1. Versetzt man eine Histidinlösung mit Kalilauge und einer Spur Kupfersulfat und erwärmt, so tritt Violettfärbung und allmählich Rotfärbung auf (Biuretreaktion) (Herzog).

2. Trägt man in eine Lösung von Histidinchlorid in verdünnter Salzsäure bei gelinder Erwärmung Kaliumchlorat in mäßiger Menge ein, verdampft fast zur Trockne, fügt mit einer Spur Salpetersäure versetztes frisches Chlorwasser hinzu, verdampft wieder zur Trockne und behandelt nun mit Ammoniakdampf, so tritt lebhaft rote Färbung auf, die bei Zusatz von wenig Natronlauge in Rotviolett übergeht (Weidelsche Reaktion) (Fränkel).

3. Versetzt man eine Histidinlösung mit überschüssiger Sodalösung und darauf mit 3—5 ccm einer unmittelbar vorher bereiteten sodaalkalischen Lösung von einigen Zentigrammen Diazobenzolsulfosäure, so tritt sofort oder nach wenigen Minuten eine dunkelkirschrote Färbung auf, die selbst beim Verdünnen mit der vielfachen Menge Wasser keinen Stich ins Gelbe bekommt (Unterschied von Tyrosin), aber beim Ansäuern in ein reines Orange übergeht. Bei einer Verdünnung von 1 : 20 000 ist die Färbung in dickeren Schichten noch dunkelkirschrot, bei einer Verdünnung von 1 : 100 000 noch blaßrot (Diazoreaktion). Weiteres über diese Reaktion und Angaben über die Herstellung der Diazobenzolsulfosäure s. bei Pauly.

Unterscheidung von Histidin und Tyrosin. Um zwischen Histidin und Tyrosin zu unterscheiden, schüttelt man die zu prüfende Lösung in einem Reagensglas nach Zusatz von überschüssiger Sodalösung mit einigen Tropfen Benzoylchlorid, bis der Geruch verschwunden ist. Fügt man nun Diazobenzolsulfosäure hinzu, so entsteht keine Rotfärbung wenn Tyrosin, wohl aber, wenn Histidin vorliegt (Inouje<sup>8</sup>). Nach Totani<sup>9</sup>) reduziert man die rotgefärbte Lösung mit Zinkstaub und Salzsäure und macht dann mit Ammoniak alkalisch: bei Tyrosin entsteht eine rosarote, bei Histidin eine goldgelbe Färbung. Während letztere für Histidin spezifisch ist, ist es die rosarote nicht für Tyrosin. Da aber die ursprüngliche Diazoreaktion nur bei Tyrosin und Histidin auftritt, so gelingt mit dieser Reaktion auch der Nachweis des Tyrosins.

4. Man versetzt eine wässrige Histidin- oder Histidinsalzlösung (welche kein freies Alkali enthalten darf) mit Bromwasser, bis die Gelbfärbung nicht mehr verschwindet, sondern gerade bestehen bleibt. Erhitzt man jetzt, so wird die Lösung zunächst wieder farblos, um nach kurzem eine rötliche Färbung

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 37, S. 248. 1902/03.

<sup>2</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 36, S. 479. 1911.

<sup>3</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 65, S. 504. 1910. — Berthelot u. Bertram: Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 154, S. 1643 u. 1826. 1912. Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 156, S. 1027. 1913. Mellanby u. Twort: Journ. of physiol. Bd. 45, S. 53. 1912/13.

<sup>4</sup>) Biochem. Journ. Bd. 11, S. 71; ref. Chem. Zentralbl. 1917, II, S. 226.

<sup>5</sup>) Chem. Zentralbl. 1920, III, S. 489.

<sup>6</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 39, S. 539. 1919 u. Bd. 50, S. 131. 1922.

<sup>7</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 122, S. 230. 1922. <sup>8</sup>) desgl. Bd. 83, S. 79. 1913.

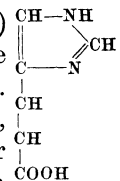
<sup>9</sup>) Biochem. Journ. Bd. 9, S. 385; ref. Chem. Zentralbl. 1916, II, S. 1014.

anzunehmen, die sich zu dunklem Weinrot vertieft. Schließlich scheiden sich schwarze amorphe Teilchen ab, die die Lösung schmutzig trüben. In Lösungen von 1:1000 entsteht noch eine charakteristische Färbung (Knoop<sup>1</sup>). Carnosin gibt diese Reaktion nicht (Hunter<sup>2</sup>).

Nach Hunter<sup>2</sup>) wird die Probe wenigstens zehnmal empfindlicher und besonders in gefärbten Lösungen auch sicherer, wenn man zunächst einen Überschuß von Brom zufügt und diesen vor dem Erhitzen durch wiederholtes Ausschütteln mit Chloroform entfernt.

186. Urocaninsäure ( $\beta$ -Imidazol-acrylsäure)  $C_6H_6N_2O_2$  wurde bisher nur 2 mal, und zwar im Hundeharn, aufgefunden von ihrem Entdecker Jaffe<sup>3</sup>) und von Siegfried<sup>4</sup>). Bei beiden Hunden war sie regelmäßig vorhanden. Sie erscheint im Hundeharn nach Eingabe von Histidin (Kotake und Konishi<sup>5</sup>). Hunter<sup>6</sup>) isolierte sie aus einer 7 Monate alten tryptischen Caseinverdauung, konnte sie aber bei wiederholten Untersuchungen nicht wiedererhalten. Hunter stellte auch ihre Identität mit der von Barger und Ewins<sup>7</sup>) (aus dem Betain des Thiohistidin und auf andere Weise) dargestellten  $\beta$ -Imidazolacrylsäure fest.

Vorkommen.



Zu ihrer Darstellung wurde der zum Sirup eingedampfte Harn mit heißem Alkohol wiederholt extrahiert und der Rückstand der alkoholischen Auszüge nach dem Ansäuern mit Schwefelsäure mit Äther mehrmals ausgeschüttelt. Nach dem Abgießen des Äthers scheidet sich aus der sauren Flüssigkeit das schwefelsaure Salz ab. Siegfried empfiehlt den durch Kalkwasser von den Phosphaten befreiten Harn mit Chlorzink auszufällen und den Niederschlag mit Schwefelwasserstoff zu zersetzen.

Darstellung.

Sie krystallisiert in Prismen oder Nadeln mit 2 Mol. Krystallwasser. Behandelt man ein wenig der krystallwasserhaltigen Substanz mit 1 Tropfen Eisessig, so lösen sich die Krystalle zunächst, um, besonders beim Reiben, sofort wieder auszufallen. Sie löst sich in heißem Wasser, schwer in kaltem, nicht in Alkohol und Äther, und verbindet sich mit Säuren und mit Basen. Schmelzpunkt ist nicht charakteristisch, sehr abhängig von der Art des Erhitzens (s. weiter unten), 224° (korr.), 231—232° (korr.) unter Zersetzung.

Eigenschaften.

Die wässrige Lösung ist inaktiv, wird gefällt durch Silbernitrat (Niederschlag ist in Salpetersäure und in Ammoniak leicht löslich), Sublimat, Phosphorwolframsäure, Pikrolonsäure; Pikrinsäure fällt langsam, wenn gesättigte Lösungen benutzt werden. Mit Diazobenzolsulfosäure und Natriumcarbonat Rotfärbung. Alkalische Permanganatlösung wird sofort reduziert. Keine Reaktion mit salpetriger Säure.

Beim Zusammenbringen einer wässrigen Lösung mit dem gleichen Volumen 50 proz. Salpetersäure scheidet sich schnell ein schwerer mikrokrystallinischer Niederschlag des Nitrats in charakteristischen Formen ab. Pikrolonat in kochendem Alkohol sehr schwer, etwas leichter in kochendem Wasser löslich. Das Bariumsalz krystallisiert mit 4 Mol. Wasser, von denen 3 bei 100° entweichen, in Wasser löslich, in Alkohol unlöslich.

Verbindungen:

mit Salpetersäure

mit Pikrolonsäure

mit Barium.

Sie schmilzt unter Bildung von Kohlensäure und etwas Wasser und Zurücklassung eines gelbbraunen Öls, welches beim Erkalten zu einer glasigen, durchscheinenden, grünlich fluoreszierenden Masse erstarrt, die sich in Alkohol leicht, schwer in kaltem, leichter in heißem Wasser löst. Diese noch nicht krystallisiert erhaltene Substanz, Urocanin, ist eine stark alkalisch reagierende

Umwandlung

<sup>1</sup>) Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 11, S. 356. 1908.

<sup>2</sup>) Biochem. Journ. Bd. 16, S. 637. 1922.

<sup>3</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 7, S. 1669. 1874 u. Bd. 8, 1, S. 811. 1875.

<sup>4</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 24, S. 399. 1898. <sup>5</sup>) desgl. Bd. 122, S. 230. 1922.

<sup>6</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 11, S. 537. 1912.

<sup>7</sup>) Journ. of the chem. soc. (London) Bd. 99, S. 2336. 1911.

Base, welche ein Platindoppelsalz bildet (Jaffe), mit ammoniakalischer Silberlösung sowie mit Kupfersulfat und Natriumbisulfit Niederschläge gibt und die Xanthinreaktion (S. 176) zeigt (Siegfried). Sie bedarf weiterer Untersuchung. Über die Einwirkung von Brom auf Urocaninsäure s. bei Siegfried.

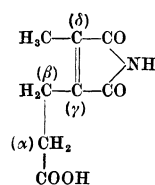
der Urocaninsäure  
ähnliche Ver-  
bindung.

Verbindung  $C_{12}H_9N_4O_4 + H_2O$ , bei  $208^\circ$  schmelzende Krystalle, in Zusammensetzung und allgemeinen Eigenschaften der Urocaninsäure ähnlich, wurde von Swain<sup>1)</sup> aus Harn von *Canis ochropus* isoliert. Im Harn von *Canis latrans* konnten Hunter und Givens<sup>2)</sup> sie nicht finden.

### Pyrrolderivate<sup>3)</sup> \*).

(Bearbeitet von P. Briegl-Tübingen.)

Entstehung. Sie sind als Oxydations- und Reduktionsprodukte aus Blut- und Gallenfarbstoffen erhalten worden. Eins, das Chitopyrrol, entsteht bei der Zinkstaubdestillation des Chitins.



187. Imid der dreibasischen Hämatinsäure  $C_8H_9O_4N$  (Imid der  $\gamma$ - $\delta$ -Penten- $\alpha$ - $\gamma$ - $\delta$ -Tricarbonsäure). Als erstes krystallisiertes niederes Abbauprodukt aus Hämatin durch Oxydation mit Chromsäure-Eisessig von Küster<sup>4)</sup> erhalten, auch direkt aus Hämin<sup>4, 5)</sup>, aus Hämatoporphyrin<sup>4, 6)</sup>, Mesoporphyrin<sup>7)</sup>, Koproporphyrin<sup>8)</sup>, Bilirubin<sup>9)</sup> gewinnbar. Seine Konstitution ist durch die Synthese erhärtet (Küster und Weller<sup>10)</sup>. Die Oxydation des Dimethylesters des Hämatins führt zum Methylester dieser Hämatinsäure (Küster und Greiner<sup>11)</sup>).

Darstellung. Zur Darstellung geht man am bequemsten von Hämatoporphyrin aus, wobei man sofort ein sehr reines Imid erhält, während sonst mehr oder weniger von dem Anhydrid der dreibasischen Hämatinsäure (§ 189) beigemischt ist infolge sekundärer partieller Ammoniakabspaltung.

Man löst 5 g amorphes Hämatoporphyrin in einem Gemisch von 500 ccm Wasser und 20 g konzentrierter Schwefelsäure und trägt in die auf  $55^\circ$  erwärmte Lösung 11,7 g Chromtrioxyd, gelöst in 100 ccm Wasser von  $55^\circ$ , ein. Man erhitzt 1 Stunde im Wasserbad und vertreibt die flüchtigen organischen Säuren durch Vakuumdestillation bei Wasserbadtemperatur. Den Destillationsrückstand, den man von ausgeschiedenen Flocken abfiltriert, äthert man nach dem Erkalten erschöpfend aus, setzt dann nochmals zur wässrigen Lösung 2 g Schwefelsäure, erwärmt nochmals auf dem Wasserbad, wobei sich ein Harz ausscheidet, von dem man abgießt, und äthert abermals aus. Die vereinigten Ätherauszüge dampft man ab, wobei man 3 g einer schon recht reinen Rohsäure erhält. Zur weiteren Reinigung nimmt man mit Wasser auf und setzt 0,1 g Calciumcarbonat hinzu, wodurch die stärker sauren Verunreinigungen, Bernsteinsäure und das Anhydrid der Hämatinsäure in nichtätherlösliche Kalksalze übergehen. Ausäthern der wässrigen Lösung ergibt das gereinigte Imid,

\*) Es werden hier nur die einkernigen behandelt. Weiter siehe § 285 ff.

<sup>1)</sup> Amer. Journ. of physiol. Bd. 13, S. 30. 1905.

<sup>2)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 8, S. 449. 1910/11.

<sup>3)</sup> Zusammenfassung bei Küster: Handb. d. biol. Arbeitsmethoden, Teil I, Abt. 8, S. 251. 1922.

<sup>4)</sup> Habilitationsschrift, Tübingen 1896. Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 32, 1, S. 677. 1899. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 28, S. 1. 1899; Bd. 44, S. 391. 1905; Bd. 61, S. 174. 1909. Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 315, S. 174. 1901.

<sup>5)</sup> Willstätter u. Asahina: Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 373, S. 237. 1910.

<sup>6)</sup> Küster: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 61, S. 174. 1909.

<sup>7)</sup> Küster: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 45, 2, S. 1945. 1912.

<sup>8)</sup> H. Fischer: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 98, S. 21. 1916.

<sup>9)</sup> Küster: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 30, 2, S. 1831. 1897. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 59, S. 89. 1909.

<sup>10)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 47, 1, S. 532. 1914. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 99, S. 229. 1917.

<sup>11)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 45, 2, S. 2503. 1912.

das aus der gleichen Menge warmem Wassers oder Essigester umkrystallisiert wird (Küster).

Will man von Hämin ausgehen, so arbeitet man zweckmäßig in stark schwefelsaurer Lösung in der Kälte (Willstätter).

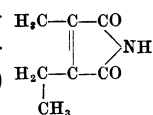
Das Imid krystallisiert aus heißem Wasser in zu Drusen vereinigten Nadeln, Eigenschaften. ist in Wasser, Alkohol, Äther, Essigester, namentlich in der Wärme, sehr leicht löslich (in Wasser von Zimmertemperatur zu 4%), schmilzt, wenn bis 100° rasch erhitzt wird, bei 113,5—114,5°.

Es gibt mit zweiwertigen Metallen eine Reihe gut krystallisierender Salze. Salze. Das Kalksalz krystallisiert aus Wasser in zu Drusen vereinigten Nadeln, die, im Vakuum getrocknet, der Formel  $(C_8H_8NO_4)_2Ca + H_2O$  entsprechen. Es ist in heißem Wasser leichter löslich als in kaltem, während das Kalksalz des Anhydrids der Hämatinsäure sich beim Erwärmen abscheidet, was zur Trennung der Säuren benutzt wird.

Über Methyl- und Äthylester sämtlicher Hämatinsäuren s. Küster<sup>1)</sup>.

Beim Erhitzen mit alkoholischem Ammoniak im Rohr auf 130° und ebenso Umwandlungen. bei der trockenen Destillation entsteht aus dem Imid unter Kohlensäure-  
abspaltung das Imid der zweibasischen Hämatinsäure (§ 188). Beim Erhitzen mit 50proz. Schwefelsäure oder mit Barytwasser läßt es sich recht  
glatt verseifen und in das Anhydrid der dreibasischen Hämatinsäure (§ 189) überführen. Diese Umwandlung läßt sich auch bewirken, indem man  
das Imid durch Salzsäure und Alkohol verestert, den Ester mit wässrigem Ammoniak bis zu seiner Lösung schüttelt, aus dem hierbei entstandenen Di-  
ammoniumsalz nach Ansäuern mit Schwefelsäure den Ester mit Äther extrahiert und verseift (Küster).

**188. Imid der zweibasischen Hämatinsäure  $C_7H_8O_2N$**  (Methyläthylmaleinsäureimid). Über seine Gewinnung aus dem Imid der dreibasischen Hämatinsäure s. oben. Es entsteht direkt bei der Oxydation von Mesoporphyrin (Küster<sup>2)</sup> und aus vielen Chlorophyllabkömmlingen (Willstätter und Asahina<sup>3)</sup>, schließlich bei der Oxydation der Hämopyrrole (Küster<sup>4)</sup>. Es krystallisiert in farblosen rhombischen Nadeln, ist in Äther und Alkohol leicht, in kaltem Wasser schwer löslich, reagiert neutral, erinnert in seinem Geruch an Juchtenleder. Fp. 68°. Es stimmt in allen Punkten mit dem synthetisch dargestellten überein (Küster und Haas<sup>5)</sup>).

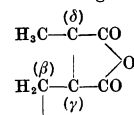


Bei der Verseifung mit Barytwasser geht aus ihm das Bariumsalz einer Säure hervor, die in freiem Zustande nur als Anhydrid existiert. Dieses Anhydrid  $C_7H_8O_3$ , ein farbloses Öl (Kp. 229 bis 230°), ist mit dem ebenfalls synthetisch dargestellten Methyläthylmaleinsäureanhydrid  $C_7H_8O_3$  identisch (Küster).

**189. Anhydrid der dreibasischen Hämatinsäure  $C_8H_8O_5$**  (Anhydrid der  $\gamma, \delta$ -Penten- $\alpha, \gamma, \delta$ -Tricarbonsäure). Über seine Gewinnung aus dem Imid s. oben. Es bildet sich, wenn bei Oxydationen des Blut- oder Blattfarbstoffs die Temperatur zu hoch steigt. Es ist auch synthetisch zu erhalten (Küster und Weller<sup>6)</sup>).

Es krystallisiert, aber in verschiedenen Formen, kann auch zunächst als Öl auftreten. Fp. 97—98°. Es ist in Alkohol, Äther, Eisessig verhältnismäßig leicht, in heißem Wasser sehr leicht löslich. Man krystallisiert am besten aus der 3fachen Menge Wasser. Seine wässrige Lösung zersetzt die Carbonate der alkalischen Erden in der Kälte, beim Erhitzen der klaren Lösung scheiden sich

Entstehung.



Eigenschaften.

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 54, S. 501. 1907/08.

<sup>2)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 45, 2, S. 1945. 1912.

<sup>3)</sup> Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 373, S. 237. 1910.

<sup>4)</sup> desgl. Bd. 346, S. 1. 1906.

<sup>5)</sup> Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 345, S. 10. 1906.

<sup>6)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 99, S. 229. 1917.

basische Salze fast quantitativ ab. Über Methyl- und Äthylester und über Anilinanlagerungsprodukte s. Küster<sup>1)</sup>.

Umwandlungen. Mit alkoholischem Ammoniak im zugeschmolzenen Rohr auf 100–110° erhitzt wird es in das Imid zurückverwandelt. Diese Umwandlung vollzieht sich auch sehr glatt, wenn man das Ammoniaklagerungsprodukt des Methyl-esters des Anhydrids unter vermindertem Druck destilliert. Dabei wird je 1 Mol. Wasser und Ammoniak abgespalten und es entsteht der Ester des Imids, welcher mit 10proz. Schwefelsäure auf dem Wasserbad verseift werden kann, ohne daß der Imidring angegriffen wird (Küster).

Mit alkoholischem Ammoniak im Rohr auf 130° erhitzt geht es unter Kohlensäureabspaltung und Ersatz eines Sauerstoffatoms durch die Imidgruppe in das Imid der zweibasischen Hämatinsäure über (s. oben). Bei der trockenen Destillation bildet sich aus dem Anhydrid Methyläthylmaleinsäureanhydrid, bei der Oxydation mit Kaliumpermanganat in schwefelsaurer oder mit Natriumbichromat in essigsaurer Lösung entsteht Bernsteinsäure, bei der Reduktion mit Zinkstaub und Essigsäure entstehen zwei stereoisomere, dreibasische, optisch inaktive gesättigte Säuren C<sub>8</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> (Hämotricarbonsäure), die sich nur durch ihren Schmelzpunkt (175° und 141°) und Löslichkeitsverhältnisse unterscheiden (Küster und Merger<sup>2)</sup>).

### Hämopyrrole und Hämopyrrolcarbonsäuren<sup>3)</sup>.

Allgemeines. 190. Bei der energischen Reduktion von Hämin mit Jodwasserstoff-Eisessig erhielten Nencki und Zaleski<sup>4)</sup> das sog. Hämopyrrol, ein zunächst als einheitlich angesehenes substituiertes basisches Pyrrol, das dann durch Willstätter und Asahina<sup>5)</sup>, gleichzeitig auch durch H. Fischer und Bartolomäus<sup>6)</sup> als ein Gemisch mehrerer Pyrrole erkannt wurde, Hämopyrrol als Hauptprodukt, daneben Kryptopyrrol, Phyllopyrrol und Methyl-Äthylpyrrol (§§ 191–194). Als ein analoges Gemisch erwies sich das zuerst von Nencki und Marchlewski<sup>7)</sup> erhaltene Reduktionsprodukt verschiedener Chlorophyll-derivate (Willstätter und Asahina). Piloty<sup>8)</sup> beobachtete bei der Reduktion von Hämatoporphyrin mit Zinn und Salzsäure das Auftreten von sauren Spaltprodukten, den Hämo- oder Phono-pyrrolcarbonsäuren (§§ 195–196), die sich aber auch, gleichzeitig mit dem Hämopyrrol, bei der Reduktion mit Jodwasserstoff-Eisessig isolieren lassen (H. Fischer und Röse<sup>9)</sup>). Dieselben Reduktionsprodukte bilden sich auch aus Gallenfarbstoff (Piloty und Tannhauser<sup>10)</sup>, H. Fischer und Röse<sup>11)</sup>. Eine reduktive Spaltung ist bei Hämin<sup>12)</sup> und seinen Porphyrinen, auch beim Gallenfarbstoff<sup>13)</sup>, durch Kaliummethylat in Methylalkohol bei 220

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 54, S. 501. 1907/08.

<sup>2)</sup> Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 345, S. 1. 1906.

<sup>3)</sup> Zusammenfassende Darstellungen der Hämopyrrolfrage bei H. Fischer: *Ergebn. d. Physiol.* Bd. 15, S. 200. 1916 u. Küster: *Handb. d. biol. Arbeitsmethoden*, Teil I, Abt. 8, S. 270. 1922.

<sup>4)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 34, 1, S. 997. 1901.

<sup>5)</sup> Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 385, S. 188. 1911.

<sup>6)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 44, 3, S. 3313. 1911; Bd. 45, 2, S. 1979. 1912.

<sup>7)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 34, 2, S. 1687. 1901.

<sup>8)</sup> Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 366, 5, S. 237. 1909; Bd. 377, S. 328. 1910.

<sup>9)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 47, 1, S. 791. 1914.

<sup>10)</sup> Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 390, S. 202. 1912.

<sup>11)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 73, S. 225. 1911. Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 45, 3, S. 3274. 1912. — Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 89, S. 267. 1914.

<sup>12)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 87, S. 38. 1913.

<sup>13)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 46, 1, S. 439. 1913. — Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 89, S. 269. 1914.

bis 230° unter starkem Druck zu erzielen, wobei sich Phyllopyrrol und Phyllopyrrolcarbonsäure bilden (H. Fischer und Röse). Beim Gallenfarbstoff ist bei der Reduktion mit Jodwasserstoff-Eisessig eine völlige Aufspaltung nur schwer zu erzielen. Die Basenfraktion besteht aus sehr wenig Kryptopyrrol. Als Hauptprodukte bilden sich Phonopyrrolcarbonsäuren, während bei weniger energischer Einwirkung die zweikernige Bilirubinsäure entsteht (§ 296).

Will man aus Hämin neben den Hämopyrrolen auch die Phonopyrrolcarbonsäuren gewinnen, folgt man zweckmäßig der von Fischer und Bartolomäus angegebenen Modifikation des Verfahrens von Nencki-Zaleski. 50 g Hämin werden in eine Mischung von 830 ccm Eisessig und 420 ccm Jodwasserstoff (spez. Gewicht 1,96) eingetragen und 1 Stunde damit im siedenden Wasserbad erwärmt. Durch Zusatz von etwa 40 g Jodphosphonium wird das ausgeschiedene Jod reduziert, wodurch die Mischung fast farblos wird. Man destilliert bei 80° im Vakuum das Säuregemisch ab, löst den grünbraunen Rückstand in Wasser und macht, unter starkem Schütteln, mit Soda schwach alkalisch. Durch Destillation mit Wasserdampf im Kohlensäurestrom erhält man ein Destillat A, das die Pyrrole enthält, und einen Rückstand B, der die Phonopyrrolcarbonsäuren enthält.

Hämin, Reduktion  
mit HJ-Eisessig.

Das Destillat A wird 3 mal mit Äther durchgeschüttelt, der Äther mit Natriumsulfat getrocknet und der Äther durch Evakuieren bei Zimmertemperatur entfernt. Es bleiben etwa 13 g an Pyrrolgemisch übrig. Diese Menge reicht aus, um Hämo-, Krypto- und Phyllopyrrol zu gewinnen; will man jedoch auch das Methyläthylpyrrol gewinnen, auf das zuerst Piloty und Stock<sup>1)</sup> aufmerksam machten, so muß man die Pyrrolgemische von 5 Darstellungen vereinigen, also von insgesamt 250 g Hämin ausgehen (H. Fischer und Eis-mayer<sup>2)</sup>). Hier wird der Vollständigkeit halber die Verarbeitung der großen Menge beschrieben, wobei die durch Willstätter und Asahina vorgeschlagene fraktionierte Fällung mit Pikrinsäure benutzt wird.

Trennung des  
Hämopyrrol-  
gemisches.

64,5 g des Pyrrolgemisches werden mit 64 ccm Äther gemischt, unter kräftigem Umschütteln 520 ccm einer 10proz. ätherischen Pikrinsäurelösung eingetragen und nach viertelstündigem Stehen in Eis der entstandene Niederschlag I (Rohpikrat des Hämopyrrols) abgesaugt. Man wäscht den Niederschlag mit 480 ccm ätherischer Pikrinsäure, vereinigt Waschflüssigkeit und Mutterlauge und läßt wieder in Eis stehen. Der Niederschlag II (Rohpikrat des Kryptopyrrols) wird abgesaugt, diese zweite Mutterlauge nochmals mit 520 ccm Pikrinsäurelösung versetzt und, ohne Rücksicht auf sich abscheidende Krystalle, die Lösung im Luftstrom von Äther völlig befreit. Man arbeitet den Rückstand mit viel Petroläther durch, wobei ein Rückstand III (Rohpikrat des Phyllopyrrols) bleibt. Die Petrolätherlösung wird durch Schütteln mit verdünnter Natronlauge von Pikrinsäure befreit, mit Natriumsulfat getrocknet und abdestilliert. Der Rückstand — nur etwa 2 g — wird durch Destillation bei 15 mm Druck gereinigt. Das bei 75—80° übergehende Öl ist das 3-4-Methyläthylpyrrol.

Trennung als  
Pikrate.

Hämopyrrol.

Kryptopyrrol.

Phyllopyrrol.

3-4-Methyläthylpyrrol.

Die Reinigung der Rohpikrate kann durch Umkrystallisieren aus Alkohol erfolgen. Bei der Veränderlichkeit der Pyrrole ist jedoch dafür zu sorgen, daß die Berührung mit dem Alkohol zeitlich möglichst beschränkt bleibt, Vorwärmen des Alkohols, sofortiges Abkühlen nach erfolgter Lösung ist erforderlich. Pikrat I wird 2 mal aus der 10fachen Menge Alkohol umkrystallisiert, II aus der 46fachen Menge Alkohol oder 40fachen Menge Benzol, Fraktion III wird 1 mal aus der 5fachen Menge Alkohol umkrystallisiert.

Reinigung der  
Rohpikrate.

<sup>1)</sup> Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 392, S. 232. 1912.

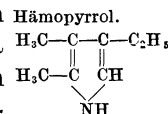
<sup>2)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 47, 2, S. 1820. 1914.

- Isolierung der Basen.** Zur Isolierung der freien Basen rührt man jedes Pikrat einzeln mit Petroläther durch, entfernt durch Schütteln mit Natronlauge die Pikrinsäure, trocknet mit Natriumsulfat und destilliert, nach Entfernung des Petroläthers, im Vakuum. Es ist stets auf die große Empfindlichkeit der Pyrrole gegen Luft und Licht Rücksicht zu nehmen. Beim vollständig substituierten Phyllopyrrol ist eine Trennung von beigemengten anderen Pyrrolen auch durchführbar infolge der Unfähigkeit zur Bildung eines Azofarbstoffs mit Diazobenzolsulfosäure (H. Fischer und Bartolomäus). Man schüttelt die ätherische Lösung des rohen, aus dem Pikrat in Freiheit gesetzten Phyllopyrrols mit einer 1proz., mit Salzsäure angesäuerten Lösung von Diazobenzolsulfosäure, bis die Farbstoffbildung aufhört. Die ätherische Lösung befreit man vom Äther, macht dann alkalisch und destilliert mit Wasserdampf. Das Phyllopyrrol erstarrt schon im Kühler krystallinisch.
- Trennung der Phono-pyrrolcarbonsäuren als Ester und Esterpikrate.** Die nach dem Abtreiben der Hämopyrrole mit Wasserdampf im Destillationsgefäß übrigbleibende Flüssigkeit *B* (S. 273), von der Reduktion von 50 g Hämin stammend, wird von dem Schlamm der ausgefallenen Eisenverbindungen abgesaugt, das Filtrat eben sauer gegen Kongopapier gemacht und 4—5 mal ausgeäthert. Den Ätherauszug befreit man durch Erhitzen auf dem Wasserbad vom Äther, löst ihn in 500 ccm absolutem Methylalkohol und sättigt mit Chlorwasserstoff. Man läßt 24 Stunden stehen und dampft dann im Vakuum bei 40° Badtemperatur ein. Der Rückstand wird vorsichtig mit Soda alkalisch gemacht und 2—3 mal ausgeäthert. Im Äther sind die Methylester der Phono-pyrrolcarbonsäuren, in der Sodalösung die nichtveresterten Anteile. Die Ätherlösung wird vom Äther befreit und im Vakuum destilliert, wobei die Badtemperatur bis 220° gesteigert wird. Aus dem Destillat krystallisiert beim Stehen in der Kälte ein Teil des Esters der Phono-pyrrolcarbonsäure. Man saugt durch eine Nutsche ohne Filterpapier, wodurch man den größten Teil der öligen Mutterlauge entfernt, den Rest durch Auspressen zwischen gehärtetem Filtrierpapier unter hohem Druck. Die ölige Mutterlauge, die noch die Ester von 3 Säuren, Phono-pyrrolcarbonsäure, Isophono-pyrrolcarbonsäure und Phyllo-pyrrolcarbonsäure enthält, wird über die Pikrate getrennt. Man versetzt dazu 11 g des Öls mit 220 ccm 10proz. feuchtätherischer Pikrinsäurelösung und stellt in Eis. Es fallen die Pikrate von Phono- und Isophono-pyrrolcarbonsäureester. Die abgesaugten Pikrate löst man in 140 ccm Essigester, wobei in der Kälte das braune Pikrat der Phono-pyrrolcarbonsäure ausfällt. Gelbe Krystalle zeigen Beimengung des Isoesters an, dessen Hauptmenge in der Essigestermutterlauge steckt. Um diesen zu gewinnen, verdampft man den Essigester der Mutterlauge und nimmt den Rückstand mit 60 ccm Alkohol von 96% auf. Es krystallisiert das Pikrat des Isophono-pyrrolcarbonsäureesters. Nicht durch Pikrinsäure gefällt wird der Phyllo-pyrrolcarbonsäureester, er ist daher in der ätherischen Mutterlauge der ersten Pikratfällung. Seine Isolierung ist schwierig, sie gelingt am besten nach Fischer und Röse, indem man das Estergemisch verseift und mit Kaliumäthylat unter Druck behandelt (3½ Stunden bei 210°). Die noch beigemengten Mengen an Phono- und Isophono-pyrrolcarbonsäure werden dadurch in Dimethyläthylpyrrolpropionsäuren übergeführt, die schlecht krystallisierende Pikrate geben, während die Trimethylpyrrolcarbonsäure unverändert bleibt und als Pikrat isolierbar ist. Einzelheiten im Original.
- Phono-pyrrolcarbonsäure.**
- Phono-pyrrolcarbonsäure.**
- Isophono-pyrrolcarbonsäure.**
- Phyllo-pyrrolcarbonsäure.**
- Gewinnung der Säuren aus den Esterpikraten.** Um aus den Pikraten der Ester der Phono-pyrrol- und Isophono-pyrrolcarbonsäure die freien Säuren zu erhalten, macht man mit Natronlauge alkalisch und nimmt die freien Ester mit Äther auf. Man verdampft den Äther und verseift die Ester durch 2stündiges Erhitzen im Wasserbad mit einem Gemisch von gleichem Volumen Jodwasserstoffsäure (spez. Gewicht 1,96) und Wasser. Man destilliert im Vakuum ab, macht mit Soda alkalisch, entfernt durch Äther

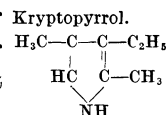


Spuren unverseiften Esters, macht dann wieder mit Salzsäure schwach kongosauer und äthert aus. Der Ätherrückstand wird aus siedendem Wasser umkrystallisiert.

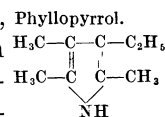
191. **Hämopyrrol** \*)  $C_8H_{13}N$  (2, 3-Dimethyl-4-äthyl-pyrrol) (von Willstätter ursprünglich als Isohämopyrrol bezeichnet), das Hauptprodukt der Reduktion von Hämin. Bei Zimmertemperatur ein Öl, in Eis fest werdend, dann bei etwa  $16^\circ$  schmelzend. Siedepunkt bei 12,5 mm  $87-88,5^\circ$ . Es löst sich wenig in Wasser, gut in Säuren und organischen Lösungsmitteln. Es ist mit Wasserdämpfen flüchtig. Leicht veränderlich durch Licht und Sauerstoff unter Rotfärbung. Riecht zugleich wie Indol und Naphthalin. Das Pikrat  $C_8H_{13}N \cdot C_6H_3N_3O_7$  gelbe Nadeln, schmilzt bei  $124^\circ$ . Hämopyrrol gibt in schwefelsaurer Lösung mit Natriumnitrit neben einem roten Farbstoff ein Monoxim  $C_7H_{10}O_2N_2$ , breite Blättchen und Täfelchen von Perlmutterglanz, Fp.  $221,5^\circ$  (Piloty und Stock<sup>1</sup>). Das Oxim bildet sich unter Eliminierung einer  $\alpha$ -ständigen Methylgruppe. Durch Verseifung des Oxims mit verdünnter Schwefelsäure bildet sich Methyläthylmaleinimid, das auch durch direkte Oxydation des Hämopyrrols mit Chromsäure erhältlich ist (Küster<sup>2</sup>). Hämopyrrol gibt mit Phthalsäure ein bei  $140^\circ$  schmelzendes Phthalid (H. Fischer und Krollpfeiffer<sup>3</sup>). Hämopyrrol ist zur Bildung von Azofarbstoffen befähigt durch Kuppelung mit Diazolösungen (Marchlewski und Mitarbeiter<sup>4</sup>), H. Fischer und Bartolomäus<sup>5</sup>). Mit Sublimat erfolgt in essigsaurer Lösung eine weiße Fällung  $(C_8H_{12}N)_2Hg \cdot 4HgCl_2$ . Mit dem Reagens von Ehrlich (Dimethylamidobenzaldehyd in salzsaurer Lösung) erfolgt intensive Rotfärbung. Es gibt die Fichtenspanreaktion der Pyrrole, d. h. seine Dämpfe färben einen mit konzentrierter Salzsäure befeuchteten Fichtenspan rot. Die Konstitution des Hämopyrrols ist durch Synthese erhärtet (Piloty und Blömer<sup>6</sup>).



192. **Kryptopyrrol** \*)  $C_8H_{13}N$  (3-5-Dimethyl-4-äthyl-pyrrol). Ein Öl, bisher nicht zum Erstarren zu bringen, in seinen Eigenschaften dem Hämopyrrol sehr ähnlich. Siedepunkt bei 13 mm bei  $84-85^\circ$ ,  $d_4^0 = 0,930$ ;  $d_4^{20} = 0,918$ . Mit Wasserdämpfen flüchtig. Ebenfalls leicht veränderlich durch Licht und Luft. Das Pikrat  $C_8H_{13}N \cdot C_6H_3N_3O_7$  schmilzt bei  $138-139^\circ$ . Das Phthalid schmilzt bei  $169^\circ$  (Fischer und Krollpfeiffer). Das Oxim  $C_7H_{10}O_2N_2$ , schlanke prismatische Nadeln, bildet sich wie das des Hämopyrrols, ist aber nicht damit identisch. Fp.  $215^\circ$  (Piloty). Kryptopyrrol reagiert mit Diazolösungen und dem Ehrlichschen Aldehydreagens. Es gibt die Fichtenspanreaktion der Pyrrole. Kryptopyrrol ist auch durch Synthese erhalten (Knorr und Heß<sup>7</sup>). Es erwies sich mit dem Naturprodukt identisch bis auf den Schmelzpunkt des Oxims, der bei  $201^\circ$  lag.



193. **Phyllopyrrol** \*)  $C_9H_{15}N$  (2-3-5-Trimethyl-4-äthyl-pyrrol). Große harte, viereckige Tafeln (nach Sublimation im Vakuum), Fp.  $69^\circ$ . Siedepunkt bei 12 mm bei  $86-87^\circ$ . Mit Wasserdämpfen flüchtig. Noch empfindlicher als die trisubstituierten Pyrrole gegen Licht und Luft, die erst Rotfärbung, dann Braunfärbung und Verharzung bewirken. Das Pikrat schmilzt bei  $169^\circ$ . Phyllopyrrol reagiert nicht mit Quecksilberchlorid Diazolösungen, Ehrlichschem Reagens,



\*) Wegen Darstellung und Literatur vgl. auch § 190.

<sup>1</sup>) Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 392, S. 238. 1912.

<sup>2</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 35, 3, S. 2953. 1902. — Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 346, S. 1. 1905/06. — Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 55, S. 526. 1908.

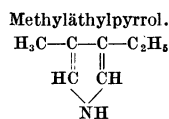
<sup>3</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 82, S. 266. 1912.

<sup>4</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 45, S. 176. 1905; Bd. 56, S. 316. 1908; Bd. 61, S. 276. 1909; Bd. 77, S. 247. 1912. Biochem. Zeitschr. Bd. 10, S. 437. 1908. Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 43, 1, S. 259. 1910.

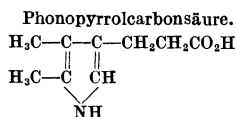
<sup>5</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 76, S. 478. 1912.

<sup>6</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 45, 3, S. 3749. 1912. <sup>7</sup>) desgl. Bd. 44, 2, S. 2765. 1911.

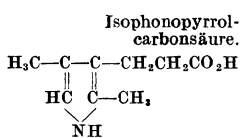
noch gibt es die Fichtenspanreaktion. Durch Reduktion ist es unter Aufnahme von 4 Wasserstoffen in das Phyllopyrrolidin zu verwandeln (Willstätter und Asahina), durch Oxydation in Methyläthylmaleinimid (H. Fischer und Röse<sup>1</sup>). Es ist mehrfach synthetisch erhalten worden (H. Fischer und Bartolomäus<sup>2</sup>), Colacicchi<sup>3</sup>).



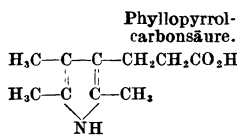
194. **3-Methyl-4-äthyl-pyrrol\***)  $\text{C}_7\text{H}_{11}\text{N}$ , ein Öl, wesentlich beständiger als die stärker substituierten Pyrrole, Siedepunkt bei 11 mm 74—75°, bei 18 mm 81°. Es gibt kein gut krystallisierendes Pikrat. Sein Oxim,  $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{O}_2\text{N}_2$ , sehr dünne, längliche, fast farblose Blättchen; Fp. 197—198°, soll nicht identisch sein mit dem aus Hämopyrrol oder Kryptopyrrol erhaltlichem Oxim. Durch Oxydation des Methyläthylpyrrols mit Chromsäure entsteht leicht Methyläthylmaleinimid. Durch Reduktion des letzteren mit Zinkstaub ist es wieder zu erhalten (Marchlewski und Grabowski<sup>4</sup>).



195. **Phonopyrrolcarbonsäure (Hämopyrrolcarbonsäure)\***)  $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{O}_2\text{N}$  (2-3-Dimethylpyrrol-4-propionsäure), Nadelbüschel, Fp. 131°, aus heißem Wasser krystallisierbar, ziemlich löslich in Benzol und Äther, gut in Alkohol, wässrigen Alkalien und Mineralsäuren. Das Pikrat,  $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{O}_2\text{N} \cdot \text{C}_6\text{H}_3\text{O}_7\text{N}_3$  hat den Fp. 148°. Das bei der Gewinnung (§ 190) verwendete Pikrat des Methylesters  $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{O}_2\text{N} \cdot \text{C}_6\text{H}_3\text{O}_7\text{N}_3$  hat braune Farbe und den Fp. 120—121°. Der Methylester selbst schmilzt bei 58°. Das Oxim der Säure  $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{O}_4\text{N}_2$ , in Wasser sehr schwer lösliche, scharf zugespitzte Blättchen, schmilzt bei 242° unter lebhafter Gasentwicklung, nachdem bei 205° Braunfärbung, von 221° Sinterung eintritt (Piloty<sup>5</sup>). Mit Phthalsäure gibt die Phonopyrrolcarbonsäure ein bei 225—226° schmelzendes Phthalid (H. Fischer und Krollpfeiffer). Phonopyrrolcarbonsäure geht bei rascher Destillation unter Kohlensäureabspaltung in Hämopyrrol über, während bei langsamerer Destillation unter Wanderung von Methyl- und Äthylgruppen ein Gemisch von Trialkylpyrrolen entsteht (Piloty, Stock und Dormann<sup>6</sup>), H. Fischer und Bartolomäus<sup>7</sup>). Die Säure reagiert mit dem Aldehydreagens von Ehrlich und Diazobenzolsulfosäure.



**Isophonopyrrolcarbonsäure\***) (Kryptopyrrolcarbonsäure)  $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{O}_2\text{N}$  (3-5-Dimethylpyrrol-4-propionsäure). Der vorhergehenden Säure in der Löslichkeit usw. sehr ähnlich. Fp. 140°. Das Pikrat schmilzt bei 155—156°, das Pikrat des Methylesters, gelbe Nadeln, bei 112—113°. Der Methylester selbst schmilzt bei 47—48°. Das Oxim der Isosäure schmilzt bei 219° (Fischer und Röse<sup>8</sup>). Die Säure reagiert mit dem Aldehydreagens von Ehrlich.



196. **Phyllopyrrolcarbonsäure\***)  $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{O}_2\text{N}$  (2-3-5-Trimethylpyrrol-4-propionsäure). Diese Säure schmilzt bei 86—87°, der Methylester  $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{O}_2\text{N}$  siedet bei 10 mm bei 157—158°. Das Pikrat der Säure hat den Fp. 124—125°, das Pikrat des Methylesters 95°. Das Pikrat des Esters ist wesentlich leichter löslich als das der Phono- und Isophonopyrrolcarbonsäure, was zur ersten Trennung dient (§ 190).

\*) Wegen Darstellung und Literatur vgl. auch §§ 190 ff.

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 82, S. 404. 1912.

<sup>2</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 45, 1, S. 466. 1912. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 77, S. 198. 1912.

<sup>3</sup>) Atti d. Reale Accad. dei Lincei, Roma (5) Bd. 21, I, S. 489. 1912; ref. Chem. Zentralbl. 1912, II, S. 122.

<sup>4</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 81, S. 88. 1912. Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 47, 2, S. 2159. 1914.

<sup>5</sup>) Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 366, S. 263. 1909.

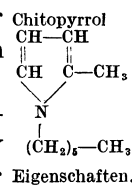
<sup>6</sup>) Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 406, S. 370. 1914.

<sup>7</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 45, 2, S. 1922. 1912.

<sup>8</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. G s. Bd. 47, 1, S. 794. 1914.

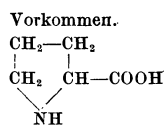
197. **Chitopyrrol**,  $C_{11}H_{19}N$  (2-Methyl-1-n-hexyl-pyrrol), wurde von Karrer und Smirnoff<sup>1)</sup> bei der Zinkstaubdestillation von Chitin erhalten. Es ist auch synthetisch zugänglich.

Farbloses, sich rasch braun färbendes Öl, Siedepunkt 200 bis 210°, von aromatischem, an alte Pilze erinnernden Geruch. Die Fichtenspanreaktion ist intensiv kirschrot. Kalium ist bei gewöhnlicher Temperatur ohne Einwirkung. Bei der Oxydation mit  $CrO_3$  in Eisessiglösung bei Zimmertemperatur bildet sich Maleinsäure, bei der Oxydation mit Nitrit in schwefelsaurer Lösung neben Maleinsäure n-Hexylamin.



### Pyrrolidinderivate.

198. **Prolin** ( $\alpha$ -Pyrrolidincarbonsäure)  $C_5N_3NO_2$  wurde zuerst von E. Fischer<sup>2)</sup> unter den Salzsäurespaltungsprodukten des Casein aufgefunden. Es tritt bei der Säure- und Alkalispaltung (E. Fischer<sup>3)</sup> der verschiedensten Proteine auf, auch bei der fermentativen (E. Fischer und Abderhalden<sup>4)</sup>, durch Trypsin nur in geringer Menge. Es ist auch im Blut gefunden (Abderhalden<sup>5)</sup> und aus Fischfleisch (Suzuki und Joshimura<sup>6)</sup>, Echinodermen (Kossel und Edlbacher<sup>7)</sup>, Käse (Winterstein<sup>8)</sup> und aus Keimpflanzen von *Lupinus albus* (E. Schulze und Winterstein<sup>9)</sup>, aus Maispollen (Anderson und Kulp<sup>10)</sup> erhalten worden.



Synthetisch ist d,l-Prolin von Willstätter<sup>11)</sup>, von E. Fischer<sup>12)</sup> und in guter Ausbeute von Sörensen und Andersen<sup>13)</sup> dargestellt worden. Letztere kombinieren Phthaliminomalonestern mit Trimethylenbromid zu  $\gamma$ -Brompropylphthaliminomalonestern, tauschen in letzterem durch Behandlung mit alkoholischer Natronlauge das Brom gegen OH aus und verseifen dann zuerst mit Natronlauge, dann mit Salzsäure, wobei  $\alpha$ -Amino- $\delta$ -oxyvaleriansäure entsteht, die beim Abdampfen mit Salzsäure in d,l-Prolin übergeht.

Darstellung.

Die beiden aktiven Proline wurden von E. Fischer und Zemplén<sup>14)</sup> dargestellt durch Spaltung des d,l-m-Nitrobenzoylprolins (gewonnen aus m-Nitrobenzoyl- $\delta$ -aminovaleriansäure) als Cinchoninsalz und Kochen mit Salzsäure.

Das natürlich vorkommende ist das l-Prolin. Bei der Säurespaltung findet aber immer eine teilweise Racemisation statt, das bei der Spaltung mit Alkali auftretende ist hauptsächlich racemisch, nach Levene und Wallace<sup>15)</sup> auch das bei der tryptischen Verdauung (von Gelatine) entstehende. Durch 5stündiges Erhitzen mit Barytwasser (auf 1 g Prolin 2 g Ätzbaryt und 4 g Wasser) auf 140—145° wird aktives Prolin racemisiert (E. Fischer). Beim 24stündigen Kochen des reinen aktiven Prolins mit 33proz. Schwefelsäure findet keine Racemisation statt (F. Ehrlich<sup>16)</sup>).

Über die Darstellung von Prolin aus der hydrolytischen Zersetzungsflüssigkeit von Proteinen s. § 475 ff. Über die Gewinnung von d,l-Prolin aus Leim s. E. Fischer und Böhner<sup>17)</sup>.

l- und d-Prolin scheiden sich aus alkoholischer Lösung auf Zusatz von Äther als kleine Prismen ab, hygroskopisch, zersetzen sich rasch erhitzt bei

Eigenschaften.

<sup>1)</sup> Helvetica chim. acta Bd. 5, S. 848. 1922.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 33, S. 151. 1901. <sup>3)</sup> desgl. Bd. 35, S. 227. 1902.

<sup>4)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 40, S. 215. 1903/04.

<sup>5)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 88, S. 478. 1913.

<sup>6)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 62, S. 1. 1909. <sup>7)</sup> desgl. Bd. 94, S. 264. 1915.

<sup>8)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 41, S. 485. 1904. <sup>9)</sup> desgl. Bd. 45, S. 38. 1905.

<sup>10)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 50, S. 433. 1922.

<sup>11)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 33, 1, S. 1160. 1900. <sup>12)</sup> desgl. Bd. 34, 1, S. 454. 1901.

<sup>13)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 56, S. 236. 1908.

<sup>14)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 42, 3, S. 2989. 1909.

<sup>15)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 47, S. 143. 1906.

<sup>16)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 63, S. 401. 1914.

<sup>17)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 65, S. 118. 1910.

215—220° (E. Fischer und Zemplén); d,l-Prolin schmilzt wasserfrei gegen 205° unter Aufschäumen.

Beide Modifikationen schmecken stark süß, sind in Wasser und Alkohol leicht löslich. Durch diese leichte Löslichkeit auch in absolutem Alkohol unterscheidet sich Prolin von den Aminosäuren.

Auch aus verdünnter Lösung wird Prolin bei Gegenwart von Schwefelsäure durch Phosphorwolframsäure gefällt. Aus alkoholischer, konzentrierter Lösung scheidet sich auf Zusatz von alkoholischer Sublimatlösung das Quecksilbersalz allmählich krystallinisch ab (Kossel und Dakin<sup>1</sup>). Sehr vollständig erfolgt die Fällung nach Neuberg<sup>2</sup>) in methylalkoholischer Lösung durch methylalkoholisches Quecksilberacetat beim Erwärmen unter Zusatz von etwas methylalkoholischer Natronlauge. Durch Mercuriacetat und Barytwasser wird es nicht gefällt (Dakin<sup>3</sup>). Es reagiert nicht mit salpetriger Säure nach v. Slyke (S. 224). und gibt keine Ninhydrinreaktion (S. 219). In schwefelsaurer Lösung ist es gegen Permanganat beständig.

Verbindungen:  
mit Kupfer

Das Kupfersalz der l-Säure ist in Alkohol löslich und bleibt beim Verdunsten des Alkohols als tiefblaue, amorphe Masse zurück, das Kupfersalz der d,l-Säure ist in Alkohol unlöslich, krystallisiert mit 2 Mol. Wasser in blauen, glänzenden Blättchen, die sich beim Trocknen über Schwefelsäure unter Abgabe des Krystallwassers violett färben und an feuchter Luft wieder blau werden.

mit Silber

Silbersalz der l-Säure sehr unbeständig (Abderhalden und Kautzsch<sup>4</sup>).

mit Pikrinsäure

Das Pikrat wird erhalten durch Fällung einer Lösung von Prolin und Pikrinsäure in möglichst wenig Eisessig mit Äther und Krystallisation aus absolutem Alkohol. Das d,l-Prolin-pikrat schmilzt bei 135—137°, löst sich leicht in heißem Alkohol, Eisessig, Wasser, weniger leicht in der Kälte oder in Äther. Das l-Prolin-pikrat krystallisiert viel schöner, schmilzt bei 153—154° und scheint etwas weniger löslich zu sein (Alexandroff<sup>5</sup>).

mit Alkohol

Der Äthylester der d,l-Säure siedet unter 11 mm Druck bei 75—76°.

mit Naphthylisocyanat

α-Naphthylisocyanat-d,l-prolin (S. 223) Fp. 171—172°, wenig löslich in kaltem Wasser (Neuberg<sup>6</sup>).

mit β-Naphthalinsulfosäure

β-Naphthalinsulfo-l-prolin (S. 222) krystallisiert mit 1 Mol. H<sub>2</sub>O. Bei 132° schmelzende Blättchen, schwer löslich in kaltem Wasser, leicht in Alkohol, schwerer in Äther löslich.

mit Phenylisocyanat

Das nach S. 223 hergestellte l-Phenylisocyanatprolin fällt auf Zusatz von Salzsäure als harzige Masse aus. Fügt man nun soviel Salzsäure hinzu, daß die Lösung etwa 4% enthält und engt auf dem Wasserbad ein, so treten Krystalle auf, die nach dem Erkalten abfiltriert und aus kochendem Wasser umkrystallisiert als flache Nadeln vom Fp. 143° erscheinen und das Anhydrid der Phenylisocyanatverbindung darstellen (E. Fischer<sup>7</sup>). Die entsprechende Verbindung der d,l-Säure krystallisiert aus heißem Alkohol in feinen Prismen vom Fp. 118° (E. Fischer<sup>8</sup>).

mit Harnstoff.

l-Prolinhydantoin (S. 223), Fp. 165—167°, dicke Nadeln, leicht löslich in heißem Wasser, läßt sich der wässrigen Lösung durch lange Extraktion mit Äther entziehen. Die zugehörige Uramidosäure wird im Gegensatz zu der des Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Phenylalanin und Tyrosin der wässrigen

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 41, S. 410. 1904.

<sup>2</sup>) Verhandl. d. dtsh. pathol. Ges. 1904, S. 31.

<sup>3</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 44, S. 517. 1920.

<sup>4</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 78, S. 126. 1912. <sup>5</sup>) desgl. Bd. 46, S. 17. 1905.

<sup>6</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 37, S. 499. 1911.

<sup>7</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 33, S. 168. 1901.

<sup>8</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 34, 1, S. 460. 1901.

Lösung durch Äther nicht entzogen, so daß diese Verbindungen zur Reinigung und Isolierung des Prolin dienen können (Dakin<sup>1</sup>).

d,l-Prolinhydantoin (S. 223), Fp. 142—143°, sehr leicht löslich in Wasser und Alkohol, leicht in Äther und Aceton, wenig in Chloroform, läßt sich der wässerigen Lösung durch Äther entziehen (Dakin<sup>2</sup>).

l-Prolinbetainchloraurat (N-Methylhygrinsäurechloraurat)  $C_7H_{14}NO_2 \cdot AuCl_4$  Betain. (S. 224), Fp. 219° oder niedriger (Engeland<sup>3</sup>).

Für l-Prolin  $[\alpha]_D^{20} = -79,8^\circ$  bis  $-80,9^\circ$  (4,4—6,5proz. wässrige Lösung).  $[\alpha]_D^{20} = -93,0^\circ$  (2,35proz. alkalische Lösung) (E. Fischer und Zemplén),  $[\alpha]_D^{20} = -46,53^\circ$  (7,68proz. Lösung in 20proz. Salzsäure) (E. Fischer<sup>4</sup>). Für d-Prolin  $[\alpha]_D^{20} = +81,0$  bis  $+81,9^\circ$  (3,8—4,5proz. wässrige Lösung) (E. Fischer und Zemplén). Optische Eigenschaften.

Durch Fäulnis entsteht aus d,l-Prolin n-Valeriansäure und  $\delta$ -Aminovaleriansäure (Neuberg<sup>5</sup>), Ackermann<sup>6</sup>); ein asymmetrischer Angriff findet dabei nicht statt. Durch gärende Hefe wird d,l-Prolin symmetrisch abgebaut (F. Ehrlich<sup>7</sup>). Umwandlungen.

Dem Nachweis muß die Isolierung (§ 476 und § 479) vorangehen. Für sie kann auch die Fällung mit Sublimat nach vorangegangener Methylierung nach Engeland (S. 224) in Betracht kommen. Nachweis.

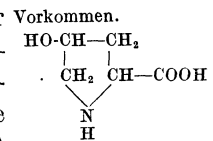
Zum Nachweis dienen besonders der Schmelzpunkt, die Löslichkeit in Alkohol sowie die Analyse, das Verhalten und die Analyse des Kupfersalzes, das Anhydrid der Phenylisocyanatverbindung, das Hydantoin ferner das Betaingoldaurat. Prolin gibt die Pyrrolreaktion, d. h. die beim Erhitzen sich entwickelnden Dämpfe färben einen mit Salzsäure befeuchteten Fichtenspan rot (Neuberg<sup>8</sup>).

199. Oxyprolin ( $\gamma$ -Oxyprolin- $\alpha$ -carbonsäure)  $C_5H_9NO_3$ . Die l-Form dieser Säure wurde zuerst von E. Fischer<sup>9</sup>) unter den hydrolytischen Zersetzungsprodukten der Gelatine aufgefunden. Auch bei der Säurespaltung von Casein<sup>10</sup>), Oxyhämoglobin und Edestin ist ihr Auftreten nachgewiesen. Ferner ist sie im Käse gefunden worden (Winterstein und Bissegger<sup>11</sup>). Fränkel und Jellinek<sup>12</sup>) erhielten bei langdauernder tryptischer Caseinverdauung d,l-Oxyprolin.

Synthetisch ist es von Leuchs<sup>13</sup>) dargestellt worden. Er erhielt aus  $\alpha,\delta$ -Dichlorvalerolacton durch Ammoniak zwei stereoisomere racemische  $\gamma$ -Oxyproline (a und b), führte das eine (a) mit Phenylisocyanat in die Phenylureidosäure über und krystallisierte diese als Chininsalz fraktioniert. Eine der so erhaltenen Ureidosäuren erwies sich als identisch mit dem entsprechenden Abkömmling des natürlichen Prolins und gab nach Abspaltung des Phenylcyanatrestes durch Erhitzen mit wässrigem Ammoniak das l-Oxyprolin, die andere das d-Oxyprolin. Darstellung.

Das natürliche Oxyprolin läßt sich selbst durch Einwirkung von Baryt bei 200° nicht völlig racemisieren (2 asymmetrische Kohlenstoffatome) (Leuchs und Felser, Leuchs und Bormann).

Über die Isolierung aus der hydrolytischen Zersetzungsflüssigkeit der Proteine s. § 475 ff, § 480. Ein sehr einfaches Verfahren zur Gewinnung von



<sup>1</sup>) Biochem. Journ. Bd. 12, S. 290; ref. Chem. Zentralbl. 1919, I, S. 817.

<sup>2</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 44, S. 527. 1920.

<sup>3</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. B. 42, 3, S. 2965. 1909. — Zeitschr. f. Biol. Bd. 63, S. 470. 1914.

<sup>4</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 33, S. 166. 1901.

<sup>5</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 37, S. 490. 1911.

<sup>6</sup>) Zeitschr. f. Biol. Bd. 57, S. 104. 1912.

<sup>7</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 63, S. 379. 1914.

<sup>8</sup>) Salkowski-Festschrift. Berlin: Hirschwald 1904, S. 271.

<sup>9</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 35, 3, S. 2660. 1902.

<sup>10</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 39, S. 156. 1903. <sup>11</sup>) desgl. Bd. 47, S. 28. 1906.

<sup>12</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 130, S. 592. 1922.

<sup>13</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 38, 2, S. 1937. 1905. — Leuchs u. Felser: desgl. Bd. 41, 2, S. 1726. 1908. — Leuchs, Giua u. Brewster: desgl. Bd. 45, 2, S. 1960. 1912. — Leuchs u. Brewster: desgl. Bd. 46, 1, S. 986. 1913. — Leuchs u. Bormann: desgl. Bd. 52, 2, S. 2086. 1919.

d,l-Oxyprolin aus tryptischer Caseinverdauungsflüssigkeit ist von Fränkel und Jellinek<sup>1)</sup> angegeben.

- Eigenschaften.** l- und d-Oxyprolin, glasglänzende Tafeln, in Wasser sehr leicht, in absolutem Alkohol sehr wenig löslich. Fp. gegen 274° unter Zersetzung, die l-Form schmeckt süß, die d-Form kaum süß, sondern fade. d,l-Oxyprolin sehr leicht löslich in Wasser (in etwa 1,5 Tl.), kaum in Alkohol, dagegen in heißem Methylalkohol, reagiert neutral, schmeckt stark süß (Leuchs).
- Prolin wird durch Mercuriacetat und Barytwasser nur sehr unvollständig gefällt, reagiert nicht oder nur sehr wenig mit salpetriger Säure (Dakin<sup>2)</sup>) und gibt keine Reaktion mit Ninhydrin (S. 219).
- Verbindungen:**
- mit Kupfer Kupfersalz der l-Säure, tiefblau, in Wasser sehr leicht löslich, in Alkohol unlöslich, krystallisiert beim Vermischen der heißen, konzentrierten, wässrigen Lösung mit heißem Alkohol, Kupfersalz der d,l-Säure in Wasser sehr schwer löslich.
- mit Alkohol Äthylester in Äther löslich (Dakin).
- mit Phenylisocyanat l- und d-Phenylisocyanatoxyprolin (S. 223), Fp. 175°, in heißem Wasser, in Alkohol und Aceton löslich, kaum in Äther; l-Form in berechneter Menge  $\frac{n}{2}$  Natronlauge  $[\alpha]_D^{20} = -37,2^\circ$ , Hydantoin + 2 H<sub>2</sub>O  $[\alpha]_D^{20} = -50,7^\circ$  (Leuchs und Brewster).
- d,l-Phenylisocyanatoxyprolin (S. 223), Fp. 194—195° (korr.), leicht löslich in Alkohol, ziemlich schwer in Aceton, unlöslich in Äther (Leuchs und Felser).
- mit Naphthalinsulfosäure l- $\beta$ -Naphthalinsulfooxyprolin + H<sub>2</sub>O (S. 222), Blättchen, schwer löslich in kaltem Wasser, in Alkohol sehr leicht, ziemlich leicht in Äther; Fp. 90—91° (Fischer und Bergell<sup>3)</sup>).
- d,l- $\beta$ -Naphthalinsulfooxyprolin (S. 222), Fp. 183—184° (Leuchs).
- mit Phenylsenfööl d,l-Phenylsenföloxyprolin (S. 223) (Leuchs und Bormann).
- mit Harnstoff. l-Oxyprolinuraminosäure (S. 223) (erhalten mit Kaliumcyanat) geht (ebenso wie das entsprechende Prolinderivat, aber im Gegensatz zu der Uraminosäure der meisten Aminosäuren, außer Glycin und Serin) auch bei längerer Extraktion kaum in Äther über (Dakin<sup>4)</sup>).
- l-Oxyprolinhydantoin (durch Salzsäure aus der Uraminsäure erhalten), Nadeln unscharf bei 162—165° schmelzend, in Wasser, Alkohol und Äther leicht löslich, lassen sich der wässrigen Lösung durch langdauernde Extraktion mit Äther entziehen. Durch langes Kochen (36 Stunden) mit 10proz. Ätzbarytlösung erhält man aus ihm wieder Oxyprolin, und zwar teilweise racemisiert (Dakin<sup>4)</sup>).
- Optische Eigenschaften.** Synthetisches l-Oxyprolin in wässriger Lösung (9—10proz.)  $[\alpha]_D^{20} = -75,7^\circ$ . Synthetisches d-Oxyprolin in wässriger Lösung (8—9proz.)  $[\alpha]_D^{21} = +75,2^\circ$  (Leuchs und Bormann). Das natürliche Oxyprolin zeigt dieselbe spezifische Drehung  $-75,6^\circ$  (Leuchs und Brewster). Der einmal<sup>5)</sup> gefundene Wert  $-81,04^\circ$  scheint zu hoch zu sein.
- Umwandlung.** Mittels Phosphor und Jodwasserstoff wird es in Prolin verwandelt (E. Fischer).
- Nachweis.** Dem Nachweis muß die Isolierung (§§ 479, 480, 481a) vorangehen. Zur Identifizierung empfiehlt sich die  $\beta$ -Naphthalinsulfoverbindung. Es gibt die Pyrrolreaktion (s. bei Prolin § 198) und Blaufärbung mit dem Folin-Denis-schen Reagens (s. bei Phenol § 200), ebenso wie Tyrosin, Tryptophan und Oxytryptophan (Abderhalden<sup>6)</sup>).

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 130, S. 598. 1922.

<sup>2)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 44, S. 499. 1920.

<sup>3)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 35, 3, S. 3785. 1902.

<sup>4)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 44, S. 517. 1920.

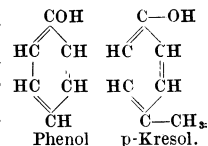
<sup>5)</sup> E. Fischer: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 35, 3, S. 2662. 1902.

<sup>6)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 85, S. 91. 1913.

**Benzolderivate.****Phenole.**

200. Phenol  $C_6H_6O$  und Kresole  $C_7H_8O$ . Diese Körper entstehen bei der Fäulnis von Eiweiß und Tyrosin und beim Behandeln dieser Stoffe mit schmelzendem Alkali (E. Baumann<sup>1</sup>). Im freien Zustande finden sie sich im Darm und in Spuren im Pferdeharn. Sie werden aber in größerer oder geringerer Menge beim Erhitzen von Harn mit verdünnter Salz- oder Schwefelsäure gebildet, indem bei dieser Behandlung ihre im Harn besonders der Pflanzenfresser ziemlich reichlich enthaltenen Schwefelsäureverbindungen (gepaarte Schwefelsäuren) und auch Glukuronsäureverbindungen eine Spaltung unter Wasseraufnahme erfahren. Der größere Teil der Phenole in Fäulnisgemischen und im Harne besteht aus p-Kresol, der kleinere aus Phenol, außerdem findet sich im Menschenharn noch o-Kresol.

Vorkommen.



Um die in Flüssigkeiten in freiem Zustande vorhandenen Phenole zu isolieren, destilliert man, bis eine Probe des Destillats beim Kochen mit Millons Reagens (Anh.) nicht mehr rot gefärbt wird. Um auch die als gepaarte Schwefelsäuren im Harne enthaltenen Phenole zu erhalten, destilliert man mindestens 200 ccm davon mit 50 ccm rauchender, roher Salzsäure, bis 50—70 ccm übergegangen sind. Die in beiden Fällen erhaltenen Destillate, welche außer den Phenolen noch flüchtige Säuren, Indol usw. enthalten können, werden mit Alkali stark übersättigt und abermals destilliert. Es gehen Ammoniak, Indol, Skatol über. Die rückständige Flüssigkeit läßt man erkalten, sättigt mit Kohlensäure, um die Phenole aus ihren Natriumverbindungen freizumachen, und destilliert abermals. Das Destillat prüft man mittels der unten bezeichneten Reaktionen. Ist auf Indol und Skatol nicht Rücksicht zu nehmen, so übersättigt man das erste Destillat mit Natriumcarbonat und destilliert so gleich die Phenole ab.

Isolierung.

Für die Abtrennung des p-Kresols von Phenol und o-Kresol hat sich die Überführung in die Sulfosäuren durch konzentrierte Schwefelsäure und Darstellung der Barytsalze bewährt. Die Destillate, welche Phenol und Kresole enthalten, werden zu dem Zweck mit überschüssigem Alkali versetzt, eingedampft, dann angesäuert und mit Äther mehrmals ausgeschüttelt. Man verdunstet die abgetrennte Ätherlösung, trocknet den Rückstand mit Chlorcalcium und destilliert. Das Destillat wird mit dem gleichen Gewicht konzentrierter Schwefelsäure 1 Stunde auf dem Wasserbade erwärmt, mit Wasser verdünnt, mit Baryt neutralisiert und filtriert, das Filtrat bis nahe zur Krystallisation eingedampft und mit überschüssigem, konzentriertem Barytwasser versetzt. Nach 12stündigem Stehen wird das abgeschiedene basische p-kresolsulfosaure Barium abfiltriert, das Filtrat durch Kohlensäure von überschüssigem Baryt befreit, filtriert, auf kleines Volumen abgedampft, abermals mit konzentriertem Barytwasser gefällt und nach 12 Stunden abfiltriert. Durch das Filtrat leitet man Kohlensäure, filtriert, verdampft zur Trockne und wägt den Rückstand, welcher das phenolsulfosaure und das o-kresolsulfosaure Barium enthält. Die Niederschläge werden in Wasser zerteilt und mit Kohlensäure behandelt. Das Filtrat wird verdunstet, getrocknet und gewogen. Man erfährt so das Gewicht des p-kresolsulfosauren Bariums. Eine Abtrennung des o-Kresols ist nicht ausgeführt, es wird durch die Bildung von Salicylsäure beim Schmelzen des Phenolgemisches mit Kali nachgewiesen (s. nächste Seite).

Abtrennung des p-Kresols.

Über Isolierung aus Fäulnisgemischen s. § 229.

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 6, S. 183. 1882. — Brieger: desgl. Bd. 4, S. 204. 1880.

Eigenschaften. Phenol schmilzt bei  $42^{\circ}$ , siedet bei  $180^{\circ}$ , löst sich in 15 Tl. Wasser bei gewöhnlicher Temperatur, färbt sich in nicht allzu verdünnter wässriger Lösung mit Eisenchlorid violett; dieselbe Färbung erfahren damit seine sulfosauren Salze.

p-Kresol schmilzt bei  $36^{\circ}$ , siedet bei  $199^{\circ}$ , ist schwer löslich in Wasser, wird in wässriger Lösung von Eisenchlorid blau gefärbt.

o-Kresol schmilzt bei  $31-31,5^{\circ}$ , siedet bei  $185-186^{\circ}$ .

Nachweis von Phenol  
und p-Kresol.

Zum Nachweis des Phenol und p-Kresol in wässrigen Lösungen, z. B. in dem in der oben beschriebenen Weise erhaltenen Destillat dienen folgende Reaktionen:

1. Beim Kochen mit Millons Reagens entsteht Rotfärbung der Flüssigkeit oder auch roter Niederschlag. Diese sehr empfindliche Reaktion geben fast alle Phenolderivate, welche eine Hydroxylgruppe am Benzolring enthalten (Nasse).

2. Beim Zusammenbringen von 1—2 ccm mit der etwa gleichen Menge eines Reagens (das durch 2stündiges Kochen von 100 g Natriumwolframat, 20 g Phosphormolybdänsäure, 50 ccm 85proz. Phosphorsäure und 750 ccm Wasser am Rückflußkühler und Verdünnen der abgekühlten Lösung auf 1000 ccm erhalten wird\*) und 3—10 ccm einer gesättigten Sodalösung (oder gepulverter Soda) entsteht Blaufärbung (Folin und Denis<sup>1</sup>). Diese außerordentlich empfindliche Reaktion wird von vielen Phenolen, Tyrosin, von Harnsäure, in ganz ähnlicher Weise aber auch von Oxyprolin, Tryptophan, Oxytryptophan (Abderhalden<sup>2</sup>) gegeben.

3. Auf Zusatz von Bromwasser zu einer Probe der Lösung entsteht sofort oder alsbald milchige Trübung, dann Niederschlag von gelblichweißen, seidenglänzenden Nadeln oder käsigen Flocken, die im wesentlichen aus Tribromphenol bestehen. Empfindliche Probe.

4. Eine Probe der Flüssigkeit wird durch sehr wenig verdünnte Eisenchloridlösung violett bis blau gefärbt. Die Reaktion der Flüssigkeit muß für diese nicht sehr empfindliche Probe völlig neutral sein. Alkohol stört die Reaktion (Salkowski<sup>3</sup>).

5. Mit Tyrosinase (aus Weizenkleie) tritt Gelb-, Orange- und Braunfärbung ein (Bertrand<sup>4</sup>).

Nachweis von  
o-Kresol.

Zum Nachweis des o-Kresols löst man die Kalischmelze des Phenolgemisches in Wasser, säuert mit Schwefelsäure an, schüttelt mit Äther aus und extrahiert den Verdampfungsrückstand des Ätherauszugs mit Chloroform. In dieses geht nur die aus dem o-Kresol entstandene Salicylsäure über, die sich durch Violettfärbung ihrer wässrigen durch Destillation von Phenol befreiten Lösung auf Zusatz von Eisenchlorid nachweisen läßt.

Über quantitative Bestimmung von Phenol und Kresol s. § 591.

Urogon.

Urogon nannte Mooser<sup>5</sup>) eine Substanz, die von ihm aus der Phenolfraction des Kuhharns dargestellt wurde. Fricke<sup>6</sup>) gewann es aus dem Harn der Haustiere und des Menschen. Ein in Alkalien unlösliches Öl  $C_7H_8O$ , aus dem durch Kalibehandlung ein Kohlenwasserstoff Urogon  $C_{21}H_{42}$  und ein phenolartiger Körper Urogol  $C_7H_8O$  entsteht. Nach den Untersuchungen von Anderson<sup>7</sup>) liegt in dem Urogon ein Gemenge vor von p-Kresol und terpenartigen Stoffen, die

\*) Die Reagenzien müssen frei von Salpetersäure sein!

<sup>1</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 12, S. 239. 1912.

<sup>2</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 83, S. 468. 1913 u. Bd. 85, S. 91. 1913.

<sup>3</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 83, S. 165. 1913.

<sup>4</sup>) Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 145, S. 1352. 1907.

<sup>5</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 63, S. 155. 1909.

<sup>6</sup>) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 156, S. 225. 1914.

<sup>7</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 26, S. 387, 401 u. 409. 1916; s. auch Neuberg u. Czapski: Biochem. Zeitschr. Bd. 67, S. 28. 1914.

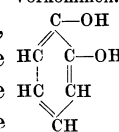


vermutlich aus der Nahrung stammen und deswegen auch eine wechselnde Zusammensetzung haben.  $C_{10}H_{16}O$  (aus Kuh- und Ziegenharn),  $C_7H_{12}O$  (aus Kuh-, Pferde- und Menschenharn).

Urinod, von Dehn und Hartmann<sup>1)</sup> aus der Phenolfraktion des Harns dargestellt, ist Urinod unzweifelhaft ebenfalls ein Gemenge. Siehe darüber Anderson.

201. **Brenzcatechin**  $C_6H_6O_2$ . Brenzcatechin findet sich als Brenzcatechinschwefelsäure (E. Baumann) sehr häufig im Menschenharn in kleinen Mengen, reichlicher und regelmäßig im Pferdeharn, fehlt aber im Harn von Tieren, die allein mit Fleisch gefüttert sind. In vermehrter Menge tritt es nach Eingabe von Phenol oder Benzol auf. Im Pferdeharn ist es auch im freien Zustande enthalten. Die Angabe von Halliburton<sup>2)</sup>, daß es in der Cerebrospinalflüssigkeit vorkomme, konnte Nawratzki<sup>3)</sup> nicht bestätigen.

Vorkommen.



Um aus dem Harne (zweckmäßig nach Eingabe von Phenol oder Benzol) Brenzcatechin und Hydrochinon (§ 202) zu erhalten, wird derselbe stark mit Salzsäure angesäuert,  $\frac{1}{2}$  Stunde auf siedendem Wasserbade digeriert und nach dem Erkalten mehrmals mit Äther extrahiert. Die Ätherlösungen schüttelt man zur Entfernung der Säuren wiederholt mit verdünnter Sodalösung, solange diese sich noch färbt, destilliert den Äther ab, versetzt den Rückstand mit gesättigter Lösung von Kochsalz oder Natriumsulfat, um Phenol und Kresol abzuschneiden, filtriert und destilliert die mit Wasser verdünnte Lösung, um Phenol und Kresol ganz zu entfernen. Nach dem Erkalten wird mit Äther extrahiert. Beim Verdunsten der abgegossenen Ätherauszüge bleiben Brenzcatechin und Hydrochinon als Sirup zurück, der krystallinisch erstarrt, wenn nicht sehr wenig Hydrochinon sich darin befindet. Man löst den Rückstand in Wasser und fällt die Lösung mit Bleiacetat aus unter Vermeidung eines Überschusses. Hierdurch wird Brenzcatechin gefällt, Hydrochinon nicht. Der Bleiniederschlag wird in Wasser zerteilt, mit Schwefelsäure zerlegt und mit Äther geschüttelt. Beim Verdunsten der abgegossenen Ätherlösung bleibt Brenzcatechin in kaum gefärbten Prismen zurück, wenn seine Quantität nicht sehr gering ist. Die vom Bleiniederschlag abfiltrierte Flüssigkeit wird angesäuert und mit Äther extrahiert. Die abgegossene Ätherlösung hinterläßt beim Verdunsten das Hydrochinon als gelben bis braunen Rückstand, der bald krystallinisch erstarrt. Durch Umkrystallisieren aus heißem Benzol oder Toluol wird es rein gewonnen.

Darstellung von Brenzcatechin und Hydrochinon aus Harn.

Um Brenzcatechin für die Zwecke des Nachweises zu isolieren, destilliert man den mit Salzsäure versetzten Harn, bis keine flüchtigen Phenole mehr entweichen (§ 200), schüttelt die zurückgebliebene Flüssigkeit nach dem Erkalten mit Äther und den Ätherauszug mit verdünnter Sodalösung. Der Äther wird verdunstet, der Rückstand mit wenig Wasser aufgenommen und die filtrierte wässrige Lösung, wie weiter unten angegeben, auf Brenzcatechin geprüft.

Isolierung aus Harn.

Brenzcatechin schmilzt bei  $104^\circ$ , siedet ohne Zersetzung bei  $245,5^\circ$  und sublimiert schon vorher zu glänzenden Krystallblättchen. Es löst sich leicht in Wasser, Alkohol, Äther und kaltem Benzol. Seine wässrige Lösung wird durch Bleiacetat gefällt; sie färbt sich mit Eisenchlorid grün, bei nachherigem Zusatz von Natriumbicarbonat, Ammoniak oder Alkalien tiefrot (bei starker Verdünnung über Rotviolett in Violett), von Natriumacetat violett (Weinland und Binder<sup>4)</sup>). Mit salpetersaurem Silber und etwas Ammoniak tritt Reduktion von Silber ein, ebenso wird Fehlingsche Lösung beim Erwärmen reduziert. Durch Alkalien werden seine Lösungen unter Braunfärbung zersetzt.

Eigenschaften.

<sup>1)</sup> Journ. of the Americ. chem. soc. Bd. 36, S. 2136; ref. Chem. Zentralbl. 1915, I, S. 795.

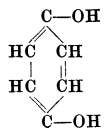
<sup>2)</sup> Journ. of physiol. Bd. 10, S. 232. 1889.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 23, S. 532. 1897.

<sup>4)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 45, 1, S. 148 u. 1113. 1912.

Nachweis. Zum Nachweis des Brenzcatechins dient besonders das Verhalten seiner wässerigen Lösung gegen Eisenchlorid und gegen Silbernitrat und Ammoniak.

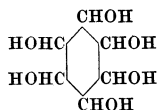
Vorkommen. 202. **Hydrochinon**  $C_6H_6O_2$ . Hydrochinon wurde als Hydrochinonschwefelsäure im Harn von Menschen und Tieren gefunden, denen Benzol, Phenol oder Hydrochinon beigebracht war, vielleicht enthält auch der normale Harn sehr geringe Spuren davon (E. Baumann<sup>1</sup>).



Über seine Darstellung aus Harn s. § 201.

Eigenschaften. Es schmilzt bei 169°, löst sich in Wasser im Verhältnis 1:17 bei 15°, leicht in Alkohol oder Äther, sehr schwer in kaltem Benzol. Seine wässrige Lösung wird durch Bleiacetat nicht gefällt. Erhitzt man eine kleine Portion Hydrochinon im offenen Probierrohre, so färbt sich das Sublimat indigoblau. Durch oxydierende Substanzen, z. B. beim Kochen mit Eisenchlorid, verwandelt es sich in Chinon, dessen eigentümlicher starker Geruch es leicht erkennen läßt. Das Chinon sublimiert schon bei gewöhnlicher Temperatur und bildet goldgelbe Prismen. Wässrige Lösung von Hydrochinon reduziert Silber aus Silbernitratlösung sogleich in der Kälte und wird durch Ammoniak braun gefärbt. Mit Millon's Reagens werden Lösungen von Hydrochinon in der Kälte gelb gefärbt, nach kurzer Zeit entsteht ein gelber Niederschlag, der sich beim Erhitzen ziegelrot färbt.

Vorkommen. 203. **i-Inosit (Phaseomannit)**  $C_6H_{12}O_6$  in verschiedenen Pflanzen, im



frischen Traubensaft und im Wein, in Maispollen, besonders in grünen Bohnen enthalten und daraus leicht in größerer Quantität darzustellen, findet sich in geringer Menge im Herzfleisch, auch in anderen Muskeln, besonders bei Säufnern, in der Leber, Milz, Lunge, in den Nieren, Nebennieren, Leukocyten, im Gehirn, Sperma, in der Milch, Placenta, in Hühnereiern. In wachsenden Geweben findet es sich reichlicher als in älteren (Starkenstein<sup>2</sup>). Im Harn ist Inosit besonders bei Albuminurie und bei Diabetes mellitus und insipidus, aber nur in geringer Menge und keineswegs regelmäßig, gefunden. Nach reichlichem Wassertrinken erscheint er im Harn. Nach Hoppe-Seyler, Rosenberger<sup>3</sup>, Starkenstein finden sich kleine Mengen regelmäßig im normalen Harn. Auch die Flüssigkeit von Echinokokken in der Leber enthält etwas Inosit. In den Pflanzensamen ist eine Substanz (Phytin) gefunden worden, welche bei der Spaltung Inosit und Phosphorsäure liefert.

Isolierung. Zur Isolierung aus Geweben<sup>4</sup>) extrahiert man das fein zerkleinerte Material mit Aceton<sup>5</sup>) (z. B. auf 1 Kilogramm Muskeln 1,25 Liter), preßt am nächsten Tage ab, filtriert, verdunstet das Aceton unter vermindertem Druck und fällt mit basischem Bleiacetat und Ammoniak. Der Niederschlag, welcher den Inosit enthält, wird in Wasser zerteilt, mit Schwefelwasserstoff zersetzt, das Filtrat vom Schwefelblei stark eingeeengt und kochendheiß mit dem 3—4fachen Volumen Alkohol versetzt. Entsteht hierdurch ein starker, am Glase haftender Niederschlag, so gießt man die heiße alkoholische Lösung einfach ab; entsteht aber ein flockiger, nicht klebriger Niederschlag, so filtriert man sie durch einen zuvor erhitzten Trichter und läßt erkalten. Wenn sich nach 24 Stunden Gruppen von Inositskrystallen abgesetzt haben, so filtriert man und spült die Krystalle mit wenig kaltem Alkohol ab. In diesem Falle ist es ratsam, um keinen Verlust an Inosit zu erleiden, den auf Zusatz von heißem Alkohol erhaltenen Niederschlag in wenig kochendem Wasser zu lösen, die heiße Lösung wiederum mit dem 3- bis 4fachen Volumen Alkohol zu fällen und, wie oben angegeben, weiter zu verfahren. Haben sich aber keine Inositskrystalle abgeschieden, so versetzt man das klare alkoholische Filtrat nach und nach unter Umschütteln mit Äther, bis eine geringe milchige Trübung nicht wieder verschwindet, und läßt dann 24 Stunden

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 6, S. 183. 1882.

<sup>2</sup>) Zeitschr. f. exp. Pathol. u. Therapie Bd. 5, S. 378. 1909.

<sup>3</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 56, S. 373. 1908.

<sup>4</sup>) Bödeker: Ann. d. Chem. Bd. 117, S. 118. 1861.

<sup>5</sup>) Momose: Bioch. Journ. Bd. 10, S. 120; ref. Chem. Zentrbl. 1916 II, S. 1171, Neadham: Bioch. Journ. Bd. 17, S. 422. 1923.

stehen. Hat man hinreichend Äther zugesetzt (ein Überschuß von Äther schadet nicht, bewirkt nur die Bildung kleinerer Krystalle), so ist aller Inosit in Form schön perlmutterglänzender Blättchen abgeschieden.

Wegen der Isolierung aus Harn s. § 594.

Inosit wurde aus Hexaoxybenzol durch Reduktion mit Wasserstoff und Palladiumschwarz erhalten (Wieland und Wishart<sup>1</sup>). Er krystallisiert mit 2 Mol. Wasser, in reinem Zustande in farblosen, großen, rhomboedrischen Krystallen des monoklinoedrischen Systems, im unreinen in zarten dendritischen Vegetationen. In trockener Luft und bei 100° verlieren die Krystalle das Krystallwasser. Getrocknet schmelzen sie bei 218—219°, und beim Erkalten erstarrt die Masse zu feinen Nadeln. Er löst sich leicht in Wasser (1:7,5), ist dagegen in starkem Alkohol oder Äther unlöslich. Die wässrige Lösung besitzt süßen Geschmack, gibt mit Hefe versetzt keine alkoholische Gärung, bewirkt keine Zirkumpolarisation, löst Kupferoxydhydrat, ohne es beim Kochen zu reduzieren, und wird durch Bleiessig bei gewöhnlicher Temperatur nach einiger Zeit, beim Kochen sogleich gallertig gefällt. Überschuß ist zu vermeiden. Völlige Fällung nur, wenn noch Ammoniak oder Cadmiumnitrat zugegeben wird. Größerer Zuckergehalt beeinträchtigt die Fällung (Meillère und Fleury<sup>2</sup>). Auch überschüssiges Kupferacetat fällt Inosit vollständig aus einer mit Ammoniak neutralisierten Lösung (Thudichum<sup>3</sup>), Meillère<sup>4</sup>). Mit Phenylhydrazin gibt Inosit keine Verbindung. Beim Erhitzen von entwässertem Inosit mit Acetylchlorid am Rückflußkühler auf 50° erhält man Hexaacetylinosit, bei 200° sublimierende und bei 212° schmelzende Krystalle; ferner ist Hexabenzoylinosit<sup>5</sup>), bei 258° schmelzende Nadeln, Hexa-p-brombenzoylinosit (Fp. 264°) (Odén<sup>6</sup>), dargestellt. Mit konzentrierter Salpetersäure digeriert geht Inosit in das Hexanitrat über, welches durch Schwefelsäure gefällt wird, in Alkohol löslich ist und Silberoxyd sowie Kupferoxydhydrat reduziert. Inosit gibt Jodoformreaktion (S. 52) (Neuberg<sup>7</sup>).

Durch Kochen mit Salzsäure oder verdünnter Schwefelsäure oder verdünnten Alkalien wird Inosit nicht verändert. Mit Jodwasserstoff auf 170° erhitzt bildet er etwas Benzol und Trijodphenol. Bei der elektrolytischen Oxydation und bei der Oxydation mit Salpetersäure entstehen Leukonsäure, Pentaosim, Oxalsäure (Contardi<sup>8</sup>). Bei der trockenen Destillation entsteht etwas Furfurol (Neuberg<sup>9</sup>). Bei Gegenwart von faulenden Eiweißstoffen zerfällt er in wässriger Lösung unter Bildung von Milchsäure und Buttersäure, und zwar ist sowohl d,l- als d-Milchsäure (Vohl<sup>10</sup>), Hilger<sup>11</sup>) gefunden worden. Über Vergärung durch Bac. lact. aerog. s. Hewitt und Steabben<sup>12</sup>). Kaninchen wandeln ihn in d,l-Milchsäure um (P. Mayer<sup>13</sup>).

Zum Nachweis des Inosits, dem die Isolierung vorangehen muß, dienen folgende Reaktionen:

<sup>1</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 47, 2, S. 2082. 1914.

<sup>2</sup>) Journ. de pharmacie et de chim. (7) Bd. 1, S. 348; ref. Chem. Zentralbl. 1910, I, S. 1941.

<sup>3</sup>) Die chemische Konstitution des Gehirns. Tübingen: Pietzcker 1901, S. 240.

<sup>4</sup>) Journ. de pharmacie et de chim. (6) Bd. 26, S. 300. 1907.

<sup>5</sup>) Maquenne: Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 104, S. 225, 297 u. 1719. 1887. — Fick: Pharmazeut. Zeit. f. Rußland Bd. 26.

<sup>6</sup>) Chem. Zentralbl. 1919, III, S. 538.

<sup>7</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 43, S. 500. 1912.

<sup>8</sup>) Gazz. chim. ital. Bd. 51, S. 1. 109; ref. Chem. Zentralbl. 1921, III, S. 629.

<sup>9</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 9, S. 551. 1908.

<sup>10</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 9, 1, S. 984. 1876.

<sup>11</sup>) Ann. d. Chem. Bd. 160, S. 333. 1871.

<sup>12</sup>) Biochem. journ. Bd. 15, S. 665. 1921.

<sup>13</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 9, S. 533. 1908.

1. Scherersche Probe<sup>1)</sup>. Verdunstet man eine kleine Menge mit Salpetersäure auf dem Platinblech oder im Schälchen fast zur Trockne, fügt zum Rückstand etwas Ammoniak und 1 Tropfen Chlorcalciumlösung und dampft vorsichtig zur Trockne, so erhält man eine schön rosarote Färbung (Rhodizon-säure). Diese Reaktion gelingt aber nur, wenn der Inosit schon ziemlich rein ist.

Nach Salkowski<sup>2)</sup> verfährt man besser so: Man löst etwas von der Substanz in 1—2 Tropfen Salpetersäure (1,2 spez. Gew.), setzt 1 Tropfen 10proz. Calciumchloridlösung (bezogen auf entwässertes Calciumchlorid), dann 1 Tropfen 1—2proz. Platinchloridlösung hinzu und verdampft vorsichtig unter Blasen auf einen Porzellantiegeldeckel: Rosarote bis ziegelrote Färbung. Läßt man die Probe liegen, so wird der Rückstand durch Wasseraufnahme orange. Beim Erhitzen tritt die Rotfärbung mitunter mit blauer Nuance wieder auf.

2. Seidelsche Probe<sup>3)</sup>. Die Ausführung ist dieselbe, man verwendet nur statt des Chlorcalciums wenige Tropfen einer Strontiumacetatlösung, worauf sich eine Grünfärbung mit violetter Niederschlag zeigt. Diese Reaktion gelingt noch mit 0,3 mg Inosit.

3. Gallois'sche Probe<sup>4)</sup>. Verdunstet man eine Inositolösung bei gelinder Wärme nahezu zur Trockne, fügt 1 Tröpfchen Mercurinitratlösung hinzu und bringt wieder vorsichtig zur Trockne, so erhält man einen gelblichweißen Rückstand, der bei weiterem vorsichtigen Erwärmen dunkelrosenrot wird. Beim Erkalten verschwindet die Färbung, kommt aber beim Erwärmen wieder.

Vorkommen. 204. Scyllit  $C_6H_{12}O_6$  wurde von Staedeler und Frerichs<sup>5)</sup> in Leber, Kiemen, Milz, besonders in den Nieren von Rochen und Haifischen gefunden. Es findet sich auch in den Muskeln (H. Müller<sup>6)</sup>) und im Gehirn (Rosenheim<sup>7)</sup>) dieser Tiere und auch im Pflanzenreich, z. B. den Cocosblättern (H. Müller). Seine Zusammensetzung und seine Beziehung zum Inosit sind erst durch J. Müller<sup>8)</sup> festgestellt.

Eigenschaften. Er krystallisiert ohne Krystallwasser, schmeckt schwach süßlich, ist in Wasser wenig löslich (bei 18° etwa 1 : 100), in absolutem Alkohol unlöslich. Er schmilzt über 340°, schätzungsweise gegen 360°. Er wird durch basisches Bleiacetat kleisterartig gefällt, durch Kochen mit Natronlauge nicht verändert, auch nicht durch Salpetersäure, in der er sich beim Erhitzen langsam ohne Zersetzung löst. Er ist optisch inaktiv, reduziert nicht Fehlingsche Lösung. Hexacetylsyllit in Wasser unlöslich, schmilzt ebenfalls sehr hoch. Scyllit gibt die Probe von Scherer (§ 203) aber nur, wenn man sie ohne Ammoniak anstellt, und die Probe von Gallois (§ 203).

Vorkommen. Mytilit  $C_6H_{12}O_5$  wurde von Jansen<sup>9)</sup> und von Ackermann<sup>10)</sup> aus den Schließmuskeln der Miesmuschel, *Mytilus edulis*, erhalten. Nach Ackermann handelt es sich um ein am Kohlenstoff methyliertes Cyclohexanhexol. Es krystallisiert aus dem eingeeengten Filtrat der Fällung des wässerigen Auszugs der Muskeln mit kolloidaler Ferrihydroxydlösung. Ackermann erhielt nach einem etwas anderen Verfahren aus 42 kg Miesmuscheln 6 g.

Eigenschaften. Er krystallisiert mit 2  $H_2O$ , löst sich zu 0,43% bei 24°, viel leichter in kochendem Wasser, nicht in organischen Lösungsmitteln mit Ausnahme von kochender Essigsäure. Schwach süßer Geschmack. Fp. 259°, optisch inaktiv.

<sup>1)</sup> Ann. d. Chem. Bd. 81, S. 375. 1852.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 69, S. 479. 1910.

<sup>3)</sup> Dissert. Dorpat 1884.

<sup>4)</sup> Zeitschr. f. analyt. Chem. Bd. 4, S. 264. 1865.

<sup>5)</sup> Journ. f. prakt. Chem. Bd. 73, S. 48. 1858.

<sup>6)</sup> Journ. chem. soc. (London) Bd. 101, S. 2383. 1912.

<sup>7)</sup> Journ. of physiol. Bd. 51, Proc. S. 7—8; ref. Malys Jahresber. 1917, S. 196.

<sup>8)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 40, 2, S. 1821. 1907.

<sup>9)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 85, S. 231. 1913.

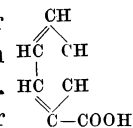
<sup>10)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 54, 2, S. 1938. 1921. — Zeitschr. f. Biol. Bd. 80, S. 193. 1924.

Bei der Acetylierung mit Eisessig und einer Spur konzentrierter Schwefelsäure entsteht Hexaacetylmytilit, Fp. 180—181°. Scherersche Probe (§ 203) schwach positiv, Galloissche Probe (§ 203) negativ.

#### Aromatische Säuren.

205. **Benzoesäure**  $C_7H_6O_2$  tritt im frischen Harn nur nach reichlicher Zufuhr von Benzoesäure auf; sie findet sich im Harn zahlreicher Pflanzenfresser (Pferde, Wiederkäuer, Pachydermen, Nager), wenn derselbe einige Zeit gestanden hat, allmählich aus der Hippursäure durch bakterielle Zersetzung entstehend. Der menschliche Harn enthält auch nach mehrtägigem Stehen meist nur sehr geringe Mengen. Sie entsteht auch bei der Oxydation von Proteinen.

Vorkommen.



Man stellt sie dar durch vorsichtige Sublimation von Benzoeharz oder durch viertelstündiges Kochen von Hippursäure mit konzentrierter Salzsäure.

Darstellung.

Zur Isolierung aus Flüssigkeiten werden diese nach Zusatz von Natriumcarbonat eingedampft; den sirupartigen Rückstand extrahiert man zunächst zur Entfernung von Fett mit Äther, fügt dann Schwefelsäure hinzu und schüttelt wieder mehrmals mit Äther aus. Im Rückstand des Ätherauszugs können neben der Benzoesäure Fettsäuren, Milchsäure, Hippursäure, Bernsteinsäure, Oxalsäure vorhanden sein. Durch Abspülen mit wenig kaltem Wasser lassen sich Milchsäure, Essigsäure und Buttersäure entfernen; durch Lösen in viel Wasser läßt sich die Benzoesäure von den höheren Fettsäuren, durch Lösen in Petroläther von der Hippursäure befreien. Von Bernsteinsäure und Oxalsäure trennt man sie durch die Unlöslichkeit des bernsteinsäuren Kalks in Alkohol und des oxalsäuren Kalks in Wasser.

Die Benzoesäure, besonders die sublimierte, bildet große, langgestreckte, dünne, biegsame, farblose Tafeln von rechteckiger Form. Bei der Ausfällung durch Säure aus den Lösungen der benzoesauren Salze erhält man meist sehr schlechtbegrenzte Krystalle. Sie schmilzt bei 121,25° und siedet unzersetzt bei 250°. Die Dämpfe reizen die Schleimhäute. Sie löst sich leicht in Alkohol, Essigäther, Benzol, auch leicht in Äther, weniger leicht in Petroläther, schwer in kaltem (1 g in 370 ccm bei 18°), leichter in heißem Wasser. Beim Kochen ihrer wässrigen Lösungen verflüchtigt sie sich reichlich mit den Wasserdämpfen. Die Verbindungen mit Alkalien, Kalk und Magnesia sind in Wasser leicht löslich, die Silber-, Blei- und Quecksilberverbindungen fast unlöslich. Benzoesaures Ammoniak verliert an der Luft Ammoniak. Mit neutralem Eisenchlorid geben neutrale Lösungen benzoesaurer Salze voluminöse Niederschläge von benzoesaurem Eisen. Die Salze der Benzoesäure haben stark hydrotropische Eigenschaften, d. h. sie vermögen viele der in Wasser unlöslichen Substanzen in wässrige Lösung überzuführen (Neuberg<sup>1</sup>). Erhitzt man eine Spur mit einigen Tropfen Alkohol und 1 Tropfen konzentrierter Schwefelsäure, so tritt der angenehme aromatische Geruch des Äthylesters auf.

Eigenschaften.

Kochen mit konzentrierter Salzsäure greift die Säure nicht an, Kochen mit konzentrierter Salpetersäure verwandelt sie in Nitrobenzoesäure. Mit Alkali oder Natronkalk stark erhitzt zersetzt sie sich zu Kohlensäure und Benzol. Kocht man Benzoesäure mit etwas starker Salpetersäure in einer Porzellanschale stark ein und erhitzt dann stärker, so tritt der Geruch nach Bittermandelöl (Nitrobenzol) auf (Lückesche Reaktion). In wässriger Lösung bei Gegenwart von Ferrisalzen geht sie im Sonnenlicht in Salicylsäure über (Neuberg<sup>2</sup>).

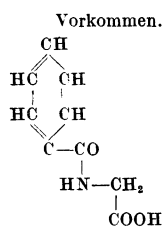
Umwandlungen.

Zum Nachweis der Benzoesäure dient außer der Krystallform, der Sublimierbarkeit und den Löslichkeitsverhältnissen besonders die Lückesche Reaktion.

Nachweis.

<sup>1</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 76, S. 107. 1916.

<sup>2</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 27, S. 271. 1910 u. Bd. 39, S. 158. 1912.



206. Hippursäure  $\text{C}_9\text{H}_9\text{NO}_3$  findet sich fast konstant reichlich im frischen Harn von Pferden, Wiederkäuern, Pachydermen und anderen pflanzenfressenden Säugetieren, in geringer Menge im Harn von Menschen, auch oft bei reiner Fleischkost oder lange dauernder Inanition. Auch im Hundeharn ist sie in kleinen Mengen vorhanden, fehlt aber bei völligem Ausschluß der Darmfäulnis (Baumann<sup>1</sup>). Im Harn von Schildkröten und mehreren Insektenarten ist sie gleichfalls gefunden, nie dagegen im Vogelharn. Sie tritt im Harn von Menschen, Hunden usw. reichlich auf nach Einführung von Benzoesäure oder Zimmtsäure, Toluol, Bittermandelöl, Chinasäure, Phenylpropionsäure usw., reichlicher auch nach Genuß von Beerenfrüchten. Nach Zufuhr von Benzoesäure ist Hippursäure in geringer Menge im Schweiß gefunden, dagegen im Rinderblut vergeblich gesucht worden. Die ausgeschnittenen noch lebenden Nieren vom Hunde bilden bei der künstlichen Durchströmung mit Blut, welches Benzoesäure und Glykokoll enthält, noch Hippursäure; bei Kaninchen können auch andere Organe diese Funktion erfüllen.

**Darstellung.** Synthetisch stellt man Hippursäure dar durch allmähliches Eintragen von trockenem Glykokoll in erhitztes Benzoesäureanhydrid und Erwärmen im Ölbad, bis die Masse sich rot färbt (Curtius<sup>2</sup>) oder noch besser nach der von Baum<sup>3</sup>) angewendeten Methode: Man löst Glykokoll in wenig Wasser, fügt einige Tropfen Natronlauge hinzu, schüttelt mit Benzoylchlorid, das allmählich im Überschuß zugesetzt wird, und macht schließlich mit Natronlauge stark alkalisch. Auf Zusatz von Salz- oder Schwefelsäure fällt ein Gemenge von Benzoesäure und Hippursäure aus, dem man durch Extraktion mit Äther die Benzoesäure entzieht. Die zurückbleibende Hippursäure wird aus heißem Wasser umkrystallisiert.

**Darstellung aus Pferde- oder Rinderharn.**

Zur Darstellung aus Pferde- oder Rinderharn dampft man den frischen Harn bei möglichst neutraler Reaktion auf kleines Volumen ein und fügt nach dem Erkalten unter gutem Umrühren starke Salzsäure hinzu. Die auskrystallisierte Säure wird nach 24 Stunden abgesaugt, ausgewaschen und aus heißem Wasser umkrystallisiert. Um den Farbstoff zu entfernen, kann man sie in sehr verdünnter Natronlauge lösen, zum Sieden erhitzen, unterchlorigsaures Natron in kleinen Portionen bis zur Entfärbung hinzufügen und nach dem Erkalten durch Salzsäure wieder die Ausscheidung bewirken, oder man kann in die heiße wässrige Lösung der freien Säure Chlor einleiten, bis die Flüssigkeit danach riecht, schnell filtrieren und die ausgeschiedene Säure unter Zusatz von Tierkohle mehrmals umkrystallisieren (Curtius<sup>4</sup>).

**Isolierung aus Menschenharn.**

Zur Isolierung der Hippursäure aus Menschenharn oder anderen Harnen, die nur geringe Mengen enthalten, verdampft man die möglichst neutral gemachte Flüssigkeit auf dem Wasserbade zum dicken Sirup, extrahiert mit Alkohol, dampft den alkoholischen Auszug ein, säuert ihn mit Salzsäure an und schüttelt wiederholt mit Essigäther aus. Die abgegossenen Essigätherlösungen wäscht man mit kleinen Mengen Wasser oder Kochsalzlösung, verdunstet den Essigäther und erschöpft den Rückstand mit frisch destilliertem Petroläther, welcher die Benzoesäure aufnimmt, die Hippursäure ungelöst läßt (Schmiedeberg und Bunge<sup>5</sup>).

**Eigenschaften.**

Die Hippursäure scheidet sich beim langsamen Erkalten der heiß gesättigten Lösung meist in harten, zerbrechlichen, langen, 4seitigen Prismen mit 2 oder 4 Pyramidenflächen am Ende ab, die dem rhombischen System zugehören. Sie lösen sich in 600 Tl. Wasser von 0°, viel reichlicher in heißem Wasser, leicht in Alkohol, wenig in Äther, besser in Essigäther, sehr schwer in kochendem

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 10, S. 123. 1886.

<sup>2</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 17, 2, S. 1662. 1884.

<sup>3</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 9, S. 465. 1885.

<sup>4</sup>) Journ. f. prakt. Chem., N. F. Bd. 26, S. 145. 1882.

<sup>5</sup>) Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 6, S. 233. 1877.

Chloroform, gar nicht in Petroläther, Benzol, Schwefelkohlenstoff; sehr reichlich (88%) löst sie sich in 50proz. Pyridinwasser (Dehn<sup>1</sup>). Trocken erhitzt schmilzt die Hippursäure bei 187°. Sie verflüchtigt sich nicht mit Wasserdämpfen. Die Lückesche Reaktion (§ 205) fällt auch mit Hippursäure positiv aus.

Die hippursäuren Salze sind meist in Wasser löslich, besonders leicht die Salze der Alkalien und alkalischen Erden. Hippursäures Silber löst sich in heißem Wasser und scheidet sich beim Erkalten in weißen, seideglänzenden Nadeln ab. Hippursäures Eisenoxyd ist ein hellbrauner Niederschlag, der in Wasser sehr schwer, in Harn leichter löslich ist. Bei gewöhnlicher Temperatur geben neutrale hippursäure Salze mit Eisenchlorid einen Niederschlag, der auf 1 Atom Eisen 2 Mol. Hippursäure enthält, beim Erhitzen der Flüssigkeit wird Hippursäure daraus frei und der Niederschlag enthält dann auf 1 Atom Eisen 1 Mol. Hippursäure.

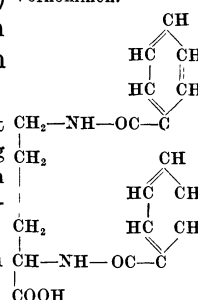
Beim Erhitzen über ihren Schmelzpunkt färbt sich Hippursäure rot und zersetzt sich unter Bildung von Benzoesäure, welche sublimiert, Blausäure und Benzonitril, welche einen bittermandelartigen Geruch bewirken. Beim Kochen mit Wasser wird Hippursäure nicht verändert, aber beim Kochen mit starker Salzsäure, schneller beim Kochen mit starker Alkalilauge unter Wasseraufnahme in Glykokoll und Benzoesäure gespalten. Bei 2stündigem Kochen von 1 g mit 50 ccm 10proz. Natronlauge am Rückflußkühler fand nahezu völlige Spaltung (über 99%) statt (Steenbock<sup>2</sup>), bei 16stündigem Erhitzen von 0,2 g in 50 ccm 0,5proz. Natronlauge auf dem Wasserbad wurde 98,2%, bei 1½stündigem Kochen von 0,03 g mit 30 ccm 15proz. Salzsäure 90% gespalten (Folin und Flanders<sup>3</sup>). Dieselbe Spaltung vollzieht sich beim Stehen und Faulen hippursäurehaltigen Harns oder nach Zusatz von faulenden Massen zu verdünnten, wässerigen Lösungen hippursaurer Salze. In Kokken (Seo<sup>4</sup>), Schimmelpilzen (Dox und Neidig<sup>5</sup>), Schweine- und Hundenieren (Schmiedeberg<sup>6</sup>), Minkowski<sup>7</sup>), Mutch<sup>8</sup>) enthaltene Fermente vermögen Hippursäure zu spalten.

Zum Nachweis der Hippursäure dienen die Krystallform, der Schmelzpunkt, das Verhalten beim Erhitzen über den Schmelzpunkt, die Löslichkeitsverhältnisse sowie auch die Lückesche Reaktion. Zur Erkennung sehr kleiner Mengen von Hippursäure empfiehlt Spiro<sup>9</sup>) die Lactimidprobe (Kondensation der Hippursäure mit Benzaldehyd).

207. Ornithursäure (Dibenzoylornithin) C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>. Diese von Jaffe<sup>10</sup>) entdeckte Säure ist in den beiden aktiven und der inaktiven Modifikation bekannt. Sie erscheint als d-Ornithursäure (an Stelle der Hippursäure) im Harn von Vögeln nach Eingabe von Benzoesäure (Jaffe).

Zu ihrer synthetischen Darstellung schüttelt man eine wässrige Lösung von Ornithin mit Benzoylchlorid und Natronlauge, säuert mit Salzsäure an, filtriert den entstandenen Niederschlag ab und löst ihn nach wiederholter Behandlung mit kochendem Wasser in heißem Alkohol. Beim Verdunsten der alkoholischen Lösung krystallisiert Ornithursäure heraus (E. Schulze und Winterstein<sup>11</sup>).

Die so aus inaktivem Ornithin erhaltene inaktive Ornithursäure läßt sich mittels der Brucin- und Cinchoninsalze in die optisch aktiven Formen spalten



<sup>1</sup>) Journ. of the Americ. chem. soc. Bd. 39, S. 1399; ref. Chem. Zentralbl. 1918, I, S. 49.

<sup>2</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 11, S. 206. 1912. <sup>3</sup>) desgl. Bd. 11, S. 257. 1912.

<sup>4</sup>) Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 58, S. 446. 1908.

<sup>5</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 85, S. 68. 1913.

<sup>6</sup>) Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 14, S. 379. 1881.

<sup>7</sup>) Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 17, S. 444. 1883.

<sup>8</sup>) Journ. of physiol. Bd. 44, S. 176. 1912.

<sup>9</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 28, S. 174. 1899.

<sup>10</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 10, S. 1926. 1876 u. Bd. 11, S. 406. 1878.

<sup>11</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 26, S. 1. 1898/99.

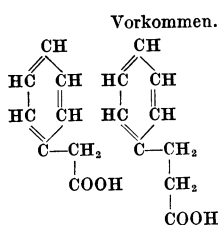
(Sörensen<sup>1</sup>). Über die komplizierte Darstellung aus Harn s. die Arbeit von Jaffe.

**Eigenschaften.** Die Säure krystallisiert ohne Krystallwasser in sehr kleinen, farblosen Nadeln, die sehr schwer löslich in heißem Wasser und in Äther so gut wie unlöslich sind. Sie lösen sich leichter in Essigäther, am leichtesten in heißem Alkohol, beim Erkalten sich größtenteils ausscheidend. Die Lösungen röten Lackmus. Schmelzpunkt der aktiven und inaktiven Säure 184—185°. Beim stärkeren Erhitzen tritt Bittermandelgeruch und wolliges Sublimat ähnlich wie beim Leucin auf. In nicht ganz reinem Zustande abgeschieden bildet sie zunächst milchige Trübung, dann eine pflasterartige Masse, die allmählich krystallisiert; im reinen Zustande scheidet sie sich gleich krystallinisch aus. Ihre Verbindungen mit Alkalien sind in Wasser mit neutraler Reaktion löslich. Das Barytsalz ist in Wasser und Alkohol leicht löslich, in Äther unlöslich. Das Kalksalz, welches beim Erhitzen der wässrigen Lösung von ornithursäurem Ammoniak mit Chlorcalcium sich krystallinisch abscheidet, ist in Wasser sehr schwer, in Alkohol und Äther unlöslich. Das Kalksalz der aktiven Säure krystallisiert in Nadeln und ohne Krystallwasser, das der inaktiven in Blättchen und mit 1 Mol. Krystallwasser (Sörensen).

**Optische Eigenschaften.** Eine schwach alkalische etwa 10proz. Lösung des Natronsalzes zeigt  $[\alpha]_D = +$  bzw.  $-9,2-9,3^\circ$ . Mit steigender Konzentration nimmt die Drehung etwas ab (Sörensen).

E. Fischer<sup>2</sup>) fand für eine wässrige etwa 10proz. Lösung der d-Säure bei Gegenwart von etwas Alkali  $[\alpha]_D^{20} = +7,85^\circ$ . Dieser niedrigere Wert ist wohl durch beigemengte racemische Säure bedingt.

**Umwandlungen.** Beim Erhitzen mit starker Salzsäure zerfällt die Ornithursäure zunächst in Benzoesäure und  $\delta$ -Monobenzoylornithin und weiter in Benzoesäure und Ornithin, beim Erhitzen mit 0,2 oder 0,4-n-Barytwasser in Benzoesäure und  $\alpha$ -Monobenzoylornithin (Sörensen<sup>3</sup>). Das inaktive  $\delta$ -Benzoylornithin schmilzt bei 285—288° (nach E. Fischer und Zemplén<sup>4</sup>) gegen 260°, das inaktive  $\alpha$ -Benzoylornithin bei 264—267° (Sörensen). Das  $\delta$ -Benzoyl-d-Ornithin schmilzt bei 225—240°. Es bildet zarte weiche Nadeln, ist leicht löslich in Wasser, unlöslich in Äther, fast unlöslich in Alkohol, gibt mit Mineralsäuren leicht lösliche Salze, aus deren konzentrierter Lösung fällbar durch Neutralisation oder Zusatz von essigsaurem Alkali (Jaffe).



208. Phenyllessigsäure  $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_2$ ,  $\beta$ -Phenylpropionsäure (Hydrozimtsäure)  $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_2$  wurden von E. und H. Salkowski<sup>5</sup>) als Produkte der Eiweißfäulnis erhalten. Bei sehr langer Dauer der Fäulnis kann die Phenyllessigsäure überwiegen, bei sehr kurzer Dauer vielleicht fehlen. Beide Säuren oder nur die Phenylpropionsäure sind auch bei der Zersetzung von Eiweiß und Leim durch anaerobe Bakterien (Rauschbrandbacillen, *Bac. liquef. magnus*, Nencki<sup>6</sup>), bei der Fäulnis des Gehirns (Stöckly<sup>7</sup>) und im Panseninhalt des Rindes bei Heufütterung (Tappeiner<sup>8</sup>) gefunden.

**Darstellung.** Synthetisch erhält man Phenyllessigsäure am besten nach Mann<sup>9</sup>) und Städel<sup>10</sup>) durch Kochen von Benzylchlorid mit alkoholischem Cyankalium und Verseifen des Cyanids mit wenig

<sup>1</sup>) Cpt. rend. du Labor. de Carlsberg Bd. 6, S. 1. 1903 u. Bd. 6, S. 209. 1905.

<sup>2</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 34, 1, S. 454. 1901.

<sup>3</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 43, 1, S. 643. 1910 u. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 76, S. 44. 1911/12.

<sup>4</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 42, 1, S. 1022. 1909.

<sup>5</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 12, 1, S. 107 u. 653. 1879. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 9, S. 8 u. 491. 1876 u. Bd. 10, S. 150. 1877.

<sup>6</sup>) Monatshefte f. Chem. Bd. 10, S. 506 u. 908. 1889.

<sup>7</sup>) Journ. f. prakt. Chem. N. F. Bd. 24, S. 17. 1881. <sup>8</sup>) Zeitschr. f. Biol. Bd. 22, S. 236. 1886.

<sup>9</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 14, 2, S. 1645. 1881. <sup>10</sup>) desgl. Bd. 19, 2, S. 1949. 1886.



verdünnter Schwefelsäure, Phenylpropionsäure aus Zimtsäure durch Einwirkung von Natriumamalgam.

Die Darstellung aus Fäulnisgemischen geschieht nach § 229. Es ist nötig, größere Mengen von Eiweiß faulen zu lassen. Aus 2 kg Fleisch erhielten E. und H. Salkowski etwa 5—6 g eines Gemisches der beiden Säuren. Zur Trennung verreibt man die ölige Flüssigkeit mit Zinkoxyd und Wasser, kocht den Brei mit großen Mengen Wasser aus und filtriert heiß. Der Rückstand enthält das phenylpropionsaure Zink, das Filtrat, abgesehen von kleinen Mengen einer anders schmelzenden Substanz, welche sich beim Erkalten abscheidet, und von der man abfiltriert, phenylessigsäures Zink. Dasselbe scheidet sich beim Eindampfen ab. Durch Zersetzen der Zinksalze mit Salzsäure gewinnt man die freien Säuren.

Trennung von Phenylessigsäure und Phenylpropionsäure.

Die Phenylessigsäure krystallisiert in breiten Blättchen, schmilzt bei 76,5° und siedet bei 262°, die Phenylpropionsäure krystallisiert in langen, feinen Nadeln, schmilzt bei 48,7° und siedet bei 280°. Beide lösen sich reichlich in heißem Wasser, leicht in Alkohol oder Äther, wenig in kaltem Wasser. Beide werden durch Chromsäure zu Benzoesäure oxydiert und geben die Lückesche Reaktion (§ 205). Phenylessigsäure Salze haben stark hydrotropische Eigenschaften (s. Benzoesäure). In den Körper eingeführte Phenylessigsäure erscheint im Harn von Hunden und Kaninchen als Phenacetursäure (E. und H. Salkowski), im Harn von Vögeln als Phenacetornithursäure (Totani<sup>1</sup>), im Harn von Menschen als Phenacetylglutamin (Thierfelder und Sherwin<sup>2</sup>), in den Körper eingeführte Phenylpropionsäure als Hippursäure.

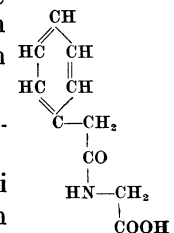
Eigenschaften.

209. Phenacetursäure  $C_{10}H_{11}NO_3$  findet sich nach E. und H. Salkowski<sup>3</sup>), welche sie entdeckten, im normalen Pferdeharn und wahrscheinlich gelegentlich auch im normalen Menschenharn. In den Körper von Hunden und Kaninchen eingeführte Phenylessigsäure erscheint im Harn als Phenacetursäure.

Vorkommen.

Synthetisch wurde sie durch Einwirkung von Glykokoll in alkalischer Lösung auf Phenylessigsäurechlorid erhalten (Hotter<sup>4</sup>).

Um sie aus Pferdeharn zu gewinnen, dampft man nach Salkowski 1 l auf 200 ccm ein, extrahiert den Rückstand mit Alkohol, verdunstet den Auszug, löst den Rückstand in Wasser und fällt die Lösung mit starker Salzsäure. Nachdem die nach einiger Zeit ausgeschiedene Hippursäure abfiltriert ist, wird die Lösung mit Äther (oder besser Essigäther) geschüttelt, der Ätherauszug mit Sodalösung und diese nach Ansäuern mit Salzsäure wieder mit Äther. Den beim Abdestillieren des Äthers bleibenden Rückstand erhitzt man mit 50—80 ccm Wasser zum Sieden, filtriert nach 24stündigem Stehen und dampft das Filtrat auf etwa 15 ccm ein. Beim Erkalten krystallisiert in der Regel Phenacetursäure ziemlich rein aus.



Darstellung.

Sie krystallisiert aus heißem Wasser in dünnen, dicht aufeinanderliegenden Blättchen, bei langsamer Abscheidung in derben, anscheinend rechtwinkligen Prismen mit 2 Pyramidenflächen, aus Alkohol und Essigäther nach Hotter in würfelähnlichen Krystallen. Sie ist in Wasser schwer löslich, aber leichter als Hippursäure, leicht löslich in Alkohol und Essigäther, sehr schwer in Äther, unlöslich in Benzol. Fp. 143°. Durch Kochen mit Salzsäure wird sie in Glykokoll und Phenylessigsäure gespalten.

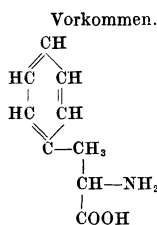
Eigenschaften.

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 68, S. 75. 1910.

<sup>2</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 47, 3, S. 2630. 1914. — Sherwin, Wolf u. Wolf: Journ. of biol. chem. Bd. 37, S. 113. 1919.

<sup>3</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 12, 1, S. 653. 1879. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 9, S. 229. 1885.

<sup>4</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 20, 1, S. 81. 1887. Journ. f. prakt. Chem. N. F. Bd. 38, S. 97 u. 117. 1888.



210. Phenylalanin (Phenyl- $\alpha$ -Aminopropionsäure)  $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_2$ . Zuerst von E. Schulze und Barbieri<sup>1)</sup> in etiolierten Lupinenkeimlingen, dann von E. Schulze<sup>2)</sup> bei der Säurespaltung der Eiweißkörper der Kürbissamen und der Barytspaltung von Konglutin aufgefunden, entsteht es bei der hydrolytischen Spaltung der verschiedensten Proteine (E. Fischer<sup>3)</sup> u. a.). Bei der Spaltung durch Verdauungsfermente wird es auch gebildet, aber in geringerer Menge (E. Fischer und Abderhalden<sup>4)</sup>), auch unter den Produkten der Pankreas- und Leberautolyse wurde es nachgewiesen (Levene<sup>5)</sup>). Auch im Käse ist es in beträchtlicher Menge gefunden. Es findet sich im Harn phosphorvergifteter Hunde (Abderhalden und Barker<sup>6)</sup>), in unreifen Rüben (v. Lippmann<sup>7)</sup>).

Das natürlich vorkommende oder durch Säurespaltung erhaltene ist l-Phenylalanin (aus Leim wurde durch Säurespaltung d-Phenylalanin erhalten).

Darstellung. Synthetisch wird es nach Erlenmeyer und Lipp<sup>8)</sup> oder bequemer nach E. Fischer<sup>9)</sup> (von der Benzylbrommalonsäure aus) erhalten. Von anderen Synthesen seien erwähnt die von Johnson und O'Brien<sup>10)</sup>, von Sasaki<sup>11)</sup> (Kondensation von Glycinanhydrid mit Benzaldehyd), von Curtius und Sieber<sup>12)</sup>. Das synthetische Phenylalanin ist die inaktive Form.

Inaktives Benzoylphenylalanin (am besten nach Erlenmeyer<sup>13)</sup> gewonnen) läßt sich mit Hilfe des Cinchoninsalzes in die aktiven Komponenten zerlegen, von denen die d-Verbindung rein erhalten werden kann. Aus ihr gewinnt man durch Erhitzen mit Salzsäure d-Phenylalanin (E. Fischer und Mouneyrat<sup>14)</sup>). Besser gelingt die Darstellung der aktiven Säuren aus dem Formyl-d,l-Phenylalanin, indem man dieses mit Hilfe der Brucinsalze zerlegt und darauf die Formylgruppe durch Kochen mit Bromwasserstoff abspaltet (E. Fischer und Schoeller<sup>15)</sup>). Sehr leicht läßt sich d,l- $\beta$ -Phenyl- $\alpha$ -uraminopropionsäure mittels Strychnin in die aktiven Komponenten zerlegen. Sie können aber nicht zur Gewinnung von aktivem Phenylalanin benutzt werden, da bei der Hydrolyse mit Jodwasserstoff oder Barytwasser Racemisation eintritt (Dakin und Dudley<sup>16)</sup>). Hefe vergärt in Gegenwart von Zucker das d,l-Phenylalanin partiell und läßt d-Phenylalanin zurück (Ehrlich<sup>17)</sup>). Die aktive Säure wird durch 24stündiges Erhitzen mit Barytwasser auf 160° racemisiert.

Über die Darstellung aus der hydrolytischen Zersetzungsflüssigkeit der Proteine s. § 475 ff. Nach E. Schulze und Winterstein<sup>18)</sup> ist die Gewinnung aus etiolierten 2—3 wöchigen Keimpflanzen von *Lupinus luteus* vorzuziehen.

Eigenschaften. l-Phenylalanin krystallisiert aus konzentrierten noch warmen, wässerigen Lösungen in kleinen, glänzenden Blättchen, aus verdünnten in feinen Nadeln mit Krystallwasser (Schmelzpunkt unter Zersetzung 275—280°), d,l-Phenylalanin in kurzen, sternförmig verwachsenen, wasserfreien Prismen (Fp. 263 bis 265°). Die Krystalle lösen sich ziemlich schwer (die d,l-Verbindung noch

<sup>1)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 14, S. 1785. 1881. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 12, S. 405. 1888.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 9, S. 63. 1885.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 33, S. 151, 177 u. 412. 1901 u. Bd. 35, S. 70. 1902.

<sup>4)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 40, S. 215. 1903/04.

<sup>5)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 41, S. 393. 1904. <sup>6)</sup> desgl. Bd. 42, S. 524. 1904.

<sup>7)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 57, S. 256. 1924.

<sup>8)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 15, 1, S. 1006. 1882. <sup>9)</sup> desgl. Bd. 37, 3, S. 3064. 1904.

<sup>10)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 12, S. 205. 1912.

<sup>11)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 54, 1, S. 163. 1921. <sup>12)</sup> desgl. Bd. 55, S. 1543. 1922.

<sup>13)</sup> Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 275, S. 13. 1893.

<sup>14)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 33, 3, S. 2383. 1900.

<sup>15)</sup> Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 357, S. 1. 1907.

<sup>16)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 17, S. 29. 1914. <sup>17)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 8, S. 438. 1908.

<sup>18)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 35, S. 313. 1902.

schwerer) in kaltem (1 Tl. l-Phenylalanin in 32,4 Tl. Wasser von 25°), leicht in heißem Wasser, wenig in verdünntem Alkohol und Methylalkohol. d-Phenylalanin schmeckt süß, l-Phenylalanin leicht bitter. Es bindet kein Brom (Siegfried und Reppin<sup>1</sup>). Es wird aus wässriger Lösung durch Mercurinitrat gefällt (E. Schulze und Winterstein<sup>2</sup>).

Ninhydrinreaktion S. 219, Reaktion nach v. Slyke S. 224.

Verbindungen:  
mit Phosphorwolframsäure

5 proz. wässrige Lösungen von l-Phenylalanin werden bei Gegenwart von Salz- oder Schwefelsäure zum Unterschied von anderen Aminosäuren durch Phosphorwolframsäure (S. 221) gefällt, und zwar als öliges, allmählich blättrig-krystallinisch werdendes Phosphorwolframat. Noch in 0,25 proz. Lösung entsteht nach etwa 10 Minuten Ausscheidung von Krystallblättchen. Die Verbindung ist in kochendem Wasser ziemlich leicht löslich und ebenso in Alkohol. Die Anwesenheit anderer Aminosäuren (Leucin, Valin) verhindert die Fällung nicht, eine etwa 0,5 proz. Lösung, der Leucin zugefügt ist, wird aber nicht mehr gefällt (E. Schulze und Winterstein). Nach Levene und Beatty<sup>3</sup>) wird Phenylalanin aus 10 proz. Lösung durch eine konzentrierte Lösung von Phosphorwolframsäure fast quantitativ (zu 97%) gefällt.

Über das Phosphorwolframat s. auch Drummond<sup>4</sup>).

Aus der konzentrierten wässrigen Lösung scheidet sich beim Einleiten von Salzsäuregas salzsaures Phenylalanin ab.

d,l-Phenylalaninpikrat, gelbe Nadeln, löst sich in Wasser bei Zimmertemperatur 2,55 : 100 und schmilzt (frisch hergestellt) bei 173°.

d,l-Phenylalaninpikrolonat (S. 221), gelbe, viereckige Blättchen oder vierseitige Prismen, löst sich in Wasser bei Zimmertemperatur 0,19 : 100, auch in Alkohol nur wenig (0,309 : 100) und schmilzt (frisch hergestellt) bei 238° (Mayeda<sup>5</sup>), nach Levene und v. Slyke<sup>6</sup>) bei 211—212° unter Zersetzung.

Sättigt man die heiße wässrige Lösung mit Kupferhydroxyd oder bringt man Kupferacetatlösung hinzu, so scheidet sich sofort das Kupfersalz in blaßblauen Schuppen ab, und zwar l-Phenylalaninkupfer wasserfrei, d,l-Phenylalaninkupfer mit 2 Mol. Wasser, die aber schon über Schwefelsäure entweichen.

d,l-Phenylalaninäthylester (S. 221) ist ein dickflüssiges, in Wasser schwerlösliches Öl, das unter 10 mm Druck bei 143° siedet und ein in flachen Prismen krystallisierendes Pikrat (Fp. 154°) bildet. Durch mehrstündiges Erhitzen mit Barytwasser auf dem Wasserbad wird der Ester verseift, ebenso durch Abdampfen seiner Lösung in starker Salzsäure auf dem Wasserbad.

d,l- und d-Phenylisocyanatphenylalanin (S. 223) (E. Fischer und Mouneyrat<sup>7</sup>) krystallisiert in feinen Nadeln, die in kaltem Wasser fast unlöslich, in heißem Alkohol leicht löslich sind und bei 180—181° (korr.) schmelzen. Das (aus d,l-Phenylalanin gewonnene) Hydantoin schmilzt bei 173—174° (korr.).

d,l-β-Naphthalinsulfophenylalanin (S. 222), leicht löslich in Alkohol und Äther, in kochendem Wasser löst es sich etwa 1 : 500. Fp. 141—142°.

p-Toluolsulfo-d- und l-Phenylalanin (S. 222), Fp. 164—165°.

d-α-Naphthylisocyanatphenylalanin (S. 223), farblose Nadeln, Fp. 155°.

mit β-Naphthalinsulfosäure  
mit Toluolsulfosäure  
mit α-Naphthylisocyanat

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 95, S. 18. 1915.

<sup>2</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 33, S. 574. 1901 u. Bd. 35, S. 210. 1902.

<sup>3</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 47, S. 149. 1906.

<sup>4</sup>) Biochem. Journ. Bd. 12, S. 5; ref. Chem. Zentralbl. 1918, II, S. 944.

<sup>5</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 51, S. 261. 1907.

<sup>6</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 12, S. 127. 1912.

<sup>7</sup>) a. a. O., Mouneyrat: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 33, 3, S. 2396. 1900.

- mit Harnstoff d,l-Phenyl- $\alpha$ -uraminopropionsäure (S. 223), in Wasser löslich 1 : 600. Schmelzpunkt im geschlossenen Capillarrohr 175° (Lippich<sup>1</sup>), im offenen 188 bis 190° (Dakin<sup>2</sup>).
- d- und l-Phenyl- $\alpha$ -uraminopropionsäure, Fp. 195—196°, etwas weniger löslich als die inaktive (Dakin und Dudley<sup>3</sup>), wässerigen Lösungen durch längeres Extrahieren mit Äther zu entziehen (Weiland<sup>4</sup>).
- mit Senföl d,l-1-Phenyl-4-benzyl-2-thiohydantoin (S. 223), unlöslich in Wasser, schwerlöslich in Alkohol, Fp. 187°.
- mit Kohlensäure. Phenylalanincarbonsaures Barium (S. 224).
- Optische Eigenschaften. Für synthetisches l-Phenylalanin fanden E. Fischer und Schoeller (etwa 2proz. Lösungen)  $[\alpha]_D^{20} = -35,09$ — $35,14^\circ$ , für synthetisches d-Phenylalanin (dieselbe Konzentration)  $[\alpha]_D^{20} = +35,00$ — $35,14^\circ$ . Für natürliches l-Phenylalanin fand E. Schulze (2—3proz. Lösung)  $[\alpha]_D = -35,3^\circ$ . Die von E. Schulze und Winterstein<sup>5</sup> später (ebenfalls für natürliches Phenylalanin aus Keimpflanzen) erhaltenen höheren Werte  $[\alpha]_D^{16} = -38,1$ — $40,3^\circ$  sind wahrscheinlich durch stark linksdrehende Beimengungen verursacht.
- Für 3,5proz. Lösung von d-Phenylalanin, welche 18% Salzsäure enthält fanden E. Fischer und Mouneyrat  $[\alpha]_D^{20} = +7,07^\circ$ , für 3,5proz. Lösungen in 20proz. Salzsäure fand Ehrlich  $[\alpha]_D^{20} = +6,86^\circ$ .
- Umwandlungen. In salzsaurer Lösung wird Phenylalanin durch Natriumnitrit in Phenylchloroessigsäure übergeführt (Jochem<sup>6</sup>). Beim Erhitzen im Reagensglas zerfällt es, während ein geringer Teil unzersetzt sublimiert, unter Abspaltung von Wasser und Kohlensäure in einen gelben, geschmolzenen, beim Erkalten krystallinisch erstarrenden Rückstand (Phenylactimid enthaltend) und einen flüchtigen Körper (Phenyläthylamin, § 156), welcher sich im oberen Teile des Röhrchens in farblosen Tropfen, die nach dem Erkalten krystallinisch werden und einen eigentümlichen Geruch besitzen, absetzt (charakteristisches Verhalten E. Schulze<sup>7</sup>). Beim Erhitzen mit Kaliumbichromat und Schwefelsäure tritt der Geruch nach Phenylacetaldehyd auf (scharfe, bequeme Methode des Nachweises), dann bildet sich Benzoesäure. Beim Erhitzen von Phenylalanin mit Salpetersäure tritt Gelbfärbung ein. Unter der Einwirkung starker Salpetersäure (bei Gegenwart von Amylum) entsteht p-Nitrobenzoesäure (Phenylalanin ist die Muttersubstanz der aus Eiweiß durch Salpetersäure gebildeten Nitrobenzoesäure) und Pikrinsäure (C. Th. Mörner<sup>8</sup>).
- Bei der Fäulnis entsteht aus Phenylalanin Phenyläthylamin, Phenylpropionsäure und Phenylessigsäure. Bac. subt. und bac. proteus bilden aus d,l-Phenylalanin Phenyläthylamin und Phenylmilchsäure, und zwar Subtilis l- und Proteus d-Säure (A mats u und Tsudji<sup>9</sup>), Oidium lactis aus d,l-Phenylalanin fast quantitativ d-Phenylmilchsäure (F. Ehrlich und Jacobsen<sup>10</sup>), gärende Hefe aus l-Phenylalanin Phenyläthylalkohol (Ehrlich<sup>11</sup>).
- Nachweis. Wegen der Trennung von anderen Aminosäuren s. § 479. Zum Nachweis sind die im vorletzten Absatz erwähnten Reaktionen sehr geeignet. 0,02 g in 2—3 ccm 25proz. Schwefelsäure gelöst und mit ein paar Körnchen

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 90. S. 124. 1914.

<sup>2</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 6, S. 241. 1909.    <sup>3</sup>) desgl. Bd. 17, S. 33. 1914.

<sup>4</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 38, S. 385. 1912.

<sup>5</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 35, S. 307. 1902.

<sup>6</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 31, S. 119. 1900/01.

<sup>7</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 9, S. 81. 1885.

<sup>8</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 95, S. 287 u. 307. 1915.

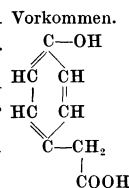
<sup>9</sup>) Chem. Zentralbl. 1920, III, S. 489.

<sup>10</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 44, 1, S. 888. 1911.

<sup>11</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 40, 1, S. 1047. 1907.

Bichromat versetzt geben beim Kochen sehr deutlichen Geruch nach Phenylacetaldehyd. Auch die Darstellung der Phenylisocyanatverbindung nach vorausgegangener Racemisierung ist für die Identifizierung geeignet.

211. **p-Oxyphenylelessigsäure**  $C_8H_8O_3$ . p-Oxyphenylelessigsäure ist von E. und H. Salkowski<sup>1)</sup> unter den Fäulnisprodukten der Wolle und Eiweißstoffe aufgefunden, von Baumann<sup>2)</sup> als Fäulnisprodukt des Tyrosins erkannt und in geringer Menge aus dem normalen Harn von Menschen und Tieren, reichlicher aus pathologischen Harnen, aus Harnen bei Phosphorvergiftung und nach Fütterung von Tyrosin gewonnen worden (Blendermann<sup>3)</sup>). Sie ist im Harn größtenteils nicht an Schwefelsäure gebunden und verschwindet bei fehlender Darmfäulnis nicht vollständig aus ihm (Baumann<sup>4)</sup>).



H. Salkowski<sup>5)</sup> stellte sie aus Phenylelessigsäure dar. Aus p-Aminophenylelessigsäure erhält man sie durch Einwirkung von salpetriger Säure. Darstellung.

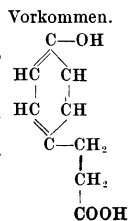
Über die Darstellung aus Harn s. den folgenden Paragraphen, aus Fäulnisgemischen s. § 229.

Die Säure krystallisiert aus der wässrigen Lösung in prismatischen, meist flachen, sehr spröden Nadeln, schmilzt bei 148° und verflüchtigt sich beim stärkeren Erhitzen zum Teil unzersetzt. Sie ist in kaltem Wasser ziemlich leicht löslich, weniger in salzsäurehaltigem, leicht in heißem Wasser, Alkohol, Äther, schwer in Benzol. Ihre wässrige Lösung gibt mit Eisenchlorid zunächst wenig intensive, grauviolette, dann schmutziggrüne Färbung, mit Millons Reagens in der Wärme Rotfärbung. Kupfersulfat, Zink- oder Cadmiumsulfat erzeugen in den wässrigen Lösungen der Ammoniakverbindung der Säure Niederschläge, ebenso bewirkt Silbernitrat einen in kochendem Wasser löslichen, voluminösen Niederschlag des neutralen Silbersalzes. Durch Bleiacetat werden sehr verdünnte neutrale Lösungen nicht gefällt, konzentrierte Lösungen geben krystallinischen Niederschlag, welcher sich im Überschuß des Fällungsmittels löst und beim Stehen allmählich wieder ausscheidet (charakteristisches Verhalten). Das Kalksalz, durch Kochen der Säure mit Calciumcarbonat erhalten, krystallisiert aus konzentrierter Lösung in tafelförmigen Krystallen ( $C_8H_7O_3$ )<sub>2</sub>Ca + 4 H<sub>2</sub>O. Über die Ausscheidung eingegebener Oxyphenylelessigsäure im Harn s. Sherwin<sup>6)</sup>.

Mit Tyrosinase (aus Weizenkleie) tritt Gelb-, Orange-, Braunfärbung ein (Bertrand<sup>7)</sup>).

Oxyphenacetursäure wurde einmal von E. und H. Salkowski<sup>8)</sup> aus Hundeharn nach Eingabe von p-Oxyphenylelessigsäure erhalten. Flache Krystallwarzen, ziemlich leicht in heißem Wasser, schwer in Äther löslich. Fp. 153°. Sie zerfällt mit Salzsäure gekocht in Glykokoll und p-Oxyphenylelessigsäure.

212. **Hydro-p-cumarsäure (p-Oxyphenylpropionsäure)**  $C_9H_{10}O_3$ . Die Hydro-p-cumarsäure wurde von Baumann<sup>9)</sup> als nächstes Reduktionsprodukt des Tyrosins bei der Fäulnis und als Bestandteil des menschlichen Harns erkannt; sie findet sich unter den Fäulnisprodukten der Eiweißstoffe neben der p-Oxyphenylelessigsäure in verschiedenen Quantitäten, da sie selbst durch Fäulnis bei Luftzutritt weiter zerfällt.



<sup>1)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 12, 1, S. 648. 1879.

<sup>2)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 12, 1, S. 1450. 1879 u. Bd. 13, 1, S. 279. 1880. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 4, S. 304. 1880.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 6, S. 247. 1882. <sup>4)</sup> desgl. Bd. 10, S. 125. 1886.

<sup>5)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 12, 2, S. 1438. 1879.

<sup>6)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 36, S. 309. 1918.

<sup>7)</sup> Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 145, S. 1352. 1907.

<sup>8)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 7, S. 171. 1883.

<sup>9)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 12, 2, S. 1450. 1879 u. Bd. 13, 1, S. 279. 1880. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 4, S. 304. 1880.

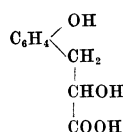
Isolierung von p-Oxyphenyllessigsäure und Hydro-p-cumarsäure.

Zur Isolierung der p-Oxyphenyllessigsäure und der Hydro-p-cumarsäure aus Harn verfährt man nach Baumann<sup>1)</sup> folgendermaßen: Etwa 50 l frischer, normaler, menschlicher Harn werden zum dünnen Sirup verdunstet, mit Essigsäure stark angesäuert und mit Äther extrahiert. Die Ätherauszüge werden mit überschüssiger Sodalösung wiederholt geschüttelt und die vereinigten wässrigen, alkalischen Lösungen von neuem angesäuert und mit Äther ausgeschüttelt. Der Ätherauszug wird nach Abdestillieren des Äthers auf dem Wasserbade erwärmt, bis die Essigsäure zum größten Teil verjagt ist, in wenig Wasser gelöst und die Lösung mit neutralem Bleiacetat versetzt, solange ein Niederschlag entsteht. Aus dem Filtrat dieses Niederschlags fällt man durch basisches Bleiacetat die Oxysäuren, zerteilt den ausgewaschenen und abgepreßten Niederschlag in Wasser, zerlegt ihn mit Schwefelwasserstoff und schüttelt die Lösung von neuem mit Äther aus. Nach dem Verdunsten dieser Ätherauszüge hinterbleibt ein stark saurer, gelber Sirup, der meist nach einiger Zeit krystallinisch erstarrt. Tritt auch nach längerem Stehen keine Krystallisation ein, so ist es zweckmäßig, den Sirup in Wasser zu lösen, mit kohlenurem Baryt zu kochen und aus der Lösung der Barytsalze die Säuren von neuem abzuscheiden. Die aus dem Menschenharn auf diese Weise dargestellten Oxysäuren erstarren stets nach einigen Tagen krystallinisch; viel langsamer und schwieriger erfolgt die Krystallisation der Oxysäuren aus dem Hunde- und Pferdeharn. Die zum Krystallbrei erstarrte Masse wird zwischen Papier möglichst abgepreßt und aus wenig Wasser umkrystallisiert. Die p-Oxyphenyllessigsäure krystallisiert dabei in langen, durchsichtigen Prismen und läßt sich durch einmaliges Umkrystallisieren aus viel Benzol völlig rein erhalten. Aus der eingedampften Mutterlauge wird durch Kochen mit einer zur völligen Lösung unzureichenden Menge Benzol die Hydro-p-cumarsäure aufgenommen, welche beim Erkalten noch gemengt mit p-Oxyphenyllessigsäure krystallisiert. Eine Methode der Trennung beider Säuren ist bis jetzt nicht bekannt.

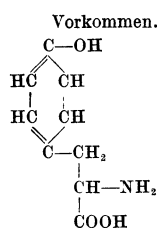
Über die Darstellung der Säure aus Fäulnisgemischen s. § 229.

Eigenschaften.

Durch Verdunsten ihrer ätherischen Lösung gewonnen, bildet die p-Oxyphenylpropionsäure ein Öl, welches bald zur strahligen Krystallmasse erstarrt, aus wenig Wasser umkrystallisiert, erscheint sie in farblosen, wasserfreien, monoklinen, in Wasser, Alkohol oder Äther leicht löslichen, bei 125° schmelzenden Krystallen. In Wasser ist sie etwas leichter löslich als die p-Oxyphenyllessigsäure, in Benzol löst sie sich schwer, aber auch leichter als die p-Oxyphenyllessigsäure. Ihre wässrige Lösung gibt ebenfalls beim Erwärmen mit Millons Reagens Rotfärbung. Aus verdünnter wässriger Lösung wird sie nicht durch neutrales, aber durch basisches Bleiacetat ausgefällt. Gegen Tyrosinase verhält sie sich wie p-Oxyphenyllessigsäure (§ 211) (Bertrand).



**l-Oxyphenylmilchsäure**  $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_4$  ist nach den Untersuchungen von Ellinger und Kotake<sup>2)</sup> und Neubauer<sup>3)</sup> die früher für Oxymandelsäure gehaltene Säure, welche von Schultzen und Ries<sup>4)</sup> in mehreren Fällen von akuter Leberatrophie im Harn neben Tyrosin gefunden wurde und die auch im Harn von Menschen und Hunden nach Phosphorvergiftung (Baumann<sup>5)</sup>, Kotake<sup>6)</sup> erscheint.



**213. Tyrosin (p-Oxyphenyl- $\alpha$ -aminopropionsäure)**  $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_3$  entsteht bei der hydrolytischen Spaltung (durch Kochen mit Säuren, Alkalien, Fermente, Mikroorganismen) von Proteinen. Es findet sich im Dünn- und Dickdarm während der Verdauung von Proteinen, im menschlichen Harn und Blut bei akuter

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 6, S. 191. 1881.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 65, S. 402. 1910.

<sup>3)</sup> Biochem. Handlexikon Bd. 4, S. 381.

<sup>4)</sup> Über akute Phosphorvergiftung und Leberatrophie. Berlin 1869.

<sup>5)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 6, S. 192. 1882. <sup>6)</sup> desgl. Bd. 65, S. 397. 1910.

Leberatrophie und vorgeschrittener Phosphorvergiftung; bei letzterer Krankheit wurde es auch oft aus der Leber erhalten. Aus dem Harn phosphorvergifteter Hunde ist es nicht gewonnen worden, aber aus dem Harn eines Cystinurikers (Abderhalden und Schittenhelm<sup>1</sup>), auch aus anderen pathologischen Harnen, z. B. diabetischen (Abderhalden<sup>2</sup>), Abderhalden und Schittenhelm) und aus Pferdeharn bei Peritonealsarkom (Christiani<sup>3</sup>); im Harn bei akuter Leberatrophie scheint es gelegentlich vorzukommen, ferner in der Milch (Pichon-Vendeuil<sup>4</sup>). Es findet sich im Hummerfleisch (Suzuki und Joshimura<sup>5</sup>). Auch in Keimpflanzen (E. Schulze<sup>6</sup>), manchen ungekeimten Pflanzensamen (Schulze und Castoro<sup>7</sup>), in Fliederbeeren (Sack und Tollens<sup>8</sup>), Ficusblättern (Deleanu<sup>9</sup>), Secale cornutum (Fränkel und Rainer<sup>10</sup>), Bohnenwurzeln (Stieger<sup>11</sup>), in der Rübenmelasse (v. Lippmann<sup>12</sup>) ist Tyrosin gefunden worden.

Das natürlich vorkommende und das durch Spaltung der Proteinkörper erhaltene ist meist l-Tyrosin; wird die Spaltung durch Ätzbaryt vorgenommen, so entsteht d,l-Tyrosin; v. Lippmann erhielt aus Rübenschößlingen d-Tyrosin. Fränkel<sup>13</sup> gewann d-Tyrosin (neben d-Tyrosinanhydrid) aus protrahierter Trypsinverdauung des Casein. Durch 16stündiges Kochen von l-Tyrosin mit 33proz. Schwefelsäure findet keine Racemisation statt (F. Ehrlich<sup>14</sup>), durch 5stündiges Erhitzen mit Ätzbaryt (auf 1 g Tyrosin 3 g Ätzbaryt und 10 ccm Wasser) auf 170° völlige Racemisierung (C. Th. Mörner<sup>15</sup>).

Synthetisch gewinnt man es nach Erlenmeyer und Lipp<sup>16</sup> durch Einwirkung von salpetriger Säure auf p-Amidophenylalanin oder nach Erlenmeyer und Halsey<sup>17</sup> in der Weise, daß die durch Kondensation von p-Oxybenzaldehyd und Hippursäure entstehende p-Hydroxy- $\alpha$ -Benzoylaminozimtsäure durch Reduktion mit Natriumamalgam in Benzoyltyrosin und dieses durch Spaltung mit Salzsäure in Tyrosin übergeführt wird. Andere Synthesen sind angegeben von Wheeler und Hoffmann<sup>18</sup> und von Sasaki<sup>19</sup> (Kondensation von Glycinanhydrid mit Anisaldehyd oder p-Oxybenzaldehyd, Reduktion und Spaltung des Diketopiperazins). Es ist die inaktive Form.

Man erhält die aktiven Modifikationen, wenn man das d,l-Benzoyltyrosin mit Hilfe von Brucin resp. Cinchonin in l- und d-Benzoyltyrosin überführt und diese durch Kochen mit Salzsäure spaltet (E. Fischer<sup>20</sup>). Besser ist die Ausbeute, wenn man von Formyl-d,l-Tyrosin ausgeht und zur Trennung Brucin verwendet. Man kann auch die asymmetrische Verseifung des Tyrosin-d,l-Methylesters mit Pankreassaft zur Gewinnung von d-Tyrosin benutzen (Abderhalden und Sichel<sup>21</sup>). Durch Einwirkung von Hefe auf eine wässrige Lösung von d,l-Tyrosin und Zucker entsteht d-Tyrosin (Ehrlich<sup>22</sup>).

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 45, S. 468. 1905. <sup>2</sup>) desgl. Bd. 44, S. 40. 1905.

<sup>3</sup>) Ref. Biochem. Zentralbl. Bd. 2, S. 440. 1904.

<sup>4</sup>) Chem. Zentralbl. 1922, I, S. 55.

<sup>5</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 62, S. 1. 1909.

<sup>6</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 24, S. 49. 1898. <sup>7</sup>) desgl. Bd. 41, S. 455. 1902.

<sup>8</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 37, 4, S. 4115. 1904.

<sup>9</sup>) Chem. Zentralbl. 1916, 2, S. 498.

<sup>10</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 74, S. 167. 1916.

<sup>11</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 86, S. 245. 1913.

<sup>12</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 17, 2, 2835. 1884.

<sup>13</sup>) Fränkel und Gallia: Biochem. Zeitschr. Bd. 134, S. 308, 1923. — Fränkel und Feldsberg: Ebenda Bd. 120, S. 218. 1921.

<sup>14</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 63, S. 399. 1914.

<sup>15</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 88, S. 126. 1913; s. auch Waser: Helvetica chim. acta Bd. 6, S. 206. 1923.

<sup>16</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 15, 1, S. 1544. 1882. <sup>17</sup>) desgl. Bd. 30, 3, S. 2981. 1897.

<sup>18</sup>) Americ. chem. Journ. Bd. 45, S. 368; ref. Chem. Zentralbl. 1911, I, S. 1857.

<sup>19</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 54, 1, S. 163. 1921. <sup>20</sup>) desgl. Bd. 32, 3, S. 3638. 1899.

<sup>21</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 131, S. 277. 1923. — Abderhalden, Sichel, Ueda: Zeitschr. f. Fermentforschung Bd. 7, S. 91. 1923.

<sup>22</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 1, S. 30. 1906.

Über die Isolierung aus der hydrolytischen Zersetzungsflüssigkeit der Proteine s. § 475 ff. und § 485, über quantitative Bestimmung in dieser Zersetzungsflüssigkeit § 496.

**Darstellung:** Für die Darstellung eignet sich ihres reichen Gehaltes an Tyrosin wegen, **aus Seide.** und weil sie nur sehr kleine Mengen anderer in Wasser schwer löslicher Aminosäuren enthält, besonders degommierter weiße Seide. Man kocht 100 g Seide 6 Stunden mit der 3fachen Menge rauchender Salzsäure (spez. Gew. 1,19), verdampft unter vermindertem Druck zur Trockne, löst den Rückstand in Wasser und verdampft nochmals, nimmt den Rückstand in wenig Wasser auf, leitet Ammoniakgas bis zur schwach alkalischen Reaktion ein und verdampft zur Trockne. Der Rückstand wird in heißem Wasser gelöst, die Lösung mit Tierkohle gekocht und heiß filtriert. Reines Tyrosin krystallisiert aus. Ausbeute etwa 8 g (Abderhalden<sup>1</sup>).

**aus Casein durch Pankreasverdauung.** Ein billigeres Verfahren ist von Marshall<sup>2</sup>) empfohlen: Man mischt auspräpariertes und fein zerkleinertes Schweinepankreas mit dem gleichen Gewicht Wasser, läßt nach genügendem Chloroformzusatz 2 Tage bei Zimmertemperatur, dann 24 Stunden bei 38° stehen und filtriert nach Abkühlen. Die Filtration verläuft sehr langsam. Man fügt zu dem klaren, gelben Filtrat Casein (auf 1000 ccm 100—150 g), macht mit Ammoniak schwach alkalisch und läßt 3—7 Tage bei 38° stehen, filtriert und wäscht mit kaltem Wasser aus. Der Filtrückstand wird mehrmals mit kochendem Wasser extrahiert (1000, 500, 250 ccm), die vereinigten Auszüge werden auf etwa 250 ccm eingengt, worauf Tyrosin sich abscheidet. Aus 1000 ccm Pankreasextrakt und 100 g Casein werden etwa 5 g erhalten.

**aus Zein.** Aus Zein erhielt Kutscher<sup>3</sup>) 10 Proz. reines Tyrosin.

**Eigenschaften.** Das reine l-Tyrosin bildet mikroskopische, farblose, seidenglänzende, feine, zu Büscheln vereinigte Nadeln (das d,l-Tyrosin kürzere, häufig sternförmig gruppierte Nadelchen) ohne Geruch und von etwas fadem Geschmack, die sich beim Erhitzen unter Geruch nach verbranntem Horn zersetzen. Schnell erhitzt zersetzt es sich unter lebhafter Gasentwicklung bei 310—314° (das d,l-Tyrosin 2—3° höher). Es ist schwer löslich in kaltem Wasser (1 Tl. in etwa 2000 Tl., das d,l-Tyrosin 1 Tl. in etwa 3000—3500 Tl.), leichter löslich in heißem Wasser, unlöslich in absolutem Alkohol oder Äther. In Ammoniak, Alkalien, auch in kohlen-sauren Alkalien löst es sich leicht, ebenso in verdünnten Mineralsäuren, schwer in Essigsäure. Eisessig löst bei 16° 0,14%, in der Siedehitze 0,18% (Habermann und Ehrenfeld<sup>4</sup>). In starker Salzsäure ist das d,l-Tyrosin weniger löslich als das l-Tyrosin. Durch Phosphorwolframsäure wird Tyrosin auch aus 5proz. Lösungen nicht gefällt, durch Mercurinitrat wird es gefällt, ebenso aus ammoniakalischer Lösung mit Bleiessig als basisches Salz (Foreman<sup>5</sup>). Über Reaktion mit Diazobenzolarsinsäure s. Pauly<sup>6</sup>). 1 Mol. Tyrosin bindet beinahe 5 Atome Br (Siegfried und Reppin<sup>7</sup>). Ninhydrinreaktion S. 219, Reaktion nach v. Slyke S. 224.

Über das Verhalten zu Neutralsalzen s. S. 220.

**Verbindungen:** Pikrolonat (Levene und v. Slyke<sup>8</sup>) (S. 221) schwärzt sich bis 260°. **mit Pikrolonsäure**

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 77, S. 75. 1912.

<sup>2</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 15, S. 85. 1913.

<sup>3</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 38, S. 111. 1903.

<sup>4</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 37, S. 18. 1902/03.

<sup>5</sup>) Chem. Zentralbl. 1911, I, S. 1218.

<sup>6</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 94, S. 284. 1915.

<sup>7</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 95, S. 18. 1915.

<sup>8</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 12, S. 127. 1912.



Tyrosinkupfer ( $C_9H_{10}NO_3$ )<sub>2</sub>Cu, durch Kochen einer wässerigen Tyrosin- mit Kupferlösung mit Kupferoxydhydrat erhalten, krystallisiert in blauen Prismen, zerfällt aber beim Kochen mit Wasser; in kaltem Wasser sehr wenig löslich.

Tyrosinblei in Wasser sehr schwer löslich, beim längeren Kochen (15 bis mit Blei 20 Minuten) von Tyrosin mit überschüssigem Bleioxyd ausfallend. Asparaginsäure verhält sich ähnlich. Zur Trennung von anderen Aminosäuren geeignet (Levene und v. Slyke<sup>1</sup>).

Zur Darstellung des l-Tyrosinäthylesters (E. Fischer<sup>2</sup>) übergießt man mit Alkohol 5 g Tyrosin mit 35 ccm Alkohol, leitet Salzsäure ein bis zur Lösung, fügt das doppelte Volumen Alkohol hinzu, kocht mehrere Stunden am Rückflußkühler und destilliert den Alkohol unter schwachem Druck ab. Der Rückstand wird mit Wasser verdünnt, die Lösung mit überschüssigem Kaliumcarbonat versetzt und mit Essigäther ausgeschüttelt. Beim Verdunsten krystallisiert der Ester aus. Farblose, flache Prismen vom Fp. 108—109°, in kaltem Wasser sehr schwer, in heißem etwas leichter löslich, in Alkohol sehr leicht, in Äther schwer löslich. Das Chlorhydrat krystallisiert aus Alkohol-Äther in seideglänzenden Nadeln, in Wasser leicht löslich. Fp. 166°.

Beim Schütteln von Tyrosin mit einer wässerigen Lösung von Natrium- mit Benzoesäure bicarbonat und Benzoylchlorid entsteht Dibenzoyltyrosin (E. Fischer<sup>3</sup>).

Di-β-Naphthalinsulfotyrosin (S. 222) scheidet sich beim Schütteln einer mit β-Naphthalin-sulfosäure natronalkalischen Tyrosinlösung mit einer ätherischen Lösung von β-Naphthalinsulfochlorid im Überschuß als Natronsalz ab, das aus heißem Wasser umkrystallisiert wird. Fp. 252—254° unter Schäumen. Die durch Fällen der wässerigen Lösung mit Salzsäure erhaltene freie Säure ist selbst in heißem Wasser sehr schwer löslich, krystallisiert aus verdünntem Alkohol in Nadelchen oder Blättchen, bei 100—102° bildet sie ein zähes Öl, das über 120° flüssig wird und über 145—150° aufschäumt (E. Fischer und Bergell<sup>4</sup>).

N-p-toluol-sulfo-l-Tyrosin (S. 222), Fp. 187—188° (korr.).

mit Toluolsulfosäure

l-Phenylisocyanattyrosin (S. 223) (Paal und Zitelmann<sup>5</sup>).

mit Phenylisocyanat

l-α-Naphthylisocyanattyrosin (S. 223), feine, sternförmig gruppierte Nadeln vom Fp. 205—206° (Neuberg und Manasse<sup>6</sup>).

mit α-Naphthylisocyanat

l-Tyrosinuraminsäure (S. 223) in Wasser 1 : 36 löslich, zersetzt sich im mit Harnstoff geschlossenen Capillarrohr bei 218° (Jaffe<sup>7</sup>), Lippich<sup>8</sup>), läßt sich wässerigen Lösungen durch lange Ätherextraktion entziehen (Weiland<sup>9</sup>). Sie ist in Wasser leicht löslich im Gegensatz zu den anderen mit Äther extrahierbaren Uraminosäuren und deswegen zur Trennung geeignet. Durch Erhitzen mit Säure entsteht aus ihr das Hydantoin\*). Zersetzung im geschlossenen Capillarrohr bei 242 bis 245° (Lippich).

\*) Das Tyrosinhydantoin, welches von Blendermann<sup>10</sup>) aus Harn von Kaninchen, denen reichliche Mengen Tyrosin zugeführt waren, isoliert wurde, ist als Kunstprodukt aufzufassen, entstanden bei der Verarbeitung des Harns aus primär vorhandenem Tyrosin (Lippich<sup>11</sup>), Dakin<sup>12</sup>).

<sup>1</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 8, S. 285. 1910/11.

<sup>2</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 34, 1, S. 433. 1901.

<sup>3</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 32, 2, S. 2454. Anmerkung. 1899. — A. Schultze: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 29, S. 467. 1900.

<sup>4</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 36, 2, S. 2605. 1903.

<sup>5</sup>) desgl. Bd. 36, 3, S. 3337. 1903.

<sup>6</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 38, 2, S. 2363. 1905.

<sup>7</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 7, S. 306. 1882/83.

<sup>8</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 41, 2, S. 2969. 1908.

<sup>9</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 38, S. 385. 1912.

<sup>10</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 6, S. 253. 1882.

<sup>11</sup>) a. a. O., S. 2974.

<sup>12</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 8, S. 25. 1910/11.

- mit Senföl 1-Phenyl-4-parahydroxybenzyl-2-thiohydantoin (S. 223), in Wasser sehr wenig löslich, löslich in Alkohol, Fp. 214—216°.
- mit Kohlensäure. Tyrosincarbonsaures Barium (S. 224).
- Optische Eigenschaften. Für die spezifische Drehung verschiedener Präparate von l-Tyrosin in 21proz. Salzsäure gelöst bei annähernd gleicher Konzentration (3,9—5%) wurden folgende Werte gefunden: aus Konglutin durch Spaltung mit Salzsäure gewonnen  $[\alpha]_D = -8,48^\circ$  (E. Schulze<sup>1</sup>), synthetisch  $[\alpha]_D = -8,64^\circ$  (E. Fischer<sup>2</sup>). mit abnehmendem Salzsäuregehalt wächst das Drehungsvermögen ziemlich stark. Über bei Benutzung von 4proz. Salzsäure erhaltene Werte s. E. Schulze und Winterstein<sup>3</sup>. Für Tyrosin in 11,6proz. Kalilauge gelöst fand Mauthner<sup>4</sup> bei einer Konzentration von 5,8%  $[\alpha]_D = -9,01^\circ$  (mit steigender Konzentration der Lösung abnehmend). Das synthetische d-Tyrosin, ebenfalls in 21proz. Salzsäure gelöst und bei einer Konzentration von 4,6%  $[\alpha]_D = +8,64^\circ$  (E. Fischer).
- Umwandlungen. Wird Tyrosin in ziemlich starker Salpetersäure gelöst, so scheidet sich nach einiger Zeit ein gelbes Krystallpulver von salpetersaurem Nitrotyrosin aus. Nitrotyrosin wurde auch unter den Spaltungsprodukten von nitrierter Seide gefunden. Auf seiner Bildung beruht, wenigstens zum Teil, die Xanthoproteinreaktion der Proteine (Inouye<sup>5</sup>). Bei der Oxydation mit 60proz. Salpetersäure entsteht Oxalsäure und Pikrinsäure (C. Th. Mörner<sup>6</sup>); bei der Oxydation mit Permanganat in alkalischer Lösung Kohlensäure, Ammoniak, Oxalsäure, Essig- und Salpetersäure (Denis<sup>7</sup>). Beim Schmelzen mit Kali entsteht aus Tyrosin p-Oxybenzoesäure.
- Bei der Vergärung von l-Tyrosin mit viel Hefe und Zucker und auch beim Wachsen von Hefe in mit Zucker und Nährsalzen versetzten Tyrosinlösungen entsteht Tyrosol (p-Oxyphenyläthylalkohol) in bis zu 80% der theoretischen Menge (F. Ehrlich<sup>8</sup>). d,l-Tyrosin wird durch Hefe symmetrisch abgebaut unter Bildung von Tyrosol (F. Ehrlich<sup>9</sup>).
- Oidium lactis bildet aus l-Tyrosin fast quantitativ d-p-Oxyphenylmilchsäure neben etwas Tyrosol (F. Ehrlich u. Jacobsen<sup>10</sup>).
- Über den Abbau des l-, d- und d,l-Tyrosin bei der Fäulnis und durch Reinkulturen von Bakterien (Bact. coli, Proteus, Subtilis, Bact. lactis aerog. u. a.) liegen viele Untersuchungen vor. Als Abbauprodukte sind nachgewiesen Hydroparacumarsäure, p-Oxyphenylessigsäure, Kresol, Phenol, Oxyphenylmilchsäure, Oxyphenylacrylsäure, Tyrosol, Tyramin, Benzoessäure, Benzol. Auf die jeweils auftretenden Substanzen sind außer den einzelnen Bakterien Nährboden, Länge der Versuchsdauer usw. von Einfluß.
- Gibt man zu einer Lösung von l-Tyrosin oder d,l-Tyrosin pflanzliche<sup>11</sup> oder tierische<sup>12</sup> Tyrosinase\*), so färbt sich die Flüssigkeit zunächst hellrot, nach

Tyrosinaselösung. \*) Man erhält eine geeignete Tyrosinaselösung durch 24stündige Extraktion von *Russula delica*, und zwar 1 g trockene Pilzmasse mit 50 ccm Wasser unter Zusatz von etwas Toluol bei 37° und Filtration. Die Wirkung des Extraktes läßt rasch nach (Abderhalden u. Guggenheim<sup>13</sup>).

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 9, S. 63. 1885.

<sup>2</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 32, 3, S. 3638. 1899.

<sup>3</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 35, S. 308. 1902 u. Bd. 45, S. 79. 1905.

<sup>4</sup>) Monatshefte f. Chem. Bd. 3, S. 343. 1882.

<sup>5</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 81, S. 80. 1912. <sup>6</sup>) desgl. Bd. 95, S. 263. 1915.

<sup>7</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 10, S. 73. 1911/12.

<sup>8</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 44, 1, S. 139. 1911 u. Biochem. Zeitschr. Bd. 79, S. 232. 1917.

<sup>9</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 63, S. 379. 1914. <sup>10</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 44, 1, S. 888. 1911.

<sup>11</sup>) Bertrand: Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 122, S. 1215. 1896; Bd. 123, S. 463. 1896; Bd. 146, S. 304. 1908.

<sup>12</sup>) v. Fürth u. Schneider: Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 1, S. 229. 1902.

<sup>13</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 54, S. 331. 1907/08.

einiger Zeit wird sie dunkler, und weiter scheiden sich schwarze Flocken ab (Bertrand<sup>1)</sup>, v. Fürth und Schneider<sup>2)</sup>. d-Tyrosin wurde viel später angegriffen, so daß es noch zweifelhaft ist, ob nicht vielleicht das benutzte Präparat etwas l-Tyrosin enthielt (Abderhalden und Guggenheim<sup>3)</sup>).

Zum Nachweis des isolierten (§ 475, 477, 485) Tyrosins dienen außer dem <sup>Nachweis.</sup> charakteristischen mikroskopischen Bilde folgende Reaktionen:

1. Beim Erwärmen einer Tyrosinlösung mit Millonschem Reagens zeigt sich bald Rotfärbung und evtl. nach einiger Zeit roter Niederschlag.

2. Folin - Denissche Probe s. § 200 bei Phenol.

3. Denigèssche Probe<sup>4)</sup>. Setzt man ein wenig Tyrosin zu 2—3 ccm einer Lösung von 1 ccm Formaldehyd in 50 ccm konzentrierter Schwefelsäure, so tritt nach kurzer Zeit weinrote Färbung ein. Fügt man jetzt sofort das doppelte Volumen Eisessig hinzu und kocht, so färbt sich die Flüssigkeit grün.

4. C. Th. Mörnersche Probe<sup>5)</sup>. Erwärmt man einige Kubikzentimeter eines Reagens, das durch Mischung von 1 Vol. Formalin, 45 Vol. Wasser und 55 Vol. konzentrierte Schwefelsäure erhalten wird und haltbar ist, mit ein wenig Tyrosin (in fester Form oder Lösung) bis zum Kochen, so tritt schöne, langandauernde Grünfärbung auf. Phenol, Homogentisinsäure, Proteine, Albumosen geben diese Reaktion nicht.

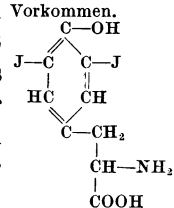
5. Wurstersche Proben<sup>6)</sup>. Eine siedende wässrige Tyrosinlösung färbt sich a) mit 1 proz. Essigsäure und dann tropfenweise unter fortgesetztem Kochen mit 1 proz. Natriumnitritlösung versetzt schön rot, b) mit etwas trockenem Chinon rubinrot.

6. Paulysche Probe<sup>7)</sup>. Sie ist die für das Histidin S. 268 angegebene, nur mit dem Unterschied, daß die Färbung weniger tiefrot ist, beim Verdünnen einen Stich ins Gelbliche bekommt und beim Ansäuern bronzegelb bis schmutzig-goldgelb wird. Doch ist es schwer, diese Farbenercheinungen von den durch Histidin bewirkten zu unterscheiden. Über die Erkennung von Histidin und Tyrosin mit Hilfe dieser Probe s. bei Histidin (S. 268).

7. Piriäsche Probe. Man erwärmt trockenes Tyrosin mit etwas konzentrierter Schwefelsäure  $\frac{1}{2}$  Stunde im Wasserbad, verdünnt die erkaltete Lösung mit Wasser, neutralisiert mit Barium- oder Calciumcarbonat, filtriert und engt ein. Die Flüssigkeit färbt sich wegen ihres Gehaltes an Tyrosinsulfosäure mit wenig Eisenchlorid violett.

8. Dunkelfärbung durch Tyrosinase s. oben.

214. Jodgorgosäure (3, 5-Dijodtyrosin)  $C_9H_9O_3NJ_2$ . Sie wurde zuerst von <sup>Vorkommen.</sup> Drechsel<sup>8)</sup> bei der Zersetzung des Achsenskeletts von Gorgonia Carolinii mit Ätzbaryt erhalten, aber erst von Henze<sup>9)</sup> und Wheeler und Jamieson<sup>10)</sup> als Dijod-d,l-tyrosin erkannt. Die Stellung der Jodatome ermittelten Wheeler und Johns<sup>11)</sup>. Auch bei der Barytspaltung anderer jodärmerer Gorgoniden wird sie erhalten, wenn auch in geringerer Menge, ebenso bei der Barytspaltung der



<sup>1)</sup> Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 122, S. 1215. 1896; Bd. 123, S. 463. 1896; Bd. 146, S. 304. 1908.

<sup>2)</sup> Beitr. z. chem. Physiol. u. Phath. Bd. 1, S. 229. 1902.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 54, S. 331. 1907/08.

<sup>4)</sup> Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 130, S. 583. 1900.

<sup>5)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 37, S. 86. 1902/03.

<sup>6)</sup> Zentralbl. f. Physiol. Bd. 1, S. 193. 1888.

<sup>7)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 42, S. 517. 1904.

<sup>8)</sup> Zeitschr. f. Biol. Bd. 33, S. 85. 1896.

<sup>9)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 38, S. 60. 1903 u. Bd. 51, S. 64. 1907.

<sup>10)</sup> Americ. chem. journ. Bd. 33, S. 365. 1905.

<sup>11)</sup> Americ. chem. soc. Bd. 43, S. 11; ref. Chem. Zentralbl. 1910, I, S. 1021.

Schwämme (Wheeler und Mendel<sup>1)</sup> und von künstlich jodiertem Eiweiß (Oswald<sup>2)</sup>). Im Eiweiß findet sich jedenfalls Dijod-l-tyrosin, das bei der Barytspaltung racemisiert wird.

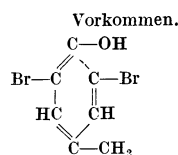
**Darstellung.** Synthetisch gewinnt man sie durch Einwirkung von Jod in Jodkalilösung auf eine Lösung von d,l-Tyrosin in Alkali (Henze).

Dijod-l-Tyrosin ist von Wheeler und Jamieson dargestellt.

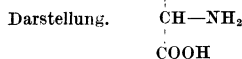
**Eigenschaften.** Aus heißem Wasser, in dem sie sehr schwer löslich ist, scheidet sie sich in lanzett- oder wetzsteinförmigen Krystallen ab, die bei fortgesetztem Umkrystallisieren aus heißem Wasser sich in glasglänzende rechteckige, flache Säulchen umwandeln. Schmelzpunkt etwas unter 200°, nicht ganz scharf, unter Zersetzung. In Alkalien, auch Soda, leicht löslich, daraus durch Säuren wieder krystallinisch fällbar. In Salzsäure leicht löslich. Durch Phosphorwolframsäure fällbar. Silber-, Kupfer-, Bleisalze fallen gleichfalls.

Beim Erwärmen einer Lösung mit Silbernitrat und Salpetersäure zum Sieden findet Trübung statt und Abscheidung von gelbem Jodsilber (Wheeler und Mendel). Beim Erwärmen mit Salpetersäure tritt Gelbfärbung ein, beim Erwärmen mit Millons Reagens keine Rotfärbung. Auch bei längerem Kochen mit Wasser findet keine Jodabspaltung statt. Trypsin spaltet in alkalischer Lösung Jod als Jodwasserstoff ab (Oswald<sup>3)</sup>. Beim Erwärmen mit Jodwasserstoffsäure entsteht Tyrosin.

Über Dijod-l-tyrosin, welches sich in Krystallform, Löslichkeit und mehreren anderen Punkten anders verhält, s. Wheeler und Jamieson, sowie Henze. In 25proz. Ammoniak (4—5proz.)  $[\alpha]_D^{20} = +2,27^\circ$ , in 4proz. Salzsäure (4- bis 5proz.)  $[\alpha]_D^{20} = +2,89^\circ$  (Abderhalden und Guggenheim<sup>4)</sup>.



215. **Bromgorgosäure (3, 5-Dibromtyrosin)**  $C_9H_9O_3NBr_2$  wurde von C. Th. Mörner<sup>5)</sup> bei der Zersetzung von Gorgonaceenskelett, und zwar den bromreichen und jodarmen Primnoastengeln, mit Ätzbaryt erhalten, und zwar als d,l-Form. Im Eiweiß findet sich jedenfalls Dibrom-l-tyrosin, das bei Barytspaltung racemisiert wird.



1-3, 5-Dibromtyrosin wurde auch synthetisch dargestellt, und zwar von Gorup-Besanez und von C. Th. Mörner<sup>6)</sup> und neuerdings nach einem sehr einfachen Verfahren (Einwirkung von Brom auf in Eisessig suspendiertes l-Tyrosin) von v. Zeynek<sup>7)</sup>; Mörner hat auch die d,l-Form synthetisiert.

**Eigenschaften.** d,l-Dibromtyrosin, glasklare Prismen oder Tafeln +  $H_2O$ , in Wasser wenig löslich (1 : 591 bei 20°), Zersetzungspunkt bei etwa 245°. Wässrige Lösung reagiert sauer gegen Lackmus und läßt sich mit Phenolphthalein und Lauge annähernd titrieren. Konzentrierte Salzsäure in der Wärme verändert es nicht, ebensowenig Kochen mit Barytwasser oder Natronlauge. 0,2proz. Lösungen werden gefällt durch Mercurinitrat, Bleiessig, nicht gefällt durch Sublimat, Silbernitrat, Bleizucker, Kupfersulfat, Phosphorwolframsäure, auch nicht bei Gegenwart von Schwefelsäure. Stärkere Lösungen werden durch Phosphorwolframsäure gefällt. Mit Salpetersäure in der Wärme erfolgt Gelbfärbung und auf Zusatz von Silbernitrat fällt Bromsilber aus. Die Tyrosinreaktionen von Millon, Piria, Denigès, Mörner, Wurster, Pauly (S. 301) sind negativ, die von Folin-Denis (§ 200) positiv.

<sup>1)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 7, S. 1. 1909/10.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 70, S. 310. 1910/11; Bd. 71, S. Bd. 74, S. 290. 1911.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 62, S. 432. 1909.

<sup>4)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 41, 1, S. 1237. 1908.

<sup>5)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 88, S. 138. 1913.

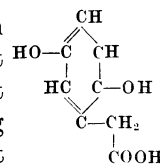
<sup>6)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 88, S. 124. 1913. <sup>7)</sup> desgl. Bd. 114, S. 275. 1921.

Beim Kochen mit Zinkstaub entsteht Tyrosin.

Über die Eigenschaften des l-Dibromtyrosin, die in einigen Punkten abweichen, s. Mörner und v. Zeynek. Es dreht in salzsaurer Lösung nach Mörner schwach rechts, nach v. Zeynek schwach links.

216. Homogentisinsäure (2,5-Dioxyphenylessigsäure, Hydrochinonessigsäure)  $C_8H_8O_4$  wurde von Wolkow und Baumann<sup>1)</sup> aus einem Alkaptonharn dargestellt und als diejenige Substanz erkannt, welche diesen Harnen die zuerst von Boedeker<sup>2)</sup> beschriebenen Eigenschaften, sich beim Stehen an der Luft besonders auf Alkalizusatz zu bräunen und Kupferoxyd in alkalischer Lösung zu reduzieren, verleiht. Sie ist seitdem häufiger aus Alkaptonharnen isoliert und findet sich auch im Serum bei dieser Stoffwechselanomalie (Abderhalden und Falta<sup>3)</sup>). Nach Tyrosin- und ebenso nach Phenylalanin- (Falta und Langstein<sup>4)</sup>) eingabe sowie nach Eingabe von Phenyl- $\alpha$ -Milchsäure, Phenylbrenztraubensäure und Oxyphenylbrenztraubensäure (Neubauer und Falta<sup>5)</sup>), Neubauer<sup>6)</sup>) tritt die Säure in solchen Harnen in vermehrter Menge auf. Das von Bertel<sup>7)</sup>) behauptete Vorkommen von Homogentisinsäure in Keimpflanzen konnte von E. Schulze und Castoro<sup>8)</sup>) nicht bestätigt werden.

Vorkommen.



Synthetisch stellten Baumann und Fränkel<sup>9)</sup>) sie aus dem Gentisinaldehyd dar. Einfacher und reichlicher erhält man sie synthetisch von der Isatinsäure über die o-Oxyphenylglyoxylsäure und Hydrochinonglyoxylsäure, welche durch Jodwasserstoff zur Homogentisinsäure reduziert wird (Neubauer und Flatow<sup>10)</sup>).

Darstellung.

Um sie aus Harn zu gewinnen, säuert man mit Schwefelsäure an (75 ccm 1 : 12 verdünnter Schwefelsäure auf 1 l Harn), dampft auf dem Wasserbade bis auf den 10. Teil ein und extrahiert 4—5 mal mit dem 3fachen Volumen Äther. Die Ätherauszüge werden abdestilliert, der Sirup wird in der 30—60fachen Menge Wasser gelöst, die Lösung filtriert, erhitzt, mit basischem Bleiacetat versetzt und heiß filtriert. Beim Erkalten krystallisiert das Bleisalz aus. Nach Garrod<sup>11)</sup>) erhält man es sehr viel einfacher, indem man den Harn zum Kochen erhitzt, je 100 ccm mit wenigstens 5—6 g festem Bleiacetat versetzt, sobald es sich gelöst hat, filtriert und das Filtrat 24 Stunden am kühlen Ort zur Krystallisation stehen läßt. Das in Wasser kaum lösliche Bleisalz wird fein zerrieben, mit der berechneten Menge doppelt-n-Schwefelsäure (für 100 g Bleisalz 175 ccm) bei Zimmertemperatur unter häufigem Umschütteln umgesetzt und das Filtrat bei Zimmertemperatur im Vakuum bis zu reichlicher Krystallisation eingeeengt. Die Krystalle werden abgesaugt, in wenig Wasser gelöst, die Lösung wird filtriert und wieder im Vakuum eingeeengt, bis Krystallisation erfolgt und nur eine ganz geringe Mutterlauge vorhanden ist (C. Th. Mörner<sup>12)</sup>).

Darstellung aus Harn.

Die Homogentisinsäure krystallisiert in Prismen mit 1 Mol. Wasser, das aber schon an der Luft fortgeht, wobei die Krystalle zerfallen und undurchsichtig werden. Völlig entweicht das Krystallwasser allmählich im Schwefelsäureexsiccator. Aus konzentrierter alkoholischer Lösung erhält man durch siedendes Chloroform die wasserfreie Säure in durchsichtigen Blättchen. In

Eigenschaften.

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 15, S. 228. 1891.

<sup>2)</sup> Ann. d. Chem. Bd. 117, S. 98. 1861.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 39, S. 143. 1903.

<sup>4)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 37, S. 513. 1902/03.

<sup>5)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 42, S. 81. 1904.

<sup>6)</sup> Dtsch. Arch. f. klin. Med. Bd. 95, S. 211. 1909.

<sup>7)</sup> Ber. d. dtsh. botan. Ges. Bd. 20, S. 454. 1902.

<sup>8)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 48, S. 396. 1906. <sup>9)</sup> desgl. Bd. 20, S. 219. 1895.

<sup>10)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 52, S. 375. 1907.

<sup>11)</sup> Journ. of physiol. Bd. 23, S. 512. 1898/99.

<sup>12)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 78, S. 307. Fußnote. 1912.

- Wasser, Alkohol, Äther ist sie leicht löslich, in Chloroform, Benzol und Toluol fast unlöslich. Die wasserfreie löst sich bei  $17,5^{\circ}$  1 : 1,8. Sie schmilzt bei  $146,5$  bis  $147^{\circ}$  und geht, über  $130^{\circ}$  erhitzt (Mörner<sup>1</sup>), unter Verlust von 1 Mol. Wasser in das Lacton über (s. unten). Beim Erhitzen in weiter Probierröhre sublimiert die schmelzende Säure scheinbar unverändert, aber das Sublimat (Lacton) färbt sich allmählich schön blau. Die wässrige Lösung färbt sich beim langen Stehen an der Luft dunkel. Mit Ammoniak oder Natronlauge, auch schon mit Alkali-carbonat, tritt Braun- bis Schwarzfärbung ein. Bringt man eine  $\frac{1}{4}$ —2proz. Lösung (auch Alkaptonharn) mit soviel Ammoniak zusammen, daß der Gehalt an Ammoniak 1—4% beträgt, so nimmt die Flüssigkeit bei Luftzutritt eine prachtvolle, intensive, rotviolette Farbe an. Es treten dabei 2 Farbstoffe,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Alkaptochrom, auf (C. Th. Mörner<sup>2</sup>). Silbernitratlösung gibt in einigen Sekunden Reduktion von Silber, ammoniakalische Silberlösung gibt sofortige Reduktion. Fehlingsche Lösung wird langsam in der Kälte, schnell beim Erwärmen reduziert. Wismutsubnitrat wird kaum reduziert. Eisenchlorid gibt eine noch bei Gehalt von 1 Tl. Säure in 4000 Tl. Lösung erkennbare, rasch vorübergehende Blaufärbung. Das Verschwinden beruht auf der Oxydation der Homogentisinsäure zu Benzochinonessigsäure durch das Eisenchlorid. Fügt man wieder Ferrichlorid hinzu, so erscheint die Blaufärbung wieder usw., bis alle Homogentisinsäure oxydiert ist (C. Th. Mörner<sup>3</sup>). Millons Reagens gibt Gelbfärbung und einen amorphen Niederschlag, der beim Erhitzen ziegelrot wird.
- Verhalten:** 1 proz. Lösungen von Homogentisinsäure werden durch Bleiacetatlösung noch sofort, 0,2 proz. nach einiger Zeit gefällt. Das Bleisalz  $(C_8H_7O_4)_2Pb + 3H_2O$  krystallisiert in Nadeln und Prismen, schmilzt bei  $214$ — $215^{\circ}$ , verliert sein Krystallwasser beim Liegen im Exsiccator oder beim Erhitzen und löst sich in 675 Tl. Wasser bei  $20^{\circ}$ , nicht in Alkohol oder Äther. Der Äthylester, in kaltem Wasser schwer, in Alkohol und Äther leicht lösliche Krystalle (Fp.  $119$ — $120^{\circ}$ ), entsteht leicht, schon beim Erhitzen einer Lösung der Säure in alkoholhaltigem Äther. Beim Schütteln einer ammoniakalischen Lösung von Homogentisinsäure mit Benzoylchlorid und Natronlauge fällt das Amid der Dibenzoylhomogentisinsäure aus. Aus dem Harn erhält man diesen Körper bei der gleichen Behandlung auch ohne Zusatz von Ammoniak (Orton und Garrod<sup>4</sup>).
- zu Alkalien und Ammoniak** Lacton. Das Lacton der Homogentisinsäure, welches beim Erhitzen über  $130^{\circ}$  entsteht, krystallisiert in kurzen Prismen, ist schwer in kaltem, ziemlich leicht in heißem Wasser löslich und kann aus dieser Lösung umkrystallisiert werden. Fp.  $191^{\circ}$ . Es gibt mit Millons Reagens Rotfärbung; seine wässrige Lösung reduziert neutrale Silberlösung nicht, auf Ammoniakzusatz alsbald. Es scheint, daß dieses Lacton auch bei der Spaltung des Gemmateins, eines Farbstoffs, welcher in Verbindung mit Zucker in Lycoperdon gemmatum Batsch enthalten ist, mit salzsäurehaltigem Wasserstoffsuperoxyd entsteht (Kotake und Naito<sup>5</sup>).
- zu Fehlingscher Lösung zu Eisenchlorid.** Beim Schmelzen der Homogentisinsäure mit Kali bilden sich Hydrochinon und Gentisinsäure. Bei der Oxydation mit Chromsäure und mit Ferrichlorid entsteht Benzochinonessigsäure (C. Th. Mörner<sup>6</sup>), beim Kochen mit Ferrichloridlösung unter Beobachtung bestimmter Versuchsanordnung eine krystallisierte, flüchtige, chlorreiche Chinonsubstanz. Geruch nach Chinon tritt beim Kochen mit konzentrierter Ferrichloridlösung nicht auf (C. Th. Mörner<sup>7</sup>).
- Verbindungen:**
- mit Blei
- mit Alkohol
- mit Benzoesäure.
- Umwandlungen.

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 117, S. 85. 1921.

<sup>2</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 69, S. 329. 1910. <sup>3</sup>) desgl. Bd. 78, S. 306. 1912.

<sup>4</sup>) Journ. of physiol. Bd. 27, S. 89. 1902.

<sup>5</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 90, S. 254. 1914.

<sup>6</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 78, S. 306. 1912. <sup>7</sup>) desgl. Bd. 117, S. 67. 1921.

Konzentrierte Lösungen von Homogentisinsäure werden durch Tyrosinase schwach braungelb gefärbt (Abderhalden und Guggenheim<sup>1)</sup>).

Der Nachweis beruht auf dem oben angegebenen Verhalten zu Alkalilauge <sup>Nachweis.</sup> und zur Fehlingschen Lösung und kann mit Hilfe dieser Reaktionen schon im Harn mit ziemlicher Sicherheit geführt werden. Schüttelt man etwas Homogentisinsäurelösung (auch Alkaptonharn) mit etwas Äther im Reagensglas und gießt den Äther auf ein Stück ungebrannten Kalk, so entsteht eine mehr oder weniger flüchtige, lebhaft Blaufärbung (Katsch und Németh<sup>2)</sup>). Auch das Verhalten zu Ammoniak und zu Ferrichlorid kann benutzt werden.

**Uroleucinsäure.** Mit diesem Namen bezeichnete Kirk<sup>3)</sup> eine Substanz, welche er vor der Entdeckung der Homogentisinsäure (§ 216) aus Alkaptonharn isolierte. Die Analyse führte zu der Formel  $C_9H_{10}O_5$ . Der Fp. lag bei etwa 133,3°. Nachdem die Homogentisinsäure durch Baumann aufgefunden worden war, zweifelte Kirk nicht daran, daß seine Säure unreine Homogentisinsäure sei (s. darüber bei Garrod und Hurlley<sup>4)</sup>).

Huppert<sup>5)</sup>, welcher das Originalpräparat von Kirk weiter untersuchte, fand es zum größeren Teil aus Homogentisinsäure bestehend, zum kleineren aus einer Säure, die bei 130,5–131,5° schmolz. Eine Analyse dieser Säure ist von Huppert nicht ausgeführt worden. Huppert schrieb ihr auf Grund des Schmelzpunktes und offenbar in der Meinung, daß das ihm zugesendete Material das Rohmaterial darstelle, aus dem auch Kirk erst die Uroleucinsäure isoliert habe, die Formel  $C_9H_{10}O_5$  zu. Tatsächlich (s. Garrod und Hurlley) hatte er aber das von Kirk analysierte Präparat erhalten. Die Analyse von Kirk bezieht sich also auf eine Substanz, die zum größten Teil aus Homogentisinsäure bestand. Die Zusammensetzung der bei 131° schmelzenden Säure ist unbekannt und damit ist natürlich auch allen Schlußfolgerungen auf ihre Konstitution der Boden entzogen.

Man hat jetzt kein Recht mehr, sie als 2, 5-Dioxyphenyl- $\alpha$ -Milchsäure aufzufassen, wie Huppert es tat, weil er aus ihr durch Methylierung und nachfolgende Oxydation dasselbe Produkt, wie aus der Homogentisinsäure erhielt.

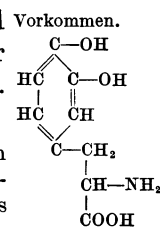
In der Tat kann es sich nicht um Hydrochinon- $\alpha$ -Milchsäure handeln, wie aus einem Vergleich mit der synthetisch dargestellten hervorgeht (Neubauer und Flatow<sup>6)</sup>).

Nach Hupperts Tode sind die von ihm hinterlassenen Präparate von Oswald<sup>7)</sup> untersucht worden mit dem Ergebnis, daß sie den Schmelzpunkt und die Zusammensetzung der Homogentisinsäure zeigten. So ist also die Uroleucinsäure aus der Literatur zu streichen.

**217. 3, 4-Dioxyphenylalanin  $C_9H_{11}NO_4$**  von Torquati<sup>8)</sup> in Fruchtsäften und Keimlingen von *Vicia faba* aufgefunden und von Guggenheim<sup>9)</sup> in seiner Konstitution festgestellt. Es ist auch in anderen Bohnen enthalten (Miller<sup>10)</sup>). Es handelt sich um die l-Form.

Für die Synthese, die zuerst von Funk<sup>11)</sup> ausgeführt wurde, kommen die Verfahren von Sasaki<sup>12)</sup> (Kondensation aus Glycinanhydrid und Vanillin, Reduktion und Spaltung des Kondensationsprodukts) und von Waser und Lewandowski<sup>13)</sup> (Nitrieren des l-Tyrosins, Reduktion des enthaltenen 3-Nitrotyrosins zu 3-Aminotyrosin, Diazotieren und Verkothen der entstandenen Diazoverbindung) in Betracht. Ersteres führt zu d,l, letzteres zu l-Dioxyphenylalanin.

l-Form, Prismen oder Nadeln, wenig in kaltem (1 : 200), leichter in kochendem Wasser (1 : 40) löslich, in allen organischen Lösungsmitteln, auch in Eisessig, unlöslich, zersetzt sich bei 280°, d,l-Form bei 271–272°, nach anderen <sup>Eigenschaften.</sup>



<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 54, S. 339. 1907/08.

<sup>2)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 120, S. 212. 1921.

<sup>3)</sup> Journ. of anat. a. phys. Bd. 23, S. 69. 1889.

<sup>4)</sup> Journ. of physiol. Bd. 36, S. 136. 1908.

<sup>5)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 23, S. 412. 1897.

<sup>6)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 52, S. 375. 1907.

<sup>7)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 93, S. 307. 1914/15

<sup>8)</sup> Chem. Zentralbl. 1913, II, S. 517.

<sup>9)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 88, S. 276. 1913.

<sup>10)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 44, S. 481. 1920.

<sup>11)</sup> Journ. of the chem. soc. (London) Bd. 99, 1, S. 554. 1911.

<sup>12)</sup> Hirai: Biochem. Zeitschr. Bd. 114, S. 67. 1921.

<sup>13)</sup> Helvetica chim. acta Bd. 4, S. 657. 1921.

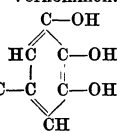
Angaben bei 285°. Wässrige Lösung neutral gegen Lackmus, färbt sich allmählich dunkel, schnell auf Zusatz von Alkalien. In Mineralsäure löst es sich unter Bildung von Salzen. Salzsäures Salz derbe Prismen. Mit Bleiacetat keine Fällung, aber mit Bleiacetat + Ammoniak. Mit Sublimat und Phosphorwolframsäure keine Fällung. Silbernitrat wird sofort reduziert, ebenso Permanganat in saurer Lösung und Fehlingsche Lösung. Pikrat konnte nicht erhalten werden, ebensowenig Metallsalze. Eisenchlorid gibt Grünfärbung, die auf Zusatz von Natriumcarbonat violett wird. Millons Reagens gibt orangerote, Diazobenzolsulfosäure tief rotbraune Färbung.

Optische Eigenschaften.  
Umwandlung.

Eine 10proz. Lösung in n-Salzsäure  $[\alpha]_D^{20} = -14,28^\circ$ .

Beim Schmelzen mit Ätzkali entsteht Protocatechusäure (Guggenheim), durch Tyrosinase tritt Schwarzfärbung ein, ebenso durch ein intracelluläres Oxydationsferment (s. darüber Bloch<sup>1</sup>).

Vorkommen.  
Eigenschaften.



218. Gallussäure (Trioxycarbonsäure)  $C_7H_6O_5$ . Ohne Zweifel aus Gerbsäure in der Nahrung herkommend, ist Gallussäure im Menschen- und Pferdeharn mehrmals aufgefunden worden (Baumann<sup>2</sup>). Aus dem mit Essigsäure angesäuerten Harn wird sie mit den Oxysäuren zusammen von Äther aufgenommen und aus der sauren wässrigen Lösung des Ätherrückstandes durch neutrales Bleiacetat gefällt. Säuert man diesen Niederschlag an, schüttelt mit Äther, löst den Ätherrückstand in Wasser und läßt verdunsten, so scheidet sie sich zuweilen in geringer Menge krystallinisch ab.

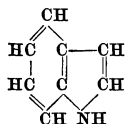
Sie krystallisiert in feinen Nadeln mit 1 Mol. Wasser und ist in heißem Wasser, Alkohol sowie Äther leicht löslich. Versetzt man eine wässrige, etwa 10proz. Lösung der Säure mit mäßigem Überschuß von Phenylhydrazin und der gleichen Menge 50proz. Essigsäure und erhitzt 1 Stunde im Wasserbade, so scheidet sich beim Erkalten Gallussäurephenylhydrazid als Prismen ab, die in Alkohol oder heißem Wasser ziemlich leicht löslich sind und bei 187° schmelzen.

Nachweis.

Eine wässrige Lösung reduziert alkalische Silberlösung schon bei gewöhnlicher Temperatur, bräunt sich auf Zusatz von Alkalien, gibt mit Eisenoxysalzen schwarzblaue Färbung und mit Cyankalium eine schöne Rotfärbung, die beim ruhigen Stehen bald verschwindet, beim Umschütteln wieder erscheint (Sidney Young<sup>3</sup>). Mit Millons Reagens gibt die Gallussäure einen ziegelroten Niederschlag, der beim Kochen graubraun wird (Huppert).

### Indol und Indolderivate.

Vorkommen.



219. Indol  $C_8H_7N$  bildet sich, meist zusammen mit Skatol, bei der Fäulnis von Eiweißstoffen (Nencki<sup>4</sup>), desgleichen beim Schmelzen dieser Stoffe mit Kali (Kühne<sup>5</sup>). In Faeces und Darminhalt von Menschen und Tieren findet es sich entweder mit oder ohne Skatol sehr häufig. In sehr seltenen Fällen kommt es auch im Magen vor. Es findet sich in kleiner Menge im Destillat normaler Harne (aus noch unbekanntem Muttersubstanzen entstehend) (Jaffe<sup>6</sup>), im Destillat von Eialbumin unter vermindertem Druck (Pictet und Cramer<sup>7</sup>), im Holz von Celtis reticulosa (Herter<sup>8</sup>), im Öl der Jasminblüten (aus einer komplexen, leicht spaltbaren Verbindung stammend) (Hesse<sup>9</sup>), im Destillat von Orangeblüten mit Wasser (Hesse und Zeitschel<sup>10</sup>), im Blütenextrakt von Robinia pseudacacia (Elze<sup>11</sup>) und anderer Pflanzen (Weehuizen<sup>12</sup>), in den Ausdünstungen von Blüten vieler Pflanzen (Sack<sup>13</sup>).

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 98, S. 226. 1916/17.

<sup>2</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 6, S. 193. 1882.

<sup>3</sup>) Ref. Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 16, 2, S. 2691. 1883.

<sup>4</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 8, 1, S. 336. 1875. <sup>5</sup>) desgl. Bd. 8, S. 206. 1875.

<sup>6</sup>) Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol., Supplbd. 1908, S. 299.

<sup>7</sup>) Helvetica chim. acta Bd. 2, S. 188. 1919.

<sup>8</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 5, S. 489. 1908/09.

<sup>9</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 32, 3, S. 2611. 1899 u. Bd. 37, 2, S. 1457. 1904.

<sup>10</sup>) Journ. f. prakt. Chem. (2) Bd. 66, S. 481. 1902.

<sup>11</sup>) Chemiker-Ztg. Bd. 34, S. 814. 1910.

<sup>12</sup>) Chem. Zentralbl. 1908, II, S. 1747.

<sup>13</sup>) Chem. Zentralbl. 1911, I, S. 1367 u. 1911, II, S. 695.



Synthetisch wurde es zuerst von Baeyer<sup>1)</sup> durch Destillation der Produkte starker Reduktion von Indigo oder Isatin mit Zinkstaub, sowie durch Schmelzen von o-Nitrozimtsäure mit Kali unter Zusatz von Eisenfeilspänen gewonnen. Am besten gewinnt man es aus Indoxylsäure, welche in dem durch Schmelzen von Phenylglycin-o-carbonsäure mit Ätzkali erhaltenen Produkt enthalten ist. Sie geht beim Kochen der wässerigen Lösung unter Kohlensäureabgabe in Indoxyl über, das in alkalischer Lösung zu Indol reduziert wird (Vorländer und Apelt<sup>2)</sup>). Darstellung.

Über die Darstellung aus Fäulnisgemischen s. § 229; über die Trennung von Skatol s. § 220.

Indol krystallisiert aus heißer wässriger Lösung in Blättchen, aus Ligroin in großen, atlasglänzenden Blättchen; es schmilzt bei 52°, siedet nicht ohne Zersetzung bei 253—254° (korr.) und verflüchtigt sich leicht mit Wasserdämpfen. Die Dämpfe haben einen eigentümlichen widerlichen Geruch. Es löst sich ziemlich leicht in heißem, weniger in kaltem Wasser, leicht in Alkohol, Äther, Chloroform, Benzol, Ligroin, und läßt sich seinen wässerigen Lösungen durch Schütteln mit Ligroin entziehen. Es verhält sich wie eine schwache Base und verbindet sich mit konzentrierten, nicht mit verdünnten Säuren. Die salzsaure Verbindung ist in Wasser schwer löslich und wird beim Kochen mit Wasser zersetzt. Auf Zusatz von einigen Tropfen Salpetersäure und Kaliumnitritlösung scheidet sich aus einer kaltgesättigten wässerigen Lösung ein roter Niederschlag von salpetersaurem Nitrosoindol  $C_{16}H_{13}(NO)N_2 \cdot HNO_3$  aus, der sich sehr wenig in Wasser, leicht in Alkohol, gar nicht in Äther löst, sehr zersetzlich ist und trocken erhitzt verpufft (Nencki<sup>3)</sup>). Bringt man in Benzol gelöstes Indol und Pikrinsäure zusammen, so verbinden sie sich zu gleichen Molekülen, und diese Verbindung scheidet sich in langen roten, stark glänzenden, in kaltem Benzol oder Ligroin schwer löslichen Krystallen ab, die aus heißem Benzol gut umkrystallisiert werden können. Zur Gewinnung des Indol aus dieser Verbindung zerlegt man sie durch Ammoniak, destilliert entweder im Wasserdampfstrom ab oder schüttelt die Lösung mit Ligroin aus, welches beim Verdunsten das Indol schön krystallisiert zurückläßt.  $\beta$ -Naphthochinonnatriumsulfonat ruft in schwach alkalischen Lösungen einen blauen oder purpurblauen Niederschlag hervor. Skatol gibt keine Verbindung. Daher zur Trennung von beiden geeignet (Herter und Foster<sup>4)</sup>). Mit Diazobenzolsulfosäure in sodaalkalischer Lösung gibt Indol Farbstofflösung, Skatol nicht (Pauly und Gundermann<sup>5)</sup>). Eigenschaften

Beim Erhitzen des Pikrats mit Alkalilauge wird Indol zersetzt (Unterschied vom Skatolpikrat), während nach Salkowski<sup>6)</sup> freies Indol, ebenso behandelt, überdestilliert. Durch Wasserstoffsperoxyd geht es in Indoxyl und schließlich in Indigoblau über, Skatol nicht (Porcher<sup>7)</sup>). Verbindungen:

Zum Nachweis des Indols dienen folgende Reaktionen\*): mit Salzsäure

1. Nach Baeyer. Auf Zusatz einiger Tropfen Salpetersäure und einiger Tropfen ganz verdünnter Kaliumnitritlösung (0,02proz. oder noch schwächer) färbt sich eine Indollösung auch bei noch sehr starker Verdünnung rot. Bei reichlicherem Gehalt tritt der oben erwähnte Niederschlag von salpetersaurem Nitrosoindol auf (Salkowski<sup>6)</sup>). mit salpetriger Säure

\*) Es ist zu beachten, daß das zur Isolierung von Indol etwa benutzte Benzol ganz rein sein muß.

<sup>1)</sup> Ann. d. Chem. Bd. 140, S. 295. 1866; Supplbd. 7, S. 56. 1870. Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 1, S. 17. 1868; Bd. 3, S. 885. 1870.

<sup>2)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 37, 1, S. 1134. 1904.

<sup>3)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 8, 1, S. 723. 1875.

<sup>4)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 1, S. 257. 1906 u. Bd. 2, S. 267. 1907.

<sup>5)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 41, 3, S. 4004, Fußnote 4. 1908.

<sup>6)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 8, S. 441. 1884.

<sup>7)</sup> Bull. de la soc. chim. de France (4) Bd. 5, S. 526. 1909.

2. Nach Legal<sup>1)</sup>. Man fügt zu einer Indollösung Nitroprussidnatriumlösung bis zur Gelbfärbung und darauf einige Tropfen Natronlauge: tiefe violettblaue Färbung, die auf Zusatz von Salzsäure oder Eisessig rein blau wird. Noch in einer Verdünnung bis zu 1:100 000 positiv.

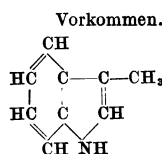
3. Nach Ehrlich<sup>2)</sup>. Man fügt zu einer Indollösung das halbe Volumen einer 2proz. alkoholischen Lösung von p-Dimethylaminobenzaldehyd, darauf tropfenweise 25proz. Salzsäure bis zur Rotfärbung (Ehrlich) und nun vorsichtig einen oder einige Tropfen einer 0,5proz. Natriumnitritlösung: Schöne dunkelrote Farbe, welche bald verschwindet (Steensma<sup>3)</sup>). Nach Salkowski<sup>4)</sup> verschwindet die Farbe nicht so schnell. Eine erst nach Nitritzusatz auftretende Rotfärbung ist nur dann auf Indol zu beziehen, wenn der Farbstoff sich in Amylalkohol löst (Salkowski).

4. Nach Hopkins. Man fügt zu einer Indollösung etwas ganz verdünnte Glyoxylsäurelösung und konzentrierte Schwefelsäure: Rotfärbung. Noch in einer Verdünnung von etwa 1:500 000 positiv (Dakin<sup>5)</sup>).

5. Nach Kondo<sup>6)</sup>. Man fügt zu der Indollösung etwas Formaldehydlösung und konzentrierte Schwefelsäure: violettrote Färbung. Noch in einer Verdünnung von 1:700 000 positiv.

6. Ein mit starker Salzsäure befeuchteter Fichtenspan wird durch Indol in alkoholischer Lösung in kurzer Zeit kirschrot gefärbt.

Über die Farbenreaktionen s. auch Denigès<sup>7)</sup>, Blumenthal<sup>8)</sup>, Fearon<sup>9)</sup>.



220. Skatol (Pr-3-Methylindol) C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>N ist von Brieger<sup>10)</sup> als Bestandteil der menschlichen Faeces erkannt und häufig im Darminhalt von Menschen und Tieren neben Indol nachgewiesen. Es entsteht wie das Indol bei der Fäulnis der Eiweißstoffe (Nencki<sup>11)</sup> und beim Schmelzen derselben mit Kali (Nencki<sup>12)</sup>). Bei 8tägiger Fäulnis von Gehirnmasse bildete es sich neben Spuren von Indol (Nencki). Es findet sich im Zibet (Walbaum<sup>13)</sup>), Holz von *Celtis reticulosa* (Dunstan<sup>14)</sup>), Herter<sup>15)</sup>), Holz von *Nectandra* (Sack<sup>16)</sup>).

Darstellung. Baeyer<sup>17)</sup> erhielt es zugleich mit Indol bei der Destillation der Reduktionsprodukte von Indigoblau mit Zinkstaub. Um es synthetisch darzustellen, vermischt man nach E. Fischer<sup>18)</sup> Propionaldehyd-Phenylhydrazon mit dem gleichen Gewicht Chlorzink (Katalysator), erhitzt, nachdem die heftige Reaktion vorüber ist, noch 2 Minuten auf 180° und destilliert im Wasserdampfstrom.

<sup>1)</sup> Breslauer ärztl. Zeitschr. 1884, Nr. 3 u. 4.

<sup>2)</sup> Med. Woche 1901, Aprilheft.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 47, S. 25. 1906.

<sup>4)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 97, S. 123. 1919.

<sup>5)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 2, S. 289. 1907.

<sup>6)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 48, S. 185. 1906.

<sup>7)</sup> Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. Bd. 64, S. 295; ref. Malys Jahresber. d. Tierchem. 1908, S. 140.

<sup>8)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 19, S. 521. 1909.

<sup>9)</sup> Biochem. Journ. Bd. 14, S. 548; ref. Chem. Zentralbl. 1921, II, S. 6.

<sup>10)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 10, 1, S. 1027. 1877.

<sup>11)</sup> Zentralbl. f. d. med. Wiss. 1878, S. 849. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 4, S. 371. 1880. Journ. f. prakt. Chem. N. F. Bd. 20, S. 466. 1879. — E. u. H. Salkowski: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 12, 1, S. 651. 1879. — Brieger: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 12, 2, S. 1985. 1879. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 4, S. 414. 1880. Journ. f. prakt. Chem. N. F. Bd. 17, S. 124. 1878.

<sup>12)</sup> Journ. f. prakt. Chem. N. F. Bd. 17, S. 97. 1878.

<sup>13)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 33, 2, S. 1903. 1900.

<sup>14)</sup> Chem. Zentralbl. 1889, II, S. 144.

<sup>15)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 5, S. 489. 1908/09.

<sup>16)</sup> Chem. Zentralbl. 1911, S. 1. 1367.

<sup>17)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 13, 2, S. 2339. 1880.

<sup>18)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 19, 1, S. 1563. 1886. Ann. d. Chem. Bd. 236, S. 137. 1886.

Über die Darstellung aus Fäulnisgemischen s. § 229.

Das Skatol krystallisiert ähnlich dem Indol in farblosen Blättchen, schmilzt bei 95°, siedet bei 265—266° und hat stechenden Fäkalgeruch. Es löst sich schwerer in Wasser als Indol, geht aber noch leichter bei der Destillation mit den Wasserdämpfen über als dieses, löst sich leicht in Alkohol, Äther, Chloroform und Benzol. Mit Salzsäure vereinigt es sich zu krystallisierter Verbindung  $2 C_9H_9N \cdot HCl$ , welche in Alkohol leichtlöslich, in Wasser sowie Äther unlöslich ist. Seine Lösung in Benzol mit gleichfalls in Benzol gelöster Pikrinsäure versetzt, gibt krystallinischen Niederschlag der pikrinsauren Verbindung wie Indol.

Eigenschaften.

Verbindungen:  
mit Salzsäure

mit Pikrinsäure.

Beim Erhitzen des Pikrats mit mäßig verdünnter Natronlauge destilliert Skatol unzersetzt (Unterschied von Indolpikrat) (Baeyer). Durch Einwirkung von Chloroform und Kalilauge auf Skatol entsteht Chlormethylchinolin (Ellinger und Flamaud<sup>1</sup>).

Umwandlung.

Dem Nachweis geht zweckmäßig die Trennung vom Indol voran. Dazu benutzt man die geringere Löslichkeit des Skatols in Wasser, seine leichtere Fällbarkeit aus der alkoholischen Lösung durch Wasser, seine größere Flüchtigkeit mit Wasserdämpfen, das verschiedene Verhalten der Pikrate bei der Destillation mit Natronlauge (Skatol geht dabei unverändert in das Destillat über, Indol nicht) und die Destillation nach Zusatz von  $\beta$ -Naphthochinonnatriumsulfonat (S. 307), mit dem Skatol keine Verbindung gibt. Skatol gibt folgende Reaktionen\*):

Trennung von Indol  
und Skatol.

1. Es löst sich in konzentrierter Salzsäure mit violetter Farbe. Auch beim Erwärmen seiner Lösung mit Schwefelsäure entsteht purpurrote Färbung (Ciamician und Magnanini<sup>2</sup>).

Nachweis.

2. Eine wässrige Lösung gibt mit einigen Tropfen Salpetersäure und etwas Kaliumnitritlösung versetzt keine Rotfärbung (wie Indol), sondern weißliche Trübung.

3. Nach Ehrlich<sup>3</sup>). Behandelt man eine Skatollösung in der S. 308 angegebenen Weise, so tritt auf Zusatz von p-Dimethylaminobenzaldehydlösung und Salzsäure eine blauviolette Färbung ein (Ad. Schmidt<sup>4</sup>), die unter Umständen auf Zusatz von Natriumnitrit tiefblau wird (Steensma<sup>5</sup>). Farbstoff in Chloroform leicht löslich (Herzfeld<sup>6</sup>).

4. Nach Sasaki<sup>7</sup>). Man vermischt 3 ccm der zu prüfenden Flüssigkeit mit 3 Tropfen aldehydfreiem Methylalkohol und unterschichtet mit dem gleichen Volumen konzentrierter Schwefelsäure, welche eine Spur Ferrisalz enthalten muß (auf 100 g eisenfreie Säure 1 Tropfen einer 1 proz. wässrigen Ferrisulfatlösung). Es entsteht an der Berührungsstelle ein violetter Ring. Mischt man nach einigen Minuten, so wird die ganze Flüssigkeit violettrot. Indol und Tryptophan geben die Reaktion nicht.

5. Nach Salkowski<sup>8</sup>). Auf Zusatz von Nitroprussidnatrium und Natronlauge färbt sich eine Skatollösung intensiv gelb, versetzt man dann mit dem halben Volumen Eisessig, erhitzt zum Sieden und erhält darin einige Minuten, so tritt Violettfärbung ein.

\*) Das zur Isolierung des Skatols etwa benutzte Benzol muß ganz rein sein.

<sup>1</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 39, 4, S. 4388. 1906.

<sup>2</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 21, 1, S. 1928. 1888.

<sup>3</sup>) Med. Woche 1901, Aprilheft.

<sup>4</sup>) Münch. med. Wochenschr. 1903, S. 721.

<sup>5</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 47, S. 25. 1906.

<sup>6</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 56, S. 261. 1913.

<sup>7</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 23, S. 402. 1910 u. Bd. 29, S. 395. 1910.

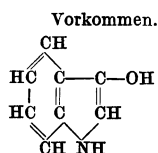
<sup>8</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 8, S. 448. 1883/84.

6. Nach Hopkins. Man fügt etwas ganz verdünnte Glyoxylsäure hinzu und konzentrierte Schwefelsäure (wie S. 308): schöne rosarote Färbung. Noch in einer Verdünnung von 1:1 000 000 positiv (Dakin<sup>1</sup>).

7. Fügt man zu einer Skatollösung Formaldehydlösung und konzentrierte Schwefelsäure (wie S. 308), so tritt Gelb- oder Braunfärbung ein (Kondo<sup>2</sup>, Dakin), eine Rotfärbung aber, wenn zu der Schwefelsäure eine Spur einer oxydierenden Substanz, z. B. Ferrisalz, zugefügt wird (Dakin).

8. Ein mit Salzsäure befeuchteter Fichtenspan wird durch Skatollösung in Wasser oder Alkohol nicht rot gefärbt; wird dagegen ein mit Skatol in heißer alkoholischer Lösung getränkter Fichtenspan in kalte starke Salzsäure getaucht, so färbt er sich zunächst kirschrot, die Farbe geht nach einiger Zeit in ein dunkles Violett über. Die Reaktion ist nicht so empfindlich wie bei Indol (E. Fischer).

Über die Farbenreaktionen s. auch Blumenthal<sup>3</sup>), Fearon<sup>4</sup>).



221. **Indoxyl**  $C_8H_7NO$  findet sich als Indoxylschwefelsäure und Indoxylglucuronsäure im Harn, in Verbindung mit Zucker als Indican in der Indigopflanze.

Man erhält es durch Zerlegung dieser gepaarten Säuren mit Salzsäure (Baumann und Brieger<sup>5</sup>) sowie durch Erwärmen von Indoxylsäure mit Wasser auf 70—80° neben Kohlensäure (Baeyer<sup>6</sup>), Vorländer und Drescher<sup>7</sup>).

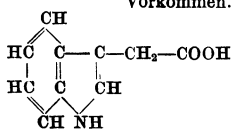
Eigenschaften.

Hellgelbe Krystalle<sup>6</sup>), löslich in Wasser mit grüner Fluorescenz, in Alkohol, Äther, besonders leicht in Aceton, mit schwach überhitztem Wasserdampf teilweise unzerstört flüchtig. Fp. 85°. Mit verdünnten Säuren entwickelt es einen unangenehmen Geruch und wandelt sich in eine amorphe, rote Substanz um; in konzentrierter Schwefel- oder Salzsäure ist es beständiger. Bei der Einwirkung von pyroschwefelsaurem Kali auf Indoxyl, in Kalilauge gelöst, entsteht Indoxylschwefelsäure. Indoxyl oxydiert sich in alkalischer Lösung, besonders in ammoniakalischer, an der Luft zu Indigoblau nach der Gleichung  $2 C_8H_7NO + O_2 = C_{16}H_{10}N_2O_2 + 2 H_2O$ , ebenso sofort auf Zusatz von Salzsäure und Eisenchlorid; mit Eisenchlorid allein entsteht eine weiße, amorphe Substanz, die aber von Salzsäure sofort in Indigo umgewandelt wird. Auf Zusatz von Natriumcarbonat und Isatin zu einer Indoxyllösung bildet sich Indirubin, auch in salzsaurer Lösung vollzieht sich diese Synthese.

Skatoxyl.

Skatoxyl  $C_9H_9NO$  ist bisher aus dem Harn nicht rein dargestellt worden.

Vorkommen.



222. **Indol-Pr-3-Essigsäure**\*)  $C_{10}H_9NO_2$  wurde zuerst von E. und H. Salkowski<sup>8</sup>) unter den Fäulnisprodukten der Eiweißstoffe aufgefunden, in ihrer Konstitution von Ellinger<sup>9</sup>) erkannt. Sie findet sich häufig im Harn (Chromogen des Urorosein) und wurde aus dem Harn eines an anormaler Darmgärung leidenden Patienten isoliert (Herter<sup>10</sup>). v. Lippmann<sup>11</sup>) erhielt sie aus Rübenentzuckerungslaugen.

Darstellung.

Synthetisch wurde sie durch Erhitzen des Phenylhydrazons des  $\beta$ -Aldehydpropionsäuremethylesters mit alkoholischer Schwefelsäure und Verseifen des so erhaltenen Esters mit alkoholischem Kali gewonnen (Ellinger).

\*) Früher als Skatolcarbonsäure bezeichnet.

<sup>1</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 2, S. 289. 1907.

<sup>2</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 48, S. 185. 1906.

<sup>3</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 19, S. 521. 1909.

<sup>4</sup>) Biochem. Journ. Bd. 14, S. 548; ref. Chem. Zentralbl. 1921, II, S. 6.

<sup>5</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 3, S. 254. 1879.

<sup>6</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 14, 2, S. 1744. 1881. <sup>7</sup>) desgl. Bd. 35, 2, S. 1701. 1902.

<sup>8</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 13, 2, S. 2217. 1880 u. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 9, S. 8. 1885.

<sup>9</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 37, 2, S. 1801. 1904.

<sup>10</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 4, S. 239 u. 253. 1908.

<sup>11</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 57, 1, S. 256. 1924.

Über die Darstellung aus Fäulnisgemischen s. § 229.

Aus 2 kg feuchten Fibrins, welches 26 Tage gefault hatte, wurden einmal 1,3 g erhalten.

Die Säure krystallisiert in Blättchen, welche in Alkohol und Äther leicht, Eigenschaften. in Wasser wenig löslich sind und bei 164° schmelzen. Der Schmelzpunkt der synthetischen Säure lag bei 165°. Beim höheren Erhitzen zerfällt sie in Kohlensäure und Skatol. Unreine wässrige Lösungen zersetzen sich schon beim Verdampfen.

Zum Nachweis dienen folgende Reaktionen, welche in wässriger Lösung Nachweis. noch bei einer Verdünnung 1:1000 eintreten (Salkowski).

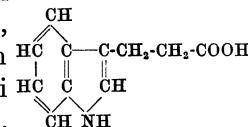
1. Mit einigen Tropfen reiner Salpetersäure von 1,2 spez. Gew. und wenigen Tropfen 2proz. Kaliumnitritlösung entsteht ziemlich schnell kirschrote Färbung, dann Trübung unter Ausscheidung eines roten Farbstoffs.

2. Mit dem gleichen Volumen Salzsäure von 1,12 spez. Gew. und einigen Tropfen 1—2proz. Chlorkalklösung erhält man allmählich purpurrote Färbung und ebensolchen Niederschlag.

3. Mit einigen Tropfen Salzsäure und 2—3 Tropfen einer ganz verdünnten Eisenchloridlösung erhitzt färbt sich die Mischung noch vor dem Sieden intensiv violett.

4. Mit p-Dimethylaminobenzaldehyd und Salzsäure Rotfärbung (Herter), nach Salkowski<sup>1)</sup> erst nach Zusatz von Nitrit.

223. **Indol-Pr-3-Propionsäure**\*)  $C_{11}H_{11}NO_2$  wurde von Nencki<sup>2)</sup> unter den Vorkommen. Produkten der Zersetzung von Serumeiweiß durch anaerobe Spaltpilze gefunden, am reichlichsten trat sie nach 3—4wöchiger Zersetzung von Eiweiß durch Rauschbrandbacillen auf. Salkowski<sup>3)</sup> beobachtete ihr Auftreten auch bei gewöhnlicher Eiweißfäulnis. Ihre Konstitution wurde von Ellinger<sup>4)</sup> erkannt.



Synthetisch wurde sie durch Kochen des Hydrazons der  $\gamma$ -Aldehydbuttersäure mit alkoholischer Schwefelsäure und Verseifen des erhaltenen Esters mit alkoholischem Kali gewonnen (Ellinger). Darstellung.

Zu ihrer Isolierung aus der Eiweißfäulnis werden die Massen mit Oxal- Isolierung aus Fäulnis- säure versetzt und destilliert, der Destillationsrückstand noch heiß filtriert und eingedampft. Nach Abtrennung der ausgeschiedenen Oxalsäure usw. wird mit Äther extrahiert und der Rückstand der Ätherauszüge mit überhitztem Wasserdampf destilliert, wobei Fettsäuren und Phenylpropionsäure übergehen, während Hydro-p-cumarsäure und Indolpropionsäure zurückbleiben. Die letztere ist in Wasser weniger löslich als Hydro-p-cumarsäure und kann durch Umkrystallisieren von dieser getrennt werden (s. auch § 229). gemischen.

Sie krystallisiert in Prismen und unregelmäßig gezackten, 6seitigen Tafeln, Eigenschaften. ist in kaltem Wasser wenig löslich (nach Salkowski<sup>5)</sup> weniger als die Indol-essigsäure), leichter in heißem; in Alkohol und Äther, ebenso in verdünnter Essigsäure ist sie leicht löslich. Fp. 134°. Aus schwefelsaurer Lösung wird sie durch Mercurisulfat gefällt. Versetzt man eine Lösung mit konzentrierter Kaliumnitritlösung und säuert dann mit Essigsäure an, so bildet sich alsbald ein gelbes Krystallmagma der Nitrosoverbindung  $C_{11}H_{10}(NO)NO_2$ , welche bei 135° unter Zersetzung schmilzt. Eine gesättigte Lösung gibt mit p-Dimethylaminobenzaldehyd und Salzsäure leichte Rosafärbung, die sich auf Nitritzusatz verstärkt, aber sehr vergänglich ist (Salkowski).

\*) Früher als Skatolessigsäure bezeichnet.

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 97, S. 125. 1919.

<sup>2)</sup> Monatshefte f. Chem. Bd. 10, S. 506. 1889.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 27, S. 302. 1899.

<sup>4)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 38, 3, S. 2884. 1905.

<sup>5)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 97, S. 127. 1919.

Nachweis. Zum Nachweis dienen die letztgenannten Reaktionen. Ferner gibt die wässrige Lösung mit Eisenchlorid eine weißliche Trübung, die beim Erwärmen ziegelrot, in konzentrierten Lösungen feuerrot bis kirschrot wird.

Vorkommen. 224. **Thyroxin (Trihydro-trijod-oxy- $\beta$ -Indolpropionsäure)**  $C_{11}H_{10}NO_3J_3$  wurde von Kendall<sup>1)</sup> aus der Thyreoidea gewonnen nach einem sehr komplizierten Verfahren, das im Original einzusehen ist.

Eigenschaften. Geschmack- und geruchlose nadelförmige Krystalle (die Enolform viel kürzer als die Ketoform und in Rosetten). Schmelzpunkt etwa 250° (Ketoform) und 204° (Enolform). Unlöslich in Wasser und wässrigen Lösungen aller Säuren, leicht löslich in Alkalien und Ammoniak unter Bildung zweibasischer Salze (mittels Carboxyl- und Hydroxylgruppe), unlöslich in allen neutralen organischen Lösungsmitteln, auch in Pyridin (in dem sich aber die Enolform löst), löslich in Alkohol bei Gegenwart von Mineralsäuren oder Alkali. Beim Einleiten von Kohlensäure in eine Lösung in Alkali scheiden sich Monoalkalisalze ab, welche abfiltriert und gewaschen, völlig zerfallen und in die freie Säure übergehen. Mit Silber, Barium, Calcium, Magnesium, Nickel, Zink, Kupfer bildet sie zweibasische Salze, welche krystallisieren, aber schon beim Waschen mit Wasser zum Teil hydrolytisch zerfallen. Dimethylester, löslich in Alkohol, unlöslich in Wasser, aus dem beim Erhitzen mit verdünnter alkoholischer Natronlauge der Monomethylester wird. Sie bildet auch Salze mit Mineralsäuren (mittels der Iminogruppe). Sulfat, sehr wenig löslich in Wasser, ebenso Chlorid, welches hydrolytisch zerfällt. Acetylderivat und Ureid (mittels der Aminogruppe), leicht löslich in Alkohol, Äther, verdünntem Ammoniak.

Bei der Hydrolyse der sauren Alkalisalze mit kaltem Wasser entsteht die Enolform, bei der Hydrolyse des Ammonsalzes bei 100° die Ketoform. Die Ketoform ist die beständigere. Sie entsteht aus der Enolform besonders durch Wasser und Säure.

Außer der Keto- und der Enolform soll noch die Form mit geöffnetem Pyrrolring, von der sich das Acetylderivat, welches zweibasische Salze bildet, ableitet und die sich in der Drüse findet, existieren und die mit dieser tautomere Aminohydratform, in der die Elemente des Wassers am Stickstoff hängen. Ein Beweis für die Richtigkeit der Formeln ist noch nicht erbracht.

Umwandlungen. Gegen Oxydations- und Reduktionsmittel ist Thyroxin ziemlich widerstandsfähig. In schwach alkalischer Lösung bei Sonnenlicht findet Zersetzung statt unter Rosa-, dann Gelbfärbung und Bildung von unterjodiger Säure.

Beim Schmelzen mit Kali gibt Thyroxin die Fichtenspanreaktion. Viele weitere Angaben s. im Original.

Vorkommen. 225. **Tryptophan (Indol-Pr-3- $\alpha$ -Aminopropionsäure)**  $C_{11}H_{12}N_2O_2$ . Dieser Körper, welcher die schon von Gmelin beobachtete Violettfärbung einer tryptischen Verdauungsflüssigkeit durch Chlor oder Brom bewirkt (daher auch Proteinochromogen genannt), tritt bei der hydrolytischen Spaltung der Proteine (durch Säuren, wobei er allerdings zum größten Teil wieder zerstört wird, Barytwasser, Fermente, besonders Trypsin, Bakterien) auf. Es wurde von Stadelmann<sup>2)</sup>, Nencki<sup>3)</sup>, Beitler<sup>4)</sup>, Kurajeff<sup>5)</sup> u. a. untersucht, aber erst von Hopkins und Cole<sup>6)</sup> in krystallisiertem Zustand erhalten und analysiert. Seine Konstitution ist durch Ellinger<sup>7)</sup> festgestellt worden. Es findet sich

<sup>1)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 39, S. 125. 1919. — Kendall u. Osterberg: desgl. Bd. 40, S. 265. 1919.

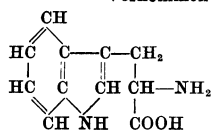
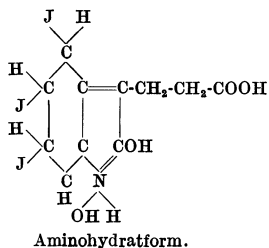
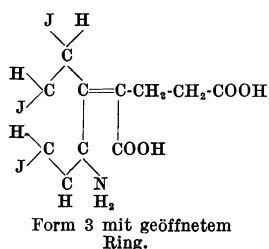
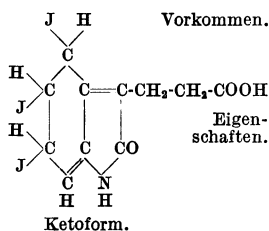
<sup>2)</sup> Zeitschr. f. Biol. Bd. 26, S. 491. 1890.

<sup>3)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 28, 1, S. 560. 1895. <sup>4)</sup> desgl. Bd. 31, 2, S. 1604. 1898.

<sup>5)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 26, S. 501. 1898/99.

<sup>6)</sup> Journ. of physiol. Bd. 27, S. 418. 1902 u. Bd. 29, S. 451. 1903.

<sup>7)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 37, 2, S. 1801. 1904; Bd. 38, 3, S. 2884. 1905 u. Bd. 40, 3, S. 3029. 1907.



in Ochsen- und Pferdemilz (Demianowski<sup>1</sup>) und ist auch im Käse (Winterstein<sup>2</sup>), im Fischfleisch (Suzuki<sup>3</sup>), in Keimpflanzen (E. Schulze und Winterstein<sup>4</sup>), im Saft von Rübenschößlingen (v. Lipmann<sup>5</sup>) nachgewiesen. Es entsteht bei der Hydrolyse des Bienengiftes mit Salzsäure (Flury<sup>6</sup>).

Die Synthese (von  $\beta$ -Indolaldehyd aus) ist von Ellinger und Flaman<sup>7</sup>) Darstellung. ausgeführt worden. Das synthetische ist d,l-Tryptophan, das natürlich vorkommende l-Tryptophan. Aus protahierter Trypsinverdauung des Casein erhielten Fränkel und Feldsberg<sup>8</sup>) d-Tryptophananhydrid. Durch 12stündiges Erhitzen mit 25 proz. Salzsäure bei 170° wird das aktive racemisiert (Neuberg<sup>9</sup>). Die Racemisierung erfolgt sehr leicht, schon beim Umkrystallisieren aus heißem Pyridin (Abderhalden und Baumann<sup>10</sup>). Ellinger und Matsuo<sup>11</sup>) gelang die Racemisation auf diese Weise nicht.

Zu seiner Darstellung\*) wird 1 kg Casein in 10 l 0,8 proz. Sodalösung bei Gegenwart von kräftig wirkendem Trypsin und einem Desinfektionsmittel tagelang (5—11 Tage) verdaut, bis die Tryptophanreaktion (Rotviolett färbung auf Bromwasserzusatz) ihr Maximum erreicht hat, die Lösung auf 80° erwärmt, mit reichlicher Menge reiner Infusorienerde durchgerührt und nach dem Erkalten filtriert. Zu dem Filtrat fügt man Schwefelsäure bis zu einem Gehalt von 5 bis 6 Vol.-%, und dann unter starkem Umrühren von einer Lösung, welche 5 Vol.-% Schwefelsäure und 10% Mercurisulfat enthält, zunächst bis zur beginnenden Trübung und dann noch für je 1 l etwa 25 ccm. Nach 12 Stunden wird der Niederschlag abgesaugt, der scharf abgesaugte Rückstand mit 5 proz. Schwefelsäure ausgewaschen, dann in Wasser suspendiert und mit Schwefelwasserstoff unter öfterer Erwärmung und Schütteln völlig zerlegt. Das Filtrat\*\*) wird durch einen kräftigen Kohlensäurestrom vom Schwefelwasserstoff befreit, wieder mit 5 Vol.-% Schwefelsäure versetzt und nun mit soviel Mercurisulfat, daß sich gerade ein zusammenhängender Niederschlag bildet. Nachdem dieser, welcher im wesentlichen Cystin enthält, nach 1/2 Stunde abgesaugt ist, wird das Filtrat mit Mercurisulfat völlig ausgefällt. Man saugt den Niederschlag ab, wäscht mit 5 proz. Schwefelsäure so lange, als das Filtrat noch mit Millons Reagens Rotfärbung gibt, und Wasser, und zerlegt ihn wie das erstemal mit Schwefelwasserstoff. Das Filtrat von Schwefelquecksilber wird nach Entfernung des Schwefelwasserstoffs durch Durchleiten von Kohlensäure mittels Barytwasser quantitativ von der Schwefelsäure befreit, filtriert und die schwefelsäure- und bariumfreie Flüssigkeit nach Zusatz von wenig Alkohol, um das Schäumen zu vermeiden, bei etwa 14 mm Druck und einer Temperatur des Wasserbades nicht über 40° soweit eingedampft, bis sich eine reichliche Menge Tryptophan ausgeschieden hat. Es wird abfiltriert und zusammen mit dem aus der eingeengten Mutterlauge gewonnenen aus 45 proz. und dann aus 75 proz. Alkohol unter Zusatz von Tierkohle umkrystallisiert. Ausbeute 5—10 g.

\*) Nach Hopkins und Cole unter Berücksichtigung einiger von Abderhalden und Kempe<sup>12</sup>) empfohlenen Abänderungen.

\*\*) Über eine Vereinfachung s. § 487.

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 132, S. 109. 1924. <sup>2</sup>) desgl. Bd. 41, S. 485. 1904.

<sup>3</sup>) Chem. Zentralbl. 1913, I, S. 1042.

<sup>4</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 45, S. 56. 1905.

<sup>5</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 49, I, S. 106. 1916.

<sup>6</sup>) Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 85, S. 319. 1920.

<sup>7</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 40, 3, S. 3029. 1907 u. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 55, S. 8. 1908.

<sup>8</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 120, S. 218. 1921.

<sup>9</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 6, S. 276. 1907.

<sup>10</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 55, S. 412. 1900. <sup>11</sup>) desgl. Bd. 91, S. 47. 1914.

<sup>12</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 52, S. 207. 1907.

Neuberg<sup>1)</sup> empfiehlt, das Filtrat von der zweiten Quecksilberfällung, statt es mit Barytwasser zu behandeln, mit 100 g Bleicarbonat, statt dessen besser gewaschenes Bleihydroxyd (v. Fürth und Lieben<sup>2)</sup>, zu versetzen, mit Ammoniak alkalisch zu machen,  $\frac{1}{2}$  Stunde zu erhitzen, heiß zu filtrieren, mit Schwefelwasserstoff zu behandeln, wieder zu filtrieren und zur Krystallisation einzuengen. Dabei findet Racemisierung statt (Allers<sup>3)</sup>, Neuberg<sup>4)</sup>.

Darstellung aus  
anderen Proteinen.

Benutzt man als Ausgangsmaterial nicht Casein, sondern Fibrin, Serumeiweiß oder Eieralbumin, so empfiehlt es sich nach Hopkins und Cole die in diesen Fällen reichlich vorhandenen Albumosen vor der ersten Fällung mit Mercurisulfat dadurch zu entfernen, daß man die filtrierte Flüssigkeit mit Schwefelsäure schwach ansäuert, mit Ammonsulfat sättigt, filtriert und mit Wasser verdünnt. Das weitere Verfahren ist das beschriebene.

Über quantitative Bestimmung in der Hydrolysenflüssigkeit der Proteine s. § 496 und 497.

Eigenschaften.

Tryptophan krystallisiert in seideglänzenden rhombischen und 6seitigen Blättchen, das racemische hat schwach süßlichen, das aktive fast keinen Geschmack. Es löst sich wenig in kaltem, leicht in heißem Wasser, wenig in absolutem Alkohol, auch in heißem wenig, wenig in kaltem, leicht in heißem Pyridin. Die Angaben über den Schmelzpunkt lauten etwas verschieden, was jedenfalls durch schnelleres oder langsames Erhitzen bedingt ist. Das synthetische d,l-Tryptophan beginnt nach Ellinger und Flamaud<sup>5)</sup> bei langsamem Erhitzen bei 240° sich zu färben, während sich in den oberen Teilen der Capillare ein braunes Destillationsprodukt niederschlägt. Bei 256° werden feine Tröpfchen sichtbar, bei 264° ist die Substanz geschmolzen. Dasselbe Verhalten beobachteten sie bei einem l-Tryptophan, und fast ganz dasselbe Allers<sup>6)</sup> bei einem racemisierten und H. Fischer<sup>7)</sup> bei einem aktiven. Für l-Tryptophan geben Hopkins und Cole an bei 220° Farbenänderung, bei 240° Braunfärbung und bei 252° völliges Schmelzen der schon vorher erweichten Substanz, Abderhalden und Kempe<sup>8)</sup> bei raschem Erhitzen leichte Gelbfärbung von 260° (korr.) an und Schmelzen gegen 289° (korr.). Unter bestimmten Verhältnissen wird es durch Silbernitrat und Alkali gefällt (Neuberg). 1 Mol. bindet 8 Atome Brom (Siegfried und Reppin<sup>9)</sup>, Homer<sup>10)</sup>. Ninhydrinreaktion (S. 219), Reaktion nach v. Slyke (S. 224).

Verbindungen:

- mit Salzsäure Fügt man zu einer wässerigen Lösung Salzsäure und dampft im Vakuum ein, so krystallisiert das salzsaure Salz  $C_{11}H_{12}N_2O_2 \cdot HCl$  (Fp. 251° unter Zersetzung).
- mit Pikrinsäure l-Tryptophanpikrat, carminrote Nadelbüschel und Tafeln (Fp. 195—196°), löst sich bei Zimmertemperatur 0,91:100, in Äther 1:100, in Alkohol leicht.
- mit Pikrolonsäure l-Tryptophanpikrolonat (S. 221), orangerote Nadelbüschel (Fp. 203—204° unter Gasentwicklung), lösen sich bei Zimmertemperatur 0,384:100, in Alkohol leicht, in Äther weniger (Mayeda<sup>11)</sup>).
- mit Kupfer l-Tryptophankupfer (S. 220), nichtkrystallisiert, in den gewöhnlichen Lösungsmitteln und verdünnten Mineralsäuren schwer löslich.
- mit Methylalkohol l-Tryptophanmethylester, Fp. 89,5° (korr.), leicht löslich in Methylalkohol, schwerer in Äther und Essigester.

<sup>1)</sup> Neuberg u. Popowsky: Biochem. Zeitschr. Bd. 2, S. 357. 1907.

<sup>2)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 109, S. 163. 1920. <sup>3)</sup> desgl. Bd. 6, S. 272. 1907.

<sup>4)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 6, S. 276. 1907.

<sup>5)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 55, S. 8. 1908.

<sup>6)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 6, S. 272. 1907.

<sup>7)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 55, S. 74. 1908. <sup>8)</sup> desgl. Bd. 52, S. 207. 1907.

<sup>9)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 95, S. 23. 1915.

<sup>10)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 22, S. 374. 1915.

<sup>11)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 51, S. 261. 1907.



l- $\beta$ -Naphthalinsulfotryptophannatrium (S. 222) scheidet sich während des Schüttelns krystallinisch ab und schmilzt, aus heißem Wasser umkrystallisiert, bei 304° (korr.). Diese Verbindung ist vermutlich zur Isolierung sehr geeignet (Abderhalden und Kempe). Die freie Säure (und zwar aus l- wie aus d,l-Tryptophan) schmilzt bei 180° (Ellinger und Flamaud).

mit  $\beta$ -Naphthalin-sulfosäure

l- und d,l-Benzolsulfotryptophan krystallisiert aus verdünntem Alkohol in Nadeln (Schmelzpunkt unter Zersetzung 185°). Zur Erkennung sehr kleiner Mengen geeignete Verbindung (Ellinger und Flamaud).

mit Benzolsulfosäure

l-Phenylisocyanattryptophan (S. 223), Fp. 166° (korr.), leicht löslich in Alkohol, Essigester, Aceton, schwer in kaltem Wasser, sehr lichtempfindlich.

mit Phenylisocyanat

l- $\alpha$ -Naphthylisocyanattryptophan (S. 223), lichtempfindliche Nadeln (Fp. 159°). Ebenfalls zum Nachweis kleiner Tryptophanmengen geeignet (Neuberg und Rosenberg<sup>1</sup>), Ellinger und Flamaud).

mit  $\alpha$ -Naphthylisocyanat

Tryptophancarbonsaures Calcium (S. 224).

mit Kohlensäure

Auf Zusatz von Brom- oder Chlorwasser zu einer Tryptophanlösung bildet sich zuerst je nach Konzentration eine rote Lösung oder roter Niederschlag, die bei weiterem Zusatz von Halogenwasser in Gelb übergehen. Der gelbe Körper kann, solange er noch feucht ist, durch Tryptophanlösung wieder in den roten zurückverwandelt werden. Der rote Körper ist ein Monohalogen substituierendes Produkt  $C_{11}H_{11}N_2O_2Cl$ , der gelbe enthält 3 Halogenatome. Auch Jod vermag in das Tryptophan einzutreten (Neuberg und Popowsky<sup>2</sup>), Neuberg).

mit Brom und Chlor.

Abderhalden und Kempe und Abderhalden und Baumann fanden für 10—11proz. Lösungen in n-Natronlauge  $[\alpha]_D^{20} = +6,06$ — $6,57^\circ$ , für 2 bis 3proz. Lösungen in  $n/2$ -Natronlauge  $[\alpha]_D^{20} = +5,7$ — $6,3^\circ$ . Die etwas niedrigeren, von H. Fischer gefundenen Werte (für 2—63proz. Lösungen in n-Natronlauge)  $[\alpha]_D = +5,56$ — $5,69^\circ$  erklären sich wohl durch eine geringe Racemisierung.

Optische Eigenschaften.

Wässrige Lösungen zeigen Linksdrehung, doch schwankten die Werte für  $[\alpha]_D$  bei verschiedenen Präparaten, die in n-NaOH die gleiche spezifische Drehung zeigten, in 0,5proz. wässriger Lösung zwischen  $-29,75$  und  $-40,3^\circ$  (H. Fischer).

Das Chlorid zeigte in etwa 3proz. Lösung  $[\alpha]_D = -13,44$  und  $-13,58^\circ$ . Beim Übersäuern mit Salzsäure trat Rechtsdrehung ein (H. Fischer).

Beim Erhitzen entsteht Kohlensäure und weiter Skatol und Indol. Beim Kochen mit Wasser wird wenig Indol, beim Kochen mit 0,5proz. Sodalösung und etwas Kupfersulfat mehr, beim Kochen mit 9proz. Natronlauge und etwas Kupfersulfat viel Indol gebildet (Herzfeld<sup>3</sup>). Wieweit Tryptophan gegen Kochen mit Barytwasser widerstandsfähig ist, steht noch nicht fest (siehe darüber Herzfeld<sup>4</sup>), Homer<sup>5</sup>), Onslow<sup>6</sup>). Bei Gegenwart von Aminosäuren ist es gegen Barytwasser widerstandsfähig (Onslow). Beim Schmelzen mit Ätzkali entsteht Skatol (bis zu 65% der berechneten Menge), Ammoniak und Oxalsäure (Hopkins und Cole), bei der Oxydation mit Eisenchlorid  $\beta$ -Indolaldehyd (Hopkins und Cole, Ellinger<sup>7</sup>), beim Erwärmen mit 60proz. Salpetersäure entstehen Oxalsäure und Pikrinsäure (C. Th. Mörner<sup>8</sup>).

Umwandlungen.

Durch Hefe bei Gegenwart von Zucker und anorganischen Salzen entsteht aus l-Tryptophan  $\beta$ -Indoläthylalkohol (Tryptophol) (F. Ehrlich<sup>9</sup>), durch *Oidium lactis* l-Indolmilchsäure (Ehrlich und Jacobsen<sup>10</sup>), durch *Bac. subl.*

<sup>1</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 5, S. 456. 1907.      <sup>2</sup>) desgl. Bd. 2, S. 357. 1907.

<sup>3</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 56, S. 82. 1913.      <sup>4</sup>) desgl. Bd. 56, S. 88. 1913.

<sup>5</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 22, S. 385. 1915.

<sup>6</sup>) Biochem. Journ. Bd. 15, S. 383. 1921.

<sup>7</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 39, 3, S. 2515. 1906.

<sup>8</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 95, S. 263. 1915.

<sup>9</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 45, 1, S. 883. 1912 u. Biochem. Zeitschr. Bd. 79, S. 232. 1917.

<sup>10</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 44, 1, S. 888. 1911.

Anthranilsäure (Sasaki<sup>1</sup>). Durch anaerobe Bakterien entsteht aus Tryptophan Indol-Pr-3-Propionsäure, durch aerobe Indol-Pr-3-Essigsäure, Skatol und Indol (Hopkins und Cole, s. auch Ellinger und Gentzen<sup>2</sup>). Auch Indoläthylamin (Berthelot und Bertrand<sup>3</sup>) und l-Indolmilchsäure (Sasaki und Otsuka<sup>4</sup>) entstehen durch Bakterien aus l-Tryptophan. Tyrosinase (aus *Russula delica*) ruft in Tryptophanlösungen leichte Färbung hervor (Abderhalden und Guggenheim<sup>5</sup>), ebenso Sepiatyrosinase (Neuberg<sup>6</sup>). Hunde und Kaninchen führen Tryptophan in Kynurensäure über (Ellinger<sup>7</sup>).

Nachweis. Tryptophan gibt folgende Reaktionen:

1. Seine Lösung färbt sich auf vorsichtigen Zusatz von Brom- oder Chlorwasser rotviolett. Ist die Lösung trübe oder gefärbt, so kann man nach Ansäuern mit Essigsäure mit Essigäther das Halogenprodukt ausziehen: Himbeerfarbe des Essigäthers (Neuberg<sup>8</sup>). Diese Reaktion zeigt, soweit bekannt, nur das freie Tryptophan, nicht auch das im Eiweiß enthaltene wie die Reaktion nach Hopkins.

2. Nach Hopkins. Man fügt zu einer Lösung ganz verdünnte Glyoxylsäurelösung und konzentrierte Schwefelsäure: Blauviolett färbung. Noch bei einer Verdünnung von 1 : 200 000 Tl. positiv.

3. Nach Edlbacher<sup>9</sup>). Schüttelt man eine Lösung mit Dimethylsulfat und Natronlauge und unterschichtet mit konzentrierter Schwefelsäure, so entsteht an der Berührungsstelle blaurote Zone, beim Schütteln nimmt die ganze Flüssigkeit die Farbe an. Indol und Skatol geben nur Rotfärbung.

4. Nach Ehrlich<sup>10</sup>). Eine Lösung färbt sich rot auf Zusatz von etwas p-Dimethylaminobenzaldehydlösung und starker Salzsäure (Rohde<sup>11</sup>).

5. Auf Zusatz von etwas alkoholischer Lösung von Benzaldehyd und ferrisulfathaltiger Schwefelsäure zu Tryptophanlösung tritt Blaufärbung (Cole<sup>12</sup>) auf Zusatz von etwas Formaldehydlösung und ferrisulfathaltiger konzentrierter Schwefelsäure violettblaue Färbung ein (Dakin<sup>13</sup>). Über eine Reaktion mit Salicylaldehyd, die auch zur Unterscheidung von Indol und Skatol dienen kann, s. Fearon<sup>14</sup>).

6. Eine Tryptophanlösung färbt sich beim Kochen mit Salpetersäure gelb, beim Kochen mit Millons Reagens braunrot (Abderhalden und Kempe).

7. Es gibt die Reaktion von Folin-Denis auf Phenol (S. 282), wenn auch nicht in ganz typischer Weise, zunächst grünblau, dann mehr und mehr rein blau (Abderhalden und Fuchs<sup>15</sup>).

8. Taucht man ein in starke Salzsäure eingetauchtes und mit Wasser abgspültes Streichholz in eine starke wässrige Lösung der Substanz, so nimmt es nach dem Trocknen eine tiefe Purpurfarbe an.

Colorimetrische Bestimmungen zur Bestimmung des Tryptophan im Eiweiß sind von verschiedenen Seiten angegeben worden, so von Faisal<sup>16</sup>),

<sup>1</sup>) Journ. of biochem. Bd. 2, S. 251; ref. Chem. Zentralbl. 1924, I, S. 1215.

<sup>2</sup>) Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 4, S. 171. 1904.

<sup>3</sup>) Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 154, S. 1826. 1912.

<sup>4</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 121, S. 167. 1921.

<sup>5</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 54, S. 331. 1907/08.

<sup>6</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 8, S. 383. 1908.

<sup>7</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 43, S. 325. 1904/05.

<sup>8</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 24, S. 441. 1910.

<sup>9</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 105, S. 240. 1919.

<sup>10</sup>) Med. Woche 1901, Aprilheft.

<sup>11</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 44, S. 161. 1905.

<sup>12</sup>) Journ. of physiol. Bd. 30, S. 317. 1903/04.

<sup>13</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 2, S. 289. 1907.

<sup>14</sup>) Biochem. Journ. Bd. 14, S. 548; ref. Chem. Zentralbl. 1921, II, S. 6.

<sup>15</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 83, S. 468. 1913.

<sup>16</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 44, S. 392. 1912.

Herzfeld<sup>1)</sup>, Fürth und Nobel<sup>2)</sup>, Fürth und Lieben<sup>3)</sup>, Folin und Looney<sup>4)</sup>, Komm und Böhringer<sup>5)</sup>. Die Ergebnisse der einzelnen Verfahren weichen oft weit voneinander ab; vgl. die Tabellen bei Fürth und Lieben, Folin und Looney. Siehe § 496 u. 497.

226. **Oxytryptophan**  $C_{11}H_{12}N_2O_3$  wurde in einigen Fällen bei der Verarbeitung der Casein-Verdauung auf Tryptophan (§ 225), und zwar dann, wenn die Verdauung sehr lange gewährt hatte, die Verarbeitung langsam erfolgte und die Ausbeute an Tryptophan nur gering war, von Abderhalden und Kempe<sup>6)</sup> isoliert. Es schied sich bei der Krystallisation als erste in Nadeln krystallisierende schwach gelblich gefärbte Fraktion ab, während das in farblosen Blättchen krystallisierende Tryptophan in den späteren Fraktionen enthalten war.

Es ist in Wasser noch schwerer löslich als Tryptophan. Es beginnt bei 276° (korr.) sich gelb zu färben und schmilzt bei 293° (korr.). Beim Erhitzen starker Indolgeruch. Hopkins Reaktion (S. 316) nur bei sehr vorsichtigem Zusatz der Schwefelsäure positiv. Kocht man mit konzentrierter Salzsäure, dampft ein und erhitzt den Rückstand, so tritt kein Indol-, sondern ein Chinolingeruch auf. Mit dem Reagens von Folin und Denis (S. 282) färbt es sich zunächst grünblau, bald tiefblau (Abderhalden und Fuchs<sup>7)</sup>). Seine Lösung färbt sich mit Tyrosinase rasch intensiv rot und allmählich braunrot (Abderhalden und Guggenheim<sup>8)</sup>). Mit Bromwasser gibt es keine Färbung. Es zeigt in n-Natronlauge Linksdrehung,  $[\alpha]_D^{20} = -11,2^\circ$  (Abderhalden und Baumann<sup>9)</sup>).

227. **Indigblau (Indigotin)**  $C_{16}H_{10}N_2O_2$  entsteht im Harn auf Zusatz des gleichen Volumens einer etwas Chlor oder Eisenchlorid enthaltenden Salzsäure, indem hierdurch die im Harn vorhandene Indoxylschwefelsäure (und Indoxylglucuronsäure) gespalten und das Indoxyl zugleich zu Indigblau oxydiert wird. (Daneben entsteht etwas Indigrot, § 228.) Seine Bildung erfolgt auch nicht selten auf Zusatz starker Mineralsäuren zum Harn, besonders Pferdeharn. Es findet sich, aus derselben Quelle stammend, auch hier und da an der Oberfläche von faulendem Harn abgeschieden als kupferrot metallisch glänzendes, dünnes Häutchen.

Es entsteht durch Einwirkung von indifferentem Sauerstoff auf Indigweiß  $C_{16}H_{12}N_2O_2$ , von Ozon auf Indol in geringer Menge, von reduzierenden Stoffen auf Isatin, Aminooxidol usw. Es bildet sich beim Kochen von o-Nitrophenylpropionsäure in alkalischer Lösung (verdünnte Natronlauge, Barytwasser oder Sodalösung) mit Trauben- oder Milchzucker (Baeyer<sup>10)</sup>), durch Kondensation von o-Nitrobenzaldehyd mit Aceton in alkalischer Lösung (Baeyer und Drewsen<sup>11)</sup>), durch Schmelzen von Phenylglykokoll oder Phenylglykokoll-o-carbonsäure mit Alkali und Oxydation der wässrigen Lösung an der Luft (Heumann<sup>12)</sup>). Auf dieser letzteren Reaktion beruht die synthetische Darstellung im Großbetriebe.

Indigblau bildet ein dunkelblaues Pulver, es ist unlöslich in Wasser, Alkohol, Äther, verdünnten Säuren und Alkalien, sehr wenig löslich in Chloroform, löslich in heißem Anilin mit blauer Farbe, in geschmolzenem Paraffin mit purpurroter Farbe. Aus beiden Lösungsmitteln kann es krystallisiert erhalten werden; aus heißem Terpentinöl krystallisiert es in schönen, blauen Tafeln. Gegen 300° verflüchtigt es sich, bildet schön purpurrot gefärbten Dampf und schlägt sich an kühleren Stellen in prismatischen Krystallen wieder nieder, die kupferroten Metallglanz zeigen und im durchfallenden Lichte tiefblau erscheinen. Beim Sublimieren zersetzt sich ein Teil des Indigblaus zu Kohle, Kohlensäure und Anilin, ein Teil geht in Indirubin (§ 228) über. Mischt man feinpulveriges Indigblau mit Eisenvitriol, überschüssigem gelöschten Kalk und ausgekochtem Wasser in einer ganz damit gefüllten Flasche und läßt stehen, so geht es in

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 56, S. 258. 1913.

<sup>2)</sup> desgl. Bd. 109, S. 103. 1920.

<sup>3)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 109, S. 124. 1920.

<sup>4)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 51, S. 421. 1922.

<sup>5)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 124, S. 287. 1923.

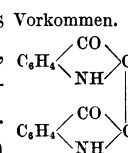
<sup>6)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 52, S. 212. 1907. <sup>7)</sup> desgl. Bd. 83, S. 468. 1913.

<sup>8)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 54, S. 352. 1907/08.

<sup>9)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 55, S. 415. 1908.

<sup>10)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 11, 1, S. 1228 u. 2, 1296. 1878; Bd. 12, 1, S. 456. 1879; Bd. 13, 2, S. 2258. 1880; Bd. 14, 2, S. 1741. 1881. — Sommaruga: desgl. Bd. 11, 2, S. 1355. 1878.

<sup>11)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 16, 2, S. 2205. 1883. <sup>12)</sup> desgl. Bd. 23, 2, S. 3043. 1890.



Darstellung.

Eigenschaften.

Indigweiß über, läßt man dann die mit Heber klar abgezogene Lösung ruhig an der Luft stehen, so scheidet sich Indigblau wieder ab. Auch in einer Mischung von Indigblau mit heißem Alkohol, sehr starker Natronlauge und etwas Traubenzucker, welche eine verschlossene Flasche ganz füllt, entsteht Indigweiß. Beim Stehen dieser Mischung an der Luft scheidet sich Indigblau in Krystallen aus.

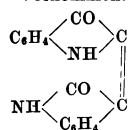
Indigblausulfosäuren.

Unter den Substitutionsprodukten des Indigblaus sind von besonderer Wichtigkeit die Indigblaudisulfosäure  $C_{16}H_8N_2O_2(SO_3H)_2$  und -monosulfosäure (Phönicinschwefelsäure)  $C_{16}H_9N_2O_2(SO_3H)$ , welche beide durch Erwärmen von pulverigem Indigblau mit konzentrierter Schwefelsäure und Eintragung der Lösung in Wasser dargestellt werden. Die Phönicinschwefelsäure scheidet sich aus der sauren Lösung in Flocken aus, löst sich aber in destilliertem Wasser, wenn auch schwerer als die Disulfosäure. Die Lösungen dieser Sulfosäuren geben ihren Farbstoff an eingelegte Wollfäden ab. Beim Erhitzen mit Salpetersäure werden sie entfärbt. Beim Kochen mit Natriumcarbonat und Traubenzucker verschwindet gleichfalls die blaue Farbe (Bildung von Indigweißsulfosäure), um beim Schütteln mit Luft wieder zu erscheinen. Die Lösungen beider Säuren und ihrer Alkaliverbindungen absorbieren sehr kräftig das Licht zwischen den Fraunhoferschen Linien C und D nahe vor letzterer Linie; bei hinreichender Dicke der Schicht greift der Absorptionsstreifen über D nach dem Gelbgrün hinüber.

Nachweis.

Zum Nachweis von Indigblau sammelt man den zu prüfenden Farbstoff auf einem in die Trichterenge dicht eingesetzten Asbestpfropf, wäscht mit Wasser, dann mit Alkohol (Lösung des fast stets zugleich vorhandenen Indirubins), trocknet und benutzt Teile dieses Pfropfes zu den Reaktionen. Als solche eignen sich besonders die Sublimierbarkeit und Bildung purpurroter Dämpfe beim starken Erhitzen im trockenen Probierrohr, Mikrosublimation nach Kempf<sup>1)</sup>, das beschriebene Verhalten gegen stark alkalische Traubenzuckerlösung, Wiederblaufärbung der Mischung beim Schütteln mit Luft, Löslichkeit des Indigblaus beim Erwärmen mit konzentrierter Schwefelsäure und das geschilderte Verhalten der wässerigen Lösung der gebildeten Sulfosäuren.

Vorkommen.



228. **Indirubin (Indigrot, Indigpurpurin)**  $C_{16}H_{10}N_2O_2$ . Dieser mit dem Indigblau isomere Farbstoff entsteht neben Indigblau bei der Zersetzung von Indoxylschwefelsäure (und Indoxylglucuronsäure) im Harn durch Salzsäure und mäßiger Oxydation, besonders bei gleichzeitiger Erwärmung, und ist in reinem Zustande zuerst von Rosin<sup>2)</sup> aus Harn erhalten worden. Gelegentlich kommt es in faulendem Harn auch in freiem Zustande vor, auch in einem Fall von Nephritis fand es sich in freiem Zustande im frischen Harn (Gröber<sup>3)</sup>). Es ist identisch mit dem von Schunck<sup>4)</sup> im käuflichen Indigo aufgefundenen roten Farbstoff (Rosin) sowie mit demjenigen, welchen Baeyer<sup>5)</sup> durch Reduktion von Isatinchlorid mit Zinkstaub und durch Einwirkung von Indoxyl auf Isatin in Alkohol bei Zusatz von Natriumcarbonat (Schunck und Marchlewski<sup>6)</sup>, Wahl und Bagard<sup>7)</sup> durch Kondensation von Oxindol mit Isatinchlorid erhielten. Auch aus Isatin entsteht es durch Reduktion, sowie aus Indigblau, das bei der Sublimation zum Teil in Indirubin übergeht.

Darstellung aus Harn.

Aus dem Harn gewinnt man es nach Rosin in folgender Weise: Etwa 300 l von geeignetem Harn (Darmkrankheiten, Pferdeharn) werden portionsweise (zu 5 l) mit basischem Bleiacetat

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. analyt. Chemie Bd. 62, S. 284. 1923.

<sup>2)</sup> Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. Bd. 123, S. 519. 1891.

<sup>3)</sup> Münch. med. Wochenschr. 1904, S. 61.

<sup>4)</sup> Mem. of Manchester phil. soc. (2) Bd. 14, S. 185.

<sup>5)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 12, 1, S. 457. 1879 u. Bd. 14, 2, S. 1745. 1881.

<sup>6)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 28, 1, S. 539 u. 3, S. 2525. 1895.

<sup>7)</sup> Bull. de la soc. chim. de France (4) Bd. 5, S. 1043. 1909; Bd. 7, S. 1090. 1910 und Bd. 9, S. 56. 1911.

vollständig ausgefällt und filtriert. Das Filtrat wird mit Salzsäure versetzt, wieder filtriert, mit soviel Salpetersäure versetzt, daß auf 1 l Flüssigkeit etwa 20 g Salpetersäure kommen, und sofort in großem Kolben bis nahe zum Sieden erhitzt. Wenn die Farbe dunkelkirschrot geworden ist, kühlt man rasch ab und fügt Soda in Substanz bis zur schwach sauren Reaktion hinzu. Die Flüssigkeit trübt sich, der Farbstoff fällt aus und wird durch ein mehrfach zusammengelegtes Filter, welches so groß sein soll, daß sämtliche Harnportionen nacheinander filtriert werden können, abfiltriert. Indigrot, Indigblau und einige andere Farbstoffe bleiben auf dem Filter, das Filtrat ist ganz frei von Indigrot. Der Rückstand wird mit kohlenausem Natron und Wasser gewaschen, getrocknet und darauf mit Chloroform am Rückflußkühler auf dem Wasserbade ausgekocht, bis sich dasselbe nicht mehr schön dunkelpurpurn, sondern blau färbt. Die abfiltrierten und vereinigten Chloroformauszüge werden abdestilliert, und zwar soweit, bis das Indigrot (verbunden mit etwas Indigblau) ausfällt. Jetzt läßt man erkalten, filtriert das ausgefallene Indigrot ab und wäscht mit kaltem Chloroform nach, bis alle braunen Verunreinigungen möglichst entfernt sind und das Filtrat schön purpurfarben abläuft. Der Rückstand, welcher immer noch Indigblau und Spuren von braunen Verunreinigungen enthält, wird so lange mit immer neuen Mengen Äther am Rückflußkühler gekocht, als noch Indigrot in Lösung geht. Die vereinigten Ätherlösungen destilliert man ab, bis sich Krystalle abzuschneiden beginnen, filtriert nach 24 Stunden und krystallisiert noch einmal um. Die Ausbeute beträgt kaum 1 g.

Indirubin krystallisiert in schokoladebraunen, verzweigten Nadeln oder rhombischen Blättchen und sublimiert beim Erhitzen auf 295—310° unter Bildung von violettroten Dämpfen. Es ist unlöslich in Wasser, verdünnter Salz- oder Schwefelsäure, Alkalien, löslich mit kirschroter Farbe in Alkohol, Äther, Benzol, Chloroform, besonders leicht in heißem, Eisessig, und wird aus der essigsäuren Lösung durch Wasser und Natriumcarbonat gefällt. Beim Verdünnen der alkoholischen Lösung mit Wasser scheidet es sich in krystallinischen Flocken aus. Es widersteht der Oxydation kräftiger als Indigblau. Mit Traubenzucker in alkalischer Lösung erwärmt geht es in Indirubinweiß über, mit konzentrierter Schwefelsäure bildet es Indirubinsulfosäure. Bei der spektroskopischen Untersuchung zeigen alkoholische Lösungen des Indirubins einen Streifen im grüngelben Teil des Spektrums. Eigenschaften.

Zum Nachweis von freiem Indirubin im Harn neutralisiert man denselben mit Natriumcarbonat, schüttelt mit Äther aus (dabei bleibt Urorosein ungelöst) und verdunstet den rotgefärbten Äther im Schälchen. Der Rückstand muß sich in Alkohol mit schön roter Farbe lösen, die alkoholische Lösung muß mit etwas Soda und Traubenzucker erwärmt farblos werden und beim Schütteln mit Luft die rote Farbe wieder annehmen (Rosin). Nachweis im Harn.

*Isolierung von Fäulnisprodukten\*) nach E. und H. Salkowski<sup>1)</sup>.  
(Untersuchung eines Fäulnisgemisches.)*

229. Die gefaulten Flüssigkeiten\*\*) werden ohne Filtration destilliert, bis der Rückstand dicklich wird, und nach Zufügen von Wasser zum Rückstande abermals destilliert. Die Untersuchung der vereinigten Destillate geschieht nach A, die des Rückstandes nach B.

A. Untersuchung der Destillate. Sie werden mit Salzsäure angesäuert und mit Äther ausgeschüttelt, und zwar in einzelnen Portionen nacheinander mit einer und derselben Portion Äther. Die mit Äther ausgeschüttelte, wässrige Lösung enthält fast nur Chlorammonium und wird nicht weiter untersucht. Der

\*) Die Basen sind hier nicht berücksichtigt; s. darüber § 165.

\*\*) Um nicht zu kleine Mengen der einzelnen Fäulnisprodukte zu erhalten, ist es nötig, größere Eiweißmengen faulen zu lassen. E. und H. Salkowski verfahren so: 2 kg gut ausgepreßtes Blut-fibrin, 8 l Wasser von 40—42°, welchem 2 g Kaliummonophosphat und 1 g Magnesiumsulfat zugesetzt waren und 200 ccm gesättigte Sodalösung wurden gemischt, einige Kubikzentimeter fauler Fleischflüssigkeit mit darin befindlichen Fleischstückchen hinzugefügt. Der Kolben wurde nun mit einem Kork, durch dessen Bohrung ein mit Gummischlauch versehenes Glasrohr gesteckt ist, verschlossen. Der Gummischlauch tauchte in Wasser. Temperatur etwa 42°. Der Kolben wurde ab und zu geschüttelt. Sobald die Gasentwicklung nachließ, wurde der Gummischlauch durch eine Klemme geschlossen. Die Verarbeitung erfolgte nach 5—6 Tagen.

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 8, S. 417. 1883/84; Bd. 9, S. 8 u. 491. 1885.

Ätherauszug, welcher Indol, Skatol, Phenole und Säuren enthält, wird zur Entfernung von Phenolen und Säuren 2 mal anhaltend mit Natronlauge (a) geschüttelt, die ätherische Lösung verdunstet, der Rückstand mit Natronlauge versetzt und im Dampfstrom destilliert. Dabei bleibt ein Rest von Phenolen und Säuren enthaltender Rückstand (b), während Indol und Skatol in das Destillat übergehen und aus diesem mit Äther ausgeschüttelt werden können (Trennung und Nachweis s. §§ 219 und 220). Die die Phenole und Säuren enthaltenden Flüssigkeiten a und b werden vereinigt, angesäuert, mit Soda alkalisch gemacht und mit Äther geschüttelt, die wässrige Lösung (c) enthält die Säuren, die ätherische, welche die Phenole enthält, wird verdunstet, der Rückstand im Dampfstrom destilliert und das Destillat mit Äther ausgeschüttelt. Beim Verdunsten des Äthers hinterbleiben Kresol und Phenol (Trennung und Nachweis s. § 200).

B. Untersuchung des Rückstandes. Der im Kolben verbliebene Rückstand wird bei durch Soda bewirkter alkalischer Reaktion im Wasserbad eingeeengt, mit dem 3fachen Volumen Alkohol vermischt und nach 24stündigem Stehen filtriert. Der Rückstand besteht aus Eiweißresten, Salzen, Bakterien. Das Filtrat wird mit der Lösung c (s. unter A) vereinigt, bei alkalischer Reaktion eingedampft, der Rückstand in Wasser aufgenommen, mit Schwefelsäure stark übersättigt und wiederholt vorsichtig mit Äther ausgeschüttelt. Die leicht eintretenden Emulsionen müssen durch Zusatz von Alkohol oder Erwärmen beseitigt werden. In der wässrigen Lösung bleiben Peptone, Aminosäuren, ein Teil der basischen Stoffe. Der Rückstand der ätherischen Lösung, der aus Fett, Säuren und basischen Stoffen besteht, wird mit gemessener Menge Natronlauge in der Wärme aufgenommen und die alkalische Lösung ohne Rücksicht auf Trübung durch Fett mit Chlorbarium ausgefällt. Der Niederschlag besteht aus Fett, Barytseifen, Bariumcarbonat. Das klare Filtrat wird eingeeengt, mit Salzsäure im Überschuß versetzt und mit Äther ausgeschüttelt. In der wässrigen Lösung bleiben basische Substanzen, z. B.  $\delta$ -Amino-n-valeriansäure (S. 193), als Salzsäureverbindungen zurück. Der Rückstand der ätherischen Lösung (flüchtige Fettsäuren, Bernsteinsäure, aromatische Säuren) wird im Dampfstrom, welcher vorher durch ein gelinde erhitztes Kupferrohr geht, destilliert und das Destillat direkt in Natronlauge, deren Menge die Quantität der oben zum Alkalisieren gebrauchten Natronlauge etwas übersteigt, eingeleitet. Die Destillation dauert sehr lange (bei der Versuchsausführung, wie sie in der \*\*Anmerkung S. 319 angegeben ist, 24—36 Stunden) und muß solange fortgesetzt werden, bis alle flüchtigen Säuren übergegangen sind. Man erkennt das daran, daß vorgelegtes, schwach alkalisches Wasser während 1stündigen Destillierens nicht sauer wird. Das Destillat (a) enthält die flüchtigen Fettsäuren, Phenyllessigsäure und Phenylpropionsäure, der Rückstand (b) Bernsteinsäure, Indolessigsäure und Oxysäuren.

Die Flüssigkeit a wird auf dem Wasserbade eingedampft, mit Salzsäure stark übersättigt und mit Äther ausgeschüttelt. Der beim Verdunsten des Äthers hinterbleibende Rückstand wird aus einem Siedekölbchen mit eingesetztem Thermometer destilliert und die Vorlage gewechselt, wenn der Siedepunkt auf 260° gestiegen ist. Unterhalb 260° gehen die flüchtigen Fettsäuren (Trennung s. § 80) über, der oberhalb 260° übergehende Anteil besteht aus Phenyllessigsäure und Phenylpropionsäure (Trennung und Nachweis s. § 208). Die im Kolben zurückbleibende Flüssigkeit b trübt sich beim Erkalten unter Abscheidung harziger Substanz und wird nach einigen Stunden filtriert. Aus dem Filtrat scheidet sich während 24stündigen Stehens im Eis-schrank reine Indolessigsäure (Nachweis s. § 222) in weißen, kroidigen

Körnchen ab. Auch etwa vorhandene Indolpropionsäure (Nachweis s. § 223) wird sich an dieser Stelle ausscheiden. Durch Einkochen der Mutterlauge auf die Hälfte ist oft noch eine zweite Abscheidung zu erhalten, ein Teil bleibt indessen stets in Lösung; dieser geht beim Ausschütteln mit Äther zusammen mit den aromatischen Oxysäuren in den Äther über, während Bernsteinsäure (§ 89) zum größten Teil zurückbleibt. (Etwa vom Äther aufgenommene Bernsteinsäure scheidet sich beim Konzentrieren der ätherischen Lösung ab.) Aus der heißen wässerigen Lösung des Ätherrückstandes krystallisiert beim Erkalten Hydro-p-cumarsäure (§ 212) und p-Oxyphenyllessigsäure (§ 211) aus.

Indolessigsäure und  
Indolpropionsäure.

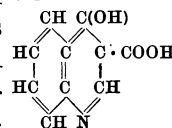
Bernsteinsäure.

Hydro-p-cumarsäure u.  
p-Oxyphenyllessigsäure.

### Chinolinderivat.

230. Kynurensäure ( $\gamma$ -Oxy- $\beta$ -Chinolinecarbonsäure)  $C_{10}H_7NO_3$ . Diese von Liebig<sup>1)</sup> entdeckte Säure ist bisher nur im Hundeharn und im Harn von Canis ochropus (Swain<sup>2)</sup>) gefunden worden. Sie tritt hier in geringer Menge und nicht regelmäßig auf, wechselt nach Art der Nahrung, mit steigendem Eiweißzerfall zunehmend, und zeigt keine Abhängigkeit von der Darmfäulnis (Baumann<sup>3)</sup>). In den Körper (Hund, Kaninchen) eingeführtes Tryptophan wird zum Teil als Kynurensäure ausgeschieden (Ellinger<sup>4)</sup>); ebenso zum kleinen Teil Kaninchen intravenös zugeführte Indolbrenztraubensäure (Ellinger und Matsuo<sup>5)</sup>).

Vorkommen.



Synthetisch erhielt Camps<sup>6)</sup> sie aus Oxalyl-o-aminoacetophenon. Die Identität dieser Säure mit Kynurensäure, welche Homer<sup>7)</sup> wahrscheinlich machte, wurde erst durch Späth<sup>8)</sup> und Besthorn<sup>9)</sup>, der auch eine neue Synthese ausführte, experimentell sichergestellt.

Darstellung.

Aus Hundeharn scheidet sie sich auf Zusatz von 4 ccm konzentrierter Salzsäure zu 100 ccm (frischem oder vorher eingedampftem) Harn während 1- bis 2-tägigem Stehen zusammen mit Schwefel ab. Am besten fällt man den Harn nach Hofmeister<sup>10)</sup> mit Salzsäure und Phosphorwolframsäure aus, filtriert, wäscht mit verdünnter Schwefelsäure bis zum Verschwinden der Chlorreaktion, erhitzt den abgepreßten und in Barytwasser zerteilten Niederschlag nach Zufügen von festem Baryt zum Kochen und filtriert die stark alkalisch reagierende Flüssigkeit ab. Die durch Kohlensäure von Baryt befreite und filtrierte Lösung wird eingeeengt und mit Salzsäure bis zur stark sauren Reaktion versetzt. Die Säure scheidet sich ab.

Darstellung aus  
Hundeharn.

Die reine Säure krystallisiert in glänzenden, weißen Nadeln mit 1 Mol. Krystallwasser, das erst bei 150° entweicht. Der Schmelzpunkt ist nicht charakteristisch. Bei raschem Erhitzen in dem auf 260° vorher erhitzten Schwefelsäurebad zersetzt sie sich bei 287—288° (Späth). Sie löst sich nicht in kaltem Wasser, wenig in Äther, ziemlich gut in heißem Alkohol, beim Erkalten sich wieder ausscheidend; in konzentrierten Mineralsäuren ist sie löslich, in verdünnten nicht. Zum Umkrystallisieren eignet sich 40proz. Essigsäure. Das salzsaure Salz  $C_{10}H_7NO_3 \cdot HCl$  wird durch Wasser zerlegt. Mit Alkalien bildet sie in Wasser lösliche Salze. Löst man sie in Barytwasser, fällt den überschüssigen Baryt durch Kohlensäure, kocht den Niederschlag mit Wasser aus und dampft

Eigenschaften.

<sup>1)</sup> Ann. d. Chem. Bd. 86, S. 125. 1853.

<sup>2)</sup> Americ. Journ. of physiol. Bd. 13, S. 30. 1905.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 10, S. 131. 1886.

<sup>4)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 43, S. 325. 1904/05.

<sup>5)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 109, S. 259. 1920.

<sup>6)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 33, S. 390. 1901.

<sup>7)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 17, S. 509. 1914.

<sup>8)</sup> Monatshefte f. Chem. Bd. 42, S. 89. 1921.

<sup>9)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 54, I, S. 1330. 1921.

<sup>10)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 5, S. 67. 1881.

das Filtrat ein, so scheidet sich beim Stehen das Barytsalz  $(C_{10}H_6NO_3)_2Ba + 3H_2O$  in farblosen, dreieckigen Blättchen (charakteristische Form) aus. Mit Phosphorwolframsäure bildet Kynurensäure eine in rhombischen Täfelchen krystallisierende Verbindung. Mit Salz- oder Schwefelsäure angesäuerte Lösungen geben noch bei einem Gehalt von 0,06% Kynurensäure auf Zusatz von Phosphorwolframsäure innerhalb 24 Stunden krystallinische Abscheidung (Hofmeister). Methylester (als Chlorhydrat in Methylalkohol schwer löslich) zersetzt sich bei  $224^\circ$  unter Gasentwicklung. Er kann zur Reinigung benutzt werden (Späth). Über eine Verbindung mit Kreatinin s. S. 162.

**Umwandlungen.** Trocken erhitzt schmilzt Kynurensäure und zerfällt in Kohlensäure und Kynurin, welches sich aus wässriger Lösung in schönen Krystallen abscheidet (Schmiedeberg und Schultzen<sup>1</sup>). Das Kynurin  $C_9H_7NO$  schmilzt bei  $201^\circ$ , löst sich auch in Alkohol, gibt mit Platinchlorid ein gut krystallisierendes Doppelsalz und ist nach Wenzel<sup>2</sup>) identisch mit  $\gamma$ -Oxychinolin. Mit konzentrierter Salzsäure auf  $240^\circ$  erhitzt liefert Kynurensäure salzsaures Kynurin, und beim Erwärmen mit Bromwasser auf dem Wasserbade scheidet sich unter Entweichen von Kohlensäure als krystallisierendes Pulver Tetrabromkynurin  $C_9H_3Br_4NO$ , in dem 1 Atom Brom sehr locker gebunden ist, aus (Brieger<sup>3</sup>). Beim Erhitzen von Kynurensäure mit Zinkstaub im Wasserstoffstrom entsteht fast reines Chinolin (Kretschy<sup>4</sup>). Beim längeren Erhitzen mit Essigsäureanhydrid auf  $140^\circ$  entsteht ein carminroter Farbstoff (Kretschy, Besthorn).

**Nachweis.** Zum Nachweis dient Jaffes Probe<sup>5</sup>). Beim Abdampfen von Kynurensäure mit Salzsäure und Kaliumchlorat auf dem Wasserbade bis zur Trockne entsteht ein rötlicher Rückstand, der beim Anfeuchten mit Ammoniak sich zunächst braungrün, nach kurzer Zeit aber smaragdgrün färbt. Die Intensität der Färbung nimmt beim Stehen an der Luft erheblich zu. Beim Erwärmen geht die grüne oder blaugrüne Farbe in einen schmutzigvioletten Ton über. Diese Reaktion gelingt noch mit minimaler Quantität trockener Kynurensäure, selbst direkt aus Harn gefällter noch unreiner Säure, aber um so schöner, je reiner sie ist.

### Spinacen, Squalen.

231. **Spinacen**  $C_{29}H_{48}$ , ein vielleicht mit den Terpenen verwandter Kohlenwasserstoff, wurde von Chapman<sup>6</sup>) in Fischleberölen gefunden, und zwar besteht das Öl aus der Leber der Spinacidae fast zu 90% aus ihm. Man erhält ihn durch Fraktionierung des unverseiften Anteils.

Farbloses Öl von schwachem angenehmen Geruch. Siedepunkt  $260^\circ$  (korr.). Hexachlorid ( $C_{29}H_{48} \cdot 6HCl$ ) krystallisiert aus Benzol, Fp.  $126^\circ$ . Mit Brom in Äther entsteht das Dodekabromid  $C_{29}H_{48}Br_{12}$ , durch Hydrierung mit Platin bei  $200^\circ$  Spinacen  $C_{29}H_{60}$ , optisch inaktives Öl.

**Squalen**  $C_{30}H_{50}$ , von Tsujimoto<sup>7</sup>) aus verseiften japanischen Haifischleberölen durch fraktionierte Destillation gewonnen, findet sich auch in Haifischeiern. Nach Mayima und Kubota<sup>7</sup>) ist es vermutlich ein Terpen, und zwar ein Dihydrotriterpen, und mit dem vorigen homolog, wenn nicht isomer oder identisch. Farbloses, fast geruchloses Öl, leicht löslich in Äther, Petroläther, Chloroform, Aceton, wenig löslich in kaltem Alkohol und Eisessig. Siedepunkt bei 10 mm  $262-264^\circ$ , Jodzahl (Hübl)  $398,70^\circ$ , optisch inaktiv.

<sup>1</sup>) Ann. d. Chem. Bd. 164, S. 155. 1872.

<sup>2</sup>) Monatshefte f. Chem. Bd. 15, S. 453. 1894.

<sup>3</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 4, S. 89. 1881.

<sup>4</sup>) Monatshefte f. Chem. Bd. 2, S. 57. 1881 u. Bd. 5, S. 16. 1884.

<sup>5</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 7, S. 399. 1882/83.

<sup>6</sup>) Journ. of the chem. soc. (London) Bd. 111, S. 56; ref. Chem. Zentralbl. 1917, II, S. 153; Bd. 113, S. 458; ref. Chem. Zentralbl. 1919, I, S. 631; Bd. 123, S. 769; ref. Chem. Zentralbl. 1923, Bd. 3, S. 18.

<sup>7</sup>) Journ. of ind. a. eng. chem. Bd. 8, S. 889; ref. Chem. Zentralbl. 1918, I, S. 638; Bd. 9, S. 1098; ref. Chem. Zentralbl. 1918, I, S. 1048; Bd. 12, S. 63; ref. Chem. Zentralbl. 1920, I, S. 862; Bd. 12, S. 73; ref. Chem. Zentralbl. 1920, II, S. 765. — Toyama: Chem. Zentralbl. 1923, I, S. 111. — Mayima u. Kubota: Japan. journ. of chem. Bd. 1, S. 19. 1922.



Hexahydrochlorid  $C_{30}H_{50} \cdot 6 HCl$ , durch Einleiten von Salzsäure in eine ätherische Lösung hergestellt, kristallisiert aus Aceton in glänzenden Blättchen. Es sintert bei  $112^\circ$  und schmilzt bei  $125^\circ$  unter Salzsäureabspaltung. Zur Identifizierung am besten geeignet.

Durch Wasserstoff bei Gegenwart von Platinschwarz entsteht  $C_{30}H_{62}$ , farbloses, dickes Öl. Das Hexaozonid liefert bei der Zersetzung Kohlensäure, Formaldehyd, Ameisensäure, Aceton, Bernstein- und Lävulinsäure und andere Säuren (Mayima und Kubota).

### Sterine.

(Bearbeitet von F. Wrede-Greifswald.)

Als Sterine wird eine Klasse von Stoffen bezeichnet, die als Grundskelett ein System von (wahrscheinlich vier) hydrierten Ringen aufweisen und die durch Anwesenheit einer Hydroxylgruppe Alkoholcharakter haben. Sie kommen teils frei, teils mit Säuren verestert im Tier- und Pflanzenorganismus in fast allen Geweben vor. Die aus Pflanzen gewonnenen Sterine werden Phytosterine genannt<sup>1)</sup>. Über die Bedeutung der Sterine im Organismus ist noch wenig bekannt.

232. **Cholesterin  $C_{27}H_{46}O$** . Kommt in den meisten Flüssigkeiten und Geweben Vorkommen. des tierischen Körpers frei und in Esterform vor<sup>2)</sup>. Nicht gefunden wurde es in den Faeces von Herbivoren<sup>3)</sup>. Vielleicht wird es im Tierkörper aus Phytosterinen gebildet<sup>4)</sup>. Besonders reichlich findet es sich in der Gehirns substanz und in der Niere (ca. 2%<sup>5)</sup>) sowie in der Galle (ca. 0,1%) aller daraufhin untersuchten Tiere, außer in der von *Scymnus borealis*<sup>6)</sup>. Im Harn kommt es nur in kleiner Menge vor<sup>7)</sup>. Im Blut finden sich ca. 0,07—0,1%, bei chronischem Ikterus bis über 2%<sup>8)</sup>. In der Frauenmilch wurde ca. 0,03% nachgewiesen<sup>9)</sup>. Die Konkremente in den Gallenwegen, die Gallensteine, bestehen beim Menschen hauptsächlich aus Cholesterin. Außerdem findet es sich gelegentlich kristallisiert in alten Transsudaten und Cystenflüssigkeiten, in Atheromen, in alten Verfettungsherden und in Eiter, zum Teil allerdings als Ester. Diese Ester (§ 233), Vorkommen der Cholesterinester. meist solche der höheren Fettsäuren (Cholesterinfett), sind in reichlicher Menge im Wollfett der Schafe<sup>10)</sup> neben Isocholesterinestern (§ 236) vorhanden, außerdem im Blut und in der Lymphe von Säugetieren und Vögeln<sup>11)</sup>, im chylösen

<sup>1)</sup> Zusammenstellung der Phytosterine s. B. Burian: Monatshefte f. Chemie Bd. 18, S. 551. 1897; Biochem. Handlex. Bd. 3. 1911 u. Bd. 8. 1914.

<sup>2)</sup> Welsch: Über Vorkommen und Verbreitung der Sterine im Tier- und Pflanzenreich. Inaug.-Diss. Freiburg 1909. — Dorée: Biochem. Journ. Bd. 4, S. 72. 1909; Biochem. Handlex. Bd. 3. 1911 u. Bd. 8. 1914.

<sup>3)</sup> Dorée u. Gardner: Proc. of the roy. soc. Bd. 80, S. 212. 1908; ref. Chem. Zentralbl. 1908, II, 1277.

<sup>4)</sup> Dorée u. Gardner: Proc. of the roy. soc. Bd. 80, S. 212. 1908; Bd. 81, S. 109. 1909. — Ellis u. Gardner: Ebd. Bd. 81, S. 129 u. 505. 1909; Bd. 84, S. 461. 1912; Bd. 86, S. 13. 1913. — Fraser u. Gardner: Ebd. Bd. 81, S. 230. 1909; Bd. 82, S. 559. 1910; s. dagegen Chauffard u. Mitarb.: Semaine méd. 1911 u. 1912; Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. 1911, 1912 u. 1913.

<sup>5)</sup> Windaus: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 65, S. 110. 1910.

<sup>6)</sup> Hammarsten: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 24, S. 322. 1898.

<sup>7)</sup> S. die Arbeit v. Grunke: Biochem. Zeitschr. Bd. 132, S. 543. 1922.

<sup>8)</sup> Bang: Biochem. Zeitschr. Bd. 91, S. 122. 1908.

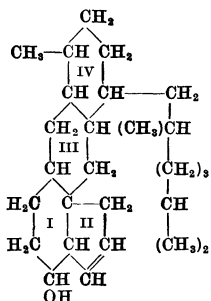
<sup>9)</sup> Tolmatscheff: Jahresber. d. Fortschr. d. Chem. 1867, S. 811.

<sup>10)</sup> Hartmann: Inaug.-Diss. Göttingen 1868. — E. Schulze: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 5, S. 1075. 1872; Bd. 6, S. 251. 1873. — E. Schulze u. Barbieri: Journ. f. prakt. Chem., N. F., Bd. 25, S. 159. 1882.

<sup>11)</sup> Baumstark: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 9, S. 145. 1884. — Hürthle: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 21, S. 331. 1895/96. — Brown: Americ. Journ. of physiol. Bd. 2, S. 306. 1899. — Tebb: Journ. of physiol. Bd. 34, S. 106. 1906. — Craven Moore: Med. Chron. Manchester Bd. 47, S. 207. 1907. — Windaus: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 65, S. 110. 1910.

Ascites<sup>1)</sup>, stark angereichert in der großen weißen Niere und in solchen pathologisch veränderten Organen, die mikroskopisch doppeltbrechende Gebilde zeigen<sup>2)</sup>, ferner in der Vernix caseosa, den Haaren, Federn, Hufen usw.<sup>3)</sup>, in der Epidermis bei Dermatitis exfoliativa<sup>4)</sup>. Sie finden sich nicht im Gehirn<sup>5)</sup>.

**Konstitution.** Die vielfachen Untersuchungen über die Konstitution des Cholesterins führten zur Aufstellung nebenstehender Formel, in der allerdings die Art und die Stellung von Ring III und IV noch ganz unsicher ist<sup>6)</sup>.



Ziemlich sicher steht folgendes über die Konstitution fest: Das Cholesterin ist ein kompliziertes Terpen, das eine sekundäre Alkoholgruppe in einem völlig hydrierten 6-Ring und eine Doppelbindung in einem partiell hydrierten 5-Ring trägt<sup>7)</sup>. Die Doppelbindung steht in  $\beta$ - $\gamma$ -Stellung zur Hydroxylgruppe<sup>8)</sup>. Außerdem trägt einer der hydrierten Ringe — aus der Zahl der Wasserstoffatome sind 4 solche Ringe anzunehmen — eine Octylseitenkette, deren Verknüpfungsstelle allerdings noch ganz unbestimmt ist<sup>9)</sup>. Der Stammkörper des Cholesterins, der an Stelle der CH = CH-Gruppe eine CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Gruppe und an Stelle der CH · OH-Gruppe eine CH<sub>2</sub>-Gruppe trägt, heißt Cholestan. Dieser kann leicht in einen stereoisomeren Körper (Asymmetrie am C<sub>5</sub>-Atom) umgewandelt werden, der Pseudocholestan genannt wurde. Wird dieser mit Chromsäure oxydiert, so wird aus der Seitenkette Aceton abgespalten und eine Monocarbonsäure C<sub>24</sub>H<sub>40</sub>O<sub>2</sub> gebildet. Diese Säure ist identisch mit der Cholsäure, die entsteht, wenn in der Cholsäure die 3 Hydroxylgruppen durch Wasserstoffatome ersetzt werden. Damit ist der sichere Zusammenhang zwischen Cholesterin und Gallensäuren erwiesen<sup>10)</sup>.

**Darstellung aus Gallensteinen**

Cholesteringallensteine werden zerrieben und mit einer Mischung von Äther und Alkohol extrahiert. Das Extrakt wird filtriert, das Filtrat vom Äther durch Kochen befreit. Die sich ausscheidende Masse wird mit alkoholischer Kalilauge gekocht. Es wird wieder eingedampft, der Rückstand mit Äther extrahiert und das nach dem Verdunsten des Äthers zurückbleibende Cholesterin

**aus Gehirn.**

aus Alkohol-Äther umkrystallisiert. — Zur Darstellung aus Gehirn wird dieses, mit etwas Sand und ca. 2—3 Teilen Gips verrieben. Nach einigen Stunden wird die zerkleinerte Masse bei Zimmertemperatur mehrmals mit Aceton extrahiert. Die Auszüge werden eingeeengt, das auskrystallisierte Cholesterin wird unter Zusatz von etwas Tierkohle umkrystallisiert<sup>11)</sup>. Um Cholesterin aus Geweben und aus Flüssigkeiten zu erhalten, wird der Ätherauszug\*) eingedampft und

**Isolierung aus Geweben und Flüssigkeiten.**

\*) Zur Herstellung dieses Auszuges verfährt man im Prinzip nach § 660, womöglich unter Benutzung größerer Mengen.

<sup>1)</sup> Wolff: Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 5, S. 208. 1904.

<sup>2)</sup> Windaus: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 65, S. 110. 1910.

<sup>3)</sup> Liebreich: Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. Bd. 121, S. 383. 1890. — Ruppel: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 21, S. 122. 1895/96. — Unna u. Golodetz: Biochem. Zeitschr. Bd. 20, S. 496. 1909.

<sup>4)</sup> Salkowski: Arb. a. d. pathol. Inst. Berlin: Hirschwald 1906.

<sup>5)</sup> Bünz: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 46, S. 47. 1905. — Tebb: Journ. of physiol. Bd. 34, S. 106. — Rosenheim: Biochem. Journ. Bd. 8, S. 74. 1914.

<sup>6)</sup> Windaus u. Rahlén: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 101, S. 229. 1918. — Windaus u. Dalmer: Ber. d. Dtsch. chem. Ges. Bd. 52, 1, S. 162. 1919. — Borsché: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 52, 2, S. 1357. 1919. — Windaus: Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden (Abderhalden) Abt. I, Tl. 6, Heft 1, Lfg. 53, S. 169. 1922.

<sup>7)</sup> Mauthner u. Suida: Monatshefte f. Chemie Bd. 15, S. 85. 1894. — Diels u. Abderhalden: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 36, 3, S. 3177. 1903; Bd. 37, S. 3092. 1904. — Windaus: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 36, 3, S. 3753. 1903. — Windaus u. Stein: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 37, 3, S. 3699. 1904. — Windaus, Rosenbach u. Riemann: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 130, S. 113. 1923.

<sup>8)</sup> Windaus: Ber. d. Dtsch. chem. Ges. Bd. 39, 2, S. 2010 u. 2249. 1906; Bd. 50, 1, S. 133. 1917. — Windaus u. Dalmer: Ber. d. Dtsch. chem. Ges. Bd. 52, 1, S. 162. 1919.

<sup>9)</sup> Mauthner u. Suida: Monatshefte f. Chemie Bd. 17, S. 41. 1896. — Windaus: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 41, 2, S. 2558. 1908; Bd. 42, 3, S. 3770. 1909. — Windaus u. Resau: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 46, 2, S. 1246. 1913. — Windaus: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 102, S. 160. 1918.

<sup>10)</sup> Wieland u. Weil: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 80, S. 287. 1912. — Windaus u. Neukirchen: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 52, 2, S. 1915. 1919.

<sup>11)</sup> Rosenheim: Journ. of physiol. Bd. 34, S. 104. 1906.

nach den Angaben von Ritter<sup>1)</sup> weiterverarbeitet: 1 Gewichtsteil des Rückstandes wird in einer Schale mit 2 Volumenteilen Alkohol und 3 Volumenteilen einer Natriumalkoholatlösung (8 g blankes Natrium in 160 ccm 99proz. Alkohol) auf dem Wasserbade bis zum Verdampfen des Alkohols erhitzt. Dann wird 1½ Gewichtsteil Kochsalz und so viel Wasser zugesetzt, daß annähernd alles gelöst ist. Es wird wieder eingedampft, der Rückstand bei 80° im Trockenschrank getrocknet, pulverisiert, nochmals im Exsiccator getrocknet und 9 Stunden im Soxhletapparat mit Äther extrahiert. Die ätherische Lösung wird von ausgeschiedenem Glycerin abgegossen und eingedampft. Der Rückstand wird in wenig Alkohol gelöst und mit viel Wasser wieder ausgefällt, filtriert und getrocknet. — Weitere Isolierungsmethoden und Trennung von Fetten und Cholesterinestern s. unten.

Cholesterin ist eine weiße, perlmutterglänzende Krystallmasse, die sich Eigenschaften. fettig anfühlt. Aus wasserfreien Lösungsmitteln krystallisiert es in wasserfreien Nadeln, aus wasserhaltigem Alkohol oder Äther in charakteristischen, rhombischen Tafeln mit 1 Mol. Wasser. Diese zeigen als spitze Kantenwinkel oft 76° 30' oder 87° 30'. Während der Krystallisation werden mitunter zuerst nadelförmige Gebilde beobachtet, dann ungleichseitige Wetzsteinformen, die dann in die Tafelform übergehen. Abweichende Krystallformen von Cholesterin aus verschiedenen Organen, die zu der Vermutung Anlaß gaben, daß im Tierkörper verschiedene Arten von Cholesterin vorkämen, beschreibt Lifschütz<sup>2)</sup>. Die wasserhaltige Form verwittert an der trockenen Luft. Das im Vakuum entwässerte Cholesterin schmilzt bei 148,5° (korr.<sup>3)</sup>). Das spezifische Gewicht ist 1,067<sup>4)</sup>, in geschmolzener Form 1,03<sup>5)</sup>. Es ist unlöslich in Wasser, verdünnten Säuren und in Alkalien (selbst konzentrierten), kaum löslich in kaltem Alkohol, löslich in 9 Teilen kochendem Alkohol (spez. Gew. 0,84), in 5,5 Teilen kochendem Alkohol (spez. Gew. 0,82). Leicht löst es sich in den meisten organischen Solventien. Essigester kann unter Umständen zur Trennung des Cholesterins von anderen Lipoiden dienen, da Cholesterin im Gegensatz zu manchem dieser Stoffe auch bei Zimmertemperatur in ihm löslich ist<sup>6)</sup>. Weiterhin löst es sich in fetten Ölen. In den Lösungen gallensaurer Salze löst es sich mäßig, in wässrigen Seifenlösungen nur ein wenig. Durch Eingießen einer acetonischen Lösung in Wasser entsteht eine kolloidale Lösung des Cholesterins<sup>7)</sup>. Wird Cholesterin in warmem Eisessig gelöst, so krystallisiert beim Erkalten eine Verbindung mit 1 Mol. Essigsäure aus. Durch Zusatz von Wasser oder Alkohol wird diese Verbindung zerlegt. Durch Kochen mit Kalilauge wird Cholesterin nicht verändert, es ist überhaupt ein recht widerstandsfähiger Körper<sup>8)</sup>. Der Luft und dem Licht ausgesetzt nimmt es allmählich eine gelbliche Farbe an, wobei Erniedrigung des Schmelzpunktes und Veränderung einiger Reaktionen zu beobachten ist<sup>9)</sup>.

Das wasserfreie Cholesterin zeigt  $[\alpha]_D = -31,12^\circ$  (in 2proz. ätherischer Lösung<sup>10)</sup>).

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 34, S. 430. 1902.

<sup>2)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 83, S. 18. 1917; s. dazu Windaus u. Lüders: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 109, S. 183. 1920.

<sup>3)</sup> Reinizer: Monatshefte f. Chemie Bd. 9, S. 422. 1889.

<sup>4)</sup> Hoppe: Jahresber. d. Chemie 1863, S: 654. <sup>5)</sup> Hein: Jahresber. d. Chemie 1847/48, S. 920.

<sup>6)</sup> Hepner: Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 73, S. 595. 1898.

<sup>7)</sup> Porges u. Neubauer: Biochem. Zeitschr. Bd. 7, S. 152. 1908. — Hesse: Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 192, S. 178. 1870.

<sup>8)</sup> S. dazu auch Grunke: Biochem. Zeitschr. Bd. 132, S. 549. 1922.

<sup>9)</sup> E. Schulze u. Winterstein: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 43, S. 316. 1904/05; Bd. 48, S. 546. 1906.

<sup>10)</sup> Hesse: Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 192, S. 178. 1870. — Diels u. Linn: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 41, 1, S. 260. 1908.

Ester des Cholesterins.

Ameisensäureester. Krystalle vom Fp.  $96^{\circ}$  <sup>1)</sup>).

Essigsäureester  $C_{29}H_{48}O_2$ . Bildet sich schon beim Einwirken von heißem Eisessig auf Cholesterin, besser durch Kochen von Cholesterin mit Essigsäureanhydrid<sup>2)</sup>. Krystalle vom Fp.  $114^{\circ}$ .

Propionsäureester. Fp.  $98^{\circ}$ , s. unter Reaktion von Obermüller.

Benzoesäureester<sup>3)</sup> aus Cholesterin, Benzoylchlorid und Pyridin. Dicke, rechtwinklige Tafeln. Schmelzpunkt unscharf zwischen  $145-180^{\circ}$ .

Ester der höheren Fettsäure s. § 233.

Nachweis.

Zum Nachweis des Cholesterins dienen folgende Reaktionen:

Fällungsreaktionen.

a) Cholesterin wird in möglichst wenig Äther gelöst und mit einer Brom-Eisessigmischung (5 g Brom in 100 g Eisessig) bis zur bleibenden Braunfärbung versetzt. Es scheidet sich Cholesterindibromid  $C_{27}H_{46}OBr_2$  in langen Nadeln vom Fp.  $122^{\circ}$  (bis  $125^{\circ}$ ) aus<sup>4)</sup>. Nach Lifschütz liegt der Schmelzpunkt des Dibromids erheblich tiefer<sup>5)</sup>.

b) Eine heiße alkoholische Lösung von Cholesterin wird mit einer heißen 1proz. Lösung von Digitonin in 90proz. Alkohol versetzt. Bald krystallisiert Digitonincholesterid  $C_{82}H_{140}O_{29}$  in Form von Nadeln aus. Es wird evtl. aus heißem Methylalkohol und etwas Wasser umkrystallisiert. Zersetzungspunkt bei ca.  $240^{\circ}$ . Die Additionsverbindung ist unlöslich in kaltem Wasser, Aceton und in Äther, sehr wenig löslich in kaltem 95proz. Alkohol\*), leichter löslich in kochendem Wasser und in heißem absoluten Alkohol, in Methylalkohol, Eisessig und Pyridin. Durch siedendes Xylol kann die Verbindung zerlegt werden. Das Cholesterin geht in das Xylol über, das Digitonin bleibt ungelöst zurück und kann wieder benutzt werden<sup>6)</sup>. — 0,1 mg Cholesterin in 1 ccm 90proz. Alkohol lassen die Reaktion noch positiv ausfallen<sup>7)</sup>. Alle bisher untersuchten in der Natur vorkommenden Sterine geben ebenfalls Verbindungen mit Digitonin. Dagegen sind keine anderen Stoffe bekannt, die derartige unlösliche Additionsverbindungen an Digitonin geben. Auch die Cholesterinester reagieren nicht.

c) Cholesterin in Pyridin gelöst gibt mit Lithiumchlorid in Pyridin eine krystallisierte schwerlösliche Doppelverbindung vom Fp.  $140^{\circ}$ . Mit Hilfe dieser Reaktion kann Cholesterin vom Fett getrennt werden<sup>8)</sup>.

Farbreaktionen.

Die nun folgenden Farbreaktionen sind nicht typisch für Cholesterin. Andere Sterine und gewisse ungesättigte Alkohole, Harzsäuren und Terpene geben ähnliche Reaktionen:

a) Wird zu krystallisiertem Cholesterin auf dem Objektträger etwas 80proz. Schwefelsäure gegeben, so färben sich die Krystalle zuerst carminrot, dann violett. Wird darauf ein wenig Jodtinktur zugesetzt, so zeigen die Krystalle nacheinander Färbungen in violett, blau, grün und rot.

b) Salkowskis Reaktion<sup>9)</sup>. Etwas trockenes Cholesterin wird im Reagensglas in Chloroform gelöst und mit dem gleichen Volumen konzentrierter Schwefel-

\*) 100 ccm lösen bei  $18^{\circ}$  die 4 mg Cholesterin entsprechende Menge des Cholesterides.

<sup>1)</sup> Menozzi: Rend. atti d. Reale Accad. dei Lincei Rom [5], Bd. 17, I, S. 91. 1908; ref. Chem. Zentralbl. 1908, I, S. 1377.

<sup>2)</sup> Reinizer: Monatshefte f. Chemie Bd. 9, S. 425. 1888.

<sup>3)</sup> Dorée u. Gardner: Proc. of the roy. soc. Bd. 80, S. 228. 1908.

<sup>4)</sup> Windaus: Chemiker-Zeit. Bd. 30, S. 1011. 1906.

<sup>5)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 111, S. 254. 1920. Bd. 114, S. 288. 1921.

<sup>6)</sup> Extraktionsapparat nach Stock: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 39, 2, S. 1976. 1906.

<sup>7)</sup> Windaus: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 42, 1, S. 238. 1909; Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 65, S. 110. 1910. — Yagi: Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 64, S. 141. 1911.

<sup>8)</sup> Zwickler: Pharm. Weekblad Bd. 54, S. 101, 1917; ref. Chem. Zentralbl. 1917, I, S. 1077.

<sup>9)</sup> Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 6, S. 207. 1872.

säure versetzt. Das Chloroform färbt sich blutrot bis purpurfarbig. Beim Eingießen der Lösung in eine Schale bilden sich bald blaue, grüne und gelbe Farben. Die Schwefelsäure unter dem Chloroform zeigt grüne Fluoreszenz; wird sie mit Eisessig verdünnt, so wird sie rosa- bis purpurrot, wobei die Fluoreszenz bestehen bleibt.

c) Reaktion nach Liebermann-Burchard<sup>1)</sup>. Cholesterin wird in wenig Chloroform gelöst, mit 2 bis 3 Tropfen Essigsäureanhydrid und einigen Tropfen konzentrierter Schwefelsäure versetzt. Es entsteht eine rosenrote, dann blaue, später grüne Färbung. Bei sehr geringer Menge tritt nach einigen Minuten direkt Grünfärbung auf.

d) Obermüllers Reaktion<sup>2)</sup>. Reines, wasserfreies Cholesterin wird mit einigen Tropfen Propionsäureanhydrid im Reagensglas  $\frac{1}{2}$  Stunde im Wasserbade erhitzt. Der Propionsäureester zeigt beim Abkühlen eigentümliche Farbänderungen von Violett zu Blaugrün, Orange, Kupferrot. Zweckmäßig wird der Farbwechsel so beobachtet, daß die Substanz an einen Glasstab angeschmolzen vor einen dunklen Hintergrund gehalten wird. Die Reaktion ist zum Nachweis kleiner Mengen nicht geeignet.

Andere Reaktionen s. bei Schiff<sup>3)</sup>, Tschugajew<sup>4)</sup>, Neuberg und Raucherger<sup>5)</sup>, Hirschsohn<sup>6)</sup>, Denigès<sup>7)</sup>, Golodetz<sup>8)</sup>, Lifschütz<sup>9)</sup> und Kahlenberg<sup>10)</sup>.

Zur quantitativen Bestimmung des Cholesterins sind folgende Methoden angegeben worden: Quantitative Bestimmung:

a) Colorimetrische Methoden. Literaturzusammenstellung s. bei Ritter<sup>11)</sup>, Fex<sup>12)</sup> und Feigl<sup>13)</sup>. Außerdem s. unter anderem die Arbeiten von Pribram<sup>14)</sup>, Kumagawa und Suto<sup>15)</sup> (s. dazu Thaysen<sup>16)</sup> und Fex<sup>17)</sup>, Dorée und Gardner<sup>18)</sup>, Fraser und Gardner<sup>19)</sup>, Shimidzu<sup>20)</sup> und Tamura<sup>21)</sup>. Die colorimetrischen Methoden geben keine so exakten Werte (ca 10 bis 20% zu hohe) wie die Digitoninmethode, weil auch andere cholesterinähnliche Körper die Farbenreaktionen geben<sup>22)</sup>. colorimetrisch

Die Extraktrückstände aus Blut oder sonstigem Material, die nach verschiedenen Verfahren gewonnen werden können<sup>23)</sup>, werden in Chloroform gelöst. Nach Myers und Wardell<sup>24)</sup> werden z. B. 5 ccm der Chloroformlösung (1 ccm Blut war mit 25 ccm Chloroform extrahiert) mit 2 ccm Essigsäureanhydrid und 0,1 ccm konzentrierter Schwefelsäure gemischt. Nachdem die Mischung

<sup>1)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 18, 1, S. 1804. 1885. — Burchard: Dissert. Rostock 1889.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 15, S. 38. 1891.

<sup>3)</sup> Liebigs Ann. d. Chemie Bd. 104, S. 332. 1857; Bd. 115, S. 313. 1860.

<sup>4)</sup> Ref. Zeitschr. f. angew. Chemie 1900, S. 618.

<sup>5)</sup> Salkowski: Festschr., Berlin 1904, S. 279, Hirschwald; Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 47, S. 335. 1906.

<sup>6)</sup> Pharmaz. Centralhalle Bd. 43, S. 357. 1902.

<sup>7)</sup> Bull. de la soc. de pharmacol. de Bordeaux 1903.

<sup>8)</sup> Chemiker-Zeit. Bd. 32, S. 160. 1908. <sup>9)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 41, 1, S. 252. 1908.

<sup>10)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 52, S. 217. 1922; ref. Chem. Zentralbl. 1922, II, S. 382.

<sup>11)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 34, S. 430. 1902.

<sup>12)</sup> Fex: Biochem. Zeitschr. Bd. 104, S. 82. 1920.

<sup>13)</sup> Zeitschr. f. d. ges. exp. Med. Bd. 11, S. 178. 1920.

<sup>14)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 1, S. 144. 1906. <sup>15)</sup> desgl. Bd. 8, S. 212, 315. 1908.

<sup>16)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 62, S. 89. 1914. <sup>17)</sup> L. c. bei <sup>12)</sup>.

<sup>18)</sup> Proc. of the roy. soc. Bd. 81, S. 109. 1909; ref. Chem. Zentralbl. 1909, I, S. 1773.

<sup>19)</sup> Proc. of the roy. soc. Bd. 82, S. 559. 1909; ref. Chem. Zentralbl. 1910, II, S. 1149.

<sup>20)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 28, S. 237. 1910. <sup>21)</sup> desgl. Bd. 41, S. 78. 1912.

<sup>22)</sup> Howard Müller: Journ. of biol. chem. Bd. 25, S. 549. 1916; ref. Chem. Zentralbl. 1917, I, S. 130. — Fex: Biochem. Zeitschr. Bd. 104, S. 115. 1920. — Lifschütz: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 117, S. 201. 1921.

<sup>23)</sup> Siehe Fex: Biochem. Zeitschr. Bd. 104, S. 116. 1920.

<sup>24)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 36, S. 147. 1918; ref. Chem. Zentralbl. 1919, II, S. 399.

10 Minuten im Dunkeln gestanden hat, wird sie mit einer eingestellten wässrigen Lösung von Naphtholgrün B im Duboscq-Colorimeter verglichen. Bloor<sup>1)</sup> vergleicht mit einer gefärbten Lösung, die aus 2,7 mg Cholesterin in 10 ccm Chloroform, 4 ccm Essigsäureanhydrid und 0,2 ccm Schwefelsäure dargestellt war und 15 Minuten im Dunkeln gestanden hatte. Authenrieth und Funk<sup>2)</sup> erhitzen die Mischung von Cholesterin, Chloroform, Essigsäureanhydrid und Schwefelsäure 15 Minuten im Wasserbade auf 35°. Nach Csonka<sup>3)</sup> wird das zu untersuchende Material vor der Extraktion mit Äther durch ein Gemisch von Alkohol, Ätzkali und Bariumchlorid verseift.

Eine colorimetrische Bestimmung von Cholesterin neben Cholesterinestern unter Benutzung der Digitoninmethode (s. unten) ist von Bloor und Knudsen<sup>4)</sup> beschrieben. Über colorimetrische Bestimmung im Harn s. bei Grunke<sup>5)</sup>.

Eine colorimetrische Methode zur Bestimmung von Cholesterin und Cholesterinestern in Muskeln ist in § 755 beschrieben.

titrimetrisch. b) Mikrobestimmung durch Titration nach Bang<sup>6)</sup>. Das Verfahren beruht darauf, daß Cholesterin (sowie Fette) durch eine bestimmte Menge  $\frac{n}{10}$ -Kaliumchromatlösung bei Gegenwart von Schwefelsäure oxydiert wird. Die überschüssig zugesetzte Chromsäure wird mit Jodkali und  $\frac{n}{10}$ -Thiosulfatlösung (mit Stärke als Indicator) bestimmt: Das Blut wird auf Filtrierpapier aufgesaugt, gewogen und an der Luft getrocknet. Es wird dann zuerst mit kaltem Petroläther das Cholesterin und das Neutralfett extrahiert und durch Oxydation mit Chromsäure bestimmt. Das Neutralfett wird in einer zweiten Probe nach Entfernen des Cholesterins (als Digitoninverbindung) besonders bestimmt. Durch Subtraktion der Werte wird die Cholesterinmenge festgestellt. — Nach der Petrolätherextraktion wird das Papierstückchen mit kaltem 92proz. Alkohol 24 Stunden digeriert. Im Alkohol finden sich die Cholesterinester, Phosphatide und die Seifen. Nun wird mit 4proz. Natronlauge verseift und mit Petroläther ausgezogen. Dabei sind die Cholesterinester nicht angegriffen worden. Um sie zu spalten, wird dann mit 25proz. Natronlauge verseift. — Die Bestimmung der Cholesterinester würde wohl, wenn es sich nur um diese handeln würde, einfacher nach der Digitoninmethode (s. unten) auszuführen sein. Nähere Einzelheiten müssen im Original eingesehen werden.

Eine Verbesserung der Mikrotitrationsmethode ist von Szent-Györgyi angegeben<sup>7)</sup>. Sie soll einfach auszuführen sein und gute Resultate geben.

gravimetrisch. c) Gravimetrische Methode von Windaus<sup>8)</sup>. Das cholesterinhaltige Extrakt<sup>9)</sup> wird in der 50fachen Menge kochendem 95proz. Alkohol gelöst und mit einer 1proz. Lösung von Digitonin in heißem 90proz. Alkohol versetzt, solange noch ein Niederschlag entsteht. Nach Thaysen<sup>10)</sup> ist ein Überschuß von Digitonin nötig. Der nach einigen Stunden ausgefallene Niederschlag wird

<sup>1)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 23, S. 317. 1915 ref. Chem. Zentralbl. 1916, II, S. 773; Journ. of biol. chem. Bd. 24, S. 227. 1916; Bd. 26, S. 417. 1916.

<sup>2)</sup> Münch. med. Wochenschr. Bd. 60, S. 1245. 1913; s. auch Grigaut: Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. 1910, S. 791 u. 827; 1911, S. 441. — Grigaut: Le cycle de Cholestérinémie. Paris 1913. Wiedergabe bei Fex: Biochem. Zeitschr. Bd. 104, S. 110 u. 119. 1920. — Weston: Journ. of med. research Bd. 16, S. 47. 1912; Journ. of biol. chem. Bd. 28, S. 383. 1917 ref. Chem. Zentralbl. 1917, I, S. 1153. — Gettler u. Baker: Journ. of biol. chem. Bd. 25, S. 211. 1916; ref. Chem. Zentralbl. 1916, II, S. 1037.

<sup>3)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 24, S. 434. 1916.

<sup>4)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 27, S. 107. 1916; ref. Chem. Zentralbl. 1917, I, S. 974.

<sup>5)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 132, S. 543. 1922. <sup>6)</sup> desgl. Bd. 91, S. 86 und 224, 1918.

<sup>7)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 136, S. 112. 1922.

<sup>8)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 65, S. 110. 1919; s. auch Fex: Biochem. Zeitschr. Bd. 104, S. 82. 1920.

<sup>9)</sup> Über die Extrakt Darstellung s. Fex: Biochem. Zeitschr. Bd. 104, S. 82. 1920.

<sup>10)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 62, S. 89. 1914.

auf einem Gooch-Tiegel filtriert, mit Alkohol und Äther gewaschen (s. dazu Fex) und bei 100° getrocknet. Aus dem Gewicht A des Additionsproduktes läßt sich das Gewicht des Cholesterins C berechnen nach der Gleichung:

$A : C = 1589 : 386,4$  (1589 = Molekulargewicht des Digitonincholesterids, 386,4 = dem des Cholesterins). Also ist:  $C = A \cdot 0,2431$  (rund 0,25).

Die Methode ist in etwas abgeänderter Form auch zur Bestimmung sehr kleiner Mengen (1—4 mg) Cholesterin brauchbar. Die Resultate sollen sehr gute sein<sup>1)</sup>.

Auch zur Trennung von Cholesterin und seinen Estern und zur gleichzeitigen Bestimmung beider nebeneinander ist die Methode geeignet, da nur das freie Cholesterin eine Verbindung mit Digitonin gibt.

Bestimmung von  
Cholesterin neben  
seinen Estern.

Der Extraktückstand (aus dem getrockneten oder mit Gips hart und pulverisierbar gemachten Material durch 3—5tägiges Extrahieren im Soxhletapparat mit Äther oder Petroläther gewonnen<sup>2)</sup> wird mit der 30fachen Menge 95proz. Alkohols ausgekocht. (Sollte nicht alles in Lösung gehen, so wird abgegossen, der — cholesterinfreie — Rückstand in Äther-Alkohol gelöst und mit dem Filtrat vom Digitonincholesterid [s. im nächsten Absatz] zur Aufarbeitung der Ester vereinigt.) Die alkoholische Lösung wird mit einer 1proz. Digitoninlösung in geringem Überschuß versetzt. Nach mehreren Stunden wird das Cholesterid wie oben beschrieben zur Wägung gebracht. Aus dieser Bestimmung ergibt sich der Gehalt an freiem Cholesterin.

Die Cholesterinester werden im Filtrat vom Digitonincholesterid bestimmt: Dies wird konzentriert und nach Zusatz von Wasser mit Äther oder Petroläther ausgeschüttelt. Das überschüssig zugesetzte Digitonin bleibt in der wässrigen Lösung, die Cholesterinester gehen in den Äther. Der Äther wird abdestilliert, der Rückstand wird mit alkoholischem Natriumäthylat in der Hitze verseift<sup>3)</sup>. Das freigewordene Cholesterin wird mit Petroläther ausgeschüttelt und in alkoholischer Lösung wie oben geschildert gefällt und gewogen<sup>4)</sup>.

Eine andere Methode zur quantitativen Fällung des Cholesterins beruht auf der oben erwähnten Reaktion mit Lithiumchlorid<sup>5)</sup>.

Die wohl zur Zeit beste Methode zur quantitativen Bestimmung von Cholesterin und Cholesterinestern in Organen, Blut und Serum findet sich § 754 eingehend beschrieben.

### 233. Cholesterinester der höheren Fettsäuren (Vorkommen s. S. 323).

Sie können synthetisch gewonnen werden durch 3stündiges Erhitzen von Cholesterin mit der doppelten Menge Palmitin-, Stearin- oder Ölsäure auf 200°. Die Schmelze wird mehrmals mit Äther gelöst und mit Alkohol gefällt<sup>6)</sup>. Zu ihrer Isolierung aus Organextrakten kann man sich ihrer Löslichkeit in Äther oder Chloroform und ihrer Schwerlöslichkeit in Alkohol bedienen: Mit Alkohol lassen sich die Cholesterinester vom Cholesterin trennen, da die Ester in ihm viel schwerer löslich sind<sup>7)</sup>. Nach Liebreich können die Ester auf Grund ihrer geringen Löslichkeit in Äthylacetessigester von Cholesterin getrennt werden. Am sichersten gelingt wohl die Trennung nach dem Digitoninverfahren von Windaus (s. oben).

<sup>1)</sup> Szent-Györgyi: Biochem. Zeitschr. Bd. 136, S. 107. 1922.

<sup>2)</sup> S. dazu Fex: Biochem. Zeitschr. Bd. 104, S. 116 u. 120. 1920. <sup>3)</sup> desgl. Bd. 104, S. 101. 1920.

<sup>4)</sup> S. auch die Arbeiten von Fraser u. Gardner: Proc. of the roy. soc. Bd. 82, S. 559. 1910. — Gardner u. Williams: Biochem. Journ. Bd. 18, S. 363. 1921. — Wacker u. Hueck: Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 71, S. 373. 1913. — Thaysen: Biochem. Zeitschr. Bd. 62, S. 89. 1914.

<sup>5)</sup> Zwikker: Pharm. Weekblad Bd. 54, S. 101. 1917.

<sup>6)</sup> Hürthle: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 21, S. 331. 1895/96. — Sal-kowski: Arb. a. d. pathol. Inst. Berlin 1906, S. 573, Hirschwald.

<sup>7)</sup> E. Schulze: Inaug.-Diss. Göttingen 1868; Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 5, S. 1075. 1872; Bd. 6, S. 251. 1873. — E. Schulze u. Barbieri: Journ. f. prakt. Chemie, N. F., Bd. 25, S. 159. 1882.

Die Fettsäureester werden durch Kochen mit alkoholischer Kalium- oder Natriumäthylatlösung leicht verseift, wenn auch schwerer als echte Fette. Die Verseifung durch wässrig-alkoholische Lauge ist weniger vollständig als die durch Alkoholate<sup>1)</sup>. Die schwerere Verseifbarkeit durch Alkalien oder Lipase ist von Pribram zur Trennung von echten Fetten vorgeschlagen worden<sup>2)</sup>.

Darstellung der  
Cholesterinester:  
aus Blut

a) Darstellung aus Blut<sup>3)</sup>. Blutserum wird mit dem dreifachen Volumen Alkohol ausgefällt, nach einigen Stunden wird abgesaugt. Die Fällung wird mehrere Tage bei 30—40° mit Alkohol extrahiert, darauf noch mehrmals ebenso mit Alkohol-Äther. Aus dem Alkoholauszug scheidet sich in der Kälte der Ölsäureester ab, aus dem Äther-Alkoholextrakt der Palmitinsäureester (mit etwas Ölsäureester). — Nach Hepner<sup>4)</sup> wird obiger Niederschlag mit Alkohol ausgekocht. Nach dem Filtrieren wird eingengt, in Wasser aufgenommen und nach völligem Entfernen des Alkohols mit Äther ausgeschüttelt. Der Ätherextrakt wird eingedampft, der Rückstand wird mit warmem Essigester behandelt. Die Lösung wird nach dem Abkühlen filtriert und eingedampft. Der Rückstand wird in Äther gelöst und mit Alkohol versetzt. Der Ölsäureester krystallisiert aus.

aus großer weißer  
Niere.

b) Darstellung aus der großen, weißen Niere<sup>5)</sup>. Die zerkleinerten Nieren werden mit Alkohol und darauf mit Aceton vom Wasser und der Hauptmenge des Fettes befreit, dann mit Aceton ausgekocht. Beim Abkühlen im Eisschrank scheiden sich die Ester ab. — Weitere Darstellungsmethode s. Windaus<sup>6)</sup>.

Eigenschaften.

Die Ester des Cholesterins geben ebenso wie das Cholesterin selbst die angeführten Reaktionen nach Liebermann-Burchard, Neuberg und Salkowski (S. 326 u. 327). Bei letzterer Reaktion ist die Rotfärbung nicht so deutlich wie beim Cholesterin. Die Schwefelsäure-Jodreaktion (S. 326) tritt bei den Estern nicht ein, vielleicht weil keine Benetzung erfolgt. Durch Digitonin werden die Ester nicht gefällt.

Cholesterin-ölsäureester. Wurde schon von Boudet<sup>7)</sup> aus Blut isoliert und unter dem Namen Serolin beschrieben. Er krystallisiert in langen, dünnen Nadeln vom Fp. 41—45°.  $[\alpha]_D = -18,48^\circ$  (in Chloroform + Alkohol<sup>8)</sup>).

Cholesterin-palmitinsäureester. Krystallisiert in weißen, seiden-glänzenden Blättchen vom Fp. 79°. Er ist schwerer löslich als der Ölsäureester.  $[\alpha]_D = -24,2^\circ$  (in Chloroform<sup>9)</sup>).

Cholesterin-stearinsäureester. Wurde neben dem Palmitinsäureester in der Nebenniere gefunden<sup>10)</sup>. Blättchen vom Fp. 82°<sup>11)</sup>.

Cholesterin-elaidinsäureester. Wurde von Panzer in der krankhaft veränderten Niere vermutet und synthetisch dargestellt<sup>12)</sup>. Krystalle vom Fp. 47°.

<sup>1)</sup> Kossel u. Obermüller: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 14, S. 559. 1890.

<sup>2)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 1, S. 413. 1906.

<sup>3)</sup> Hürthle: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 21, S. 331. 1895/96.

<sup>4)</sup> Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 73, S. 595. 1898.

<sup>5)</sup> Panzer: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 48, S. 519. 1906; Bd. 54, S. 239. 1907/08.

<sup>6)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 65, S. 110. 1910.

<sup>7)</sup> Ann. de chim. et de phys. [2], Bd. 52, S. 337. 1833.

<sup>8)</sup> Hürthle: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 21, S. 332. 1895/96.

<sup>9)</sup> Abderhalden u. Kautsch: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 65, S. 69. 1910.

<sup>10)</sup> Rosenheim u. Tebb: Journ. of physiol. Bd. 38, Proc. 54. 1909.

<sup>11)</sup> S. auch Hürthle: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 21, S. 345. 1895/96.

<sup>12)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 48, S. 519. 1906.



**234. Oxycholesterin**  $C_{27}H_{46}O_2$ . Findet sich im Blut und in verschiedenen Organen wie Knochenmark, Pankreas, Gehirn und im Haut- und Wollfett<sup>1)</sup>, und zwar ist es präformiert anzunehmen, ist also nicht etwa erst bei der Isolierung entstanden. Es kommt nicht in der Rindergalle, in der Leber und im Pferdekot vor<sup>2)</sup>. Durch Blut wird es auch außerhalb des Körpers aus Cholesterin gebildet<sup>3)</sup>. Über Vorkommen von Oxycholesterin bei gewissen pathologischen Veränderungen s. Lifschütz<sup>4)</sup>.

Das Oxycholesterin ist nach Lifschütz<sup>5)</sup> ein zweiwertiger Alkohol. Es ist nicht identisch mit den Cholesterinoxyden von Westphalen<sup>6)</sup>. Es ist wohl als intermediäres Abbauprodukt des Cholesterins im Körper zu betrachten.

Zur Darstellung aus Organteilen s. die oben angeführten Arbeiten. Darstellung durch Oxydation von Cholesterin mit Benzoylsuperoxyd (neben Metacholesterin) s. Lifschütz<sup>7)</sup>.

Oxycholesterin ist eine feste, amorphe, gelbliche Masse, die sich in fast allen organischen Solventien löst. Das einzige bekannte kristallisierte Derivat ist die Verbindung mit Digitonin. Diese zeigt einen Schmelzpunkt von  $218^\circ$ <sup>8)</sup>.

Zum Nachweis dienen die Cholesterinreaktionen von Salkowski und Liebermann, welche positiv ausfallen (S. 326 u. 327). Charakteristisch sind folgende Reaktionen:

1. Oxycholesterin, in Chloroform gelöst, gibt mit einer Mischung von 10 Vol. Eisessig und 1 Vol. konzentrierter Schwefelsäure eine Färbung, die von blauviolett in grün umschlägt. Der Umschlag geht bei Zusatz von etwas Eisenchlorid rasch in ein echtes Grün über. Diese Lösung zeigt spektroskopisch einen charakteristischen Streifen zwischen C und D<sup>9)</sup>.

2. Oxycholesterin, in Chloroform gelöst, gibt mit einigen Tropfen Dimethylsulfat („technisches“ Produkt) eine purpurne Färbung. Auf Zusatz von in Eisessig gelöstem Eisenchlorid wird die Farbe blaugrün, dann smaragdgrün. Spektroskopisch zeigt die Lösung einen scharfen Streifen im Rot<sup>10)</sup>. Cholesterin verhält sich anders.

Über quantitative Bestimmung (spektroskopisch) s. bei Lifschütz<sup>11)</sup>, über quantitative Bestimmung neben Cholesterin und über die Fällbarkeit des Oxycholesterins neben Cholesterin durch Digitonin s. bei Lifschütz<sup>12)</sup>.

**Metacholesterin.** Wurde neben Oxycholesterin durch künstliche Oxydation des Cholesterins gewonnen. Es findet sich auch in den unverseifbaren Teilen der Fette aus tierischen Organen<sup>13)</sup>. Nach Windaus und Lüders<sup>14)</sup> ist das „Metacholesterin“ verunreinigtes Cholesterin.

<sup>1)</sup> Lifschütz: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 50, S. 436. 1906; Bd. 53, S. 140. 1907; Bd. 58, S. 175. 1908; Bd. 63, S. 222. 1909; Bd. 117, S. 211. 1919. — Unna u. Golodetz: Biochem. Zeitschr. Bd. 20, S. 480. 1909. — M. C. Rosenheim: Biochem. Zeitschr. Bd. 8, S. 74. 1914.

<sup>2)</sup> Lifschütz: Biochem. Zeitschr. Bd. 52, S. 206. 1913.

<sup>3)</sup> Lifschütz: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 93, S. 209. 1914.

<sup>4)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 48, S. 373. 1913.

<sup>5)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 96, S. 342. 1916; Bd. 106, S. 271. 1919.

<sup>6)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 48, 1, S. 1064. 1915.

<sup>7)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 48, S. 400. 1913; Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 47, 2, S. 1453. 1914.

<sup>8)</sup> Lifschütz: Biochem. Zeitschr. Bd. 52, S. 207. 1913.

<sup>9)</sup> Lifschütz: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 50, S. 436. 1906; Bd. 53, S. 140. 1907; Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 41, 1, S. 252. 1908.

<sup>10)</sup> Rosenheim: Biochem. Journ. Bd. 10, S. 176. 1916; Chem. Zentralbl. 1916, II, S. 1192.

<sup>11)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 48, S. 378. 1913.

<sup>12)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 54, S. 212. 1913; Bd. 62, S. 219. 1914; Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 117, S. 201. 1921.

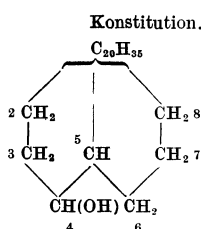
<sup>13)</sup> Lifschütz: Biochem. Zeitschr. Bd. 83, S. 18. 1917; Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 107, S. 201. 1919; Bd. 106, S. 271. 1919.

<sup>14)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 109, S. 183. 1920; s. dazu Lifschütz: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 111, S. 253. 1920.

**Eigenschaften.** Darstellung aus Cholesterin und Benzoylsuperoxyd in alkoholischer Lösung s. bei Lifschütz<sup>1)</sup>. Metacholesterin ist wesentlich leichter löslich als Cholesterin. Es krystallisiert nicht wie dieses in rhombischen Tafeln mit geradlinigen, sondern mit oval (elliptisch) nach außen gebogenen Rändern. Der Schmelzpunkt liegt bei 139—141°, also 4—5° tiefer als der des Cholesterins. Auch der Schmelzpunkt des Acetates liegt 4—5° tiefer als bei dem des Cholesterins. Das Dibromid schmilzt nach Lifschütz<sup>2)</sup> bei 101—106°. Molekulargewicht und spezifische Drehung des Metacholesterins sind jedoch von fast gleicher Größe wie beim Cholesterin.

Reaktionen s. in den zitierten Arbeiten von Lifschütz<sup>3)</sup>.

**Vorkommen.** 235. **Koprosterin** C<sub>27</sub>H<sub>48</sub>O<sup>4)</sup>. Findet sich im menschlichen Kot, wo es wahrscheinlich durch bakterielle Reduktion von Cholesterin entsteht. Außerhalb des Darmkanals ist die Reduktion durch Bakterienwirkung nicht geglückt<sup>5)</sup>. Der Gehalt der Faeces an Koprosterin ist von der Nahrung abhängig: Bei reiner Milchdiät soll es fehlen<sup>6)</sup>, bei Ernährung mit Gehirnschubstanz soll es sich vermehrt finden<sup>7)</sup>. Bei Pflanzenfressern war es im Darm nicht auffindbar<sup>8)</sup>. Die von Marcet und von Hinterberger<sup>9)</sup> schon früher isolierten Stoffe (Excretin) waren vermutlich unreines Koprosterin.



Das Koprosterin ist ein sekundärer Alkohol wie das Cholesterin. Die bei diesem vorliegende Doppelbindung ist durch Aufnahme von 2 Wasserstoffatomen verschwunden. Es ist jedoch nicht identisch mit dem Hauptprodukt der katalytischen Reduktion des Cholesterins, des Dihydrocholesterins ( $\beta$ -Cholestanol). Beim Ersatz der OH-Gruppe im Koprosterin durch Wasserstoff entsteht ein anderer Körper (Pseudocholestan oder Koprostan<sup>10)</sup> als bei derselben Behandlung des  $\beta$ -Cholestanols. Die Isomerie muß also unabhängig sein von der Stellung der OH-Gruppe; nach Windaus beruht sie auf Stereoisomerie am C<sub>5</sub>. Immerhin gelang es Windaus, das Koprosterin aus den Produkten der katalytischen Reduktion des Cholesterins auf Umwegen zu gewinnen<sup>11)</sup>. Es dürfte wohl die gleiche Konstitution haben, die für das Cholesterin angenommen wird. Es unterscheidet sich dadurch von ihm, daß die Doppelbindung hydriert ist, und daß am C<sub>5</sub> Stereoisomerie vorliegt.

**Darstellung.** Zur Darstellung wird der trockene und gepulverte Kot mit Äther extrahiert, der Rückstand aus dem Ätherextrakt wird mit alkoholischem Natriumäthylat gekocht. Das Koprosterin läßt sich aus dem Verseiften mit Äther ausziehen; es ist nach mehrfachem Umkrystallisieren rein.

**Eigenschaften.** Koprosterin krystallisiert aus Alkohol in feinen Nadeln, und zwar ohne Krystallwasser. Die Löslichkeitsverhältnisse sind ähnlich wie beim Cholesterin. Der Schmelzpunkt liegt bei 101—102°; H. Fischer fand nach mehrfachem Umkrystallisieren aus Alkohol und aus Aceton den Schmelzpunkt zu 112—116°<sup>12)</sup>.  $[\alpha]_D = +24,53^\circ$  (in Alkohol, Fischer<sup>12)</sup>. Es addiert kein Halogen, nimmt jedoch Ozon auf<sup>13)</sup>. Mit Digitonin (S. 326) entsteht eine schwer lösliche Verbindung<sup>14)</sup>.

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 129, S. 115. 1922.

<sup>2)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 129, S. 126. 1922; s. dazu die Angaben von Windaus u. Lüders (s. oben) und Lifschütz: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 111, S. 254. 1920; Bd. 114, S. 288. 1921.

<sup>3)</sup> Ferner Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 114, S. 108. 1921; Bd. 117, S. 201 u. 212. 1921.

<sup>4)</sup> H. Fischer: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 73, S. 232. 1911.

<sup>5)</sup> Bondzynski u. Humnicki: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 22, S. 396. 1896. — Bondzynski: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 29, 1, S. 476. 1896.

<sup>6)</sup> Müller: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 29, S. 129. 1900.

<sup>7)</sup> Dorée u. Gardner: Proc. of the roy. soc. Bd. 80, S. 227. 1908; Chem. Zentralbl. 1908, II, S. 1278; Proc. of the roy. soc. Bd. 81, S. 109. 1909. — Fraser u. Gardner: Proc. of the roy. soc. Bd. 81, S. 230 u. 505. 1909; ref. Chem. Zentralbl. 1909, II, S. 375. — Ellis u. Gardner: Proc. of the roy. soc. Bd. 81, S. 505. 1909; ref. Chem. Zentralbl. 1910, I, S. 556.

<sup>8)</sup> Dorée u. Gardner s. bei 7; s. aber auch König u. Schluckebier: Zeitschr. f. Untersuch. d. Nahrungs- u. Genußmittel Bd. 15, S. 641. 1908.

<sup>9)</sup> Ann. de chim. et de phys. Bd. 59, S. 91. 1860; Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 166, S. 213. 1873.

<sup>10)</sup> Mauthner: Monatshefte f. Chemie Bd. 30, S. 639. 1909.

<sup>11)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 49, 2, S. 1724, 1916.

<sup>12)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 73, S. 232. 1911.

<sup>13)</sup> Dorée: Journ. of the chem. soc. Bd. 95, S. 645. 1909; ref. Chem. Zentralbl. 1909, I, S. 1975.

<sup>14)</sup> Windaus: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 42, 1, S. 242. 1909.

Die Darstellung der Ester ist ähnlich wie beim Cholesterin (S. 329).

Ester.

Koprosterylacetat:  $C_{29}H_{50}O_2$  Nadeln vom Fp.  $89^\circ$ .

Koprosterylpropionat  $C_{30}H_{52}O_2$ . Zeigt beim Abkühlen seiner Schmelze nicht die Farbreaktionen wie das Propionat des Cholesterins (S. 327).

Koprosterylbenzoat  $C_{34}H_{52}O_2$ . Tafeln vom Fp.  $122^\circ$  <sup>1)</sup>.

Zum Nachweis dienen die meisten Cholesterinreaktionen (S. 326 u. 327), welche aber in etwas veränderter Form ausfallen. Bei der Probe von Salkowski tritt zuerst gelbe, dann orangerote, dann dunkelrote Färbung auf, bei der von Liebermann-Burchard sofort Blaufärbung, die bald in Grünfärbung übergeht. Koprosterin färbt das Reagens nur ungefähr ein Drittel so stark wie Cholesterin. Über das Verhalten des Koprosterins gegenüber Brom und Digitonin s. oben. Die Farbreaktion von Liebermann-Burchard kann auch zur quantitativen Bestimmung benutzt werden <sup>2)</sup>.

Nachweis.

**Hippokoprosterin** (Chortosterin nach Dorée und Gardner)  $C_{27}H_{54}O$  oder  $C_{27}H_{56}O$ . Wurde aus Pferdekot gewonnen <sup>3)</sup>. Es ist nach Dorée und Gardner <sup>4)</sup> kein Produkt des tierischen Körpers, sondern stammt aus der Grasnahrung <sup>5)</sup>. Es ist ein gesättigter Alkohol, der vielleicht gar nicht konstitutionell zu den Sterinen gehört. Es bildet Krystalle vom Fp.  $79^\circ$ , ist optisch inaktiv, gibt keine Farbenreaktionen. Eine Anzahl Derivate werden von Dorée und Gardner beschrieben.

**236. Isocholesterin**  $C_{27}H_{46}O$ . Wurde isoliert (als Ester) aus dem Wollfett der Schafe <sup>6)</sup>. Daneben wird von Darmstaedter und Lifschütz eine zweite Isocholesterinart vermutet <sup>7)</sup>. Nach Cohen <sup>8)</sup> findet es sich auch in Pflanzen (afrikanischer Rubber). Daß es in der Vernix caseosa vorkommt, wird von Unna und Golodetz <sup>9)</sup> bestritten.

Vorkommen.

Zur Darstellung wird Wollfett (Lanolin) mit Alkohol ausgekocht. Der ungelöste Teil wird verseift: Cholesterin und Isocholesterin werden mit Äther aufgenommen und mit Benzoylchlorid in die Benzoate übergeführt. (Unverändertes Cholesterin kann mit Alkohol entfernt werden.) Die Benzoate lassen sich durch vorsichtiges Krystallisieren aus Äther voneinander trennen (s. unten). Das Isocholesterin wird aus dem Benzoat durch Kochen mit alkoholischer Kalilauge gewonnen.

Darstellung.

Isocholesterin scheidet sich aus Äther und Aceton in feinen Nadeln ab. Die Lösung in heißem Alkohol erstarrt beim Abkühlen zu einer Gallerte. Der Schmelzpunkt liegt bei  $139-141^\circ$ .  $[\alpha]_D = +59,1^\circ$  (in Äther). Die Löslichkeit ist ähnlich der des Cholesterins. Durch Einwirken von Luft und Licht verändert es sich allmählich <sup>10)</sup>.

Eigenschaften.

Isocholesterylacetat  $C_{29}H_{48}O_2$ . Aus Isocholesterin (aus Rubber gewonnen) und Essigsäureanhydrid. Blättchen vom Fp.  $124-128^\circ$  bzw.  $134-135^\circ$  <sup>11)</sup>.

Ester.

<sup>1)</sup> Bondzynski u. Humnicki s. oben. — Dorée u. Gardner: Proc. of the roy. soc. Bd. 80, S. 231. 1908; ref. Chem. Zentralbl. 1908, II, S. 1278.

<sup>2)</sup> Myers u. Wardell: Journ. of biol. chem. Bd. 36, S. 147. 1918; Chem. Zentralbl. 1919, II, S. 399.

<sup>3)</sup> Bondzynski u. Humnicki: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 22, S. 409. 1896. — v. Gittelman-Wilenko: Anz. Akad. d. Wiss. Krakau 1906; Chem. Zentralbl. 1906, II, S. 1242.

<sup>4)</sup> Proc. of the roy. soc. Bd. 80, S. 217. 1908; ref. Chem. Zentralbl. 1908, II, S. 1277.

<sup>5)</sup> S. auch Windaus u. Hauth: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 40, 3, S. 3686, Fußnote. 1907.

<sup>6)</sup> E. Schulze: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 5, S. 1075. 1872; Bd. 6, S. 251. 1873. — E. Schulze u. Barbieri: Journ. f. prakt. Chemie, N. F., Bd. 25, S. 159. 1882. — Moreschi: Rend. atti d. Reale Accad. dei Lincei Roma Bd. 19, II, S. 53. 1910.

<sup>7)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 31, 1, S. 97 u. 1122. 1898.

<sup>8)</sup> Arch. d. Pharmazie Bd. 246, S. 518 u. 592. 1908.

<sup>9)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 20, S. 496. 1909; s. dagegen Ruppel: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 21, S. 122. 1895/96.

<sup>10)</sup> E. Schulze u. Winterstein: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 48, S. 546. 1906.

<sup>11)</sup> Cohen s. bei <sup>8)</sup>.

Isocholesterylstearat  $C_{45}H_{80}O_2$ . Nadeln vom Fp.  $72^\circ$  <sup>1)</sup>.

Isocholesterylbenzoat  $C_{34}H_{50}O_2$ . Aus Isocholesterin und Benzoylchlorid durch Erhitzen oder auch bei Gegenwart von Pyridin in der Kälte. Feine Nadeln aus Äther, Fp.  $194$ — $195^\circ$ ; läßt sich leicht von den derben Tafeln des Cholesterylbenzoats durch Abschlämmen trennen <sup>2)</sup>.

Nachweis. Isocholesterin gibt die Reaktion von Liebermann-Burchard <sup>3)</sup> (S. 327). Die Probe von Salkowski (S. 326) ist sehr wenig ausgeprägt <sup>4)</sup>. Über den spektroskopischen Nachweis s. bei Lifschütz <sup>5)</sup> und Unna und Golodetz <sup>3)</sup>.

**Spongosterin**  $C_{27}H_{48}O$ . Wurde aus einem Kieselchwamm des Mittelmeeres (Suberites domuncula) von Henze <sup>6)</sup> isoliert.

Spongosterin bildet glänzende Blättchen mit 1 Mol. Krystallwasser, vom Fp.  $123$ — $124^\circ$ .  $[\alpha]_D^{25} = -19,59^\circ$  (Chloroformlösung). Es addiert Brom und enthält eine Hydroxylgruppe. Das Acetat zeigt den Fp.  $124,5^\circ$ , das Benzoat Fp.  $128^\circ$ . Einige weitere Derivate s. in den zitierten Arbeiten. — Spongosterin gibt die Reaktion von Liebermann-Burchard (S. 326), dagegen die von Salkowski (S. 326) nur wenig deutlich.

**Bombicesterin**  $C_{27}H_{46}O$  (?). Läßt sich aus den Puppen der Seidenraupen isolieren <sup>7)</sup>. Es bildet Blättchen vom Fp.  $148^\circ$ , die aus Alkohol mit 1 Mol. Wasser krystallisieren.  $[\alpha]_D^{15} = -34^\circ$  (in Chloroform). Das Acetat zeigt den Fp.  $129^\circ$ , das Dibromid den Fp.  $111^\circ$ . Weitere Derivate s. im Original.

**Stellasterin**  $C_{27}H_{44}O$ . Findet sich in den Blinddärmen und Testikeln von Echinodermen und von Astropekten <sup>8)</sup>. Der Schmelzpunkt liegt bei  $149$ — $150^\circ$ , der des Acetats bei  $176$ — $177^\circ$ , der des Benzoats bei  $100$ — $125^\circ$ .

**Clonasterin**  $C_{27}H_{46}O$ . Wurde von Dorée <sup>9)</sup> aus Clona celata isoliert. Es bildet Blättchen vom Fp.  $137$ — $138^\circ$ .  $[\alpha]_D = -37,04^\circ$  (in Chloroform). Das Acetat schmilzt bei  $134$ — $135^\circ$ , das Benzoat bei  $143$ — $144^\circ$ , das Dibromid bei  $114^\circ$ .

**Asteriasterin**. Wurde von Page <sup>10)</sup> aus Organen von Asterias forbesi dargestellt. Krystalle vom Fp.  $70^\circ$ . Das Acetat schmilzt bei  $97^\circ$ , das Benzoat bei  $125^\circ$ . Gibt mit Digitonin ein Digitonid. Die Reaktion nach Liebermann-Burchard (S. 327) ist positiv, die nach Salkowski (S. 326) ist atypisch, die nach Tschugajew (S. 327) ist negativ.

## Gallensäuren.

(Bearbeitet von F. Wrede-Greifswald.)

Die Gallensäuren werden in der Leber bereitet und gehen in die Galle und von da evtl. in andere Organe oder Flüssigkeiten über. Sie bestehen meist aus 2 Komponenten (gepaarte Gallensäuren), deren eine für die Gallensäuren charakteristisch ist (Cholsäure usw.). Bei einigen Tierarten findet sich fast ausschließlich eine bestimmte Gallensäure, bei anderen liegt ein Gemenge vor. Die Gallensäuren sind in der Galle als Natriumsalze enthalten. Die Alkalisalze sind löslich in Wasser und Alkohol, unlöslich in Äther; in wässriger Lösung werden sie zum Teil durch Neutralsalze ausgefällt.

Über die Konstitution und deren Zusammenhang mit Cholesterin s. bei Cholsäure (S. 335). Die zahlreichen für die Ermittlung der Konstitution dargestellten Oxydations- und Reduktionsprodukte werden, da sie sich nicht im Organismus finden, hier nicht angeführt.

<sup>1)</sup> E. Schulze: Journ. f. prakt. Chemie Bd. 7, S. 174. 1873; Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 6, S. 252. 1873.

<sup>2)</sup> E. Schulze: Journ. f. prakt. Chemie Bd. 7, S. 174. 1873; Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 6, S. 252. 1873; s. auch Cohen: Arch. d. Pharmazie Bd. 246, S. 518 u. 502. 1908.

<sup>3)</sup> Unna u. Golodetz: Biochem. Zeitschr. Bd. 20, S. 469 u. 482. 1909.

<sup>4)</sup> S. auch E. Schulze: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 14, S. 522. 1890.

<sup>5)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 41, I, S. 252. 1908.

<sup>6)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 41, S. 109. 1904; Bd. 55, S. 427. 1908.

<sup>7)</sup> Menozzi u. Moreschi: Rend. d. Reale Accad. dei Lincei Roma [5], Bd. 17, I, S. 95. 1908; ref. Chem. Zentralbl. 1908, I, S. 1378.

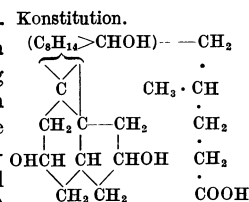
<sup>8)</sup> Kossel u. Edlbacher: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 94, S. 264. 1915.

<sup>9)</sup> Biochem. Journ. Bd. 4, S. 92. 1909.

<sup>10)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 57, S. 471. 1923; ref. Chem. Zentralbl. 1923, II, S. 1627.

**237. Cholsäure (Cholalsäure)  $C_{24}H_{40}O_5$ .** Sie kommt in geringer Menge im Vorkommen. Dünndarm, reichlicher im Dickdarm vor, auch im Harn bei Ikterus; sie stammt aus der Glykochol- bzw. Taurocholsäure der Galle. Sie kann durch Hydrolyse mit Alkalien aus Galle oder aus reiner Glykochol- oder Taurocholsäure gewonnen werden<sup>1)</sup>.

Bei gelinder Oxydation wird eine Triketosäure  $C_{20}H_{33}(CO)_3COOH$  gebildet<sup>2)</sup>. Damit ist bewiesen, daß 3 sekundäre Alkoholgruppen sich in der Cholsäure finden. Bei der trockenen Destillation im Vakuum werden aus Cholsäure 3 Mol. Wasser abgespalten unter Bildung einer Verbindung mit 3 Doppelbindungen, der Cholatriencarbonsäure  $C_{24}H_{34}O_2$ <sup>3)</sup>. Die Cholatriencarbonsäure kann katalytisch hydriert werden zur Cholancarbonsäure  $C_{24}H_{40}O_2$  (Cholansäure nach Wieland). Diese Cholansäure konnte von Windaus und Neukirchen<sup>4)</sup> auch auf durchsichtige Weise aus Cholesterin erhalten werden (s. S. 324). Auch die Stellung der 3 Hydroxylgruppen konnte von Wieland wahrscheinlich gemacht werden. Unter Zugrundelegung der Formel für das Cholesterin (s. dort) kann der Cholsäure mit ziemlicher Sicherheit beifolgende Konstitution zuerkannt werden. Der Rest  $C_6H_{14}$  ist noch ganz ungeklärt, dürfte aber auf Grund der Zahl der Wasserstoffatome noch 2 Ringsysteme enthalten.



Über die verschiedenen Methoden zur Isolierung aus Galle s. die Arbeiten Darstellung. von Mylius<sup>5)</sup>, Lassar-Cohn<sup>6)</sup>, Vahlen<sup>7)</sup>, Pregl<sup>8)</sup>, Pregl und Buchtala<sup>9)</sup>, Langheld<sup>10)</sup>, Wieland und Weil<sup>11)</sup>.

Darstellung nach Hammarsten<sup>12)</sup>: Rindergalle wird durch Zusatz von Alkohol schleimfrei gemacht. Der Alkohol wird abdestilliert. In einer Probe der wässrigen Lösung wird durch Eindampfen der Trockengehalt bestimmt. Die ganze Menge der Lösung wird so verdünnt, daß der Gehalt an Trockensubstanz 5% beträgt, dann wird 30 Stunden mit  $\frac{1}{4}$  Volumen 30proz. Natronlauge in einem eisernen Gefäße (Autoklav) gekocht, nach dem Erkalten wird annähernd neutralisiert und filtriert. Die rohe Säure wird dann mit Salzsäure gefällt. Diese wird in Wasser mit etwas Ammoniak gelöst, so daß die Lösung nicht mehr als 2% Gallensäure enthält. Darauf wird mit einer 20proz. Bariumchloridlösung versetzt, bis gerade keine Fällung mehr entsteht. Diese Fällung (Bariumsalze der Fettsäuren, Desoxycholsäure usw.) wird abfiltriert, im Filtrat wird mit Salzsäure die Cholsäure gefällt. Die Flüssigkeit wird nach einiger Zeit abgossen, die rohe Cholsäure wird mit Wasser mehrmals durchgeknetet und gewaschen. Hierauf wird sie mehrfach mit wenig starkem Alkohol durchgearbeitet, wobei sie meist krystallisiert. Dann wird aus heißem Alkohol umkrystallisiert, bis sie bei 196—197° schmilzt. Aus den Mutterlaugen erhält man beim Einengen weitere kleine Mengen Säure, in ihnen findet sich auch noch etwas Desoxycholsäure. — Zur Aufarbeitung von sog. Sommergalle, die schlechtkrystallisierte Produkte liefert, eignet sich gut das Verfahren von Pregl und Buchtala<sup>13)</sup>. Rindergalle enthält etwa 5% Cholsäure<sup>14)</sup>.

<sup>1)</sup> Strecker: Annalen d. Chemie u. Pharmazie Bd. 67, S. 1. 1848.

<sup>2)</sup> Hammarsten: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 14, 1, S. 71. 1881.

<sup>3)</sup> Wieland u. Weil: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 80, S. 287. 1912.

<sup>4)</sup> Ber. d. Dtsch. chem. Ges. Bd. 52, 2, S. 1915. 1919.

<sup>5)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 12, S. 262. 1888. <sup>6)</sup> desgl. Bd. 19, S. 563. 1893.

<sup>7)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 21, S. 253. 1896.

<sup>8)</sup> Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 71, 303. 1898; Monatshefte f. Chemie Bd. 24, S. 19. 1903.

<sup>9)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 74, S. 198. 1911.

<sup>10)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 41, 1, S. 378. 1908.

<sup>11)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 80, S. 287. 1912.

<sup>12)</sup> S. Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden (Abderhalden), Abt. I, Teil 6, Heft 1, Lfg. 53, S. 227. 1922. — Die oben angeführte Methode richtet sich teilweise nach einer Privatmitteilung von Herrn Prof. Hammarsten.

<sup>13)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 74, S. 198. 1911.

<sup>14)</sup> Wieland u. Weyland: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 110, S. 123. 1920.

Über den Nachweis der Cholsäure in tierischen Flüssigkeiten s. § 246.

Isolierung aus Kot. Über die Isolierung der Cholsäure aus Kot s. § 824.

Eigenschaften. Cholsäure krystallisiert aus Alkohol in Tetraedern mit 1 Mol. Krystallalkohol, aus feuchtem Äther oder wasserhaltiger Essigsäure in Tafeln oder Prismen mit 1 Mol. Wasser. Fp. 196—198°. 1 Teil Cholsäure löst sich in 4000 Teilen kaltem Wasser, in 750 Teilen heißem Wasser, in ca. 20 Teilen 70proz. Alkohol, in 27 Teilen Äther. Der Krystallalkohol oder das Krystallwasser entweicht bei ca. 130° völlig. Die Säure schmeckt süßlichbitter. Gegen heiße Alkalien ist sie sehr widerstandsfähig.

Die Alkalisalze sind leichtlöslich in Wasser, weniger in Alkohol. Das Natriumsalz fällt aus der Lösung in Natronlauge beim Erhitzen aus, löst sich aber beim Abkühlen wieder<sup>1)</sup>. Eine nicht zu verdünnte alkoholische Lösung der Alkalisalze wird durch Äther krystallinisch gefällt. Das Bariumsalz krystallisiert in seidenglänzenden Nadeln; es löst sich in 30 Teilen kaltem Wasser, leichter in heißem. Es läßt sich schwer unzersetzt umkrystallisieren<sup>2)</sup>. Die Salze des Bariums, Bleies und Silbers lösen sich leicht in warmem Alkohol, die beiden letzteren sind in Wasser fast unlöslich. Beim Kochen der Cholsäure mit Eisessig entstehen Acetylderivate<sup>3)</sup>. Über den Äthylester s. bei Bondi und Müller<sup>4)</sup>.

Optische Eigenschaften.  $[\alpha]_D = +37,02^\circ$  (krystallwasserfrei, in Alkohol<sup>5)</sup>). Das Natriumsalz zeigt:  $[\alpha]_D = +27,6^\circ$  (in 4proz. wässriger Lösung). Die spezifische Drehung nimmt mit abnehmender Konzentration zu.

Anhydride. Beim Erhitzen für sich oder mit Säuren, auch bei der Fäulnis im Darne, bildet die Cholsäure Anhydride. Eins derselben, das Dyslysin ( $C_{24}H_{36}O_3$  ?), soll als amorphe, in Wasser unlösliche Masse sich in dem Kot finden. Beim Kochen mit Alkali soll es sich wieder in Cholsäure verwandeln.

Nachweis. Zum Nachweis dienen folgende Reaktionen:

1. Mylius' Jodreaktion<sup>6)</sup>. 0,02 g krystallisierte Cholsäure werden in 0,5 g Alkohol gelöst und mit 1 ccm  $n_{10}$ -Jodlösung versetzt. Beim vorsichtigen Verdünnen mit Wasser erstarrt die Flüssigkeit plötzlich zu einem Brei von Nadeln. Die Verbindung zeigt im auffallenden Licht gelben Metallglanz, im durchfallenden blaue Färbung. Mit der Reaktion, die für Cholsäure allein charakteristisch ist, können sehr kleine Mengen, auch neben Choleinsäure, nachgewiesen werden<sup>7)</sup>.

2. Reaktion nach Hammarsten<sup>8)</sup>. Pulverisierte Cholsäure wird in 25proz. Salzsäure eingetragen. Es tritt eine Violettfärbung auf, die langsam in Grün und Gelb übergeht. Die violette Lösung zeigt ein Absorptionsband in der Gegend der D-Linie.

Die beiden folgenden Reaktionen fallen auch mit den gepaarten Cholsäuren positiv aus.

3. Fluoreszenzreaktion. In konzentrierter Schwefelsäure löst sich Cholsäure zu einer rotgelben Flüssigkeit, die grüne Fluoreszenz zeigt (Bildung von Dehydrocholan<sup>9)</sup>).

<sup>1)</sup> Ekbohm: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 50, S. 101. 1906/07. — Langheld: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 41, 1, S. 380. 1908.

<sup>2)</sup> Hammarsten: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 36, S. 540. 1902.

<sup>3)</sup> Ekbohm: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 50, S. 97. 1906/07.

<sup>4)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 47, S. 502. 1906.

<sup>5)</sup> Vahlen: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 21, S. 265. 1895.

<sup>6)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 11, S. 306. 1887; Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 28, S. 385. 1895.

<sup>7)</sup> Örum: Skandinav. Arch. f. Physiol. Bd. 16, S. 300. 1904.

<sup>8)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 61, S. 495. 1909.

<sup>9)</sup> S. auch Pregl: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 45, S. 166. 1905.

4. Pettenkofers Reaktion. Die betreffende wässrige Lösung wird mit wenig 10proz. Rohrzuckerlösung und tropfenweise unter Umschütteln mit konzentrierter Schwefelsäure versetzt, wobei die Temperatur auf etwa 70° gehalten wird. Es tritt, sobald die zunächst ausgefallte Cholsäure durch weiteren Zusatz von Schwefelsäure wieder gelöst ist, eine kirschrote Färbung auf, die bald in Purpurrot und im Verlauf von 8 Tagen unter Dunklerwerden ins Blaurote übergeht. Die purpurrote Lösung, mit Alkohol verdünnt, zeigt einen Absorptionsstreifen zwischen D und E neben E und einen zweiten vor F<sup>1)</sup>. Anwesenheit von Proteinstoffen und solchen Körpern, die sich leicht mit Schwefelsäure zersetzen, sowie von Farbstoffen und Oxydationsmitteln beeinträchtigen die Reaktion sehr. Ölsäure und Phosphatide geben dieselbe Reaktion. Gewisse organische Substanzen, z. B. Amylalkohol, verhalten sich ähnlich, doch fehlen die Spektralerscheinungen. Statt Rohrzuckerlösung kann nach Udránszky<sup>2)</sup> auch Furfurol benutzt werden. Die Probe zeigt dann noch ca.  $\frac{1}{20}$  mg Cholsäure an. Nach Ville und Derrien<sup>3)</sup> ist diese Reaktion aber verschieden von der mit Rohrzucker, da die Absorptionsstreifen nicht die gleiche Lage haben. — Weitere Reaktionen s. bei Bang<sup>4)</sup> und Jolles<sup>5)</sup>.

Nachweis der Cholsäure in Faeces s. § 824, im Harn § 622.

238. Desoxycholsäure  $C_{24}H_{40}O_4$ . Wurde von Mylius<sup>6)</sup> und Vahlen<sup>7)</sup> aus Vorkommen. faulender Rindergalle gewonnen. Pregl<sup>8)</sup> stellte sie auch aus frischer Rindergalle dar, Küster aus Rindergallensteinen<sup>9)</sup>. H. Fischer erhielt eine Säure aus Kot, die wohl mit Desoxycholsäure identisch ist<sup>10)</sup>. Neuerdings ist von Mörner<sup>11)</sup> ein menschlicher Darmstein untersucht worden, der größtenteils aus Additionsverbindungen von Desoxycholsäure mit höheren Fettsäuren („Choleinsäure“) bestand. — Ihr freies Vorkommen dürfte auf einen Zerfall der mit Taurin oder Glykokoll gepaarten Verbindungen zurückzuführen sein<sup>12)</sup>. Die Angabe, daß sie aus Cholsäure durch Fäulnis (Mylius) oder durch Reduktion (Vahlen) entsteht, konnte von Ekbohm<sup>13)</sup> nicht bestätigt werden.

Über die Identität von Desoxycholsäure mit der „Choleinsäure“, die zu- Beziehung zur Choleinsäure. erst Latschinoff<sup>14)</sup> aus Galle isolierte, ist viel gestritten worden<sup>15)</sup>. Erst Wieland und Sorge zeigten, daß „Choleinsäure“ keine spezifische Gallensäure

<sup>1)</sup> Schenk: Anat.-phys. Untersuch. Wien 1872, S. 47; s. auch Drechsel, Journ. f. pr. Chem. Bd. 24, S. 44. 1881.

<sup>2)</sup> Mylius: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 11, S. 492. 1887. — Udránszky: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 12, S. 370. 1888.

<sup>3)</sup> Bull. de la soc. chim. de France [4], Bd. 5, S. 895. 1909; ref. Chem. Zentralbl. 1909, II, S. 1699; s. auch Guérin: Journ. de pharm. et de chim. Bd. 28, S. 54. 1908; ref. Chem. Zentralbl. 1908, II, S. 641.

<sup>4)</sup> Laerebok i Urinanalyse. Kjöbenhavn 1917.

<sup>5)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 57, S. 30. 1908.

<sup>6)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 19, 1, S. 373. 1886.

<sup>7)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 21, S. 253. 1895/96; Bd. 23, S. 99. 1897.

<sup>8)</sup> Sitzungsber. d. Akad. d. Wiss. Wien, 1902, Mathem.-naturw. Kl. III, Abt. IIb, S. 1024; Monatshefte f. Chemie Bd. 24, S. 21. 1904. — Pregl u. Buchtala: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 74, S. 198. 1911.

<sup>9)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 69, S. 463. 1910. <sup>10)</sup> desgl. Bd. 73, S. 233. 1911.

<sup>11)</sup> Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 130, S. 24. 1924; s. auch Sjöqvist, Hygiea, Festband, 1908, II, No. 48.

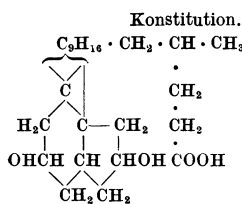
<sup>12)</sup> S. auch Gullbring: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 45, S. 448. 1905.

<sup>13)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 50, S. 97. 1906/07.

<sup>14)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 18, 2, S. 3039. 1885; Bd. 19, 1, S. 1140. 1886; Bd. 20, 1, S. 1043 u. 1053. 1887.

<sup>15)</sup> Lassar-Cohn: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 17, S. 607. 1893. — Mylius: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 20, 2, S. 1970. 1887. — Vahlen: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 23, S. 99. 1897. — Langheld: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 41, 1, S. 378. 1908. — Pregl: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 65, S. 157. 1910.

ist, sondern ein Additionsprodukt von 8 Mol. Desoxycholsäure mit 1 Mol. Fettsäure (meist Gemenge von Palmitin- und Stearinsäure<sup>1</sup>). Die Desoxycholsäure zeigt eine ungewöhnliche Neigung, sehr schwer trennbare Doppelverbindungen zu geben („Choleinsäuren“).



Desoxycholsäure läßt sich durch Wasserabspaltung in eine Säure mit 2 Doppelbindungen umwandeln, diese durch katalytische Reduktion in Cholsäure (s. S. 335). Die beiden auch noch auf anderem Wege nachgewiesenen Hydroxylgruppen in der Desoxycholsäure befinden sich an derselben Stelle, wo sich 2 von den 3 Hydroxylgruppen in der Cholsäure befinden. Die Konstitution dürfte nach Wielands Untersuchungen die nebenstehende sein.

Einen weiteren Beweis dafür, daß die 2 Hydroxylgruppen identisch sind mit zweien der 3 Hydroxylgruppen der Cholsäure, erbrachten Boedecker und Volk<sup>2</sup>): Cholsäure konnte durch Abspalten von 1 Mol. Wasser und Addition von 2 Wasserstoffatomen in Desoxycholsäure übergeführt werden.

Darstellung.

Die bei der Bereitung der Cholsäure (S. 335) erhaltene Fällung mit Bariumchlorid und die alkoholischen Mutterlaugen der Cholsäure dienen zur Bereitung der Desoxycholsäure. Die Mutterlaugen werden neutralisiert, der Alkohol wird abgetrieben. Der Rückstand wird nach dem Lösen in Wasser mit Salzsäure ausgefällt. (Bei starker Färbung wird vor der Fällung mit Lauge gekocht<sup>3</sup>). Die ausgefallenen Rohsäuren werden in Wasser mit Ammoniak gelöst, die Flüssigkeit wird mit 20 proz. Bariumchloridlösung gefällt.

Die Bariumsalze werden nun in wenig verdünntem kalten Alkohol gelöst und vom Rückstand (Bariumseifen usw.) abfiltriert. Das Filtrat wird warm mit Soda zersetzt. Nach dem Trocknen und Zerreiben des Rückstandes wird mit Alkohol erschöpft. Die alkoholische Lösung wird nötigenfalls mit etwas Tierkohle entfärbt, gegebenenfalls wird auch die Fällung mit Bariumchlorid noch einmal wiederholt. Aus den Alkalisalzen werden Desoxycholsäure und Choleinsäure mit Salzsäure gefällt, ausgewaschen und getrocknet. Die trockene Masse wird mit Eisessig verrieben und abgesaugt, wodurch Verunreinigungen ins Filtrat gehen. Das Waschen mit Eisessig wird wiederholt. Nun wird der Filterrückstand aus heißem Eisessig umkrystallisiert, bis die Desoxycholsäure-Essigsäureverbindung bei 144—145° schmilzt. — Sollte die Rohsäure beim Verreiben mit Eisessig schmierig bleiben, so wird sie in wenig heißem Eisessig gelöst. Beim Erkalten werden meist Krystalle erhalten.

Gewinnung aus Choleinsäure.

Um aus den „Choleinsäuren“ die Desoxycholsäure zu gewinnen, führt man sie zweckmäßig in die schwerlösliche Essigsäure- oder Xylolverbindung über. Diese lassen sich relativ leicht durch Erhitzen im Vakuum spalten<sup>4</sup>). — Darstellung aus reiner Glykocholeinsäure und Taurocholeinsäure s. bei Wahlgren<sup>5</sup>). Darstellung aus Cholsäure s. bei Boedecker und Volk.<sup>2</sup>) — Nach Wieland und Weyland<sup>6</sup>) enthält Rindergalle ca. 0,7% Desoxycholsäure.

Eigenschaften.

Die Desoxycholsäure krystallisiert mit fast allen Lösungsmitteln, aus denen sie erhalten war, in Form von sehr schwer trennbaren Doppelverbindungen aus. Es bedarf tagelangen Erhitzens auf 130° im Vakuum, um Eisessig, Essigester, Aceton oder Äther zu entfernen<sup>7</sup>). Krystallalkohol kann etwas leichter entfernt werden, nämlich schon durch Erhitzen auf 110° im Vakuum. Die reine Säure

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 97, S. 1. 1916.

<sup>2</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 55, S. 2302. 1922.

<sup>3</sup>) Pregl: Sitzungsber. d. Akad. d. Wiss. Wien 1902, Mathem.-naturw. Kl. III, Abt. IIb, S. 1024. — Pregl u. Buchtala: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. 74, S. 198. 1911.

<sup>4</sup>) Wieland u. Sorge: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 97, S. 15. 1916.

<sup>5</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 36, S. 556. 1902. — Gullbring: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 45, S. 455. 1905.

<sup>6</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 110, S. 123. 1920.

<sup>7</sup>) Wieland u. Sorge: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 97, S. 1. 1916.



zeigt einen Fp. von  $172^\circ$ ;  $[\alpha]_D = +57,02^\circ$  (in Alkohol<sup>1</sup>). Sie ist sehr schwer löslich in Wasser, auch schwerlöslich in kalter Essigsäure, leichtlöslich in Alkohol (leichter als Cholsäure). Der Geschmack ist stark bitter, nicht zugleich süß wie der der Cholsäure.

Folgende Eigenschaften der Salze können unter anderem zur Unterscheidung der Desoxycholsäure und Cholsäure benutzt werden: Das Natriumsalz der Desoxycholsäure wird durch 10proz. Natronlauge aus wässriger Lösung gefällt. Selbst aus sehr verdünnter Lösung der Säure in Ammoniak wird durch Bariumchlorid das Bariumsalz in der Kälte krystallinisch ausgefällt (das cholsaure Barium erst durch Erhitzen der konzentrierten Lösung). Dabei ist allerdings zu beachten, daß cholsaures Barium größere Mengen von desoxycholsaurem Barium zu lösen vermag.

Die Alkalisalze der Desoxycholsäure zeigen noch stärkere Neigung als die freie Säure, Additionsverbindungen einzugehen. Über Ester der Desoxycholsäure s. bei Latschinoff, Langheld und Wieland und Sorge (s. oben).

Die Verbindung der Desoxycholsäure mit 1 Mol. Essigsäure zeigt den Fp.  $144-145^\circ$ , die mit Äther den Fp.  $153-155^\circ$ <sup>2</sup>). Eine sehr gut krystallisierende Diformyldesoxycholsäure vom Fp.  $193^\circ$  wurde von Wieland<sup>3</sup>) dargestellt.

Die natürlichen „Choleinsäuren“ sind von Wieland und Sorge<sup>4</sup>) synthetisch aus Desoxycholsäure und Fettsäuren durch einfaches Vermischen der alkoholischen Lösungen gewonnen worden: Choleinsäuren.

Palmitincholeinsäure  $(C_{24}H_{40}O_4)_8C_{16}H_{32}O_2$ ; Fp.  $184-185^\circ$ .

Stearincholeinsäure  $(C_{24}H_{40}O_4)_8C_{18}H_{36}O_2$ ; Fp.  $186-187^\circ$ .

Oleincholeinsäure  $(C_{24}H_{40}O_4)_8C_{18}H_{34}O_2$ ; Fp.  $185-186^\circ$ .

Gleiche Teile dieser 3 Säuren zusammen umkrystallisiert geben Krystalle vom Fp.  $185-186^\circ$ . Dieser Stoff ist identisch mit der „Choleinsäure“, die aus der Galle isoliert wurde (s. oben). Sie gibt schwerlösliche Bariumsalze, zeigt sonst aber ähnliche Eigenschaften wie die Desoxycholsäure selbst. Die „Choleinsäure“ aus Galle zeigt  $[\alpha]_D = +48,47^\circ$  (in Alkohol<sup>5</sup>).

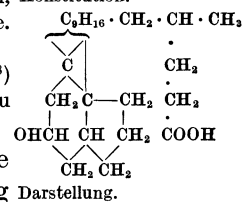
Die Desoxycholsäure gibt zum Unterschied von der Cholsäure keine blaue Jodverbindung und keine Farbreaktion mit Salzsäure (s. S. 336). Nachweis.

**239. Lithocholsäure  $C_{24}H_{40}O_3$ .** Wurde von H. Fischer<sup>6</sup>) aus Gallensteinen, von Wieland und Weyland<sup>7</sup>) aus hydrolisierter Rindergalle dargestellt. 100 kg Rindergalle enthalten ca. 2 g Lithocholsäure. Vorkommen.

In der Lithocholsäure läßt sich nach derselben Methode, wie bei der Cholsäure beschrieben, eine sekundäre Hydroxylgruppe nachweisen. Bei der Reduktion entsteht wieder Cholansäure. Die Formel ist nach Wieland die nebenstehende. Konstitution.

Weitere Belege für die Stellung der Hydroxylgruppe wurden von Borsche und Hallwaß<sup>8</sup>) erbracht, denen es gelang, Cholsäure über Reductodehydrocholsäure hinweg in Lithocholsäure zu verwandeln.

Das Bariumsalz der Lithocholsäure fällt mit dem der Desoxycholsäure aus. Über die Trennung der beiden Säuren s. im Original. Die Darstellung auf chemischem Wege aus Cholsäure s. bei Borsche und Hallwaß<sup>8</sup>).



<sup>1</sup>) Wieland u. Sorge: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 97, S. 16. 1916.

<sup>2</sup>) Pregl l. c.

<sup>3</sup>) Wieland: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 110, S. 151. 1920; s. auch Boedecker u. Volk: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 55, S. 2302. 1922.

<sup>4</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 97, S. 1. 1916.

<sup>5</sup>) Pregl: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 65, S. 157. 1910.

<sup>6</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 73, S. 204. 1911.

<sup>7</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 110, S. 123. 1920.

<sup>8</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 55, S. 3324. 1922.

**Eigenschaften.** Die Lithocholsäure krystallisiert aus Alkohol oder Eisessig in hexagonalen Blättchen; Fp.  $186^{\circ}$ ,  $[\alpha]_D = +32,72^{\circ}$  (in Alkohol<sup>1</sup>). Sie löst sich leicht in Alkohol, besonders in heißem. In Äther ist sie leichter löslich als die anderen Gallensäuren. 3 ccm Eisessig lösen ca. 0,2 g in der Wärme auf.

Die an sich schwerlöslichen Alkalisalze gehen bei Gegenwart von Desoxycholsäure spielend leicht in Lösung, was die Trennung sehr erschwert. — Die Lithocholsäure zeigt keine Neigung zur Bildung von Additionsverbindungen wie die Desoxycholsäure. Sie ist geschmacklos.

**Nachweis.** Lithocholsäure gibt die Pettenkofer-Reaktion (S. 337), dagegen nicht die Jodreaktion von Mylius (S. 336). Über einige Derivate (Methylester usw.) s. die oben zitierten Arbeiten.

240. Außer diesen in ihrer Konstitution ziemlich gut erforschten Gallensäuren finden sich bei einzelnen Tiergattungen noch einige weniger genau studierte Vertreter der Klasse:

**Phocaecholalsäuren.** Sie können aus reinen Phocaetaurocholsäuren, die sich in der Galle des Walrosses und einiger Seehundsarten finden (S. 348), durch alkalische Hydrolyse gewonnen werden<sup>2</sup>).

$\alpha$ -Phocaecholalsäure  $C_{22}H_{36}O_5$ . Findet sich hauptsächlich in der Galle des Walrosses. Darstellung aus der  $\alpha$ -Phocaetaurocholsäure s. bei Hammarsten<sup>2</sup>). Sie krystallisiert bei Gegenwart von Äther in feinen Nadeln, die bei  $133^{\circ}$  sintern und bei  $152$ — $156^{\circ}$  schmelzen.  $[\alpha]_D = +35,63^{\circ}$  (Natriumsalz in Wasser). Die Säure ist fast unlöslich in kaltem Wasser, in heißem Wasser sintert sie zu einem Klumpen zusammen. Die Lösung in heißem Wasser erstarrt beim Erkalten zu einer Gallerte. Die Säure gibt keine blaue Jodverbindung, mit Salzsäure entsteht eine ähnliche Färbung wie bei Gegenwart von Cholsäure. (S. 336.)

$\beta$ -Phocaecholalsäure  $C_{24}H_{40}O_5$  (Isocholsäure). Entsteht durch Hydrolyse aus der entsprechenden Phocaetaurocholsäure, die sich in der Galle von Seehundsarten findet. Sie wird mit Hilfe des schwer in Wasser löslichen Bariumsalzes isoliert. Die Säure krystallisiert aus Aceton in Nadeln oder Prismen vom Fp.  $220$ — $222^{\circ}$ .  $[\alpha]_D = +29,34^{\circ}$  (Natriumsalz in Wasser). Sie ist leicht löslich in Alkohol. Der Geschmack ist rein bitter. Gibt keine Reaktion mit Jod und keine Farbenreaktion mit Salzsäure. (S. 336.)

**Hyocholsäuren.** Wurden aus der Schweinegalle isoliert, in der sie hauptsächlich als Glykokollpaarlinge vorkommen. Sie geben keine Reaktionen mit Jod (S. 336).

$\alpha$ -Hyocholsäure (Hyodesoxycholsäure)  $C_{24}H_{40}O_4$ <sup>3</sup>). Durch Verseifen von  $\alpha$ -Hyoglykocholsäure (S. 345) von Gundlach und Strecker<sup>4</sup>), von Jolin<sup>5</sup>) und von Windaus und Bohne<sup>6</sup>) dargestellt. Die Säure ist eine Dioxycarbonsäure<sup>3</sup>). Bei der Reduktion der beiden sekundären Hydroxylgruppen zu  $CH_2$ -Gruppen entsteht nicht Cholansäure wie bei der Cholsäure, sondern eine ihr isomere Säure, die Hyocholansäure genannt wurde. Die  $\alpha$ -Hyocholsäure trägt danach das Wasserstoffatom am  $C_5$  sterisch in derselben Lage, wie dies beim Cholesterin der Fall ist<sup>3</sup>). Die krystallisierte Säure zeigt einen Fp. von  $196^{\circ}$  (Windaus und Bohne), ist schwer löslich in Wasser, leicht löslich in Alkohol. Sie gibt die Pettenkofersche und die Fluoreszenzreaktion (S. 336 u. 337).

$\beta$ -Hyocholsäure  $C_{24}H_{40}O_4$  (?). Wurde analog der  $\alpha$ -Säure aus der  $\beta$ -Hyoglykocholsäure von Jolin dargestellt. Das Natriumsalz scheidet sich aus konzentrierten alkoholischen Lösungen in großen, dünnen Tafeln ab, die in Wasser leichtlöslich sind. Durch gesättigte Neutralsalzlösung wird aus der Lösung der  $\beta$ -Säure nur wenig gefällt (Unterschied von der  $\alpha$ -Säure).

**Chenocholsäure.**  $C_{27}H_{44}O_4$  (nach Windaus  $C_{24}...$ <sup>3</sup>). Ist aus der Taurochenocholsäure der Gänsegalle (S. 348) abspaltbar. Sie wurde krystallisiert erhalten von Heintz und Wislicenus<sup>7</sup>). Läßt sich in Cholansäure überführen<sup>3</sup>). Sie gibt ein schwerlösliches Bariumsalz. Die Pettenkofersche Reaktion (S. 337) ist positiv.

<sup>1</sup>) H. Fischer und Borsche u. Hallwaß s. oben.

<sup>2</sup>) Hammarsten: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 61, S. 454. 1909; Bd. 68, S. 109. 1910.

<sup>3</sup>) Windaus, Zeitschr. f. angew. Chem. Bd. 36, S. 309. 1923.

<sup>4</sup>) Liebig's Ann. d. Chem. Bd. 62, S. 205. 1847; Bd. 70, S. 188. 1849.

<sup>5</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 13, S. 223. 1889.

<sup>6</sup>) Liebig's Ann. d. Chem. Bd. 433, S. 278. 1923.

<sup>7</sup>) Poggendorfs Annalen Bd. 108, S. 547. 1859; s. auch Otto: Zeitschr. f. Chemie 1868, S. 635. Liebig's Annal. d. Chem. Bd. 149, S. 185. 1869.

**Ursocholeinsäure**  $C_{18}H_{28}O_4$  oder  $C_{19}H_{30}O_4$ . Wurde von Hammarsten<sup>1)</sup> aus verseiften Eishäringalle dargestellt. Sie gibt ein krystallisiertes, schwerlösliches Bariumsalz. Die Säure selbst ist amorph, schwerlöslich in Wasser, leichtlöslich in Alkohol. Fp. 100–101°.  $[\alpha]_D = +22,34^\circ$  (in Alkohol). Die Jodreaktion ist negativ, die Pettenkofersche und Fluoreszenzreaktion (S. 336 u. 337) ist positiv.

Andere „Cholsäuren“ wurden aus der Galle von Nagern<sup>2)</sup> und aus der des Nilpferdes isoliert<sup>3)</sup>.

**Lithofellinsäure**  $C_{20}H_{36}O_4$ . Ist der Hauptbestandteil der Bezoarsteine, die sich gelegentlich im Darmtraktus der Bezoarziege und anderer ziegenartiger Tiere finden<sup>4)</sup>. Nach H. Fischer<sup>5)</sup> handelt es sich wahrscheinlich nicht um eine Gallensäure, sondern um eine aus dem Futter der Tiere stammende Substanz.

Die Lösung der Steine in Methylalkohol wird mit Petroläther gefällt. Die Fällung wird in Darstellung. Alkali gelöst und mit Bariumchlorid zur Beseitigung von Verunreinigungen (Lithobilinsäure, s. unten) versetzt. Nach dem Filtrieren wird mit Salzsäure gefällt und aus Alkohol umkrystallisiert.

Die Säure krystallisiert aus verdünntem Alkohol mit 1 Mol. Wasser. Fp. 205°.  $[\alpha]_D = +13,76^\circ$ . Eigenschaften. Sie ist in krystallisiertem Zustande fast unlöslich in Wasser, zeigt sonst ähnliche Löslichkeitsverhältnisse wie die anderen Cholsäuren. Die Salze krystallisieren schwer. Die Reaktion nach Pettenkofer (S. 337) ist positiv.

**Lithobilinsäure**  $C_{30}H_{58}O_6$  (?). Findet sich neben der Lithofellinsäure in Bezoarsteinen<sup>6)</sup>, sie wird als schwer lösliches Bariumsalz von ihr getrennt. Sie bildet Krystalle vom Fp. 199° (korr.), die mäßig löslich in Äther sind. Zeigt eine stärkere Rechtsdrehung als die Lithofellinsäure.

**Fellinsäure**  $C_{23}H_{40}O_4$  oder  $C_{23}H_{38}O_4$ . Wurde von Schotten<sup>7)</sup> aus verseiften menschlicher Galle isoliert. Die Säure konnte von Örum<sup>8)</sup> nicht wieder aufgefunden werden, so daß ihre Existenz zweifelhaft scheint. Aus 1½ l Menschengalle sollen 3,5 g der Substanz erhalten sein. Sie soll Krystalle vom Fp. 169° darstellen, die optisch rechtsdrehend sind und eine Pettenkofersche Reaktion (S. 337) geben, die etwas andere Farben als die mit Cholsäure zeigt.

**241. Scymnole.** Finden sich mit Schwefelsäure gepaart als Natriumsalze in der Galle des Hai-fisches *Scymnus borealis* und wahrscheinlich in der einer Rochenart (*Raja batis*<sup>9)</sup>). Sie werden aus den gepaarten Säuren (§ 248) durch einstündiges Kochen mit 10 proz. Kalilauge abgespalten. Die Scymnole scheiden sich ab und können aus heißem Wasser oder wässrigem Alkohol umkrystallisiert werden. Über die Konstitution ist wenig bekannt, doch scheinen sie ähnlich wie die Cholsäure gebaut zu sein. Wahrscheinlich sind die Scymnole keine Säuren, sondern Alkohole, die erst durch die Kombination mit Schwefelsäure Säurecharakter erhalten.

$\alpha$ -Scymnol  $C_{27}H_{46}O_5$ . Feine Nadeln vom Fp. 100–101°, kaum löslich in kaltem Wasser, leichter in heißem, leichtlöslich in organischen Lösungsmitteln. Gibt die Reaktion nach Pettenkofer (S. 337) sowie eine Reaktion, die der nach Liebermann - Burchard (S. 327) sehr ähnlich ist. Mit 25 proz. Salzsäure entsteht eine indigblaue Färbung.

$\beta$ -Scymnol  $C_{29}H_{50}O_5$  (?). Ist amorph. Gibt mit Salzsäure ebenfalls Farbreaktionen.

Zu diesen Körpern gehören auch ihrer chemischen Konstitution nach die Gifte einiger Krötenarten.

**242. Bufotalin**  $C_{26}H_{36}O_6$ . Wurde von Wieland und Weil<sup>10)</sup> aus den Häuten der einheimischen Vorkommen. Kröte *Bufo vulgaris* isoliert.

Das Bufotalin ist wahrscheinlich ganz ähnlich aufgebaut wie die Cholsäure. Es enthält 2 Doppelbindungen, eine sekundäre, eine tertiäre Hydroxylgruppe, und eine Acetylgruppe. Weiter konnte

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 36, S. 537. 1902.

<sup>2)</sup> Hammarsten: Lehrbuch der physiologischen Chemie. 9. Aufl. S. 335.

<sup>3)</sup> Hammarsten: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 74, S. 123. 1911.

<sup>4)</sup> Jünger u. Klages: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 28, 3, S. 3045. 1895; dort Zusammenstellung der älteren Literatur.

<sup>5)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 47, 3, S. 2728. 1914; Bd. 49, 2, S. 2413. 1916.

<sup>6)</sup> Roster: Gazz. chim. ital. Bd. 9, S. 364 u. 462. 1879; *Sopra un nuovo acido-lithobilico*. Firenze 1879.

<sup>7)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. 11, S. 268. 1887; s. auch Lassar - Cohn: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 19, S. 566. 1894; *Habil.-Schr. Hamburg* 1898, S. 74.

<sup>8)</sup> Skandinav. Arch. f. Physiol. Bd. 16, S. 273. 1905.

<sup>9)</sup> Hammarsten: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 24, S. 322. 1898.

<sup>10)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 46, 3, S. 3315. 1913; s. auch Wieland: *Sitzungsber. d. Bay. Akad. d. Wiss., Mathem.-phys. Kl.* 1920, S. 329.

eine Lactongruppe nachgewiesen werden, die vielleicht in der Seitenkette (s. Formel der Cholsäure)

sich befindet:  $\begin{array}{c} \text{O} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{C} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CO} \\ | \\ \text{CH}_3 \end{array}$ . Die wünschenswerte Reduktion zur Cholsäure ist aus

Materialmangel noch nicht durchgeführt.

**Eigenschaften.** Bufotalin krystallisiert aus den verschiedenen Lösungsmitteln in Form von Additionsverbindungen aus. Diese Stoffe können nur sehr schwer entfernt werden (im Hochvakuum bei 150°). Die Verbindung von 2 Mol. Bufotalin mit 1 Mol. Essigester krystallisiert sehr schön; ihr Schmelzpunkt liegt bei 154°. Das reine Bufotalin schmilzt bei 222° und zeigt  $[\alpha]_D = +6^\circ$ . Es sublimiert bei 225° im Hochvakuum unzersetzt. Mit Essigsäureanhydrid und konzentrierter Schwefelsäure entstehen nacheinander die Farbtöne violett, blau, später grün.

**Bufotalidin** (Oxybufotalin?)  $\text{C}_{26}\text{H}_{36}\text{O}_7$ . Wurde ebenfalls aus Krötenhaut neben Bufotalin von Wieland und Weil gewonnen. Es krystallisiert sehr schön, meist mit den Lösungsmitteln zusammen. Die Verbindung mit Alkohol hat den Fp. 175°. Die im Hochvakuum getrocknete Verbindung schmilzt bei 228–230°. Die Reaktionen sind ähnlich denen des Bufotalins, jedoch erfolgt der Farbwechsel rascher.

**Bufagin**  $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}_4$  (?). Ist nach Wieland vielleicht ein Methyläther des Bufotalins von der Formel  $\text{C}_{27}\text{H}_{38}\text{O}_6$ . Es wurde von Abel und Macht<sup>1)</sup> aus dem Hautsekret der tropischen Kröte Bufo aqua dargestellt (neben ca. 7% Adrenalin!). Bufagin krystallisiert ohne Lösungsmittel, zeigt den Fp. 217° und  $[\alpha]_D = +11^\circ$ . Es löst sich schwerer in verdünntem Alkohol als Bufotalin. Mit Essigsäureanhydrid und Schwefelsäure entsteht sofort eine rein grüne Färbung.

### Gepaarte Gallensäuren.

(Bearbeitet von F. Wrede-Greifswald.)

Bei den verschiedenen Tierarten ist das relative Mengenverhältnis von Glykochol- zu Taurocholsäure sehr wechselnd. Nach dem Schwefelgehalt der Gallen zu urteilen, dürfte die Taurocholsäure bei fleischfressenden Säugetieren, bei Vögeln, Schlangen und Fischen der Menge nach vorherrschend sein. Auch bei einigen Pflanzenfressern, wie Schafen und Ziegen, ist der Gehalt an Taurocholsäure überwiegend. Das Verhältnis der beiden Säuren bei Rindergalle ist sehr wechselnd. Die Gallen von Kaninchen, Hasen, Känguruh, Nilpferd, Orang-Utan und Schwein enthalten hauptsächlich Glykocholsäure. Ein Einfluß der Nahrung auf das Verhältnis der beiden Gallensäuren konnte nicht nachgewiesen werden. Nach Ritter<sup>2)</sup> soll jedoch bei Kälbern in der Zeit, wo sie von der Milch- zur Pflanzennahrung übergehen, die Menge der Taurocholsäure abnehmen<sup>3)</sup>.

### Glykokollderivate.

**Vorkommen.** 243. **Glykocholsäure**  $\text{C}_{26}\text{H}_{43}\text{NO}_6 + 1\frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ . Sie findet sich besonders reichlich in der Rindergalle (immer neben den anderen gepaarten Gallensäuren), aber auch in der Menschengalle. Bei Fleischfressern (Hund) fehlt sie offenbar, Fischgalle enthält wenig. Sie geht mit der Galle in die Exkrememente über, bei Ikterus auch in den Harn. In der menschlichen Galle finden sich ca. 3–5% gallensaure Salze (Glykochol- und Taurocholsäure<sup>4)</sup>).

**Synthese.** Synthetisch wird sie durch Vereinigung von Cholazid (aus dem Hydrazid) und Glykokoll erhalten<sup>5)</sup>. Das Glykokoll ist also säureamidartig gebunden anzunehmen (s. nebenstehende Formel).

**Darstellung.** Aus manchen Gallen ist die Darstellung sehr einfach, aus anderen müssen zur Abscheidung verschiedene Ausfällungsmethoden angewendet werden. Häufig führen folgende Verfahren zum Ziel:

<sup>1)</sup> Journ. of pharmacol. a. exp. therapeut. Bd. 4, S. 319. 1912.

<sup>2)</sup> Zit. nach Malys Jahresber. d. Tierchem. Bd. 6, S. 195. 1876.

<sup>3)</sup> Hammarsten: Lehrb. d. physiol. Chem., 9. Aufl., S. 349. 1922.

<sup>4)</sup> Czyhlarz, Fuchs u. v. Fürth: Biochem. Zeitschr. Bd. 49, S. 120. 1913.

<sup>5)</sup> Bondi u. Müller: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 47, S. 499. 1906.

1. Die Galle wird eingedampft, der Sirup wird mit Alkohol extrahiert. Von der mit Tierkohle entfärbten Lösung wird der Alkohol zum größten Teil abdestilliert, aus der konzentrierten alkoholischen Lösung werden mit Äther die Natriumsalze der Glykochol-, Taurochol- und der Glykocholeinsäure gefällt. Der Niederschlag krystallisiert meist nach kurzer Zeit („Plattners krystallisierte Galle“). Er wird in nicht zu wenig Wasser gelöst, mit Äther und mit verdünnter Schwefelsäure versetzt, bis eine starke auch beim Umrühren bleibende Trübung entsteht. Nach einigen Stunden ist die ganze Flüssigkeit zu einem Brei von Nadeln erstarrt. Diese werden ausgewaschen und mehrfach aus Wasser umkrystallisiert. — Ungelöst bleibt dabei die Paraglykocholsäure und die Glykocholeinsäure (S. 344). — Zur völligen Reinigung empfiehlt Hammarsten<sup>1)</sup>, die ganz trockene krystallisierte Säure in 10 Teilen Alkohol zu lösen und die Lösung mit Wasser bis zur Trübung zu versetzen. Dadurch wird die Bildung von Paraglykocholsäure (S. 344) vermieden.

2. Rindergalle wird durch Zusatz von Alkohol vom Schleim befreit<sup>2)</sup>. Aus dem Filtrat wird der Alkohol abdestilliert. In einer Probe der Flüssigkeit wird der Trockenrückstand bestimmt. Danach wird die ganze Lösung auf einen Trockengehalt von nicht mehr als 3% gebracht. Eine Probe der Flüssigkeit wird nun mit Äther und Salzsäure versetzt. Entsteht eine Trübung und bilden sich innerhalb von 12 Stunden reichlich Krystalle, so können die Gallensäuren direkt aus der ganzen Menge auf diese Weise abgeschieden werden. Erfolgt jedoch keine Krystallbildung, so wird die Glykocholsäure mit Bleizuckerlösung ausgefällt. Der abgetrennte Niederschlag wird mit warmer Sodalösung zerlegt. Nach dem Filtrieren und Eindampfen wird in Alkohol aufgenommen, filtriert, wieder eingedampft und in Wasser zu 2—3% gelöst. Diese Lösung wird nun mit Äther und Salzsäure gefällt. Die Krystalle werden, wie oben angegeben, gereinigt. — Über die Aufarbeitung der Filtrerrückstände (Glykocholeinsäure) s. S. 344. — An Stelle von Bleizucker ist auch Eisenchlorid empfohlen worden, nachdem die Gallenfarbstoffe mit Uranacetat ausgefällt waren<sup>3)</sup>.

3. Nach Hüfner<sup>4)</sup> können gelegentlich auch aus frischer Rindergalle durch Zusatz von Äther und Salzsäure (auf 40 ccm Galle 2 ccm konzentrierte Salzsäure) Krystalle von Glykocholsäure erzeugt werden.

Andere Verfahren s. bei Strecker<sup>5)</sup>, Gorup-Besanez<sup>6)</sup>, Medweder<sup>7)</sup> und Hammarsten und Wahlgren<sup>8)</sup>.

Isolierung aus tierischen Flüssigkeiten s. § 246.

Glykocholsäure krystallisiert in feinen, weißen Nadeln mit  $1\frac{1}{2}$  Mol. Krystallwasser<sup>9)</sup>. Das Wasser entweicht bei 100° im Vakuum, wird aber an der Luft wieder aufgenommen. Die Säure zeigt keinen scharfen Schmelzpunkt (132—152°). Die mehrfach aus Alkohol mit Wasserzusatz umkrystallisierte Säure zeigt nach dem Trocknen bei 105° folgendes Verhalten: Sie sintert bei 125—127° und

<sup>1)</sup> Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden (Abderhalden), 1922. Abt. I, Teil 6, Heft 1, Lfg. 53, S. 213. 1922.

<sup>2)</sup> Hammarsten: Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden (Abderhalden), Abt. I, Teil 6, Heft 1, Lfg. 53, S. 211. 1922; auch Privatmitteilung von Herrn Prof. Hammarsten.

<sup>3)</sup> Bleibtreu: Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 14, S. 99 u. 187. 1903. — Bontemps: Inaug.-Diss. Greifswald 1905.

<sup>4)</sup> Journ. f. prakt. Chem., N. F., Bd. 10, S. 267. 1874; Bd. 19, S. 302. 1879.

<sup>5)</sup> Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 65, S. 1. 1848.

<sup>6)</sup> Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 157 (N. R. 81), S. 286. 1871.

<sup>7)</sup> Zentralbl. f. Physiol. Bd. 14, S. 289. 1900.

<sup>8)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 36, S. 556. 1902; Bd. 43, S. 121. 1904/05.

<sup>9)</sup> Knoop: Biochem. Handlex. (Abderhalden) Bd. 3, S. 311. 1911. — Letsche: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 73, S. 308. 1911.

schmilzt bei 126—128° zu einer beim Erkalten glasigen Masse<sup>1)</sup>.  $[\alpha]_D = + 32,3^\circ$  (in Alkohol<sup>2)</sup>. Der Geschmack ist süß und bitter. Sie löst sich in kaltem Wasser 0,33 : 1000, in siedendem 8,5 : 1000<sup>3)</sup>. Sie ist leichtlöslich in Alkohol, sehr wenig löslich in Äther, Chloroform oder Benzol.

Die Salze mit Alkalien und mit alkalischen Erden sind in Wasser leichtlöslich. Von Schwermetallsalzen werden diese Lösungen meist gefällt. Die Lösung der Alkalisalze vermag geringe Mengen von Fett und Cholesterin zu lösen. Eine 2proz. Lösung der Alkalisalze wird durch manche Neutralsalze gefällt<sup>4)</sup>. Über die Fällbarkeit durch Essigsäure s. bei Wahlgren<sup>5)</sup>.

Das Natriumsalz zeigt  $[\alpha]_D = + 27,8^\circ$  (in Alkohol<sup>6)</sup>).

**Spaltung.** Durch Kochen mit verdünnter Salzsäure oder Schwefelsäure oder mit Alkalien wird Glykocholsäure in Cholsäure und Glykokoll gespalten<sup>7)</sup>. Durch längeres Kochen der Glykocholsäure in wässriger Lösung oder auch durch Erhitzen der Säure auf 105° entsteht die isomere Paraglykocholsäure.

**Nachweis.** Die Glykocholsäure gibt die Fluorescenz- und die Pettenkofersche Reaktion, jedoch keine Jodreaktion. (S. 336 u. 337.)

**Paraglykocholsäure**  $C_{26}H_{43}O_6N \cdot H_2O$ . Ihre Darstellung aus Glykocholsäure s. bei Letsche<sup>8)</sup>. Sie bildet perlmutterglänzende Blättchen, die wesentlich schwerer in Wasser löslich sind als die Glykocholsäure. Beim Kochen mit Alkohol oder Laugen geht sie wieder in Glykocholsäure über. Sie enthält 1 Mol. Krystallwasser, das bei 105° entweicht. Die Säure (+  $H_2O$ ) sintert bei 168° und zersetzt sich bei 198°. Wasserfrei sintert sie bei 193° und zersetzt sich bei 198°<sup>8)</sup>.

**Vorkommen.** 244. **Glykcholeinsäure (Glykodesoxycholsäure)**  $C_{26}H_{43}NO_5$ . Findet sich neben der Glykocholsäure in der Rindergalle<sup>9)</sup>, auch in der Galle des Moschusochsen und des Menschen<sup>10)</sup>.

**Synthese.** Das synthetische Produkt aus dem Azid der Desoxycholsäure und Glykokoll ist verschieden von der natürlichen Glykcholeinsäure. Vielleicht liegt bei dem Naturprodukt eine Additionsverbindung mit Fettsäure vor („Choleinsäure“). An den synthetischen Körper nachträglich noch Fettsäure zu addieren, ist nicht gelungen. Vielleicht handelt es sich aber auch um einen konstitutionellen Unterschied in der Kohlenstoff-Stickstoffbindung. Der synthetische Körper zeigt den Fp. 187—188°<sup>11)</sup>.

**Darstellung.** Sie wird aus den Filtrerrückständen gewonnen, die bei der Darstellung der Glykocholsäure erhalten wurden (s. S. 343). Sie werden mit etwas Alkali in Wasser gelöst, evtl. neutralisiert und mit Bariumchlorid gefällt. Der Niederschlag wird in heißem Wasser gelöst und mit Soda zersetzt. Das Filtrat wird eingedampft und in Alkohol aufgenommen. Es wird wieder eingedampft, in Wasser gelöst, mit Tierkohle entfärbt und mit Äther und Salzsäure die Glykcholeinsäure krystallinisch ausgefällt<sup>12)</sup>. Zur Reinigung wird die Fällung als Bariumsalz wiederholt, bis der Fp. 175—179° erreicht ist. Die Säure wird

<sup>1)</sup> Hammarsten: Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden (Abderhalden), Abt. I, Teil 6, Heft 1, Lfg. 53, S. 215. 1922.

<sup>2)</sup> Letsche: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 60, S. 462. 1909.

<sup>3)</sup> Emich: Monatshefte f. Chemie Bd. 3, S. 336. 1882.

<sup>4)</sup> Tengström: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 41, S. 217. 1904.

<sup>5)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 36, S. 563. 1902.

<sup>6)</sup> Letsche s. oben.

<sup>7)</sup> Strecker: Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 67, S. 3. 1848.

<sup>8)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 73, S. 308. 1911; Bd. 60. S. 462. 1909; s. auch Wahlgren: l. c.

<sup>9)</sup> Wahlgren: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 36, S. 556. 1902.

<sup>10)</sup> Hammarsten: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 43, S. 109. 1904/05.

<sup>11)</sup> Wieland u. Stender: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 106, S. 181. 1919.

<sup>12)</sup> S. auch Hammarsten: Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden (Abderhalden), Abt. I, Teil 6, Heft 1, Lfg. 53, S. 215. 1922.

zum Schluß aus einer konzentrierten alkoholischen Lösung durch Wasserzusatz umkrystallisiert.

Sie bildet Nadeln oder Prismen, die nach dem Trocknen bei 105° den Eigenschaften. Fp. 175—176° zeigen. Sie sind fast unlöslich in kaltem Wasser, schwer löslich auch in siedendem Wasser, zum Unterschied von der Glykocholsäure. Die Löslichkeit in warmem Alkohol ist beträchtlich, dagegen gering in Äther, Aceton und Chloroform. Der Geschmack ist rein bitter.

Die Alkalisalze sind in Alkohol schwerlöslich, in Wasser leichtlöslich. Die Lösungen werden durch Schwermetallsalze (wie Glykocholsäure) gefällt, ebenso durch Calcium-, Magnesium- und Bariumsalze. Durch Neutralsalze erfolgt Fällung, und zwar leichter als bei Lösungen der Glykocholate.

Durch Kochen mit Alkali zerfällt die Säure in Desoxycholsäure und Glyko- Spaltung. koll. Die Säure gibt die Fluorescenz- und die Pettenkofersche Reaktion, letztere mit stark violetterm Farbenton. (S. 336 u. 337.)

**Hyoglykocholsäuren.** In der Schweinegalle kommen 2 Glykocholsäuren vor, die bei der Spaltung 2 verschiedene Hyocholsäuren liefern<sup>1)</sup>. (S. 340.) Die Darstellung und Trennung der beiden Säuren ist sehr schwierig. Eine Verbesserung der älteren Methoden gibt Hammarsten<sup>2)</sup>. Das Verfahren beruht darauf, daß die Alkalisalze der beiden Säuren durch Natriumchloridlösung bei verschiedenen Konzentrationen getrennt ausfallen: Bei der Sättigung mit Kochsalz werden beide Salze fast völlig ausgefällt. Das Salz der  $\alpha$ -Säure gibt schon mit 3—5 proz. Kochsalzlösung eine reichliche Fällung, das  $\beta$ -Salz (in 2 proz. Lösung) wird bei einer Konzentration von 10% Kochsalz kaum ausgesalzen. Einzelheiten s. im Original.

$\alpha$ -Hyoglykocholsäure  $C_{26}H_{43}NO_4$  (nach Windaus und Bohne<sup>3)</sup>. Kann nach Hammarsten aus einem Gemenge von Alkohol und Aceton krystallisiert erhalten werden. Der Schmelzpunkt liegt bei etwa 150°.  $[\alpha]_D = +9,7^\circ$  (für die amorphe Säure). Ist sehr schwer löslich in Wasser, etwas löslich in Äther, leichtlöslich in Alkohol. Die Alkalisalze werden durch die Salze der Erdalkalien und Schwermetalle gefällt. Die Fluorescenz- und Pettenkofersche Reaktion sind positiv. (S. 336 u. 337.)

Einige Derivate der Säure beschreiben Windaus und Bohne.

$\beta$ -Hyoglykocholsäure  $C_{26}H_{43}NO_5$  (?). Ist bisher nicht krystallisiert und nicht frei von Beimengungen erhalten. Sie ähnelt in ihrem Verhalten der  $\alpha$ -Säure.

Weitere mit Glykokoll gepaarte Gallensäuren finden sich in der Galle der Nager<sup>4)</sup> und in der des Nilpferdes<sup>5)</sup>. Die aus Guano isolierte Guanogallensäure ist nur amorph erhalten worden. Ihr Barytsalz löst sich ziemlich schwer in Wasser. Die Fluorescenz- und die Pettenkofersche Reaktion sind positiv<sup>6)</sup>. (S. 336 u. 337.)

#### *Taurinderivate.*

**245. Taurocholsäure  $C_{26}H_{45}NSO_7$ .** Sie findet sich in der Galle von Rind, Schaf Vorkommen. und Ziege neben Glykocholsäure. Die menschliche Galle enthält schwankende, aber meist nur geringe Mengen. Auch in der Galle der Schlangen und Fische kommt sie vor. In der Hundegalle bildet sie den Hauptbestandteil der Gallensäuren. Bei Ikterus kann sie, ebenso wie die Glykocholsäure, im Urin gefunden werden.

Synthetisch wurde sie erhalten durch Umsetzung von Cholsäureazid mit Synthese. Taurin<sup>7)</sup>.

Die Darstellung aus Rindergalle ist sehr schwierig und gibt schlechte Darstellung. Ausbeuten. Nach Bang<sup>8)</sup> kann dabei von der Eigenschaft der Taurocholsäure,

<sup>1)</sup> Gundlach u. Strecker: Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 62, S. 205. 1847. — Strecker: Liebigs Ann. d. Chemie Bd. 70, S. 188. 1849. — Jolin: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 12, S. 512. 1888; Bd. 13, S. 205. 1889.

<sup>2)</sup> Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden (Abderhalden), Abt I, Teil 6, Heft 1, Lfg. 53, S. 217. 1922.

<sup>3)</sup> Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 433, S. 278. 1923.

<sup>4)</sup> Hammarsten: Lehrbuch der physiol. Chemie. 9. Aufl. S. 335.

<sup>5)</sup> Hammarsten: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 74, S. 123. 1911.

<sup>6)</sup> Hoppe-Seyler: Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. Bd. 26, S. 525. 1863.

<sup>7)</sup> Bondi u. Müller: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 47, S. 499. 1906.

<sup>8)</sup> Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 7, S. 148. 1906.

eine Fällung mit Eiweiß zu geben, Gebrauch gemacht werden. Hammarsten<sup>1)</sup> empfiehlt diese Methode hingegen nicht.

Nach Hammarsten<sup>2)</sup> eignet sich zur Darstellung am besten Hundegalle oder, falls erhältlich, Fischgalle (Dorsch). Durch Alkoholzusatz schleimfrei gemachte Hundegalle wird auf einen Gehalt an Trockensubstanz von 2—5% gebracht (s. Darstellung der Cholsäure und der Glykocholsäure). Dann wird mit einer 5proz. Eisenchloridlösung versetzt, bis in der sauer gewordenen Lösung keine Fällung mehr entsteht. Der Niederschlag enthält Farbstoff und Taurocholeinsäure. Das Filtrat wird mit Soda oder Natronlauge nicht ganz neutralisiert. Es wird wieder filtriert und mit Eisenchlorid versetzt, mit etwas Wasser verdünnt und nochmals mit Soda annähernd neutralisiert. (Die verschiedenen eisenhaltigen Niederschläge werden gegebenenfalls zur Darstellung der Taurocholeinsäure benutzt (S. 348). Das Filtrat wird nun mit Soda schwach alkalisch gemacht. Nach dem Filtrieren wird bei Zimmertemperatur mit Kochsalz gesättigt. Das Taurocholat fällt in Flocken aus. Es wird abgetrennt, nochmals in Wasser gelöst und wieder ausgesalzen. Durch Aufnehmen in Alkohol wird beigemengtes Kochsalz entfernt. Das Taurocholat wird nun in wenig absolutem Alkohol gelöst und mit so viel schwefelsäurehaltigem Alkohol versetzt, daß die Lösung etwa 2—3% Säure enthält. Vom Natriumsulfat wird abfiltriert und mit Äther versetzt. Die amorph ausgefällte Säure wird in wenig Alkohol gelöst, die Lösung wird filtriert. Dann wird etwas Wasser zugesetzt und so viel Äther, daß eine bleibende Trübung entsteht. Die Taurocholsäure krystallisiert bald aus. Durch Zugabe neuer Äthermengen kann die Krystallabscheidung vermehrt werden. Es wird aus Alkohol, der etwas Wasser enthält, durch Zusatz von Äther wiederholt umkrystallisiert.

Isolierung aus tierischen Flüssigkeiten s. § 246.

Eigenschaften.

Aus der wasserhaltigen, alkoholischen Lösung scheidet sich die Säure nach Ätherzusatz krystallisiert in Form von Nadeln oder Prismen ab, die nach Hammarsten<sup>3)</sup> 1 Mol. Wasser enthalten. Bondi und Müller<sup>4)</sup> erhielten sie auf synthetischem Wege als weißes Pulver ohne Krystallwasser. Sie färbt sich beim Erhitzen auf 100° gelb, sintert bei 140°, beginnt bei 160° sich zu zersetzen und schmilzt bei 180° zu einer braunen Flüssigkeit.  $[\alpha]_D = +23,27$  ( $c = 2,32$  Natriumsalz in Wasser<sup>5)</sup>). Sie löst sich leicht in Wasser und in Alkohol; in Äther, Benzol, Aceton und Chloroform ist sie unlöslich. Die nicht ganz reine Säure zerfließt an der Luft. Sie schmeckt süß und ganz wenig bitter.

Die Salze mit Alkalien, Erdalkalien und vielen Schwermetallen sind löslich in Wasser. Das Natriumsalz ist verhältnismäßig schwerlöslich in kaltem Alkohol. Es kann aus der alkoholischen Lösung durch Ätherzusatz krystallisiert erhalten werden. Durch Bleiacetat wird eine Taurocholatlösung nicht gefällt, auch nicht durch Eisenchlorid, wohl aber erfolgt Fällung durch Bleiessig mit Ammoniak. Über die Aussalzbarekeit durch Neutralsalze s. die Arbeit von Tengström<sup>6)</sup>. Aus einer mit Salzsäure versetzten und mit Kochsalz gesättigten Taurocholatlösung krystallisiert die Säure, namentlich bei Zusatz von Äther, aus (Hammarsten).

<sup>1)</sup> Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden (Abderhalden), Abt. I, Teil 6, Heft 1, Lfg. 53, S. 221. 1922.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 43, S. 127. 1904/05; Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden (Abderhalden), Abt. I, Teil 6, Heft 1, Lfg. 53, S. 219. 1922.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 43, S. 136. 1904.

<sup>4)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 47, S. 499. 1906.

<sup>5)</sup> Hammarsten: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 61, S. 471. 1909.

<sup>6)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 41, S. 217. 1904.



Durch Kochen mit verdünnten Säuren oder Laugen wird Taurocholsäure Spaltung. in Taurin und Cholsäure zerlegt, und zwar wesentlich leichter als die Glykocholsäure<sup>1)</sup>. Es wird am besten 12 Stunden mit einer heiß gesättigten Bariumhydroxydlösung im zugeschmolzenen Rohr im Wasserbade erhitzt. Das Barium wird mit Kohlensäure entfernt, das Filtrat wird eingedampft. Aus dem Rückstand wird mit kaltem Wasser das Taurin, mit heißem Wasser die Cholsäure extrahiert. — Die Spaltung geht auch bei der Fäulnis im Darmkanal vor sich.

Außer den oben angeführten Konstanten ist charakteristisch der Schwefel- Nachweis. gehalt (Oxydation durch Schmelzen mit Salpeter und Soda. Fällung mit Bariumchlorid in salzsaurer Lösung). Die Pettenkofersche und die Fluoreszenzreaktion sind positiv, die Jodreaktion ist negativ (S. 336 u. 337). Von der Taurocholeinsäure kann die Taurocholsäure unterschieden werden durch den bitteren Geschmack und durch die Fällbarkeit der ersteren mit Eisenchlorid.

246. Die Isolierung von Gallensäuren aus Blut oder serösen Flüssig- Isolierung von Gallensäuren aus Blut oder serösen Flüssigkeiten. keiten geschieht nach Hoppe-Seyler in folgender Weise<sup>2)</sup>: Die Flüssigkeit wird mit dem 2—3fachen Volum Alkohol gefällt. Der Niederschlag wird abfiltriert und ausgepreßt und, falls es sich um Blut handelt, von neuem mit Alkohol verrieben. Sonst genügt es, ihn mit Alkohol auszuwaschen. Die alkoholischen Extrakte werden eingedampft, der Rückstand wird mit absolutem Alkohol fein zerrieben. Nach dem Filtrieren wird wieder eingedampft, nochmals in Alkohol aufgenommen und wieder zur Trockne gebracht. Zur Entfernung von Fett wird dieser Rückstand mit Äther verrieben. Das Nichtgelöste wird in Wasser gelöst. Nun wird evtl. filtriert, das Filtrat wird mit Bleiessig und etwas Ammoniak gefällt, wobei ein Überschuß an Fällungsmitteln zu vermeiden ist. Der Niederschlag wird mit Wasser gewaschen, dann mit Alkohol ausgekocht. Die heiß abfiltrierte alkoholische Lösung wird mit etwas Sodalösung auf dem Wasserbade zur Trockne gebracht. Der Rückstand wird mit absolutem Alkohol ausgekocht, das Filtrat wird eingeengt und mit einem Überschuß von Äther versetzt. Der harzige Niederschlag krystallisiert bisweilen. (Evtl. mitauskrystallisiertes Alkaliacetat darf nicht mit gallensauren Salzen verwechselt werden.) Die Gallensäuren können durch die Pettenkofersche Reaktion (S. 337) noch weiter identifiziert werden. — Bei sehr kleinen Gallensäuremengen lassen sich die gallensauren Salze, die ja in Alkohol-Äther nicht ganz unlöslich sind, nicht ausfällen. In diesen Fällen wird das alkoholische bleihaltige Filtrat mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Das Filtrat vom Schwefelblei wird in einer Glasschale zur Verdunstung hingestellt. Der Rückstand wird in wenig Äther gelöst, die Lösung wird filtriert und eingetrocknet. Mit dem Rückstand wird die Pettenkofersche Reaktion (S. 337) angestellt. Auf diese Weise konnten in Transsudaten noch gallensaure Salze in einer Verdünnung 1:100 000 leicht nachgewiesen werden. Soll die Art der Gallensäuren bestimmt werden, so wird die erhaltene Krystallmasse in Wasser gelöst und mit Bleizucker versetzt: Glykocholsäure und Cholsäure werden gefällt.

Die geschilderte Methode ist jedoch nicht absolut einwandfrei, da Ölseife und gewisse Phosphatide, die auch die Pettenkofersche Reaktion geben, störend wirken können. Näheres s. in der Originalabhandlung.

Über Nachweis im Harn s. § 622, in Faeces s. § 824.

<sup>1)</sup> Strecker: Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 67, S. 30. 1848.

<sup>2)</sup> Hammarsten: Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden (Abderhalden), Abt. I, Teil 6, Heft 1, Lfg. 53, S. 244. 1922.

Vorkommen. 247. **Taurocholeinsäure (Taurodesoxycholsäure)**  $C_{26}H_{45}O_6NS$  (?). Wurde neben Taurocholsäure in der Galle des Hundes und Rindes gefunden<sup>1)</sup>.

Synthese. Die Synthese aus Desoxycholsäureazid und Taurin<sup>2)</sup> führte zu einem krystallisierten, jedoch mit dem aus der Galle isolierten nicht identischen Körper.

Darstellung. Die Säure läßt sich gewinnen aus den bei der Isolierung der Taurocholsäure gewonnenen Fällungen mit Eisenchlorid (S. 346). Diese werden mit warmer Soda-lösung zersetzt. Das Filtrat wird eingedampft, der Rückstand wird mit Alkohol extrahiert. Die alkoholische Lösung wird mit Tierkohle entfärbt und eingedampft. Der Rückstand wird nun in alkoholischer Lösung mit Schwefelsäure zerlegt und mit Äther versetzt (s. bei der Darstellung der Taurocholsäure). Die noch Krystalle von Taurocholsäure enthaltenden Fraktionen werden abgesondert; nur die, die einen harzartigen Bodensatz geben, werden weiterverarbeitet. Dieser Bodensatz wird in das Natriumsalz der Taurocholeinsäure übergeführt und zur weiteren Reinigung mit Eisenchlorid gefällt. Aus der Eisenfällung wird wieder das Natriumsalz bereitet. Dieses wird in alkoholischer Lösung mit Schwefelsäure zerlegt und mit Äther gefällt.

Eigenschaften. Die Taurocholeinsäure stellt eine honigartige Masse dar, die nicht krystallisiert erhalten werden konnte. Sie löst sich leicht in Wasser und in Alkohol, nicht in Äther. Der Geschmack ist intensiv bitter. Die Alkalisalze werden durch Eisenchlorid gefällt, jedoch nicht durch Bariumchlorid.

Hydrolyse. Die Säure zerfällt bei der Hydrolyse in Taurin und Choleinsäure<sup>3)</sup>.

**Taurochenocholsäure.** Sie findet sich in der Gänsegalle<sup>4)</sup>. Zur Darstellung wird die Galle mit Alkohol extrahiert. Die Lösung wird mit Äther gefällt, der Niederschlag wird mit konzentrierter Natriumsulfatlösung gewaschen, getrocknet, in absolutem Alkohol gelöst und mit Äther wieder gefällt. Das Natriumsalz  $C_{26}H_{50}NSO_7Na$  (?) krystallisiert aus. Es wird in Wasser gelöst und mit Bleiessig gefällt. Die Bleifällung wird in alkoholischer Lösung mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Beim Eindampfen erhält man die freie Säure [neben etwas Parataurochenocholsäure (?)]. Die nicht krystallisiert erhaltene Säure ist in Wasser und Alkohol leichtlöslich. Die Pettenkofersche Reaktion ist positiv. (S. 337.)

**Phocaetaurocholsäuren.** Sie wurden von Hammarsten<sup>5)</sup> aus der Galle vom Walroß und von Seehunden gewonnen.

$\alpha$ -Phocaetaurocholsäure  $C_{26}H_{45}O_8NS$  (?). Findet sich hauptsächlich in der Galle des Walrosses. Darstellung s. im Original. — Feine Nadeln mit 2 Mol. Krystallwasser.  $[\alpha]_D = ca. + 41^\circ$  (Natriumsalz in Wasser). Ist schwerlöslich in Wasser und in Alkohol, fast unlöslich in Aceton, Chloroform und Benzol. Der Geschmack ist süß, wenig bitter. Mit 25proz. Salzsäure gibt sie die Farbreaktionen der Cholsäure (S. 336 u. 337). Natrium- und Bariumsalz krystallisieren leicht.

$\beta$ -Phocaetaurocholsäure  $C_{26}H_{45}O_7NS$  (?). Kommt besonders in der Galle der Phocaceen vor. Sie wurde bisher nur amorph erhalten  $[\alpha]_D = ca. + 25^\circ$  (Natriumsalz in Wasser). Gibt die Farbreaktionen der Cholsäure. Die Lösungen der Salze geben mit Eisenchlorid keine Fällung.

Bei der alkalischen Hydrolyse geben beide Phocaecholsäuren (§ 240)

#### *Schwefelsäurederivate.*

248. In der Galle der Plagiostomen fand Hammarsten<sup>6)</sup> Schwefelsäureester von Körpern, die den Gallensäuren und dem Cholesterin ähnlich sind (§ 241). Darstellung s. im Original.

$\alpha$ -Scymnolschwefelsäure. Das Natriumsalz ist meist amorph, läßt sich aber gelegentlich in Form radiär gestreifter Kügelchen erhalten. Es löst sich leicht in Wasser und Alkohol. Zersp.

<sup>1)</sup> Hammarsten: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 43, S. 127. 1904. — Gullbring: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 45, S. 448. 1905.

<sup>2)</sup> Wieland u. Stender: l. c.

<sup>3)</sup> Gullbring: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 45, S. 455. 1905; s. auch Hammarsten: Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden (Abderhalden), Abt I, Teil 6, Heft 1, Lfg. 53, S. 272. 1922.

<sup>4)</sup> Heintz u. Wislicenus: Poggendorfs Annalen Bd. 108, S. 547. 1859. — Otto: Zeitschr. f. Chem. 1868, S. 633.

<sup>5)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 61, S. 454. 1909; Bd. 68, S. 109. 1910.

<sup>6)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 24, S. 322. 1898.

ca. 130°. Die Lösung wird von Eisenchlorid, Bleiessig und durch 40 proz. Kalilauge gefällt. Die Pettenkofersche und die Fluoreszenzreaktion sind positiv, mit 25 proz. Salzsäure entsteht eine indigoblaue Farbe (S. 336 u. 337).

$\beta$ -Scymnolschwefelsäure. Das Natriumsalz stellt eine harzige Masse dar. Es schmeckt ebenso wie das  $\alpha$ -Salz bitter-süß. Es wird durch Eisenchlorid und Bleiessig, aber nicht durch 40 proz. Kalilauge gefällt. Die Pettenkofersche Reaktion ist positiv. (S. 337.) Mit 25 proz. Salzsäure entsteht eine grüne, allmählich braun werdende Farbe. — Neben diesen beiden Körpern findet sich noch ein dritter, der ähnlich zusammengesetzt zu sein scheint ( $\gamma$ -Säure). Er ist noch nicht näher untersucht.

### Gepaarte Schwefelsäuren.

(Bearbeitet von F. Wrede-Greifswald.)

249. Allerhand Verbindungen, die den Organismus belästigen, namentlich solche aus der aromatischen Reihe, werden im Körper mit Schwefelsäure (oder auch evtl. mit Glucuronsäure) „gepaart“ und dann hauptsächlich mit dem Harn ausgeschieden<sup>1)</sup>. Die gepaarten Schwefelsäuren sind nach dem Typus der Ester gebaut. Fehlt in der auszuscheidenden Substanz die zur Esterbildung benötigte Hydroxylgruppe, so wird häufig durch Oxydation eine solche gebildet.

Die Stoffe, die mit Schwefelsäure gebunden werden, entstehen normalerweise durch Fäulnis im Darm aus Bausteinen der Nahrung, hauptsächlich aus Eiweißspaltprodukten. Sie können aber auch künstlich dem Organismus beigebracht werden. Aus gangränösen Herden oder aus Abscessen soll der Organismus ebenfalls Stoffe resorbieren können, die Anlaß zur Paarung geben. — Die Menge dieser Substanzen ist einerseits von der Art der Nahrung, andererseits aber auch von der Intensität und der Art der Darmfäulnis abhängig. Z. B. findet sich im Harn der Pflanzenfresser mehr gepaarte Schwefelsäure, da mit der Nahrung viel Stoffe aufgenommen werden, die aromatische Kerne enthalten. Stauungen im Darmtraktus führen wegen der längeren Einwirkung der Fäulnis-erreger zu einer Vermehrung der gepaarten Verbindungen. Nahrungsmittel, die die Darmfäulnis vermindern, wie reichliche Milchmengen, aber auch Desinfizientia, setzen die Bildung der gepaarten Schwefelsäuren herunter. — Demgemäß ist die absolute Menge der Schwefelsäureester auch normalerweise im Harn recht verschieden, in 24 Stunden zwischen 0,1—0,6 g<sup>2)</sup>. Neben dem gebundenen findet sich im Harn aber auch freies Phenol, Kresol usw.<sup>3)</sup>.

Die Synthese findet wohl in der Leber statt<sup>4)</sup>. Die gepaarten Schwefelsäuren kommen als Alkalisalze hauptsächlich im Urin vor. Im Schweiß des Menschen<sup>5)</sup>, in der Galle<sup>6)</sup> und im Wollschweiß der Schafe<sup>7)</sup> sind geringe Mengen nachgewiesen worden. Auch im Harne von Neugeborenen sollen sie sich finden<sup>8)</sup>.

<sup>1)</sup> Baumann: Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 12, S. 69. 1876; Bd. 13, S. 285. 1876; Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 1, S. 60. 1878; Bd. 2, S. 335. 1879; Bd. 10, S. 123. 1886. — Baumann u. Herter: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 1, S. 244. 1877/78. Zusammenstellung der Arbeiten Baumanns: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 23, S. 17. 1897.

<sup>2)</sup> v. d. Velden: Centralbl. f. med. Wiss. Bd. 14, S. 886. 1876. — Tollens: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 67, S. 138. 1910.

<sup>3)</sup> Folin u. Denis: Journ. of biol. chem. Bd. 22, S. 309. 1915. — Dubin: ebd. Bd. 26, S. 69. 1916. — Tisdall: ebd. Bd. 44, S. 409. 1920.

<sup>4)</sup> Embden u. Glässner: Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 1, S. 310. 1902.

<sup>5)</sup> Kast: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 11, S. 501. 1887.

<sup>6)</sup> v. Bergmann: Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 4, S. 196. 1904. — Hammarsten: Ergebn. d. Physiol. Bd. 4, S. 7. 1905. — Örum: Skandinav. Arch. f. Physiol. Bd. 16, S. 273. 1904.

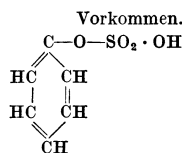
<sup>7)</sup> Buisine: Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. Bd. 103, S. 66. 1886.

<sup>8)</sup> Senator: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 4, S. 1. 1880.

**Eigenschaften.** Die freien Säuren sind sehr unbeständig. Die Kaliumsalze krystallisieren, sind leichtlöslich in Wasser, unlöslich in kaltem Alkohol. Die Bariumsalze sind ebenfalls in Wasser löslich. Die Salze der gepaarten Schwefelsäuren zersetzen sich allmählich an der feuchten Luft. Durch Kochen mit Wasser, namentlich bei Gegenwart von Mineralsäuren, werden sie rasch gespalten unter Freiwerden von Schwefelsäure. In stark alkalischen Lösungen und in Lösungen von organischen Säuren zersetzen sie sich bei kurzdauerndem Kochen nur wenig. Durch Erhitzen auf 150—160° gehen manche der Salze in die der isomeren und beständigeren Sulfosäuren über.

**Nachweis.** Über den Nachweis und die quantitative Bestimmung der gepaarten Schwefelsäuren im Harn s. §§ 568 u. 575.

Neben den gepaarten Schwefelsäuren, die in Substanz isoliert werden konnten, ist das Vorkommen von anderen wahrscheinlich gemacht, namentlich von solchen, die nach dem Einnehmen gewisser Verbindungen sich durch eine Vermehrung der „gebundenen“ Schwefelsäure bemerkbar machten. Diese gepaarten Säuren sind meist nicht rein dargestellt; sie werden hier nicht angeführt.



**250. Phenolschwefelsäure  $C_6H_6SO_4$ .** Ihr Kaliumsalz findet sich in geringer Menge im Harn vom Pferd, häufig auch im Harn vom Menschen<sup>1)</sup>. Vermehrt ist die Ausscheidung nach Eingabe von Phenol oder Lysol per os oder nach Anlegen phenolhaltiger Wundverbände<sup>2)</sup>, auch bei energischer Darmfäulnis. Sie dürfte wohl hauptsächlich aus dem Tyrosin der Eiweißstoffe entstehen. Buisine<sup>3)</sup> fand die Säure im Wollschweiß der Schafe. Über die Bildung von Phenolschwefelsäure bei Eingabe von Phenol usw. zusammen mit schwefelhaltigen Substanzen s. die Arbeit von Rhode<sup>4)</sup>.

**Synthese.** Phenolschwefelsäure wird synthetisch gebildet durch Erhitzen von Phenolkalium mit Kaliumpyrosulfat in wässriger Lösung auf 60—70°<sup>5)</sup>. Darstellung durch Elektrolyse s. bei Drechsel<sup>6)</sup>.

**Darstellung aus Harn.** Aus normalem Pferdeharn<sup>7)</sup> läßt sich nach der unten angegebenen Methode nur ein schwer trennbares Gemisch von Phenol- und Kresolschwefelsäure erhalten. Besser gelingt die Darstellung aus Harn von Hunden, denen täglich mehrere Gramm Phenol beigebracht waren. 8—10 l dieses Harns werden zum Sirup eingedampft, der dann mit 96 proz. Alkohol extrahiert wird. Das Extrakt wird kalt mit einer alkoholischen Oxalsäurelösung versetzt, solange noch ein Niederschlag entsteht. Nach 10 Minuten wird filtriert, das Filtrat wird mit Kalilauge schwach alkalisch gemacht. Es wird wieder filtriert und zum Sirup eingedampft. Dieser wird zur Krystallisation hingestellt (am besten unter 0°). Die Krystalle des Kaliumsalzes werden abgesaugt und aus kochendem Alkohol umkrystallisiert.

**Eigenschaften.** Die freie Säure ist sehr unbeständig. Das Kaliumsalz krystallisiert aus Alkohol in Blättchen oder großen Tafeln, die in 7 Teilen Wasser bei 15°

<sup>1)</sup> Baumann: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 2, S. 335. 1878/79.

<sup>2)</sup> Baumann: Ber. d. Dtsch. chem. Ges. Bd. 9, 1, S. 55. 1876. — Blumenthal: Biochem. Zeitschr. Bd. 1, S. 135. 1906. — Wohlgemuth: Berl. klin. Wochenschr. Bd. 43, S. 508. 1906. — Bial: Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 56, S. 416. 1907. — Wandel: ebd. Bd. 56, S. 420. 1907.

<sup>3)</sup> Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. Bd. 103, S. 66. 1886.

<sup>4)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 124, S. 15. 1922.

<sup>5)</sup> Baumann: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 2, S. 335. 1878/79; Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 9, 2, S. 1715. 1876; Bd. 11, 2, S. 1907. 1878.

<sup>6)</sup> Journ. f. prakt. Chemie Bd. 29, S. 229. 1884.

<sup>7)</sup> Baumann: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 9, 1, S. 55. 1876; Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 2, S. 335. 1878.

löslich sind. Das Bariumsalz krystallisiert in Nadeln mit 3 Mol. Krystallwasser.

251. **Kresolschwefelsäuren**  $C_7H_8SO_4$ . Sie finden sich im Harn des Menschen, des Pferdes und vieler anderer Säugetiere<sup>1)</sup>. Hauptsächlich kommt die p-Verbindung vor, daneben finden sich aber auch kleine Mengen der o-, vielleicht auch der m-Verbindung. Aus den Gonaden von *Rhizostoma Cuvieri* isolierte Haurowitz<sup>2)</sup> sowohl p- als auch o-Kresolschwefelsäure.

Synthese und Darstellung aus dem Harn ist analog wie bei der Phenolschwefelsäure. Der Pferdeharn ist mitunter so reich an kresolschwefelsaurem Kalium, daß es aus dem zum Sirup eingedampften Harn in der Kälte auskrystallisiert.

Das Kaliumsalz krystallisiert wie das der Phenolschwefelsäure. Über den Nachweis in Form der Kresolsulfosäure s. bei Baumann<sup>3)</sup>.

252. **Brenzcatechinschwefelsäuren**  $C_6H_6S_2O_8$  und  $C_6H_6SO_5$ . Sie finden sich nach Baumann (s. oben) im Pferdeharn. Im menschlichen Harn kommen sie gelegentlich vor. Sie fehlen aber bei reiner Fleischnahrung. Nach Eingabe von Benzol, Phenol, Brenzcatechin oder Protocatechusäure erscheinen sie reichlicher<sup>4)</sup>. Sie sind aus dem Harn noch nicht in Substanz isoliert worden. Synthese s. bei Baumann<sup>5)</sup>.

Das Kaliumsalz der Brenzcatechinmonoschwefelsäure krystallisiert, zeigt ähnliche Eigenschaften wie das Kaliumsalz der Phenolschwefelsäure. Die Lösung färbt sich mit Eisenchlorid violett. Das Kaliumsalz der Brenzcatechindschwefelsäure bildet ein in Alkohol unlösliches Krystallpulver, dessen wässrige Lösung mit Eisenchlorid keine charakteristische Färbung gibt.

**Hydrochinonschwefelsäure**  $C_6H_6SO_5$ . Sie findet sich nach Baumann<sup>6)</sup> spurenweise im Pferdeharn sowie im Harn nach Eingabe von Benzol oder Phenol<sup>7)</sup>.

Synthese wie bei den anderen gepaarten Schwefelsäuren. Das Kaliumsalz krystallisiert mit 1 Mol. Wasser.

Über Verbindungen der gepaarten Schwefelsäuren mit Chinäthonsäure s. die Arbeiten von Kossel<sup>8)</sup> und G. Hoppe-Seyler<sup>9)</sup>.

253. **Indoxylschwefelsäure (Harnindicin)**  $C_8H_7O_4NS$ . Kommt vor im Harn des Menschen und der Fleischfresser, besonders reichlich im Pferdeharn<sup>10)</sup>. Nach Eingabe von Indol oder o-Nitrophenylpropionsäure fand Jaffé und auch G. Hoppe-Seyler eine Vermehrung des Harnindicans<sup>11)</sup>. Über die Indicanausscheidung bei gewissen pathologischen Verhältnissen s. bei Hammarsten<sup>12)</sup>.

<sup>1)</sup> Städeler: Annalen d. Chemie Bd. 77, S. 18. 1851. — Baumann: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 9, 2, S. 1389. 1876. — Preusse: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 2, S. 355. 1878/79.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 122, S. 145. 1922.

<sup>3)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 9, 2, S. 1389. 1876.

<sup>4)</sup> Baumann u. Preusse: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 3, S. 156. 1879.

<sup>5)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 11, 2, S. 1907. 1878.

<sup>6)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 6, S. 183. 1882.

<sup>7)</sup> Baumann u. Preusse: Malys Jahresber. d. Tierchemie Bd. 9, S. 170. 1879.

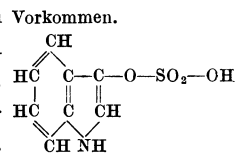
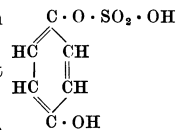
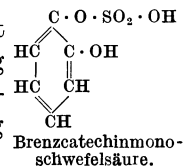
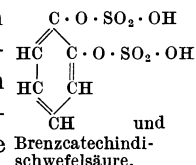
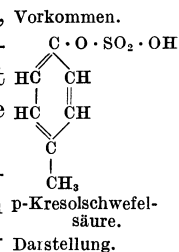
<sup>8)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 7, S. 292. 1882/83.

<sup>9)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 7, S. 424. 1882/83.

<sup>10)</sup> Baumann u. Brieger: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 3, S. 254. 1879. — Hoppe-Seyler: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 8, S. 79. 1884. — Otto: Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 33, S. 607. 1884. — G. Hoppe-Seyler: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 97, S. 171. 1916; s. auch Stanford: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 87, S. 188. 1913.

<sup>11)</sup> Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 3, S. 448. 1870; Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 7, S. 403. 1883; Bd. 8, S. 79. 1883/84; s. auch Stern: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 68, S. 52. 1910.

<sup>12)</sup> Lehrbuch der physiologischen Chemie 1922.

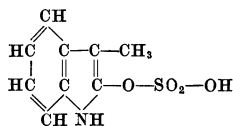


Eingenommenes Indol wird hauptsächlich als gepaarte Schwefelsäure ausgeschieden, Phenol und Kresol wird zum größten Teil an Glucuronsäure gebunden<sup>1)</sup>.

**Synthese.** Indoxylschwefelsäure bildet sich leicht aus Indoxyl und Kaliumpyrosulfat<sup>2)</sup>.  
**Darstellung aus Harn.** Zur Darstellung aus Harn<sup>3)</sup> dient Harn von Hunden, die mit Indol oder o-Nitrophenylpropiolsäure gefüttert waren (oder auch menschlicher Harn, siehe G. Hoppe - Seyler). Er wird zum dünnen Sirup eingedampft und mit Alkohol versetzt, solange noch ein Niederschlag entsteht. Das Filtrat wird mit dem gleichen Volumen Äther versetzt. Die nach 24 Stunden abgegossene Flüssigkeit wird mit konzentrierter alkoholischer Oxalsäurelösung versetzt, bis sich keine Fällung mehr bildet. Es wird schnell filtriert und eine konzentrierte Lösung von Kaliumcarbonat hinzugegeben, bis die Reaktion alkalisch ist. Das Filtrat wird zum Sirup eingedampft, dieser wird mit der 15—20fachen Menge kalten absoluten Alkohols aufgenommen. Die Lösung wird nach 24 Stunden filtriert. Der Filtrückstand wird mit 96proz. Alkohol ausgekocht, das Extrakt wird zur Krystallisation hingestellt. Die Mutterlauge der Krystalle oder — falls sich keine solchen abgeschieden haben — die ganze Lösung wird mit reichlich Äther versetzt. Von den sich abscheidenden schmierigen Massen wird abgegossen. Aus der Flüssigkeit scheiden sich dann allmählich Krystalle ab, die aus 96proz. Alkohol umkrystallisiert werden.

**Eigenschaften.** Das Kaliumsalz der Indoxylschwefelsäure gleicht im Aussehen und in seinen Eigenschaften dem der Phenolschwefelsäure. Trocken im Reagensglas erhitzt läßt es purpurrote Dämpfe von Indigoblau entstehen. Beim Erhitzen mit verdünnter Salzsäure wird Indoxyl in öligen Tropfen abgeschieden, wobei sich ein eigentümlicher fäkalartiger Geruch bemerkbar macht. Die öligen Tropfen sowie der Geruch verschwinden bald: Es entsteht ein brauner Niederschlag, der einen roten Farbstoff und Indigoblau enthält. Wird mit Salzsäure bei Gegenwart von gelinde oxydierenden Mitteln, z. B. Eisenchlorid, die Spaltung vorgenommen, so bildet sich Indigoblau<sup>4)</sup>. Beim Erhitzen mit Alkalien wird die Indoxylschwefelsäure kaum angegriffen. — Über die schwerlösliche Verbindung mit Chinäthonsäure s. G. Hoppe - Seyler<sup>5)</sup>.

**Nachweis.** Nachweis der Indoxylschwefelsäure s. § 591.



**Skatoxylschwefelsäure**  $C_9H_9O_4NS$ . Sie soll im normalen Harn vorkommen<sup>6)</sup>. Aus Diabetikerharn dargestellt ist sie von Otto<sup>7)</sup>. Ob sie im Harn nach Eingabe von Skatol erscheint, ist zweifelhaft. Versuche zur Synthese ergaben nur sehr mangelhafte Ausbeuten. Über die Darstellung aus Harn s. auch Otto<sup>8)</sup> und Jaffé<sup>9)</sup>.

<sup>1)</sup> Tollens: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 67, S. 138. 1910; s. auch G. Hoppe-Seyler: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 97, S. 171. 1916.

<sup>2)</sup> Bayer: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 14, 2, S. 1744. 1881. — Thesen: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 23, S. 23. 1896/97.

<sup>3)</sup> Baumann u. Brieger: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 3, S. 254. 1879. — G. Hoppe - Seyler: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 7, S. 423. 1882/83; Bd. 97, S. 171. 1916.

<sup>4)</sup> Baumann u. Tiemann: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 12, 1, S. 1098. 1879. — Obermayer: Wien. klin. Wochenschr. Bd. 9, S. 176. 1890.

<sup>5)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 7, S. 424. 1882/83.

<sup>6)</sup> Brieger: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 10, 1, S. 1031. 1877; Bd. 12, 2, S. 1985. 1879; Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 4, S. 414. 1880; s. dagegen Mester: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 12, S. 130. 1888. — Grosser: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 44, S. 328. 1905. — Staal: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 46, S. 236. 1905. — Maillard: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 46, S. 515. 1905. — Rosin: Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. Bd. 123, S. 550. 1891.

<sup>7)</sup> Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 33, S. 607. 1884; s. dagegen Staal: l. c.

<sup>8)</sup> Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 33, S. 607. 1884.

<sup>9)</sup> Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. Bd. 70, S. 73. 1877.

Das krystallisierende Kaliumsalz (?) soll beim trockenen Erhitzen rote Dämpfe entstehen lassen. Die wässrige Lösung soll mit konzentrierter Salzsäure eine rote, mit Eisenschlorid eine violette, mit konzentrierter Salpetersäure ebenfalls eine rote Färbung geben (Otto: s. oben).

Über die aus Skatol (resp. Indigo oder Urorosein) gebildeten Färbungen und ihre spektroskopische Untersuchung s. bei Hammarsten<sup>1)</sup>.

### Gepaarte Glucuronsäuren<sup>2)</sup>.

(Bearbeitet von F. Wrede-Greifswald.)

254. Viele Substanzen scheidet der Organismus mit Glucuronsäure verbunden aus, namentlich dann, wenn die zur Verfügung stehende Schwefelsäure zur Bindung nicht ausreicht. Künstlich zugeführtes Indol paart sich vorzugsweise mit Schwefelsäure, Phenol vorzugsweise mit Glucuronsäure (s. bei Indoxylschwefelsäure).

Die Glucuronsäure (§ 114) geht mit den betreffenden Stoffen glykosid-<sup>Konstitution.</sup>artige Verbindungen ein. Es können also nur solche Körper sich mit Glucuronsäure verbinden, die eine Hydroxylgruppe enthalten oder in denen der Organismus durch Oxydation (oder auch Reduktion) eine solche schaffen kann. — Außer diesen Verbindungen zwischen Glucuronsäure und Alkoholen sind noch einige weitere bekannt (s. S. 355 unten), in denen eine Carboxylgruppe sich mit der Glucuronsäure vereinigt. — Alle diese Stoffe haben noch sauren Charakter, da die Carboxylgruppe der Glucuronsäure nicht besetzt ist.

Die glykosidartigen gepaarten Säuren dürften der Reihe der sog.  $\beta$ -Glykoside angehören, denn sie können synthetisch aus der Acetobromglucuronsäure gewonnen werden, und aus Aceto-bromglykosen hat man sonst fast ausnahmslos  $\beta$ -Glykoside erhalten. Weiterhin werden die gepaarten Glucuronsäuren wie die meisten  $\beta$ -Glykoside durch Emulsin gespalten<sup>3)</sup>.

Die gepaarten Glucuronsäuren finden sich im normalen Menschenharn zu <sup>Vorkommen.</sup>etwa 0,04<sup>0/00</sup>—0,25<sup>0/00</sup><sup>4)</sup>, und zwar als Phenol-, Indoxyl- und Skatoxyglucuronsäure, vielleicht auch als Harnstoffglucuronsäure<sup>5)</sup>. Nach Bial<sup>6)</sup> kommen sie auch in der Galle und in den Faeces vor. Auch im Blut finden sie sich in kleinen Mengen<sup>7)</sup>. Nach Embden<sup>8)</sup> werden gepaarte Glucuronsäuren in der Leber gebildet.

Aus Glucuronsäurelacton-Bromhydrindiacetat und Phenol bzw. Euxanthon <sup>Synthese.</sup>in alkalischer methylalkoholischer Lösung wurden von Neuberger und Neimann<sup>9)</sup> Phenolglucuronsäure und Euxanthinsäure dargestellt. Sie sind mit den Naturprodukten identisch<sup>10)</sup>.

<sup>1)</sup> Lehrbuch der physiologischen Chemie 1922. S. 580.

<sup>2)</sup> Neuere Literatur zusammengestellt im Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, herausgegeben von Abderhalden, Abt. I, Teil 5, S. 1082. 1922.

<sup>3)</sup> S. dazu Neuberger u. Neimann: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 44, S. 97 u. 115. 1905.

<sup>4)</sup> Mayer u. Neuberger: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 29, S. 256. 1900. — Tollens u. Stern: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 64, S. 39. 1909.

<sup>5)</sup> Neuberger u. Neimann: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 44, S. 99. 1905.

<sup>6)</sup> Zeitschr. f. klin. Med. Bd. 47, S. 489; Zentralbl. f. Physiol. Bd. 21, S. 751. 1908; s. auch Leersum: Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 3, S. 522. 1903.

<sup>7)</sup> Mayer: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 32, S. 518. 1901. — Lépine u. Boulud: Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. Bd. 133, 134 u. 138; Stepp: Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 107, S. 264. 1920.

<sup>8)</sup> Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 2, S. 591. 1902.

<sup>9)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 44, S. 114. 1905.

<sup>10)</sup> Salkowski u. Neuberger: Biochem. Zeitschr. Bd. 2, S. 307. 1907.

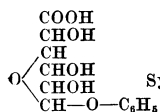
**Darstellung.** Die Darstellung der gepaarten Glucuronsäuren aus Harn gründet sich auf die Löslichkeit in Äther-Alkohol, auf die Fällbarkeit durch basisches Bleiacetat und auf die Aussalzbarkeit durch Ammoniumsulfat<sup>1)</sup>.

**Eigenschaften.** Die gepaarten Säuren drehen die Ebene des polarisierten Lichtes nach links. Bei der Behandlung mit verdünnten Säuren werden sie (meist erst beim Erwärmen) gespalten, wobei die Rechtsdrehung der freien Glucuronsäure sich geltend macht. Manche gepaarten Glucuronsäuren, bei denen die Spaltung auch in alkalischer Lösung leicht vor sich geht, reduzieren Fehling-Lösung direkt beim Erwärmen, andere müssen zuvor mit Säure gekocht werden. Sie geben ebenso wie die Glucuronsäure selbst die Phloroglucinreaktion und die Orcin-Salzsäurereaktion, letztere allerdings erst nach längerem Kochen, sowie die Reaktion nach Tollens (s. S. 137). Über die Verwendbarkeit der Reaktion nach Tollens s. die Arbeiten von Mandel und Neuberg<sup>2)</sup>, Neuberg und Saneyoshi<sup>3)</sup> und Neuberg und Schewket<sup>4)</sup>.

**Nachweis.** Zum Nachweis dienen die erwähnten Reaktionen, die Veränderung der optischen Drehung sowie das Reduktionsvermögen nach der Hydrolyse. Nach Mayer und Neuberg<sup>5)</sup> wird die etwa mit Bleiessig gefällte, wenn auch noch unreine Säure durch Kochen mit einer Mineralsäure gespalten. Es wird mit Soda neutralisiert, salzsaures p-Brom-phenylhydrazin und Natriumacetat hinzugefügt und erwärmt. Von der ausgeschiedenen rohen Hydrazinverbindung werden 0,2 g in einer Mischung von 4 ccm reinem Pyridin und 6 ccm absolutem Alkohol gelöst. Die Lösung wird im 1-dm-Rohr mit Natriumlicht optisch untersucht. Die p-Bromphenylhydrazinverbindung der Glucuronsäure zeigt dann einen Drehwinkel von  $-7^{\circ} 25'$ ; sie dreht sehr viel stärker als irgendeine andere in Frage kommende Substanz.

Weitere Methoden zum Nachweis und zur quantitativen Bestimmung s. bei Harn (§ 605).

**255. Phenolglucuronsäure**  $C_{12}H_{14}O_7$ . Findet sich in geringer Menge im normalen Harn, in größerer Menge nach Phenoleingabe<sup>6)</sup>.



**Synthese.**

Synthese aus Aceto-Bromglucuronsäurelacton und Phenol s. oben.

Zur Darstellung<sup>7)</sup> wird der Harn eines mit Phenol gefütterten Hammels

**Darstellung.** in Portionen von je 10 l mit pulverisiertem normalen Bleiacetat geschüttelt, bis alles Fällbare niedergeschlagen ist. Das Filtrat wird mit Bleiessig ausgefällt, der Niederschlag wird gründlich gewaschen und mit Ammoniumsulfid in gelinder Wärme umgesetzt. Das Filtrat vom Schwefelblei wird eingedampft. Der Rückstand krystallisiert bald. Er wird mit dem 3fachen Volumen Wasser durchgerührt und abgesaugt: Benzoe- und Hippursäure bleiben ungelöst. Das Filtrat wird eingengt und mit kalt gesättigter Bleiacetatlösung versetzt. Der Niederschlag wird verworfen. Im Filtrat wird nun mit Bleiessig die Phenolglucuronsäure gefällt. Nach dem Zersetzen mit Schwefelwasserstoff wird eingedampft und aus heißem Wasser umkrystallisiert.

<sup>1)</sup> Külz: Zeitschr. f. Biol. Bd. 27, S. 247. 1890; Schmiedeberg u. Mayer: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 3, S. 422. 1879; s. a. H. Fischer: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 70, S. 262. 1910; Bang: Bioch. Zeitschr. Bd. 32, S. 443. 1910.

<sup>2)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 13, S. 148. 1908. <sup>3)</sup> desgl. Bd. 36, S. 56. 1911.

<sup>4)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 44, S. 502. 1912.

<sup>5)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 29, S. 256. 1900.

<sup>6)</sup> Schmiedeberg: Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 14, S. 288. 1881. — Neuberg u. Mayer: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 29, S. 256. 1900. — Falk: Münch. med. Wochenschr. 1902, Nr. 36. — Fromm u. Hildebrandt: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 33, S. 579. 1901. — Salkowski u. Neuberg: Biochem. Zeitschr. Bd. 2, S. 307. 1906.

<sup>7)</sup> Salkowski u. Neuberg: Biochem. Zeitschr. Bd. 2, S. 308. 1906.



Die Säure bildet lange Nadeln vom Fp. 148—151°.  $[\alpha]_D = -81,9^\circ$ <sup>1)</sup>. Das Kalium- und Natriumsalz krystallisiert.

**Euxanthinsäure**  $C_{19}H_{18}O_{11}$  oder  $C_{19}H_{16}O_{10} + H_2O$ . Kommt vor im Harn von Kühen, die mit Mangoblättern gefüttert waren. Aus ihm wird sie abgetrennt (als Magnesiumsalz) und als Farbstoff unter dem Namen Piuri, Purree oder Indischgelb in den Handel gebracht<sup>2)</sup>.

Darstellung erfolgt aus Indischgelb oder aus Harn von Tieren, die Euxanthon erhalten hatten<sup>3)</sup>.

Euxanthinsäure bildet lange, gelbe Nadeln vom Fp. 156 bis 158° und Eigenschaften. Zsp. 160—180°.  $[\alpha]_D = -110^\circ$  (in wässrigem Alkohol).

**256. Mentholglucuronsäure**  $C_{16}H_{28}O_7$ . Findet sich nach Eingabe von Menthol im Harn<sup>4)</sup>.

Der Harn wird mit Ammoniumsulfat bis zur Halbsättigung versetzt, zum Darstellung. Kochen erhitzt und warm filtriert. Beim Erkalten scheidet sich das Ammoniumsalz fast quantitativ ab. Die freie Säure wird daraus durch Umkrystallisieren mit säurehaltigem Wasser oder Alkohol erhalten<sup>5)</sup>.

Große Krystalle mit  $1\frac{1}{2}$  Mol. Wasser, die bei 92° sintern, bei ca. 110° schmelzen.  $[\alpha]_D = -104,6^\circ$  (in Alkohol). Beim Erhitzen mit Wasser tritt Zersetzung ein<sup>6)</sup>.

**d-Campherglucuronsäure**  $C_{16}H_{24}O_8$ . Tritt im Urin nach Camphereingabe auf<sup>7)</sup>. Es wurden 2 Formen isoliert:

$\alpha$ -Säure, Nadeln vom Fp. 128—130°.  $[\alpha]_D = -32,8^\circ$ .

$\beta$ -Säure ist amorph.

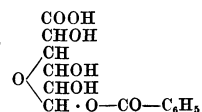
Die Säuren liefern bei der Hydrolyse einen Oxycampher, das Campherol. Nach Neuberg und Weiß<sup>8)</sup> sind die beiden Säuren identisch.

**Urochloralsäure (Trichloräthylalkoholglucuronsäure)**  $C_8H_{11}Cl_3O_7$ . Zeigt sich nach Eingabe von Chloralhydrat im Harn<sup>9)</sup>.

Weiß Krystalle vom Fp. 142°, leicht löslich in Wasser und in Alkohol, schwer löslich in Äther.  $[\alpha]_D = -57,4^\circ$ . Fehlingsche Lösung wird reduziert. Bei der Hydrolyse entsteht Trichloräthylalkohol  $C_2H_3Cl_3O$ .

Die beiden folgenden gepaarten Säuren sind esterartig zusammengesetzt. Sie werden durch Alkalien besonders leicht gespalten, reduzieren deshalb Fehling-Lösung.

**Benzoesäureglucuronsäure**  $C_{13}H_{14}O_8$ . Findet sich im Harn (Hammel) nach Eingabe von Benzoesäure<sup>10)</sup>. Die freie Säure krystallisiert nicht.  $[\alpha]_D = +43,86^\circ$  (Natriumsalz).



<sup>1)</sup> Salkowski u. Neuberg: l. c.

<sup>2)</sup> S. unter anderm Stenhouse: Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 51, S. 423. 1844. — Erdmann: Journ. f. prakt. Chemie (1), Bd. 33, S. 190. 1844. — Bayer: Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 155, S. 257. 1870. — Gräbe: Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 254, S. 267. 1889. — Lefèvre u. Tollens: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 40, 4, S. 4513. 1907.

<sup>3)</sup> Külz: Zeitschr. f. Biologie Bd. 23, S. 479. 1887.

<sup>4)</sup> Bonanni: Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 1, S. 304. 1901. — Fromm u. Clemens: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 34, S. 385. 1901. — Neuberg u. Lachmann: Biochem. Zeitschr. Bd. 24, S. 416. 1910. — Bang: Biochem. Zeitschr. Bd. 32, S. 443. 1911.

<sup>5)</sup> Bang: Biochem. Zeitschr. Bd. 32, S. 443. 1910.

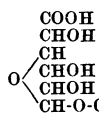
<sup>6)</sup> Fischer, H.: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 70, S. 262. 1910/11.

<sup>7)</sup> Wiedemann: Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 6, S. 230. 1877. — Schmiedeberg u. Mayer: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 3, S. 422. 1879. — Magnus-Levy: Biochem. Zeitschr. Bd. 2, S. 319. 1906.

<sup>8)</sup> Ergebn. d. Physiol. Bd. 3, I, S. 443. 1904.

<sup>9)</sup> v. Mering u. Musculus: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 8, 1, S. 640 u. 662. 1875. — Külz: Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 33, S. 221. 1884. — v. Mering: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 6, S. 480. 1882; Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 15, 1, S. 1019. 1882. — Neuberg u. Mayer: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 29, S. 256. 1900.

<sup>10)</sup> Magnus-Levy: Biochem. Zeitschr. Bd. 6, S. 502. 1907.



**Dimethylaminobenzoeglucuronsäure**  $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{NO}_8$ . Entsteht aus verfütterter Dimethylaminbenzoesäure<sup>1)</sup>.

Es sind außer den hier angeführten noch zahlreiche andere gepaarte Glucuronsäuren beobachtet worden, die nach Eingabe gewisser Stoffe im Urin auftreten<sup>2)</sup>.

### Chondroitin- und Mucoitinschwefelsäure.

(Bearbeitet von H. Steudel-Berlin.)

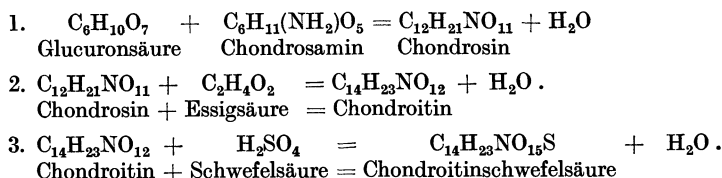
Chondroitinschwefelsäure.

257. Die Chondroitinschwefelsäure wurde zuerst von C. Th. Mörner<sup>3)</sup> im Knorpel aufgefunden, in ihren Reaktionen genau beschrieben und als Ätherschwefelsäure erkannt, sie wurde von Schmiedeberg<sup>4)</sup>, Mandel, Levene, La Forge und López - Suárez<sup>5)</sup> näher untersucht. Nach Schmiedeberg hat die Chondroitinschwefelsäure die Formel  $\text{C}_{18}\text{H}_{27}\text{NSO}_{17}$ , die nach neueren Analysen von Alzona<sup>6)</sup> in  $\text{C}_{14}\text{H}_{25}\text{NSO}_{16}$  abgeändert werden muß.

Konstitution.

Die Substanz zerfällt durch Einwirkung schwacher Säuren sehr leicht in Schwefelsäure und einen stickstoffhaltigen Kohlenhydratkomplex, das Chondroitin (eine einbasische, amorphe Säure, die eine dem arabischen Gummi ähnliche glasige Masse bildet und nicht reduziert). Das Chondroitin liefert bei weiterer Spaltung mit Salzsäure Essigsäure und einen reduzierenden Komplex, das Chondrosin. Das Chondrosin ist ein Körper, der sich mit Säuren und Basen verbinden kann, ist nichtkrystallisierend und reduziert Fehlingsche Lösung. Bei der Spaltung des Chondrosins mit Barythydrat erhält man Produkte, die anzeigen, daß das Chondrosin ein Disaccharid ist und aus Glucuronsäure und einem Hexosamin besteht, das von Schmiedeberg für Glucosamin gehalten wurde, von Levene und La Forge aber als ein Isomeres des Glucosamins, als Chondrosamin (§ 116), bezeichnet wird.

Der Aufbau der Chondroitinschwefelsäure würde sich also aus folgenden Stufen zusammensetzen:



Mit dieser Formulierung würde die von Alzona durch Elementaranalyse abgeleitete Formel  $\text{C}_{14}\text{H}_{25}\text{NSO}_{16}$  ganz gut stimmen, nach Levene muß wegen des Verhaltens des Chondroitins (das nicht reduziert, sondern erst nach der Spaltung Fehlingsche Lösung reduziert) die Formel verdoppelt werden, so daß der Chondroitinschwefelsäure die Formel  $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{S}_2\text{O}_{29}$  zukäme. Neuerdings hat Levene aber eine andere Formel für ein Bariumsalz der Säure angegeben:  $\text{C}_{26}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{S}_2\text{O}_{29}\text{Ba}_2$ .

Vorkommen.

Die Chondroitinschwefelsäure ist von C. Th. Mörner außer im Knorpel in der Tunica intima aortae und spurenweise in der Knochensubstanz aufgefunden, von K. Mörner<sup>7)</sup> im menschlichen Harn und in Rindernieren. Nach Levene kommt sie in Knorpel, Sehnen, Aorta und Sklerotica vor, während in Nabelstrang, Glaskörper, Cornea, Magenschleimhaut, Serummucoïd, Ovomucoïd

<sup>1)</sup> Jaffé: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 43, S. 374. 1904/05. — Hildebrandt: Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 7, S. 438. 1906.

<sup>2)</sup> Zusammenstellung s. u. a. Biochemisches Handlexikon (Abderhalden) und Tollens: Kurzes Lehrbuch der Kohlenhydrate. 1914.

<sup>3)</sup> Skandinav. Arch. f. Physiol. Bd. 1, S. 210. 1889. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 20, S. 357. 1895; Bd. 23, S. 311. 1897.

<sup>4)</sup> Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 28, S. 355. 1891; Bd. 87, S. 1. 1920.

<sup>5)</sup> Levene: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 37, S. 400. 1901. — Levene u. Mandel: desgl. Bd. 45, S. 386. 1905; Bd. 47, S. 151. 1906. — Levene u. La Forge: Journ. of biol. chem. Bd. 15, S. 69, 155. 1913; Bd. 18, S. 123, 237. 1914; Bd. 20, S. 95, 433. 1915; Bd. 26, S. 143. 1917. — Levene u. López - Suárez: desgl. Bd. 25, S. 511. 1917; Bd. 26, S. 373. 1917; Bd. 31, S. 609. 1919; Bd. 36, S. 105. 1919; Bd. 45, S. 467. 1921.

<sup>6)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 66, S. 408. 1915.

<sup>7)</sup> Skand. Arch. f. Physiol. Bd. 6, S. 332. 1895.

und Ovarialcysten die entsprechende Säure nicht Chondrosamin als Komponente, sondern Glucosamin enthält. Diese im übrigen sich ganz wie die Chondroitinschwefelsäure verhaltende Substanz ist von ihm Mucoitinschwefelsäure<sup>1)</sup> genannt, aber bis auf das in ihr enthaltene Hexosamin noch nicht in genügender Reinheit isoliert worden. Die entsprechenden Spaltungsprodukte der Mucoitinschwefelsäure sind das Mucoitin, das in Mucosin und Essigsäure zerfällt, während das Mucosin aus Glucuronsäure und Glucosamin besteht.

Über das Vorkommen von Chondroitinschwefelsäure im Amyloid<sup>2)</sup> resp. in amyloidarteten Organen sind die Ansichten geteilt.

Für die Darstellung der Chondroitinschwefelsäure sind Verfahren von C. Th. Mörner<sup>3)</sup>, Schmiedeberg<sup>4)</sup>, Kondo<sup>5)</sup> und Levene<sup>6)</sup> ausgearbeitet worden, auf die hier nur verwiesen werden kann. Nach den von Levene veröffentlichten Analysen scheint sein Verfahren nur ein sehr unreines Präparat von Chondroitinschwefelsäure zu liefern.

Über die Darstellung der Mucoitinschwefelsäure s. Levene und López-Suárez<sup>7)</sup>.

Die freie Chondroitinschwefelsäure ist wegen ihrer leichten Zersetzlichkeit nicht darstellbar; fast sämtliche Salze sind in Wasser leicht löslich. Weder die freie Säure noch ihre Salze diffundieren durch Pergament- oder Schilfmembranen. Neutrale Lösungen werden durch basisches Bleiacetat, Zinnchlorür, Quecksilberoxydulnitrat, neutrales Eisenchlorid und Alkohol gefällt, nicht durch die meisten übrigen Metallsalze, Mineralsäuren, Essigsäure, Pikrinsäure, Gerbsäure. Lösungen, welche chondroitinschwefelsaures Kali und Eiweiß oder Leim enthalten, geben beim Ansäuern mit Essigsäure Niederschläge, die im Überschuß der Säure unlöslich, dagegen in überschüssigen Mineralsäuren löslich sind.

Mit Kupferoxyd und Natronlauge gibt die Chondroitinschwefelsäure eine rein blaue Lösung. Mit Salzsäure erhitzt, reduziert die Lösung und gibt auf Zusatz von Bariumchlorid einen Niederschlag von Bariumsulfat. Sie gibt keine Orcinsalzsäurereaktion (§ 100) und kein Furfurol bei der Destillation mit Salzsäure, dagegen die Ehrlichsche Reaktion mit p-Dimethylaminobenzaldehyd (S. 308) (Orgler und Neuberg<sup>8)</sup>).

Zum Nachweis der Chondroitinschwefelsäure verfährt man nach C. Th. Mörner<sup>9)</sup> folgendermaßen: Das fein zerkleinerte Material wird bei Zimmertemperatur mit 2 Tl. 2proz. Kalilauge digeriert. Nach 2 Tagen verdünnt man mit 3 Tl. Wasser, filtriert durch Leinwand, macht das Filtrat mit Essigsäure deutlich sauer, fügt sofort überschüssiges Bariumcarbonat hinzu, kocht auf, filtriert und dampft nach Hinzufügen von etwas Bariumcarbonat

<sup>1)</sup> Levene u. López-Suárez: Journ. of biol. chem. Bd. 25, S. 511. 1916; Bd. 26, S. 373. 1917; Bd. 36, S. 105. 1919.

<sup>2)</sup> Krawkow: Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 40, S. 195. 1898. — Oddi: desgl. Bd. 33, S. 376. 1894. — Mayeda: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 58, S. 469. 1909. — Hanßen: Biochem. Zeitschr. Bd. 13, S. 185. 1908.

<sup>3)</sup> Mörner, Th. C.: Skandinav. Arch. f. Physiol. Bd. 1, S. 210. 1889; Bd. 6, S. 332. 1895. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 20, S. 357. 1895; Bd. 23, S. 311. 1897.

<sup>4)</sup> Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 28, S. 355. 1891; Bd. 87, S. 1. 1920.

<sup>5)</sup> Kondo: Biochem. Zeitschr. Bd. 26, S. 116. 1910. — Fränkel: Ann. d. Chem. u. Pharmazie Bd. 351, S. 541. 1906. — Pons: Beitr. z. chem. Physiol. Bd. 9, S. 393. 1907.

<sup>6)</sup> Levene u. La Forge: Journ. of biol. chem. Bd. 15, S. 69. 1913; Bd. 18, S. 237. 1914; Bd. 25, S. 511. 1917; Bd. 26, S. 373. 1917; Bd. 36, S. 105. 1919. — Posner u. Gies: Americ. Journ. of Physiol. Bd. 11, S. 330. 1904.

<sup>7)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 36, S. 1. 1918.

<sup>8)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 37, S. 416 und 424. 1902/03.

<sup>9)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 20, S. 358. 1895.

auf dem Wasserbade bis zur Trockne. Der Rückstand wird einige Minuten mit Wasser gekocht, das Filtrat mit Alkohol gefällt, der Niederschlag mit kochendem Alkohol ausgewaschen, in Wasser gelöst und die wässerige Lösung geprüft, ob sie auf Zusatz von Leimlösung und Essigsäure einen Niederschlag gibt und ob sie nach dem Kochen mit Salzsäure reduziert und freie Schwefelsäure enthält.

Chondrosin. 258. Chondrosin. Zur Darstellung nach Levene<sup>1)</sup> werden 50 g Bariumsalz der Chondroitinschwefelsäure in 150 ccm eines Gemisches gleicher Teile Wasser und konzentrierter Salzsäure gelöst und 1 Stunde auf dem Wasserbade erwärmt. Es scheidet sich sofort BaSO<sub>4</sub> aus und nach 1 Stunde ist das Maximum an Reduktionsvermögen erreicht. Aller Stickstoff ist dann als Aminostickstoff (nach van Slyke) vorhanden. Die filtrierte Lösung wird im Vakuum zum dicken Sirup verdampft, dieser in 40 ccm heißem Wasser aufgenommen und in 500 ccm absoluten Alkohol gegossen. Das Chondrosinchlorhydrat fällt teilweise als flockiger Niederschlag aus. Nach dem Stehen über Nacht werden 2 Vol. absoluter Äther zugesetzt, der Niederschlag abgesaugt und mit absolutem Äther gründlich gewaschen. Zur Reinigung wird der Körper in seinem Gewicht Wasser gelöst und wie oben beschrieben wieder ausgefällt. Farbloses nicht-hygroscopisches Pulver. Ausbeute etwa 27 g.

Für das Sulfat fanden Orgler und Neuberg in Übereinstimmung mit Schmiedeberg  $[\alpha]_D^{17} = +38,44^\circ$ . Daraus berechnet sich für freies Chondrosin  $[\alpha]_D = +47,34^\circ$  (nach Schmiedeberg  $+42,0^\circ$ ).

Bei der Spaltung des Chondrosin mit Natriumamalgam erhält man eine Lösung, in der Glucuronsäure mit Hilfe von Phenylhydrazin oder p-Bromphenylhydrazin nachgewiesen werden kann. Bei der Oxydation mit Salpetersäure wird saures zuckersaures Kali erhalten, ebenso bei Behandlung mit Brom. Das Chondrosin liefert bei der Destillation mit Salzsäure eine Menge Furfurol, die etwa 1 Mol. Glucuronsäure und 1 Mol. Glucosamin entspricht. Aus Chondrosin läßt sich beim Sieden mit Schwefelsäure Lävulinsäure gewinnen.

Chondridin. Das von Hebbing<sup>2)</sup> aus Chondroitinschwefelsäure erhaltene krystallisierende Chondridin soll nach Levene<sup>3)</sup> ein mit 1½ Mol. Krystallwasser krystallisierendes Lacton des Chondrosin sein.

Glucothionsäure. Die früher als Glucothionsäure<sup>4)</sup> beschriebene Substanz scheint unreine Chondroitinschwefelsäure gewesen zu sein.

### Lactacidogen.

Vorkommen. 259. Diese von Embden sogenannte Tätigkeitssubstanz des quergestreiften Muskels ist nach ihm ein Hexosephosphorsäurekomplex, welcher bei der Kontraktion durch fermentative Spaltung unter Bildung von Phosphorsäure und Milchsäure zerfällt. Die von ihm<sup>5)</sup> aus der Lactacidogenfraktion des Muskelsaftes mit Hilfe von Phenylhydrazin erhaltene Osazonverbindung erwies sich als identisch mit der Phenylhydrazinverbindung des Osazons aus Hefehexosephosphorsäure (C<sub>24</sub>H<sub>31</sub>N<sub>6</sub>PO<sub>7</sub>). Schön krystallisiert. Fp. 148°, eine 0,4 proz. Lösung dreht im 4-Dezimeterrohr  $-0,56^\circ$ .

Darstellung. Zur Darstellung verfährt man folgendermaßen: Noch lebensfrische Muskulatur wird unter starker Kühlung in der Fleischhackmaschine zerkleinert\*), der in gekühltem Gefäß aufgefangene

\*) Zweckmäßiger ist es wohl, die Muskulatur in Dewarschem Gefäß gefrieren zu lassen und die Zerkleinerung nach § 733 vorzunehmen.

<sup>1)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 15, S. 69. 1913.

<sup>2)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 63, S. 353. 1914. <sup>3)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 45, S. 467. 1921.

<sup>4)</sup> Levene: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 31, S. 395. 1900/01; Bd. 37, S. 400. 1902/03; Bd. 39, S. 1. 1903. — Mandel u. Levene: desgl. Bd. 45, S. 386. 1905; Bd. 47, S. 151. 1906. Biochem. Zeitschr. Bd. 4, S. 78. 1907; Bd. 16, S. 246. 1909. — Mandel u. Neuberg: Biochem. Zeitschr. Bd. 13, S. 142. 1908. — Neuberg: desgl. Bd. 16, S. 250. 1909. — Levene u. Jacobs: Journ. of exp. med. Bd. 16, S. 557. 1908.

<sup>5)</sup> Embden u. Laquer: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 113, S. 1. 1921.

Brei mit dem seinem Gewicht entsprechenden Volumen 4proz. eisgekühlter Salzsäure eine Stunde lang kräftig gerührt (zur Zerstörung des Fermentes), mit dem der Salzsäure gleichen Volumen 5proz. Sublimatlösung versetzt und einige Zeit gerührt. Nach Stehen im Eisschrank über Nacht wird abgesaugt, das Filtrat mit Schwefelwasserstoff vom Quecksilber und durch Luftstrom vom Schwefelwasserstoff befreit und unter Eiskühlung zunächst mit starker Natronlauge bis zur schwach sauren Reaktion und dann weiter unter kräftigem Rühren mit reinem gepulvertem bariumcarbonatfreiem Ätzbaryt versetzt bis zur stark alkalischen Reaktion und bis eine Probe des Filtrats mit Barytwasser keine Trübung mehr gibt. Die Barytfällung, welche sich innerhalb weniger Stunden absetzt, wird noch an demselben Tage auf einer großen eisgekühlten Nutsche abgesaugt und mit eisgekühltem Wasser gewaschen, bis das Waschwasser kaum noch alkalisch reagiert. Man verreibt sie unter starker Kühlung in einer Reibschale mit 25proz. Schwefelsäure, bis auch nach einigem Stehen stark mineralisirende Reaktion vorhanden ist und eine abzentrifugierte Probe reichlich freie Schwefelsäure enthält. Nach Absaugen des Bariumsulfats fällt man das Filtrat zur Entfernung des Magnesiums mit gesättigter Bleizuckerlösung unter Vermeidung eines Überschusses, saugt den Niederschlag ab, wäscht ihn gründlich mit kaltem Wasser (am besten indem man ihn ein oder mehrere Male von der Nutsche nimmt und mit Wasser zerreibt) und zersetzt ihn mit überschüssiger 25proz. Schwefelsäure in der Reibschale. Das bleifreie, schwefelsaure, gelb gefärbte Filtrat, welches außer Lactacidogen noch Phosphorsäure und Nucleinsäure enthält, wird zur Entfernung der Hauptmenge der Nucleinsäure mit dem 4—5fachen Volumen Methylalkohol versetzt, der Niederschlag nach wiederholtem Schütteln bei geringem Druck abgesaugt und das Filtrat im Vakuum bei einer 40° nicht übersteigenden Temperatur des Heizwassers stark eingeeengt (bei einer Ausgangsmenge von 5 kg Muskeln bis auf etwa 100—150 ccm). Man mißt das Volumen und fügt auf je 20 ccm gepulvertes Natriumacetat bis zum Verschwinden der Kongoreaktion hinzu und 1,5 g reinstes salzsaures Phenylhydrazin und erwärmt im Wasserbad bei 80°. Tritt beim Erwärmen nicht sofort völlige Klärung ein, so filtriert man heiß und erwärmt 30—40 Minuten weiter. Sehr rasch tritt eine zunehmende Gelbfärbung ein, und die Osazonverbindung krystallisiert aus, bei größerer Lactacidogenkonzentration schon in der Wärme, sonst beim Abkühlen. Nach einigen Stunden Stehens im Eisschrank (nicht länger als über Nacht) saugt man ab, wäscht mit eiskaltem Wasser aus, trocknet im Vakuum über Schwefelsäure und krystallisiert nun durch Lösen in heißem Methylalkohol und Versetzen mit heißem Chloroform. Goldgelbe, zugespitzte Blättchen, oft rosetten- oder garbenartig angeordnet. Sie werden rasch abgesaugt, mit einem Gemisch von 1 Vol. Methylalkohol und 3 Vol. Chloroform, dann mit reinem Chloroform gewaschen und möglichst schnell in einen Vakuumexsiccator gebracht. Aus 7 kg Hundemuskeln wurden nach dem sehr verlustreichen Umkrystallisieren aus Methylalkohol-Chloroform 3,52 g reine Substanz erhalten. Aus 100 g gewinnt man eine für die Identifizierung durch Schmelzpunkt- und Phosphorbestimmung genügende Menge.

Ausbeute.

### Glycerinphosphorsäure.

260. Glycerinphosphorsäure  $C_3H_9PO_6$ . Sie findet sich in sehr geringer Menge Vorkommen. im normalen Harn, im Blut, leukämischem Harn, in Transsudaten, Colostrum, Muskeln, Nerven, im Gehirn, Eidotter, Eiter usw. Sie entsteht bei der Spaltung von Lecithin, Kephalin und vielleicht noch anderen Phosphatiden mit Bariumhydroxyd. Auch bei der Fermentspaltung des Lecithins tritt sie auf (P. Mayer). Die frei vorkommende ist wohl überall als Zersetzungsprodukt von Phosphatiden aufzufassen.

Die natürliche Glycerinphosphorsäure ist optisch aktiv (Willstätter und Lüdeke<sup>1)</sup>), kann aber nicht die reine unsymmetrische Säure darstellen, da die Barium- und Calciumsalze (auch nach vorangegangener Racemisation) nicht mit denen dieser Säure übereinstimmen. Die Säure (aus Eigelb- und Gehirnlecithin\*) besteht jedenfalls aus einem Gemenge der asymmetrischen und symmetrischen, in dem die letztere zu überwiegen scheint (Tutin und Hann<sup>2)</sup>, Bailly<sup>3)</sup>).

\*) Die für die Darstellung benutzten Präparate waren unzweifelhaft Gemenge von Lecithin und Kephalin.

<sup>1)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 37, 3, S. 3753. 1904.

<sup>2)</sup> Journ. of the chem. soc. (London) Bd. 89, 2, S. 1749. 1906.

<sup>3)</sup> Journ. de pharmacie et de chim. [7] Bd. 11, S. 204; ref. Chem. Zentralbl. 1915, I, S. 1300 u. 1916, II, S. 726, ferner 1919, I, S. 84. — Grimbert u. Bailly: Journ. de pharmacie et de chim. [7] Bd. 11, S. 153; ref. Chem. Zentralbl. 1915, I, S. 878.

$\alpha$ -Glycerinphosphorsäure (asymmetrische).

Synthese. Sie entsteht bei der Einwirkung von Permanganat in der Kälte auf monoallylphosphorsaures Natrium (Bailly<sup>1</sup>). E. Fischer und Pfähler<sup>2</sup>) erhielten sie aus Acetonglycerinphosphorsäure durch Kochen mit Schwefelsäure. Sie wurde auch, wahrscheinlich in weniger reinem Zustande von Tutin und Hann<sup>3</sup>), King und Pyman<sup>4</sup>) und von Carré<sup>5</sup>) dargestellt.

d- und l- $\alpha$ -Glycerinphosphorsäure wurden von Abderhalden und Eichwald<sup>6</sup>) durch Eintragen von Phosphoroxchlorid in eine gut gekühlte Mischung von aktivem Monobromhydrin und Pyridin und Abscheidung des Halogens aus der gebildeten Bromglycerinphosphorsäure durch Lithiumhydroxyd erhalten. Dabei entsteht aus d-Monobromhydrin das rechtsdrehende  $\alpha$ -glycerinphosphorsäure Lithium, aus l-Monobromhydrin das linksdrehende.  $[\alpha]_D^{20}$  für das nicht ganz reine Salz (12—15 proz. Lösung) +3,51° bzw. -3,02°.

Eigenschaften.  $\alpha$ -Glycerinphosphorsäure ist eine sirupöse Flüssigkeit. Natriumsalz zerfließliche Blättchen, Bariumsatz existiert als amorphes, leicht lösliches und als krystallisiertes schwer lösliches. Letzteres scheidet sich beim Kochen der Lösung rasch in zu Büscheln und Knollen vereinigten breiten Nadeln oder langen Plättchen ab und stellt, an der Luft getrocknet, ein sandiges, farbloses Pulver ohne Krystallwasser dar. Löslich in Mineralsäuren und Essigsäure. Bei 22° in Wasser zu 1,26—1,3% löslich. (Die Angabe von Bailly<sup>7</sup>), bei 16° zu 1,87%, erklärt sich wohl durch die Existenz der leicht löslichen Modifikation.)

Ag salz Die konzentrierte Lösung der leicht löslichen Form gibt Fällungen mit Silbernitrat, Bleiacetat, Sublimat, Silbersatz feine, farblose Nadeln ohne Krystallwasser

Ca salz (E. Fischer und Pfähler). Calciumsatz amorph (bei 14° zu 5% löslich) und krystallisiert (bei 14° zu 3,95% löslich). Bei beiden nimmt die Löslichkeit mit steigender Temperatur ab (Bailly). Brucinsatz + 9 H<sub>2</sub>O Nadeln, welche krystallwasserfrei bei 157—158° schmelzen.  $[\alpha]_D$  für das wasserfreie Salz in Wasser = -25,3°, in Alkohol = -32,5° (Tutin und Hann). Nach King und Pyman ist der Krystallwassergehalt wechselnd. Bei 158—160° tritt Transparenz ein und erst bei weiterem Erhitzen Schmelzen.  $[\alpha]_D$  für das wasserfreie Salz in Methylalkohol = -24,0°

 $\beta$ -Glycerinphosphorsäure (symmetrische).

Synthese. Sie wurde von Tutin und Hann und von King und Pyman (ausgehend von  $\alpha$ -Dichlorhydrin und Phosphoroxchlorid) dargestellt.

$\beta$ -Glycerinphosphorsaures Natrium ist auch das Handelspräparat Poulenc (Paolini<sup>8</sup>), Bailly<sup>9</sup>).

Eigenschaften. Sirupöse Flüssigkeit. Natriumsatz + 5 H<sub>2</sub>O rechtwinklige Platten, wasserfrei bei 17° zu 27,16% löslich (Bailly). Bariumsatz existiert in einer amorphen leicht löslichen und mehreren krystallisierten Formen, die durch Krystallwassergehalt und Löslichkeit sich unterscheiden (Bailly). Calciumsatz krystallisiert wasserfrei (löslich bei 18° zu 0,99%) und + 1,25 H<sub>2</sub>O (löslich bei 18° zu 1,16%).

Brucinsatz. Mit zunehmender Temperatur nimmt Löslichkeit ab (Bailly). Brucinsatz + 11½ H<sub>2</sub>O, Nadeln schmelzen wasserfrei bei 157—158°.  $[\alpha]_D$  für das wasserfreie Salz in Wasser = -23,9°, in Alkohol = -28,1° (Tutin und Hann). Nach King und Pyman krystallisieren sie mit wechselndem Krystallwassergehalt, werden (krystallwasserfrei) bei 158—160° transparent und erst bei weiterem Erhitzen flüssig.  $[\alpha]_D$  für das wasserfreie Salz in Methylalkohol = -25,2°.

<sup>1</sup>) Chem. Zentralbl. 1915, II, S. 391; 1919, I, S. 84.

<sup>2</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 53, 2, S. 1616. 1920. <sup>3</sup>) a. a. O.

<sup>4</sup>) Journ. of the chem. soc. (London) Bd. 105, S. 1238. 1914.

<sup>5</sup>) Bull. de la soc. chim. de France (4) Bd. 11, S. 169. 1912.

<sup>6</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 51, 2, S. 1308. 1918.

<sup>7</sup>) Chem. Zentralbl. 1917, I, S. 308.

<sup>8</sup>) Gaz. chim. ital. Bd. 42, 1, S. 57; ref. Chem. Zentralbl. 1912, I, S. 995 u. Atti R. acad. Roma (5) Bd. 21, 2, S. 350; ref. Chem. Zentralbl. 1912, II, S. 1616.

<sup>9</sup>) Chem. Zentralbl. 1919, I, S. 84.

Natürliche Glycerinphosphorsäure (Gemenge von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Säure?).

Man erhält sie aus Lecithin in Form ihres Bariums Salzes durch Erhitzen mit Barytwasser, Filtrieren, Einleiten von Kohlensäure, Filtrieren und Fällen des Filtrats mit Alkohol. Zur Reinigung wird der Niederschlag in Wasser gelöst, die Lösung wieder mit Alkohol gefällt und Lösung und Fällung häufig wiederholt. Darstellung.

Um eine Racemisierung möglichst zu vermeiden, stellt man das Lecithin bei gewöhnlicher Temperatur nach Ulpiani<sup>1)</sup> dar, bewerkstelligt die Hydrolyse durch mehrstündiges Schütteln mit 10% Barytwasser in der Kälte\*), reinigt durch tagelanges Digerieren mit Blutkohle und fällt dann wiederholt mit Alkohol wie oben (Willstätter und Lüdeke).

Sirupöse Flüssigkeit. Bariumsalz in kaltem Wasser leicht löslich, schwerer in kochendem. Es setzt sich beim Erhitzen der Lösung als Haut an der Gefäßwand ab und ist schwer abzufiltrieren, da es bei geringer Temperaturerniedrigung wieder in Lösung geht. Durch Alkohol, in dem es unlöslich ist, wird es aus verdünnter Lösung als schleimiger Niederschlag gefällt, aus konzentrierter in kompakten Flocken. Bei 105° getrocknet entspricht es, und zwar sowohl das beim Erhitzen der Lösung als durch Alkohol gefällte, der Formel  $C_3H_7O_6P\text{Ba} + \frac{1}{2} H_2O$ . Das Bariumsalz der vollständig racemisierten natürlichen Säure krystallisiert ebenfalls mit  $\frac{1}{2} H_2O$  und löst sich in 13,9 Tl. Wasser bei 17° (Tutin und Hann). Das Calciumsalz wird aus dem Bariumsalz durch stundenlanges Schütteln seiner Lösung mit der Lösung von frisch gefälltem Gips erhalten, scheidet sich beim Erwärmen seiner wässerigen Lösung als flimmernde Krystallnadelchen ab. Beim Trocknen über Schwefelsäure im Vakuum hält es noch  $\frac{3}{4} H_2O$  zurück, welches in der Wärme (130°) abgegeben wird; wasserfreies Salz bei 16° zu 2,13%, bei 18° zu 2,62% löslich, unlöslich in Alkohol. Eigenschaften.  
Ba salz.  
Ca salz.

Brucinsalz +  $6\frac{1}{2} H_2O$ , Nadeln schmelzen wasserfrei bei 158—159°.  $[\alpha]_D$  für das wasserfreie Salz in Wasser — 23,9°, in Alkohol — 27,9° (Tutin und Hann). Brucinsalz.

Ba- und Ca salz zeigen eine schwache Linksdrehung. Die Stärke der Ablenkung ist nicht genau anzugeben, da sich eine partielle Racemisierung bei der Darstellung nicht vermeiden läßt. Bei möglichster Vermeidung der Racemisierung (s. oben)  $[\alpha]_D$  für Calciumsalz — 2,09°, für Bariumsalz — 1,71° (Willstätter und Lüdecke). Levene und Rolf<sup>2)</sup> erhielten niedrigere Werte. Die Angabe von Fränkel und Dimitz<sup>3)</sup>, daß die Glycerinphosphorsäure aus Kephalin rechts drehe, ist nach Levene und Rolf unrichtig. S. dazu noch Fränkel<sup>3)</sup>. Optische Eigenschaften.

Beim Erwärmen zerlegt sich die freie Säure allmählich in ihre Komponenten. Durch verdünnte Säuren wird sie langsam hydrolysiert, durch  $\frac{1}{4} H_2SO_4$  bei 92° erst in 10 Tagen vollständig (Plimmer<sup>4)</sup>). Über die Geschwindigkeit der Hydrolyse s. Malengreau und Prigent<sup>5)</sup>. Sie wird völlig gespalten durch Extrakte der Niere und Darmschleimhaut, in geringerem Grade durch Lunge, in noch geringerem durch Leber und Milz, gar nicht durch Pankreas, Muskeln, Blut (Grosser und Husler<sup>6)</sup>, Plimmer<sup>7)</sup>); s. auch Forrai<sup>8)</sup>. Eine Spaltung erfolgt auch durch Hefe (Neuberg und Karczag<sup>9)</sup>) sowie durch viele Pflanzensamen (Nemec<sup>10)</sup>) und durch Takadiastase (Akamatsu<sup>11)</sup>). Für alle diese Fermentversuche wurde synthetische inaktive Glycerinphosphorsäure benutzt, nur Akamatsu verwendet auch natürliche. Spaltung.

\*) Nach Levene und Rolf<sup>2)</sup> ist die Racemisierung von der Temperatur unabhängig.

<sup>1)</sup> Gazz. chim. ital. Bd. 31, 2. S. 47. 1901. <sup>2)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 40, S. 1. 1919.

<sup>3)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 21, S. 337. 1909. — Fränkel: desgl. Bd. 124, S. 226. 1921.

<sup>4)</sup> Biochem. journ. Bd. 7, S. 72. 1913.

<sup>5)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 73, S. 68. 1911.

<sup>6)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 39, S. 1. 1912. <sup>7)</sup> Biochem. journ. Bd. 7, S. 43. 1913.

<sup>8)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 142, S. 282. 1923. <sup>9)</sup> desgl. Bd. 36, S. 60. 1911.

<sup>10)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 93, S. 94. 1919 u. Bd. 137, S. 570. 1923.

<sup>11)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 142, S. 184 u. 186. 1923.

### Phosphatide.

**Vorkommen.** 261. Mit diesem von Thudichum eingeführten Namen bezeichnet man Verbindungen, welche Phosphorsäure, höhere Fettsäuren und organische Basen enthaltend, in allen darauf untersuchten tierischen und pflanzlichen Zellen und Geweben gefunden worden sind und besonders reichlich in der Nervensubstanz, im Eidotter, im Sperma, in den Nebennieren, im Herzmuskel, in den Samen vorkommen. Auch im Blut, in der Galle, in Transsudaten, in der Milch, im Colostrum, im Sputum fehlen sie nicht. Sie sind sowohl im freien Zustande als auch in lockerer, schon durch Alkohol zerlegbarer Verbindung mit anderen Stoffen vorhanden und lassen sich im allgemeinen den Geweben durch Äther entziehen, die freien direkt, die lockergebundenen nach vorausgegangener Alkoholbehandlung.

**Einteilung.** Man teilt sie, ebenfalls nach Thudichum, auf Grund des Verhältnisses von Phosphor und Stickstoff in ihrem Molekül ein in Monoaminomonophosphatide (§ 262 ff.), Diaminomonophosphatide (§ 266) usw. Die Trennung und Isolierung der einzelnen ist sehr schwierig und bis jetzt nur für einige, und auch nur bis zu einem gewissen Grade, gelungen. Diese Schwierigkeiten beruhen auf der Ähnlichkeit der Löslichkeitsverhältnisse und der Fähigkeit dieser Verbindungen, einander und fremde an und für sich in den Lösungsmitteln unlösliche Substanzen in Lösung zu erhalten, auch auf der leichten Zersetzlichkeit mancher. Es scheint indessen, daß die Zahl der Phosphatide geringer ist als man bisher annahm und daß viele der als chemische Individuen beschriebenen dies keineswegs sind.

**Nachweis.** Zum Nachweis der Phosphatide in Organen und Flüssigkeiten eignet sich wohl am besten das folgende Verfahren: Die fein zerkleinerten Organe extrahiert man mit Alkohol und filtriert die alkoholischen Auszüge ab. Flüssigkeiten fällt man mit Alkohol und filtriert von den Niederschlägen ab. Die auf dem Filter zurückbleibenden Massen werden mehrmals mit Alkohol bei 50—60° ausgezogen, die abfiltrierten Lösungen mit den ersten Filtraten vereinigt und bei mäßiger Wärme verdunstet; dabei ist auf möglichst neutrale Reaktion zu achten, nötigenfalls durch Essigsäure oder Soda während des Abdampfens zu neutralisieren. Der Rückstand wird mit einer Mischung von Alkohol und Äther extrahiert, das Filtrat verdunstet. Den zurückbleibenden Sirup zieht man mehrmals mit Äther aus, vereinigt die filtrierten Auszüge und destilliert den Äther ab. Der Rückstand enthält neben Phosphatiden wohl stets Cholesterin, gewöhnlich auch Fette, seltener andere Stoffe, aber keine Phosphate. Findet man bei der Veraschung mit Soda und Salpeter (§ 54) Phosphorsäure, so ist damit die Anwesenheit von Phosphatiden nachgewiesen.

#### *Monoaminomonophosphatide.*

262. **Allgemeines.** Die am besten bekannten, wahrscheinlich die einzigen Monoaminomonophosphatide, sind die Lecithine und Kephaline, welche in weitester Verbreitung im Tier- und Pflanzenkörper vorkommen. Das erste Lecithin wurde von Gobley und in Hoppe-Seylers Laboratorium von Diakonow<sup>1)</sup> aus Eigelb gewonnen, ein Kephalin zuerst von Thudichum<sup>2)</sup> aus Gehirn dargestellt. In allen Fällen handelte es sich um unreine Substanzen (Gemenge von Lecithin und Kephalin). Der Reindarstellung ist man erst in neuester Zeit näher gekommen. Beide enthalten höhere Fettsäuren,

<sup>1)</sup> Med.-chem. Untersuchungen; herausgegeben von Hoppe-Seyler. Berlin: Hirschwald. Heft 2, S. 221. 1867 u. Heft 3, S. 405. 1868.

<sup>2)</sup> Die chem. Konstitution des Gehirns. Tübingen: Pietzcker 1901, S. 127.



Glycerinphosphorsäure und eine Base, welche bei den Lecithinen Cholin, bei den Kephallinen Aminoäthylalkohol (Colamin) ist. Über die Darstellung von Lecithinen + Kephallinen aus Geweben s. § 263.

Sie\*) sind amorphe Substanzen, in Chloroform, Äther, Petroläther, Schwefelkohlenstoff, Benzol löslich, in Methylacetat (Winterstein und Hiestand<sup>1)</sup> und Aceton schwer löslich und daher durch Aceton fällbar (Zuelzer<sup>2)</sup>, quantitativ aus ätherischer Lösung durch Aceton, welches ein wenig einer gesättigten alkoholischen Lösung von Magnesiumchlorid enthält (Nerking<sup>3)</sup>). Bei Anwesenheit von Fetten ist die Fällung durch Aceton unvollständig. In Alkohol ist Lecithin löslich, Kephalin schwer löslich oder unlöslich. Indessen vermag eine alkoholische Lecithinlösung reichliche Mengen von Kephalin in Lösung zu halten. In Wasser quellen sie auf zu kleisterartigen Massen und trüben Lösungen und zeigen unter dem Mikroskop schleimig-ölige Fäden. Aus diesen kolloidalen Lösungen können sie durch Säure und durch Neutralsalze (besonders Calcium- und Magnesiumchlorid) zur Abscheidung gebracht werden (Koch<sup>4)</sup>, Porges und Neubauer<sup>5)</sup>, Kakiuchi<sup>6)</sup>, ebenso durch Aceton bei Gegenwart von etwas Kochsalz (MacLean<sup>7)</sup>). Sie addieren Jod und Wasserstoff. Cadmium- und Platinchlorid rufen in alkoholischen Lösungen Niederschläge hervor (Strecker<sup>8)</sup>.

Die Cadmiumchloridniederschläge sind relativ reicher an Lecithin und ärmer an Kephalin als die Lösungen, die zur Fällung benutzt wurden (Trier<sup>9)</sup>, Eppler<sup>10)</sup>. Sie sind getrocknet weiße, leicht pulverisierbare Substanzen, welche aus warmer Mischung von Essigester und 80proz. Alkohol (2 : 1) (Willstätter und Lüdeke<sup>11)</sup> in mikroskopischen Nadeln krystallisieren. Über diese Verbindungen s. Bergell<sup>12)</sup>, Ulpiani<sup>13)</sup>, Erlandsen<sup>14)</sup>, Eppler<sup>15)</sup>, Levene und West<sup>16)</sup>. Versuche, aus ihnen durch Schwefelwasserstoff, Bleihydroxyd, Silberoxyd, Phosphatide zurückzuerhalten, haben zu keinem befriedigenden Ergebnis geführt (Ulpiani, Erlandsen), dagegen gelingt es durch Zersetzung mit Ammoniumcarbonat (Bergell).

Man kocht mit der achtfachen Menge 80proz. Alkohol am Rückflußkühler und trägt eine entsprechende Menge Ammoncarbonat in konzentrierter Lösung langsam ein, bis die Reaktion deutlich alkalisch und eine Probe des Filtrats cadmiumfrei ist. E. Schulze und Winterstein<sup>17)</sup> nehmen die Zersetzung in absolutem Alkohol vor, indem sie die Chlorcadmiumverbindung in absolutem Alkohol zerreiben, die Flüssigkeit zum Sieden erhitzen und feingepulvertes Ammoncarbonat in kleinen Portionen unter häufigem Umschütteln hinzufügen, bis die Flüssigkeit schwach alkalisch reagiert und schwach nach Ammoniak riecht.

Die Platinchloridniederschläge sind weiß, flockig, leicht löslich in Äther, Chloroform, Schwefelkohlenstoff; aus diesen Lösungen durch Alkohol fällbar.

\*) Die Angaben über Fällungen und Verbindungen beziehen sich vielfach auf Gemenge von Lecithin und Kephalin. Weiteres über Lecithin und Kephalin siehe § 264 u. § 265.

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 54, S. 288. 1907/08.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 27, S. 255. 1899.

<sup>3)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 23, S. 262. 1910.

<sup>4)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 37, S. 181. 1902/03. Journ. of biol. chem. Bd. 3, S. 53. 1907.

<sup>5)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 7, S. 152. 1906.

<sup>6)</sup> Journ. of biochem. Bd. 1, S. 165; ref. Chem. Zentralbl. 1922, III, S. 600.

<sup>7)</sup> Biochem. Journ. Bd. 6, S. 355. 1913. — Biochem. Zeitschr. Bd. 57, S. 134. 1913.

<sup>8)</sup> Ann. d. Chem. Bd. 148, S. 77. 1868.

<sup>9)</sup> Hoppe-Seilers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 86, S. 148. 1913. <sup>10)</sup> desgl. Bd. 87, S. 233. 1913.

<sup>11)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 37, 3, S. 3755. 1904.

<sup>12)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 33, 2, S. 2584. 1900.

<sup>13)</sup> Gazz. chim. ital. Bd. 31, II, S. 47. 1901.

<sup>14)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 51, S. 71. 1907. <sup>15)</sup> desgl. Bd. 87, S. 243. 1913.

<sup>16)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 34, S. 175. 1918.

<sup>17)</sup> Hoppe-Seilers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 40, S. 107. 1904.

**Hydrierung.** Durch Reduktion in alkoholischer Lösung mit Wasserstoff bei Gegenwart von kolloidalem Palladium entsteht Hydrolecithin und Hydrokephalin\*) (Paal und Öhme<sup>1</sup>). Nach Levene und West<sup>2</sup>) erfolgt die Reduktion leichter, wenn die alkoholische Lösung 1—2% Essigsäure enthält. Ein solches aus offenbar kephalinhaltigem Lecithin (aus Eigelb) gewonnenes Reduktionsprodukt stellte nach dem Umkrystallisieren ein weißes Krystallmehl dar, das bei 82—84° sinterte, bei höherer Temperatur sich zersetzte. In Wasser unlöslich, in Aceton fast unlöslich, in Äther schwer löslich, in Methyl- und Äthylalkohol wenig löslich, in Chloroform schon bei Zimmertemperatur reichlich löslich (Paal und Öhme).

Bei Gegenwart von Phosphatiden lösen sich manche anorganische und organische Substanzen, z. B. Kochsalz (Bing<sup>3</sup>), Zucker (Bing<sup>4</sup>), P. Mayer<sup>5</sup>), Albumosen in Äther oder Chloroform oder Chloroform und Alkohol, welche an und für sich in diesen Flüssigkeiten unlöslich sind.

**Optische Eigenschaften.**

Die ohne Anwendung von Wärme isolierten Phosphatide (Gemenge von Lecithin und Kephalin) drehen rechts, ebenfalls die Chlorcadmiumverbindungen dieses Phosphatidgemenges, für die in 1—2proz. Lösung  $[\alpha]_D = +11,41^\circ$  gefunden wurde (Ulpiani, Levene und West). Durch mehrstündiges Erhitzen einer absolut alkoholischen Lösung auf 90—100° im geschlossenen Rohr erfolgt Racemisierung; aus einer solchen inaktiven Substanz entsteht durch Einwirkung von Steapsin nach P. Mayer<sup>6</sup>) eine links drehende.

**Pettenkofersche Reaktion.**

Sie geben die Pettenkofersche Reaktion, d. h. Purpurfärbung auf Zusatz von etwas Rohrzucker und konzentrierter Schwefelsäure.

**Umwandlungen.**

Die Phosphatide unterliegen der Autooxydation und sind deshalb in dunklem evakuierten Exsiccator aufzubewahren. Die der Luft ausgesetzten werden dunkler unter Abnahme der Jodzahl. Durch Säuren und Basen werden sie gespalten in Glycerinphosphorsäure, Phosphorsäure, Fettsäuren und Base. S. weiter darüber bei Lecithin und Kephalin. Bei der Fäulnis entstehen dieselben Spaltungsprodukte unter allmählicher weiterer Zersetzung. Bei der Selbstverdauung des Pankreas findet Spaltung statt (Kutscher und Lohmann<sup>7</sup>), desgleichen durch den Darmsaft (Bergell<sup>8</sup>) und durch Steapsin (Bokay<sup>9</sup>), P. Mayer<sup>10</sup>). Nach Porter<sup>11</sup>) finden sich „lecithin“spaltende Fermente in allen darauf untersuchten Organen, auch Takadiastase spaltet (Akamatsu<sup>12</sup>).

**Einwirkung von Cobragift.**

Durch Einwirkung von Cobragift wird aus Lecithin die ungesättigte Fettsäure abgespalten, wie zuerst Willstätter<sup>13</sup>) beobachtete. Levene und Rolf<sup>14</sup>) fanden, daß das Kephalin die gleiche Veränderung erfährt. Die so

\*) Zur Darstellung der Hydrolecithine s. auch das Patent von J. D. Riedel: Chem. Zentralbl. 1913, I, S. 1155 u. 1914, II, S. 1175.

<sup>1</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 46, 2, S. 1297. 1913.

<sup>2</sup>) Journ. of biol. Chem. Bd. 33, S. 111. 1918.

<sup>3</sup>) Skandinav. Arch. f. Physiol. Bd. 11, S. 166. 1901.

<sup>4</sup>) Skandinav. Arch. f. Physiol. Bd. 9, S. 336. 1899.

<sup>5</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 1, S. 81. 1906. <sup>6</sup>) desgl. Bd. 1, S. 39. 1906.

<sup>7</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 39, S. 159. 1903.

<sup>8</sup>) a. a. O. Zentralbl. f. allg. Pathol. u. pathol. Anat. Bd. 12, S. 633.

<sup>9</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 1, S. 162. 1877/78.

<sup>10</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 1, S. 39. 1906.

<sup>11</sup>) Biochem. Journ. Bd. 10, S. 523; ref. Chem. Zentralbl. 1917, I, S. 884.

<sup>12</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 142, S. 186. 1923.

<sup>13</sup>) Willstätter u. Lüdecke: bei Lüdecke, Dissertation, München 1905. — Kyes: Biochem. Zeitschr. Bd. 4, S. 99. 1907. — Delezenne u. Ledebt: Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 155, S. 1101. 1912. — Delezenne u. Fourneau: Bull. de la soc. chim. de France (4) Bd. 15, S. 421; ref. Chem. Zentralbl. 1914, II, S. 52.

<sup>14</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 55, S. 743. 1923.

entstandenen Substanzen werden als Lysolecithin und Lysokephalin bezeichnet\*).

**263. Darstellung von Lecithinen + Kephalinen aus Eigelb und Organen.** Sie soll zur Vermeidung von Zersetzungen möglichst schnell unter Benutzung von ganz frischem Material und ganz reinen Reagenzien geschehen. Sobald die Phosphatide aus den Geweben isoliert sind, müssen sie möglichst vor Licht und Luft geschützt werden (Benutzung von Exsiccatoren aus braunem Glas).

Das Eigelb wird in dünner Schicht auf einer Glasplatte ausgebreitet und bei einer Temperatur bis zu 30° einem lebhaften Luftstrom (Flügelventilator) ausgesetzt. Bringt man durch häufiges Behandeln mit einem Spatel immer wieder neue Teile an die Oberfläche, so schreitet das Trocknen schnell voran und die Masse läßt sich in einem Mörser zu einem feinen Pulver zerreiben. Organe werden nach Entfernung des sichtbaren Fettes zweckmäßig zunächst mittels Aceton entwässert. Man verwandelt sie mit Hilfe einer Fleischhackmaschine in einen feinen homogenen Brei, läßt ihn eine Zeitlang in Aceton liegen, koltiert und preßt möglichst trocken, zerbröckelt die Masse mit der Hand, breitet sie auf einer Glasplatte aus und verfährt wie oben. Zum Pulverisieren benutzt man eine Kaffeemühle.

Es folgt eine mehrfach wiederholte und erschöpfende Extraktion des Pulvers mit absolutem Alkohol\*\*) (Schüttelmaschine) bei Zimmertemperatur. Der vereinigte alkoholische Auszug wird unter vermindertem Druck bei 30—40° eingengt, der Sirup mit Äther aufgenommen, die ätherische Lösung durch Zentrifugieren geklärt, mit Aceton gefällt\*\*\*) und dieser Prozeß (Aufnahme mit Äther, Zentrifugieren, Fällern mit Aceton) mehrmals wiederholt. Man zerreibt jetzt die Masse nach Mac Lean<sup>1)</sup> mit Wasser zu einer Emulsion und versetzt diese mit  $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{3}$  Vol. Aceton. Das Phosphatidgemenge fällt aus, während stickstoffhaltige Beimengungen in Lösung bleiben. Nach mehrmaliger Wiederholung dieses Reinigungsprozesses (wobei es nötig ist, um eine gute Fällung mit Aceton zu erhalten, der Emulsion eine Spur Kochsalz zuzusetzen) und Entfernen des Wassers durch Durchkneten mit Aceton nimmt man die Masse mit Äther auf, klärt die ätherische Lösung durch Zentrifugieren, fällt mit Aceton und wiederholt dieses Verfahren (Aufnahme mit Äther, Zentrifugieren, Fällern mit Aceton) mehrfach, bis eine klare Lösung in Äther erfolgt. Jetzt wird wieder mit Aceton gefällt und der Niederschlag im Vakuumexsiccator getrocknet.

\*) Anm. bei der Korrektur. In einer soeben erschienenen Arbeit (Journ. of biol. chem. Bd. 58, S. 859. 1924) geben Levene, Rolf und Simms an, daß ihnen die Isolierung der beiden Substanzen gelungen ist. Lysokephalin ist weniger löslich in organischen Lösungsmitteln und kann durch Krystallisation aus Chloroform gereinigt werden. Es krystallisiert in Nadeln, welche bei 140° erweichen und bei 198° unter Zersetzung schmelzen. Spez. Drehung in Eisessig +2,0°. Bei der Hydrolyse konnte nur Stearinsäure isoliert werden. Lysolecithin ist viel löslicher und krystallisiert, wenn nahezu rein, aus Chloroform, Pyridin, Methyl- und Äthylalkohol in Aggregaten von Nadeln, die bei 100° erweichen und sich bei 263° zersetzen. Spez. Drehung in Eisessig +0,8°, in Chloroform —2,6°. Bei der Hydrolyse entstehen Palmitin- und Stearinsäure. Von beiden wurden die Dissoziationskonstanten bestimmt.

\*\*) Eine stufenweise Extraktion zunächst mit Äther und dann mit Alkohol, wie sie von Erlandsen<sup>2)</sup> in der Annahme empfohlen wurde, daß in den Äther- und Alkoholauszug verschiedene Phosphatide übergehen und also auf diese Weise schon bei der Extraktion eine Trennung erreicht werden kann, hat sich nach den Untersuchungen von Mac Lean<sup>1)</sup> als unnötig erwiesen.

\*\*\*) In dem Aceton-Äther bleibt immer mehr oder weniger Lecithin und Kephalin gelöst. Man gewinnt sie, indem man die eingengte Lösung tropfenweise in einen großen Überschuß Aceton (auf 4 ccm Sirup 100 ccm Aceton), das eine Spur Calciumchlorid enthält, fließen läßt und dieses Verfahren mehrfach wiederholt (Mac Lean<sup>3)</sup>).

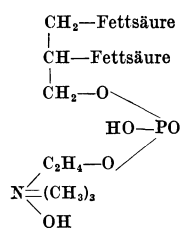
<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 57, S. 132. 1913.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 51, S. 71. 1907.

<sup>3)</sup> Biochem. Journ. Bd. 8, S. 453. 1914.

Trennung in eine  
Lecithin- und  
eine Kephalin-  
fraktion.

Die so gewonnene Substanz enthält Phosphor und Stickstoff in einem Verhältnis 1:1 und keinen anderen Stickstoff als Cholin- und  $\text{NH}_2$ - (also Aminoäthylalkohol-) Stickstoff. Sie besteht aus einem Gemenge von Lecithin und Kephalin (Mac Lean<sup>1</sup>). In der Regel läßt es sich durch Behandlung mit absolutem Alkohol trennen in einen in Alkohol löslichen Teil (Lecithinfraktion) und einen in Alkohol unlöslichen Teil (Kephalinfraktion). In der Lecithinfraktion ist aber stets auch Kephalin und umgekehrt in der Kephalinfraktion auch Lecithin enthalten. Gelegentlich (nach Mac Lean dann, wenn die Darstellung möglichst schnell und unter Benutzung besonders gut gereinigter Reagenzien, besonders Äther, erfolgt ist) löst sich auch das ganze Gemenge in absolutem Alkohol auf, indem das in Alkohol an und für sich unlösliche Kephalin in einer alkoholischen Lecithinlösung löslich ist. Mac Lean hat aus diesem Gemenge reines Lecithin, oder vorsichtiger ausgedrückt ein Monaminophosphatid, das keinen anderen Stickstoff als Cholinstickstoff enthielt, erhalten durch Fällung der alkoholischen Lösung mit Cadmiumchlorid und Reinigung der Chlorcadmiumverbindung mit Hilfe von Äther, in dem sie unlöslich ist. Allerdings liegen bis jetzt weder von der Chlorcadmiumverbindung noch von dem aus ihr gewonnenen Lecithin Analysen vor.



Zusammensetzung.

264. **Lecithine.** Das Lecithinmolekül enthält nach allgemeiner Annahme 1 Mol. Glycerinphosphorsäure, und zwar linksdrehende<sup>2)</sup> (s. § 260), 1 Mol. Cholin und 2 Mol. Fettsäuren, die unter Austritt von 3 Mol. Wasser zusammengetreten sind. S. nebenstehende Formel\*).

Die Darstellung von völlig kephalinfreien Lecithinen ist sehr schwierig und bisher wohl nur in einzelnen Fällen gelungen.

Die bisher aus den Lecithinen gewonnenen Fettsäuren sind Palmitinsäure, Stearinsäure, Ölsäure und Arachidonsäure ( $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_2$ )<sup>3)</sup>, woraus hervorgeht, daß es mehrere Lecithine von nebenstehender Formel geben muß. Ein Lecithin, in dem man auch die in ihm enthaltenen beiden Fettsäuren und ihre Stellung im Molekül feststellen konnte, ist noch nicht bekannt. Ein Stearylöleyllecithin würde die Formel  $\text{C}_{44}\text{H}_{88}\text{NPO}_9$  (C 65,53, H 10,98, N 1,73, P 3,84, O 17,83%), ein Stearylarchinodyllecithin die Formel  $\text{C}_{46}\text{H}_{86}\text{NPO}_9$  (C 66,69, H 10,47, N 1,69, P 3,75, O 17,40%) haben.

Die reinen, d. h. kephalinfreien Lecithine sind bisher nur in Form ihrer Reduktionsprodukte (Hydrolecithine), welche im Gegensatz zu den Lecithinen kristallisieren, analysiert worden.

Über erfolgreiche Versuche zur Synthese der Lecithine siehe Grün und Kade<sup>4)</sup>.

Darstellung:

aus Eigelb

Darstellung von Lecithincadmiumchlorid und Lecithin aus Eigelb nach Mac Lean. Getrocknetes (s. § 263) und pulverisiertes Eigelb wird mit Alkohol extrahiert, der alkoholische Auszug mit alkoholischer Cadmiumchloridlösung gefällt, der Niederschlag mit Alkohol gewaschen und mit der etwa 15fachen Menge eine Spur Alkohol enthaltenden Äthers verrieben. Durch Zentrifugieren erhält man einen braunen Niederschlag und eine überstehende

\*) Wenn die Angabe, daß die bei der Spaltung von Lecithin (das jedenfalls nicht frei von Kephalin war) auftretende Glycerinphosphorsäure ein Gemenge von symmetrischer und asymmetrischer sei (§ 260), richtig ist, dann wird es auch Lecithine von etwas anderer Konstitution, in denen die Fettsäuremoleküle an den beiden endständigen Kohlenstoffatomen des Glycerins und die Phosphorsäure am mittleren hängen, geben.

<sup>1)</sup> Biochem. Journ. Bd. 9, S. 351. 1915.

<sup>2)</sup> Willstätter u. Lüdecke: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 37, 3, S. 3753. 1904.

<sup>3)</sup> Levene u. Simms: Journ. of biol. chem. Bd. 51, S. 285. 1922.

<sup>4)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 45, 3, S. 3367. 1912.

klare Flüssigkeit. Der Niederschlag wird mit Äther gewaschen, getrocknet und nach Bergell<sup>1)</sup> zersetzt, indem man ihn mit der 8fachen Menge 80proz. Alkohols am Rückflußkühler kocht und eine entsprechende Menge Ammoncarbonat in konzentrierter Lösung langsam einträgt, bis die Reaktion deutlich alkalisch und eine Probe des Filtrats cadmiumfrei ist. Man filtriert heiß, konzentriert, nimmt den Rückstand mit Äther auf, fällt mit Überschuß von Aceton und reinigt den Niederschlag durch Emulsionieren in Wasser und Fällern mit Aceton (wie § 263 beschrieben). Die Substanz wird dann in Alkohol gelöst und wieder mit Cadmiumchlorid gefällt, der Niederschlag nach Willstätter und Lüdecke<sup>2)</sup> aus einer Mischung von 2 Tl. Essigester und 1 Tl. 80proz. Alkohol umkrystallisiert. Aus diesem Doppelsalz erhielt Mac Lean durch Zersetzung nach Bergell und durch wiederholte Reinigung des erhaltenen Phosphatids mit Wasser und Aceton ein Präparat, das keinen anderen als Cholinstickstoff enthielt. Eine vollständige Analyse dieses Lecithins wurde nicht ausgeführt.

Darstellung von Lecithincadmiumchlorid und Lecithin aus Eigelb nach Levene und Rolf<sup>3)</sup>. Eigelbpulver wird zuerst mit Aceton und dann mit Äther erschöpft.

1. Darstellung der  $\text{CdCl}_2$ -Verbindung aus dem Acetonauszug. Der vereinigte Auszug wird auf ein kleines Volumen gebracht, wenigstens 24 Stunden bei  $0^\circ$  stehen gelassen, die abgeschiedene Fettmasse bei einer Temperatur von unter  $10^\circ$  abgesaugt\*), nach dem Schmelzen auf dem Wasserbade mit dem 3—4fachen Volumen Alkohol durchmischt, bei  $0^\circ$  der Krystallisation überlassen und filtriert. Man engt nun unter vermindertem Druck auf die Hälfte des ursprünglichen Volumens ein und fällt mit einer alkoholischen  $\text{CdCl}_2$ -Lösung. Die so erhaltene  $\text{CdCl}_2$ -Verbindung suspendiert man in etwa ihrem gleichen Volumen Toluol und erhält sofort oder nach leichtem Erwärmen, evtl. nach Zusatz von einigen Tropfen Wasser, eine Lösung, die sofort oder nach Zentrifugieren völlig klar ist. Man gießt sie in das mehrfache Volumen kalten 1proz. Wasser enthaltenden Äther, zentrifugiert den in einigen Minuten auftretenden Niederschlag ab, wäscht ihn mit Äther gut aus, suspendiert ihn zur Entfernung des Toluol in Aceton und filtriert wieder. Aus 11—12 kg Eigelbpulver erhält man auf diese Weise 80 bis 100 g Lecithincadmiumchlorid, welches nur noch 1,4% des Stickstoffs als  $\text{NH}_2$ -Stickstoff enthält. Statt durch die Toluolbehandlung kann man die Entfernung des Kephalin auch durch wiederholtes Umkrystallisieren der Chlorcadmiumverbindung aus einer Mischung von Essigester und 80proz. Alkohol nach Willstätter bewirken (Levene und West<sup>4)</sup>).

2. Darstellung der  $\text{CdCl}_2$ -Verbindung aus dem Ätherauszug. Der vereinigte Auszug wird auf ein kleines Volumen gebracht, mit Aceton gefällt, die Fällung in Äther gelöst und 24 Stunden bei  $0^\circ$  stehen gelassen. Der dabei entstehende Niederschlag (Cerebroside, Sphingomyelin) wird entfernt, die ätherische Lösung, nachdem sie auf ein kleines Volumen gebracht ist, wieder mit Aceton gefällt und so fortgefahren, bis die ätherische Lösung klar bleibt. Die Acetonfällung (Lecithin und Kephalin) nimmt man in Äther auf und fällt mit Alkohol. Die vom Niederschlag dekantierte alkoholische Lösung wird unter normalem Druck auf ein kleines Volumen gebracht und mit alkoholischer  $\text{CdCl}_2$ -Lösung gefällt.

\*) Aus der Acetonmutterlauge kann man nach einem etwas umständlichen Verfahren noch beträchtliche Mengen von Lecithin- $\text{CdCl}_2$  erhalten.

<sup>1)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 33, 3, S. 2584. 1900.

<sup>2)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 37, 3, S. 3755. 1904.

<sup>3)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 46, S. 193. 1921.

<sup>4)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 34, S. 185. 1918.

Die weitere Reinigung dieses Salzes wird in der unter 1. beschriebenen Weise vorgenommen, bis in der hydrolysierten Flüssigkeit kein  $\text{NH}_2$ -Stickstoff mehr nachzuweisen ist.

3. Darstellung des Lecithins aus der  $\text{CdCl}_2$ -Verbindung geschieht nach Bergell mit Ammoniumkarbonat (S. 363).

Die Lecithine aus Eigelb enthalten Palmitin-, Stearin-, Öl- und Arachidonsäure<sup>1)</sup>.

aus anderen  
Organen. Über die Darstellung von Lecithincadmiumchlorid und Lecithin aus Gehirn s. Levene und Rolf<sup>2)</sup>, aus Leber s. Levene und Simms<sup>3)</sup>. In ersterem sind Palmitin-, Stearin- und Ölsäure nachgewiesen, in letzterem außer diesen noch Arachidonsäure (Levene und Simms<sup>4)</sup>).

Eigenschaften. Das aus den Lösungen abgeschiedene Lecithin ist eine hell- bis orangegefärbte knetbare, wachsartige Masse, welche auch nach dem Trocknen im Vakuum ein feuchtes Aussehen hat, äußerst hygroskopisch und deswegen auch nach dem Trocknen schwer pulverisierbar ist. Reines Lecithin enthält keine andere Base als Cholin, entwickelt also nach der Hydrolyse im Apparat von v. Slyke (§ 492) keinen Stickstoff. Es ist im Gegensatz zu Kephalin in Alkohol löslich. Über seine weiteren Löslichkeitsverhältnisse, sein Verhalten zu Wasser, seine Eigenschaften s. § 262. Die Chlorcadmiumverbindung ist in Äther schwer löslich. Aus reinem Lecithinchlorcadmium erhält man bei der Zersetzung mit Ammoncarbonat nach Bergell reines Lecithin (Levene und West<sup>5)</sup>).

Hydrolecithin. Reines (kephalinfreies) Hydrolecithin aus Lecithin, das aus Eigelb und Gehirn über die Chlorcadmiumverbindung gewonnen war, durch Reduktion dargestellt, gab bei der Analyse Werte, die ziemlich gut auf Distearyllecithin stimmten.  $[\alpha]_D^{20} = +5,5 = +6,0^\circ$  (Levene und West<sup>6)</sup>, Levene und Rolf<sup>7)</sup>).

Spaltung. Die Spaltung kann durch Basen und Säuren in wässriger oder alkoholischer Lösung bewirkt werden.

Bei 6stündigem Schütteln bei Zimmertemperatur von mit Wasser emulgiertem Lecithin mit gesättigtem Barytwasser und weiterem 3stündigem Stehen wird eine erhebliche Menge glycerinphosphorsaures Barium, und zwar linksdrehendes, gebildet und aus dem Filtrat gewonnen (Levene und Rolf<sup>8)</sup>). Bei 1stündigem Erhitzen mit gesättigter methylalkoholischer Barytlösung im Wasserbad oder 2 $\frac{1}{2}$ stündigem Kochen mit gesättigtem Barytwasser am Rückflußkühler wird alles Cholin abgespalten (Mac Lean<sup>9)</sup>). Beim Kochen (der Lecithinchlorcadmiumverbindung) mit der 50fachen Gewichtsmenge  $\frac{1}{10}$ -Salz- oder -Schwefelsäure am Rückflußkühler ist nach 8—13 Stunden (wahrscheinlich schon in kürzerer Zeit) eine völlige Abspaltung von Cholin und Fettsäuren und eine teilweise Spaltung der Glycerinphosphorsäure in Glycerin und Phosphorsäure erfolgt (Malengreau und Prigent<sup>10)</sup>). Auch durch Kochen mit 5fach normaler methylalkoholischer Salzsäure bei Gegenwart von Zinn oder Zink (um eine Anlagerung von Halogen an die ungesättigten Fettsäuren zu verhindern) läßt sich eine Spaltung bewirken. Die nach der Reaktion auf der Flüssigkeit schwimmenden Ester der Fettsäuren können mit Petroläther ausgeschüttelt und nach dem Trocknen mit Natriumsulfat und Verdunsten des Petroläthers im Vakuum destilliert werden (Rollett<sup>11)</sup>).

<sup>1)</sup> Levene u. Rolf: Journ. of biol. chem. Bd. 51, S. 507. 1922.

<sup>2)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 46, S. 353. 1921.

<sup>3)</sup> desgl. Bd. 48, S. 185. 1921.

<sup>4)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 51, S. 285. 1922.

<sup>5)</sup> desgl. Bd. 34, S. 175. 1918.

<sup>6)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 34, S. 185. 1918.

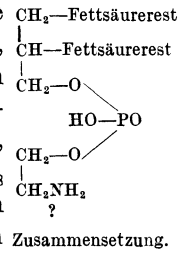
<sup>7)</sup> desgl. Bd. 46, S. 353. 1921.

<sup>8)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 40, S. 1. 1919.

<sup>9)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 55, S. 360. 1908. <sup>10)</sup> desgl. Bd. 77, S. 107. 1912.

<sup>11)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 61, S. 210. 1909.

265. **Kephaline.** Das Kephalinmolekül enthält nach allgemeiner Annahme je 1 Mol. Glycerinphosphorsäure, und zwar linksdrehende<sup>1)</sup> (§ 260), Stearinsäure<sup>2)</sup>, eine ungesättigte Fettsäure und Aminoäthylalkohol<sup>3)</sup>, welche unter Austritt von 3 Mol. Wasser zusammengetreten sind (s. nebenstehende Formel\*). Von ungesättigten Säuren sind gefunden worden Kephalinlinolensäure<sup>4)</sup>, Arachidonsäure<sup>5)</sup>, Ölsäure<sup>5)</sup>. Ein Stearyl-linolykcephalin z. B. würde die Formel haben  $C_{41}H_{78}NPO_8$  (C 66,16, H 10,57, N 1,88, P 4,17, O 17,21%), ein Stearyl-arachidonykcephalin die Formel  $C_{43}H_{78}NPO_8$  (C 67,22, H 10,24, N 1,83, P 4,04, O 16,67%). Obgleich nun die aus verschiedenen Geweben isolierten Kephalinpräparate andere analytische Werte (z. B. C 60,00, H 9,38, N 1,68, P 4,27%), welche mehr zu der Formel  $C_{41}H_{78}NPO_{13}$  (Thudichum<sup>6)</sup>, Koch<sup>7)</sup>, Stern und Thierfelder<sup>8)</sup>, Levene und West<sup>9)</sup> u. a.) stimmen, gaben, und das auch für Naphthyl- und Phenylureidoverbindungen gilt (Levene und West<sup>10)</sup>, ist man doch wohl berechtigt, Formeln wie die obigen für die richtigen zu halten, einmal der Spaltungsprodukte wegen, und dann weil es Levene und West<sup>11)</sup> gelungen ist, aus einem hydrierten „Lecithin“ (Gemenge von Lecithin und Kephalin) aus Eigelb ein krystallisiertes Hydrokephalin von der Formel  $C_{41}H_{82}NPO_8$  zu isolieren. Die Kephaline der Autoren scheinen Zersetzungsprodukte zu enthalten (Levene und Komatsu<sup>12)</sup>.



Darstellung von Kephalin aus Schafsgehirn nach Renall<sup>13)</sup>. Ganz frisches, von Blut und Häuten befreites und fein gemahlene Gehirn wird mit der 3fachen Menge Aceton geschüttelt, nach Absaugen am nächsten Tage nochmals mit der gleichen Menge Aceton geschüttelt, am nächsten Tage abgesaugt und mit der 1½fachen Menge Alkohol geschüttelt. Das abgesaugte Material schüttelt man jetzt 2 mal mit der 3fachen Menge (auf das ursprüngliche Gewicht des feuchten Gehirns berechnet) niedrig siedendem Petroläther. Das wasserklare und farblose Filtrat (geht man von Rindsgehirn aus, so ist das Filtrat goldgelb) engt man im Kohlensäurestrom ein und läßt es in Alkohol tropfen; es fällt eine feste, weiße Masse aus, deren ätherische Lösung durch Zentrifugieren geklärt und mit Alkohol gefällt wird. Der Niederschlag wird in Wasser verteilt (auf 30 g 500 ccm) und nach Thudichum mit je 10 ccm n-Salzsäure versetzt, bis eine sich gut absetzende käsige Fällung entsteht (wozu etwa 80 ccm nötig sind). Diese wird abzentrifugiert, mit Aceton gehärtet, im Vakuumexsiccator getrocknet und mit Äther aufgenommen. Nach Abzentrifugieren der unlöslichen Anteile engt man die ätherische Lösung stark ein, fällt mit Aceton und trocknet im Vakuum. Während der ganzen Darstellung ist die Berührung der Lösung mit Luft und Licht möglichst zu vermeiden.

Darstellung aus  
Gehirn nach  
Renall.

\*) Indessen ist diese Formel noch keineswegs sicher. Manche Beobachtungen bei der Hydrolyse sprechen dafür, daß die Fettsäuren mit der Phosphorsäure verbunden sind. Im übrigen s. \*)-Note Seite 366. Das dort über die Konstitution der Lecithine Gesagte gilt auch für die der Kephaline.

<sup>1)</sup> Levene u. Rolf: Journ. of biol. chem. Bd. 40, S. 1. 1919.

<sup>2)</sup> Parnas: Biochem. Zeitschr. Bd. 56, S. 17. 1913. — Levene u. West: Journ. of biol. chem. Bd. 16, S. 419. 1913/14.

<sup>3)</sup> Baumann: Biochem. Zeitschr. Bd. 54, S. 30. 1913. — Renall: desgl. Bd. 55, S. 296. 1913.

<sup>4)</sup> Cousin: Journ. de chim. et de phys. (6) Bd. 24, S. 101. 1906 u. Bd. 25, S. 177. 1907. — Parnas: Biochem. Zeitschr. Bd. 22, S. 411. 1909.

<sup>5)</sup> Levene u. Rolf: Journ. of biol. chem. Bd. 54, S. 91. 1922.

<sup>6)</sup> a. a. O., S. 132.

<sup>7)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 36, S. 134. 1902. <sup>8)</sup> desgl. Bd. 53, S. 370. 1907.

<sup>9)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 24, S. 41. 1916; Journ. of biol. chem. Bd. 24, S. 111. 1916.

<sup>10)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 25, S. 517. 1916.

<sup>11)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 35, S. 285. 1918; s. auch Levene u. Komatsu: desgl. Bd. 39, S. 83. 1919.

<sup>12)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 39, S. 91. 1919. <sup>13)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 55, S. 296. 1913.

Darstellung aus Gehirn  
nach Levene und  
Rolf.

Darstellung von Kephalin aus Ochsengehirn nach Levene und Rolf<sup>1)</sup>. Getrocknetes oder mit Aceton entwässertes Gehirn wird 6mal mit 5% Wasser enthaltendem Äther extrahiert, der Ätherrückstand mit Aceton gefällt, die Fällung in Äther gelöst und die ätherische Lösung nach Entfernung des bei 0° sich Abscheidenden wieder in Aceton gegossen. Dieses Verfahren wird nochmals wiederholt. Das so erhaltene Gemenge von Lecithin und Kephalin wird aus ätherischer Lösung mit Alkohol gefällt. Es fällt hauptsächlich Kephalin. Lösung und Fällung wird wiederholt, und daran schließen sich noch mehrere Fällungen aus Petroläther (Siedepunkt 50—60°) mit Alkohol. Man erhält so ein Kephalin, welches vollkommen frei ist von Lecithin, dessen Stickstoff nur NH<sub>2</sub>-Stickstoff ist. Es werden noch weitere Verfahren angegeben.

Eigenschaften.

Kephalin wird aus seinen Lösungen als schnell fest und zerreiblich werdender in reinem Zustand farbloser Niederschlag gefällt (während Lecithin nach der Fällung eine plastische Beschaffenheit zeigt). Reines Kephalin enthält von Basen nur Aminoäthylalkohol, muß also nach der Hydrolyse seinen ganzen Stickstoff nach v. Slyke entwickeln. Es löst sich nicht oder nur sehr wenig in Alkohol (Unterschied von Lecithin), auch in wasserfreiem Äther löst es sich nicht und in Essigäther nur in der Wärme. Über sein Verhalten zu anderen Lösungsmitteln, zu Wasser und weitere Eigenschaften s. § 262. Mit Wasser gibt es klare kolloidale Lösung. Die Chlorcadmiumverbindung (§ 262) ist in Äther löslich (Thudichum, Mac Lean<sup>2)</sup>). Über säurebeständige Färbung siehe Koganei<sup>3)</sup>.

Hydrokephalin.

Versuche, Kephalin mit Wasserstoff und Palladium zu reduzieren, sind unbefriedigend verlaufen (Levene und West<sup>4)</sup>).

Ein krystallisierendes Hydrokephalin von der Formel C<sub>41</sub>H<sub>82</sub>NPO<sub>8</sub> und  $[\alpha]_D = +6,0^\circ$  wurde von Levene und West<sup>5)</sup> aus einem mit Wasserstoff bei Gegenwart von Palladium reduziertem Gemenge von Lecithin und Kephalin (aus Eigelb) erhalten.

Spaltung.

Das Kephalin (die Angaben beziehen sich auf kein ganz reines Präparat) ist sehr zersetzlich, wird aber schwerer völlig gespalten als Lecithin. Durch 18stündige Hydrolyse mit Baryt und Wasser bei 120° zerfällt es in Stearinsäure, Aminoäthylalkohol und eine vierbasische Säure, deren Bariumsalz ätherlöslich ist und aus der bei 20stündigem Erhitzen mit 2,5proz. Natronlauge bei 110° die Kephalinlinolsäure (Parnas<sup>6)</sup>) erhalten wird. Aus einem ganz lecithin-freien Kephalin entsteht durch Spaltung mit Baryt bei Zimmertemperatur, die ganz so durchgeführt wurde wie bei Lecithin (s. dieses), Glycerinphosphorsäure, deren Bariumsalz nach Reinigung über das Bleisalz links dreht, und zwar ebenso stark wie das aus Lecithin gewonnene (Levene und Rolf<sup>7)</sup>). Durch 12stündiges Kochen mit 10proz. Salzsäure erfolgt eine Abspaltung der Fettsäuren (Levene und Rolf<sup>8)</sup>). Cousin<sup>9)</sup> kochte zunächst in salzsaurer Lösung, wobei die Base abgespalten wird, und dann mit alkoholischer Kalilauge. Die bei der Hydrolyse auftretenden Fettsäuren halten kleine Mengen Stickstoff (Aminoäthylalkohol) fest. Siehe darüber und über Verbindungen dieses Alkohols mit Fettsäuren Koganei<sup>10)</sup>.

Myelin, Paramyelin.

Myelin und Paramyelin nennt Thudichum zwei von ihm aus Gehirn gewonnene Monoaminomonophosphatide. Ihre chemische Individualität ist zweifelhaft. Von ersterem gibt

<sup>1)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 40, S. 10. 1919 u. Bd. 54, S. 91. 1922.

<sup>2)</sup> Biochem. Journ. Bd. 9, S. 359. 1915.

<sup>3)</sup> Journ. of biochem. Bd. 2, S. 495; ref. Ber. über d. ges. Physiol. Bd. 21, S. 21. 1924.

<sup>4)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 24, S. 41. 1916. <sup>5)</sup> desgl. Bd. 35, S. 285. 1918.

<sup>6)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 22, S. 411. 1909.

<sup>7)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 40, S. 1. 1919. <sup>8)</sup> desgl. Bd. 54, S. 91. 1922.

<sup>9)</sup> Journ. de chim. et pharm. [6] Bd. 24, S. 101. 1906 u. Bd. 25, S. 177. 1907.

<sup>10)</sup> Journ. of biochem. Bd. 3, S. 15; ref. Ber. über d. ges. Physiol. Bd. 22, S. 340. 1924.



Thudichum an, daß es mit Blei eine in Alkohol unlösliche Verbindung gibt, und daß seine alkoholische Lösung durch Cadmium- und Platinchlorid nicht gefällt wird.

Vesalthin nennen Fränkel und Pari<sup>1)</sup> ein aus Rinderpankreas dargestelltes Monoaminomonophosphatid. Es ist jedenfalls ein Gemenge von Lecithin und Kephalin. Siehe dazu MacLean<sup>2)</sup>.

#### *Diaminomonophosphatide.*

266. **Sphingomyelin** wurde zuerst von Thudichum<sup>3)</sup> aus Gehirn (in dem Vorkommen, es den einen Komponenten des sog. Protagon bildet) gewonnen. Es ist auch in den Nebennieren (Rosenheim und Tebb<sup>4)</sup>) und in Nieren, Leber, Eigelb (Levene<sup>5)</sup>), Herz (MacLean und Griffiths<sup>6)</sup>), Fischsperma (San<sup>7)</sup>) gefunden worden. Ganz rein ist es noch nicht erhalten worden. Bei der Analyse der aus verschiedenen Organen gewonnenen Substanzen wurden gefunden C 64,5—66,6, H 11,3—11,7, N 3,4—3,8, P 3,8—4,2% (Levene). Es gibt vielleicht zwei Sphingomyeline, die sich durch den in ihnen enthaltenen Säurekomplex unterscheiden (Levene).

Bei der Spaltung wurde erhalten Phosphorsäure, Cholin (Thudichum, Zusammensetzung, Levene<sup>8)</sup>), Sphingosin (etwa 33%), Lignocerinsäure und eine zweite noch unreine Säure von niedrigerem Molekulargewicht (vielleicht eine Oxysäure) (Levene<sup>9)</sup>). Ein weiteres Spaltungsprodukt, nach Thudichum wahrscheinlich ein Alkohol (Sphingol) C<sub>9</sub>H<sub>18</sub>O oder C<sub>18</sub>H<sub>36</sub>O<sub>2</sub>, nach Rosenheim und Tebb<sup>10)</sup> ein krystallisierter Alkohol, konnte von Levene nicht erhalten werden. Glycerin fehlt.

Darstellung aus Gehirn nach Rosenheim und Tebb<sup>10 u. 11)</sup>. Das mit Darstellung: kaltem Aceton und Äther völlig erschöpfte Gehirn wird zu einem feinen Pulver zermahlen, mit 3 Vol. Pyridin bei 30—40° 10 Minuten erwärmt und nach Abkühlen auf 15° filtriert (das Filtrat enthält Cerebroside). Der Filtrerrückstand wird mit 3 Vol. Pyridin bei 40—45° 1/2 Stunde lang extrahiert und warm filtriert. Das beim Abkühlen sich abscheidende weiße Pulver wird abfiltriert, mit Aceton gewaschen und durch fraktionierte Fällung aus Alkohol-Chloroformlösung mit Aceton und Krystallisation aus Pyridin weiter gereinigt. Genauere Angaben liegen nicht vor.

Darstellung von Sphingomyelin nach Levene<sup>12)</sup>. Das getrocknete aus Gehirn und Material (Gehirn, Niere, Leber, Nebenniere, Eigelb) wird mit kochendem Alkohol erschöpft, der beim Erkalten entstehende Niederschlag mit Äther und Aceton völlig extrahiert und dann in heißem Pyridin gelöst. Der beim Erkalten und Stehen auftretende Niederschlag wird in heißem Eisessig gelöst, die beim Erkalten entstehende Abscheidung abfiltriert, das Filtrat nach Einengen unter vermindertem Druck in Aceton gegossen. Das dabei ausfallende Rohsphingomyelin löst man in einer Mischung von 5 Tl. Ligroin und 1 Tl. Alkohol, fügt Alkohol hinzu, solange noch eine Fällung entsteht, läßt das Filtrat über Nacht bei 0° stehen, filtriert wieder, engt unter vermindertem Druck ein und gießt in Aceton. Der dabei auftretende Niederschlag wird nun mehrmals aus einer Lösung gleicher Teile Pyridin und Chloroform umkrystallisiert, bis die Reaktion

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 17, S. 68. 1909 u. Bd. 18, S. 37. 1909.

<sup>2)</sup> Biochem. Journ. Bd. 8, S. 453. 1914.

<sup>3)</sup> Die chemische Konstitution des Gehirns. Tübingen: Pietzcker 1901, S. 165.

<sup>4)</sup> Journ. of physiol. Bd. 38, Proc. LIV. 1909.

<sup>5)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 24, S. 69. 1916.

<sup>6)</sup> Biochem. Journ. Bd. 14, S. 615. 1920.

<sup>7)</sup> Journ. of biochem. Bd. 1, S. 1; ref. Chem. Zentralbl. 1922, III, S. 561.

<sup>8)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 18, S. 453. 1914 u. Bd. 24, S. 69. 1916.

<sup>9)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 15, S. 153. 1913 u. Bd. 24, S. 69. 1916.

<sup>10)</sup> Journ. of physiol. Bd. 38, Proc. LI. 1909.

<sup>11)</sup> Journ. of physiol. Bd. 41, Proc. I. 1910.

<sup>12)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 18, S. 453. 1914 u. Bd. 24, S. 69. 1916.

mit Orcin und Salzsäure (§ 100) bei Gegenwart einer Spur Kupferacetat negativ ausfällt (Entfernung der Cerebroside).

**Eigenschaften.** Weiße krystallinische Substanz, nicht hygroskopisch, luft- und lichtbeständig, in kaltem Alkohol nur wenig löslich, krystallisiert aus warmem, unlöslich in Aceton, Äther und Wasser, in dem es aufschwillt unter Emulsionsbildung, löslich in warmem Pyridin. Es bildet mit Cadmiumchlorid eine Verbindung, die in Alkohol noch weniger löslich ist als das Sphingomyelin. Es dreht in einer Mischung von Methylalkohol und Chloroform gelöst rechts,  $[\alpha]_D = +7,5 - +8,7^\circ$  (Levene). Über das eigentümliche optische Verhalten seiner Lösung in Pyridin (Sphärorotation) siehe Rosenheim und Tebb<sup>1)</sup>.

Ein von Cerebroside ganz freies Sphingomyelin gibt weder die Probe von Molisch (§ 97) (Rosenheim und Tebb), noch die Reaktion mit Orcin und Kupferacetat.

**Spaltung.** In betreff der Spaltung, welche sowohl mit Baryt und nachfolgend mit Salzsäure, als auch mit Schwefelsäure ausgeführt wurde und der Isolierung der Spaltungsprodukte s. die Arbeiten von Levene.

**Weitere Diaminomonophosphatide.** Weitere Diaminomonophosphatide sind aus Gehirn (Thudichum<sup>2)</sup>, Eisbären- und Walroßgalle (Hammarsten<sup>3)</sup>, Eigelb (Stern und Thierfelder<sup>4)</sup>, Pferdenieren und Ochsenherz (MacLean<sup>5)</sup>, Aalschleim (Müller und Rainbach<sup>6)</sup>, Nebennieren (Beumer<sup>7)</sup>, Placenta (Sakaki<sup>8)</sup>, Osborne und Wakeman<sup>9)</sup>, Tuberkelbacillen und Mykobact. lactic. (Tamura<sup>10)</sup> erhalten worden. Von keiner dieser Substanzen ist die chemische Individualität nachgewiesen, sie bedürfen alle weiterer Untersuchung. Von einem aus dem alkoholischen Auszug von getrockneten und mit Äther erschöpften Ochsenherzen gewonnenen Diaminophosphatid hat MacLean<sup>5)</sup> gezeigt, daß es sich um ein mit stickstoffhaltigen Substanzen verunreinigtes Monaminomonophosphatid handelt.

#### *Weitere Phosphatide.*

267. Ebenso wenig ist irgendeine Gewähr dafür vorhanden, daß die im folgenden zu nennenden, meist von Fränkel und seinen Schülern aus Gewebe isolierten Phosphatide chemische Individuen sind: Diaminomonophosphatide aus Rinderniere<sup>11)</sup>, Pferdepankreas<sup>12)</sup>, Gehirn<sup>13)</sup> (Di-Lignoceryl-di-Glucosaminphosphorsäureester), Triaminomonophosphatid aus Eigelb<sup>14)</sup> (Neottin), Triaminodiphosphatid aus Rinderniere<sup>11)</sup>, Placenta<sup>15)</sup>, Pentaaminomonophosphatid<sup>16)</sup> (Leukopoliin) aus menschlichem Gehirn. Fast alle diese Verbindungen sind nur einmal dargestellt und weder von den Entdeckern noch von anderer Seite bestätigt worden. Zudem sind sie ganz ungenügend untersucht worden, was zum Teil an der geringen Menge, die zur Verfügung stand, lag.

Ein von Fränkel und Linnert<sup>17)</sup> aus menschlichem Gehirn dargestelltes und unter dem Namen Sahidin beschriebenes Triaminodiphosphatid ist von Fränkel<sup>17)</sup> als ein noch unreines Lecithin erkannt worden.

<sup>1)</sup> Journ. of physiol. Bd. 37, S. 348. 1908 und Sano: Journ. of Bioch. Bd. 1, S. 17; ref. Chem. Zentralbl. 1922, III, S. 561.

<sup>2)</sup> Die chem. Konstitution des Gehirns. Tübingen: Pietzcker 1901, S. 160, 110, 100.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 36, S. 528. 1902 u. Bd. 61, S. 454. 1909.

<sup>4)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 53, S. 370. 1907.

<sup>5)</sup> Biochem. Journ. Bd. 6, S. 333; ref. Malys Jahresber. d. Tierchem. 1913, S. 287. Journ. of physiol. Bd. 45, Proc. XVIII. Biochem. Zeitschr. Bd. 57, S. 132. 1913.

<sup>6)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 92, S. 56. 1914.

<sup>7)</sup> Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 77, S. 304. 1914.

<sup>8)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 49, S. 317. 1913.

<sup>9)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 21, S. 539; ref. Chem. Zentralbl. 1915, II, S. 852 u. Bd. 28, S. 1; ref. Chem. Zentralbl. 1917, I, S. 883.

<sup>10)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 87, S. 85. 1913.

<sup>11)</sup> Fränkel u. Nogueira: Biochem. Zeitschr. Bd. 16, S. 366. 1909.

<sup>12)</sup> Fränkel u. Offer: Biochem. Zeitschr. Bd. 26, S. 53. 1910.

<sup>13)</sup> Fränkel u. Kafka: Biochem. Zeitschr. Bd. 101, S. 159. 1920.

<sup>14)</sup> Fränkel u. Bolaffio: Biochem. Zeitschr. Bd. 9, S. 44. 1908.

<sup>15)</sup> Sakaki: Biochem. Zeitschr. Bd. 49, S. 326. 1913.

<sup>16)</sup> Fränkel u. Elias: Biochem. Zeitschr. Bd. 28, S. 320. 1910.

<sup>17)</sup> Fränkel u. Linnert: Biochem. Zeitschr. Bd. 24, S. 268. 1910. — Fränkel: Ebenda Bd. 124, S. 216. 1921.

Das von Erlandsen<sup>1)</sup> unter dem Namen Cuorin beschriebene, aus dem Ätherextrakt des Cuorin. getrockneten Herzmuskels durch Fällung mit Aceton, Lösung des abfiltrierten Niederschlages in Äther und weitere Fällung mit Alkohol gewonnene Monaminodiphosphatid hat sich nach den Untersuchungen von Levene und Komatsu<sup>2)</sup> und Mac Lean und Griffith<sup>3)</sup> als ein Gemenge von Kephalin und anderen Substanzen herausgestellt.

Ebensowenig kann das Carnaubon, das Dunham und Jacobson<sup>4)</sup> aus Rindernieren Carnaubon. gewannen und für ein Triaminomonophosphatid hielten, als eine einheitliche Substanz betrachtet werden. Es ist ein Gemenge im wesentlichen von Cerebrosiden und Sphingomyelin (Mac Lean und Rosenberg<sup>5)</sup>).

#### *Phosphorsulfatide und Sulfatide.*

268. Über Phosphorsulfatide, welche schwefelhaltige Verbindungen von Phosphatiden und Cerebrosiden darstellen sollen und aus Gehirn und Lunge erhalten wurden, s. Thudichum<sup>6)</sup>, Koch<sup>7)</sup>, Fränkel und Gilbert<sup>8)</sup>, Sammartino<sup>9)</sup>. Sie bedürfen weiterer Untersuchung. Dasselbe gilt von einem phosphorfreien, schwefelhaltigen Stoff (Sulfatid), den Levene<sup>10)</sup> aus Gehirn isolierte.

#### *Jecorin.*

269. Diese Substanz gewann Drechsel<sup>11)</sup> aus Pferde- und Delphinleber durch wiederholte Extraktion der Organe mit kaltem Alkohol. Der beim Verdunsten des Alkohols bei 40—45° zurückbleibende halbflüssige Rückstand wurde mit absolutem Alkohol mehrmals ausgeschüttelt. Der hierbei ungelöst bleibende Anteil wurde in wasserhaltigem Äther aufgenommen, die Lösung durch Alkohol gefällt. Diese Lösung in wasserhaltigem Äther und Fällung mit Alkohol wurde mehrmals wiederholt. Nach dem Trocknen im Vakuum zeigte das Jecorin die Zusammensetzung C 51,4, H 8,2, N 2,86, S 1,4, P 3,5, Na 2,72%. Poröse erdige Masse oder feines Pulver, hygroskopisch, in wasserhaltigem Äther löslich, in Wasser nach vorheriger schleimiger Quellung löslich. Die Lösung wurde durch konzentrierte Salzlösungen, Kupferacetat, Silbernitrat gefällt und reduzierte Fehling'sche Lösung.

Die von anderen aus Pferdeleber<sup>12)</sup>, Hundeleber<sup>13)</sup>, Nebennieren<sup>14)</sup>, anderen Organen, Blut dargestellten Jecorinpräparate zeigten ähnliche Eigenschaften (das Reduktionsvermögen trat zuweilen erst nach der Hydrolyse auf), aber, soweit Analysen ausgeführt wurden, andere Zusammensetzung und verschiedenes Phosphorstickstoffverhältnis.

Mit starker Natronlauge gekocht gibt Jecorin beim Erkalten Seifenleim und auf Zusatz von Säure Schwefelwasserstoff. Beim Kochen mit Alkalilauge oder Salzsäure oder Salpetersäure bildet sich Stearinsäure, beim Kochen mit Barytwasser entstehen Cholin, Glycerinphosphorsäure, Fettsäuren, beim Kochen mit verdünnten Säuren Glucose (Manasse).

Aus dem Angeführten sowie aus den Untersuchungen von Meinertz<sup>15)</sup>, Siegfried u. Mark<sup>16)</sup>, Frank<sup>17)</sup> u. a. geht hervor, daß Jecorin keine einheitliche Substanz ist. Es handelt sich um ein Gemenge von Phosphatiden, besonders Kephalin, Kohlenhydrat, anorganischen Salzen.

#### *Phosphatide aus Pflanzen.*

Phosphatide, welche bei der hydrolytischen Spaltung Zucker (Glucose, Galaktose, Pentosen bis zu 20% auf Glucose berechnet) liefern, sind in Pflanzen in weiter Verbreitung nachgewiesen, aber noch nicht in reinem Zustande erhalten worden (Hiestand<sup>18)</sup>, Winterstein u. Hiestand<sup>19)</sup>, E. Schulze<sup>20)</sup>, Trier<sup>21)</sup>.

Kohlenhydrathaltige  
Phosphatide aus  
Pflanzen.

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 51, S. 96. 1907.

<sup>2)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 39, S. 91. 1919.

<sup>3)</sup> Biochem. journ. Bd. 14, S. 615 ref. Chem. Zentralbl. 1921, I, S. 98.

<sup>4)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 64, S. 302. 1910.

<sup>5)</sup> Biochem. journ. Bd. 9, S. 103. 1915.

<sup>6)</sup> Die chem. Konstitution des Gehirns. Tübingen: Pietzcker 1901, S. 176.

<sup>7)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 53, S. 496. 1907 u. Bd. 70, S. 94. 1910/11.

<sup>8)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 124, S. 206. 1921.

<sup>9)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 124, S. 234. 1921 u. Bd. 131, S. 411. 1922.

<sup>10)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 13, S. 463. 1912/13.

<sup>11)</sup> Journ. f. prakt. Chem., N. F. Bd. 33, S. 425. 1886. Zeitschr. f. Biol. Bd. 33, S. 85. 1896.

<sup>12)</sup> Manasse: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 20, S. 478. 1895. — Siegfried u. Mark: desgl. Bd. 46, S. 492. 1903. — P. Mayer: Biochem. Zeitschr. Bd. 1, S. 92. 1906. — Baskoff: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 57, S. 395. 1908; Bd. 61, S. 426. 1909; Bd. 62, S. 162. 1909.

<sup>13)</sup> Baldi: Arch. f. Anat. u. Physiol., Physiol. Abt. 1887, Suppl.-Bd. S. 100. <sup>14)</sup> Manasse: a. a. O.

<sup>15)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 46, S. 376. 1906. <sup>16)</sup> A. a. O.

<sup>17)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 50, S. 273. 1913. <sup>18)</sup> Diss. philosoph. Fak. Zürich 1906.

<sup>19)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 54, S. 288. 1907/08. <sup>20)</sup> desgl. Bd. 55, S. 338. 1908.

<sup>21)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 86, S. 1, 153, 407. 1913.

## Protagon.

- Vorkommen.** 270. Unter diesem Namen beschreibt Liebreich<sup>1)</sup> einen leicht zersetzlichen, kompliziert zusammengesetzten krystallisierten Körper, den er aus dem Gehirn isolierte. Er findet sich nur in den markhaltigen Nervenfasern. Die Zusammensetzung ist nach Liebreich C 66,74, H 11,74, N 2,80, P 1,23, O 17,49%. Die späteren Analysen von Gamgee und Blankenhorn<sup>2)</sup> ergaben für denselben Körper C 66,39, H 10,69, N 2,39, P 1,06%. Es enthält nach Kossel<sup>3)</sup> auch Schwefel, und zwar 0,5—0,8%. Sehr ähnliche Werte wurden von Baumstark<sup>4)</sup>, Kossel, Lesem und Gies<sup>5)</sup>, Cramer<sup>6)</sup> u. a. erhalten. Thudichum<sup>7)</sup> ist sehr energisch gegen die Auffassung des Protagon als einheitliche Substanz aufgetreten. Auch Kossel fand, daß Präparate, welche nach einer etwas abweichenden Methode dargestellt waren, abweichende Werte zeigten und Wörner und Thierfelder<sup>8)</sup> stellten eine wechselnde Zusammensetzung der Präparate fest, so daß sie das Protagon ebenfalls nicht als einheitlichen Körper betrachten. Zu demselben Ergebnis sind auf Grund eingehender Untersuchungen Gies<sup>9)</sup> und Mitarbeiter, sowie Rosenheim und Tebb<sup>10)</sup> gekommen. Sie halten das Protagon für ein Gemenge von Cerebrosiden und Phosphatiden (Sphingomyelin). Demgegenüber vertritt Cramer<sup>11)</sup> die Einheitlichkeit der Verbindung. S. dazu auch Pearson<sup>12)</sup>.
- Weiteres Vorkommen.** Protagonartige Stoffe wurden auch aus Leukoeyten (Lilienfeld<sup>13)</sup>, Sputum (Ad. Schmidt<sup>14)</sup> und Fr. Müller<sup>15)</sup>, Nebennieren (Orgler<sup>16)</sup>, Nieren (Dunham<sup>17)</sup>, roten Blutkörperchen (Pascucci<sup>18)</sup>, Bang und Forssman<sup>19)</sup> gewonnen.
- Darstellung aus Gehirn.** Zur Darstellung nach Wilson und Cramer<sup>11)</sup> wird das von Blut und Häuten möglichst befreite und zerkleinerte Gehirn in weithalsiger Flasche mit 90—96proz. Alkohol bei möglichst niedriger Temperatur geschüttelt, der Alkohol nach Absetzen abgegossen, die Extraktion mit frischem Alkohol 3—4 mal wiederholt, die abfiltrierte Masse zunächst mit einer Mischung gleicher Teile Alkohol und Äther, dann mit Äther allein bis zur Erschöpfung (3—4 Extraktionen) extrahiert und durch Liegen an der Luft getrocknet. Man gießt jetzt kochenden Alkohol auf das Pulver, erhitzt 1—2 Minuten unter Umschütteln im Wasserbad, filtriert heiß in ein mit Eis gekühltes Becherglas und wiederholt die Extraktion 2 mal. Der entstehende Niederschlag wird aus einer geringen Menge kochendem absoluten Alkohol wiederholt umkrystallisiert, indem man auch hier den kochenden Alkohol auf die Substanz gießt und die heiße Lösung schnell filtriert. Bei den ersten beiden Umkrystallisationen bleiben sich nicht lösende Anteile zurück, bei der dritten löst sich in der Regel alles in einer geringen Menge Alkohol auf.
- Eigenschaften.** Es bildet bei der langsamen Abscheidung aus alkoholischer Lösung mikroskopische Nadeln, welche sich rosettenförmig zusammenlagern und bei der Ausscheidung aus ganz konzentrierter Lösung gekrümmte Form zeigen. Die Krystallgruppen haben oft das Ansehen von scharf konturierten, radial gestreiften Knollen mit höckerigen oder gezackten Rändern. Zerrieben und über Schwefelsäure getrocknet bildet es ein weißes, nicht hygroskopisches Pulver. Es löst sich schwer in kaltem Alkohol, leicht in warmem Alkohol und warmem Äther. Mit Wasser quillt es gelatinös und bildet schließlich eine opaleszierende Lösung. Schmelzpunkt bei 200° nach vorangegangener

<sup>1)</sup> Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 134, S. 29. 1865.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 3, S. 260. 1879.

<sup>3)</sup> Arch. f. Anat. u. Physiol., physiol. Abt. 1891, S. 359. — Kossel u. Freytag: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 17, S. 431. 1893.

<sup>4)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 9, S. 145. 1885.

<sup>5)</sup> Americ. Journ. of physiol. Bd. 8, S. 183. 1902.

<sup>6)</sup> Journ. of physiol. Bd. 31, S. 31. 1904.

<sup>7)</sup> Die chem. Konstitution des Gehirns. Tübingen 1901.

<sup>8)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 30, S. 542. 1900.

<sup>9)</sup> a. a. O. — Posner u. Gies: Journ. of biol. chem. Bd. 1, S. 59. 1905. — Gies: desgl. Bd. 3, S. 339. 1907.

<sup>10)</sup> Journ. of physiol. Bd. 36, S. 1. 1907. Proc. of the physiol. soc. Journ. of physiol. Bd. 37. 1908. Quart. Journ. of exp. physiol. Bd. 2, S. 317; ref. Chem. Zentralbl. 1910, I, S. 290 u. Biochem. Zeitschr. Bd. 25, S. 151. 1910.

<sup>11)</sup> Lochhead u. Cramer: Biochem. Journ. Bd. 2, S. 350. 1907. — Wilson u. Cramer: Journ. of exp. physiol. Bd. 1, S. 97. 1908. Quart. Journ. of exp. physiol. Bd. 2, S. 91. 1909. — Cramer: Quart. Journ. of exp. physiol. Bd. 3, S. 129. 1910.

<sup>12)</sup> Biochem. Journ. Bd. 8, S. 616; ref. Chem. Zentralbl. 1916, I, S. 1152.

<sup>13)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 18, S. 475. 1894.

<sup>14)</sup> Berlin. klin. Wochenschr. 1898, S. 73. <sup>15)</sup> desgl. 1898, S. 75.

<sup>16)</sup> Salkowski-Festschrift. Berlin: Hirschwald 1904, S. 285.

<sup>17)</sup> Ref. Biol. Zentralbl. Bd. 4, S. 89. 1905/06.

<sup>18)</sup> Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 6, S. 543. 1905.

<sup>19)</sup> Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 8, S. 249. 1906.

Gelbfärbung und Erweichung. Nach Levene<sup>1)</sup> gibt es die Orcinsalzsäurereaktion (§ 100). Es zeigt schwache Rechtsdrehung (Rosenheim und Tebb). Über das eigentümliche Verhalten seiner Lösung in Pyridin (Übergang der zunächst bei 30° vorhandenen schwachen Rechtsdrehung bei Abkühlung und auch bei Erwärmung in eine starke Linksdrehung und schließlich konstant bleibende schwache Linksdrehung) siehe Rosenheim und Tebb<sup>2)</sup>.

Durch warmen Alkohol wird es allmählich zersetzt (Cramer). Beim Kochen mit Barytwasser Spaltung. entstehen die Zersetzungsprodukte der Phosphatide und Cerebroside.

**Paranucleoprotagon.** Mit diesem Namen bezeichnen Ulpiani und Lelli<sup>3)</sup> einen Stoff, welchen sie erhielten, indem sie einen Chloroformauszug des Gehirns mit Essigäther fällten und den abfiltrierten Niederschlag mit Äther und mit Chloroform erschöpften. Diese Verbindung, in der die Gesamtmenge des Protagens enthalten sein soll, wird durch 85 proz. Alkohol bei 45° in Protagon und Paranuclein gespalten. Bei einer Nachprüfung erhielten Steel und Gies<sup>4)</sup> zwar auch, wenn auch in kleiner Menge, einen Stoff, welcher durch Alkohol in protagonhaltige Stoffe und ein Protein gespalten werden konnte. In vielen Punkten konnten sie aber die Angaben von Ulpiani und Lelli nicht bestätigen, so daß weitere Untersuchung nötig ist.

### Nucleinsäuren.

(Bearbeitet von H. Steudel-Berlin.)

271. Nucleinsäuren finden sich in Verbindung mit Proteinen als nucleinsäure Eiweißsalze in weiter Verbreitung in tierischen und pflanzlichen Geweben, besonders in den Zellkernen. Sie enthalten alle Kohlenstoff, Wasserstoff, Sauerstoff, Stickstoff und Phosphor. Es sind Phosphorsäureester von Kohlenhydraten der 5- oder der 6-C-Reihe, die ihrerseits Purin- oder Pyrimidinkörper glucosidartig gebunden haben.

Charakteristisch für Nucleinsäuren sind also 1. ihr Gehalt an organisch gebundener Phosphorsäure, 2. gewisse Kohlenhydratreaktionen und 3. ihr Gehalt an Purin- bzw. Pyrimidinkörpern.

Man unterscheidet einfache und zusammengesetzte Nucleinsäuren. In den einfachen Nucleinsäuren ist nur 1 Mol. eines Purin- bzw. Pyrimidinkörpers, 1 Mol. eines Kohlenhydrates und 1 Mol. Phosphorsäure enthalten. Eine große Anzahl dieser einfachen Nucleinsäuren krystallisiert und liefert auch krystallisierende Salze. Bisher hat man aber nur einfache Nucleinsäuren kennengelernt, die als Kohlenhydratkomponente eine Pentose (d-Ribose) in ihrem Molekül enthalten.

Die einfachen Nucleinsäuren werden auch als Nucleotide bezeichnet, die in ihnen enthaltenen Basen-Pentosekomplexe als Nucleoside.

Bis jetzt sind folgende einfache Nucleinsäuren (Nucleotide) bekannt, von denen aber nur die ersten beiden direkt aus Organen, die anderen nur als Spaltungsprodukte zusammengesetzter Nucleinsäuren erhalten worden sind:

Nucleotide	Nucleoside-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
Inosinsäure	= Hypoxanthosin- (Inosin-) H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> = Hypoxanthin-d-Ribose-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
Guanylsäure	= Guanosin- (Vernin-) H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> = Guanin-d-Ribose-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
Adenylsäure	= Adenosin-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> = Adenin-d-Ribose-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
Xanthylsäure	= Xanthosin-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> = Xanthin-d-Ribose-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
Uracylsäure	= Uridin-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> = Uracil-d-Ribose-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
Cytosylsäure	= Cytidin-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> = Cytosin-d-Ribose-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>

Einfache Nucleinsäuren.

Die zusammengesetzten Nucleinsäuren bestehen aus mehreren einfachen Nucleinsäuren. Am besten bekannt ist die Thymonucleinsäure, die aus 4 einfachen Nucleinsäuren besteht, die als Kohlenhydrat ein Derivat der 6-C-Reihe besitzen. Über die Art der Verknüpfung der einzelnen einfachen Nucleinsäuren untereinander ist nichts Sicheres bekannt. Von ihr grundsätzlich verschieden ist eine Nucleinsäure, die im Pflanzenreiche (Hefe, Weizenkeimlinge) aufgefunden ist. Sie besteht gleichfalls aus verschiedenen

Zusammengesetzte Nucleinsäuren.

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 53, S. 499. 1907.

<sup>2)</sup> Journ. of physiol. Bd. 37, S. 341 u. 348. 1908.

<sup>3)</sup> Gazz. chim. ital. Bd. 32, 1, S. 466. 1902.

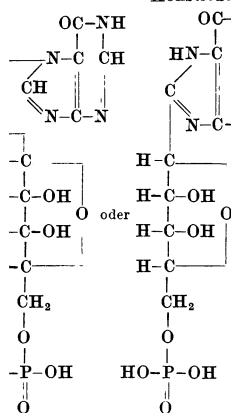
<sup>4)</sup> Americ. Journ. of physiol. Bd. 20, S. 378. 1907.

Gekoppelte Nuclein-  
säuren.

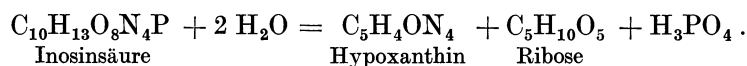
einfachen Nucleinsäuren, die aber eine Pentose (d-Ribose) als Kohlenhydrat enthalten, und die nur äußerst locker miteinander verbunden sind. Man hat endlich auch eine lockere Bindung einer einfachen Nucleinsäure (Guanylsäure) an eine zusammengesetzte Nucleinsäure beobachtet (gekoppelte Nucleinsäure).

#### Einfache Nucleinsäuren\*).

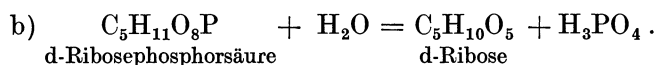
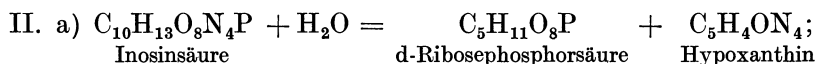
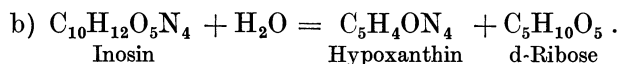
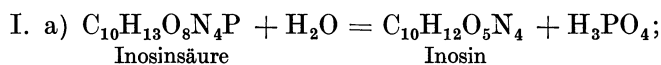
Vorkommen. 272. Inosinsäure  $C_{10}H_{13}O_8N_4P$  wurde von Liebig im Fleischextrakt entdeckt. Konstitution. Haiser<sup>1)</sup> fand den Phosphorgehalt der Substanz und klärte auch ihre Zusammensetzung auf. Das Kohlenhydrat der Inosinsäure wurde von Levene<sup>2)</sup> als d-Ribose bestimmt. Nach ihm ist die Pentose durch das Kohlenstoffatom in  $\delta$ -Stellung mit der Phosphorsäure verknüpft, so daß der Inosinsäure nebenstehende Formel zukommt.



Bei der totalen Hydrolyse zerfällt die Inosinsäure in Hypoxanthin, d-Ribose und Phosphorsäure:



Bei weniger eingreifender Spaltung erhält man Bruchstücke, in denen die Pentose entweder mit dem Hypoxanthin oder mit der Phosphorsäure verbunden ist:



Darstellung. Zur Darstellung der Inosinsäure eignet sich am besten frisches Fleischextrakt. Folgende Methode von Haiser<sup>3)</sup> hat sich gut bewährt: Das Extrakt wird in etwa 5 Tl. Wasser von ungefähr 40° gelöst und mit Baryt im Überschuß die anorganischen Verbindungen ausgefällt. Das Filtrat wird mit Essigsäure neutralisiert und mit Bleiessig in der Kälte genau ausgefällt. Ein Überschuß wirkt lösend. Der Bleiniederschlag wird in der Kälte mit Schwefelwasserstoff zersetzt, mit Bariumcarbonat angerieben und aufgekocht. Das Filtrat wird im Vakuum eingengt und liefert eine Krystallisation des inosinsauren Bariumsalses. Die Ausbeute hängt von der Frische des Extraktes ab und kann bis 1,5% betragen.

Eigenschaften. Die freie Inosinsäure ist bisher nicht krystallisiert erhalten worden, dagegen krystallisiert das Bariumsals leicht in perlmutterglänzenden Blättchen, die in trockenem Zustande das Aussehen von poliertem Silber haben. 1000 Tl.  $H_2O$  lösen bei 16° 2,5 Tl. Salz. In heißem Wasser leichter löslich, in Alkohol unlöslich. Eine wässrige Lösung scheidet beim Kochen einen Teil unlöslich aus (wohl als basisches Salz).  $C_{10}H_{11}O_8N_4PBa + 7\frac{1}{2} H_2O$ . Verliert bei 100°  $6\frac{1}{2} H_2O = 18,93\%$ ; bei 100° im Vakuum entweicht auch das letzte Molekül  $H_2O$ . Löst man das Bariumsals zu 3% in 2,5proz. Salzsäure, so ist  $[\alpha]_D^{16} = -18,5^\circ$ .

\*) Es werden hier nur die aus den Organen isolierten behandelt. Die Beschreibung der aus den zusammengesetzten Nucleinsäuren gewonnenen erfolgt bei diesen (§§ 278—280).

<sup>1)</sup> Monatshefte f. Chem. Bd. 16, S. 190. 1895; Bd. 29, S. 161. 1908; Bd. 30, S. 147, 377. 1909; Bd. 31, S. 357. 1910.

<sup>2)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 42, 1, S. 1198, 2, S. 2469. 1909; Bd. 41, 2, S. 2703. 1908; Bd. 44, 1, S. 746. 1911.

<sup>3)</sup> Monatshefte f. Chem. Bd. 29, S. 161. 1908.

Basisches inosinsaures Barium, mikrokristallinische Masse von weißem kreibigen Aussehen, entsteht durch Versetzen einer siedend heißen Lösung von inosinsaurem Baryt mit Barytwasser  $(C_{10}H_{10}N_4PO_8)_2Ba_3 + 2 H_2O$ .

Calcium- und Kalisalze sind gleichfalls kristallisiert erhalten worden; das letztere ist sehr hygroskopisch. Calcium-, Kaliumsalze.

Blei-, Silber-, Kupfersalze sind amorph. Weitere Salze.

Molischsche (§ 97), Orcin- und Phloroglucinreaktion (§100) sind positiv, Reduktion von Fehlingscher Lösung findet erst nach dem Kochen mit Säuren statt.

Inosin. Wird das Filtrat der Bleiessigfällung des Fleischextraktes (bei der Darstellung der Inosinsäure) mit Ammoniak versetzt, so entsteht ein neuer Niederschlag, der mit Schwefelwasserstoff zersetzt und mit Bariumcarbonat behandelt werden kann. Er enthält ein äquimolekulares, nicht leicht zu trennendes Gemenge von Inosin und Hypoxanthin, das früher als Carnin (§ 145) bezeichnet wurde. Am reinsten wird das Inosin erhalten, wenn man das Gemisch acetyliert und das entstehende Triacetylinosin aus Chloroform umkristallisiert. Durch Verseifung erhält man reines Inosin  $C_{10}H_{12}O_5N_4$ . Es ist Hypoxanthin-d-ribosid und kann auch aus Adenosin mit Natriumnitrit und Essigsäure gewonnen werden. Ferner entsteht es aus inosinsaurem Baryt bei 4stündigem Erhitzen mit Wasser auf  $135^\circ$ . Fp.  $215^\circ$ .  $[\alpha]_D = -49,2^\circ$  in 9proz. wässriger Lösung.  $[\alpha]_D^{20} = -72,68^\circ$  in etwa 10proz. alkalischer Lösung. Inosin.

Aus wässriger Lösung kristallisiert beim Eindunsten bei  $45^\circ$  nach dem Abkühlen Inosin mit 2 Mol. Krystallwasser in tyrosinähnlichen Nadeln:  $C_{10}H_{12}O_5N_4 + 2 H_2O$ . Fp.  $89-90^\circ$ . Die Substanz verliert die beiden Moleküle  $H_2O$  bei gewöhnlicher Temperatur über Schwefelsäure.

Aus alkalischer Lösung scheidet sich bei längerem Stehen das Natriumsalz in langen Prismen ab<sup>1)</sup>.

Triacetylinosin<sup>2)</sup>  $(C_{10}H_9N_4O_5(COCH_3)_3)$ , durch Acetylieren mit Essigsäureanhydrid und Natriumacetat. Aus Alkohol seidenglänzende Nadeln. Fp.  $236^\circ$ .

Ribosephosphorsäure. Durch 1stündiges Kochen von inosinsaurem Baryt mit 1proz. HCl erhält man d-ribosephosphorsaures Barium, nachdem die Lösung von Hypoxanthin befreit ist. Die Substanz kristallisiert aus Wasser in Aggregaten von rechteckigen Platten.  $C_5H_9PO_8Ba + 5\frac{1}{2} H_2O$ . Durch Oxydation mit Salpetersäure oder Brom entsteht aus Ribosephosphorsäure die Phosphoribonsäure. Durch neutrale Hydrolyse (bei  $130^\circ$  in Ammoniumacetatlösung 3 Stunden lang) wird die Phosphorsäure abgespalten und d-Ribonsäure erhalten. Ribosephosphorsäure.

d-Ribose<sup>3)</sup> wird am zweckmäßigsten aus einem der Purinriboside hergestellt, die bei neutraler Hydrolyse der Hefenucleinsäure (§ 277) entstehen, z. B. aus Vernin; das Inosin enthält die gleiche Pentose. 1,5g Vernin werden 1 Stunde lang in 150 ccm  $\frac{n}{10}$ - $H_2SO_4$  am Rückflußkühler gekocht. Die Lösung wird mit Silbersulfat ausgefällt, das Filtrat mit  $H_2S$  behandelt, filtriert, mit  $BaCO_3$  neutralisiert und unter vermindertem Druck eingeengt. Der Rückstand, in heißem absolutem Alkohol gelöst, liefert nach dem Einengen und Impfen eine Kristallisation von d-Ribose. Näheres über sie § 103. d-Ribose.

**273. Guanylsäure.** Die Guanylsäure ist zuerst von Bang<sup>4)</sup> im Nucleoprotein des Pankreas aufgefunden worden; sie ist auch aus den Nucleoproteiden anderer Vorkommen.

<sup>1)</sup> Levene u. Jacobs: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 43, 1, S. 3162. 1910.

<sup>2)</sup> Haiser u. Wenzel: Monatshefte f. Chem. Bd. 29, S. 157. 1908.

<sup>3)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 46, 3, S. 3949. 1913.

<sup>4)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 26, S. 133. 1898. — Steudel: desgl. Bd. 53, S. 539. 1907. — H. Steudel u. P. Brigl: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 68, S. 40. 1910.

Organe dargestellt worden. Im Pankreas und wahrscheinlich auch in den anderen Organen kommt die Säure teilweise oder ganz nicht als solche vor, sondern in lockerer Bindung mit einer zusammengesetzten Nucleinsäure (Guanylnucleinsäure<sup>1)</sup>) (§ 281). In ähnlicher lockerer Bindung ist sie auch in der Hefenucleinsäure enthalten.

**Konstitution.** Sie ist analog der Inosinsäure zusammengesetzt (s. Konstitutionsformel bei Inosinsäure) und besteht aus Guanin, d-Ribose und Phosphorsäure. Bei totaler Spaltung erhält man diese 3 Bruchstücke, bei teilweiser Spaltung bleibt die d-Ribose entweder mit der Phosphorsäure verbunden (d-Ribosephosphorsäure) oder mit dem Guanin (Vernin<sup>2)</sup>). Das Vernin ist zuerst von E. Schulze in Pflanzenkeimlingen entdeckt, später von Levene<sup>3)</sup> als Guanosin bezeichnet.

**Darstellung.** Zur Darstellung der Guanylsäure geht man am einfachsten und bequemsten von der Hefenucleinsäure aus und verfährt nach H. Steudel und E. Peiser<sup>4)</sup> folgendermaßen: 50 g hefenucleinsaures Natrium (von C. F. Boehringer und Söhne in Mannheim-Waldhof zu beziehen) werden in 200 ccm warmem Wasser gelöst und mit 20 ccm 33proz. NaOH versetzt. Man läßt etwa 24 Stunden bei Zimmertemperatur (etwa 15—17°) stehen, zentrifugiert von einem aus Calcium- und Eisenphosphat bestehenden Niederschlag ab, versetzt das Filtrat mit 20 g Natriumacetat und fällt mit 600 ccm Alkohol. Diese Operation hat den Zweck, 1. die Hefenucleinsäure aufzuspalten und 2. die anorganischen Phosphate zu entfernen. Die Alkoholfällung wird in 50 ccm warmem Wasser gelöst, evtl. noch einmal zentrifugiert, die klare Lösung mit 10 g Natriumacetat versetzt und mit Eisessig neutralisiert. Es entsteht ein reichlicher amorpher Niederschlag, der abzentrifugiert und 2 mal aus 100 ccm heißer 20proz. Natriumacetatlösung umgefällt wird. Dann wird der Niederschlag in 50 ccm doppeltnormaler Natronlauge gelöst und allmählich das 3—4fache Volumen Alkohol hinzugegeben. Es fällt ein farbloses Öl aus, das beim Reiben mit einem Glasstab sofort krystallisiert. Ausbeute an tertiärem guanylsauren Natrium lufttrocken 6,7 g.

Ältere, umständlichere Darstellungsmethoden, die als Ausgangsmaterial von Pankreasdrüsen resp. von Pankreasproteid ausgehen, s. bei Bang<sup>5)</sup>, Levene<sup>6)</sup>, Feulgen<sup>7)</sup>.

**Eigenschaften.** Die reine Guanylsäure  $C_{10}H_{14}O_8N_5P + 2 H_2O$  krystallisiert mit 2 Mol. Krystallwasser in langen, prismatischen Nadeln, bei Gegenwart von mineralischen Verunreinigungen fällt sie gelatinös aus<sup>8)</sup>. Das Krystallwasser entweicht beim Trocknen unter vermindertem Druck im siedenden Xylolbade in 24 Stunden.

Lufttrocken schmilzt sie im geschlossenen Röhrchen bei 180° (korr.) unter Aufschäumen, nachdem sie bei 175° weich und halb durchsichtig geworden ist.  $[\alpha]_D^{20}$  in Wasser = — 7,5°, in 5proz. NH<sub>3</sub>-Lösung — 43,5°.

<sup>1)</sup> Feulgen: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 108, S. 147. 1920; Bd. 111, S. 257. 1920. — E. Hammarsten: desgl. Bd. 109, S. 141. 1920; Bd. 118, S. 224. 1922.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 9, S. 420. 1885.

<sup>3)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 42, 3, S. 2474, 2703. 1909; Bd. 43, 3, S. 3154. 1910.

<sup>4)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 114, S. 201. 1921; Bd. 120, S. 292. 1922.

<sup>5)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 26, S. 133. 1899; Bd. 31, S. 411. 1901. Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 4, S. 175. 1904; Bd. 11, S. 76. 1908. — v. Fürth u. Jerusalem: Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 10, S. 174. 1907; Bd. 11, S. 146. 1908.

<sup>6)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 10, S. 221. 1908. — Jones u. Rowntree: Journ. of biol. chem. Bd. 4, S. 289. 1908.

<sup>7)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 106, S. 249. 1919.

<sup>8)</sup> Levene: Journ. of biol. chem. Bd. 39, S. 77. 1919; Bd. 40, S. 171. 1920; Bd. 41, S. 483. 1920.



Das saure Natriumsalz fällt beim Ansäuern mit Essigsäure aus der Zer- Natriumsalz.  
setzungsflüssigkeit als schwerlösliche Substanz aus. Beim öfteren Lösen in  
Wasser und Fällen mit Alkohol wird es immer löslicher, so daß endlich mit  
Alkohol auch nach dem Ansäuern mit Essigsäure nichts mehr ausfällt. Es ent-  
steht nur eine sehr visköse Gallerte. Zusatz von Natriumacetatlösung bewirkt  
aber wieder die völlige Ausfällung der Substanz<sup>1)</sup>. Außer dem sauren Salz ist  
ein sekundäres und ein basisches Natriumsalz bekannt; das letztere krystallisiert<sup>2)</sup>.

Guanylsaures Brucin. Fp. 233°. Zsp. 240°.  $[\alpha]_D^{20}$  in 35 proz. Alkohol — 26,0°. Brucinsalz.

Die Guanylsäure gibt schwer lösliche Blei-, Kupfer- und Bariumverbindun- Weitere Salze.  
gen, die bisher nicht krystallisiert erhalten sind.

Bei der Oxydation mit salpetriger Säure entsteht aus Guanylsäure Xan- Oxydation mit  
thylsäure<sup>3)</sup>  $H_2N \cdot C_{10}H_{12}N_4O_8P + HNO_2 = HO \cdot C_{10}H_{12}N_4O_8P + N_2 + H_2O$ . salpetriger  
Brucinsalz aus 30 proz. Alkohol lange, farblose Nadeln, die gegen 200° schmelzen. Säure.  
Bei der Säurehydrolyse entsteht Xanthin als einziger stickstoffhaltiger Spalt-  
körper.

Vernin (Guanosin<sup>4)</sup>  $C_{10}H_{13}O_5N_5 + 2 H_2O$ . Bei der neutralen Hydrolyse Guanosin (Vernin).  
der Guanylsäure unter Druck erhält man das Guanin-d-ribosid. 20 g Guanyl-  
säure werden in 150 g Wasser gelöst, mit Ammoniak neutralisiert und 3<sup>1</sup>/<sub>2</sub> Stunden  
im Autoklaven auf 130° erhitzt. Nach dem Abkühlen und Umrühren scheidet  
sich das Rohguanosin aus, das beim Umfällen in langen, tyrosinähnlichen Nadeln  
krystallisiert. In kaltem Wasser wenig, in heißem leicht löslich, unlöslich in  
Alkohol, löslich in verdünnten Mineralsäuren und in Alkalien.  $[\alpha]_D^{20} = -60^\circ$   
in <sup>n</sup>/<sub>10</sub>-NaOH in etwa 3 proz. Lösung. Fp. 237—240°. Mit Phloroglucin und Salz-  
säure erhält man Pentosenreaktion (§ 100), Trommer'sche Probe (§ 97) negativ, nach  
der Hydrolyse mit Säuren positiv. Mit Diazobenzolsulfosäure keine Rotfärbung.  
Gibt mit Phosphorwolframsäure in saurer Lösung Niederschlag, ebenso mit  
Mercurinitrat und mit Bleiessig und Ammoniak. Mit Silbernitrat und Ammoniak  
in neutraler Lösung gelatinöser Niederschlag, der in Ammoniak leicht löslich ist<sup>5)</sup>.

Vernin pikrat<sup>5)</sup>. Büschel feiner Nadeln, Fp. 185°. Zur Identifizierung gut  
geeignet ist das Triacetylvernin<sup>6)</sup> (aus Vernin mit Essigsäureanhydrid und  
Natriumacetat). Löslich in heißem Chloroform und heißem absoluten Alkohol.  
Glasglänzende prismatische Nadeln, Fp. 226° (unkorr.).  $[\alpha]_D^{15} = +2,306^\circ$ .

#### Zusammengesetzte Nucleinsäuren.

Der bisher allein bekannte Vertreter der zusammengesetzten Nucleinsäuren  
im Tierreich ist die Thymonucleinsäure.

274. **Thymonucleinsäure.** Sie kommt in den Zellkernen fast aller Organe vor, Vorkommen.  
doch eignen sich die meisten Organe nicht als Ausgangsmaterial für ihre Ge-  
winnung. Nur sehr kernreiche Gewebe zu verarbeiten ist lohnend. Es kommt  
also in erster Linie die Thymusdrüse und das reife Fischsperma in Betracht.

Fast alle Methoden, die für die Darstellung der Thymonucleinsäure emp- Darstellung.  
fohlen sind, beruhen auf der zuerst von Kossel gemachten Beobachtung, daß  
die Säure gegen Alkalien in der Siedehitze ziemlich beständig ist. Am einfachsten  
gestaltet sich die Gewinnung der Nucleinsäure nach dem Verfahren von A. Neu-  
mann<sup>7)</sup>, dem die späteren Methoden sämtlich nachgebildet sind.

<sup>1)</sup> Steudel u. Brigl: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 68, S. 40. 1910.

<sup>2)</sup> Feulgen: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 111, S. 257. 1921.

<sup>3)</sup> Knopf: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 92, S. 159. 1914.

<sup>4)</sup> Levene u. Jacobs: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 42, 2, S. 2474, 2703. 1909; Bd. 43, 3,  
S. 3154. 1910.

<sup>5)</sup> E. Schulze u. Trier: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 70, S. 143. 1910.

<sup>6)</sup> Steudel u. Freise: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 120, S. 126. 1922.

<sup>7)</sup> Arch. f. Anat. u. Physiol. (Physiol. Abt.) 1898, S. 374; 1899, Suppl.-Bd. S. 552.

1 kg rein präparierte Thymus oder anderes Gewebe wird in schwach essigsäurehaltigem Wasser gekocht, bis die Drüsen vollkommen hart geworden sind, fein zerhackt und in 2 l siedendes Wasser, dem vorher 200 g Natriumacetat zugefügt waren, gebracht und bis zur feinen Verteilung durchgerührt. Dann werden 100 ccm 33proz. Natronlauge zugesetzt und auf dem Wasserbade am Rückflußkühler  $\frac{1}{2}$  oder 2 Stunden gekocht, je nachdem man die Säure a oder b (s. unten) erhalten will. Nach der Neutralisation mit etwa 150 ccm 50proz. Essigsäure wird (durch einen Heißwassertrichter bei a) filtriert, das Filtrat auf etwa  $\frac{1}{2}$ —1 l eingedampft und nach dem Abkühlen auf 40° durch das gleiche Volumen Alkohol gefällt. Das abgeschiedene Natriumsalz löst man in 500 ccm Wasser, erhitzt auf dem Wasserbade, bis die trübe Flüssigkeit einen Niederschlag abgeschieden hat und wieder klar geworden ist, filtriert und fällt mit Alkohol. Lösung und Fällung wird so lange wiederholt, bis Alkohol erst auf Zusatz von wenig Natriumacetat eine Fällung erzeugt.

Wird das Natriumsalz der Thymonucleinsäure mit absolutem Alkohol behandelt und im Exsiccator getrocknet, so erhält man ein weißes, feines, stäubendes Pulver.

Will man die freie Säure herstellen, die aber sehr zersetzlich ist und sich nicht lange hält, so gießt man die Lösung des nucleinsäuren Natriums in die 3fache Menge salzsäurehaltigen Alkohols (2 ccm konzentrierter Salzsäure auf 100 ccm Alkohol). Der Niederschlag (bei a voluminöser als bei b) wird abfiltriert und bis zum Verschwinden der Chlorreaktion mit Alkohol und zuletzt mit Äther gewaschen.

Ausbeute 30—35 g Nucleinsäure aus 1 kg Reinthymus.

Andere Methoden sind von Schmiedeberg<sup>1)</sup>, Levene<sup>2)</sup>, Peters<sup>3)</sup>, Baumann<sup>4)</sup>, Feulgen<sup>5)</sup> angegeben.

a- und b-Säuren.

Die Säuren a und b unterscheiden sich nur dadurch, daß a noch schwerer in Wasser löslich ist als b, und daß a in einer mindestens 5proz., mit Hilfe von Natriumacetat hergestellten Lösung gelatiniert, b nicht. Die a-Säure enthält meist noch Beimengungen der b-Säure und umgekehrt. Zur weiteren Reinigung haben Kostytschew<sup>6)</sup> und Feulgen<sup>7)</sup> Verfahren angegeben. Das Gelatinierungsvermögen ist sehr abhängig von der Reaktion der Lösung und von der Anwesenheit von Neutralsalzen.

Nach Schmiedeberg ist die a-Säure mit seiner anhydrischen, die b-Säure mit der hydratischen identisch.

Konstitution.

Die Thymonucleinsäure hat die Zusammensetzung  $C_{43}H_{59}O_{33}N_{15}P_4$ <sup>8)</sup>. Sie zerfällt bei der völligen Aufspaltung in Guanin, Adenin, Thymin, Cytosin, 4 Mol. eines Kohlenhydrates der 6-C-Reihe und 4 Mol. Phosphorsäure. Bei teilweiser Hydrolyse, bei der nur Guanin und Adenin aus dem Molekül herausgelöst werden, erhält man eine Substanz, die Thymosinsäure (§275), die Fehlingsche Lösung reduziert. Es müssen demnach die beiden Basen durch

<sup>1)</sup> Arch. f. exper. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 57, S. 321. 1907.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 45, S. 370. 1905; Bd. 46, S. 155. 1905; Bd. 50, S. 1. 1906. Journ. of biol. chem. Bd. 48, S. 177. 1921.

<sup>3)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 10, S. 373. 1911/12.

<sup>4)</sup> Proc. of the soc. f. exp. biol. a. med. Bd. 17, S. 118. 1920.

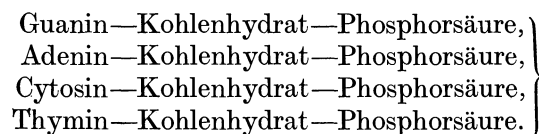
<sup>5)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 90, S. 261. 1914; Bd. 84, S. 326. 1913; Bd. 91, S. 165. 1914.

<sup>6)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 39, S. 553. 1903.

<sup>7)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 91, S. 165. 1914.

<sup>8)</sup> Steudel: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 42, S. 165. 1904; Bd. 43; S. 402. 1905; Bd. 46, S. 332. 1905; Bd. 48, S. 425. 1906; Bd. 49, S. 406. 1906; Bd. 53, S. 14. 1907; Bd. 56, S. 212. 1908.

Vermittlung der reduzierenden Gruppe mit dem Kohlenhydrat verknüpft sein und es ergibt sich für die Struktur der Thymonucleinsäure folgendes Bild:



Über die Art der Verknüpfung der einfachen Nucleinsäuren untereinander ist nichts Sicheres bekannt<sup>1)</sup>. Die Bindung der einfachen Nucleinsäuren aneinander ist gegen Alkalieinwirkung beständig<sup>2)</sup>.

Es sind aus den verschiedensten Organen Nucleinsäuren dargestellt und analysiert. Da aber fast gar keine Kriterien für die Reinheit der Substanzen bestehen, außer mühsamen quantitativen Spaltungen, so haben die meisten Elementaranalysen der Literatur wenig Wert. Wahrscheinlich ist die nach Neumann gewonnene Thymonucleinsäure in allen Organen die gleiche. Als leicht auszuführende Charakteristik ist es empfehlenswert, das Verhältnis von P : N zu bestimmen, das in der Thymonucleinsäure gleich 1 : 1,70 ist.

Die Thymonucleinsäure ist ein weißes, amorphes Pulver, das in Alkohol und Äther unlöslich ist. In kaltem Wasser ist es schwer löslich und verwandelt sich zunächst in eine schleimige Masse. In Alkalien, Ammoniak, Alkalicarbonat und -acetat ist es leicht löslich, und zwar verhält sich die Substanz wie eine 4basische Säure. Aus der Lösung in Alkalien kann die Thymonucleinsäure durch Mineralsäuren, nicht durch Essigsäure, wieder gefällt werden. Eine Auflösung von reinem nucleinsauren Natrium gibt mit Alkohol keinen Niederschlag; dieser tritt erst auf Zusatz von etwas konzentrierter Natriumacetatlösung auf. Auch mit Erdalkalien kann die Thymonucleinsäure lösliche neutrale Salze liefern; diese haben aber eine große Tendenz, in wasserunlösliche basische Salze überzugehen. Die Schwermetallsalze sind in Wasser unlöslich, das Metall ist nur sehr schwer wieder aus den Salzen zu entfernen, weil das Schwefelmetall, das beim Behandeln mit Schwefelwasserstoff entsteht, kolloidal gelöst bleibt und meist erst dann ausflockt, wenn die Nucleinsäure schon zersetzt ist.

Die Alkali- und Erdalkalisalzlösung der a-Säure erstarren bei genügender Konzentration (etwa 5%) zu Gallerten; verdünntere Lösungen erst nach Zusatz gewisser Salze.

Die Thymonucleinsäure gibt keine Biuretreaktion; Phloroglucin und Salzsäure liefert eine Reaktion, die der Reaktion auf Pentosen (§ 100) ähnlich ist, doch läßt sich der Farbstoff nicht mit Amylalkohol ausschütteln. Orcinsalzsäurereaktion negativ.

In essigsaurer Lösung gibt die Thymonucleinsäure mit basischen Eiweißkörpern Niederschläge, die in Salzsäure schwer löslich oder unlöslich sind<sup>3)</sup>. Die Niederschläge sind nucleinsaure Eiweißsalze und entsprechen den Niederschlägen, die man durch Ansäuern von wässrigen Organauszügen erhält und als Nucleoproteide (§ 436 ff.) bezeichnet.

Sie zeigt Rechtsdrehung, und zwar beträgt in neutraler Lösung  $[\alpha]_D = +154,2$  bis  $156,9^\circ$  (unabhängig von der Konzentration). Bei Zusatz von Säure nimmt die Drehung zu, bei weiterem Zusatz wieder ab. Steigender Zusatz von Ammoniak läßt die Drehung bis auf  $0^\circ$  sinken. Die neutralisierte Lösung zeigt

<sup>1)</sup> Feulgen: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 101, S. 288. 1918.

<sup>2)</sup> Steudel u. Nakagawa: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 128, S. 29. 1923.

<sup>3)</sup> Steudel: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 83, S. 72. 1913; Bd. 90, S. 291. 1914; Bd. 122, S. 298. 1922.

wieder die ursprüngliche Drehung (Gamgee und Jones<sup>1</sup>). Das gleiche ist der Fall, wenn man statt Ammoniak Natronlauge nimmt<sup>2</sup>). Gelatinierbarkeit und Drehungsvermögen scheinen in einem gewissen Zusammenhang<sup>2</sup>) zu stehen.

Das nächste Abbauprodukt der Thymonucleinsäure ist die Thymosinsäure (s. § 275).

Vollständige  
Hydrolyse.

Bei der vollständigen Hydrolyse der Thymonucleinsäure durch siedende Schwefelsäure entstehen Guanin und Adenin (und sekundär aus diesen Xanthin und Hypoxanthin), ferner Thymin, Cytosin (sekundär in Uracil verändert). Als Spaltstücke des Kohlenhydrates erhält man Ameisensäure und Lävulin-säure, endlich Phosphorsäure<sup>3</sup>). Das sich entwickelnde Ammoniak entstammt der sekundären Veränderung des Guanins, Adenins und Cytosins. Über die Isolierung der Spaltungsprodukte s. § 276.

Einwirkung von  
Salpetersäure.

Bei der Einwirkung starker Salpetersäure<sup>4</sup>) auf Thymonucleinsäure krystallisieren die Nitate des Guanins und Adenins annähernd quantitativ aus. Aus dem Filtrat, das Fehlingsche Lösung reduziert und Rechtsdrehung zeigt, läßt sich Thymosinsäure gewinnen. Behandelt man das Filtrat in der Wärme, so erhält man Thymin und Uracil (aus Cytosin hervorgegangen), ferner Oxalsäure und Säuren, die durch Einwirkung der Salpetersäure auf das Kohlenhydrat entstehen.

Oxydation mit  
Calciumper-  
manganat.

Bei der Oxydation mit Calciumpermanganat<sup>5</sup>) erhielten Kutscher und Seemann und Kutscher und Schenck Adenin, Guanidin (aus Guanin), Harnstoff, eine biuretgebende Substanz, Martamsäure, Oxalsäure, Essigsäure und eine Säure unbekannter Formel.

Einwirkung von  
Fermenten.

Pepsin-Grübler, Hundemagensaft, auch Rindermuskeln und Rinderblut haben keinen Einfluß auf Nucleinsäure<sup>6</sup>). Ob die Verflüssigung und die Aufhebung der Gelatinierbarkeit wirklich Veränderungen, durch Fermente bedingt, sind, bedarf weiterer Untersuchung. Reine Trypsinpräparate und reines Erepsin greifen Nucleinsäure nicht an<sup>7</sup>). Dagegen sind Nucleasen (§ 520) in den wässerigen Auszügen vieler pflanzlicher und tierischer Organe gefunden worden: Darm-schleimhaut von Rindern und Kaninchen, Pankreas, Milz, Leber, Thymus, Bakterien, Schimmelpilze<sup>8</sup>).

Nachweis.

Um eine Substanz als Thymonucleinsäure zu charakterisieren, ist es erforderlich, das Verhältnis von P : N und die Purinbasen etwa nach der Salpeter-säuremethode in ihr zu bestimmen. Der quantitative Nachweis des Cytosins und Thymins erfordert so große Mengen Material, wie sie gewöhnlich nicht zur Verfügung stehen. Das optische Verhalten bei Zusatz von Natronlauge und Neutralisation nach einiger Zeit ist ebenfalls charakteristisch. Endlich ist folgende mikroskopische Reaktion zur Erkennung der Thymonucleinsäure geeignet (H. Steudel<sup>9</sup>): Bringt man ein Körnchen von Nucleinsäure mit einem Tropfen starker Salpetersäure oder konzentrierter Salzsäure auf einem Objekt-träger zusammen, so kann man nach einigen Augenblicken reichliche Abscheidung

<sup>1</sup>) Proc. of the roy. soc. of London Bd. 72, S. 100. 1904.

<sup>2</sup>) Steudel: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 83, S. 76. 1913. — Feulgen: desgl. Bd. 104, S. 189. 1920. — Steudel u. Nakagawa: desgl. Bd. 128, S. 29. 1923.

<sup>3</sup>) Kossel u. Neumann: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 27, 2, S. 2215. 1894.

<sup>4</sup>) Steudel: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 49, S. 409. 1906.

<sup>5</sup>) Kutscher u. Seemann: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 36, 3, S. 3023. 1903. — Kutscher u. Schenck: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 44, S. 309. 1905.

<sup>6</sup>) Sachs: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 46, S. 337. 1905.

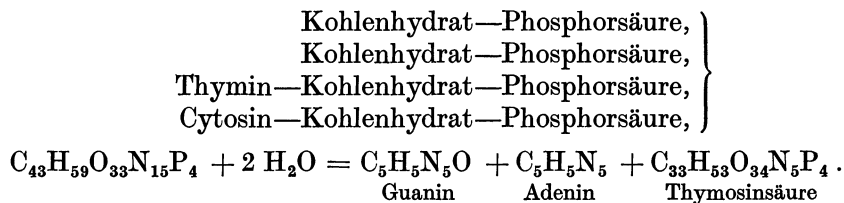
<sup>7</sup>) Steudel: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 55, S. 407. 1908.

<sup>8</sup>) Araki: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 38, S. 84. 1903. — Nakayama: desgl. Bd. 41, S. 348. 1904. — Iwanoff: desgl. Bd. 39, S. 31. 1903. — Plenge: desgl. Bd. 39, S. 190. 1903.

<sup>9</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 48, S. 425. 1906.

von doppeltbrechenden Krystallen beobachten. Die anderen bekannten Nucleinsäuren reagieren nicht so leicht wie die Thymonucleinsäure.

275. Thymosinsäure<sup>1)</sup>. Sie ist das nächste Abbauprodukt der Thymonucleinsäure und wurde früher auch als Nucleothyminsäure<sup>2)</sup>, Thyminsäure<sup>3)</sup>, Nucleotinphosphorsäure<sup>4)</sup> bezeichnet. Sie unterscheidet sich von der Thymonucleinsäure nur dadurch, daß Guanin und Adenin in ihr fehlen und die von den Basen besetzt gewesenen reduzierenden Gruppen der Kohlenhydrate freige worden sind:



Die Darstellung gelingt am sichersten nach dem Verfahren von Steudel und Brigl durch Behandeln von Nucleinsäure mit starker Salpetersäure in der Kälte<sup>5)</sup>. Darstellung der Thymosinsäure.

10 g lufttrockenes nucleinsaures Natrium werden mit einem erkalteten Gemisch von 10 ccm konzentrierter Salpetersäure (spez. Gew. 1,4) und 10 ccm Wasser unter Kühlung übergossen und unter häufigem Umrühren 48 Stunden im Eisschrank stehen gelassen. Nach dieser Zeit ist die Zersetzung der Nucleinsäure noch nicht ganz vollendet, der Versuch muß jedoch nach 2 Tagen unterbrochen werden, da sonst weitgehende Hydrolyse eintritt. Die auskrystallisierten Nitrate der Nucleinbasen werden abgesaugt, die Flüssigkeit auf 100 ccm verdünnt mit Sodalösung neutralisiert und mit basischem Bleiacetat gefällt. Der voluminöse Niederschlag wird abzentrifugiert, mehrere Male mit Wasser ausgewaschen und mit Schwefelwasserstoff in der Kälte zersetzt. Zuletzt wird, um besser filtrieren zu können, rasch zum Sieden erhitzt und vom Schwefelblei getrennt. Das Filtrat wird mit Barytwasser neutralisiert; auf Zusatz des gleichen Volumens Alkohol fällt ein weißer Niederschlag, der thymosinsaures Barium ist. Es wird mit Wasser gewaschen und mit Alkohol getrocknet. Aus 50 g nucleinsaurem Natrium erhält man etwa 20 g thymosinsauren Baryt. Einmal ausgefällt und getrocknet geht der Körper rasch in eine in Wasser unlösliche Form über. Er verliert auch sehr bald sein Reduktionsvermögen gegen Fehlingsche Lösung, wahrscheinlich wohl, weil das Kohlenhydrat sehr empfindlich ist.

Eine andere sichere Darstellungsmethode ist von Steudel und Peiser<sup>6)</sup> angegeben. Sie beruht auf der Einwirkung von  $\text{Ca}(\text{HSO}_3)_2$  auf Nucleinsäure bei 120—130°.

Die thymosinsauren Salze sind, auch getrocknet, nicht lange haltbar; sie zersetzen sich leicht unter Gelbfärbung, die bei älteren Präparaten einer rotbraunen Farbe Platz macht. Anfangs lassen sich die unlöslich gewordenen Salze der Erdalkalien durch Zusatz von wenig Essigsäure wieder in Lösung bringen und durch Alkohol wieder ausfällen; später scheinen sich die Präparate gänzlich zu zersetzen. Die Vorgänge sind noch nicht genügend aufgeklärt. Thymosinsaure Salze.

<sup>1)</sup> Steudel u. Peiser: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 111, S. 297. 1921.

<sup>2)</sup> Neumann: Arch. f. Anat. u. Physiol. (Physiol. Abt.) 1899, Suppl.-Bd. S. 552.

<sup>3)</sup> Kossel u. Neumann: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 26, S. 2753. 1893. — Kossel: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 22, S. 74. 1896. — Steudel u. Brigl: desgl. Bd. 70 S. 398. 1911. — Feulgen: desgl. Bd. 101, S. 296. 1918.

<sup>4)</sup> Schmiedeberg: Arch. f. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 43, S. 71. 1899.

<sup>5)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 70, S. 398. 1911.

<sup>6)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 111, S. 297. 1921.

Eigenschaften der  
Thyminosäure.

Thyminosäure bzw. ihre Salze reduzieren nicht nur Fehlingsche Lösung, sondern auch ammoniakalische Silberlösung. Sie geben schöne Aldehydreaktion mit fuchsin-schweflicher Säure und färben unter der Einwirkung von Salzsäure-dämpfen einen mit ihnen getränkten Fichtenspan tiefgrün<sup>1)</sup>. Die letzteren Reaktionen beruhen auf der Bildung von Furfurol resp. Oxymethylfurfurol<sup>1)</sup>.

Weitere Spaltungs-  
produkte der Thy-  
monucleinsäure.

Außer der Thyminosäure sind von Levene und von Thannhauser eine Reihe Spaltungsprodukte<sup>2)</sup> beschrieben, die noch näherer Untersuchung bedürfen: Thyminhexosephosphorsäure, Thyminhexosediphosphorsäure, Cytosinhexosephosphorsäure, Cytosinhexosediphosphorsäure, Hexothymidindiphosphorsäure, Hexocytidindiphosphorsäure.

#### Isolierung der Purin- und Pyrimidinkörper aus der Thymonucleinsäure nach Steudel.

276. 1<sup>3)</sup>. 100 g Thymonucleinsäure werden mit 300 ccm konzentrierter Schwefelsäure und 600 ccm Wasser 14 Stunden am Rückflußkühler gekocht. Nach Entfernung von Schwefelsäure und Phosphorsäure mit Baryt wird die auf 5% Schwefelsäure gebrachte Flüssigkeit mit Phosphorwolframsäure ausgefällt und der Niederschlag mit 5proz. Schwefelsäure gut ausgewaschen.

a) Niederschlag. Er wird mit Baryt zersetzt, der abfiltrierte phosphorwolframsaure Baryt mehrmals ausgekocht, Filtrat und Waschwasser nach schwachem Ansäuern mit Schwefelsäure mit neutralem Silbernitrat ausgefällt (Kutscher<sup>4)</sup>), der Niederschlag abfiltriert.

α) Niederschlag. Er enthält die Nucleinbasen\*) und wird nach einem später bei Untersuchung der Organe zu besprechenden Verfahren untersucht (§ 741).

β) Filtrat. Es wird so lange mit Silbernitrat versetzt, bis sämtliche Basen in die Silberverbindungen übergeführt sind, d. h. bis eine Probe in gesättigtem Barytwasser sofort neben weißen Silberverbindungen braunes Silberoxyd ausfallen läßt. Nun fällt man mit Barytwasser aus und filtriert. Der Niederschlag wird mit Salzsäure zersetzt, das Filtrat bei niederer Temperatur zur Trockne gebracht. Man löst, entfärbt mit Tierkohle und fällt mit Natriumpikrat aus. Der abfiltrierte Niederschlag wird zur Entfernung der Pikrinsäure mit Benzol und Salzsäure geschüttelt, die wässrige Lösung eingeengt. Cytosin scheidet sich als Chlorid ab.

b) Filtrat. Man entfernt die Säuren mit Baryt, den überschüssigen Baryt mit Schwefelsäure (bis die Reaktion gegen Lackmus neutral wird) und dampft ein: Es scheidet sich ein Gemenge von Thymin und Uracil\*\*) aus. Aus der Mutterlauge läßt sich der Rest dieser beiden Substanzen als schwer lösliches Silbersalz mit Silbersulfat und Barytwasser gewinnen. Für die Trennung dieser Basen hat Johnson<sup>5)</sup> ein Verfahren angegeben, welches auf ihrer Umwandlung in Oxynitrohydrothymin und 5-Nitrouracil durch rauchende Salpetersäure und der leichten Löslichkeit des ersteren in absolutem Alkohol

\*) Man findet alle 4 Nucleinbasen. Xanthin- und Hypoxanthin sind aber als sekundär, erst während der Hydrolyse aus Guanin und Adenin entstanden, anzusehen.

\*\*) Uracil ist als sekundäres Produkt, während der Hydrolyse aus Cytosin entstanden, anzusehen.

<sup>1)</sup> Feulgen: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 100, S. 241. 1917; Bd. 104, S. 1. 1919; Bd. 101, S. 296. 1918. Steudel u. Peiser: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 132, S. 297. 1924.

<sup>2)</sup> Levene u. Mandel: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 41, 2, S. 1905. 1908. — Alsberg: Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 51, S. 240. 1904. — Thannhauser u. Ottenstein: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 114, S. 39. 1921.

<sup>3)</sup> Steudel: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 42, S. 165. 1904.

<sup>4)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 38, S. 124, Fußnote. 1903.

<sup>5)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 4, S. 407. 1908.

beruht. Handelt es sich nur um die Gewinnung von Thymin, so kann man auch das Filtrat, das man erhält, wenn man aus der Zersetzungsflüssigkeit die Schwefelsäure entfernt hat, bis zur Sirupkonsistenz einengen und mit Alkohol auskochen. Aus der alkoholischen Lösung pflegt nach dem Einengen fast reines Thymin auszukristallisieren (H. Steudel, bisher nicht veröffentlichte Beobachtung).

2<sup>1)</sup>. Die bei der unter 1 beschriebenen Spaltung auftretenden Xanthin, Hypoxanthin und Uracil entstehen während der langen Hydrolyse sekundär aus Guanin, Adenin und Cytosin.

Eine nahezu quantitative Gewinnung von Adenin und Guanin in Form ihrer Nitrats erzielt man, wenn man Nucleinsäure (oder nucleinsaures Kupfer) mit der doppelten Menge einer Salpetersäure von spez. Gew. 1,2 bei niedriger Temperatur zusammenbringt. Die Nucleinsäure fällt zunächst als zähe Masse zu Boden und es beginnt allmählich eine langsame Gasentwicklung, wobei die Nucleinsäure nach und nach in Lösung geht. Nach 24 Stunden ist sie fast vollständig verschwunden und statt dessen findet sich ein reichlicher krystallinischer Bodensatz (Adenin- und Guaninnitrat), zu dessen vollständiger Bildung man 2—3 Wochen stehen läßt. Er wird abgesaugt, kurz mit verdünnter Salpetersäure, dann mit Alkohol und Äther gewaschen und gewogen. Um aus dem Gemenge Adenin und Guanin zu isolieren, löst man es vorsichtig in heißem Wasser, übersättigt mit Ammoniak und filtriert nach 24stündigem Stehen ab. Der Niederschlag wird in Natronlauge gelöst und mit Essigsäure gefällt: Guanin. Das Filtrat wird zur Trockne verdunstet, um das Ammoniak zu vertreiben, der Rückstand in Wasser gelöst und die Lösung mit Natriumpikrat gefällt: Adeninpikrat.

277. **Hefenucleinsäure.** Zu den zusammengesetzten Nucleinsäuren gehört auch eine Nucleinsäure, die in der Hefe und in Weizenkeimlingen aufgefunden ist. Sie unterscheidet sich aber insofern wesentlich von der Thymonucleinsäure, als sie gegen Natronlauge sehr empfindlich ist und unter ihrer Einwirkung schon bei gewöhnlicher Temperatur in einzelne einfache Nucleinsäuren zerfällt<sup>2)</sup>.

Will man sie durch Extraktion mit Natronlauge aus der Hefe oder aus Weizenkeimlingen gewinnen, so müssen alle Operationen bei niedriger Temperatur, womöglich 0°, ausgeführt werden. Da dies im gewöhnlichen Laboratoriumsbetrieb sehr umständlich ist, so bezieht man das Präparat am besten aus einer guten chemischen Fabrik<sup>3)</sup>. Will man die Substanz selbst herstellen, so arbeitet man am besten nach der Methode von Altman<sup>4)</sup>:

1500 ccm frischen Hefebreis werden abzentrifugiert, der Rückstand mit 4500 ccm Wasser angerührt, auf 0° abgekühlt, 150 g NaOH in 375 ccm Wasser zugesetzt, nach 15 Minuten 200 ccm HCl (spez. Gew. 1,19) zugesetzt und mit Essigsäure angesäuert. Nach 24 Stunden wird die filtrierte Lösung mit Salzsäure bis zur beginnenden Niederschlagsbildung versetzt, hierauf noch 2,5<sup>0/100</sup> Salzsäure zugefügt und mit dem gleichen Volumen 2,5<sup>0/100</sup> alkoholischer Salzsäure ausgefällt. Zur Reinigung wird das Präparat in Wasser unter Zusatz von Natronlauge gelöst, vom Ungelösten (Calciumphosphat und Eisenphosphat) abzentrifugiert, mit Essigsäure angesäuert, wieder zentrifugiert und das Filtrat mit dem gleichen Volumen 3<sup>0/100</sup> alkoholischer Salzsäure gefällt.

<sup>1)</sup> Steudel: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 48, S. 425. 1906; Bd. 49, S. 406. 1906.

<sup>2)</sup> Steudel u. Peiser: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 108, S. 42. 1919; Bd. 114, S. 201. 1921; Bd. 120, S. 292. 1922; Bd. 127, S. 262. 1923.

<sup>3)</sup> Z. B. C. F. Boehringer & Söhne, Mannheim-Waldhof.

<sup>4)</sup> Arch. f. Anat. u. Physiol. (Physiol. Abt.) 1889, S. 524.

Darstellung nach Clarke und Schryver. Ein Verfahren, das die Extraktion mit Natronlauge vermeidet, ist von Clarke und Schryver<sup>1)</sup> angegeben:

1000 g Preßhefe, die zuerst in der Kälte, dann in der Siedehitze mit Alkohol ausgezogen sind, werden 4—5 Tage lang mit 10 l 10proz. Kochsalzlösung bei 60—80° unter häufigem Umrühren extrahiert. Dann werden zu dem Filtrate 90 ccm HCl (1 konzentrierte HCl vom spez. Gew. 1,19 : 1 Wasser) zugesetzt. Der von der Flüssigkeit getrennte Niederschlag kann durch Auflösen in warmer 10proz. Natriumacetatlösung und Wiederausfällen mit Salzsäure gereinigt werden. Er ist völlig biuretfrei und enthält getrocknet 7,8% P und 16,1% N.

Aus Weizenkeimlingen kann man die gleiche Substanz erhalten, nur muß vor dem Ausziehen mit Kochsalzlösung die Stärke durch Einwirkung von Diastase entfernt werden.

Zusammensetzung, Eigenschaften.

Die Zusammensetzung der Hefenucleinsäure wird verschieden angegeben, je nach der Art der Darstellung, die angewandt wurde. Es sind z. B. folgende Formeln aufgestellt:  $C_{36}H_{52}N_{14}P_4O_{19}$  (Boos<sup>2)</sup>,  $C_{38}H_{50}N_{15}P_4O_{29} + C_2H_4O_2$  (Levene<sup>3)</sup>,  $C_{38}H_{49}N_{15}P_4O_{29}$  (Levene und Jacobs<sup>4)</sup>,  $C_{29}H_{42}N_{13}P_3O_{23}$  (Kowalewski<sup>5)</sup>.

Die Hefenucleinsäure ist ziemlich leicht in Wasser löslich, aus ihren wässrigen Lösungen wird sie nicht durch Essigsäure, wohl aber durch vorsichtigen Zusatz von Salzsäure gefällt. Im Überschuß von Salzsäure löst sie sich zu einer milchigen Flüssigkeit auf. In Alkalien ist sie leicht löslich, wird aber durch Alkaliwirkung leicht in einfache Nucleinsäuren aufgespalten. Durch einen großen Überschuß von Eisessig kann man sie aus ihrer wässrigen Lösung ausfällen. Diese Fällung ist von Levene als Reinigungsmethode empfohlen<sup>6)</sup>.

Die Hefenucleinsäure ist rechtsdrehend, die Größe der Ablenkung hängt von der Alkaleszenz der Lösung ab. Sie reduziert nicht Fehlingsche Lösung, wohl aber nach vorherigem Erwärmen mit 5proz. Schwefelsäure.

Abbau durch Natronlauge u. Darstellung von Guanylsäure, Adenylsäure, Cytosylsäure u. Uracylsäure.

Durch Einwirkung von schwacher Natronlauge bei Zimmertemperatur zerfällt sie in eine Reihe von einfachen Nucleinsäuren<sup>7)</sup>, und zwar Guanylsäure, Adenylsäure, Cytosylsäure (Cytidinphosphorsäure) und Uracylsäure (Uridinphosphorsäure), welche in folgender Weise isoliert werden können:

Man scheidet zunächst nach § 378 die Guanylsäure als Natriumsalz ab. Wird das Filtrat vom Niederschlag des guanylsauren Salzes mit Bleiessig ausgefällt, der Niederschlag gründlich mit Wasser ausgewaschen und mit Schwefelwasserstoff zersetzt, so liefert das Filtrat beim Einengen im Vakuum bei niedriger Temperatur des Wasserbades eine reichliche Krystallisation der Adenylsäure. Aus der Mutterlauge der Adenylsäure lassen sich bei weiterem Einengen, Fällen mit Alkohol und Umkrystallisieren Cytosylsäure und Uracylsäure gewinnen.

Diese Methode der Darstellung der Säuren ist wesentlich einfacher wie die ursprünglich von Levene, Jones und Thannhauser angegebenen Verfahren, bei denen die Säuren über die Brucinsalze dargestellt werden

<sup>1)</sup> Biochem. Journ. Bd. 11, S. 319. 1918.

<sup>2)</sup> Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 55, S. 16. 1906.

<sup>3)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 17, S. 120. 1909.

<sup>4)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 43, 1, S. 150. 1910.

<sup>5)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 69, S. 248. 1910.

<sup>6)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 17, S. 120. 1909. Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 42, 2, S. 2474 und 2703. 1909.

<sup>7)</sup> Steudel u. Peiser: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 114, S. 201. 1921; Bd. 120, S. 292. 1922; Bd. 127, S. 262. 1923.



mußten. Auf die Einzelheiten dieser Methoden<sup>1)</sup> kann hier nicht eingegangen werden.

278. Adenylsäure<sup>2)</sup> (Adenosinphosphorsäure)  $C_{10}H_{14}O_7N_5P + H_2O$  Adenylsäure. krystallisiert aus Wasser mit 1 Mol. Krystallwasser, das sie unter den gleichen Bedingungen wie die Guanylsäure (§ 273) verliert. Fp. der lufttrockenen Substanz  $195^\circ$  unter Aufschäumen im geschlossenen Röhrchen. Die Adenylsäure ist die schwerstlösliche der einfachen Nucleinsäuren. In 1proz. wässriger Lösung  $[\alpha]_D^{50} = -40,5^\circ$ . Die Drehung ist sehr von Konzentration und Reaktion abhängig.

279. Cytosylsäure<sup>2)</sup> (Cytidinphosphorsäure)  $C_9H_{14}O_8N_3P$ , längliche Cytosylsäure. Platten ohne Krystallwasser aus Wasser. Fp. im geschlossenen Röhrchen unter Aufschäumen  $230-233^\circ$  (korr.). In 1proz. wässriger Lösung  $[\alpha]_D^{50} = +48,5^\circ$ , abhängig von Konzentration und Reaktion.

280. Uracylsäure<sup>2)</sup> (Uridinphosphorsäure)  $C_9H_{13}O_9N_2P$ ; aus Methyl- Uracylsäure. alkohol krystallisieren beim langsamem Verdunsten des Lösungsmittels Prismen mit spitzen Enden. Fp. im geschlossenen Rohr  $198,5^\circ$  (korr.). In 1proz. wässriger Lösung  $[\alpha]_D^{20} = +9,5^\circ$ , abhängig von Reaktion und Konzentration. Monoammoniumsalz der Uracylsäure prismatische Nadeln ohne Krystallwasser. Wird bei  $200^\circ$  halb durchsichtig und zersetzt sich im geschlossenen Röhrchen bei  $242^\circ$  (korr.).

Durch neutrale Hydrolyse unter Druck werden aus der Hefenucleinsäure Abbau durch neutrale Hydrolyse. Körper gewonnen, die Purin- bzw. Pyrimidinriboside sind, und zu den einfachen Nucleinsäuren in der Beziehung stehen wie das Inosin zur Inosinsäure. Sie werden auch aus den einfachen Nucleinsäuren durch neutrale Hydrolyse erhalten, indem dabei die Phosphorsäure abgespalten wird.

Die Darstellung dieser Körper (Hydrolyse der Hefenucleinsäure in neutraler Lösung (durch Ammoniakzusatz) mit Wasser im Autoklaven bei  $130-135^\circ$   $3\frac{1}{2}$  Stunden lang) ist von Levene und Jacobs beschrieben worden<sup>3)</sup>.

Vernin (Guanosin) s. bei Guanylsäure (§ 273).

Vernin (Guanosin).

Adenosin<sup>4)</sup>  $C_{10}H_{13}O_4N_5 + 1\frac{1}{2} H_2O$ . Tyrosinartige Nadeln, in Wasser Adenosin. ziemlich leicht, in Alkohol kaum löslich. Fp.  $229^\circ$  (korr.); verliert beim Trocknen im Vakuum bei  $110^\circ$  das Krystallwasser.  $[\alpha]_D = -63,3^\circ$ , in 1 Mol. Natronlauge gelöst  $[\alpha]_D = -67,3^\circ$ .

Durch Einwirkung von Natriumnitrit in essigsaurer Lösung entsteht Inosin.

Adenosinpikrat  $C_{10}H_{13}O_4N_5 \cdot C_6H_2(NO_2)_3OH$ . Glänzende Plättchen, Fp.  $180$  bis  $185^\circ$  (korr.).

Cytidin<sup>5)</sup>  $C_9H_{13}O_5N_3$ . Die freie Substanz krystallisiert nicht, wohl aber das Cytidin. Sulfat, Chlorhydrat, Pikrat, Tribenzoylderivat. Die freie Substanz ist rechtsdrehend  $[\alpha]_D^{20} = +19,14^\circ$ .

Cytidinsulfat  $(C_9H_{13}O_5N_3)_2H_2SO_4$ , lange prismatische Nadeln. Fp.  $233^\circ$ . Eine 10proz. Lösung in 1proz.  $H_2SO_4$  zeigt  $[\alpha]_D^{30} = +29,7^\circ$ .

1) Jones u. Read: Journ. of biol. chem. Bd. 29, S. 111, 123. 1917; Bd. 31, S. 39. 1920. — Jones u. Kennedy: Journ. of pharmacol. a. exp. therapeut. Bd. 13, S. 45. 1918. — Jones: Americ. journ. of physiol. Bd. 52, S. 193. 1919. — Jones u. Abt: Americ. journ. of physiol. Bd. 50, S. 574. 1920. — Levene: Journ. of biol. chem. Bd. 33, S. 425. 1919; Bd. 39, S. 77. 1919; Bd. 40, S. 171, 395. 1920; Bd. 41, S. 1, 19, 483. 1920. — Thannhauser u. Dorfmueller: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 100, S. 121. 1917; Bd. 104, S. 65. 1918; Bd. 107, S. 157. 1919; Bd. 109, S. 177. 1920; Bd. 112, S. 187. 1921.

2) Levene: Journ. of biol. chem. Bd. 41, S. 483. 1920.

3) Levene u. Jacobs: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 42, 2, S. 2474. 1909; Bd. 42, 2, S. 2703. 1909; Bd. 43, 3, S. 3154. 1910; Bd. 44, 1, S. 1027. 1910.

4) Levene u. Jacobs: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 42, 2, S. 2703. 1909.

5) Levene u. Jacobs: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 44, 1 S. 1031. 1911.

Cytidinchlorhydrat  $C_9H_{13}O_5N_3 \cdot HCl$ . Fp. 218°.

Cytidinpikrat  $C_9H_{13}O_5N_3 \cdot C_6H_2(NO_2)_3OH$ . Fp. 185—187°.

Alle 3 Salze sind ziemlich leicht in Wasser löslich.

Uridin. Uridin<sup>1)</sup>  $C_9H_{12}O_6N_2$ . Entsteht aus Cytidin durch Einwirkung von Eisessig und Kaliumnitrit, ferner bei der Hydrolyse der Hefenucleinsäure mit Ammoniak. Lange prismatische Nadeln. Fp. 165°. Eine 9proz. wässrige Lösung zeigt  $[\alpha]_D^{30} = +5,15^\circ$ .

Vollständige Hydrolyse. Bei der totalen Hydrolyse der Hefenucleinsäure mit Schwefelsäure<sup>1)</sup> erhält man 19,72% Humin-N, 13,08% Ammoniak-N, 3,14% Guanin-N, 7,18% Adenin-N, 0,34% Xanthin-N, 0,49% Hypoxanthin-N, 5,84% Cytosin-N und 8,29% Uracil-N.

Spaltung mit Salpetersäure. Bei der Spaltung mit Salpetersäure in der Kälte<sup>2)</sup> nach Steudel wurde gefunden 14,74% Guanin, 8,14% Adenin. — Bei der Furfurolbestimmung wurden 22,78% Phloroglucid erhalten, entsprechend 23,44% Pentose.

Andere Derivate. Ob die von einigen Autoren beschriebenen Derivate, Triphosphonucleinsäure<sup>3)</sup>, Desaminotriphosphonucleinsäure<sup>4)</sup>, Adeninuracildinucleotid<sup>5)</sup>, Uracilcytosindinucleotid<sup>5)</sup>, chemische Individuen oder Gemenge sind, darüber herrscht noch Meinungsverschiedenheit.

280a). Im Anschluß an die im vorhergehenden erwähnten Nucleoside sollen noch folgende Verbindungen erwähnt werden:

Adeninhexosid. Adeninhexosid  $C_{11}H_{16}N_5O_5$ , aus einem Hefepräparat von Mandel und Dunham<sup>6)</sup> gewonnen. Fp. 206°.  $[\alpha]_D =$  etwa  $+12,15^\circ$ . Bei der Hydrolyse entsteht Adenin und eine Hexose, deren Osazon 15,5% N enthält und bei 156° schmilzt. Beim Kochen mit starker Salzsäure entsteht Lävulinsäure.

Guaninhexosid. Guaninhexosid siehe Levene u. Jacobs: Journ. of biol. chem. Bd. 12, S. 377. 1912.

Harnsäureribosid. Harnsäureribosid. Es findet sich in dem Blut (roten Blutkörperchen) des Rindes, in geringerer Menge auch im Menschenblut und in noch kleinerer im Blut der anderen untersuchten Tiere, Pferd, Schaf, Schwein, Hund, Huhn (Davis, Newton und Benedict<sup>7)</sup>). Es besteht aus 1 Mol. Harnsäure und 1 Mol. d-Ribose, die unter Austritt von 1 Mol. Wasser zusammengetreten sind. Auf Grund der Ergebnisse der Spaltung ist daran trotz der unbefriedigenden Analysenresultate wohl nicht zu zweifeln.

Darstellung. Zur Darstellung wird frisch defibriertes Rinderblut langsam in 5 Volumina kochende  $\frac{1}{100}$ -Essigsäure gegossen, nach etwa 1 Minute langem Kochen filtriert, das Filtrat auf das ursprüngliche Blutvolumen eingekocht, abgekühlt, mit  $\frac{1}{10}$  Vol. Mercks 5proz. Lösung von dialysiertem Eisen versetzt und filtriert. Man fügt zu dem Filtrat das gleiche Volumen 0,5proz. Mercuriacetatlösung, filtriert den Niederschlag, welcher langsam entsteht und außer aller freier Harnsäure auch eine kleine Menge der gebundenen enthält, nach 12—24 Stunden ab und versetzt das völlig klare Filtrat mit dem gleichen Volumen 20proz. Natriumacetatlösung. Nach 48stündigem Stehen dekantiert man, zentrifugiert den Bodensatz, gießt die überstehende Flüssigkeit ab, wäscht den Rückstand durch Verteilen in Wasser und Zentrifugieren, und wiederholt das so oft, bis der Niederschlag sich nach 20 Minuten langem Zentrifugieren nicht mehr vollständig absetzt.

<sup>1)</sup> Levene u. Jacobs: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 44, 1, S. 1031. 1911.

<sup>2)</sup> Kowalewsky: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 69, S. 240. 1910.

<sup>3)</sup> Thannhauser u. Dorfmueller: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 100, S. 121. 1917.

<sup>4)</sup> Thannhauser u. Sachs: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 112, S. 187. 1921.

<sup>5)</sup> Jones u. Read: Journ. of biol. chem. Bd. 29, S. 111. 1916.

<sup>6)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 11, S. 85. 1912.

<sup>7)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 54, S. 595. 1922. — Newton u. Davis: desgl. Bd. 54, S. 601, 603. 1922.

Er wird nun in heißem Wasser suspendiert und mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Man filtriert ab, wäscht mit wenig heißem Wasser, dampft unter vermindertem Druck bei 40—45° bis zur Krystallisation ein, filtriert am nächsten Tage ab und wäscht mit Alkohol und Äther. Aus 15 l Blut wurden etwa 0,6 g erhalten.

Farblose viereckige Platten. Aus nicht ganz reinen und nicht zu verdünnten Lösungen kann die Abscheidung auch als Gallerte erfolgen, welche allmählich krystallinisch wird. Die Substanz reagiert sauer, ist sehr schwer löslich in kaltem Wasser, unlöslich in Alkohol und Äther, leicht in Alkalien. Sie wird nicht gefällt durch Silbermagnesiummischung und reduziert nicht Fehlingsche Lösung. Das Natronsalz zeigt  $[\alpha]_D^{20} = +20,42^\circ$ . Bei der Spaltung entsteht Harnsäure und d-Ribose. Eigenschaften.

### Gekoppelte Nucleinsäuren.

281. Möglicherweise kommen die bisher beschriebenen Nucleinsäuren auch in größeren Molekularverbänden vor, als sie den auf die einfachste Formel berechneten Molekülen zukommen. So sind Unterschiede zwischen dem natürlichen und dem künstlichen nucleinsäuren Clupein beobachtet im Drehungsvermögen und in der Viscosität<sup>1)</sup>, die sich vielleicht so erklären lassen. Auch das Auftreten der Thymonucleinsäure in zwei verschiedenen Modifikationen, der a- und b-Form, von der die a-Form als Salz gelatiniert, die b-Form nicht, hat möglicherweise seinen Grund darin, daß die a-Form ein Polymeres der b-Form ist. Aber nicht allein die einzelnen Nucleinsäuren unter sich können sich verbinden, sondern es sind auch lockere Bindungen zwischen Nucleinsäuren verschiedener Art beobachtet worden — gekoppelte Nucleinsäuren<sup>2)</sup>.

Am besten untersucht ist eine gekoppelte Nucleinsäure, die aus der Pankreasdrüse gewonnen werden kann: Guanylnucleinsäure<sup>3)</sup>.

Zu einer Auflösung von Pankreasnucleoprotein nach Hammarsten (§ 439) fügt man 0,5 proz. Pankreatin Merck und hält die Flüssigkeit mehrere Tage bei 40° im Brutschrank unter Toluolzusatz. Dann wird zentrifugiert und die klare Lösung mit Alkohol gefällt. Der Niederschlag wird abzentrifugiert, bei 0° in Wasser gelöst unter vorsichtigem Zusatz von Natronlauge und bei alkalischer Reaktion wieder mit Alkohol gefällt. Dann wird der Niederschlag mit Alkohol getrocknet. Guanylnucleinsäure.  
Darstellung nach Feulgen<sup>3)</sup>.

Man bereitet sich eine Auflösung des nach E. Hammarsten gewonnenen „Nucleoproteids aus Trockenpankreas“ (s. § 439); eine 2 proz. Lösung in sehr verdünnter Natronlauge gibt nach Zusatz von CaCl<sub>2</sub> bis 0,5% eine maximale Fällung von guanylnucleinsäurem Calcium. Hierbei ist es gleichgültig, ob die Nucleinlösung schwach sauer oder schwach alkalisch reagiert. Der Niederschlag wird mit Alkohol ausgewaschen, er kann auf verschiedene Weise gereinigt und aus ihm die freie Säure und ein Calcium-Natriumsalz hergestellt werden. Darstellung nach E. Hammarsten<sup>4)</sup>

Die Präparate unterscheiden sich voneinander je nach der Methode, nach der sie gewonnen sind. Sie bestehen aus einer zusammengesetzten Nucleinsäure (wahrscheinlich Thymonucleinsäure), die locker 1 oder 2 Mol. Guanylsäure gebunden hält. Die reine Guanylnucleinsäure ist durch Mineralsäuren fällbar, nicht durch Essigsäure. Das neutrale Natriumsalz der Guanylnucleinsäure dreht stark rechts  $[\alpha]_D^{20} = +$  etwa 50°. Zusatz von Natronlauge bewirkt Linksdrehung, die nach Neutralisation wieder in Rechtsdrehung übergeht. Eigenschaften.

Durch Spaltung beim Erwärmen mit Natronlauge erhält man Guanylsäure (§ 273) und Thymonucleinsäure (§ 274).

<sup>1)</sup> Steudel: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 83, S. 76. 1913.

<sup>2)</sup> E. Hammarsten: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 109, S. 141. 1920.

<sup>3)</sup> Feulgen: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 108, S. 147. 1920.

<sup>4)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 109, S. 141. 1920. — E. Hammarsten u. Jorpes: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 118, S. 224. 1921.

Ähnliche Verhältnisse wie in der Pankreasdrüse liegen wahrscheinlich auch in den anderen Organen vor, in denen bisher Guanylsäure und Thymonucleinsäure nebeneinander gefunden sind, z. B. in der Milz (H. Steudel<sup>1</sup>).

Der Rückstand der Pankreasdrüsen, aus denen das Nucleoproteid extrahiert ist, enthält noch eine Nucleinsäure, in der das Verhältnis von Guanin zu Adenin gleich 1 : 1 ist<sup>2</sup>) wie in der Thymonucleinsäure.

#### Cerebroside.

Mit diesem Namen bezeichnet man seit Thudichum<sup>3</sup>) Substanzen von neutralem Charakter, welche bei der Hydrolyse in d-Galaktose, Sphingosin und eine höhere Fettsäure zerfallen. Die bis jetzt bekannten Cerebroside, Phrenosin (Cerebron) und Kerasin, wurden beide von Thudichum aus dem Gehirn, in dem sie, wahrscheinlich ausschließlich, in der weißen Substanz vorkommen, dargestellt, allerdings noch in unreinem Zustande. Ein reines, krystallisiertes Cerebrosid, das sie Cerebron nannten, erhielten Wörner und Thierfelder<sup>4</sup>). Nachdem sich herausgestellt, daß in dem Phrenosin ein noch unreines Cerebron vorliegt, hat man unter dem Namen Phrenosin und Cerebron denselben Körper\*) zu verstehen. Das Kerasin wurde in reinem Zustande zuerst von Rosenheim<sup>5</sup>) dargestellt.

Vorkommen. Cerebroside sind auch nachgewiesen im Eiter (Hoppe-Seyler<sup>6</sup>), Kossel und Freytag<sup>7</sup>), in der Nebenniere (Rosenheim und Tebb<sup>8</sup>), der Niere, der Leber und dem Eigelb (Levene und West<sup>9</sup>), und scheinen auch in Blutkörperchen (Pascucci<sup>10</sup>), Bang und Forssman<sup>11</sup>), Milz (Hoppe-Seyler<sup>12</sup>), Lunge (Sammartino<sup>13</sup>), Fischsperma (Sano<sup>14</sup>), Stierhoden (Kossel und Freytag), Reis (Trier<sup>15</sup>), Pilzen (Bamberger und Landsiedl<sup>16</sup>), Zellner<sup>17</sup>) und Eichenholz (Sullivan<sup>18</sup>) vorzukommen.

#### Cerebron (Phrenosin) $C_{48}H_{93}NO_9$ .

282. Es besteht aus je einem Molekül Cerebronsäure, Galaktose und Sphingosin, die unter Austritt von 2 Mol. Wasser zusammengetreten sind. Die Konstitutionsformel steht noch nicht ganz fest. Siehe dazu Thierfelder<sup>19</sup>) und Rosenheim<sup>20</sup>).

Darstellung von Cerebron aus Gehirn. 1. Darstellung von Cerebron aus Gehirn nach Thierfelder<sup>21</sup>). Von Blut und Häuten befreites und durch mindestens viermaliges Hindurchschicken

\*) Damit wird natürlich die Bezeichnung „Phrenosin“, die ich für ein von dem Cerebron schwer abtrennbares amorphes Cerebrosid vorgeschlagen habe, hinfällig (Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 91, S. 107. 1914.)

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 114, S. 255. 1921.

<sup>2</sup>) Steudel u. Nakagawa: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 126, S. 250. 1923.

<sup>3</sup>) Die chem. Konstitution des Gehirns usw. Tübingen: Franz Pietzcker 1901.

<sup>4</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 30, S. 542. 1900.

<sup>5</sup>) Biochem. Journ. Bd. 7, S. 604. 1913; Bd. 8, S. 110. 1914; Bd. 10, S. 142. 1916.

<sup>6</sup>) Med.-chem. Untersuchungen Bd. 4, S. 486. Berlin: Hirschwald 1871.

<sup>7</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 17, S. 452. 1893.

<sup>8</sup>) Journ. of physiol. Bd. 38, Proc. LIV. 1909. <sup>9</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 31, S. 649. 1917.

<sup>10</sup>) Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 6, S. 543. 1905. <sup>11</sup>) desgl. Bd. 8, S. 238. 1906.

<sup>12</sup>) a. a. O. S. 495. <sup>13</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 124, S. 234. 1921.

<sup>14</sup>) Journ. of biochem. Bd. 1, S. 1; ref. Chem. Zentralbl. 1922, III, S. 561.

<sup>15</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 86, S. 413. 1913.

<sup>16</sup>) Monatshefte f. Chem. Bd. 26, S. 1109. 1905. <sup>17</sup>) desgl. Bd. 32, S. 133. 1911.

<sup>18</sup>) Chem. Zentralbl. 1918, I, S. 632.

<sup>19</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 89, S. 248. 1914.

<sup>20</sup>) Biochem. Journ. Bd. 10, S. 142. 1916.

<sup>21</sup>) Kitagawa u. Thierfelder: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 49, S. 286. 1906. — Loening u. Thierfelder: desgl. Bd. 68, S. 464. 1910.

durch die feinste Siebplatte der Fleischhackmaschine zerkleinertes Gehirn (Menschengehirn) wird in Portionen von je 2,5 kg (2 menschlichen Gehirnen entsprechend) in großer weithalsiger Flasche mit etwa 3 l Aceton übergossen und unter häufigem Schütteln bei Zimmertemperatur 24 Stunden stehen gelassen. Die auf großer Nutsche abgesaugte und einmal mit Aceton gewaschene Masse wird in die Flasche zurückgebracht und nochmals der gleichen Behandlung unterworfen. Den möglichst trockengesaugten Rückstand übergießt man mit etwa 1500 ccm Äther, läßt unter häufigem Umschütteln 24 Stunden stehen, filtriert ab und setzt die Extraktion mit Äther fort, bis dieser sich nicht mehr färbt und beim Verdunsten nur noch wenig hinterläßt. Eine 4—5 malige Extraktion ist erforderlich. Das beim Abkühlen der ätherischen Filtrate auf 0° sich Abscheidende wird durch Dekantieren und Zentrifugieren abgetrennt. Die mit Äther erschöpfte Gehirnmasse, etwa 350 g (13—14% des frischen Gehirns), wird fein zerrieben, durch eine feine Seidensiebplatte geschickt, mit der 5fachen Menge 85 proz. Alkohols 5 Minuten ausgekocht und heiß auf einer großen Nutsche (doppeltes, gut abschließendes Filter) abgesaugt. Der beim Abkühlen entstehende Niederschlag wird abgesaugt, das Filtrat wieder zur Extraktion verwendet. Eine 4 malige Extraktion unter Benutzung der gleichen Alkoholmenge genügt in der Regel. Die abgesaugten Abscheidungen werden mit Äther geschüttelt, durch Zentrifugieren wieder abgetrennt und mit den oben erwähnten Zentrifugaten vereinigt. Die so erhaltene schneeweiße Masse (das sog. Protagon), deren Menge 80—100 g (3—4% des frischen Gehirns) beträgt, löst man nach Verdunsten des anhaftenden Äthers in 75% Chloroform enthaltendem Methylalkohol, und zwar 100 g in etwa 500 ccm. Die Lösung erfolgt schon bei gelindem Erwärmen sehr leicht und vollständig. Die Flüssigkeit wird von Papierfasern und anderen Verunreinigungen durch Filtration befreit und in einem verschlossenen Kolben bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Bis zum nächsten Tag hat sich an der Oberfläche eine harte, dicke Kruste abgeschieden. Man filtriert, kühlt das Filtrat ab und krystallisiert die dabei ausfallende und abfiltrierte Masse noch einige Male aus 75% Chloroform enthaltendem Methylalkohol um, bis die Abscheidung wieder in Form einer harten, weißen Kruste an der Oberfläche der klaren Flüssigkeit erfolgt. Die Mutterlaugen werden im Vakuum bis zur Trockne verdunstet und die Rückstände aus demselben Lösungsmittel umkrystallisiert. Dabei lassen sich noch weitere Mengen der gleichen charakteristischen Abscheidungen erhalten. Die Massen werden vereinigt und in der etwa 25—30fachen Menge 20% Chloroform enthaltendem Methylalkohol heiß gelöst. Der beim Erkalten sich bildende Niederschlag enthält noch kleine Mengen phosphorhaltiger Substanz, zu deren Entfernung man ein Zinkreagens (eine Auflösung von Zinkhydroxyd in Methylalkohol, die durch Einleiten von Ammoniak in das in Methylalkohol suspendierte Zinkhydroxyd und Zufügen von Ammoniumacetat bewirkt wird) benutzt. Man fügt zu einer heißen Lösung in 10% Chloroform enthaltendem Methylalkohol eine heiße Lösung dieses Reagens, kocht, bis die zunächst entstandene Trübung sich zu einer flockigen Masse zusammengeballt hat, und filtriert. Der Filterrückstand ist sehr phosphorreich. Der aus dem klaren Filtrat beim Erkalten sich abscheidende Niederschlag wird abfiltriert und wieder in 10% Chloroform enthaltendem Methylalkohol gelöst. Dabei bleibt noch eine geringe Menge einer zink- und phosphorhaltigen Substanz ungelöst zurück. Aus dem erkaltenden Filtrat fällt das Cerebron amorph, gelegentlich aber auch der Hauptsache nach in Form glitzernder Krystallblättchen aus. Bei der mikroskopischen Betrachtung sieht man aber auch in diesem Falle noch amorphe Beimengungen, und wenn die Abscheidung amorph geschehen ist, so erfolgt bei der Krystallisationsprobe (S. 395) keine völlige Umwandlung in Krystalle. Um diese

Beimengungen zu entfernen, löst man in großer Menge 20% chloroformhaltigen Methylalkohols in der Hitze und trennt die beim Abkühlen innerhalb gewisser Temperaturgrenzen erfolgenden Abscheidungen mittels Filtrieren durch Warmwassertrichter voneinander. Jede dieser so erhaltenen Fraktionen prüft man in kleinen Proben in der S. 395 beschriebenen Weise auf Krystallisierbarkeit (ob völlige Umwandlung erfolgt oder reichliche oder spärliche, oder ob sie ganz ausbleibt) und vereinigt die sich gleich oder ähnlich verhaltenden. Die zuerst ausgeschiedenen Anteile zeigen die reichlichste Krystallisation, die zuletzt ausgefallenen bleiben bei dieser Prüfung amorph. Eine weitere Trennung innerhalb der so gewonnenen einzelnen Fraktionen läßt sich durch wiederholte Extraktion mit 10% Chloroform enthaltendem Methylalkohol und weiterhin mit Methylalkohol bei 50° erzielen. Die beim Erkalten der Extraktionsflüssigkeiten erfolgenden Abscheidungen werden abfiltriert und ebenso wie die extrahierten Massen der erwähnten Prüfung unterworfen und mit den ein gleiches Verhalten zeigenden zusammengetan. Die extrahierten Substanzen werden mit der Zahl der Extraktionen immer ärmer an dem nicht krystallisierenden Körper, die ersten Extraktionsflüssigkeiten sind relativ am reichsten an ihm. So gelingt es schließlich, reines Cerebron, welches bei der Probe völlig krystallisiert, zu erhalten.

Darstellung von  
Cerebron und  
Kerasin aus  
Gehirn.

2. Darstellung von Cerebron (Phrenosin) und Kerasin nach Rosenheim<sup>1</sup>). a) Darstellung des Rohcerebrosidgemenges. 10 kg fein zerkleinertes Ochsenhirn werden in 10 l Aceton verteilt und unter häufigem Umschütteln 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach Abgießen des überstehenden wässerigen Acetons und Kolieren des Gehirnbreies durch mehrere Lagen feinen Musselins wird die Behandlung mit Aceton mehrmals wiederholt\*), um das Wasser zu entfernen. Nach Verdunsten des anhaftenden Acetons mittels eines Luftstromes, den man über die auf leicht erwärmten Glasplatten in dünner Schicht liegende Masse leitet, extrahiert man solange mit Petroläther, als dieser noch nennenswerte Mengen Substanz löst, und entfernt den anhaftenden Petroläther in derselben Weise wie vorher das Aceton. Das Material wird nun auf einer Mühle zu einem feinen Pulver gemahlen. Seine Menge beträgt etwa 1300 g. Zu der weiteren Verarbeitung verwendet man zweckmäßig je 500 g. Diese werden mit 1500 ccm Pyridin (Kp. 115°) versetzt und ungefähr 20 Minuten in einem Wasserbad von 50° auf 45° erwärmt. Nun kühlt man schnell auf Zimmertemperatur ab und saugt auf großer Nutsche ab. Beim Eingießen des Filtrates (evtl. nach Einengen durch Destillation im Vakuum) in die 3—4fache Menge Aceton entsteht eine Fällung, welche nach Abkühlen auf 0°, Absitzen und Abgießen der überstehenden Flüssigkeit durch glattes Filter ohne Druck filtriert wird. Nach gründlichem Auswaschen mit Aceton suspendiert man den Filtrerrückstand in Aceton, saugt ihn ab, trocknet im Vakuum und extrahiert ihn im Soxhletapparat mit Äther. Das so erhaltene Rohcerebrosidgemenge stellt ein leicht gelbliches Pulver dar, enthält noch etwa 0,5% P und wiegt etwa 79 g. Die Ausbeute beträgt also 2% des frischen Gehirns.

b) Abtrennung phosphorhaltiger Bestandteile aus dem Rohcerebrosidgemenge. Durch 2maliges Umkrystallisieren aus 15 Vol. 67% Chloro-

\*) Rosenheim setzt die Behandlung mit Aceton fort, bis es beim Verdunsten nur noch Spuren von Cholesterin hinterläßt. Da dazu wenigstens sechs, nach meinen Erfahrungen noch mehr Extraktionen nötig sind, so empfiehlt sich dieses Verfahren nicht, wenn lediglich Cerebroside dargestellt werden sollen, wohl aber dann, wenn man auch eine gleichzeitige Gewinnung von Cholesterin, welches in das Aceton geht, und von ungesättigten Phosphatiden, welche bei der nachfolgenden Extraktion mit Petroläther abgetrennt werden, beabsichtigt.

<sup>1</sup>) Biochem. Journ. Bd. 7, S. 604. 1913 u. Bd. 8, S. 110. 1914.

form enthaltendem Alkohol erhält man eine weiße Substanz mit 1,68% N und 0,08% P, welche im wesentlichen aus Cerebrosiden besteht.

c) Trennung von Cerebron (Phrenosin) und Kerasin. Je 50 g dieser feinpulverisierten Substanz werden mit 3500 ccm 10% Wasser enthaltendem Aceton in einem auf 56° erwärmten Wasserbad behandelt, die Lösung wird von dem Ungelösten (etwa 15%) abfiltriert und bei 37° stehen gelassen. Nach 16—20 Stunden trennt man die klare Flüssigkeit von dem entstandenen Niederschlag, der zum Teil an den Wandungen haftet, durch ein auf 37° erwärmtes Filter (Phrenosinfraktion). Das Filtrat setzt beim Stehen im Eischrank (24 Stunden oder länger) einen gelatinösen Niederschlag ab, dessen Abscheidung bei 28° beginnt. Er wird abgesaugt, mit Aceton gewaschen und im Vakuum getrocknet (Kerasinfraktion). Sie beträgt etwa 50% der Phrenosinfraktion, die Menge des in ihr enthaltenen Kerasins ist aber viel kleiner.

α) Cerebron (Phrenosin) Fraktion. 32,5 g dieser Fraktion werden fein pulverisiert, in 120 ccm Chloroform bei etwa 60° gelöst und mit 180 ccm auf 60° erwärmtem Eisessig versetzt. Während Stehens über Nacht bei 37° scheidet sich ein Niederschlag ab, welcher abfiltriert und bei 37° mit Eisessig-Chloroformmischung (3 : 2) gewaschen wird. Der feuchte Niederschlag wird nochmals derselben Behandlung unter Benutzung von 200 ccm desselben Lösungsmittels unterworfen und die dabei gewonnene Abscheidung noch einmal ebenso behandelt. Die erhaltene Menge wiegt nach Trocknen im Vakuum 20,1 g. Aus den beiden ersten Mutterlaugen scheidet sich beim Abkühlen auf Zimmertemperatur noch eine beträchtliche Menge (6,64 g) eines gelatinösen Niederschlages ab, welcher mit der Kerasinfraktion vereinigt wird. Die dritte Mutterlauge bleibt beim Abkühlen auf Zimmertemperatur klar. Das Präparat ist jetzt praktisch phosphorfrei, enthält aber noch kleine Mengen von Kerasin, wie die Gipsplattenprobe (Probe c, S. 395) zeigt. Es wird deshalb in 40 Vol. Chloroform gelöst, die Lösung mit 60 Vol. warmem Aceton versetzt und die bei 37° abfiltrierte Fällung noch 2 mal in derselben Weise umgefällt. Nachdem jetzt die Gipsplattenprobe ergeben hat, daß das Präparat frei von Kerasin ist, wird es nochmals aus 50% Pyridin enthaltendem Aceton und aus 10% Wasser enthaltendem Aceton umkrystallisiert.

β) Kerasinfraktion. Je 10 g der Kerasinfraktion werden in 40 ccm Chloroform bei 50° gelöst und mit 60 ccm auf etwa 60° erwärmtem Eisessig versetzt. Die Lösung bleibt klar, bis die Temperatur auf 40° gesunken ist. Beim Stehen bei 37° scheidet sich an der Oberfläche ein Niederschlag (hauptsächlich Phrenosin) ab, welcher bei dieser Temperatur abfiltriert wird. Das Filtrat beginnt bei 26° eine Abscheidung zu bilden und erstarrt schließlich zu einer gelatinösen Masse. Nach Filtrieren und Waschen mit der Eisessig-Chloroformmischung (3 : 2) wird sie in Aceton verteilt und abgesaugt. Nach dem Trocknen wiegt sie 5 g. Bei Wiederholung des Prozesses unter Benutzung von 50 ccm Eisessig-Chloroformmischung scheiden sich bei 37° nur 0,5 g ab, auch bei der zweiten Wiederholung kommt es noch zu einer Abscheidung, bei der dritten bleibt die Flüssigkeit auch in vielen Stunden klar. Da die Gipsplattenprobe (S. 395) ergibt, daß, wenn auch erst nach einigen Stunden, noch ganz vereinzelte Sphärolithe von Phrenosin auftreten, so wird noch eine Krystallisation aus 50% Pyridin enthaltendem Aceton vorgenommen, und zwar löst man in 10facher Menge Pyridin und fügt das gleiche Volumen auf 45° erwärmtes Aceton hinzu. Bei 37° zeigt sich nur eine leichte Wolke von Phrenosin. Das Filtrat beginnt bei 28° eine Abscheidung zu bilden und wird nach Abkühlen auf Zimmertemperatur filtriert. Der Filtrerrückstand wird nochmals demselben Verfahren unterworfen und zuletzt aus einer großen Menge 2% Pyridin enthaltendem 90proz. Aceton

umkrystallisiert. Von 10 g der Kerasinfraktion werden im Durchschnitt 1,36 g Kerasin erhalten.

Darstellung von Cerebron aus Gehirn mit Hilfe von Baryt.

3. Darstellung von Cerebron aus Gehirn unter Anwendung von Baryt nach Thierfelder<sup>1)</sup>. Bei den im vorigen beschriebenen Verfahren macht die Entfernung der phosphorhaltigen Bestandteile besondere Schwierigkeiten. Sie lassen sich umgehen durch Verseifen dieser Bestandteile mit Baryt in der Hitze.

Je 30 g „Protagon“ (über dessen Gewinnung aus Gehirn s. S. 391) werden mit gesättigtem Barytwasser zu einer ganz feinen Emulsion, die frei von jedem größeren Partikelchen ist, verrieben und mit im ganzen 750 ccm dieser Flüssigkeit in einem mit Steigrohr versehenen Rundkolben 80 Minuten im stark kochenden Wasserbad unter beständigem Umschütteln erhitzt. Nach dem Erkalten saugt man den Niederschlag auf der Nutsche ab, befreit ihn durch Auswaschen mit Wasser völlig von Baryt und dann mit Aceton von Wasser. Die Masse wird nun mit Aceton zerrieben, mit 1000 ccm Aceton 3 Minuten lang unter Umschütteln im Sieden erhalten und durch Heißwassertrichter filtriert. Der beim Abkühlen und im Eisschrank entstehende Niederschlag wird abgesaugt, das Filtrat wieder zur Extraktion verwendet. Man wiederholt das Verfahren mehrmals, indem man zunächst nur einige Minuten, dann  $\frac{1}{4}$  Stunde,  $\frac{1}{2}$  Stunde, mehrere Stunden am Rückflußkühler auskocht. Die ersten Abscheidungen sind phosphorfrei, die späteren enthalten etwas Phosphor. Die Menge der phosphorfreien Substanz beträgt etwa 30% (etwa 1,1% des frischen Gehirns). Aus den phosphorhaltigen Präparaten lassen sich durch erneutes Auskochen mit Aceton noch phosphorfreie gewinnen.

Man löst nun je 25 g in der 70fachen Menge absolutem Alkohol, läßt die Lösung über Nacht bei 29° stehen und filtriert die entstandenen Ausscheidungen durch Warmwassertrichter ab. Sie betragen etwa 70% des Cerebrosidegemenges und bestehen hauptsächlich aus Cerebron. Der Filtrerrückstand wird nochmals der gleichen Behandlung unterworfen und dann in der oben (S. 392) beschriebenen Weise durch Umkrystallisieren aus 20% Chloroform enthaltendem Methylalkohol und Extraktion mit 10% Chloroform enthaltendem Methylalkohol und reinem Methylalkohol weiter gereinigt, bis die Krystallisationsprobe (S. 395) die Entfernung aller amorphen Beimengungen anzeigt.

Eigenschaften. 283. Cerebron ist in Äther unlöslich, in Alkohol, Aceton, Benzol in der Kälte unlöslich, in der Hitze löslich. Es scheidet sich aus seinen Lösungsmitteln, z. B. heißem Alkohol, beim Erkalten gewöhnlich in mikroskopischen, knollenförmigen Gebilden ab, welche, abfiltriert und getrocknet, ein weißes Pulver bilden, gelegentlich aber auch in cholesterinartigen Krystallen, welche, im Vakuum getrocknet, eine verfilzte, silberglänzende Masse bilden. Die amorphe Form läßt sich leicht in die krystallinische überführen (s. unten bei Krystallisationsprobe (S. 395). Über das Verhalten unter dem Polarisationsmikroskop und der Gipsplatte s. S. 395.

Beim schnellen Erhitzen im Schmelzröhrchen erweicht es unter Annahme eines feuchten Ansehens und Ausscheidung feiner Tröpfchen bei etwa 130° und wird bei 212° flüssig (Wörner und Thierfelder). Dieses Verhalten erklärt sich nach Rosenheim<sup>2)</sup> aus dem Übergang in den flüssig-krystallinischen und weiter in den flüssigen Zustand. Der Übergang in den flüssig-krystallinischen Zustand läßt sich am besten beobachten, wenn man eine kleine Menge des trockenen Pulvers vorsichtig auf einem Deckglas in Lehmanns Polarisationsmikroskop erwärmt bis es völlig geschmolzen ist. Es ist jetzt ganz isotrop,

<sup>1)</sup> Loening u. Thierfelder: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 74, S. 282, 1911.

<sup>2)</sup> Biochem. Journ. Bd. 8, S. 121. 1914.



d. h. unsichtbar in dem dunklen Feld zwischen den gekreuzten Nicols. Läßt man nun ein wenig abkühlen, so schießen zahlreiche anisotrope, einzelligende nadelförmige, flüssige Krystalle auf dem dunkeln Untergrund an, die man besonders gut an den dünnsten Stellen und bei einem Druck auf das Deckglas sieht (Rosenheim).

Über Dibrom- und Barytverbindungen s. Kossel und Freytag<sup>1)</sup>. Über Hexaacetylcerebron, das in Wasser unlöslich, in allen organischen Lösungsmitteln leicht löslich ist und links dreht, s. Thierfelder<sup>2)</sup> und Levene und West<sup>3)</sup>, über Benzoylphrenosin und weitere Verbindungen Levene und West<sup>3)</sup>.

Es ist rechtsdrehend. Die Stärke der Drehung ist von Lösungsmittel, Temperatur und Konzentration abhängig. 5proz. Lösung in 75% Chloroform enthaltendem Methylalkohol  $[\alpha]_D^{50} = +7,6^\circ$  (Kitagawa und Thierfelder<sup>4)</sup>, 10proz. Lösung in demselben Lösungsmittel  $[\alpha]_D^{45} = +10,4^\circ$ , 10proz. Lösung in Pyridin  $[\alpha]_D^{20} = +3,74^\circ$  und  $[\alpha]_D^{30} = +4,30^\circ$  (Rosenheim). Optische Eigenschaften.

Bei der Spaltung zerfällt Cerebron in je 1 Mol. Cerebronsäure, d-Galaktose und Sphingosin. Sie wird durch 3—4stündiges Erhitzen mit 10% Schwefelsäure enthaltendem Methylalkohol am Rückflußkühler auf kochendem Wasserbade bewirkt. Dabei erhält man die Cerebronsäure zum Teil als Methylester, das Sphingosin zum Teil als Dimethylsphingosin, die Galaktose als Methylgalaktosid (Thierfelder<sup>5)</sup>. Spaltung.

Über die Spaltung mit wässriger Schwefelsäure s. Levene und Mayer<sup>6)</sup>.

Mit konzentrierter Schwefelsäure gibt es zuerst Gelb-, dann Purpurfärbung. Erhitzt man eine Spur mit  $\frac{1}{2}$  ccm Wasser, fügt nach dem Erkalten 2 Tropfen einer 2proz. alkoholischen Lösung von  $\alpha$ -Naphthol hinzu und unterschichtet mit 1 ccm reiner konz. Schwefelsäure, so tritt an der Berührungsstelle ein violetter Streifen auf. Beim Schütteln färbt sich die ganze Flüssigkeit violett (Rosenheim und Tebb<sup>7)</sup>). Mit Orcin und konz. eisenchloridhaltiger Salzsäure gekocht entsteht Grün- bis Blaugrünfärbung (Fränkel u. Linnert<sup>8)</sup>. Reaktionen.

Zur Erkennung und zur Feststellung seiner Reinheit (Abwesenheit von Phosphatiden und Kerasin) dienen folgende Proben: Prüfung auf Reinheit.

a) Ein völlig reines Cerebron gibt auch in größerer Menge nach Veraschen mit Soda und Salpeter keine Spur einer Phosphorsäurereaktion mit Ammoniummolybdat.

b) Krystallisationsprobe. Ein völlig reines Cerebron muß nach Thierfelder<sup>9)</sup> in einem kleinen, mit Steigrohr versehenen Rundkölbchen mit einer zur Lösung auch beim Sieden unzureichenden Menge Methylalkohol oder 10% Chloroform enthaltendem Methylalkohol versetzt beim Kochen auf dem Wasserbade sich in kurzer Zeit seiner ganzen Menge nach in prächtige, dem Cholesterin ähnliche Krystalle verwandeln. Beobachtet man bei der mikroskopischen Betrachtung noch amorphe Formen, so ist mit der Reinigung fortzufahren.

c) Gipsplattenprobe. Zur Prüfung, ob dem Cerebron noch Kerasin oder umgekehrt dem Kerasin noch Cerebron beigemischt ist, gibt

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 17, S. 431. 1893; s. auch Levene u. Jacobs: Journ. of biol. chem. Bd. 12, S. 391. 1912.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 89, S. 248. 1914.

<sup>3)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 31, S. 635. 1917.

<sup>4)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 49, S. 286. 1906.

<sup>5)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 44, S. 366. 1905.

<sup>6)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 31, S. 627. 1917.

<sup>7)</sup> Journ. of physiol. Bd. 41, Proc. I. 1910.

<sup>8)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 26, S. 41. 1910.

<sup>9)</sup> Loening u. Thierfelder: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 68, S. 464. 1910.

Rosenheim<sup>1)</sup> folgende Probe an, welche auf dem verschiedenen Verhalten beider Cerebroside unter dem Polarisationsmikroskop beruht. Man löst eine kleine Menge (8—10 mg) in einem kleinen Reagensglas ( $0,5 \times 4$  cm) in 2 Tropfen Pyridin bei etwa  $37^\circ$ , bringt 1 Tropfen mittels einer warmen Capillarpipette auf einen erwärmten Objektträger, bedeckt mit einem Deckglas und läßt langsam erkalten. Es bilden sich Sphärokrystalle zuerst an den Rändern, wodurch das weitere Verdunsten des Lösungsmittels verhindert wird. Da die Krystalle denselben Brechungsindex wie das Pyridin haben, so sind sie bei gewöhnlichem Licht unter dem Mikroskop kaum sichtbar. Im polarisierten Licht mit gekreuzten Nicols heben sie sich hell von dem dunklen Untergrund ab und zeigen das wohl ausgebildete Kreuz. Bringt man nun die Gipsplatte mit Rot I unmittelbar über dem Polarisator so an, daß ihre Achse diagonal zu den Polarisations Ebenen der gekreuzten Nicols liegt, so beobachtet man einen charakteristischen Unterschied zwischen Cerebron und Kerasin. Auf dem roten Hintergrunde erscheinen die Krystalle in Quadranten geteilt, von denen zwei entgegengesetzte die Additionsfarbe blau, die anderen beiden die Subtraktionsfarbe gelb zeigen, und zwar zeigen die Sphärolithe des Cerebrons die blaue Farbe im oberen rechten und unteren linken Quadranten, die des Kerasins umgekehrt die blaue Farbe im oberen linken und unteren rechten. Die Sphärolithe erscheinen zunächst einheitlich und haben eine Größe, die zwischen 0,05 und 0,5 mm schwankt, nach einigen Stunden beobachtet man wohl den Sphärokrystall des einen Cerebroside umwachsen von einem des anderen. Mit Hilfe dieser Probe kann man mit sehr wenig Substanz feststellen, ob ein Cerebron-Präparat völlig frei von Kerasin ist und umgekehrt.

*Kerasin*  $C_{47}H_{91}NO_8$ .

**Darstellung.** 284. Es besteht aus je einem Mol. Lignocerinsäure, Galaktose und Sphingosin, die unter Austritt von 2 Mol. Wasser zusammengetreten sind. Über die Konstitution, welche noch nicht ganz feststeht, siehe Rosenheim<sup>2)</sup>. Über seine Darstellung s. S. 392. Seine Trennung von Phrenosin beruht auf der Eigenschaft des letzteren, beim Abkühlen der Lösungen sich vor dem Kerasin abzuschneiden. Levene und West<sup>3)</sup> haben sich bei der Trennung beider auch der Benzoylverbindungen bedient, indem aus einer Lösung beider in Methylalkohol beim Stehen bei  $0^\circ$  Benzoylkerasin oder eine an ihm reichere Fraktion sich abscheidet. Nach Levene und West soll die Darstellung eines von Cerebron vollständig freien Kerasins noch nicht gelungen sein.

**Eigenschaften.** Es zeigt ähnliche Löslichkeitsverhältnisse wie Cerebron, ist aber in warmem Alkohol leichter löslich als Cerebron und scheidet sich aus seinen Lösungen in zusammenhängender Gallerte ab, welche, abfiltriert und im Vakuum getrocknet, sich leicht pulverisieren läßt, beim Trocknen an der Luft aber zu einer weißen durchsichtigen, wachsartigen Masse wird. Über Schwefelsäure im Vakuum getrocknet entspricht es der Formel  $C_{47}H_{91}NO_8 + H_2O$ .

Über sein Verhalten unter dem Polarisationsmikroskop und der Gipsplatte s. S. 395.

Es geht beim Erwärmen ebenso wie das Cerebron in den flüssig-krystallinen Zustand über und bei weiterem Erhitzen in den isotrop-flüssigen. Sein Klärungspunkt liegt bei  $180^\circ$  (Rosenheim<sup>4)</sup>). Über Verbindungen mit Brom

<sup>1)</sup> Biochem. Journ. Bd. 8, S. 110. 1914.

<sup>2)</sup> Biochem. Journ. Bd. 10, S. 142. 1916.

<sup>3)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 31, S. 635. 1917.

<sup>4)</sup> Biochem. Journ. Bd. 8, S. 121. 1914.

(Dibromkerasin) und Baryt s. Kossel und Freytag<sup>1)</sup>, über Pentaacetylkerasin s. Thierfelder<sup>2)</sup> und Levene und West.

Kerasin zeigt Linksdrehung, deren Stärke von Lösungsmittel, Temperatur und Konzentration abhängig ist. Eine 10proz. Lösung in Pyridin  $[\alpha]_D^{18} = -2,5^\circ$ , eine 10,5proz. in demselben Lösungsmittel  $[\alpha]_D^{25} = -3,71^\circ$ , eine 10,04proz. in 10% Pyridin enthaltendem Chloroform  $[\alpha]_D^{50} = -5,08^\circ$  (Rosenheim<sup>3)</sup>). Siehe auch Levene und West<sup>4)</sup>. Optische Eigenschaften.

Bei der Spaltung entsteht je 1 Mol. Lignocerinsäure, d-Galaktose und Sphingosin. Bewirkt man sie durch 7—8stündiges Erhitzen mit 10% Schwefelsäure enthaltendem Methylalkohol auf dem kochenden Wasserbade am Rückflußkühler, so geht die Lignocerinsäure in den Methylester, das Sphingosin zum Teil in Monomethylsphingosin, die Galaktose in Methylgalaktosid über (Thierfelder<sup>5)</sup>). Über die Spaltung mit wässriger Schwefelsäure s. Levene und Mayer<sup>6)</sup>. Spaltung.

Mit konzentrierter Schwefelsäure gibt es zunächst Gelb-, dann Purpurfärbung. Es gibt dieselben Reaktionen mit Orcin und  $\alpha$ -Naphthol wie das Cerebron (S. 395). Über sein Verhalten unter dem Polarisationsmikroskop und der Gipsplatte s. S. 395. Reaktionen und Prüfung auf Reinheit.

### Tierfarbstoffe.

(Bearbeitet von P. Brigl-Tübingen.)

#### *Die Farbstoffgruppen der Blutfarbstoffe.*

Die Hämoglobinarten (§ 424) werden durch Säuren und Alkalien in Globin und die Farbstoffgruppe<sup>7)</sup> zerlegt, und zwar entsteht aus den Hämoglobinen neben Eiweiß Hämochromogen (§ 285), aus den Oxyhämoglobinen neben Eiweiß Hämatin (§ 286). Letzteres bildet sich auch durch die Einwirkung von Pepsin oder Trypsin auf Oxyhämoglobine. Spaltet man Oxyhämoglobine mit Eisessig-Kochsalz, so erhält man das gut krystallisierende und daher am genauesten studierte Hämin (§ 287).

285. **Hämochromogen**<sup>8)</sup> ist nur als Spaltungsprodukt des Hämoglobins oder Reduktionsprodukt des Hämatins bekannt. Es geht sehr leicht wieder durch Oxydation in Hämatin über. Vorkommen.

Hämochromogen bildet sich sehr häufig in Spirituspräparaten von Pankreas, Leber, Milz, Muskeln. Übergießt man die Organe im ganzen oder nach ihrer Zerkleinerung mit Alkohol und läßt ohne Umrühren einige Tage stehen, so erscheinen die unteren Schichten rosenrot bis purpurrot, die oberen grau bis bräunlich und die spektroskopische Untersuchung des reflektierten Lichtes ergibt in den roten, unteren Schichten die Spektralstreifen des Hämochromogens mit aller Schärfe. Bringt man sie an die Luft, so werden sie bald von der Oberfläche aus graubraun durch Hämatinbildung. Übergießen mit Äther wirkt ähnlich wie Alkohol<sup>9)</sup>.

Eine Darstellung des freien Hämochromogens in analysenreiner Form ist wegen seiner großen Affinität zu Sauerstoff bis jetzt nicht gelungen. Erhitzt man Hämoglobin in hinreichend starkem Alkali auf  $100^\circ$  bei Abwesenheit von Darstellung:

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 17, S. 431. 1893; s. auch Levene: Journ. of biol. chem. Bd. 12, S. 391. 1912.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 89, S. 248. 1914.

<sup>3)</sup> Biochem. Journ. Bd. 10, S. 142. 1916.

<sup>4)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 31, S. 635. 1917.

<sup>5)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 85, S. 35. 1913.

<sup>6)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 31, S. 627. 1917.

<sup>7)</sup> Zusammenfassende Darstellung der Vertreter der Farbstoffgruppe bei Küster im Handb. der biol. Arbeitsmethoden, Abt. I, Teil 8, S. 201ff. Berlin-Wien 1922.

<sup>8)</sup> Hoppe-Seyler: Med.-chem. Untersuch., Heft 4, S. 540. 1871. Berlin, Hirschwald.

<sup>9)</sup> Struve: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 9, S. 623. 1876.

Sauerstoff, so scheidet sich Hämochromogen als violettgrauer, pulveriger\*) Niederschlag ab. Beim Erkalten löst es sich teilweise oder vollständig wieder. Seine Ammoniakverbindung gewann v. Zeynek<sup>1)</sup> als rote bis braunrote Substanz durch Reduktion von in alkoholischem Ammoniak suspendiertem Hämatin mit alkoholischem Hydrazin in einem besonders konstruierten Apparate. Die Verbindung hatte die Zusammensetzung C 63,83, H 5,66, N 11,48, Fe 9,25%, was einer Formel  $C_{34}H_{32}O_4N_4Fe \cdot NH_3$  entspräche. Eine ähnliche, krystallisierte Doppelverbindung mit Pyridin erhielten v. Zeynek<sup>2)</sup> und Kalmus<sup>3)</sup> beim Erhitzen von Hämoglobin oder auch von Hämatin mit Pyridin unter Zusatz von Hydrazin. Zuerst wurde die Reaktion zum mikroskopischen Nachweis<sup>4)</sup> benutzt. Beim Mischen unter einem Deckglas von 1 Tropfen defibriniertem Blut mit je 1 Tropfen Pyridin und Schwefelammoniumlösung erscheinen rasch rote Nadelbüschel, die sich mikrospektroskopisch wie Hämochromogen verhalten.

Verhalten in Lösungen.

Von Lösungen sind die in Alkalien bei Abschluß von Sauerstoff beständiger, während sich saure Lösungen bald unter Abspaltung von Eisen, Bildung von Porphyrinen zersetzen. Alkalische Lösungen des Hämochromogens erhält man durch Versetzen einer alkalischen Lösung von Hämatin mit einem Reduktionsmittel wie Schwefelammonium, Stokesscher Lösung (Anh.), Hydrazinhydrat. Die Farbe ist kirschrot. Eine saure rote Lösung erhält man nach Milroy<sup>5)</sup>, wenn man durch eine alkoholische, nur 0,4—0,8% Oxalsäure enthaltende Lösung von Hämatin Wasserstoff leitet und dann mit einer Spur Zinkstaub reduziert. Dhéré, Baudoux und Schneider<sup>6)</sup> haben durch Zusatz von etwas Natriumhydrosulfit zu einer methylalkoholischen Lösung von Hämatin und Erwärmen im zugeschmolzenen Gefäß auf 60—65° Krystalle erhalten, welche angeblich saures Hämochromogen sind.

Spektrum:  
in alkal. Lösung

Eine alkalische Lösung zeigt bei genügender Verdünnung 2 sehr deutliche Absorptionsstreifen (s. Spektraltafel), von denen der eine tiefschwarze mit seiner Mitte einer Wellenlänge von 556,4 entspricht und fast in der Mitte zwischen *D* und *E* liegt, der andere nicht so dunkle und bei der Verdünnung der Lösung früher verschwindende mit seiner Mitte einer Wellenlänge von 520,4 entspricht und den Zwischenraum zwischen *E* und *b* ausfüllt, noch etwas über *b* hinüberreichend (Hoppe-Seyler<sup>7)</sup>). Lewin, Miethe und Stenger<sup>8)</sup> fanden, daß die maximale Absorption in den beiden Streifen den Wellenlängen 558 und 526 entspricht, während Formánek<sup>9)</sup> 559,1 und 529,2  $\mu\mu$  angibt. Auch bei starker Konzentration der Lösung zeigen sich bei der spektroskopischen Betrachtung keine anderen Streifen und das blaue Licht bis *G* hin ist sehr wenig absorbiert. Ein dritter Streifen im ultravioletten Teil des Spektrums. Sein Maximum entspricht nach Gamgee<sup>10)</sup> 420,0  $\mu\mu$ , nach Lewin, Miethe und Stenger 385  $\mu\mu$ .

\*) Die Angabe von Hoppe-Seyler (Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 13, S. 495. 1889), es auf diese Weise krystallisiert erhalten zu haben, scheint von ihm selbst nicht aufrecht erhalten worden zu sein.

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 25, S. 492. 1898. <sup>2)</sup> desgl. Bd. 70, S. 225. 1910.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 70, S. 216. 1910.

<sup>4)</sup> Donogány: Malys Jahresber. d. Tierchem. Bd. 23, S. 126. 1893. — Kobert: Zeitschr. f. angew. Mikroskopie Bd. 5. 1900. — K. Bürker: Münch. med. Wochenschr. Bd. 56, S. 126. 1909.

<sup>5)</sup> Proc. of the physiol. soc.; Journ. of physiol. Bd. 32, S. 12. 1905.

<sup>6)</sup> Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 165, S. 515. 1917; ref. Chem. Zentralbl. 1918, I, S. 201.

<sup>7)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 13, S. 477. 1889.

<sup>8)</sup> Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 118, S. 80. 1907.

<sup>9)</sup> Zeitschr. f. analyt. Chem. Bd. 40, S. 513. 1901.

<sup>10)</sup> Zeitschr. f. Biol. Bd. 34, S. 505. 1896.

Die saure Lösung des Hämochromogens zeigt einen Streifen zwischen *D* in saurer Lösung. und *E* (580—550  $\mu\mu$ ) (Milroy), während Dhéré und Vegezzi<sup>1)</sup> 3 Streifen angeben von wechselnder Lage je nach der Reduktionsart.

Bei Gegenwart von Sauerstoff geht es sofort unter Veränderung der Farbe Umwandlung. der Lösung in Hämatin über. Selbst verdünnte Säure in alkoholischer Lösung entzieht dem Hämochromogen auch bei gewöhnlicher Temperatur sehr bald das Eisen und es bildet sich das an der Luft beständige Hämatoporphyrin.

Kohlenoxydhämochromogen entsteht nach Hoppe - Seyler<sup>2)</sup> durch Kohlenoxydhämo- Einwirkung von Alkali auf Kohlenoxydhämoglobin bei Abwesenheit von Sauerstoff im zugeschmolzenen Rohr und scheidet sich aus dieser Lösung beim Erhitzen auf 100° ab, um beim Erkalten sich wieder aufzulösen. Pregl<sup>3)</sup> erhielt es in einem für diesen Zweck besonders konstruierten Apparat als dunkelblauviolett an Kaliumpermanganat erinnerndes Pulver, welches völlig getrocknet an trockener Luft beständig ist. Im Kohlenoxydhämochromogen kommen auf 1 Atom Fe 1 Mol. CO (Hoppe - Seyler, Hüfner und Küster<sup>4)</sup> chromogen.

Die alkalischen Lösungen des Kohlenoxydhämochromogens zeigen dieselben spektroskopischen Erscheinungen wie das Kohlenoxydhämoglobin, gehen aber an der Luft allmählich in Hämatinlösungen über (Hoppe - Seyler). Durch Ferricyankalium werden die Lösungen unter Kohlenoxydentwicklung zersetzt (Pregl). Beim Erhitzen im Wasserstoffstrom wird Kohlenoxyd abgegeben und es entsteht Hämochromogen.

286. **Hämatin**, nur als Zersetzungsprodukt des Oxyhämoglobins oder nach Vorkommen. Küster richtiger des Methämoglobins<sup>5)</sup> und als Oxydationsprodukt des Hämochromogens bekannt, findet sich häufig im Darmkanal, wo es durch die Einwirkung des Magen- und Pankreassaftes auf den Blutfarbstoff der Speisen oder auf ausgetretenes Blut gebildet wird oder wohin es bereits präformiert in den Speisen gelangt. Bei Fleischnahrung wird es daher stets in den Faeces angetroffen. Selten kommt es in alten Blutextravasaten vor. Bei vielen Krankheiten und Vergiftungen wird es im Serum, gelegentlich auch im Harn gefunden<sup>6)</sup>.

Die Darstellung des Hämatins direkt aus Blut oder Blutfarbstoff hat Darstellung: bedeutende Schwierigkeiten zu überwinden, bequemer geht man vom Hämin aus. Hoppe - Seyler schlug vor, es zu gewinnen durch Schütteln von defibriniertem Blut mit Äther, Zusatz von starker Essigsäure, wiederholtes Schütteln, Abgießen und Filtrieren der dunkelbraunen ätherischen Lösung sofort, nachdem sie sich abgeschieden hat, Stehenlassen, Abfiltrieren des ausfallenden Niederschlags und Waschen desselben mit Äther, Alkohol und Wasser. v. Zeynek<sup>7)</sup> erhielt es durch Verdauung von in Wasser gelöstem Oxyhämoglobin mit Pepsin- aus Oxyhämoglobin durch Verdauung salzsäure und starkes Verdünnen der verdauten Lösung mit 0,4proz. Salzsäure als braunen, schlammartigen Niederschlag, der durch Verrühren mit 1proz. Salzsäure von beigemengten Schollen befreit und durch Dekantieren mit Wasser gereinigt wurde. Das so gewonnene Hämatin ist weniger widerstandsfähig gegen verdünnte Säuren, gegen hohe Temperaturen bei Gegenwart von Wasser als das aus Häminkrystallen gewonnene sog. typische Hämatin, und wird auch

<sup>1)</sup> Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 163, S. 209. 1916; ref. Chem. Zentralbl. 1916, II, S. 911.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 13, S. 477. 1889. <sup>3)</sup> desgl. Bd. 44, S. 173. 1905.

<sup>4)</sup> Arch. f. (Anat. u.) Physiol., Supplbd. 1904, S. 387.

<sup>5)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 43, 1, S. 373. 1910.

<sup>6)</sup> Vgl. besonders Schumm: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 87, S. 171. 1913 u. Bd. 97, S. 32. 1916; Feigl: Biochem. Zeitschr. Bd. 85, S. 171 u. 212. 1917; Caesar, ebenda Bd. 89, S. 1. 1918.

<sup>7)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 30, S. 126. 1900.

bei länger dauernder Verdauung verändert (v. Zeynek<sup>1</sup>). Küster<sup>2</sup>) unterscheidet dieses Verdauungshämatin als  $\alpha$ -Hämatin von dem aus Hämin gewonnenen  $\beta$ -Hämatin.

aus Hämin. Am einfachsten stellt man Hämatin aus Häminkrystallen nach Nencki und Sieber<sup>3</sup>) dar. Die reinen Krystalle werden nach Anreiben mit Alkohol in äußerst verdünnter reiner Kalilauge kalt gelöst, die filtrierte Lösung wird mit verdünnter Schwefelsäure gefällt, Lösung und Fällung wiederholt und der flockige, braune Niederschlag mit heißem Wasser gewaschen, bis das ablaufende Wasser keine Sulfatreaktion mehr gibt, was langes Auswaschen erfordert. Das Hämatin wird erst bei gelinder Wärme, dann bei 120—150° getrocknet.

Bei dieser Reaktion wird das Chlor des Hämins durch Hydroxyl ersetzt. Die Rückverwandlung dieses Hämatins in Hämin ist bisher nicht mit Sicherheit geglückt (Küster<sup>4</sup>), so daß man mit Küster<sup>5</sup>) eine gleichzeitig verlaufende Änderung der molekularen Struktur annimmt. Der gegenteilige Befund von Eppinger<sup>6</sup>) hat nicht bestätigt werden können. Das Verdauungshämatin von v. Zeynek ist recht glatt in Hämin zu verwandeln, indem man es, in Aceton aufgeschwemmt, mit Salzsäure versetzt.

Formel. Dem Hämatin kommt höchstwahrscheinlich<sup>7</sup>) die Formel  $C_{34}H_{32}O_4N_4FeOH$  zu. Willstätter<sup>8</sup>) gibt der Formel  $C_{33}H_{32}N_4O_4FeOH$  den Vorzug. Genaueres über den Bau siehe bei Hämin S. 405.

Eigenschaften. Das typische Hämatin aus Hämin ist nicht erkennbar krystallinisch. Von gelegentlich beschriebenen krystallinischen Hämatinen<sup>9</sup>) ist nicht bekannt, in welchem genaueren Zusammenhang mit Hämatin sie stehen. Das typische Hämatin hat blauschwarze Farbe und lebhaften Metallglanz, es gibt wie manches in Glanz und Farbe ihm ähnliche Rotgiltigerz einen braunen Strich auf Porzellan und fein pulverisiert ein dunkelbraunes Pulver, ist somit pleochromatisch. Es kann auf 180° erhitzt werden, ohne daß es sich zersetzt; sehr stark erhitzt verkohlt oder verglimmt es, ohne zu schmelzen und sich aufzublähen, unter Entwicklung von Blausäure, und läßt in der Form der Stücke, die zum Versuche verwendet wurden, ein Skelett von reinem (auch manganfreiem) Eisenoxyd (ungefähr 13% des Hämatins betragend) zurück. Es ist unlöslich in Wasser, Alkohol, Äther, Chloroform, verdünnten Säuren, Bicarbonaten, ein wenig löslich in Eisessig, besonders in der Wärme. In säurehaltigem Alkohol oder Äther löst es sich in geringer Menge, es löst sich ferner in allen Alkalilösungen, auch sehr verdünnten, selbst in Alkohol beim Zusammenschütteln mit kohlen-saurem Alkali, ferner in Phenol, Pyridin, Piperidin. Die alkalischen Lösungen vermögen nicht zu diffundieren. Sie erscheinen in dickeren Schichten in durchfallendem Lichte schön rot, in dünner Schicht olivengrün. Die sauren Lösungen sind in jeder Dicke der Schicht braun gefärbt. Alkalische Lösungen von Hämatin werden

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 49, S. 472. 1906.

<sup>2</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 43, 1, S. 372. 1910; Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 110, S. 108. 1920.

<sup>3</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 17, 2, S. 2267. 1884.

<sup>4</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 40, S. 396. 1903/04.

<sup>5</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 110, S. 107. 1920; Bd. 121, S. 121. 1922. Vgl. auch S. 401, Anm. 3 u. 4.

<sup>6</sup>) Dissert. Phil. Fak. München 1907; Piloty: Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 377, S. 341. 1910.

<sup>7</sup>) Küster: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 40, S. 393. 1903/04. — H. Fischer: Ergebn. d. Physiol. Bd. 15, S. 185. 1916.

<sup>8</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 87, S. 426. 1913.

<sup>9</sup>) Cazeneuve u. Breteau: Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 128, S. 678. 1899. — Piettre u. Vila: desgl. Bd. 141, S. 1041. 1906.

durch Kalk- oder Barytsalze in rotbraunen Flocken gefällt, auch Niederschläge von phosphorsaurem Kalk nehmen Hämatin aus Lösungen in sich auf. Auf dieser letzteren Eigenschaft beruht eine Methode des Nachweises von Blut im Harn (§ 621). Auch Bleiacetat fällt bei vorsichtigem Zusatz Hämatin aus seinen Lösungen.

Die sauren und alkalischen Lösungen absorbieren am wenigsten das äußerste Spektrum: Rot im Spektrum bis etwa zur Linie *B*, am stärksten das violette Licht. Die Lage der Absorptionsstreifen ist sehr abhängig von der Konzentration der Lösung und der Art der Darstellung. Nach Schumm<sup>1)</sup> sind aber viele Differenzen durch Beimengung von Zersetzungsprodukten zu erklären. Eine alkalische in alkal. Lösung. Lösung zeigt bis zu einer Konzentration von 0,015 g Hämatin in 100 ccm bei einer Dicke der Flüssigkeitsschicht von 1 ccm einen schlecht begrenzten Absorptionsstreifen zwischen den Linien *C* und *D*, letzterer Linie anliegend. Eine saure Lösung (in schwefelsäurehaltigem Alkohol) zeigt einen Absorptionsstreifen in saurer Lösung. nahe bei *C* zwischen dieser Linie und *D*; ein anderer weniger scharf begrenzter, viel breiter und bei weiterer Verdünnung etwas früher verschwindender, findet sich zwischen *D* und *F*. Dieser letztere Streifen zerlegt sich bei vorsichtiger Verdünnung der Flüssigkeit zunächst in zwei ungleich dunkle Bänder; das neben *F* befindliche ist dunkler, der hellste Zwischenraum zwischen *E* und *b*. Ein sehr schmaler, schwacher Streifen erscheint bei gewisser Verdünnung zwischen *D* und *E*, dicht neben *D*, so daß in diesem Falle 4 Streifen vorhanden sind (siehe Spektraltafel). Ein nicht scharf zu bestimmendes Band findet sich auf der Grenze von violettem und ultraviolettem Licht (Gamgee). Die Lage der Streifen des sauren Hämatin ist leicht veränderlich, daher auch abweichende Angaben in der Literatur: Lewin, Miethe und Stenger geben für saure Hämatinlösungen in Aceton 3 Streifen an, deren maximale Absorptionen entsprechen  $\lambda = 630, 540$  und  $502$ . Schumm gibt an als maximale Absorption der 3 Streifen  $\lambda = 618, 575$  und  $532$  bei Messungen im Gitterspektrophotometer. Andere Angaben mit Abbildungen bei Newkomer<sup>2)</sup>.

Durch Behandlung mit Reduktionsmitteln, z. B. Schwefelammonium, Veränderung des Spektrum: durch Reduktionsmittel Stokesscher Lösung (Anh.), Hydrazinhydrat verändert die Hämatinlösung ihre Farbe, und bei der Spektraluntersuchung sieht man die Streifen des Hämochromogens (§ 285). Fügt man zu einer alkalischen Hämatinlösung Cyan- durch Cyankalium. kalium, so wird die Lösung durchsichtiger rotbraun, absorbiert am schwächsten das Licht zu beiden Seiten der Linie *C* und zeigt beim Verdünnen einen schlecht begrenzten Absorptionsstreifen zwischen *D* und *E*.

Mit Alkalien erfolgt zunächst Lösung zu den nicht krystallisiert erhaltenen Umwandlungen: in alkal. Lösung. Metallsalzen, analog mit Ammoniak. Das Ammonsalz ist bei  $100^\circ$  noch beständig. Die Löslichkeit in  $\text{NH}_3$  geht teilweise verloren, wenn Hämatin mit viel heißem Wasser gewaschen wird, was auf gewisse Umlagerungen schließen läßt (Cazeneuve und Breteau<sup>3)</sup>, Küster). Auch durch Einwirkung von verdünntem Alkali in der Wärme und allmählich auch in der Kälte erleidet Hämatin Veränderungen (Küster<sup>4, 5)</sup>. Durch Kochen mit konzentrierter Kalilauge soll es dagegen keine bemerkbare Änderung erfahren, beim Schmelzen mit Kali entweicht Ammoniak, doch geht die Zerlegung sehr langsam vor sich. Sehr schnell wird es unter Entfärbung zersetzt, wenn Chlor in seine alkalische Lösung eingeleitet wird.

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 87, S. 171. 1913.

<sup>2)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 37, S. 465. 1919.

<sup>3)</sup> Journ. de pharmacie et de chim. (6) Bd. 9, S. 369. 1899.

<sup>4)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 28, S. 15. 1899. Vgl. a. S. 400, Anm. 5.

<sup>5)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 43, 1, S. 370. 1910.

**in saurer Lösung.** Verdünnte Salzsäure führt zunächst in ein Chlorid über, dessen Identität mit Hämin unsicher ist (s. oben S. 400). Stärkere Säuren bei erhöhter Temperatur spalten Eisen ab, Salzsäure bei 130° schon zu 90% (Küster<sup>1</sup>), unter Bildung von Hämatoporphyrin (§ 288) und evtl. weiteren Zersetzungsprodukten. Konzentrierte Schwefelsäure löst zu einer dunkelroten Flüssigkeit, in der sie rasche Porphyrinbildung ohne Gasentwicklung bewirkt. Ähnlich wirkt SO<sub>2</sub> bei Luftabschluß im Licht (v. Zeynek<sup>2</sup>), während bei Sauerstoffzutritt die Lösung fast völlig entfärbt wird. Am glattesten erfolgt Bildung von Hämatoporphyrin durch Bromwasserstoff-Eisessig.

**Reduktionen.** Gelinde Reduktion in alkalischer Lösung führt in Hämochromogen über, wie spektroskopisch nachweisbar (s. S. 401), Reduktion mit Zinn und Salzsäure ergibt zunächst einen dem Urobilin nahestehenden Farbstoff, stärkere Reduktion in saurer Lösung mit Sn+HCl oder PH<sub>4</sub>J ergibt wie beim Hämin das Hämopyrrolgemisch (§ 190). Auch bei der trockenen Destillation entstehen Pyrrole.

**Oxydation.** Das Hämatin ist nur schwer oxydierbar. Mit Chromsäure (Küster<sup>3</sup>) ergibt es neben niederen Abbauprodukten das Imid der Hämatinsäure (§ 187).

**Nachweis.** Der Nachweis beruht auf seinen Lichtabsorptionserscheinungen, besonders auf dem Auftreten des charakteristischen Spektrums des Hämochromogens auf Zusatz von Reduktionsmitteln. Von Hämoglobin und Oxyhämoglobin trennt man es durch seine Fällbarkeit durch Bleiacetat.

**287. Hämin (Chlorhämin).** Dieses nur als Kunstprodukt erhältliche krystallisierte Derivat der Farbkomponente des Blutfarbstoffs ist wichtig, weil es wegen seiner Schwerlöslichkeit und Krystallisationsfähigkeit verhältnismäßig am bequemsten von den bekannten Derivaten aus Blutfarbstoff oder direkt aus Blut zu gewinnen ist. Mit dem Hämin sind die meisten Untersuchungen über die Konstitution der Farbkomponente angestellt. Neben dem eigentlichen Hämin, dem salzsauren Salz des Hämatins, sind besonders durch Küster auch die entsprechende Bromverbindung, das sog. Bromhämin<sup>4</sup>) und neuerdings die Rhodanhämine<sup>5</sup>) in den Kreis der Untersuchung gezogen worden. Als ameisen-saures Salz wurden von Küster und Gerlach<sup>6</sup>) Krystalle erkannt, die Partos<sup>7</sup>) erhalten hatte.

**Darstellung:** Häminkrystalle sind zuerst von Teichmann<sup>8</sup>) beobachtet und für den **im kleinen** mikroskopischen Blutnachweis benutzt worden. Man verreibt ein Teilchen einer eingetrockneten Blutkruste oder auch den eingedampften Wasserauszug eines auf Blut zu untersuchenden verdächtigen Fleckens in irgendeinem Kleidungsstück mit einem Körnchen Kochsalz auf einem Objektträger, versetzt mit Eisessig und erhitzt bei aufgelegtem Deckglas bis gerade zum Sieden des Eisessigs. Beim Erkalten erscheinen die charakteristischen Teichmannschen Krystalle (s. S. 405 unten). Ist die Probe negativ, kann man sicherheitshalber nach Zusatz von neuem Eisessig nochmals erhitzen.

**präparativ.** Im größeren Maßstabe ist das Hämin zuerst von Hoppe-Seyler<sup>9</sup>) nach einem hieran angelehnten Verfahren, Kochen von Blut mit Eisessig, der mit Kochsalz gesättigt war, dargestellt und analysiert worden. Dies Verfahren ist

<sup>1</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 43, 1, S. 370. 1910.

<sup>2</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 49, S. 478. 1906.

<sup>3</sup>) Habilitationsschrift, Tübingen 1896; Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 29, 1, S. 821. 1896.

<sup>4</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 91, S. 115. 1914. Dort auch ältere Literatur.

<sup>5</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 129, S. 157. 1923.

<sup>6</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 119, S. 98. 1922; Bd. 129, S. 130. 1923.

<sup>7</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 105, S. 49. 1920.

<sup>8</sup>) Zeitschr. f. rat. Med. (N. F.) Bd. 3, S. 375. 1853; Bd. 8, S. 41. 1857.

<sup>9</sup>) Med.-chem. Untersuch., Heft 3, S. 379. Berlin, Hirschwald 1868.



dann später vielfach variiert worden, bevorzugt wird die Methode von Schalfjeff<sup>1)</sup> mit der Abänderung nach Nencki - Zaleski<sup>2)</sup>. Während bei dieser Eisessigmethode die Farbkomponente ausgefällt wird, und die Eiweißkomponente des Blutfarbstoffs im Eisessig gelöst bleibt, kann man umgekehrt auch auf dem Umwege über das Hämatin die Farbkomponente von dem koagulierten Eiweiß durch schwefelsäurehaltigen Alkohol ablösen und nachträglich durch Salzsäure das Hämin fällen. Auch diese Methode geht ursprünglich auf Hoppe - Seyler<sup>3)</sup> zurück, man folgt meist der Ausführungsart von Mörner<sup>4)</sup>. An Stelle des Alkohols wurde von Nencki und Zaleski<sup>2)</sup> Aceton verwandt, ein durch Zaleski und Merunowicz<sup>5)</sup> modifiziertes Verfahren. Ob die nach den verschiedenen Methoden gewonnenen Hämine identisch sind, ist zweifelhaft. Zwar ist die Zusammensetzung die gleiche, jedoch sind im Feinbau, besonders wohl in der Verteilung der Nebenvalezen, Unterschiede anzunehmen. Mörner<sup>6)</sup> unterscheidet daher das nach seiner Methode gewonnene Hämin als  $\beta$ -Hämin von dem nach Schalfjeff gewonnenen  $\alpha$ -Hämin, eine Unterscheidung, der sich auch Küster<sup>7)</sup> anschließt. Das Acetonhämin ist wohl ein  $\beta$ -Hämin, das Krystallaceton enthält.

Nach der im Laboratorium von Willstätter<sup>8)</sup> erprobten Ausführungsart der Methode zur Darstellung von ( $\alpha$ -) Hämin kann man von defibriertem Blut ausgehen, wenn auch die Verwendung von abzentrifugierten Blutkörperchen eine erhebliche Ersparnis an Eisessig bedingt<sup>9)</sup>. Wichtig ist, daß man nur frisches Blut nimmt, das am gleichen Tage verarbeitet wird. Pferdeblut eignet sich nicht so gut wie Ochsenblut (Küster), vielleicht allerdings nur deshalb, weil das Blut alter Tiere weniger brauchbar ist als das junger.

In einem Rundkolben von 4 l Inhalt werden 3 l Eisessig (99—100 proz.) unter Zusatz von etwas Chlornatrium im Dampfbad auf 95° erhitzt, worauf 1 l defibriertes, durch dünne Gaze filtrierte Blut unter Umschwenken in 2 Portionen eingetragen wird, und zwar durch einen Tropftrichter, dessen Abflußrohr nahe über dem Eisessig endet und die Gefäßwand nicht berührt. Nach Zusetzen von  $\frac{1}{2}$  l Blut wird die Temperatur erst wieder auf 95° gebracht und dann erst der Rest einlaufen gelassen, worauf noch  $\frac{1}{4}$  Stunde erwärmt wird. Sobald der ganze Inhalt des Kolbens von den atlasglänzenden Häminkristallen erfüllt erscheint, gießt man durch ein Koliertuch in eine große Porzellanschale und läßt über Nacht stehen. Nun wird die stark gefärbte Flüssigkeit von dem am Boden sitzenden Hämin abgossen und das letztere mit Salzsäure von 1% aufs Filter gespritzt. Man trocknet auf Fließpapier. Die Ausbeute beträgt durchschnittlich 4,5 g Hämin pro Liter Blut.

Die Reinigung dieses Rohhämins, dem vor allem noch Spuren von Eiweiß und Lipoiden anhaften können, gelingt wegen seiner Schwerlöslichkeit nicht durch Umkrystallisieren, sondern durch eine sog. Umscheidung (Schalfjeff, Küster<sup>10)</sup>). Man löst es durch Zusatz von Basen, Ammoniak, Pyridin oder Chinin

<sup>1)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 18, Ref. S. 232. 1885.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 30, S. 384. 1900.

<sup>3)</sup> Med.-chem. Untersuch., Heft 4, S. 523. 1871.

<sup>4)</sup> Nordiskt med. Arkiv, Festband 1897, Nr. 1 u. Nr. 26; Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 29, S. 187 Anm. 3. 1900.

<sup>5)</sup> Anzeiger Akad. Wissensch. Krakau 1907, S. 634; ref. Chem. Zentralbl. 1908, I, S. 1058.

<sup>6)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 41, S. 543. 1904.

<sup>7)</sup> Küster in Abderhalden: Handb. d. biol. Arbeitsmethoden, Abt. I, Teil 8, S. 203. 1922.

— Küster u. Reihling: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 91, S. 120. 1914.

<sup>8)</sup> Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 373, S. 232. 1910; Bd. 385, S. 197. 1911.

<sup>9)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 87, S. 457. 1913.

<sup>10)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 40, S. 391. 1903/04.

in geeigneten organischen Lösungsmitteln wie Alkohol, Aceton, Chloroform. Hierbei erfolgt eine chemische Veränderung des Moleküls, im wesentlichen eine Entziehung von HCl, Bildung des Dehydrochloridhämins  $C_{34}H_{31}N_4O_4Fe$ . Gießt man aber die Lösung in Eisessig, der Kochsalz oder Salzsäure enthält, so bildet sich das Chlorhämin zurück.

Zum Umscheiden verwendet man möglichst frisch dargestelltes Rohhämin, von dem man höchstens 5 g gleichzeitig verarbeiten soll. Je 1 g wird in einem Gemisch von 3 ccm Pyridin und 5 ccm Chloroform gelöst, von Ungelöstem abfiltriert, mit 5 ccm Chloroform nachgewaschen und nun das Filtrat unter Schütteln eingetragen in 140 ccm Eisessig, der kurz vor dem Eintragen mit 1 ccm konzentrierter Salzsäure versetzt und auf 105—110° erhitzt worden war. Die rasch einsetzende Krystallisation wird durch Reiben mit einem Glasstab beschleunigt und durch Stehen bei kühler Außentemperatur während eines Tages vervollständigt. Man wäscht erst mit konzentrierter, dann mit verdünnter, etwas Salzsäure enthaltender Essigsäure, und trocknet, erst auf Fließpapier, dann im Vakuum neben Kali. Ausbeute 0,6—0,8 g auf je 1 g Rohhämin. Statt Pyridin kann man auch das von Schälfejeff als erstem verwandte Chinin nehmen, von dem für jedes Gramm Rohhämin 1 g in 25 ccm Chloroform angewandt wird. Man trägt dann in Eisessig ein, der mit Kochsalz gesättigt ist. Sättigt man den Eisessig mit Bromkalium, so kann man zum entsprechenden Bromhämin kommen. Zweckmäßig ist es dann aber, um ein ganz chlorfreies Produkt zu erhalten, schon von einem rohen Bromhämin auszugehen, indem man die Spaltung des Oxyhämoglobins mit Eisessig ausführt, der mit Bromkalium versetzt war (Küster und Reihling<sup>1</sup>).

Bromhämin.

$\beta$ -Hämin nach  
Mörner.

Verfahren von K. A. H. Mörner<sup>2</sup>). 1 l defibriertes Blut wird mit 3 l Wasser gemischt und nach Zusatz von 10 ccm 1proz. Schwefelsäure bis zum lebhaften Aufwallen erhitzt, das Koagulum wird koliert, ausgewaschen und scharf abgepreßt, dann wird mit etwa  $\frac{1}{2}$  l 90proz. Alkohols angerieben und wieder scharf abgepreßt. Jetzt wird der zerkleinerte Blutkuchen mit 1750 ccm 90proz. Alkohols, dem ein erkaltetes Gemisch von 17,5 ccm konzentrierter Schwefelsäure und 17,5 ccm 90proz. Alkohols zugesetzt ist, verrieben und in einem kühlen Raum 2 Stunden digeriert, dann koliert, der Rest ausgepreßt, die erhaltene, dunkelgefärbte Lösung filtriert, das Filtrat rasch zum Sieden erhitzt und jetzt pro Liter 8 ccm 25proz. Salzsäure, die mit etwa 12 ccm 90proz. Alkohols versetzt sind, eingetragen und durch Einstellen in kaltes Wasser abgekühlt. Nach 2-tägigem Stehen wird der über dem abgesetzten Hämin stehende Alkohol abgegossen, der Krystallbrei abgesaugt, mit etwas Weingeist und dann mit Wasser gewaschen, in gelinder Wärme getrocknet und mit Petroläther behandelt. Ausbeute etwa 3 g aus 1 l Blut. Küster<sup>3</sup>) gelang es, auch dieses Hämin mit Hilfe von Chinin- oder Pyridinchloroform umzukrystallisieren.

Die Methode von Mörner, die auch auf Blutkörperchen und krystallisiertes Hämoglobin anwendbar ist (Küster<sup>4</sup>), gestattet, mit den Hilfsmitteln kleinerer Laboratorien bis zu 15 l Blut täglich zu verarbeiten. Das erhaltene Hämin ist nicht ganz rein, das Hämin als Carbonsäure ist während des Prozesses teilweise mit dem Äthylalkohol verestert, es kann bis zu 1% an Äthyl enthalten. Man kann die gebildeten Ester wieder verseifen, wenn man auf je 1 g Hämin 50 ccm Methyläthylketon und 10 ccm Salzsäure von 10% nimmt und damit 2—3 Stunden

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 91, S. 125. 1914.

<sup>2</sup>) Nordiskt med. Arkiv, Festband Nr. 1 u. Nr. 26. 1897.; Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 29, S. 187 Anm. 3. 1900.

<sup>3</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 40, S. 403. 1903/04.

<sup>4</sup>) Abderhaldens Handb. d. biol. Arbeitsmethoden, Abt. I, Teil 8, S. 203. 1922.

unter Rückfluß kocht (Küster). Für die Gewinnung von Porphyrinen oder für den energischen oxydativen und reduktiven Abbau ist diese Reinigung nicht erforderlich.

Die störende Veresterung durch das Lösungsmittel wird vermieden, wenn man nach dem Vorschlag von Zaleski und Merunowicz Aceton als Lösungsmittel verwendet. Man stellt sich erst, genau nach Mörner, das Blutkoagulum her, das dann solange auf Filtrierpapier getrocknet wird, bis der Rückstand aus 1 l Blut 300—350 g wiegt. Je 150—200 g davon werden auf dem Wasserbad in einer Schale etwas erwärmt, das warme Pulver mit etwa 300 ccm Aceton, dem 16 ccm 50proz. Schwefelsäure zugesetzt war, 1 Minute digeriert, koliert, filtriert und ausgepreßt. Das Filtrat samt Preßflüssigkeit wird auf 40—45° erhitzt, 30—40 ccm Salzsäure (spez. Gew. 1,12) pro Liter Blut zugesetzt und kalt stehen gelassen. Nach dem Abfiltrieren der ausgeschiedenen Nadeln wäscht man mit Aceton von 50%, das 0,001% Salzsäure enthält, trocknet im Vakuum und extrahiert mit Petroläther. Die Krystalle enthalten Krystallaceton, das sie bei 110° abgeben. Auch dieses Hämin ist durch Umscheidung, wie beim  $\alpha$ -Hämin geschildert, in letzteres überführbar. Acetonhämin.

Die Zusammensetzung des nach verschiedenen Verfahren gewonnenen Hämins ist nach der Umscheidung die gleiche (Küster<sup>1</sup>). Unterschiede in der Zusammensetzung der Rohhämine sind bedingt durch Beimengungen, entweder von Eiweißderivaten oder von Lösungsmitteln, die lose gebunden sein können wie das Aceton, oder in das Molekül teilweise eingetreten sind wie die Alkohole, die partielle Esterbildung bewirken. Die Formel des gereinigten Hämins, auch gestützt durch Molekulargewichtsbestimmung<sup>2</sup>), wird von der Mehrzahl der auf diesem Gebiet tätigen Forschern als  $C_{34}H_{32}N_4O_4FeCl$  angenommen, während Willstätter<sup>3</sup>) wegen des Zusammenhangs mit dem Blattfarbstoff die Formel  $C_{33}H_{32}N_4O_4FeCl$  bevorzugt. Die Auflösung dieser Bruttoformel in ein Formelbild ist noch nicht vollständig gelungen. Es stehen vorläufig noch 3 sich allerdings nur in Einzelheiten unterscheidende Formeln von Küster, Willstätter und H. Fischer zur Erörterung<sup>4</sup>). Allgemein anerkannt ist über die Bindung der Atome im Hämin, daß der Sauerstoff in Form zweier Carboxyle, Propionsäurereste, anzunehmen ist, der Stickstoff in Form von 4 Pyrrol- resp. Pyrrolenkernen. An den Stickstoff ist durch 2 Haupt- und Nebervalenzen gebunden das dreiwertige Eisen, an dessen dritter Hauptvalenz das Chloratom sitzt. Die Pyrrolkerne sind zusammengehalten durch in  $\alpha$ -Stellung angreifende Kohlenstoffe. Die Ringe tragen außerdem eine Reihe von Seitenketten, von denen zwei besonders reaktionsfähig sind infolge des Vorliegens einer Doppelbindung (die 2 Vinyle nach Küster). Durch Anlagerung von Bromwasserstoff, Brom, Wasser und Wasserstoff an diese Vinyle erklären sich eine Reihe von Umwandlungsprodukten des Hämins. Zusammensetzung.

Das Hämin, wie man es nach Schalfjeff direkt erhält oder bei den anderen Verfahren nach vorhergehender „Umscheidung“ mit Eisessig-Kochsalz, bildet Krystalle des triklinen Systems, dünne Blättchen und Säulchen, in ihrem ganzen Habitus und dem Auftreten sternähnlicher Durchkreuzungszwillinge sehr an Gips erinnernd (Teichmannsche Krystalle). Die Krystalle sind im auffallenden Lichte blauschwarz, etwas metallisch glänzend, in der Durchsicht Eigenschaften.

1) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd 40, S. 403. 1903/04.

2) H. Fischer u. Hahn: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 46, 2, S. 2308. 1913.

3) Willstätter u. M. Fischer: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 87, S. 426. 1913.

4) Wegen der Formelbilder und ihrer Ableitung vgl. die Zusammenstellung bei Küster: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 100, S. 93. 1920, u. Brigl: Die chem. Erforschung der Naturfarbstoffe. Braunschweig 1921, S. 181—186. Dort auch Literatur.

dunkelbraun. Das nach Mörner gewonnene  $\beta$ -Hämin, das im übrigen nur durch kleine Unterschiede in den Löslichkeiten abweicht, bildet mehr würfelnähnliche, weniger gestreckte Nadeln. Die Häminkrystalle, im Capillarröhrchen erhitzt, zeigen bei  $240^\circ$  ein schwaches Sintern, bleiben dann aber bis  $300^\circ$  unverändert, an der Luft erhitzt verglimmen sie bei stärkerem Erhitzen unter Entwicklung von Blausäure und Hinterlassung eines Skeletts von Eisenoxyd. Hämin ist unlöslich in Wasser und verdünnten Säuren bei Zimmertemperatur, Alkohol, Äther und Chloroform. Gelöst wird es etwas von warmem Eisessig, leicht ferner von vielen alkalischen Flüssigkeiten, jedoch unter chemischer Veränderung, Salzbildung der beiden Carboxyle und — meistens — auch Abspaltung des Chlors vom Eisen. Alkalien und Alkalicarbonate, von denen 3 Mole gebraucht werden, lösen zu Alkalisalzen des Hämatins, Dinatriumphosphat nur in der Wärme, es lösen nicht saure Carbonate und zweifach saures Phosphat. Die Lösungsmöglichkeit durch organische Basen ist bei der Umscheidung (S. 403 u. 407) erwähnt.

**Häminester.** Hämin als Dicarbonsäure ist leicht zu verestern, allerdings bildet sich der Monoalkylester schneller als der Dialkylester. Veresterung erfolgt beim Erwärmen mit angesäuerten Alkoholen (deswegen teilweise schon bei der Gewinnung von Hämin nach Mörner), leichter nach vorhergehender Lösung in Chinin-Chloroform (Nencki und Zaleski); der Dimethylester bildet sich aber auch mit Dimethylsulfat in alkalischer oder saurer Lösung (Küster und Greiner<sup>1</sup>). Die Methyl-, Äthyl- und Amylester sind bekannt. Die Monoester lösen sich noch in Alkalien, die Dialkylester nicht mehr. Die Dialkylester, die viel besser als Hämin in organischen Lösungsmitteln wie Aceton, Chloroform, heißem Benzol und Eisessig löslich sind, sind gut krystallisierende Substanzen von hohem Zersetzungspunkt. Wegen der genaueren Methode der Darstellung, bei der man sich genau an die Vorschrift halten muß, und wegen der Eigenschaften muß auf die Originalliteratur verwiesen werden. Bei den Estern gelingt besonders glatt der Austausch des Chlors gegen Hydroxyl, Bildung des Esters des Hämatins und dessen Rückverwandlung in Häminester (Willstätter und M. Fischer<sup>2</sup>). Beim Methylester gelingt ferner der Nachweis des ungesättigten Charakters durch Anlagerung von 1 Mol. Brom, Bildung des krystallisierten Körpers  $C_{36}H_{36}O_4N_4FeClBr_2$  (Küster und Greiner<sup>3</sup>).

**Hämin, HBr-Anlagerung.** Das Hämin selber ist gleichfalls zu Anlagerungsreaktionen befähigt; mit einer Lösung von Bromwasserstoff in Eisessig erfolgt je nach der Konzentration und Länge der Einwirkung eine Anlagerung von 2 oder 3 Mol. Bromwasserstoff unter gleichzeitigem Austausch des Chlors am Eisen durch Brom, Bromhämin  $\cdot 2 HBr$  und Bromhämin  $\cdot 3 HBr$ . Durch flüssigen Bromwasserstoff erfolgt Anlagerung von 5 Mol. HBr unter Ablösung des Eisens (Willstätter und M. Fischer<sup>4</sup>). Diese Hydrobromide sind als Zwischenprodukte bei der Bildung von Hämatoporphyrin anzusehen (S. 409).

**Wasserstoffanlagerung.** Bei geeigneter Reduktion des Hämins werden 4 Wasserstoffe angelagert; **Mesohämin.** Bildung von Mesohämin  $C_{34}H_{36}O_4N_4FeCl$ . Zuerst erhalten durch Wiedereinführung von Eisen in das entsprechende Porphyrin, das Mesoporphyrin (Zaleski<sup>5</sup>), später durch direkte Reduktion des Hämins mit Alkoholaten gleichzeitig von Willstätter, M. Fischer und Forsén<sup>6</sup>) und von Hans Fischer und Röse<sup>7</sup>). Am bequemsten darstellbar ist Mesohämin durch Reduktion des Hämins mit Wasserstoff-Palladium (H. Fischer und Hahn<sup>8</sup>).

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 86, S. 190 u. 196. 1913.

<sup>2</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 87, S. 491. 1913.

<sup>3</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 86, S. 197. 1913. <sup>4</sup>) desgl. Bd. 87, S. 443. 1913.

<sup>5</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 37, S. 54. 1902/03.

<sup>6</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 87, S. 488. 1913. <sup>7</sup>) desgl. Bd. 88, S. 9. 1913.

<sup>8</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 91, S. 174. 1914.

Die Einwirkung von Basen kann in verschiedener Richtung erfolgen. Während wässrige Alkalien hauptsächlich das Chlor am Eisen gegen Hydroxyl vertauschen und so Hämatin bilden, kann durch Ammoniak in Alkohol oder durch organische Basen wie Pyridin, Chinin, Anilin in der Hauptsache Abspaltung von 1 Mol. HCl erfolgen; Bildung des (Dehydrochlorid)hämins  $C_{34}H_{31}O_4N_4Fe$  (Küster<sup>1</sup>). Der Körper ist am besten zu isolieren bei Verwendung von kaltem Anilin, während die übrigen Basen, wie schon erwähnt, bei der Umscheidung des Rohhämins Verwendung finden. Es ist nämlich das Dehydrochlorid in Hämin zurückzuverwandeln, wenn es wieder mit Salzsäure in Berührung kommt. Bei der Einwirkung von siedendem Anilin auf Hämin bildet sich sog. Anilinohämin (Küster<sup>1</sup>) neben anderen Produkten (Küster und Fuchs<sup>2</sup>). Der Mechanismus der Reaktion ist noch nicht recht durchsichtig, ebensowenig wie der der Einwirkung von Phenylhydrazin und Bromphenylhydrazin (v. Fürth<sup>3</sup>).

Hämin u. organische Basen.

Durch starke Mineralsäuren erfolgt Lösung des Hämins unter Loslösung des Eisens, Bildung von Hämatoporphyrin (§ 288) oder evtl. anderer Porphyrine (s. unten). Der Angriffspunkt der Säure ist die Haftstelle des Eisens, es treten 2 Wasserstoffe an die Stelle der Gruppe  $>FeCl$  und gleichzeitig reagieren die beiden ungesättigten Stellen des Moleküls, die Vinyle von Küster, die in zwei gesättigte Seitenketten übergehen. Durch konzentrierte Schwefelsäure werden 2 Mol. Wasser angelagert — Bildung von Hämatoporphyrin —, durch Bromwasserstoff-Eisessig mindestens 2 Mol. HBr, die dann nachträglich bei der Berührung mit Wasser (Küster<sup>4</sup>), Willstätter und M. Fischer<sup>5</sup>) auch Br gegen OH austauschen — gleichfalls Bildung von Hämatoporphyrin —, durch Jodwasserstoff werden die Vinyle reduziert zu 2 Äthylen — Bildung von Mesoporphyrin (§ 290). Durch stärkere Reduktion mit Jodwasserstoff erfolgt zunächst Bildung des Mesoporphyrinogens (§ 290), bei noch stärkerer Einwirkung in der Hitze Spaltung des ganzen Moleküls zu mononuclearen Pyrrolderivaten, dem Gemisch der Hämopyrrole und Hämopyrrolcarbonsäuren (§ 190). Oxydation mit Chromsäure ergibt Hämatinsäure-Imid.

Hämin u. Säuren; Porphyrinbildung

Reduktion.

Oxydation.

**288. Hämatoporphyrin.** Aus Hämochromogen oder Hämatin oder Hämin können auf verschiedene Weise, aber immer unter Einwirkung von Säuren, eisenfreie Farbstoffe erhalten werden, die ihre Zusammengehörigkeit durch ihre Zusammensetzung, ihren Ursprung und vor allem durch ihr spektroskopisches Verhalten erkennen lassen, die jedoch leicht veränderlich sind und von denen sich noch nicht sicher angeben läßt, in welcher Beziehung sie zueinander stehen oder wie weit sie evtl. identisch sind. Der Name Hämatoporphyrin und die ersten eingehenden Untersuchungen stammen von Hoppe-Seyler<sup>6</sup>). Dieselben wurden von Nencki und Sieber<sup>7</sup>) fortgeführt.

Entstehung.

Hämatoporphyrin findet sich im Magen- und Darminhalt bei Einführung von konzentrierter Schwefelsäure in den Magen. Nach Garrod<sup>8</sup>) kommt es, wenn auch nur in Spuren, wahrscheinlich in jedem normalen Harn vor. In Harnen von Kranken (Bleikolik, Darmblutungen, Lebererkrankungen) oder nach Arzneimittelgabe (Sulfonal) ist ein Porphyrin von MacMunn, Neusser,

Vorkommen.

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 40, S. 408. 1903/04.

<sup>2</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 40, 2, S. 2021. 1907.

<sup>3</sup>) Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 351. S. 1. 1907.

<sup>4</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 86, S. 51. 1913. <sup>5</sup>) desgl. Bd. 87, S. 438. 1913.

<sup>6</sup>) Med.-chem. Untersuchungen, Heft 4, S. 528. 1871.

<sup>7</sup>) Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 18, S. 412. 1884; Bd. 20, S. 325. 1886; Bd. 24, S. 430. 1888.

<sup>8</sup>) Journ. of physiol. Bd. 13, S. 598. 1892; Bd. 15, S. 108. 1894; Bd. 17, S. 349. 1895.

Salkowski<sup>1)</sup>, Hammarsten<sup>2)</sup> und vielen anderen<sup>3)</sup> nachgewiesen worden. Auch die gefärbten Eischalen vieler Vögel enthalten nach H. Fischer und Kögl<sup>4)</sup> ein Porphyrin.

Da jedoch neuerdings durch H. Fischer und Mitarbeiter besondere Harnporphyrine (§ 293 und 294) nachgewiesen wurden, die spektroskopisch kaum vom Hämatorporphyrin zu unterscheiden sind, ist es sehr ungewiß geworden, inwieweit es sich bei den älteren Angaben um das typische Hämatorporphyrin gehandelt hat. Nach Schumm ist der Harnfarbstoff vielfach Koproporphyrin. Ähnlich unsicher ist auch die Angabe von MacMunn<sup>5)</sup>, daß Hämatorporphyrin ein physiologischer Farbstoff gewisser niederer Tiere sei. So hat das im Integument des Regenwurms (*Eisenia foetida*) aufgefundene Porphyrin wahrscheinlich die Formel  $C_{40}H_{48}N_4O_8$  und ist vielleicht ein Chlorophyllderivat (H. Fischer und Schaumann<sup>6)</sup>). Das komplexe Kupfersalz des Uroporphyrins ist anscheinend das Turacin (§ 321), nicht, wie früher auf Grund nur spektroskopischer Befunde vermutet, des Hämatorporphyrins.

**Darstellung.** Aus Hämochromogen entsteht das Hämatorporphyrin bei Abwesenheit von Sauerstoff bzw. Anwesenheit von reduzierenden Stoffen durch jede, auch die schwächste Säure, langsamer erfolgt unter sonst gleichen Verhältnissen die Bildung aus Kohlenoxydhämochromogen. Zu seiner Gewinnung aus Hämatin oder Hämin bedarf es energischerer Säurewirkung, am besten mit Hilfe von Bromwasserstoff-Eisessig nach Nencki und Zaleski<sup>7)</sup>.

Von den vielen Variationen der ursprünglichen Methode sei die von Willstätter und M. Fischer<sup>8)</sup> geschildert, mit deren Hilfe es erstmalig gelang, das freie Hämatorporphyrin krystallisiert zu erhalten, während früher nur das salzsaure Salz so zu erhalten war.

36 g Häminkrystalle werden in 900 g Eisessig-Bromwasserstoff vom spezifischen Gewicht 1,41 (bei 0° bestimmt) auf einmal eingetragen und  $\frac{1}{4}$  Stunde geschüttelt. Man läßt 7 Stunden stehen, bis klare Lösung erfolgt ist. Dann gießt man in 5 l Wasser, filtriert von wenigen körnigen Partikelchen durch eine dünne Talkumschicht ab und läßt noch — um den Ersatz von Brom durch Hydroxyl zu vervollständigen — 3 Stunden stehen. Durch Zusatz von konzentrierter Natriumacetatlösung fällt man das Hämatorporphyrin aus, filtriert ab und wäscht solange mit Wasser, bis mit Silbernitrat im Waschwasser kein Brom mehr nachweisbar ist. Zur Reinigung wird der noch feuchte Niederschlag in ganz verdünnter Natronlauge gelöst, von Eisenhydroxyd abfiltriert und aus dem Filtrat mit Essigsäure der Farbstoff wieder gefällt und abgesaugt. Man verarbeitet ihn zweckmäßig noch feucht weiter, entweder auf krystallisiertes Hämatorporphyrin oder auf das salzsaure Salz.

Zur Gewinnung des krystallisierten Hämatorporphyrins löst man den Schlamm in Alkohol, und zwar für je 10 g angewandtes Hämin in 1 l, und trägt diese Lösung in 25 l Äther ein. Man wäscht den Alkohol mit Wasser fort, trocknet den Äther mit Natriumsulfat und engt auf 1 l ein. Schon in der Wärme beginnt die Krystallisation, die sich beim Stehen bei Zimmertemperatur noch vermehrt. Die Ausbeute beträgt etwa die Hälfte des angewandten Hämins.

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 15, S. 286. 1891.

<sup>2)</sup> Skandinav. Arch. f. Physiol. Bd. 3, S. 319. 1892.

<sup>3)</sup> Zusammenstellung bei Günther: Arch. f. klin. Med. Bd. 105, S. 89. 1911. Ergebn. d. allg. Pathol. u. pathol. Anat. Bd. 20, 1. Abt., S. 608—764. 1922.

<sup>4)</sup> Vgl. H. Fischer u. Hilger: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 128, S. 173. 1923.

<sup>5)</sup> Journ. of physiol. Bd. 7, S. 240. 1886.

<sup>6)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 128, S. 162. 1923.

<sup>7)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 30, S. 423. 1900.

<sup>8)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 87, S. 461. 1913.

Zur Gewinnung des Dichlorhydrats löst man nach Willstätter und M. Fischer das Hämatorporphyrin in mäßig warmer Salzsäure von 3% und filtriert rasch. Das Filtrat setzt bald die Krystalle des salzsauren Hämatorporphyrins ab. Man trocknet bei Zimmertemperatur, erst zwischen Fließpapier, dann im Exsiccator. Bei höherer Temperatur tritt leicht Abspaltung von Salzsäure ein. Zaleski<sup>1)</sup> hatte ursprünglich angegeben, das Hämatorporphyrin in Salzsäure von 0,7%, die man bis 75° erwärmt, zu lösen und zum er kalteten Filtrat  $\frac{1}{10}$  des Volumens an stärkerer Salzsäure (spez. Gew. 1,19) zuzusetzen. Auch so erhält man das reine Dichlorhydrat in Büscheln von rotbraun gefärbten Nadeln.

Die Bildung des Hämatorporphyrins aus dem Hämin erfolgt mit Hilfe von Bromwasserstoff über eine Reihe von bromhaltigen Zwischengliedern, wie durch Küster und Deihle<sup>2)</sup> wahrscheinlich gemacht, von Willstätter und M. Fischer durch die Isolierung der Substanzen bewiesen wurde. Zuerst bilden sich Bromhydrate des Hämins (S. 406), dann löst sich das Eisen ab und es treten weitere Moleküle HBr dafür ein, insgesamt 4, wenn mit Bromwasserstoff-Eisessig gearbeitet wird, 5 bei Anwendung von flüssigem Bromwasserstoff. Bei Zugrundelegung der Formel mit 34 Kohlenstoffen für das Hämin wären die Formeln dieser Bromhydrate  $C_{34}H_{38}O_4N_4Br_4$  und  $C_{34}H_{39}O_4N_4Br_5$ . Bei Berührung des Tetrabromids mit Wasser werden 2 Bromatome gegen Hydroxyl ausgetauscht, es entsteht das Bromhydrat des Hämatorporphyrins selber.

Komplizierter und noch nicht voll aufgeklärt sind die Verhältnisse bei der Verwendung von flüssigem Chlorwasserstoff. Es bilden sich hier bei der Berührung mit Wasser 2 abweichende Porphyrine, das Häminoporphyrin und das Hämidoporphyrin (Willstätter und M. Fischer).

Die Formel des Hämatorporphyrins ist  $C_{34}H_{38}O_6N_4$ , die seines salzsauren Salzes  $C_{34}H_{38}O_6N_4 \cdot 2 HCl$  (Willstätter nimmt die Formel  $C_{33}H_{38}O_6N_4$  an). Die Sauerstoffe sind in Form von 2 Carboxylen und 2 alkoholischen Hydroxylen vorhanden. Die Krystalle des freien Hämatorporphyrins bestehen aus an den Enden abgerundeten, länglichen Blättchen, von violetter Farbe, in der Durchsicht braun. Sie sind schwer löslich in Äther, Methylalkohol und Äthylalkohol von 96%; absoluter Äthylalkohol löst etwas besser. Leichter löst Aceton, gut Eisessig mit violetter Farbe. Amorphes Hämatorporphyrin löst sich leichter in Alkohol. Wasser und verdünnte Essigsäure lösen kaum, dagegen gut verdünnte Mineralsäuren. Alkalien, Alkalicarbonate und auch Bicarbonate lösen zum Alkalisalz. Das schwer lösliche Natriumsalz ist krystallisiert (Nencki und Sieber<sup>3)</sup>). Auch Schwermetallsalze sind erhältlich, so das schwer lösliche Bleisalz. Ätherische Lösungen von Hämatorporphyrin geben an Salzsäure von 0,03% nur Spuren, an solche von 0,4% fast die ganze Menge beim einmaligen Ausschütteln ab (Willstätter). Aus der schwach salzsauren Lösung wird durch Natriumacetat das freie Hämatorporphyrin amorph ausgefällt.

Hämatorporphyrin, eingeführt in die Blutbahn von Tieren (Hausmann<sup>4)</sup> oder des Menschen (Meyer-Betz<sup>5)</sup>), bewirkt im Licht starke Schädigungen des Organismus infolge einer photobiologischen Sensibilisation. Diese Sensibilisation

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 37, S. 56. 1902/03.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 86, S. 51. 1913.

<sup>3)</sup> Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 24, S. 437. 1888.

<sup>4)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 30, S. 276. 1911; Bd. 67, S. 309. 1914; Bd. 77, S. 268. 1916.

<sup>5)</sup> Dtsch. Arch. f. klin. Med. Bd. 112, S. 476. 1913; Zentralbl. f. Biochem. u. Biophys. Bd. 16, S. 154. 1913/14.

findet sich überhaupt bei vielen Porphyrinen (H. Fischer<sup>1</sup>), H. Fischer und v. Kemnitz<sup>2</sup>). Vgl. § 290 u. § 294.

**Spektrum:** Das optische Verhalten des Hämatorporphyrins ist zum Nachweis wichtig, jedoch nur mit Vorsicht zu verwenden, wenn es sich um die Unterscheidung von anderen Porphyrinen handelt, wo in jedem Fall die Isolierung und Analyse sehr wünschenswert bleibt (vgl. Koproporphyrin, § 293ff.). Das kristallisierte Hämatorporphyrin weist in ätherischer Lösung außer einem schwachen, dünnen Streifen im Orange 4 Absorptionsbänder auf, einen sehr schmalen scharfen und dunklen im Orange zum Rot hin, einen schmalen, etwas weniger dunklen beim Beginn vom Grün, dem ein sehr breiter die gelbe Region ausfüllender Schatten vorgelagert ist, und 2 starke Bänder im Grün und beim Übergang vom Grün in Blau. Das letztere ist das dunkelste und weitaus breiteste (Willstätter und M. Fischer).

**in saurer Lösung** Die sauren Lösungen des Hämatorporphyrins zeigen schön violette, konzentriertere kirschrote Farbe und bei spektroskopischer Prüfung einen schmalen, nicht sehr dunklen Absorptionsstreifen zwischen *C* und *D*, dicht an *D* anliegend (die dunkelste Stelle entspricht nach Lewin, Miethe und Stenger<sup>3</sup>) 593  $\mu\mu$ ), und einen breiteren, dunklen Streifen zwischen *D* und *E*, dessen dunkelste Stelle 550  $\mu\mu$  entspricht und der nach Rot zu eine schattenhafte Fortsetzung hat, welche weiterhin (etwa entsprechend 575  $\mu\mu$ ) wieder als Streifen erscheint. Unter Umständen sieht man außer den beschriebenen 2 oder 3 Streifen noch weitere violettwärts von den erwähnten (Schulz<sup>4</sup>), Lewin). Die Streifen im unsichtbaren Teil des Spektrums entsprechen nach Lewin den Wellenlängen 403 und 380  $\mu\mu$ . Nach Schumm<sup>5</sup>), der mit dem Gitterspektrophotometer sehr genaue Messungen des Spektrums nicht nur vom Hämatorporphyrin, sondern auch von anderen Porphyrinarten, Meso-, Koproporphyrin durchgeführt hat, sind in einer wässerigen, mit 25proz. Salzsäure versetzten Lösung von Hämatorporphyrin 5 Streifen zu beobachten, von denen aber nur 2, die bei 595,3 und 552  $\mu\mu$ , ihre Lage so genau beibehalten, daß sie scharf bestimmbar sind. Bei stärkster Verdünnung tritt als einziger Streifen ein sehr scharfer im Violett auf. In alkoholischer Lösung des Hämatorporphyrin-dichlorhydrats ist das Spektrum stark abhängig vom Grade der Dissoziation des Salzes (Willstätter<sup>6</sup>). (Spektraltafel.)

**in alkal. Lösung.** Die alkalischen Lösungen sehen zum Teil auch violett, zum Teil feurig rot bis braun aus; die braune Farbe findet man am häufigsten, sie entspricht aber wohl nicht den reinsten Lösungen. Spektroskopisch sind die alkalischen Lösungen ausgezeichnet durch 4 Absorptionsstreifen, von denen der erste zwischen *C* und *D* näher an *D*, der zweite und dritte zwischen *D* und *E*, jeder einer dieser Linien nahe, der vierte von *b* bis gegen *F* gelegen ist. Indessen ist die Lage und Intensität der Streifen des auf verschiedene Weise hergestellten Hämatorporphyrins eine etwas abweichende, besonders bezieht sich das auf die mittleren Streifen. Unter Umständen sieht man auch einen fünften Streifen, welcher blau- oder rotwärts vom ersten liegt (vgl. Schulz). Der Streifen im unsichtbaren Teil entspricht nach Lewin einer Wellenlänge von 388  $\mu\mu$ . (Spektraltafel.)

**Schwermetall-spektrum.** Eine starke Veränderung erleidet das Spektrum, wenn das Hämatorporphyrin unter geeigneten Bedingungen mit zweiwertigen Schwermetallen zusammen-

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 97, S. 109. 1916.

<sup>2</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 96, S. 309. 1916.

<sup>3</sup>) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 118, S. 80. 1907.

<sup>4</sup>) Arch. f. (Anat. u.) Physiol. 1904, Supplbd., S. 271.

<sup>5</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 90, S. 1. 1914; Bd. 98, S. 171. 1916/17.

<sup>6</sup>) Willstätter u. Pfannenstiel: Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 358, S. 262. 1907.



gebracht wird, die Neigung zur Komplexsalzbildung haben. Eine alkalische Farbstofflösung, der alkalische Chlorzinklösung zugesetzt wird, verändert sich allmählich, wobei schließlich 2 Streifen auftreten, einer beiderseits von *D*, der andere zwischen *D* und *E* (Hammarsten<sup>1</sup>). Das Spektrum, das auf Zusatz von Stannoverbindungen auftritt, wenn man Blut in Eisessig mit SnCl<sub>2</sub> aufkocht und nach Zusatz von Na-Acetat untersucht, wird wegen seiner Beständigkeit und Schärfe zum Nachweis sehr empfohlen (Milroy<sup>2</sup>).

Hämatoporphyrin als Dicarbonsäure gibt leicht Dialkylester. Stehenlassen mit 8 proz. methylalkoholischer Salzsäure bei Zimmertemperatur oder Aufkochen mit 1 proz. während 10 Minuten reicht zur Bildung des Dimethylesters aus (Willstätter und M. Fischer). Eine Tetramethylverbindung C<sub>38</sub>H<sub>46</sub>O<sub>6</sub>N<sub>4</sub>, der Dimethylester des Hämatoporphyrindimethyläthers, bildet sich aus den S. 406 erwähnten Bromhydraten C<sub>34</sub>H<sub>38</sub>O<sub>4</sub>N<sub>4</sub>Br<sub>4</sub> und C<sub>34</sub>H<sub>38</sub>O<sub>4</sub>N<sub>4</sub>Br<sub>5</sub> beim Lösen in Methylalkohol (Küster und Greiner, Willstätter und M. Fischer, Küster und Bauer<sup>3</sup>). Die Verbindung zeichnet sich durch leichte Löslichkeit und gute Krystallisationsfähigkeit aus. Die Substanz ist durch wässrige Säuren leicht in die freie Dicarbonsäure zu verwandeln, in den Dimethyläther des Hämatoporphyrins. Auch entsprechende Äthylverbindungen sind bekannt (Küster u. Geering<sup>4</sup>).

Die energische Oxydation des Hämatoporphyrins mit Chromsäure in verdünnter schwefelsaurer Lösung führt nach Küster leicht zum Imid der Hämatinsäure (§ 187).

Die Reduktion des Hämatoporphyrins kann in sehr verschiedener Richtung erfolgen. Man kann die die alkoholischen Hydroxyle tragenden Seitenketten reduzieren (Mesoporphyrin und Hämatoporphyrin, § 290 u. 291), man kann diese Seitenketten unberührt lassen und zwei andere für den Farbstoffcharakter notwendigen Doppelbindungen reduzieren (Leukobase des Hämatoporphyrins, § 289), man kann auch beide Gruppen gleichzeitig reduzieren (Mesoporphyrinogen, § 290). Schließlich läßt sich durch stärkere Reduktion auch eine völlige Spaltung des Moleküls erzielen, Bildung von Hämopyrrolen und Hämopyrrolcarbonsäuren (§ 190).

Der Nachweis des Hämatoporphyrins geschieht mit Hilfe des Spektroskops, jedoch bleibt es immer erwünscht, den Nachweis durch die Isolierung in Substanz zu ergänzen, was besonders wichtig bei Kot und Harn ist wegen der Existenz von Uro- und Koproporphyrin. Von Oxyhämoglobin ist es trennbar durch seine Fällbarkeit durch Bleiacetat.

### Reduzierte Porphyrine.

289. Die **Leukobase des Hämatoporphyrins** ist nur in Lösungen bekannt. Man erhält sie durch Reduktion einer alkalischen Lösung von Hämatoporphyrin mit Natriumamalgam bis zur Farblosigkeit. Durch tagelanges Durchsaugen von Luft ist sie in Hämatoporphyrin zurückzuverwandeln (H. Fischer und Röse<sup>5</sup>).

290. **Mesoporphyrin** C<sub>34</sub>H<sub>38</sub>O<sub>4</sub>N<sub>4</sub> und Mesoporphyrinogen C<sub>34</sub>H<sub>42</sub>O<sub>4</sub>N<sub>4</sub> sind zwar durch Reduktion von Hämatoporphyrin mit Jodwasserstoff-Eisessig unter Zusatz von Phosphoniumjodid darstellbar, bequemer ist es aber, wie es beim Mesoporphyrin die Entdecker (Nencki und Zaleski<sup>6</sup>) zuerst erprobt haben,

<sup>1</sup>) Skandinav. Arch. f. Physiol. Bd. 3, S. 319. 1892; Autorreferat in Malys Jahresber. d. Tierchem. Bd. 21, S. 423. 1891.

<sup>2</sup>) Biochem. Journ. Bd. 12, S. 318. 1919; ref. Chem. Zentralbl. 1919, I, S. 856.

<sup>3</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 94, S. 172. 1915.

<sup>4</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 109, S. 125. 1922.

<sup>5</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 88, S. 18. 1913.

<sup>6</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 34, 1, S. 997. 1901.

direkt von Hämin auszugehen und dieses zu reduzieren. Die Formel des Mesoporphyrins bewies Zaleski<sup>1)</sup>.

**Darstellung.** Zur Darstellung des Mesoporphyrins folgt man zweckmäßig einer von H. Fischer und Meyer - Betz<sup>2)</sup> angegebenen Modifikation.

5 g Hämin werden mit 30 ccm wässriger Jodwasserstofflösung (spez. Gew. 1,96) und 75 ccm Eisessig auf dem Wasserbad bis zur völligen Lösung erwärmt, was bei häufigem Umschütteln nach  $\frac{1}{4}$  Stunde der Fall ist. Man versetzt mit 10 ccm Wasser und dann, innerhalb 10 Minuten, mit 3 g Phosphoniumjodid in kleinen Stücken. Die Reaktion ist beendet, sobald die anfänglich dunkel rotgelbe Flüssigkeit blaurot geworden und kein gelber Farbton mehr wahrnehmbar ist, und sobald beim Verdünnen mit dem gleichen Volumen Wasser keine Fällung erfolgt. Man kühlt ab und gießt in 1 l Wasser, setzt soviel Natronlauge von 10% hinzu, daß die Reaktion nur noch essigsauer ist, und filtriert den entstandenen Niederschlag ab. Zur Reinigung löst man in 300 ccm Natronlauge von 1%, verdünnt auf 1000 ccm, filtriert und fällt das Mesoporphyrin mit Essigsäure wieder aus. Weitere Reinigung erfolgt durch Lösen in Natronlauge und Fällung als Natriumsalz durch Zusatz eines geringen Überschusses an konzentrierter Natronlauge. Durch Lösen in 250 ccm kochender Salzsäure von 2,5% verwandelt man es in das schön in Nadeln krystallisierende, kalt schwer lösliche Dichlorhydrat des Mesoporphyrin. Aus dem Chlorhydrat läßt sich nach Willstätter und M. Fischer<sup>3)</sup> unschwer das freie, krystallisierte Mesoporphyrin gewinnen, indem man die wässrige Lösung mit Ammoniak annähernd neutralisiert und mit viel Äther extrahiert. Beim Einengen des Äthers krystallisiert das Mesoporphyrin.

**Eigenschaften.** Mesoporphyrin krystallisiert aus Äther in roten, langen Prismen, aus Alkohol in Spindeln. Es ist in seinem Verhalten dem Hämatoporphyrin sehr ähnlich. Es gibt ein gut krystallisierendes Dichlorhydrat, gut krystallisierende Dialkylester, von denen der Diäthylester bei 202—205° schmilzt, auch das Spektrum ist nur schwer von dem des Hämatoporphyrins zu unterscheiden. In saurer

**Spektrum.** Lösung mit 25% Salzsäure liegen nach Schumm<sup>4)</sup> die Absorptionsstreifen des Mesoporphyrins um etwa  $2,5 \mu\mu$  weiter nach Violett. Etwas stärker ist die Verschiebung in alkalischer Lösung. Sehr ausgeprägt ist auch die Fähigkeit zur Komplexsalzbildung, durch Wiedereinführung von Eisen kommt man zum Mesohämin (S. 406) (Zaleski<sup>5)</sup>, H. Fischer und Röse<sup>6)</sup>). Besonders leicht ist Kupfer einzuführen (Zaleski, H. Fischer und Hahn<sup>7)</sup>), während die Einführung von Magnesium schwieriger ist (Zaleski<sup>8)</sup>). Es sind ein Tetrachlor- und Tetrabrom-

**Giftwirkung.** mesoporphyrin erhältlich (H. Fischer und Röse<sup>9)</sup>). Ein Unterschied gegen das Hämatoporphyrin besteht in der nur geringen Photosensibilisation des Mesoporphyrin bei höheren Tieren, während es auf Infusorien stärker wirkt (H. Fischer mit Meyer - Betz und v. Kemnitz<sup>10)</sup>).

**Mesoporphyrinogen.** Läßt man die Einwirkung des  $HJ + PH_4J$  auf Hämin in Eisessig unter Luftabschluß bei Zimmertemperatur 10—11 Tage vor sich gehen, so erfolgt weitere Reduktion bis zum farblosen krystallisierten Mesoporphyrinogen

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 37, S. 54. 1902/03.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 82, S. 99. 1912; Bd. 84, S. 278. 1913.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 87, S. 492. 1913.

<sup>4)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 90, S. 15. 1914; Bd. 98, S. 171. 1916/17.

<sup>5)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 43, S. 11. 1904/05.

<sup>6)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 88, S. 9. 1913.

<sup>7)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 91, S. 182. 1914.

<sup>8)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 46, 2, S. 1687. 1913.

<sup>9)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 46, 2, S. 2461. 1913.

<sup>10)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 82, S. 107. 1912; Bd. 96, S. 309. 1916; Bd. 97, S. 109. 1916.

$C_{34}H_{42}O_4N_4$  (H. Fischer und Bartolomäus<sup>1</sup>). Man kann es auch erhalten durch entsprechende Reduktion von Hämato- und Mesoporphyrin, aus letzterem besser durch Natriumamalgam oder Zinkstaub-Eisen bei alkalischer Reaktion (H. Fischer, Bartolomäus und Röse<sup>2</sup>). Durch Luftsauerstoff in saurer oder alkalischer Lösung ist es leicht wieder oxydabel, in alkalischer läßt sich Mesoporphyrin erhalten.

291. **Hämoporphyrin** bildet sich nach Willstätter und M. Fischer<sup>3</sup>) durch Hämoporphyrin. Reduktion des Hämoporphyrins mit methylalkoholischer Kalilauge bei 200°. Ob es mit dem Mesoporphyrin isomer ist oder sich durch den Mindergehalt von 2 Wasserstoffen unterscheidet, ist noch nicht sicher. Die Bedeutung dieses Stoffes liegt darin, daß man durch weitere Behandlung mit Natronkalk daraus die carboxylfreie Grundsubstanz der ganzen Reihe erhalten kann, das Ätioporphyrin, identisch mit dem zuerst aus Chlorophyll erhaltenen Ätioporphyrin (Willstätter und Mitarbeiter<sup>4</sup>).

Zur Darstellung des Hämoporphyrins löst man 2 g amorphes Hämato- Darstellung. porphyrin in 50 ccm methylalkoholischer Kalilauge und 100 ccm Pyridin auf, füllt in einen Silberbecher und erhitzt im Autoklaven 4—5 Stunden auf 200°. Man dekantiert von der am Boden sitzenden, krystallisierten Kaliumverbindung, löst diese in Wasser und fällt mit Essigsäure. Das Rohprodukt löst man in verdünnter Salzsäure, neutralisiert mit Ammoniak und schüttelt das Hämoporphyrin mit Äther aus. Zur Reinigung schüttelt man den Äther erst mit Salzsäure von 0,1%, entzieht den Farbstoff dann dem Äther durch Durchschütteln mit Salzsäure von 2—3% und schüttelt die salzsaure Lösung nochmals mit Äther, wodurch eine gelbe Beimengung entfernt wird. Man führt das Hämoporphyrin dann abermals in Äther über, indem man die salzsaure Lösung wieder mit Ammoniak neutralisiert und ausschüttelt, und engt den Äther ein. Aus wasserhaltigem Äther erhält man feine, rotbraune Nadeln, aus vorher getrocknetem Eigenschaften. dicke, braune Platten. Das Hämoporphyrin ist schwer löslich in Äther, absolutem Alkohol, kaum in Chloroform und Benzol. Eisessig löst mit stark blautichig roter Farbe. Es ist eine Dicarbonsäure, die einen schön krystallisierenden Dimethylester gibt, mit Salzsäure gibt es ein Dichlorhydrat, das beim Lösen in Salzsäure von 5—20% langsam in Nadeln krystallisiert. Es ist etwas stärker basisch als Mesoporphyrin, das erst durch Salzsäure von mindestens 1,75% seiner ätherischen Lösung entziehbar ist, während Hämoporphyrin die Salzsäurezahl 0,75 hat.

292. **Ätioporphyrin.** Erhitzt man Hämoporphyrin — oder besser seine Ätioporphyrin. komplexe Magnesiumverbindung, das Hämophyllin — mit Natronkalk, so geht es unter Abspaltung von Kohlensäure (vielleicht auch Kohlensäure und Essigsäure, Fischer und Röse<sup>5</sup>) in das Ätioporphyrin oder evtl. zunächst die entsprechende Magnesiumverbindung, das Ätiophyllin, über. Wegen der Einzelheiten der Darstellung muß auf die Schilderung bei Willstätter und M. Fischer verwiesen werden, die genauestens eingehalten werden muß.

Das Ätioporphyrin, aus Äther krystallisiert, besteht aus schönen, spitzen Eigenschaften. Prismen vom Zsp. 265°. Es hat eine an die Chrombeize des Alizarins erinnernde Farbe. In Lösungen ist es braunrot. Es löst sich schwer in Alkohol und Äther, leicht in Aceton, Ameisensäure und heißem Eisessig. Es hat keine sauren, wohl

<sup>1</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 46, 1, S. 511. 1913.

<sup>2</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 84, S. 262. 1913.

<sup>3</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 87, S. 423. 1913.

<sup>4</sup>) Zusammenstellung bei Willstätter u. Stoll: Untersuchung über das Chlorophyll. Berlin 1913, S. 392.

<sup>5</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 91, S. 186. 1914.

aber ausgesprochen basische Eigenschaften, es gibt schwer lösliche, krystallisierende Salze mit Pikrinsäure, Styphninsäure, Platinchlorwasserstoffsäure. Es ist zur Komplexsalzbildung mit geeigneten Schwermetallen wie sonstige Porphyrine befähigt.

**Spektrum.** Das Absorptionsspektrum zeigt hauptsächlich, neben Absorption im Violett, 4 Bänder: ein besonders scharfes und dunkles liegt im Blau, ein breiteres im Grün, ein eigentümlich gegliedertes im Gelbgrün, und im Orange ein schmales Band, dem gegen Gelb hin ein Schatten folgt.

Das aus Hämoporphyrin gewonnene Ätioporphyrin ist völlig identisch mit dem aus Chlorophyllderivaten erhaltenen, nur daß der Schmelzpunkt des letzteren etwas höher liegt, bei 280°.

**Vorkommen.** 293. **Uroporphyrin\*) (Harnporphyrin).** Beim Hämatoporphyrin wurde erwähnt (S. 407), daß im Harn bei verschiedenen Krankheiten und nach der Eingabe mancher Medikamente im Harn ein Porphyrin zu beobachten ist, das auf Grund des spektroskopischen Befundes als Hämatoporphyrin angesprochen wurde. Nachdem im Falle einer angeborenen Porphyrinurie durch H. Fischer nachgewiesen<sup>1, 2)</sup> wurde, daß es sich — neben einem besonderen Koproporphyrin (§ 294) — um ein spezielles Harnporphyrin, das Uroporphyrin, handelt, dessen Spektrum zwar dem des Hämatoporphyrins sehr ähnlich ist, das sich jedoch durch seine Zusammensetzung weitgehend unterscheidet, ist zweifelhaft geworden, inwieweit jene älteren Angaben über das Vorkommen von Porphyrin im Harn sich auf das eine oder andere der Porphyrine beziehen. Das Vorkommen von Uroporphyrin im Harn ist seitdem sichergestellt bei idiopathischer Porphyrinurie (Löffler<sup>3)</sup>, bei Trionalvergiftung (Ellinger und Rießer<sup>4)</sup>, in einem Fall hochgradiger Nervendegeneration (A b d e r h a l d e n<sup>5)</sup>, wahrscheinlich gemacht bei Sulfonalvergiftung und in den Knochen bei Osteohämochromatose von Schlachtieren (Schumm<sup>6)</sup>). Das Uroporphyrin war in den Fällen von H. Fischer nicht das einzige Porphyrin des Harns, daneben war noch das Koproporphyrin (§ 294) und wahrscheinlich noch ein Mittelglied zwischen diesen beiden Porphyrinen vorhanden. Ferner finden sich noch die Leukoverbindungen der Porphyrine. Über den Zusammenhang des Uroporphyrins mit dem Turacin s. § 321.

**Isolierung.** Die Isolierung des Uroporphyrins gelingt durch Überführung in den schön krystallisierenden Methylester (H. Fischer). 25 l Harn eines Patienten mit angeborener Porphyrinurie werden mit einem Überschuß an Eisessig versetzt, 300 ccm bei Harn, der noch nicht in ammoniakalische Gärung übergegangen ist, sonst entsprechend mehr. Nach Stehen über Nacht wird die überstehende klare Flüssigkeit nach Möglichkeit von dem entstandenen Niederschlag abgehebert und dann durch Kieselgur filtriert. Nach Waschen mit Wasser wird der Filterrückstand etwa 2 Stunden getrocknet, ohne ihn aber ganz eintrocknen zu lassen, dann in 40 ccm n-Natronlauge und 1 l Wasser aufgenommen und filtriert. Das Filtrat wird mit Essigsäure in geringem Überschuß versetzt, der entstehende Niederschlag auf gehärtetem Filter abgesaugt und gut ausgewaschen. Da die Isolierung des Farbstoffs aus dem Niederschlag, in dem er noch stark verunreinigt mit anderen Stoffen, darunter etwas Eiweiß, vorliegt, auf Schwierig-

\*) Wegen des Namens Uroporphyrin, und ebenso wegen des Namens Koproporphyrins statt Kotporphyrin vgl. Hammarsten, Lehrbuch der physiol. Chem., 9. Aufl. München u. Wiesbaden. 1922. S. 235. Anm. 6.

1) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 95, S. 34. 1915.

2) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 98, S. 78. 1916.

3) Biochem. Zeitschr. Bd. 98, S. 105. 1919.

4) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 98, S. 1. 1917.

5) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 106, S. 178. 1919.

6) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 96, S. 183. 1915/16.

keiten stößt, wird er zweckmäßig noch feucht auf den Methylester verarbeitet. Der Niederschlag wird mit 300 ccm Methylalkohol übergossen und dieser unter Eiskühlung mit Salzsäuregas gesättigt. Nach Stehen während 24 Stunden verdünnt man mit einem gleichen Volumen Methylalkohol, filtriert und gießt das Filtrat in das mehrfache Volumen Wasser. Man macht mit Soda vorsichtig alkalisch, extrahiert den Ester des Farbstoffs mit Chloroform und verdampft, nach Trocknung, das Chloroform. Der krystallinische Rückstand wird in 70 ccm Chloroform gelöst, filtriert, erwärmt und kochender Methylalkohol zugegeben. Es krystallisiert rasch der Ester des Uroporphyrins. In der Mutterlauge ist noch der Ester des Koproporphyrins enthalten (H. Fischer). Will man aus dem Ester das freie Uroporphyrin gewinnen — für die Identifizierung ist der Ester brauchbarer —, so kann man den Ester entweder mit Natronlauge kochen und dann essigsauer machen, oder den Ester mit der 60fachen Menge Bromwasserstoff-Eisessig 1 Stunde schütteln. Die klare Lösung in viel Wasser gegossen und mit Natriumacetat versetzt läßt die freie Säure ausfallen. Sie ist aus Pyridin-Alkohol mit Krystallpyridin oder aus Eisessig in schönen Krystallen zu erhalten, feine rote Nadeln, löslich in Äther, Alkohol, Eisessig und Pyridin. Aus dem essigsaurigen Harn ist das Uroporphyrin jedoch durch keins der üblichen Lösungsmittel, wie Äther, Chloroform usw., zu extrahieren. Unterschied von Koproporphyrin.

Im Harn kommt das Uroporphyrin teilweise als leicht oxydables Porphyrinogen vor.

Das Uroporphyrin hat die Formel  $C_{40}H_{36}O_{16}N_4$ . 14 Atome Sauerstoff sind in Form von 7 Carboxylgruppen nachweisbar. Es zeigt in  $n_{10}$ -Kalilauge 5 Absorptionsstreifen bei 613—603, 577—565, 561—552, 542—532, 511—496  $\mu\mu$ . In 19proz. Salzsäure sind 3 Streifen bei 598—590, 576—571, 558,5—544  $\mu\mu$  zu sehen (H. Fischer). Zusammensetzung  
Spektrum.

Zum Nachweis geeignet sind die Alkylester, die durch Stehenlassen mit salzsäurehaltigem Alkohol sich bilden. Der Methylester  $C_{47}H_{50}O_{16}N_4$  besteht aus Büscheln langer Nadeln, Fp. 290° unter Zersetzung, sehr schwer löslich in der Kälte in allen Lösungsmitteln außer Chloroform. Heißer Alkohol löst etwas, gut heißer Eisessig. Die Lösungen fluorescieren tiefrot. Spektroskopisch zeigt eine Chloroformlösung einen Schatten bei 587  $\mu\mu$  und 4 Streifen bei 628—620, 586—564, 541—526, 513—485  $\mu\mu$ . Die Eisessiglösung des Esters, mit einer solchen von Kupferacetat zusammengebracht, gibt ein komplexes Kupfersalz  $C_{47}H_{48}O_{16}N_4Cu$ , das nur noch 2 Absorptionsstreifen bei 580—560 und 545—520  $\mu\mu$  zeigt. Dieses Kupfersalz ist nach H. Fischer und Hilger<sup>1)</sup> höchstwahrscheinlich identisch mit dem Methylester des Turacins (§ 321). Ein Eisensalz  $C_{47}H_{48}O_{16}N_4FeCl$  gibt ein sehr an Häm in erinnerndes Spektrum. Der sehr ähnliche Äthylester  $C_{54}H_{64}O_{16}N_4$  schmilzt bei 220°. Nachweis als  
Ester.

Durch Kochen mit Jodwasserstoff-Essigsäure bei Gegenwart von Phosphor während 1 Stunde werden 4 Carboxyle abgespalten und Koproporphyrin erhalten. Bei energischer Reduktion mit Jodwasserstoff-Eisessig während 2 Stunden wurden keine Basen der Hämopyrrolfraktionen erhalten, dagegen Phonopyrrolcarbonsäure (§ 195). Bei der Oxydation mit Chromsäure entsteht das Imid einer carboxylierten Hämaminsäure,  $C_9H_9O_6N$ , das bei einer Sublimation im Vakuum in Hämaminsäure-Imid (§ 187) übergeht (H. Fischer<sup>2)</sup>). Umwandlungen.

**294. Koproporphyrin.** Es ist reichlich im Kot und Harn von Patienten mit Phorphyrinurie gemeinsam mit Uroporphyrin vorhanden (H. Fischer<sup>3)</sup>). Vorkommen.

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 128, S. 170. 1923.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 98, S. 78. 1916.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 96, S. 148. 1915/16; Bd. 97, S. 148. 1916; Bd. 98, S. 14. 1916.

Es ist als das primäre Produkt anzusehen, aus dem durch Einführung von 4 Carboxylgruppen das Uroporphyrin gebildet wird. Spektroskopisch und auf Grund seiner Löslichkeitsverhältnisse wäre das Porphyrin des normalen Harns und das bei manchen Erkrankungen gleichfalls Koproporphyrin (Schumm<sup>1</sup>), Papendiek<sup>2</sup>). Es findet sich in kleineren Mengen als normales Stoffwechselprodukt in den Faeces, anscheinend reichlicher nach Genuß von Fleisch (H. Fischer<sup>3</sup>).

**Isolierung.** Zur Darstellung des Koproporphyrins werden die Faeces von Patienten, die an Porphyrinurie leiden, getrocknet, 24 Stunden mit Äther und darauf 4—5 Stunden mit Alkohol ausgezogen, wodurch viele sonst störende Beimengungen entfernt werden. 3 malige Extraktion mit 1proz. Natriumbicarbonat entzieht dem Rückstand jetzt den Farbstoff, teilweise als Porphyrinogen, das sich während der weiteren Operationen oxydiert. Man sucht durch Dekantieren, Gießen durch ein feinmaschiges Drahtnetz und Filtration ein ganz blankes Filtrat zu erzielen, ohne Rücksicht auf die tagelange Dauer der Operationen. Die Filtrate, mit Essigsäure angesäuert, lassen den Farbstoff ausfallen. Man verarbeitet ihn, analog, wie beim Uroporphyrin geschildert (S. 414) auf den Methylester, den man in Chloroform überführt. Der Chloroformrückstand wird aus Chloroform-Alkohol umkrystallisiert. Amorph ausfallende Teile sind zu verwerfen. Durch alkalische Verseifung erhält man das freie Koproporphyrin, in langen, derben Prismen aus Äther oder Eisessig. Da es in Wasser kolloidal löslich ist, eine charakteristische Eigenschaft, kann man es nicht genügend auswaschen und nicht aschefrei erhalten. Bessere Eigenschaften hat der Methylester. Die freie Säure hat ähnliche Löslichkeitsverhältnisse wie das Uroporphyrin, nur löst sie sich leichter in Äther mit roter Farbe und ist einer wässrigen essigsauren Lösung, auch Harn, durch Äther zu entziehen. Ferner ist Koproporphyrin stärker basisch, es löst sich in nicht zu verdünnter Salzsäure.

**Zusammensetzung.** Die Formel des Koproporphyrins ist  $C_{36}H_{36}O_8N_4$ . Es enthält 3 Carboxylgruppen, die durch Stehenlassen mit saurem Methylalkohol leicht zu verestern sind. Es unterscheidet sich vom Uroporphyrin durch den Mindergehalt von 4 Carboxylen. Durch Abspaltung von 4 Carboxylen aus Uroporphyrin erhält man das Koproporphyrin (H. Fischer<sup>4</sup>). Spektroskopisch unterscheidet es sich durch das Fehlen eines Streifens vom Uroporphyrin, während die Analogie im Spektrum recht groß ist gegenüber Hämatoporphyrin. In alkalischer Lösung, in  $\frac{n}{10}$ -Kalilauge, zeigt Koproporphyrin 4 Streifen, bei  $\mu\mu$  619—614, 577—561, 541—528, 506—496. Die beiden mittleren Streifen sind am dunkelsten. In Salzsäure von 19% sind 2 Streifen zu beobachten bei 596—588 und 555—541  $\mu\mu$ , außerdem ein Schatten etwa bei 570  $\mu\mu$ .

**Methylester.** Der Methylester  $C_{39}H_{42}O_8N_4$ , lange, vielfach gebogene und verfilzte Nadeln, hat den Fp. 249—250°. Er gibt, analog wie der Methylester des Uroporphyrins, ein komplexes Kupfersalz  $C_{39}H_{40}O_8N_4Cu$ , mikroskopische Prismen, Fp. 285,5°, und eine Chlorferriverbindung  $C_{39}H_{40}O_8N_4FeCl$ , derbe Prismen aus Chloroform-Äther, die in Pyridin 3 Absorptionsstreifen zeigen: einen im Rot, zwei im Grün.

**Giftwirkung.** Bei Mäusen, die im Dunklen gehalten wurden, ist Koproporphyrin 2 mal so giftig wie Uroporphyrin, aber weniger giftig als Hämatoporphyrin. Im Licht ist infolge Photosensibilisation Uroporphyrin bedeutend giftiger, nicht viel weniger als Hämatoporphyrin (vgl. S. 409). Paramäcien werden im Licht nicht beeinflußt.

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 105, S. 158. 1919; Bd. 126, S. 169. 1923.

<sup>2</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 128, S. 111. 1923; Bd. 133, S. 97. 1924.

<sup>3</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 130, S. 306 u. S. 307 Anm. 1923; Bd. 132, S. 12. 1924.

<sup>4</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 97, S. 115. 1916.

Der Nachweis im Kot ist am sichersten durch die Isolierung des Methyl-esters und dessen Kupfersalz zu führen. Zur vorläufigen Orientierung zieht man eine kleine Probe des Kotes mit Alkohol aus, der mit Salzsäure gesättigt ist. Intensive Rotfärbung und Auftreten des charakteristischen Spektrums zeigen Koproporphyrin an. Im Harn prüft man, ob nach starkem Ansäuern mit Essigsäure mit Äther ein roter Farbstoff extrahierbar ist, der mit Salzsäure von 19% aufgenommen das Porphyrinspektrum zeigt. Nachweis.

#### **Gallenfarbstoffe.**

295. **Bilirubin** findet sich, neben Biliverdin (§ 298) und anderen an Menge zurücktretenden Gallenfarbstoffen (S. 418), in der Galle sämtlicher untersuchter Vertebraten, ferner im Dünndarm, dem Blutserum des Menschen, des Pferdes und anderer Tiere. Bei Ikterus tritt es in den Geweben und im Harn auf. Angereichert findet es sich als Magnesium- und Calciumverbindung in Gallenkonkreten; Rindergallensteine sind besonders reich daran. Bei menschlichen Gallensteinen überwiegt meist der Cholesteringehalt. Vorkommen.

Daß das Bilirubin und die Gallenfarbstoffe überhaupt einer Umwandlung des Blutfarbstoffs in der Leber ihre Entstehung verdanken, ist experimentell vielfach belegt. So erscheint subcutan gegebenes Hämatin fast vollständig als Gallenfarbstoff in der Galle wieder (Brugsch und Yoshimoto<sup>1</sup>). Der Zusammenhang von Hämatin und Bilirubin ergibt sich auch aus den gemeinsamen Abbauprodukten (§§ 187—195). Strittig war dagegen, ob es eine Bildung von Bilirubin außerhalb der Leber gibt. Da sich jedoch die in alten Blutextravasaten und Cystenflüssigkeiten findenden sog. Hämatoidinkristalle (Virchow<sup>2</sup>) als identisch mit Bilirubin erwiesen haben, ist eine gelegentliche extrahepatische Bilirubinbildung aus Blutfarbstoff nicht zu bezweifeln (H. Fischer und Reindel<sup>3</sup>). Beziehung zum Blutfarbstoff.

Zur Darstellung<sup>4</sup>) von Bilirubin benutzt man, wie schon früh festgestellt wurde, statt der menschlichen Gallensteine (Städeler) besser Rindergallensteine, wobei man der Methode von Küster<sup>5</sup>) folgt. Frische, dem Aussehen nach an Farbstoff reiche Gallensteine werden äußerlich von Schleim befreit, bei 100° getrocknet und fein gemahlen. Je 150 g des Pulvers werden mit siedendem Äther 3 Tage extrahiert, dann mit 15—20 l siedendem Wasser, bis das Waschwasser farblos bleibt, schließlich mit heißer 10proz. Essigsäure. Auch ganz verdünnte Salzsäure wird statt der Essigsäure angewandt (H. Fischer<sup>6</sup>). Man wäscht die Säure, die den Gallenfarbstoff aus seiner Calcium- und Magnesiumverbindung in Freiheit gesetzt hat, mit Wasser sorgfältig fort, trocknet im Dampfschrank, extrahiert 24 Stunden mit Äther, dann einige Tage mit kaltem absoluten Alkohol, mit dem geschüttelt wird, bis er nicht mehr grün gefärbt wird. Diese ganzen Extraktionen entfernen nur Beimengungen und lassen das Bilirubin ungelöst, nur der zweite Ätherextrakt enthält kleine Mengen des Farbstoffs. Zur Extraktion des Bilirubins wird sofort anschließend, unter Lichtabschluß, der Rückstand im Soxhletschen Apparat solange mit Chloroform extrahiert, Hämatoidin.

<sup>1</sup>) Zeitschr. f. exp. Pathol. u. Therap. Bd. 8, S. 639. 1911. Dort Literatur.

<sup>2</sup>) Ann. d. Chem. u. Pharm. Bd. 78, S. 353. 1851.

<sup>3</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 127, S. 299. 1923.

<sup>4</sup>) Valentiner: Günzburgs Zeitschr. 1858, S. 46 (zit. nach Küster<sup>5</sup>). — Städeler: Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 132, S. 323. 1864. — Maly: Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 132, S. 127. 1864; Bd. 175, S. 76. 1874; Bd. 181, S. 106. 1876. — Thudichum: Journ. f. prakt. Chem. Bd. 104, S. 196. 1868. Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 181, S. 242. 1876.

<sup>5</sup>) Biol. Arbeitsmethoden, Abt. I, Teil 8, S. 323. 1922; Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 121, S. 80. 1922.

<sup>6</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 73, S. 217. 1911.

bis dieses nur noch ganz schwach gefärbt ist, was oft erst nach 8 Tagen der Fall ist. Der Farbstoff fällt größtenteils schon bei der Extraktion in Krusten aus, durch Einengen des Lösungsmittels auf den vierten Teil gewinnt man eine weitere kleine Menge. Es ist meistens lohnend, das zurückbleibende Gallensteinpulver nochmals der Behandlung mit 10proz. Essigsäure, Äther, Alkohol und Chloroform zu unterwerfen. Dem dann verbleibenden Rückstand kann durch Übergießen mit 96proz. Essigsäure das Choleprasin entzogen werden, ein noch nicht rein erhaltener, Aminosäuren enthaltender Komplex (Küster<sup>1</sup>), Küster und Reihling<sup>2</sup>). Der dann noch ungelöst bleibende, sicher nicht einheitliche Teil ist als Bilihumin bezeichnet worden (Städeler, Küster). In menschlichen Gallensteinen sind noch andere Beimengungen beschrieben, Biliprasin, Bilifuscin (Städeler, v. Zumbusch<sup>3</sup>).

**Reinigung von Rohbilirubin.** Das durch Chloroformextraktion gewonnene Bilirubin ist noch nicht rein, es enthält, aus dem Chloroform stammend, Chlor und außerdem Schwefel (H. Fischer<sup>4</sup>). Ferner beobachtet man 2 Bilirubinmodifikationen, eine orange und eine rotbraun gefärbte, die sich etwas in der Löslichkeit unterscheiden. Die orange Modifikation ist die gewöhnliche. Zur Reinigung führt man in das schön krystallisierende Bilirubinammonium (Küster<sup>5</sup>) über. Je 10 g des feingepulverten Rohbilirubins übergießt man mit 75 ccm siedendem absoluten Methylalkohol, leitet unter evtl. Erwärmen auf dem Wasserbad solange Ammoniakgas ein, bis alles Bilirubin gelöst, filtriert heiß, wäscht 2 mal mit je 15 ccm heißem, mit NH<sub>3</sub> gesättigtem Methylalkohol und läßt in einer Kältemischung auskrystallisieren. Bei sehr geringem Ausfall, besonders bei der rotbraunen Bilirubinmodifikation kann dies eintreten, engt man im Wasserstoffstrom auf die Hälfte ein, sättigt wieder mit Ammoniak und kühlt in einer Kältemischung. Aus der Mutterlauge gewinnt man den Rest an Bilirubinammonium durch Eingießen in 600 ccm trockenen Äthers in dünnem Strahl. Zur Zerlegung des Bilirubinammoniums extrahiert man tagelang im Soxhlet mit Chloroform. In den ersten Tagen wird unter Ammoniakentwicklung das Bilirubin in Freiheit gesetzt, das etwa vom 6. Tage an reichlicher in Lösung geht. In der Hülse zurück bleibt die schwefelhaltige Verunreinigung, das extrahierte Bilirubin ist jedoch dafür stärker chlorhaltig geworden. Man reinigt es endgültig, indem man es wieder in Bilirubinammonium verwandelt und dies in der 5fachen Menge Methylalkohol heiß löst. Beim Erkalten krystallisiert die Hauptmenge des freien Bilirubins aus, der Rest nach 6stündigem Kochen des Filtrats bis zum Aufhören der Ammoniakentwicklung. Man wäscht mit kaltem Methylalkohol und Äther und trocknet bei 60° im Vakuum.

Statt der umständlichen doppelten Chloroformextraktion läßt sich vielfach auch das mit Äther, Alkohol, Essigsäure, Äther vorbehandelte Gallensteinpulver direkt mit der 4fachen Menge Methylalkohol extrahieren, wenn man diesen nach dem Eintragen des Pulvers heiß mit Ammoniak sättigt. Es geht der Farbstoff als Bilirubinammonium in Lösung. Er kann durch Eingießen in die 40fache Menge Äther krystallisiert gewonnen werden. Schon beim Abdestillieren des Äthers verliert der Körper Ammoniak und geht in krystallisiertes Bilirubin über. Das Verfahren versagt jedoch gelegentlich (Küster).

**Isolierung aus Flüssigkeiten.** Um Bilirubin aus Flüssigkeiten, welche gleichzeitig Blutfarbstoff, Methämoglobin, Urobilin usw. enthalten, zu isolieren, fällt man nach einem auf Huppert<sup>6</sup>) zurückgehenden Verfahren mit einer mäßigen Quantität Kalkmilch

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 47, S. 322. 1906; Bd. 121, S. 92. 1922.

<sup>2</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 94, S. 163. 1915. <sup>3</sup>) desgl. Bd. 31, S. 446. 1901.

<sup>4</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 95, S. 78. 1915. <sup>5</sup>) desgl. Bd. 99, S. 86. 1917.

<sup>6</sup>) Arch. f. Heilkunde Bd. 8, S. 351 u. 476. 1869.



unter gutem Umschütteln, leitet sofort, um die Zersetzung von Blutfarbstoff oder Methämoglobin zu beschränken, Kohlensäure ein und filtriert. Den ausgewaschenen Niederschlag bringt man in Alkohol, fügt Chloroform und dann Essigsäure bis zur Übersättigung des Kalks hinzu, filtriert und scheidet das Chloroform durch Zufügen von Wasser ab. Die Chloroformlösung wird abgegossen, durch ein trockenes Filter filtriert und verdunstet. Das zurückbleibende Bilirubin kann mit etwas Alkohol und Äther gewaschen werden. Quantitativ genau ist diese Bestimmung nicht, sie gibt viel zu niedrige Werte, weil die Kalkfällung nicht vollkommen ist, auch bei der weiteren Behandlung etwas Bilirubin zersetzt wird. Die ganze Prozedur muß so schnell wie möglich ausgeführt werden. Hämatin wird aus Flüssigkeiten durch den Kalk wie Bilirubin gefällt und gelangt mit letzterem in die Chloroformlösung. Hämatin findet sich aber im Organismus nicht, höchstens im Magen und Darmkanal.

Diese Nachteile vermeidet ein von Hymans v. d. Bergh und de la Fontaine-Schlüter<sup>1)</sup> für Serum und ähnliche eiweißhaltige Flüssigkeiten ausgearbeitetes Verfahren. Man fällt das Serum mit dem doppelten Volumen an reinem Aceton, filtriert vom Eiweißniederschlag ab und verdunstet das Aceton im Vakuum. Die zurückbleibende wässrige Bilirubin-Alkalilösung wird durch mehrmaliges Ausschütteln mit Äther von Fett usw. befreit, der Äther wieder im Vakuum entfernt, die wässrige Schicht mit Salz- oder Essigsäure angesäuert und das Bilirubin mit Chloroform oder Essigäther extrahiert. Beim Einengen und Stehenlassen bei 0° krystallisiert das Bilirubin leicht aus.

Die Formel des Bilirubins, die ursprünglich nach dem Vorgang von Städeler als  $C_{16}H_{18}O_3N_2$  oder  $C_{32}H_{36}O_6N_4$  angenommen wurde, ist nach H. Fischer<sup>2)</sup> und Küster<sup>3)</sup> richtiger  $C_{33}H_{36}O_6N_4$ . Die 4 Stickstoffatome werden in 4 teilweise oxydierten Pyrrolringen angenommen, von den Sauerstoffen 4 in Form zweier Carboxyle. Zusammensetzung.

Reines Bilirubin aus Gallensteinen krystallisiert aus heißem Dimethylanilin beim Erkalten meist in breiten, an beiden Enden schief abgeschnittenen rotbraunen Säulen und auch in charakteristischen Keulenformen (Küster). Die Krystalle halten leicht etwas Dimethylanilin zurück. Aus Chloroform scheidet es sich beim Verdunsten in monoklinen Tafeln ab, aus Phenol in feinen hellgelben Nadeln. Die Krystallform kann aber stark wechseln, je nach der Vorbehandlung und Herkunft des Bilirubins. Krystallographische Angaben von v. Groth, Holst und Steinmetz mit Abbildungen bei H. Fischer und Reindel. Bilirubin färbt sich von 360° an dunkel und ist bei 400° noch nicht geschmolzen. Reines krystallisiertes Bilirubin hat eine schöne gelbrote Farbe, eine zweite, leichter lösliche Modifikation ist braunrot. Bilirubin ist völlig unlöslich in Wasser und Glycerin, sehr wenig löslich in Äther, Benzol, Schwefelkohlenstoff, Amylalkohol, etwas löslicher in Alkohol. In Dimethylanilin löst es sich wie 1 : 100, in heißem sehr viel reichlicher. Die Löslichkeit in Chloroform ist wie 1 : 120 bis 1 : 1450, je nach der Darstellung (Küster<sup>4)</sup>). Alle Lösungen haben gelbe bis bräunlichrote Farbe. In einer 1,5 cm dicken Schicht ist noch bei 500 000facher Verdünnung gelbliche Färbung zu erkennen. In alkalischen Flüssigkeiten löst es sich leicht auf und wird, soweit es nicht zersetzt ist, durch Salzsäure aus diesen Lösungen unverändert wieder abgeschieden. Da die Eigenschaften.

<sup>1)</sup> Kon. Akad. v. Wetensch., Wis. en Naturk. Afd. Bd. 23, S. 733. 1914; Malys Jahrb. d. Tierchem. Bd. 44, S. 288. 1914.

<sup>2)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 47, 2, S. 2330. 1914; Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 95, S. 78. 1915.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 99, S. 86. 1917.

<sup>4)</sup> Handb. d. biol. Arbeitsmethoden (Abderhalden), Abt. I, Teil 8, S. 330. 1922.

- Verbindungen: Alkaliverbindungen in Chloroform unlöslich sind, kann man einer Chloroformlösung mit Alkalien das Bilirubin durch verdünntes Alkali entziehen (Unterschied von Lipochromen). Aus einer konzentrierten wässerigen Lösung wird durch konzentrierte Natronlauge Bilirubinnatrium ausgefällt. Ammoniak, in eine Suspension von Bilirubin mit  $\text{NH}_3$  in heißem Methylalkohol eingeleitet, verwandelt in das Bilirubinammonium  $\text{C}_{33}\text{H}_{36}\text{O}_6\text{N}_4 \cdot \text{NH}_3$ , eine in der Kälte in schönen braunroten Nadeln krystallisierende Substanz, zur Reinigung des Bilirubins sehr geeignet (Küster). Beim Kochen mit Methylalkohol, Äther und Chloroform verliert es sein Ammoniak wieder.
- mit Ca Bilirubincalcium fällt auf Zusatz von Chlorcalcium zu einer ammoniakalischen Bilirubinlösung als rostfarbiger flockiger Niederschlag aus, der, über Schwefelsäure im Vakuum getrocknet, metallisch glänzend dunkelgrün erscheint, zerrieben ein dunkelbraunes Pulver  $\text{C}_{33}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{O}_6\text{Ca}$  darstellt und in Wasser, Alkohol, Äther und Chloroform unlöslich ist. Auch durch Chlorbarium, Bleizucker, Bleiessig und Silbernitrat wird eine ammoniakalische Bilirubinlösung gefällt, die Silberverbindung bildet bräunlichviolette Flocken. Silberoxyd wird durch Bilirubin nicht reduziert, auch beim Kochen nicht. Mit Diazomethan bildet sich ein Ester. Dimethylester, unter gleichzeitiger Addition von Diazomethan (Küster).
- Azoverbindungen. Bilirubin ist, wie zuerst P. Ehrlich<sup>1)</sup> feststellte, mit Diazobenzolsulfosäure zu kuppeln, wenn man eine Chloroformlösung des Bilirubins bei Gegenwart von Alkohol mit der sauren Diazolösung zusammenbringt und einige Zeit, 5 bis 30 Minuten, stehen läßt. Die Gegenwart überschüssiger Säure ist nicht erforderlich, man kann auch von den fertigen Diazosalzen ausgehen, überschüssige salpetrige Säure ist zu vermeiden (H. Fischer und Reindel<sup>2)</sup>). Statt der diazotierten Sulfanilsäure sind auch andere Komponenten brauchbar; Diazolösungen aus Aminoacetophenon (Pröscher<sup>3)</sup>), Tribromanilin (Orndorff und Teeple<sup>4)</sup>), Anilin (H. Fischer und Barrenscheen<sup>5)</sup>) sind angewendet worden. Es treten im allgemeinen 2 Azogruppen in das Molekül ein  $\text{C}_{33}\text{H}_{34}\text{O}_6\text{N}_4(\text{N}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{R})_2$ , nur zu kleinerem Prozentsatz bildet sich auch ein Monoazofarbstoff  $\text{C}_{33}\text{H}_{35}\text{O}_6\text{N}_4(\text{N}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{R})$ . Die Azofarbstoffe sind in sauren Lösungen blauviolett bis blau, in neutralen rot. Schüttelt man die Chloroformlösung mit Alkali, so wandert der Farbstoff in die wässrige Schicht, und zwar bei Bilirubin aus Gallensteinen mit blauvioletter Farbe, aus Serum oder Sekreten mit gelber bis grünlicher Farbe (H. Fischer und Reindel). Dieser Unterschied bedarf noch der Klärung. Die Diazoreaktion des Bilirubins ist besonders für klinische Zwecke zum Nachweis und zur ungefähren Bestimmung des Bilirubins im Serum ausgestaltet. Ihre Empfindlichkeitsgrenze soll 1 : 1 500 000 sein (Hymans v. d. Bergh und Snapper<sup>6)</sup>).
- Spektrum. Bilirubinlösungen zeigen keine Absorptionsstreifen, auch nicht im violetten und ultravioletten Teil des Spektrums. Setzt man aber einer verdünnten Lösung von Bilirubinalkali in Wasser Ammoniak im Überschuß und Chlorzinklösung hinzu, so wird sie zunächst tiefer orange, dann olivenbraun und grün, und zeigt einen Streifen im Rot zwischen *C* und *D* nahe an *C*. Zum Nachweis des Bilirubins geeignet (Hammarsten<sup>7)</sup>). Eine andere Ausführungsform arbeitet in alkoholischer Lösung mit Zinkacetat unter vorsichtigem Zusatz von Jod, wobei 2 Streifen, zwischen *C* und *B* und bei *D*, auftreten (Auché<sup>8)</sup>).

1) Zeitschr. f. analyt. Chem. Bd. 23, S. 275. 1884.

2) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 127, S. 306. 1923.

3) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 29, S. 411. 1900.

4) Americ. chem. Journ. Bd. 33, S. 215. 1905.

5) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 115, S. 94. 1921.

6) Dtsch. Arch. f. klin. Med. Bd. 110, S. 540. 1913.

7) Lehrb. d. physiol. Chem. 9. Aufl. 1922, S. 343.

8) Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 146, S. 496. 1908.

Bilirubin ist leicht veränderlich, besonders durch Oxydationsmittel, als welches schon der Luftsauerstoff wirken kann. Eisessig bei Luftzutritt bewirkt allmählich Grünfärbung unter Lösung (Küster), auch geschmolzene Mono-<sup>1)</sup> und Trichloressigsäure<sup>2)</sup> lösen mit grüner Farbe. Bromwasserstoff-Eisessig löst dunkelviolet unter Anlagerung von HBr (Küster und Reihling). Selbst eine Chloroformlösung erleidet im Licht Farbumschlag in Grün.

Umwandlungen in  
andere Farbstoffe.

Wenn man Bilirubin in alkalischer Lösung auf flachen Tellern der Luft aussetzt, so wird die Lösung grün durch Bildung von Biliverdin (§ 298). Ähnliche grüne Farbstoffe bilden sich auch durch Cl, Br oder Jod. Vermischt man eine schwach alkalische oder neutrale Bilirubinlösung mit nicht zu verdünnter Salpetersäure, die etwas salpetrige Säure enthält (wie dies gewöhnlich der Fall ist), so geht die Farbe der Flüssigkeit zunächst in Grün, dann in Blau, Violett, Rot und endlich in Gelb über. Auf dieser Reaktion beruhen die Gmelinsche und Hammarstensche Reaktion (S. 421 u. 422).

Von den hierbei auftretenden Farbstoffen wird der blauviolette Bilicyanin<sup>3)</sup> (Choleverdin, Bilicyanin, Cholecyanin<sup>4)</sup> und der rotgelbe Choletelin<sup>5)</sup> genannt. Eine Reindarstellung dieser Körper ist keineswegs gelungen (Maly fand für das Choletelin *C* 55,5, *H* 5,3%), doch kennt man durch die Untersuchungen von Jaffe<sup>6)</sup>, Heynsius und Campbell, Stokvis ihre spektroskopischen Eigenschaften. Die stark sauren violettblauen Bilicyaninlösungen zeigen zwei oder, wenn die Oxydation schon etwas vorgeschritten ist, drei Streifen, von denen die beiden ersten vor *D* und zwischen *D* und *E* liegen, der dritte (also erst bei weiterer Oxydation auftretende) vor *F*. Bei neutraler Reaktion sind die Lösungen des Bilicyanin blaugrün oder stahlblau mit roter Fluoreszenz und bei alkalischer grün. Die sauren gelbbraunen Lösungen des Choletelin zeigen nur einen Streifen, und zwar vor *F*.

Choletelin.

Bei der Oxydation des Bilirubins, entweder in Eisessig mit Chromsäure oder in alkalischer Lösung durch Luftsauerstoff, besser durch Natriumsuperoxyd, entsteht das Anhydrid der dreibasischen Hämatinsäure (§ 189) (Küster<sup>7)</sup>. Oxydation mit Eisenchlorid in Eisessig verwandelt in zwei noch nicht rein erhaltene Farbstoffe Dehydroxybilirubin und Bilinigrin (Küster<sup>8)</sup>. Oxydation mit Nitrit liefert das Oxim der Isophonopyrrolcarbonsäure (Fischer und Röse<sup>9)</sup>.

Abbau durch  
Oxydation

Die reduktive Spaltung des Bilirubins (§ 190) ist nur schwierig zu erreichen. Erhitzen mit Jodwasserstoff-Eisessig ergibt bei kürzerer Einwirkung Bilirubinsäure (§ 296) neben Phono- und Isophonopyrrolcarbonsäure, bei längerer Einwirkung wenig Kryptopyrrol und größere Mengen an Isophonopyrrolcarbonsäure (Fischer und Röse<sup>10)</sup>. Die Aufspaltung mit Kaliummethylat unter Druck führt zu Phyllopyrrol und Trimethylpyrrolpropionsäure (Fischer und Röse).

durch Reduktion.

Über weitere Reduktionsprodukte vgl. die folgenden § 296, 297.

Zum Nachweis des Bilirubins dienen folgende Proben:

1. Gmelinsche Probe. Bringt man in ein Zylinderglas eine wässrige Bilirubin- (oder Biliverdin-) Lösung und, am besten mit einer Pipette, darunter eine Salpetersäure (spezifisches Gewicht mindestens 1,4), die etwas salpetrige Säure enthält, mit der Vorsicht, daß die Flüssigkeiten sich nicht zu sehr an der Grenze mischen, so bildet sich eine Farbenskala in der Reihenfolge aus, daß unten zunächst an der Salpetersäure gelbrote, darüber rote, dann violette,

Bilirubin-Nachweis.

<sup>1)</sup> Küster: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 94, S. 137. 1915.

<sup>2)</sup> Piettre: Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 147, S. 1492. 1909.

<sup>3)</sup> Heynsius u. Campbell: Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 4, S. 497. 1871.

<sup>4)</sup> Stokvis: Maandblad v. d. Genootsch. teer bevord van Nat. gen. usw. Amsterdam 1870, S. 10. Zentralbl. f. med. Wiss. 1872, S. 785 u. 1873, S. 449.

<sup>5)</sup> Maly: Sitzungsber. d. Wien. Akad. Bd. 59, II, S. 597. 1869.

<sup>6)</sup> Zentralbl. f. med. Wiss. 1868, S. 241.

<sup>7)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 26, S. 314. 1898; Bd. 59, S. 87. 1909.

<sup>8)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 91, S. 58. 1914. <sup>9)</sup> desgl. Bd. 82, S. 403. 1912.

<sup>10)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 45, S. 1581. 1912; Bd. 47, S. 794. 1914.

darüber blaue und zu oberst grüne Färbung erkennbar wird. Die Reaktion gelingt noch gut bei einer Verdünnung von 1:80 000. Eiweiß stört diese Reaktion nicht, mäßiger Gehalt an Urobilin im Harn oder von Lutein im Blutserum ebenfalls nicht erheblich, wohl aber die dunkle Färbung von Methämoglobin oder Hämatin.

2. Hammarstenske Probe<sup>1)</sup>. Von einem Säuregemisch, welches aus 1 Tl. 25proz. Salpetersäure und 19 Tl. 25proz. Salzsäure besteht, durch Stehen gelblich geworden sein muß und sich mindestens 1 Jahr hält, mischt man vor jedesmaligem Gebrauch 1 Tl. mit 4 Tl. Alkohol. Setzt man zu einigen Kubikzentimetern dieser sauren, farblosen Flüssigkeit einige Tropfen Bilirubinlösung, so entsteht sofort eine dauerhafte, schön grüne Farbe. Durch Zusatz von mehr Säuregemenge zu dieser grünen Flüssigkeit kann man sehr leicht nacheinander und beliebig langsam sämtliche Farben der Gmelinschen Reaktion erhalten.

3. Das S. 420 unten beschriebene spektroskopische Verhalten nach Zusatz von Ammoniak und Chlorzink zu der verdünnten Bilirubinalkalilösung.

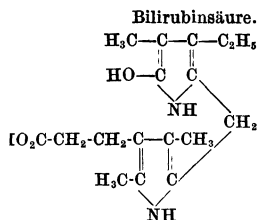
4. Das Verhalten gegen Diazolösung (S. 420). Die Galle soll diese Probe nach Ehrlich direkt geben, reines Bilirubin jedoch erst nach Zusatz von Alkohol, wenig Alkali oder schwachen Säuren (Hymans v. d. Bergh und Muller<sup>2)</sup>). Der günstige katalytische Einfluß des Alkohols wird auch von H. Fischer bestätigt.

Nachweis im Harn, im Serum. Über den Nachweis von Gallenfarbstoffen im Harn s. § 621. Zum Nachweis im Serum wird dieses mit dem doppelten Volumen Alkohol von 96% gefällt und die alkoholische Lösung am besten nach 4. untersucht (Hymans v. d. Bergh und Snapper).

Quantitative Bestimmung. Zur quantitativen Bestimmung des Bilirubins sind spektrophotometrische und colorimetrische Methoden vorgeschlagen worden (Herzfeld<sup>3)</sup>, v. d. Bergh<sup>4)</sup>).

Reduktionsprodukt des Bilirubins. 296. Reduktionsprodukte des Bilirubins. Die Reduktion des Bilirubins ist, abgesehen von der im vorigen Paragraph behandelten völligen Spaltung, in recht verschiedener Richtung zu leiten. Die Reduktion in alkalischer Lösung mit Wasserstoffpalladium führt zum Mesobilirubin  $C_{33}H_{40}O_6N_4$  (H. Fischer<sup>5)</sup>, die mit Natriumamalgam, von Maly zuerst versucht<sup>6)</sup>, zum Mesobilirubinogen  $C_{33}H_{44}O_6N_4$  (H. Fischer, H. Fischer und P. Meyer<sup>7)</sup>, identisch mit dem Urobilinogen (§ 297), die mit Jodwasserstoff-Eisessig zur Bilirubinsäure.

**Bilirubinsäure**,  $C_{17}H_{24}O_3N_2$ , fast gleichzeitig von Piloty und Thannhauser<sup>8)</sup> und H. Fischer<sup>9)</sup> erhalten. Zu Büschel vereinigte Blättchen, leicht löslich in Laugen und Natriumcarbonat, Methyl- und Äthylalkohol, Chloroform und Eisessig, schwer in Essigester, kaum in Benzol und Petroläther. Fp. 187°. Mit dem Ehrlichschen Reagens (S. 420) erfolgt keine Färbung. Oxydation mit Permanganat führt zur Xanthobilirubinsäure (Piloty und Thannhauser<sup>10)</sup>, H. Fischer<sup>11)</sup>. Reduktion ergibt neben wenig Kryptopyrrol und Phonopyrrolcarbonsäure Isophonopyrrolcarbonsäure. Sie ist ein Dipyrrylmethanderivat (Fischer und Röse<sup>12)</sup>).



- 1) Maly's Jahresber. d. Tierchem. 1898, S. 310.
- 2) Biochem. Zeitschr. Bd. 77, S. 90. 1916.
- 3) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 77, S. 280. 1912.
- 4) Hymans v. d. Bergh: Gallenfarbstoffe im Blut. Leipzig. 1918.
- 5) Zeitschr. f. Biol. Bd. 65, S. 163. 1914; Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 47, 2, S. 2330. 1914; Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 127, S. 322. 1923.
- 6) Ann. d. Chem. u. Pharm. Bd. 163, S. 77. 1872.
- 7) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 75, S. 342. 1911.
- 8) Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 390, S. 202. 1912.
- 9) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 45, 2, S. 1579. 1912. <sup>10)</sup> desgl. Bd. 45, 2, S. 2393. 1912.
- 11) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 46, 1, S. 439. 1913.
- 12) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 45, 3, S. 3274. 1912; Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 89, S. 255. 1914.

Das **Mesobilirubin**,  $C_{33}H_{40}O_6N_4$ , derbe schwefelgelbe Prismen aus Chloroform, feine verfilzte **Mesobilirubin**. Nadeln aus Pyridin, löslich in Essigester, unlöslich in Eisessig. Es löst sich in Natronlauge, nicht in Carbonaten. Fp. 300—315°. Es gibt die Reaktion nach Gmelin auf Gallenfarbstoffe (S. 421) nicht die mit dem Reagens von Ehrlich (S. 420). Weitere Reduktion mit Natriumamalgam oder Wasserstoff-Palladium führt zum Mesobilirubinogen.

297. **Mesobilirubinogen (Urobilinogen)**,  $C_{33}H_{44}O_6N_4$ . Von Jaffe<sup>1)</sup> wurde zuerst darauf aufmerksam gemacht, daß in jedem normalen Harn, reichlicher in pathologischen Fällen im Harn, ein Chromogen vorkommt, das Urobilinogen, **Urobilinogen**. das mit großer Leichtigkeit bei Einwirkung von Luft und Licht in einen roten Farbstoff übergeht, das Urobilin (§ 303), für das vor allem, neben seinem Absorp- **Urobilin**. tionsspektrum, eine starke grüne Fluoreszenz auf Zusatz von Zinkchlorid und Ammoniak charakteristisch ist. Identisch damit erschien ein entsprechender Farbstoff der Faeces, das Stercobilin. Die Reindarstellung des Urobilins ist noch nicht gelungen, trotz zahlreicher Bemühungen (Fr. Müller und Gerhardt<sup>2)</sup>, Garrod und Hopkins<sup>3)</sup>, es ist sogar sehr wahrscheinlich, daß die Umwandlung des Chromogens in den Farbstoff überhaupt nicht in einer Richtung geht und das sog. Urobilin vielmehr ein Gemisch von gefärbten Substanzen darstellt. Rein dargestellt ist dagegen das Chromogen, das Urobilinogen (H. Fischer und Meyer - Betz<sup>4)</sup>).

Es erwies sich als identisch mit dem Chromogen, das man durch Re- **Mesobilirubinogen**. duktion von Bilirubin mit Natriumamalgam erhalten kann. Die Reduktion von Bilirubin hat nach ersten Versuchen von Städeler<sup>5)</sup> ausführlicher Maly<sup>6)</sup> untersucht, der aber übersah, daß er anfänglich eine farblose Substanz erhielt (Disqué<sup>7)</sup>, die erst bei Luftzutritt in eine gefärbte Substanz überging, das sog. Hydrobilirubin Malys, nach ihm identisch mit Urobilin. Erst H. Fischer<sup>8)</sup> isolierte die primären Reduktionsprodukte des Bilirubins, unter denen zu etwa 50% das Mesobilirubinogen auftrat, zunächst wegen der hälftigen Ausbeute als Hemibilirubin bezeichnet. Im Tierkörper wird die entsprechende Reduktion des Gallenfarbstoffs durch die Darmbakterien bewirkt (Fr. Müller<sup>9)</sup>, Kämmerer und Miller<sup>10)</sup>. Das Mesobilirubinogen geht dann durch Luftsauerstoff in ein Farbstoffgemisch vom Urobilintyp über, sodaß die Anschauung von Maly — allerdings mit jener Reserve wegen der Einheitlichkeit der Substanz — wieder zu Recht besteht, daß Hydrobilirubin und Urobilin identisch sind, trotz abweichender Analysendaten, besonders im Stickstoffgehalt. Verschieden sind dagegen, trotz ähnlichen Spektralbefunds, analoge Reduktionsprodukte aus Hämin und dessen Porphyrinen. Sicher einheitlich und voll identisch sind das Urobilinogen und das Mesobilirubinogen (H. Fischer und Meyer - Betz). Diese Muttersubstanz des Urobilins findet sich im frischen **Vorkommen**. Harn, frischen Faeces und der Galle.

Nach H. Fischer und Meyer - Betz wird zur Darstellung von Urobilinogen **Darstellung aus Harn**. pathologischer Harn, der die Ehrlichsche Aldehydreaktion (Anhang) stark zeigt, möglichst frisch in einer 20-l-Flasche, die 500 ccm Chloroform enthält, gesammelt,

1) Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. Bd. 47, S. 405. 1869.

2) Gerhardt: Inaug.-Dissert. Berlin 1889.

3) Journ. of physiol. Bd. 20, S. 112. 1896; Bd. 22, S. 451. 1898.

4) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 75, S. 232. 1911. Dort auch Literatur.

5) Ann. d. Chem. u. Pharm. Bd. 132, S. 323. 1864. <sup>6)</sup> desgl. Bd. 163, S. 88. 1872.

7) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 2, S. 259. 1878/79.

8) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 73, S. 222. 1911. — H. Fischer u. P. Meyer: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 75, S. 339. 1911.

9) Jahresber. d. Schles. Ges. f. vaterl. Kultur, Breslau 1892; zit. nach H. Fischer u. Meyer-Betz.

10) Wien. klin. Wochenschr. Bd. 35, S. 639. 1922; Ergebn. d. ges. Physiol. Bd. 15, S. 80. 1923; Deutsch. Arch. f. klin. Med. Bd. 141, S. 318. 1923.

bis die Flasche gefüllt ist. Man säuert mit Eisessig bis zur stark sauren Reaktion auf Lackmus an und extrahiert 2 mal mit Chloroform. Die vereinigten, von jeder Emulsion befreiten Chloroformextrakte werden mit 1 proz. Ammoniaklösung extrahiert. Die Ammoniaklösung wird erst 3 mal mit Äther ausgeschüttelt, dann mit 50 proz. Schwefelsäure eben kongosauer gemacht und mit Chloroform extrahiert. Die Chloroformlösung wird mit Natriumsulfat getrocknet, im Vakuum bei 25° zur Trockne eingedampft, der Rückstand mit 3—4 ccm Essigester aufgenommen und filtriert. Beim Verdunsten des Essigesters krystallisiert das Urobilinogen. Bei der Darstellung ist möglichst unter Ausschluß von Licht und Luft zu arbeiten.

Darstellung durch Reduktion von Bilirubin.

Um es aus Gallenfarbstoff durch Reduktion zu erhalten, werden 5 g Bilirubin mit 40 ccm  $n_{10}$ -Lauge und 20 ccm Wasser 2 Minuten geschüttelt, 40 g etwa 5 proz. Natriumamalgam eingetragen und 1 Stunde unter Kühlung geschüttelt. Die jetzt nur noch schwach gelbe Lösung wird vom Quecksilber abgossen, mit 50 proz. Schwefelsäure gerade angesäuert und 4 mal mit Chloroform extrahiert. Das mit Natriumsulfat getrocknete Chloroform wird in 1 l Ligroin (Kp. 50—60°) gegossen, filtriert und das Filtrat im Vakuum eingengt. Es krystallisiert das rohe Mesobilirubinogen aus, das zur Reinigung in wenig Chloroform gelöst und mit Natriumbicarbonat 10 mal ausgeschüttelt wird, wodurch eine desmotrope „acide“ Form des Chromogens entfernt wird, während im Chloroform die gewöhnliche Form des Mesobilirubinogens zurückbleibt, durch Eingießen in Ligroin und Einengen zu isolieren.

Eigenschaften.

Das Mesobilirubinogen krystallisiert in derben, monoklinen Prismen, vom Fp. 202°, sehr schwer löslich in Essigester, Äther, Benzol, Ligroin und Wasser, leicht in wässrigen Alkalien und Ammoniak, konzentrierter Salzsäure, Alkohol, Chloroform und Naphthalin. Die acide Form schmilzt bei 140—160°.

Umwandlungen.

Das Mesobilirubinogen ist sehr unbeständig. Beim Stehen seiner Lösung am Licht bei Luftzutritt, besonders im direkten Sonnenlicht, am schnellsten in mineral-saurer Lösung, wird es bald in Urobilin verwandelt. Das Mesobilirubinogen ist durch Erhitzen mit Kaliummethylat in Mesobilirubin zu verwandeln (Fischer und P. Meyer). Die Oxydation des Urobilinogens zu Urobilin kann auch durch milde Oxydationsmittel wie Jod, Salpetersäure, Wasserstoffsperoxyd erreicht werden, jedoch tritt dabei leicht weitergehende Oxydation ein. Chromsäure ergibt Hämatinsäure- und Methyläthylmaleinimid (§ 188). Salpetrige Säure spaltet unter Bildung des Oxims der Phonopyrrolcarbonsäure (§ 195).

Nachweis.

Das Mesobilirubinogen zeigt keine Absorptionstreifen und keine Fluorescenz, dagegen gibt es im Gegensatz zum Urobilin schöne Rotfärbung mit einer salzsauren Lösung von Dimethylaminobenzaldehyd, dem Reagens von Ehrlich (s. Anhang), je nach der Konzentration sofort oder erst nach dem Kochen, was zum Nachweis benutzt wird. Diese Lösungen zeigen eine charakteristische Absorption im Gelbgrün, und zwar zunächst nur einen Streifen bei  $\lambda = 572—532 \mu\mu$ ; nach einiger Zeit tritt noch ein zweiter auf,  $\lambda = 496—475 \mu\mu$ . Näheres über den hierbei auftretenden Farbstoff vgl. bei H. Fischer und Meyer - Betz.

Vorkommen.

298. Biliverdin ( $C_{16}H_{18}N_2O_4$ )<sub>2</sub> oder  $C_{32}H_{36}N_4O_8$ . Das Biliverdin, dessen Formel noch unsicher ist, ist ein Oxydationsprodukt des Bilirubins und findet sich neben diesem in der Galle vieler Tiere und reichlich in den Rändern der Placenta der Hündin, ferner im Darminhalt, im Erbrochenen, ikterischen Harn und bisweilen in Gallensteinen.

Darstellung aus Bilirubin.

Zur Darstellung aus Bilirubin läßt man nach Heintz<sup>1)</sup> und Städeler<sup>2)</sup> eine alkalische Lösung in flachen Gefäßen längere Zeit an der Luft stehen, fällt

<sup>1)</sup> Poggend. Ann. Bd. 84, S. 117. 1851.

<sup>2)</sup> Ann. d. Chem. u. Pharm. Bd. 132, S. 323. 1864.

dann mit Salzsäure, wäscht den abfiltrierten Niederschlag mit Wasser, löst ihn in Alkohol und läßt das alkoholische Filtrat verdunsten. Küster<sup>1)</sup> erhielt indessen auf diesem Wege keinen einheitlichen Körper. Zum mindesten ist die Identität mit dem natürlich vorkommenden Biliverdin nicht streng bewiesen.

Um es aus Hundeplocenta zu gewinnen, wäscht man diese zunächst mit Wasser gut aus, extrahiert dann mit einer Mischung von Chloroform und Alkohol, dampft das Filtrat ein, zieht den Rückstand mit kaltem Alkohol aus, filtriert und verdunstet bei mäßiger Wärme zur Trockne.

Das Biliverdin ist ein amorpher, dunkelgrüner Körper. Beim Verdampfen einer Lösung in Eisessig erhält man unvollkommene, grün gefärbte, rhombische Plättchen mit abgestumpften Ecken. Das künstlich dargestellte Biliverdin ist in Wasser, Äther und Chloroform unlöslich, in Alkohol und Eisessig leicht löslich. In selbst sehr verdünnten Alkalien löst es sich und wird durch Kalk-, Baryt- und Bleisalze sowie durch Säuren wieder gefällt. Auch konzentrierte Schwefelsäure löst es mit grüner Farbe, Zusatz von Wasser scheidet es unverändert ab. Seine Lösungen zeigen keine Absorptionsstreifen.

Durch Salpetersäure erfährt es die gleichen Veränderungen wie Bilirubin (Umwandlung der Farbe in Blau, Violett, Rot und Gelb), durch Oxydation mit Natriumbichromat in eisessigsaurer Lösung entsteht Hämatinsäure. Durch schweflige Säure wird eine alkalische Lösung von Biliverdin, besonders schnell beim Erwärmen, gelb gefärbt, und diese Lösung verhält sich gegen Salpetersäure der Bilirubinlösung sehr ähnlich. Ähnlich soll Ammoniumsulfhydrat wirken (Haycraft und Scofield<sup>2)</sup>). Die Reduktion mit Natriumamalgam scheint der des Bilirubins analog zu sein (Maly<sup>3)</sup>).

Zum Nachweis dienen die Gmelinsche und die Hammarstonsche Probe (S. 421 u. 422). Vom Bilirubin unterscheidet es sich durch seine grüne Farbe, seine Löslichkeit in Alkohol und Unlöslichkeit in Chloroform. Die Diazo-reaktion nach Ehrlich (S. 420) tritt nicht ein.

Weitere Gallenfarbstoffe sind besonders aus Gallensteinen gewonnen, aber noch ungenügend untersucht. Näheres bei der Verarbeitung der Gallensteine S. 418.

299. **Den Gallenfarbstoffen nahestehende Farbstoffe** sind in den Gehäusen von Mollusken von Fr. N. Schulz<sup>4)</sup>, welcher ältere Angaben von Krukenberg<sup>5)</sup> zum Teil bestätigen konnte, nachgewiesen worden.

Roter Farbstoff aus *Haliotis rufescens*, unlöslich in Chloroform, leicht löslich in verdünnten wässrigen und alkoholischen Säuren, aus der sauren Lösung durch Phosphorwolframsäure fällbar. Noch nicht isoliert. Gmelinsche Reaktion (S. 421) bei zweckmäßiger Anordnung positiv, doch zeigen die dabei entstehenden Umwandlungsprodukte keine Spektralerscheinungen. Bei der Reduktion mit Natriumamalgam entsteht Urobilin (§ 303).

Grüner Farbstoff (daneben ist auch ein blauer vorhanden) aus *Haliotis californiensis*, ebenfalls in verdünnten Säuren löslich und durch Phosphorwolframsäure fällbar. Nicht isoliert. Sehr schöne Gmelinsche Probe (S. 421). Die dabei auftretenden Umwandlungsprodukte zeigen ebenso wie der ursprüngliche grüne Farbstoff Spektralerscheinungen, welche aber mit dem des Bilicyanin und Choletelin (S. 421) nicht übereinstimmen. Eine Bildung von Urobilin läßt sich nicht mit Sicherheit nachweisen. Beim Schmelzen mit Kali entstehen in reichlicher Menge Indol und Pyrrol. Über die Farbstoffe aus anderen Molluskengehäusen s. bei Krukenberg.

300. **Phylloerythrin (Cholohämatin, Bilipurpurin)**. Auf Vorkommen und spektrale Eigenschaften dieses Farbstoffs in der Ochsen-galle hat zuerst Hoppe-Seyler<sup>6)</sup> aufmerksam gemacht. Es wurde dann von Mac Munn<sup>7)</sup> in

1) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 59, S. 84. 1909.

2) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 14, S. 173. 1890.

3) Ann. d. Chem. u. Pharm. Bd. 163, S. 77. 1872.

4) Zeitschr. f. allg. Physiol. Bd. 3, S. 91. 1903.

5) Literatur bei v. Fürth: Vergleich. chem. Physiol. der niederen Tiere. Jena 1903, S. 528.

6) Die früheren Auflagen dieses Handbuchs, z. B. 2. Aufl. 1865, S. 165.

7) Journ. of physiol. Bd. 6, S. 22. 1885.

Schaf- und Rindergalle aufgefunden und als Cholohämatin beschrieben, von Hammarsten<sup>1)</sup> in der Galle des Moschusochsen und Nilferdes gefunden, später in kristallisiertem Zustande von Loebisch und Fischler<sup>2)</sup> aus Rindergalle dargestellt und als Bilipurpurin bezeichnet und von Marchlewski<sup>3)</sup> aus Rinderserum dargestellt. An der Identität dieser Farbstoffe läßt sich nach den Untersuchungen von Marchlewski<sup>4)</sup> nicht zweifeln. Marchlewski<sup>5)</sup> stellte auch die Abhängigkeit des Auftretens dieses Farbstoffs von dem Chlorophyllgehalt der Nahrung und damit seine Beziehung zum Chlorophyll fest. Als Chlorophyllderivat charakterisierte ihn auch H. Fischer<sup>6)</sup>.

**Zusammensetzung.** Analysiert ist bisher nur das „Bilipurpurin“. Es hatte die Zusammensetzung  $C_{32}H_{34}N_4O_5$  (Fischler und Loebisch) oder nach neueren Analysen des gleichen Präparates wohl richtiger  $C_{33}H_{36}N_4O_6$  oder  $C_{34}H_{36}N_4O_6$  (H. Fischer).

**Chromogen.** Es findet sich in den genannten Gallen als Chromogen und entsteht aus diesem durch Einwirkung des Luftsauerstoffs (Gamgee<sup>7)</sup>).

**Darstellung.** Darstellung aus frischer Rindergalle nach Loebisch und Fischler. Größere Mengen (aus 100 l wurden nur 0,5 g erhalten) werden auf dem Wasserbad zum dicken Sirup eingedampft. Der Rückstand wird mit Alkohol zu einem Brei angerührt und in kleinen Portionen in Alkohol eingetragen. Die nach 8 bis 12stündigem Stehen abdekantierte alkoholische Flüssigkeit wird verdunstet, der Rückstand in Wasser gelöst und nach Ansäuern mit verdünnter Schwefelsäure mit Äther geschüttelt. Der rot gefärbte ätherische Auszug wird nach völligem Trocknen über Calciumchlorid abfiltriert und verdunstet und die hinterbleibende braune, fettglänzende, kristallinische Masse nach Erschöpfen mit Ligroin und mit Alkohol wiederholt aus heißem Chloroform umkristallisiert.

**Eigenschaften.** Dunkelviolette, metallisch glänzende Schüppchen (doppeltbrechende Rhomben oder Rhomboide von 103 bzw. 77°). Sehr schwer löslich in Chloroform, löslich in heißem Amylalkohol und heißem Eisessig, unlöslich in Äther und Alkohol, kaum löslich in heißem Alkohol. Die Lösungen sind dichroitisch, sie erscheinen im durchfallenden Licht dunkel rotviolett, im reflektierten dunkel saftgrün, in starken Verdünnungen schwach bordeauxrot bzw. gelbgrün. Bis 330° erhitzt verändert sich der Farbstoff scheinbar nicht. In konzentrierten Mineralsäuren löst er sich mit grasgrüner Farbe, nach einigem Stehen erscheinen die Lösungen in durchfallendem Licht indigoblau, in reflektiertem purpurrot. In Pyridin gelöst gibt er mit Kupferacetat ein schön kristallisiertes, komplexes Kupfersalz (H. Fischer). Aus ihm läßt sich das Bilipurpurin unverändert wiedergewinnen. Konzentrierte wässrige Alkalien lösen den Farbstoff sehr schwer, verdünnte nur wenig leichter, in der Wärme rascher als in der Kälte, und wirken verändernd auf ihn ein. Durch Oxydationsmittel, z. B. durch Brom, wird der in Chloroform gelöste Farbstoff in eine grünbraune Substanz übergeführt.

**Spektrum.** Bei der spektroskopischen Untersuchung sieht man 4 Streifen (außerdem 2 Streifen im Ultraviolett), welche von Loebisch und Fischler; Gamgee<sup>8)</sup>, sowie von Marchlewski (siehe die zitierten Arbeiten) genau beschrieben worden sind.

<sup>1)</sup> Lehrb. d. physiol. Chem. 9. Aufl. 1922, S. 346 Anm. 7. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 43, S. 111. 1904/05.

<sup>2)</sup> Monatshefte f. Chem. Bd. 24, S. 335. 1903.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 41, S. 33. 1904.

<sup>4)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 43, S. 207 u. 464. 1904/05.

<sup>5)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 41, S. 33. 1904; Bd. 45, S. 466. 1905.

<sup>6)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 96, S. 293. 1915/16.

<sup>7)</sup> Die physiol. Chemie der Verdauung. Leipzig 1897, S. 346.

<sup>8)</sup> Vgl. bei Marchlewski: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 43, S. 207. 1904.



Zwei andere Derivate des Chlorophylls wurden von Schunk<sup>1)</sup> aus den Faeces von mit Gras gefütterten Rindern isoliert, Phylloxanthin und Skatocyanin. Ein Chlorophyllderivat ist nach H. Fischer vielleicht auch das Porphyrin aus dem Integument von *Eisenia foetida* (S. 408). Andere Chlorophyllderivate.

### *Harnfarbstoffe.*

Über Uroporphyrin und Koproporphyrin vgl. § 293, 294.

301. **Urochrom**, nach Ansicht vieler Autoren der Hauptfarbstoff des Harns, früher von Thudichum u. a., wenn auch nicht in reinem Zustande, dargestellt, ist von Garrod<sup>2)</sup> genauer untersucht und in folgender Weise dargestellt worden: Vorkommen.

Der Harn (etwa 1 l) wird gelinde erwärmt, mit Ammonsulfat gesättigt, filtriert und das Filtrat mit absolutem Alkohol (auf 10 Vol. 2—3 Vol. absoluten Alkohol) versetzt. Die sich abscheidende alkoholische Schicht, welche den Farbstoff enthält, wird in viel Wasser gegossen, durch Eintragen von Ammonsulfat bei gelinder Wärme wieder zur Abscheidung gebracht, durch Aufgießen auf festes Ammonsulfat und schwaches Erwärmen entwässert und nun unter Erhaltung der alkalischen Reaktion durch zeitweiligen Zusatz von Ammoniak auf dem Wasserbade eingedampft. Den braunen Rückstand wäscht man zur Entfernung von Indoxylschwefelsäure schnell mit Essigäther und läßt ihn dann einige Stunden unter absolutem Alkohol stehen. Die erhaltene alkoholische Lösung wird bis zur starken Orangefärbung eingeengt, in mindestens das gleiche Vol. Äther eingegossen, der ausgeschiedene Farbstoff abfiltriert, mit Äther gewaschen, nach dem Trocknen mit Chloroform und zuletzt mit absolutem Alkohol gewaschen. Die Darstellung ist mit großem Verlust verbunden. Darstellung:  
nach Garrod

Dieses Präparat, welches nicht analysiert worden ist, kann seiner Darstellung nach kein einheitlicher Körper sein. Klemperer<sup>3)</sup> hat eine erste Reinigung durch Absorption an Tierkohle vorgeschlagen, um dann nach Garrod zu verfahren.

Nach Bondzynski<sup>4)</sup> und seinen Mitarbeitern ist Urochrom eine Proteinsäure, welche in die Gruppe der Alloxyproteinsäuren (s. S. 518) gehört und von allen anderen Harnproteinsäuren durch ihre Fällbarkeit durch Kupferacetat getrennt werden kann.

Die Isolierung aus dem Harn geschieht nach Dombrowski<sup>4)</sup> in folgender Weise:

Der Harn wird mit einer ammoniakalischen Lösung von Barium- und Calciumacetat gefällt (auf 10 l Harn eine Lösung von 86 g Calciumacetat und 53 g Bariumacetat und 43 ccm 21 proz. Ammoniak), nach mehrstündigem Stehen filtriert und das (von Phosphorsäure, Schwefelsäure und fast aller Harnsäure freie) Filtrat nach Neutralisation mit Essigsäure mit einer durch Ammoniak neutralisierten Lösung von Kupferacetat versetzt. Der bald entstehende amorphe grüngraue Niederschlag wird nach 24 Stunden abfiltriert, ausgewaschen, in Wasser zerteilt und bei 50° mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Nach Entfernung des Schwefelwasserstoffs im Vakuum in einer Kohlensäureatmosphäre unter gelindem Erwärmen wird die filtrierte Flüssigkeit mit einem kleinen Überschuß von Barytwasser versetzt, schnell filtriert, nach Einleiten von Kohlensäure wieder filtriert, im Vakuum konzentriert und mit Alkohol gefällt. Aus dem so gewonnenen Bariumsulfat wurde das Silbersulfat dargestellt. nach Dombrowski

Zu einem, abgesehen von dem fehlenden Schwefelgehalt, sehr ähnlichen Produkt führt ein Verfahren von Hohlweg, Salomonsen und Mancini<sup>5)</sup>.

Dazu wird der Harn durch eine hohe Schicht Tierkohle filtriert, die das Urochrom absorbiert, nachdem man vorher den Harn durch eine Fällung mit ammoniakalischer Barium- und Calciumacetatlösung geklärt hat und durch Kohlensäure den überschüssigen Baryt und Kalk wieder entfernt hat. Die Kohle wird mit Wasser bis zur Cl-Freiheit gewaschen, bei 50° getrocknet, das Urochrom mit Eisessig extrahiert und durch Äther gefällt. nach Hohlweg u. a.

<sup>1)</sup> Proc. of the roy. soc. of London Bd. 69, S. 307. 1901.

<sup>2)</sup> Proc. of the roy. soc. of London Bd. 55, S. 394. 1894. — Huppert: Analyse des Harns. 10. Aufl. S. 506.

<sup>3)</sup> Berlin. klin. Wochenschr. Bd. 40, Nr. 14. 1903.

<sup>4)</sup> Bondzynski, Dombrowski u. Panek: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 46, S. 110. 1905. — Dombrowski: desgl. Bd. 54, S. 188. 1907/08.

<sup>5)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 13, S. 199, 205 u. 208. 1908. — Vgl. a. Mellanby u. Thomas: Journ. of Physiol. Bd. 53, S. 96. 1920.

**Zusammensetzung.** Die Formel des so dargestellten Urochroms steht noch nicht fest. Vorläufige Analysen des freien, nach Dombrowski dargestellten Urochroms und des Silbersalzes ergaben C 43,09, H 5,14, N 11,15, S 5,09, wobei noch zu bemerken, daß wohl bei der Fällung durch Kupferacetat eine Reduktion des Kupfers zu Kupferoxydul auf Kosten des Urochroms vor sich gegangen ist. Bemerkenswert ist der hohe Schwefelgehalt dieses Präparats, während das von Hohlweg schwefelfrei war und die Zusammensetzung 47,6% C, 6,3% H, 9,9% N hatte.

**Eigenschaften.** Dunkelgelbes Pulver, in Wasser löslich mit saurer Reaktion, in absolutem Alkohol schwer löslich, in Äther, Chloroform, Benzol unlöslich. Von den amorphen Salzen lösen sich das Natrium- und Bariumsalz in Wasser, aber nicht in Alkohol. Die wässrige Lösung des Urochroms wird gefällt durch Kupfer-, Quecksilber- und basisches Bleiacetat, Eisenchlorid, Phosphorwolfram- und Phosphormolybdänsäure, nicht durch Jodjodkalium und Quecksilberjodidjodkalium und fast gar nicht durch Quecksilberchlorid. Durch Mineralsäuren färbt sie sich erst beim Erwärmen rotbraun. Mit Natronlauge und Nitroprussidnatrium zeigt sie eine wieder verschwindende purpurrote Färbung.

Eine Urochromlösung zeigt keinen Absorptionsstreifen und keine Fluoreszenz, auch nicht auf Zusatz von Chlorzink oder Ammoniak.

**Umwandlung.** Das Urochrom ist zersetzlich. Alkalilaugen spalten aus dem Präparat von Bondzynski schon bei Zimmertemperatur Schwefel ab (Abscheidung von Schwefelblei auf Zusatz von Bleiacetat). Auf Zusatz von einer verdünnten ferricyankaliumhaltigen Eisenchloridlösung entsteht sofort blaue Farbe und Abscheidung von Berlinerblau. Jodsäure wird zu Jodwasserstoffsäure reduziert. Das Urochrom von Hohlweg und Salomonsen gibt ein gelbes, körniges Bromierungsprodukt (Mancini).

Bei der trockenen Destillation von Urochromcalcium entwickeln sich Dämpfe, welche den Geruch und die Reaktionen des Pyrrols geben. Hämopyrrol entsteht unter denselben Bedingungen, wie sie zu seiner Bildung aus Hämin führen (§ 190), nicht. Beim Kochen mit Salzsäure wird nach Dombrowski ein schwefelhaltiges Melanin abgespalten.

Näheres speziell auch über die Bindungsverhältnisse des Schwefels im Urochrom s. bei Dombrowski.

**Verhalten zu Aldehyd.** Eine alkalische Lösung wird durch Aldehyd nicht verändert. Garrod gab an, daß sein Urochrom durch dies Reagens in einen dem Urobilin ähnlichen Farbstoff (Absorptionsstreifen, grüne Fluoreszenz auf Zusatz von ammoniakalischem Zinkchlorid) umgewandelt werde.

**Quantitative Bestimmung.** Zur quantitativen Bestimmung ist ein colorimetrischer Vergleich mit Echthgelb G verwendbar (Klemperer, Pelkan<sup>1</sup>).

**Urochromogen.** Von Weiß<sup>2</sup>) wird der Auffassung des Urochroms als des gelben Hauptfarbstoffs des Harns stark widersprochen. Nach diesem Autor ist die gelbe Farbe des Harns der Hauptsache nach durch Urobilin (§ 303) und Uroerythrin (§ 304) bedingt und nur zu einem kleinen Teil durch eine wenig gefärbte Substanz, das Urochromogen, das dann erst durch Oxydation mit Luftsauerstoff bei Belichtung oder mit Kaliumpermanganat in einen intensiver gefärbten gelben Körper übergeht, eben das sog. Urochrom.

**302. Urochromogen.** Eine Substanz, die in größerem Maße nur in pathologischen Fällen im Harn auftritt, besonders bei Erkrankungen mit starkem Gewebszerfall, jedoch auch im normalen Harn enthalten sein soll. Eine Isolierung der reinen Substanz ist noch nicht gelungen. Sie läßt sich analog wie Urochrom anreichern, indem Harn durch Sättigung mit Ammonsulfat

<sup>1</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 43, S. 237. 1920.

<sup>2</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 133, S. 331. 1922. Dort auch weitere Literatur über Urochromogen.

von den rötlichen Farbstoffen befreit wird. Dem Filtrat kann das Urochromogen durch Alkohol-extraktion entzogen werden und nach vorsichtigem Verdunsten des Alkohols wieder in Wasser überführt werden. Das Urochromogen ist in saurer Lösung wenig, in neutraler, stärker noch in alkalischer gelbgrün gefärbt. Die wässrige Lösung, mit Diazobenzolsulfosäure versetzt und mit  $\text{NH}_3$  alkalisch gemacht, zeigt eine rote Farbe und beim Schütteln bildet sich ein rosagefärbter Schaum, die sog. Diazoreaktion von Ehrlich in ammoniakalischer Lösung. Nach Hermanns<sup>1)</sup> ist allerdings eine der Muttersubstanzen dieser Reaktion ein mehrwertiges Phenol von der Formel  $\text{C}_8\text{H}_6\text{O}_4$ . Durch Oxydation mit 1 Tropfen Permanganat tritt intensive Gelbfärbung auf, Bildung von Urochrom. Beim längeren Stehen einer Urochromogenlösung fällt ein schwarzer Farbstoff aus, das Uromelanin (Weiß). Urochromogen enthält durch alkalische Bleilösung abspaltbaren Schwefel. Es gibt die Xanthoprotein-, nicht die Millonsche Reaktion (Weiß).

**303. Urobilin** und Urobilinogen finden sich in kleinen Mengen in jedem <sup>Vorkommen.</sup> Harn, und zwar in ganz frischem hauptsächlich das in § 297 behandelte Urobilinogen (Jaffe<sup>2)</sup>). Reichlicher kommen sie im Harn vor bei Erkrankungen der Leber und Gallenwege, bei Zirkulationsstörungen (Stauungsleber), bei vielen fieberhaften Infektionskrankheiten und bei manchen Vergiftungen (Urobilinurie). Auch im unteren Dünndarm, Dickdarm und in den Faeces finden sich Urobilin (Stereobilin) und Urobilinogen von der Geburt an, nicht im Meconium. Ob sie normalerweise auch stets in der Galle nachweisbar sind, ist strittig. Unter pathologischen Verhältnissen ist Urobilin auch in serösen Flüssigkeiten und in der Lymphe, sehr selten im Blut gefunden worden. Magnus - Levy<sup>3)</sup> fand es in der autolytierten Leber. Im Harn und in Faeces von Kaninchen fehlt es nach Fromholdt<sup>4)</sup>, was aber bestritten wird (Gautier und Russo<sup>5)</sup>). Es entsteht aus <sup>Entstehung.</sup> Gallenfarbstoff, und zwar bildet sich durch Reduktion zunächst das Urobilinogen, identisch mit Mesobilirubinogen, das dann weiter durch Oxydation das als Urobilin bezeichnete Farbstoffgemisch gibt. Näheres bei Mesobilirubinogen (§ 297).

Zur Darstellung von Urobilin aus Harn hat Jaffe folgendes Verfahren angegeben: Man fällt eine große Menge Harn mit Bleiessig aus, kocht den sorgfältig mit Wasser gewaschenen und getrockneten Niederschlag mehrmals mit Alkohol aus und zerlegt ihn darauf mit Schwefelsäure enthaltendem absoluten Alkohol. Die Lösung wird mit Ammoniak übersättigt, filtriert, das Filtrat mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt und mit Chlorzink versetzt. Die dabei entstehende meist braunrote Fällung wird mit kaltem, dann mit heißem Wasser bis zum Verschwinden der Chlorreaktion ausgewaschen, mit Alkohol ausgekocht, bei gelinder Wärme getrocknet, pulverisiert und in wässrigem Ammoniak gelöst, die filtrierte Flüssigkeit mit Bleizucker gefällt. Der in der Regel intensiv rot gefärbte Niederschlag wird mit kaltem Wasser gewaschen (aber nicht zu lange), getrocknet und mit schwefelsäurehaltigem Alkohol zerlegt. Die so erhaltene saure Lösung wird mit dem halben Volumen Chloroform vermischt und mit einem großen Überschuß von Wasser geschüttelt. Die klar abgesetzte Chloroformlösung schüttelt man schnell noch 1- oder 2 mal mit nicht zuviel Wasser, destilliert das Chloroform ab, wäscht den Rückstand mit wenig Äther, löst wieder in Chloroform, filtriert und destilliert das Chloroform ab. <sup>Darstellung aus Harn nach Jaffe.</sup>

Bei urobilinreichen Harnen kann man direkt den Harn mit einem nicht zu geringen Überschuß von Ammoniak versetzen, filtrieren, das Filtrat mit einer konzentrierten Lösung von Chlorzink ausfällen und nun weiter verfahren, wie oben beschrieben. Das aus urobilinreichen Harnen gewonnene Urobilin scheint

1) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 114. S. 79. 1921; Bd. 122, S. 98. 1922. Dort Literatur über die Diazoreaktion.

2) Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. Bd. 47, S. 405. 1869.

3) Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 2, S. 278. 1902.

4) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 53, S. 340. 1907.

5) Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. Bd. 64, S. 839. 1908. Biochem. Zentralbl. Bd. 7, S. 839. 1908.

reiner zu sein als das aus normalen erhaltene; es handelt sich jedoch immer um ein bisher nicht trennbares Gemisch.

Darstellung aus Harn  
nach Méhu u. a.

Ferner kann man die Darstellung aus Harn unter Benutzung der zuerst von Méhu<sup>1)</sup> beobachteten Eigenschaft des Urobilins, durch Sättigung des Harns mit Ammonsulfat ausgefällt zu werden, sowie einiger von Fr. Müller und Huppert<sup>2)</sup> gemachter Vorschläge in folgender Weise vornehmen. Der Harn wird mit alkalischer Chlorbariumlösung (auf 100 Tl. Harn 30 Tl. einer Mischung von 1 Vol. gesättigter Chlorbariumlösung und 2 Vol. gesättigtem Barytwasser) zur Entfernung von Harnsäure und Hämatoporphyrin versetzt, filtriert, sodann wird aus dem Filtrat durch konzentrierte Natriumsulfatlösung der überschüssige Baryt entfernt, die Flüssigkeit mit Schwefelsäure nahezu neutralisiert, filtriert und mit Ammonsulfat gesättigt. Der Niederschlag wird auf dem Filter gesammelt, mit gesättigter Ammonsulfatlösung gewaschen und, nachdem er lufttrocken geworden, nach Zusatz von verdünnter Schwefelsäure mit einer Mischung von 1 Tl. Äther und 2 Tl. Alkohol in der Wärme ausgezogen. Die abfiltrierte Lösung wird mit Chloroform gemischt, im Scheidetrichter mit ungefähr dem doppelten Volumen Wasser geschüttelt und zur Abscheidung der Chloroformlösung stehen gelassen. Man läßt jetzt die Chloroformlösung ab, wäscht sie mit dem doppelten Volumen Wasser und entzieht ihr das Urobilin durch Schütteln mit ammoniakalischem Wasser. Aus der ammoniakalischen Lösung vertreibt man das Ammoniak in der Wärme.

Andere Darstellungs-  
methode.

Eine andere Methode ist von Garrod und Hopkins<sup>3)</sup> angegeben. Charnas<sup>4)</sup> empfiehlt, dem mit Weinsäure angesäuerten Harn das Urobilinogen durch Äther zu entziehen und die dann nachträglich zu Urobilin zu oxydieren.

Darstellung aus  
Faeces.

Zur Darstellung aus menschlichen Faeces verreibt man diese mit schwefelsäurehaltigem Alkohol, filtriert und engt das Extrakt bei 40—50° ein. Man nimmt den Rückstand mit Äther-Alkohol (1:2 Vol.) in der Wärme auf, setzt Chloroform hinzu und wäscht den Alkohol mit Wasser fort. Dem Chloroform entzieht man das Urobilin mit ganz verdünntem Ammoniak, wobei viele Beimengungen im Chloroform gelöst bleiben, säuert die ammoniakalische Schicht an und extrahiert wieder mit Chloroform. Beim Verdunsten bleibt ein Urobilin, das sich Lösungsmitteln gegenüber zwar wie ein einheitlicher Körper verhält, jedoch noch Gallensäuren enthält (H. Fischer<sup>5)</sup>).

Zusammensetzung.

Die mittlere Zusammensetzung eines solchen „Urobilins“ aus Harn und Faeces ist ziemlich übereinstimmend bei verschiedener Darstellung mit C 63,6, H 7,8, N 4,1 % gefunden worden (Garrod und Hopkins), C 65,9, H 7,8, N 5,1 (H. Fischer).

Eigenschaften.

Das Urobilin ist bis jetzt nur amorph erhalten worden, zeigt rote, rotbraune oder rotgelbe Farbe, löst sich wenig in Wasser oder Äther, leicht in Alkohol, Amylalkohol oder Chloroform, auch in wässerigen Alkalilösungen oder Ammoniak, aus denen es durch Säuren wieder gefällt wird. Es erscheint in seinen neutralen alkoholischen Lösungen je nach der Konzentration braungelb, gelb oder rosa mit grüner Fluorescenz, in alkalischen Lösungen mehr gelb, in sauren alkoholischen rosen- bis bräunlich-purpurrot. Die Lösungen verändern an der Luft mehr und mehr ihre Färbung ins Bräunliche unter allmählich fortschreitender Zersetzung des Farbstoffs. Mit der Lösung des Farbstoffs getränkte Papierfilter oder Baumwolle und Wolle geben beim Waschen mit Wasser, Alkohol, Chloroform den Farbstoff nur unvollkommen wieder ab. Durch Sättigen seiner

<sup>1)</sup> Journ. de pharmacie et de chim. (4) Bd. 28, S. 159. 1878.

<sup>2)</sup> Huppert: Analyse des Harns. 10. Aufl. S. 527.

<sup>3)</sup> Journ. of Physiol. Bd. 20, S. 112. 1896; Bd. 22, S. 451. 1898.

<sup>4)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 20, S. 401. 1909.

<sup>5)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 73, S. 213. 1911.

Lösungen mit Ammonsulfat (aber nicht mit Ammonchlorid) wird er abgeschieden, aus dem Harn auch durch Phosphorwolframsäure. Durch neutrales und basisch essigsäures Blei wird der Farbstoff gefällt, teilweise durch Chlorzink oder Zinksulfat und Ammoniak. Die ammoniakalische Lösung wird auf Zusatz von etwas Zinksalz rot und zeigt eine sehr kräftige, noch bei sehr starker Verdünnung erkennbare Fluorescenz (Jaffe). Die Probe wird noch empfindlicher, wenn man mit einer alkoholischen Zinkacetatlösung arbeitet und sich mit einer Konvexlinse einen Lichtkegel in der Flüssigkeit erzeugt (Schlesinger<sup>1</sup>). Die Leukoverbindung des Koproporphyrins, Uroporphyrins und anderer Porphyrine geben jedoch die gleiche Probe (H. Fischer<sup>2</sup>). Eine alkalische Lösung von Urobilin färbt sich auf Zusatz von etwas Kupfersulfat violett oder rötlich (Biuretreaktion) und zeigt nach höchstens 2 Minuten 3 charakteristische Spektralstreifen (H. Fischer<sup>3</sup>).

Im durchfallenden Licht spektroskopisch untersucht zeigen sehr verdünnte saure Lösungen einen Absorptionsstreifen zwischen den Linien *b* und *F*, etwas näher an letzterer Linie, bei stärkerer Konzentration aber darüber hinausgehend (s. Spektraltafel). Macht man alkalisch oder ammoniakalisch, so wird der Streifen sehr schwach und rückt näher an *b*, wird aber sehr deutlich in der mit Zinksalz versetzten ammoniakalischen Lösung, parallel mit dem Auftreten der Fluorescenz. Bei der Biuretprobe zeigen sich Streifen im Rot, Gelb und Blau, die besonders deutlich sind, wenn man die Lösung essigsauer macht, mit Chloroform extrahiert und dieses untersucht. Spektrum.

Zum Nachweis benutzt man besonders die Fluorescenz auf Zusatz von Zinkacetat nach Schlesinger — es darf aber kein Porphyrinharn vorliegen —, kontrollierbar durch das spektrale Verhalten dieser Lösung, daneben die Biuretreaktion mit ihren Spektralstreifen. Nachweis.

Über den Nachweis im Harn vgl. § 621.

Eine angenähert quantitative Bestimmung ist von G. Hoppe-Seyler<sup>4</sup>), Charnas<sup>5</sup>), Strauß und Hahn<sup>6</sup>) durch Wägung, von Sallet<sup>7</sup>) spektrophotometrisch ausgeführt worden. Quantitative Bestimmung.

Über die Gewinnung und die Eigenschaften von Urobilinogen vgl. Mesobilirubinogen § 297.

**304. Uroerythrin.** Dieser von Prout als rosige Säure, von Golding Bird als Purpurin bezeichnete, von Heller untersuchte Farbstoff ist von Zoja<sup>8</sup>), Riva<sup>9</sup>) und besonders von Garrod<sup>10</sup>) genauer beschrieben worden. Er findet sich sehr häufig in normalem Harn, die rote Farbe des Sedim. later. (S. 172) bedingend, vermehrt nach Muskelanstrengungen und starkem Schwitzen, bei Digestionsstörungen, Herz- und Lungenaffektionen, besonders bei rheumatischen Krankheiten und solchen, die Zirkulationsstörungen in der Leber bewirken. Es soll sich um einen Skatolfarbstoff handeln (Porcher und Hervieux<sup>11</sup>)). Vorkommen.

Zur Darstellung benutzt man das Uratsediment, welches sich beim Abkühlen des Harns bildet. Dasselbe wird abfiltriert, in Wasser unter mäßigem Erwärmen Darstellung.

<sup>1</sup>) Dtsch. med. Wochenschr. Bd. 29, S. 561. 1903.

<sup>2</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 97, S. 148. 1916.

<sup>3</sup>) Münch. med. Wochenschr. Bd. 59, S. 2555. 1912.

<sup>4</sup>) Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. Bd. 124, S. 30. 1891.

<sup>5</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 20, S. 401. 1909.

<sup>6</sup>) Münch. med. Wochenschr. Bd. 67, S. 1286. 1920.

<sup>7</sup>) Rev. de méd. Bd. 17, S. 109. 1897.

<sup>8</sup>) Zentralbl. f. med. Wissensch. 1892. S. 705.

<sup>9</sup>) Malys Jahresber. d. Tierchem. Bd. 24, S. 295. 1894.

<sup>10</sup>) Journ. of physiol. Bd. 17, S. 439. 1895.

<sup>11</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 45, S. 486. 1905.

gelöst, die Lösung mit Ammonchlorid gesättigt, der Niederschlag (Urate und Uroerythrin) abfiltriert und mit gesättigter Ammonchloridlösung gewaschen, bis alles Urobilin entfernt ist. Jetzt digeriert man den Niederschlag an einem dunklen Orte einige Stunden mit warmem Alkohol, filtriert, versetzt das Filtrat mit mindestens 2 Tl. Wasser und schüttelt mehrmals mit Chloroform (zur Entfernung von Hämatoporphyrin). Fügt man jetzt einige Tropfen Essigsäure hinzu und schüttelt abermals mit Chloroform, so nimmt dieses das Uroerythrin auf. Nach dem Waschen mit Wasser läßt man die Chloroformlösung im Dunkeln bei mäßiger Temperatur verdunsten (Garrod).

Nach Borrien<sup>1)</sup> kann man das Uroerythrin dem Harn oder Sediment durch Schütteln mit Talkum entziehen. Beim Extrahieren des Talkums mit schwach salzsaurem Alkohol wandert der Farbstoff in den Alkohol.

**Eigenschaften.** Das Uroerythrin hat eine rosa Farbe, ist amorph und wird, besonders in seinen Lösungen, durch Licht leicht gebleicht (charakteristisches Verhalten). Das beste Lösungsmittel ist Amylalkohol, es folgen dann Essigester, Alkohol, Chloroform, Wasser. Sehr verdünnte Lösungen sind rosa, konzentrierte rötlich orange. Sie fluorescieren nicht, auch nicht nach Zusatz von Chlorzink und Ammoniak (Unterschied von Urobilin), zeigen aber eine starke Lichtabsorption, die in der Mitte zwischen *D* und *E* beginnt, bis *F* reicht und eigentlich aus 2 durch einen Schatten verbundenen Streifen besteht (s. Spektraltafel). Durch konzentrierte Schwefelsäure werden die Lösungen carminrot, durch Alkalien (außer Ammoniak) durch Purpur und Blau hindurch schnell grün gefärbt (Garrod). Das von Borrien isolierte Uroerythrin wich insofern in seinen Eigenschaften ab, als es unlöslich war in Wasser, Äther und Chloroform. Das Absorptionsspektrum in saurem oder neutralem Alkohol zeigte zwei unscharfe Banden bei 550—525 und 520—489  $\mu\mu$ . Die rote alkoholische Lösung wird durch geringe Mengen Ammoniak oder Alkali blaugrün, Wasserstoffsperoxyd entfärbt.

**Nachweis.** Zum Nachweis schüttelt man den Harn vorsichtig mit Amylalkohol. Die Orangefarbe, das spektroskopische Verhalten und das Ablassen der Färbung bei der Belichtung lassen das Uroerythrin erkennen. Auch das Verhalten gegen Alkalien und konzentrierte Schwefelsäure ist charakteristisch.

Urorubrohämatin  $C_{68}H_{94}N_8Fe_2O_{26}$  und Urofuscöhämatin  $C_{68}H_{106}N_8O_{26}$  nennt Baumstark<sup>2)</sup> zwei Farbstoffe, welche er bei einem Fall von Lepra aus dem Harn isolierte. Ersterer war in Wasser, Alkohol, Äther, Chloroform unlöslich, gab mit Alkalien eine schön braunrote, nicht dichroitische Flüssigkeit und zeigte in saurer Lösung einen Absorptionstreifen vor der Linie *D* und einen zweiten hinter *D*. Der zweite löste sich in Alkalien mit brauner Farbe ohne Dichroismus und gab kein charakteristisches Spektrum. Beide sollen nach Baumstark in naher Beziehung zum Hämatin stehen. Nach H. Fischer<sup>3)</sup> ist ein Zusammenhang mit dem Uroporphyrin (§ 293) denkbar, die Formeln Baumstarks wären dann zu halbieren.

#### Aus Chromogenen entstehende Harnfarbstoffe.

Im Harn sind eine ganze Reihe farbloser Substanzen enthalten, die durch geeignete Mittel, meist Oxydation in saurer Lösung, in Farbstoffe übergehen können. Dazu gehört nicht nur das Urobilinogen, das schon beim Mesobilirubinogen angeführt wurde (§ 297), und das Indoxyl (§ 221), sondern noch mehrere andere, wahrscheinlich genetisch und chemisch eng zusammengehörige Substanzen, aus denen das Urorosein, Nephrosein und Skatolrot entstehen.

<sup>1)</sup> Journ. de Pharm. et Chem. [7] Bd. 16, S. 45. 1917; ref. Chem. Zentralbl. 1917, II, S. 473.

<sup>2)</sup> Arch. f. Physiol. Bd. 9, S. 568. 1874; Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 7, S. 1170. 1874.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 97, S. 150. 1916.

Vielleicht gehört auch ein von de Jager<sup>1)</sup> beobachteter Farbstoff in diese ganze Reihe, bei der es sich nach Ellinger und Flamaud<sup>2)</sup> um Triindylmethanfarbstoffe, nach König<sup>3)</sup> und H. Fischer<sup>4)</sup> eher um Diindolylmethene handelt. Die Chromogene wären nach dieser Auffassung bakterielle Abbauprodukte des Tryptophans.

Zu einer anderen Gruppe gehören die Substanzen des Harns, die in schwarze bis braune Farbstoffe übergehen; sie sind bei den Melaninen (§ 308) angeführt.

305. Urorosein wurde von Nencki und Sieber<sup>5)</sup> zuerst beobachtet, von Rosin<sup>6)</sup> und Herter<sup>7)</sup> weiter untersucht. Das Chromogen ist, wie Salkowski<sup>8)</sup> vermutete und Herter feststellte, Indolelessigsäure, daneben kommt noch das Kuppelungsprodukt der Indolelessigsäure mit Glycin, die Indolacetursäure, in Frage (Erwins und Laidlow<sup>9)</sup>, Homer<sup>10)</sup>). Es findet sich in vielen pathologischen und normalen Harnen und gibt sich dadurch zu erkennen, daß es auf Zusatz von starker Salzsäure und ganz verdünnter Kaliumnitritlösung in einen roten Farbstoff (Urorosein) übergeführt wird. In Harnen, welche eine Zeitlang gestanden haben und in denen durch Mikroorganismen salpetrige Säure entstanden, bildet sich der Farbstoff schon durch Zusatz von Säure allein (Herter).

Urorosein ist unlöslich in Äther und in Chloroform (Unterschied von Indi-  
rubin und von Skatolrot), löslich in Wasser, Äthyl- und Amylalkohol mit schön  
roter Farbe. Die Farbe verschwindet auf Zusatz von Alkalien, um auf Zusatz  
von Säuren wiederzukehren. Die amyalkoholische Lösung zeigt einen scharfen  
Streifen im Grün zwischen *D* und *E*, näher an *D*, bei 557  $\mu\mu$ .

Die Muttersubstanz wird durch Eintragen von Ammonsulfat bis zur wolkigen Trübung gefällt und kann so von Urobilin getrennt werden. Durch Bleiacetat und Ammoniak wird sie nicht gefällt. Näheres bei Indolelessigsäure (§ 222).

Einen ähnlichen, aber vom Urorosein angeblich verschiedenen Farbstoff beschreibt Staal<sup>11)</sup>. Das Chromogen ist aus normalem Harn in folgender Weise zu isolieren: Der mit Ammonsulfat gesättigte und von ausgeschiedenem Urobilin, Uroerythrin usw. abfiltrierte Harn wird nach dem Einengen und Ansäuern mit etwas Essigsäure mit Essigester ausgeschüttelt, der Essigester durch wiederholtes Schütteln mit Wasser von Indican befreit und eingeengt. Dabei scheidet sich Hippursäure ab. Durch weiteres Einengen und Aufnahme des Rückstandes mit kaltem Essigäther gelingt es, die Hippursäure ziemlich völlig zu entfernen und das Chromogen in noch unreinem Zustande als braune sirupartige Masse zu erhalten. Seine Lösung gibt mit Salzsäure allein keine Färbung, wohl aber mit Salzsäure und einem Oxydationsmittel, z. B. Salzsäure und wenig Kaliumnitrit, eine schöne Purpurfarbe (der das Chromogen enthaltende Harn färbt sich schon auf Zusatz von Salzsäure allein). Die Lösungsverhältnisse des Farbstoffes sind dieselben wie für das Urorosein angegeben, indessen zeigt er noch einen zweiten schwächeren, mehr nach *E* zu gelegenen Absorptionsstreifen. Das Chromogen ist keine gepaarte Schwefelsäure oder Glucuronsäure und gibt bei der Sublimation, Reduktion und auch bei der bakteriellen Zersetzung keine Spur Skatol oder Indol (Staal).

306. Nephrorosein ist ein dem Urorosein zum mindesten sehr nahestehender Farbstoff genannt worden (V. Arnold<sup>12)</sup>), der sich nur in manchen pathologischen Fällen, besonders beim Scharlach, findet. Er entsteht aus seinem Chromogen,

1) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 62, S. 333. 1909.

2) Desgl. Bd. 62, S. 276. 1909; Bd. 71, S. 7. 1911; Bd. 78, S. 365. 1912; Bd. 91, S. 15. 1914.

3) Journ. f. prakt. Chem. Bd. 84, S. 204. 1911.

4) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 56, S. 2316. 1923.

5) Journ. f. prakt. Chem. N. F. Bd. 26, S. 333. 1882.

6) Dtsch. med. Wochenschr. 1893, S. 51.

7) Journ. of biol. chem. Bd. 4, S. 239 u. 253. 1908.

8) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 42, S. 216, Fußnote. 1904; Biochem. Zeitschr. Bd. 97, S. 123. 1919.

9) Biochem. Journ. Bd. 7, S. 18. 1913.

10) Journ. biol. Chem. Bd. 22, S. 345. 1915.

11) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 46, S. 236. 1905. 12) desgl. Bd. 61, S. 240. 1909.

wenn der Harn mit Salpetersäure oder konzentrierter Salzsäure und etwas Nitrit behandelt wird. Durch Amylalkohol läßt es sich dem Harn entziehen. Der rote Farbstoff hat einen Absorptionsstreifen, von *b* bis zur Mitte zwischen *b* und *F* reichend. Unter der Wirkung des Lichts verwandelt er sich in einen anderen Farbstoff,  $\beta$ -Urorosein genannt, der einen Absorptionsstreifen zwischen *D* und *E* besitzt, *D* anliegend, also sehr ähnlich dem des eigentlichen Uroroseins.

307. **Skatolrot** ist ein Farbstoff genannt worden, dessen Chromogen, vielleicht Skatoxyl-Schwefelsäure, im Harn nach Eingabe von Skatol auftritt. Das Chromogen gibt auf Zusatz von Salzsäure allein oder mit einem Oxydationsmittel, Eisenchlorid oder Salpetersäure, den Farbstoff.

Er ist, nachdem er schon früher von Brieger<sup>1)</sup>, Otto<sup>2)</sup> und von Mester<sup>3)</sup> studiert wurde, neuerdings besonders von Grosser<sup>4)</sup>, Porcher und Hervieux<sup>5)</sup> und A. Homer<sup>6)</sup> untersucht worden. Er löst sich in Alkohol und Amylalkohol, nicht in Chloroform und Äther und nicht in Wasser. Seine amyalkoholische Lösung zeigt einen Streifen zwischen *D* und *E* zwischen den Wellenlängen 577 und 550 (Porcher und Hervieux). Beim Erhitzen mit Zinkstaub gibt er Skatol (Grosser). Nach Homer, die mehrere Indolderivate eingab und die entstehenden Harnfarbstoffe untersuchte, ist das Skatolrot ein Gemisch zweier Farbstoffe, aber nicht identisch mit Urorosein, trotz gleichen Spektrums. Vgl. auch Maillard<sup>7)</sup>.

#### *Braune und schwarze Pigmente.*

Vorkommen. 308. **Melanine.** Mehr oder weniger dunkle, braune bis ganz schwarze Pigmente finden sich in der Chorioidea und Retina des Auges, dem Rete Malpighii vieler Tiere und des Menschen, besonders bei Negern, in den Haaren und Federn, der Haut von Reptilien und Fischen, dem Horne, Fischbein, in den Pigmentzellen von Schmetterlingen und an serösen Häuten bei Fröschen, Schlangen usw. Fast bei allen erwachsenen Menschen findet sich mehr oder weniger reichlich ein schwarzer Farbstoff in Lungen und Bronchialdrüsen, und meist zeigt er sich bei Sektionen in denjenigen Organen als schiefergraue Färbung, welche von diesen Organen Lymphe empfangen. In melanotischen Carcinomen und Sarkomen finden sich schwarze Pigmente oft in großen Massen abgelagert. Auch im Harn von Kranken mit melanotischen Tumoren treten solche Farbstoffe oder Chromogene derselben auf (Mörner<sup>8)</sup>, v. Jaksch<sup>9)</sup>, Hensen und Nölke<sup>10)</sup>, Thormählen<sup>11)</sup>, Feigl und Querner<sup>12)</sup>. Für viele dieser Körper erscheint eine Beziehung zum Blutfarbstoff ausgeschlossen und eine Abstammung von Eiweißbausteinen, besonders von dessen aromatischen Atomkomplexen (Tyrosin, Tryptophan) nicht zu bezweifeln, aus denen sie sich durch oxydierende Fermente bilden (vgl. Oxydasen, § 522). S. darüber v. Fürth und Schneider<sup>13)</sup>,

Entstehung.

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 4, S. 414. 1880.

<sup>2)</sup> Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 33, S. 607. 1884.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 12, S. 130. 1888.

<sup>4)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 44, S. 328. 1905.

<sup>5)</sup> Bull. de la soc. chim. de France (4) Bd. 1, S. 852. 1907. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 45, S. 486. 1905.

<sup>6)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 22, S. 345. 1915.

<sup>7)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 46, S. 515. 1905. <sup>8)</sup> desgl. Bd. 11, S. 66. 1887.

<sup>9)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 13, S. 385. 1889.

<sup>10)</sup> Dtsch. Arch. f. klin. Med. Bd. 62, S. 347. 1899.

<sup>11)</sup> Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. Bd. 108, S. 313. 1887.

<sup>12)</sup> Dtsch. Arch. f. klin. Med. Bd. 123, S. 107. 1917.

<sup>13)</sup> Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 1, S. 229. 1902.



v. Fürth und Jerusalem<sup>1)</sup>, Spiegler<sup>2)</sup>, Neuberg<sup>3)</sup>, Eppinger<sup>4)</sup>, Bloch<sup>5)</sup>. Über den Melanismus von Schmetterlingen vgl. v. Fürth und Schneider, Hasebroek<sup>6)</sup>. Über Homogentisinsäure als Ursache einer Dunkelfärbung des Harns vgl. bei dieser (§ 216).

Melanine sind isoliert aus Chorioidea und Pigmentepithel des Auges (Fuscin<sup>7)</sup>), Isolierte Melanine. aus melanotischen Geschwülsten von Menschen<sup>8)</sup> (Sarkomelanin, Phymatorhusin), aus melanotischen Geschwülsten von Pferden<sup>9)</sup> (Hippomelanin), aus menschlichen und tierischen Haaren<sup>10)</sup>, aus Negerhaut und Negerhaaren<sup>11)</sup>, aus Tintenfischen<sup>12)</sup> (Sepiamelanin), aus melanotischen Därmen<sup>13)</sup> usw. Über die Zusammensetzung einiger dieser Melanine s. die Zusammenstellung bei Mörner und bei Chittenden und Albro<sup>14)</sup> sowie in dem Sammelreferat von v. Fürth<sup>15)</sup> und bei Samuely<sup>16)</sup>.

Diese sämtlichen Pigmente sind amorph, bilden kleinere oder größere Körnchen. In ihrer Zusammensetzung weichen sie sehr voneinander ab, doch enthalten sie im allgemeinen mehr Kohlenstoff und weniger Stickstoff und Wasserstoff als die Eiweißstoffe. Manche sind eisenhaltig, andere eisenfrei. Dasselbe gilt vom Schwefel. Der Schwefelgehalt ist bei einigen sehr hoch gefunden. Viele der analysierten Substanzen waren von zweifelhafter Reinheit. Sie sind unlöslich in Wasser, Alkohol, Äther, ebenso in Säuren. In Alkalien sind sie zum Teil Allgemeine Eigenschaften.

<sup>1)</sup> Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 10, S. 131. 1907.

<sup>2)</sup> Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 4, S. 40. 1904; Bd. 10, S. 253. 1907.

<sup>3)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 8, S. 383. 1908; Virchows Archiv f. pathol. Anat. u. Physiol. Bd. 192, S. 14. 1908.

<sup>4)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 28, S. 181. 1910.

<sup>5)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 98, S. 226. 1916/17.

<sup>6)</sup> Fermentforschung Bd. 5, S. 1, 297. 1922; Bd. 7, S. 1, 139. 1923.

<sup>7)</sup> Rosow: v. Graefes Arch. f. Ophth. Bd. 9, III, S. 63. 1863. — Sieber: Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 20, S. 362. 1886. — Hirschfeld: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 13, S. 407. 1889. — Landolt: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 28, S. 192. 1899. — Scherl: v. Graefes Arch. f. Ophth. Bd. 34, S. 130. 1893.

<sup>8)</sup> Berdez u. Nencki: Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 20, S. 346. 1886. — Nencki u. Sieber: Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 24, S. 17. 1888. — Mörner: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 11, S. 66. 1887. — Miura: Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. Bd. 107, S. 250. 1887. — Brandl u. Pfeiffer: Zeitschr. f. Biol. Bd. 26, S. 348. 1890. — Schmiedberg: Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 39, S. 70. 1897. — Zdarek u. v. Zeynek: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 36, S. 493. 1902. — v. Zumbusch: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 36, S. 511. 1902. — Wolff: Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 5, S. 476. 1904. — Brahn u. Schmidtmann: Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. Bd. 227, S. 137. 1920.

<sup>9)</sup> Berdez u. Nencki: a. a. O. — Nencki u. Sieber: a. a. O. — v. Fürth u. Jerusalem: Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 10, S. 131. 1907. — Ronau u. Rießer: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 57, S. 143. 1908; Bd. 61, S. 12. 1909. — Adler-Herzmark, Biochem. Zeitschr. Bd. 49, S. 130. 1913.

<sup>10)</sup> Sieber: a. a. O. — Nencki u. Sieber: a. a. O. — Jones: Americ. Journ. of physiol. Bd. 2, S. 380. 1899. — Spiegler: a. a. O. — Gortner: Journ. of biol. chem. Bd. 8, S. 341. 1910. — Fasal: Biochem. Zeitschr. Bd. 55, S. 393. 1913.

<sup>11)</sup> Abel u. Davis: Journ. of exp. med. Bd. 1, S. 361; ref. nach Malys Jahresber. d. Tierchem. 1896, S. 529. — Meirowski: Ursprung des melanotischen Pigments usw., Leipzig 1908. Literatur. — Young: Biochem. Journ. Bd. 8, S. 460. 1914.

<sup>12)</sup> Nencki u. Sieber: a. a. O. — v. Fürth u. Schneider: Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 1, S. 241. 1901. — Piettre: Compt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 153, S. 782, 1037. 1911; Bd. 155, S. 594. 1912.

<sup>13)</sup> Abderhalden: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 85, S. 92. 1912. — Salkowski: Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. Bd. 227, S. 121. 1920.

<sup>14)</sup> Americ. Journ. of physiol. Bd. 2, S. 291. 1899.

<sup>15)</sup> Zentralbl. f. allg. Pathol. u. pathol. Anat. Bd. 15, S. 617. 1904. Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 10, S. 131. 1907. Handb. d. Biochem. Bd. 1, S. 744. 1909.

<sup>16)</sup> Biochem. Handlex. Bd. VI, S. 293—302. 1911.

schwer löslich oder unlöslich, zum Teil leicht löslich. Viele geben bei der Zersetzung Pyrrol, Indol, Skatol.

Die dunklen Pigmente der Retina und Chorioidea, der Haut, der melanotischen Carcinome, der Haare und Federn, des Fischbeins usw. werden schnell zerstört, wenn sie in Alkalilauge gelöst oder suspendiert mit Chlor behandelt werden; in den Lungen und Bronchialdrüsen von Menschen findet sich dagegen zuweilen ein Körper, der bei völlig schwarzer Farbe und Unlöslichkeit in Kalilauge von Chlor nicht angegriffen wird, also wohl Kohle ist, da man diese Eigenschaft fast an keinem anderen organischen Körper kennt. Dieser Stoff ist in sehr feinen Körnchen in diesen Geweben eingelagert, doch finden sich zuweilen in den Lungen Splitter von Holzkohle, welche durch die Respiration dahin gelangt sind, und welche durch das Mikroskop gut unterschieden werden können. Konzentrierte Salpetersäure greift die schwarzen Pigmente meist sehr langsam an.

**Isoliertes Melanogen.** Aus dem Harn von Kranken mit melanotischen Tumoren ist ein krystallisiertes Chromogen isoliert, das eine N-Methyl-pyrrolidon-oxycarbonsäure zu sein scheint. Seine Ausscheidung ist stark vermehrt nach Eingabe von Tryptophan (Eppinger).

**Umwandlungen.** Spiegler erhielt aus Schimmelhaaren und weißer Schafwolle hellgraubraune Pulver, welche durch Einwirkung von Ammoniak schwarz wurden. Sie gaben ebenso wie die Melanine aus schwarzen Pferdehaaren und schwarzer Schafwolle bei der Oxydation mit Chromsäure Methyl-dibutylelessigsäure  $C_{11}H_{22}O_2$ . Hämatinsäure wurde nicht erhalten, ebenso nicht bei der Reduktion des schwarzen Pigments mit Jodwasserstoff und Jodphosphonium Hämopyrrol; auch aus Chorioidealpigment erhielt er kein Hämopyrrol.

Das aus melanotischen Lebern von H. Wolff dargestellte Melanin lieferte beim Erhitzen mit Bromwasserstoff und Brom auf  $120^\circ$  ein Öl, aus dem durch weitere Behandlung eine vermutlich mit Xyliton  $C_{12}H_{18}O$  identische Substanz erhalten wurde. v. Zumbusch konnte unter den hydrolytischen Zersetzungsprodukten von aus Leber gewonnenem Melanin Cystin, Tyrosin und Hexonbasen nicht auffinden.

v. Fürth und Jerusalem erhielten aus Hippomelanin weder Indol und Skatol noch Xyliton und Methyl-dibutylelessigsäure. Sie fanden weitgehende Übereinstimmung zwischen dem Hippomelanin und dem aus Tyrosin durch Einwirkung pflanzlicher Tyrosinase entstandenen künstlichen Melanin. Rona und Rießer erhielten aus Hippomelanin Guanidin, ein von Adler-Herzmark bestrittener Befund.

**Nachweis.** Die Unterscheidung der genannten Farbstoffe von den Blut- und Gallenfarbstoffen macht keine Schwierigkeiten; ihre Unterscheidung von Holzkohlen-, Steinkohlen-, Braunkohlenstaub wird zum Teil nur mikroskopisch möglich sein.

**309. Melanoidine (Melanoidinsäuren<sup>1</sup>).** Beim Kochen von Proteinen mit Mineralsäuren treten den Melaninen ähnliche Stoffe auf, besonders stark bei gleichzeitiger Gegenwart von Tryptophan und Kohlenhydratkomplexen: braune oder schwarze leicht pulverisierbare Substanzen von sehr wechselnder Zusammensetzung, in Alkalien mehr oder weniger leicht löslich, aus diesen Lösungen durch Säuren wieder fällbar. Das aus käuflichem Serumalbumin erhaltene Melanoidin gab bei der Zinkstaubdestillation Pyridin, pyrrolähnliche Körper und Skatol. Erstere beiden Substanzen treten auch bei der Behandlung mit Jodwasserstoff und Jodphosphonium auf (Samuely).

**Eisenablagerungen.** **310. Anorganische Ablagerungen** von gelbbrauner Farbe, bestehend aus Ferrihydrat mit Calciumphosphat und -carbonat kommen pathologisch sehr reichlich in der menschlichen Leber und in den Mesenteriallymphdrüsen vor und bleiben zurück, wenn die zerkleinerte Drüsenmasse

<sup>1</sup>) Mulder: Journ. f. prakt. Chem. Bd. 21, S. 343. 1840. — Nencki, Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 28, 1, S. 567. 1895. — Schmiedeberg: Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 39, S. 65. 1897. — Chittenden u. Albro: a. a. O. — Samuely: Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 2, S. 355. 1902. — Gortner u. Mitarbeiter: Journ. of the Americ. chem. soc. Bd. 37, S. 1630. 1915; Bd. 39, S. 2477, 2734. 1917; Bd. 42, S. 632. 1920; Journ. of biol. chem. Bd. 26, S. 177. 1917. — Fürth u. Lieben: Biochem. Zeitschr. Bd. 116, S. 224. 1921.

zunächst mit viel Wasser kalt extrahiert, dann mit verdünnter Natronlösung erwärmt, abfiltriert und sorgfältig mit Wasser ausgewaschen wird. Diese Massen lieferten in einem Falle lufttrocken gewogen 69%  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  neben 11—12%  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  und über 5%  $\text{CaCO}_3$ . Solche Eisenablagerungen können nicht wohl aus zersetztem Blutfarbstoff herrühren; sie können mehr Eisen enthalten als das gesamte Blut des betreffenden Menschen.

Bei zwei Erkrankungen, bei der Pseudomelanose (Ernst<sup>1</sup>) und bei Chloromgeschwülsten (Kossel und Giese<sup>2</sup>) hat sich die Schwarz- resp. Grünfärbung auf fein verteiltes Eisensulfid zurückführen lassen.

### *Lipochrome*<sup>3</sup>).

311. Unter diesem Sammelnamen hat man eine nicht geringe Zahl<sup>4</sup>) unvoll- Allgemeines.  
kommen bekannter und meist nicht rein dargestellter gelber bis roter Farbstoffe zusammengefaßt, die darin übereinstimmen, daß sie in Fetten, Äther, Alkohol, Amylalkohol, Benzol, Chloroform, auch in wässerigen Seifenlösungen löslich sind, in letzteren allerdings wohl nur kolloidal, während reines Wasser gar nicht löst, schlecht stark wasserhaltiger Alkohol und Aceton. Man hat sie meist nicht frei von Fetten oder Seifen erhalten können. Soweit sie chemisch identifiziert werden konnten, haben sie sich als Carotinoide erwiesen.

Die Lipochrome — von Thudichum<sup>5</sup>) auch Luteine genannt — sind im Vorkommen.  
Eigelb und verschiedenen tierischen Organen und Säften aufgefunden worden, so in den Corpora lutea der Kühe, den Fettkügelchen der Retina, in Fettgeweben, dem Blutserum und serösen Flüssigkeiten (Thudichum). Relativ reich daran sind Eigelb und die Sera von Huhn und Rind sowie Rindermilch (Palmer und Mitarbeiter<sup>6</sup>), während beim Menschen das Serum arm daran ist, reich dagegen Leber und Nebenniere (Hymans v. d. Bergh und Muller). Ob der gleichen Gruppe auch der als fettlöslicher Faktor A bezeichnete Bestandteil der Butter angehört, das Vitamin A, ist vorläufig noch zweifelhaft (Drummond und Mitarbeiter<sup>7</sup>), Steenbock<sup>8</sup>), Palmer<sup>9</sup>). Diese Luteine zeigen, worauf schon Zusammenhang mit Carotinoiden.  
Thudichum hinwies, große Ähnlichkeit, sind sogar teilweise identisch mit entsprechenden gelbroten Farbstoffen der Pflanze, die neuerdings unter dem Namen der Carotinoide zusammengefaßt worden sind (Tswett<sup>10</sup>). Es hat sich dann auch durch Fütterungsversuche ein enger Zusammenhang beweisen lassen zwischen dem Gehalt der Nahrung an Carotinoiden und dem Gehalt des Serums, des Eigelbs an Lipochromen (Palmer, Hymans v. d. Bergh). Starke Zuführung von Carotinoiden kann beim Menschen zu einer Xanthosis, einer starken Gelbfärbung der Haut führen (Literatur bei Hymans v. d. Bergh und Muller). Von den ihrer Formel nach aufgeklärten Lipochromen hat sich das Lutein des Hühnereis als isomer mit dem Pflanzenfarbstoff Xanthophyll erwiesen (Willstätter und Escher<sup>11</sup>), das in den Corpora lutea und gelegentlich auch in Gallensteinen (H. Fischer und Röse<sup>12</sup>) vorkommende Lipochrom war mit dem Carotin

<sup>1</sup>) Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. Bd. 152, S. 418. 1898.

<sup>2</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 114, S. 127. 1921.

<sup>3</sup>) Literatur bei Hymans v. d. Bergh u. Muller: Biochem. Zeitschr. Bd. 108, S. 279. 1920.

<sup>4</sup>) Zusammenstellung von Lipochromen bei Samuely im Biochem. Handlex. Bd. VI, S. 303. 1911 u. Handb. der biol. Arbeitsmeth. Abt. I, Bd. 8, S. 722. Berlin-Wien. 1922.

<sup>5</sup>) Zentralbl. f. d. med. Wiss. 1869, S. 1. Proc. of the roy. soc. of London Bd. 17, S. 253. 1869.

<sup>6</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 17, S. 191. 1914; Bd. 23, S. 261. 1915; Bd. 27, S. 27. 1916.

<sup>7</sup>) Lancet Bd. 198, S. 862. 1920; ref. Chem. Zentralbl. 1920, II, S. 206; Biochem. Journ. Bd. 14, S. 668. 1920; ref. Chem. Zentralbl. 1921, I, S. 42.

<sup>8</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 51, S. 63. 1922.

<sup>9</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 39, S. 299. 1919; Bd. 46, S. 559. 1921.

<sup>10</sup>) Ber. d. dtsh. botan. Ges. Bd. 29, S. 630. 1911. — Näheres über Carotinoide bei Willstätter u. Stoll: Untersuchungen über Chlorophyll. S. 101—125 u. 231—250. Berlin 1911. — Kurze Zusammenstellung bei Brigl: Die chem. Erforschung der Naturfarbstoffe. S. 71—74. Braunschweig 1921.

<sup>11</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 76, S. 214. 1911. <sup>12</sup>) desgl. Bd. 88, S. 331. 1913.

- der Mohrrüben identisch (Escher<sup>1</sup>). In den meisten Fällen ist die Untersuchung noch nicht soweit durchgeführt, man hat sich vielfach auf Grund von Löslichkeitsverhältnissen (vgl. Entmischungsprobe bei Lutein in dem folgenden § 312) damit begnügt, zu entscheiden, ob es sich um einen dem Xanthophyll oder dem Carotin ähnlichen Farbstoff handelt. In spektroskopischer Hinsicht zeigen all diese Farbstoffe Absorptionsstreifen — meist zwei oder drei — im blauen Teil des Spektrums. In chemischer Hinsicht unterscheiden sich diese Farbstoffe durch das Fehlen jeder sauren oder basischen Gruppe von anderen tierischen Farbstoffen, es handelt sich um Kohlenwasserstoffe oder Oxydationsprodukte von solchen. Sie sind außerordentlich empfindlich gegen Oxydation, selbst durch den Luftsauerstoff, und gegen Lichteinwirkung. Mit konzentrierter Schwefelsäure geben sie alle eine tiefe Blaufärbung, eine analoge Färbung mit Salpetersäure ist wenig beständig.
- Spektrum.** 312. Lutein aus Eigelb,  $C_{40}H_{56}O_2$ , wegen seiner nahen Verwandtschaft mit dem pflanzlichen Xanthophyll als Xanthophyll *b* bezeichnet. Nach älteren vergeblichen Isolierungsversuchen von Städeler<sup>2</sup>) und Kühne<sup>3</sup>) und nur spektroskopischer Charakterisierung durch Schunk<sup>4</sup>) ist es in reiner krystallisierter Form erst durch Willstätter und Escher<sup>5</sup>) gewonnen.
- Umwandlungen.** Zur Darstellung des Luteins werden je 6 kg Eidotter erst einmal mit 7 l Sprit vorbehandelt, dann ohne Trocknung mit insgesamt 7 l Aceton das Lutein bei Zimmertemperatur extrahiert. Die vereinigten Acetonlösungen lassen beim Stehen ein Öl ausfallen, das verworfen wird. Je 6 l Acetonextrakt werden mit  $\frac{1}{2}$  l Petroläther vermischt und mit dem 3fachen Volumen Wasser vorsichtig unter Vermeidung von Emulsionen unterschichtet. Nach 24stündigem Stehen gießt man die wässrige Acetonschicht ab und löst den zurückbleibenden fettigen Sirup in 20 l Petroläther. Durch Versetzen mit 40 l Aceton werden Phosphatide entfernt und dann das Aceton durch 3maliges Waschen mit Wasser entfernt. Die mit Natriumsulfat getrocknete Petrolätherschicht wird auf 2 l im Vakuum eingedampft, von ausgefallenem Cholesterin abfiltriert und nach Verdünnen mit 4 l Petroläther im Eisschrank stehen gelassen, worauf in einigen Tagen ein Rohlutein auskrystallisiert, in einer Ausbeute von 4 g aus 110 kg Eidotter, aus 6000 Eiern stammend. Zur Reinigung wird erst durch kurzes Aufkochen mit kleineren Mengen Methylalkohol ein farbloses Wachs entfernt und dann je  $\frac{1}{4}$  g in 240—270 ccm Methylalkohol heiß gelöst. Die in der Kälte ausfallenden Krystalle werden noch 2—3 mal aus Methylalkohol umkrystallisiert. Sie enthalten 1 Mol. Krystallalkohol, das sie nur langsam abgeben.
- Lutein aus Eigelb.** Das Lutein krystallisiert aus Methylalkohol in Prismen, auch Wetzsteinformen und rhomboedrische, fast würfelförmige Täfelchen sind zu beobachten, aus Schwefelkohlenstoff in Prismen ohne Krystalllösungsmittel. Die Krystalle, von lebhaftem Metallglanz, sind in der Aufsicht bernsteingelb, in der Durchsicht braungelb, das Pulver ziegel- bis mennigerot. Der Schmelzpunkt liegt, beim Eintauchen in ein vorgewärmtes Bad, bei 195—196° (korr.). Lutein löst sich nicht in Wasser, verdünnten Säuren und Alkalien, sehr leicht in Chloroform, merklich in warmem Schwefelkohlenstoff (1 g in 400 ccm), in der Kälte viel schwerer, leichter in Benzol und Äther. In Petroläther ist es in der Kälte so gut wie unlöslich, beim Kochen nur ganz wenig. Von siedendem Methylalkohol ist zur Lösung die 800fache Menge erforderlich. Diese Löslichkeitsverhältnisse
- Darstellung.**
- Eigenschaften.**

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 83, S. 198. 1913.

<sup>2</sup>) Journ. f. prakt. Chem. Bd. 100, S. 148. 1867.

<sup>3</sup>) Untersuch. a. d. physiol. Inst. Heidelberg Bd. 1, S. 341. 1878; Bd. 4, S. 169. 1882.

<sup>4</sup>) Proc. of the roy. soc. of London Bd. 72, S. 165. 1903.

<sup>5</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 83, S. 198. 1913.

zeigt jedoch nur das reine Lutein, durch Beimengungen von Lipoiden wird seine Löslichkeit stark erhöht. Eine alkoholische Lösung, mit Petroläther vermischt und durch vorsichtigen Wasserzusatz entmischt, enthält den Farbstoff fast vollständig in der alkoholischen Schicht (gleiches Verhalten wie pflanzliches Xanthophyll, dagegen Wandern in die Petrolätherschicht beim Carotin). Entmischungsprobe.

Die Farbe des Luteins ist in verdünnten Lösungen goldgelb, nur in Schwefelkohlenstoff gelbrot. Das Spektrum ist voll identisch mit dem des pflanzlichen Xanthophylls, in Alkohol 2 Bänder im Blau bei 484—472 und 454—441  $\mu\mu$  und Endabsorption des Violett von 419  $\mu\mu$  an; in Schwefelkohlenstoff 3 Bänder, von denen das dritte bei stärkerer Verdünnung zuerst verschwindet, bei 516—501, 483—467 und 447—441  $\mu\mu$ . Farbe. Spektrum.

Lutein ist an der Luft mit zunehmender Geschwindigkeit autoxydabel, es nimmt bis zu 23% seines Gewichts an der Luft zu, ohne wesentlich abzublassen. In ätherischer Lösung addiert es Jod unter Bildung eines dunkelvioletten Pulvers mikroskopischer Spieße. Umwandlungen.

In den Eidottern ist noch ein anderer, roter Farbstoff beobachtet, vielleicht Carotin. Er ist jedoch noch nicht rein erhalten. Ebensovienig sind die von Maly<sup>1)</sup> aus den Eiern der Seespinne (*Maja squinado*) isolierten krystallisierten Luteine, Vitellolutein und Vitellorubin, bisher chemisch aufgeklärt. Andere Eifarbstoffe.

**313. Carotin** aus den Corpora lutea der Kuh,  $C_{40}H_{56}$ . Dieser fast gleichzeitig von Piccolo und Lieben<sup>2)</sup> sowie von Holm und Städeler<sup>3)</sup> in krystallisierter Form isolierte Farbstoff der Ovarien des Rindes ist erst durch Escher<sup>4)</sup> voll aufgeklärt, er erwies sich allen untersuchten Eigenschaften nach als völlig identisch mit dem Carotin der Mohrrüben. Carotin ist gelegentlich auch im Ätherextrakt von Rindergallensteinen beobachtet (H. Fischer und Röse). Neben wenig Xanthophyll soll Carotin den Hauptfarbstoff des Rinderserums und Milchfetts darstellen (Hymans v. d. Bergh u. Snapper<sup>5)</sup>, Willstätter u. Escher, Palmer u. Eckles). Vorkommen.

Zur Gewinnung des Carotins aus den Corpora lutea werden Rinderovarien erst mit 60proz., dann mit 95proz. Alkohol vorbehandelt, dann mit Petroläther (Kp. 50—70°) bei Zimmertemperatur extrahiert. Der Petrolätherauszug wird 7 mal mit dem 6. Teil an Methylalkohol von 85% gewaschen, der Alkohol durch Wasser entfernt, mit Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum zum dicken Sirup eingedampft. Der Rückstand wird mit der 6—10fachen Menge absoluten Äthylalkohols versetzt, 10—15 Minuten in einer Eiskochsalzmischung gekühlt, durch Kolieren getrennt und das Filtrat im Eisschrank stehen gelassen. Bald beginnt die Krystallisation des Carotins. Man wäscht die Krystalle mit einer Mischung gleicher Teile Petroläther und absolutem Alkohol, löst in Schwefelkohlenstoff und bringt durch Alkohol wieder zur Krystallisation, krystallisiert dann nochmals aus Petroläther oder Äther. Gewinnung.

Das Pigment des Corpus luteum zeigt alle Eigenschaften des Carotins, die für das Präparat aus Mohrrüben durch Willstätter und Escher<sup>6)</sup> und für das Carotin aus grünen Blättern von Willstätter und Mieg<sup>7)</sup> angegeben sind. Die Krystalle, vom allerdings je nach der Art des Erhitzens etwas schwankenden Fp. 175°, bestehen aus fast quadratischen Rhomboedern, bald in Blättchen, bald in Wetzsteinen oder Spießen auftretend. Die Farbe ist in der Durchsicht rot, Eigenschaften.

1) Monatshefte f. Chem. Bd. 2, S. 351. 1881.

2) Zeitschr. f. Chem. Bd. 4, S. 645. 1868.

3) Journ. f. prakt. Chem. Bd. 100, S. 142. 1867.

4) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 83, S. 198. 1913.

5) Deutsch. Arch. f. klin. Med. Bd. 110, S. 540. 1913. Weitere Literatur in § 311.

6) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 64, S. 57. 1910.

7) Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 355, S. 1. 1907.

in der Aufsicht dunkelbraun, mit bald kupferfarbigem, bald samtartigem Reflex. Der Farbstoff löst sich spielend in Schwefelkohlenstoff, gut in Chloroform und Benzol, sehr schwer in siedendem Alkohol. Von Petroläther ist für 1 g 1,5 l zum Lösen erforderlich, von Äther fast 1 l.

**Entmischungsprobe.** Bei der Entmischung einer Alkohol-Petrolätherlösung durch wenig Wasser wandert der Farbstoff in die obere Petrolätherschicht (Unterschied von Lutein und Xanthophyll).

**Lösungsfarbe, Spektrum.** Die Farbe seiner Lösungen ist goldgelb, nur die in Schwefelkohlenstoff ist verdünnt rein rot, in stärkerer Lösung tief rotorange, mit einem Stich ins Blaue. Das Spektrum der alkoholischen Lösung zeigt 2 Absorptionsbänder bei 493—476 und 459—444,5  $\mu\mu$  und Endabsorption von 417  $\mu\mu$  ab, in Schwefelkohlenstoff liegen die Bänder bei 526—512 und 488—475  $\mu\mu$ .

**Umwandlungen.** Der Farbstoff ist gleichfalls stark autoxydabel, er nimmt, unter Abblässen, bis zu 36% an Gewicht zu beim Liegen in einer Sauerstoffatmosphäre. Mit Jod gibt er ein krystallisiertes Trijodid  $C_{40}H_{56}J_3$ , violette Nadeln, vom Fp. 135°, identisch mit dem Trijodid des Carotins aus Mohrrüben (Willstätter und Escher).

**Andere Carotinoide.** In die Carotingruppe gehört wahrscheinlich auch der Farbstoff des gelben Fettes (Escher<sup>1</sup>). Unsicher ist, ob hier ein Farbstoff einzuregistrieren ist, der die gelbrote Farbe der infolge von Inanition völlig atrophisch und fettfrei gewordenen Fettzellen im Knochenmark und in den Genitaldrüsen des Frosches bedingt. Er gibt mit Jodjodkalium eine bläuliche Färbung, welche alsbald in ein Dunkelblauschwarz übergeht (E. Neumann<sup>2</sup>).

**314. Weitere Lipochrome.** Beim Lutein aus Eigelb und dem Carotin aus den Corpora lutea des Rindes ist es gelungen, nachzuweisen, daß man es mit Vertretern zweier Untergruppen zu tun hat, nahe verwandt oder identisch mit pflanzlichen Carotinoiden, den mehr gelblichen, sauerstoffhaltigen Xanthophyllfarbstoffen wie dem Lutein des Eigelbs, löslich in Alkoholen, kaum in Petroläther, und dem sauerstofffreien, deutlich rötlicher tingierenden Carotin, besser löslich in Petroläther, kaum in Alkoholen. Völlig ungewiß ist aber, inwieweit eine ganze Reihe weiterer Lipochrome der Wirbeltiere und Wirbellosen in die gleichen Gruppen einzuordnen sind, ob nicht unter ihnen Vertreter noch neuer Gruppen anzunehmen sind. Zwar sind auch unter ihnen noch eine ganze Reihe krystallisierbarer Stoffe aufgefunden worden, ihre Untersuchung fällt jedoch noch in die Zeit vor der Durchforschung der pflanzlichen Carotinoide durch Willstätter und seine Schüler, so daß die Neubearbeitung auf Grund dieser Erfahrungen noch aussteht. Es werden deshalb hier nur kurz einige Vertreter angeführt; wegen Einzelheiten muß auf die Originalliteratur verwiesen werden.

**Tetronerythrin** nannte Wurm<sup>3</sup>) einen Farbstoff, der die Rotfärbung bedingt, die man an den als „Rosen“ bezeichneten runzligen Hautpartien in der Umgebung des Auges von Auer-, Birk- und Haselhähnen beobachten kann. Es gelang Wurm aber ebensowenig wie Hoppe-Seyler, den Farbstoff rein zu isolieren. Nach seiner gelbroten Farbe, seiner Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln, dem Fehlen saurer Eigenschaften ähnelt er sehr den Carotinoiden. Er teilt mit ihnen die Empfindlichkeit gegen Licht und Sauerstoff.

**Crustaceorubin.** Als identisch oder nahe verwandt mit dem Tetronerythrin wird meist das weitverbreitete Crustaceorubin angesehen, das sich in der Hypodermis vieler Crustaceen findet (Pouchet<sup>4</sup>), Krukenberg<sup>5</sup>), Newbiggin<sup>6</sup>). In den Schalen kommt eine blaue Vorstufe vor, das Cyanokrystallin, das durch Erwärmen mit Wasser oder Behandlung mit Säuren sehr rasch in das Crustaceorubin unter Abspaltung einer Base übergeht (Krukenberg, Newbiggin).

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 83, S. 208 Anm. 2. 1913.

<sup>2</sup>) Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. Bd. 170, S. 363. 1902.

<sup>3</sup>) Zeitschr. f. wiss. Zool. 1871, S. 535.

<sup>4</sup>) Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 74, S. 757. 1872. Journ. d'anat. et physiol. Bd. 12, S. 10. 1876.

<sup>5</sup>) Vergleich. physiol. Studien Bd. 2, III, S. 39 u. 71. 1882.

<sup>6</sup>) Journ. of physiol. Bd. 21, S. 237. 1897.

Crustaceorubin ist auch im Blut, in der Leber und in Ovarien von höher organisierten Crustaceen beobachtet worden (Halliburton<sup>1)</sup>, Mac Munn<sup>2)</sup>, Heim<sup>3)</sup>. Auch die rote Farbe niederer Crustaceen ist oft durch ähnliche Lipochrome bedingt (Zoff<sup>4)</sup>, Blanchard<sup>5)</sup>. In Schwämmen schließlich fand Krukenberg<sup>6)</sup> einen zum mindesten sehr ähnlichen, wenn nicht identischen Farbstoff.

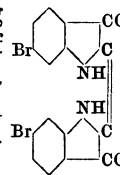
In Form roter Krystalle ist der Farbstoff aus Hypodermis und Schale von Flußkrebis und Hummer dargestellt. Er löst sich in organischen Lösungsmitteln mit gelbroter bis roter Farbe. Er zeigt die Empfindlichkeit gegen Licht und Sauerstoff, die charakteristische Blaufärbung der Lipochrome mit konzentrierter Schwefelsäure und Salpetersäure, unterscheidet sich aber von den Luteinen durch seine sauren Eigenschaften. Er soll mit Alkalien und Erdalkalien gelbrote Salze bilden, unlöslich in Wasser und Alkohol, löslich aber in Äther und Benzol.

Ein krystallisiertes Lipochrom aus *Euglena viridis* konnte Kutscher<sup>7)</sup> durch Alkohol-extraktion und Eindunsten gewinnen. Wetzsteinförmige, rote Krystalle vom Fp. 103—108°, die die üblichen Reaktionen der Lipochrome zeigten.

#### Andere Farbstoffe.

**315. Schneckenpurpur.** Eine Gruppe von Farbstoffen, die im Altertum an der Mittelmeerküste und — noch bis heutigen Tages — in Mittelamerika zur Herstellung von Purpurfärbung von Geweben diente<sup>8)</sup>, entwickelt sich aus ihrer Natur nach unaufgeklärten Chromogenen, die in der Hypobranchialdrüse vieler Mollusken, speziell der Prosobranchier, vorkommen und nach außen sezerniert werden. Unter dem Einfluß des Lichts, ohne daß Sauerstoffzufuhr erforderlich ist, entwickelt sich aus diesem Sekret der eigentliche Farbstoff (Schunk<sup>9)</sup>, Dubois<sup>10)</sup>. Es blieb zunächst ungewiß, wieweit die einzelnen Farbstoffe, die aus *Purpura haemostoma* und *Purpura lapillus*, aus *Murex brandaris*, *trunculus* und *erinaceus* isoliert worden sind, und unter dem Namen Punicin (Schunk) oder Purpurin (Dubois) beschrieben wurden, untereinander identisch waren. Nach dem ganzen Farbcharakter handelte es sich in allen Fällen um Substanzen, die chemisch dem Indigo (§ 227) sehr nahe standen. Erst Friedländer machte es für *Murex trunculus* und *Purpura lapillus* sehr wahrscheinlich, was für die Mittelmeerschnecke *Murex brandaris*<sup>11)</sup> und die mittelamerikanische Art *Purpura aperta*<sup>12)</sup> durch die Analyse bewiesen werden konnte, daß es sich um 6-6-Dibromindigo handelte, der schon früher synthetisiert war (Sachs, Kempf und Sichel<sup>13)</sup>).

**316. Antiker Purpur** aus *Murex brandaris*,  $C_{16}H_8Br_2O_2N_2$ . Zur Isolierung nach Friedländer werden die Hypobranchialdrüsen herauspräpariert und der auf Filtrierpapier gestrichene Inhalt durch Belichtung zum Farbstoff entwickelt. Man entfernt durch Behandlung mit heißer, verdünnter Schwefelsäure, heißem Wasser und Alkohol eine Reihe von Beimengungen und extrahiert den Farbstoff dann durch warmes Acetylentetrachlorid oder Benzoesäureester. Den beim Erkalten ausfallenden Farbstoff reinigt man durch Umkrystallisieren aus Benzoesäureester oder Chinolin. Flimmernde, kupferglänzende Krystalle, sublimierbar,



<sup>1)</sup> Journ. of physiol. Bd. 6, S. 300. 1885.

<sup>2)</sup> Proc. of the roy. soc. of London Bd. 35, S. 132. 1883.

<sup>3)</sup> Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 114, S. 722. 1892.

<sup>4)</sup> Beiträge z. Physiol. u. Morphol. nied. Organismen, III. Heft, S. 26—34. Leipzig 1893.

<sup>5)</sup> Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 110, S. 292. 1890.

<sup>6)</sup> Zentralbl. f. d. med. Wiss. 1879, S. 705.

<sup>7)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 24, S. 360. 1898.

<sup>8)</sup> Literatur über Geschichte bei v. Fürth: Vergleich. chem. Physiol. nied. Tiere, Jena 1903, S. 374, und bei Samuely: Biochem. Handlex. Bd. VI, S. 317 Anm. 2. Berlin 1911.

<sup>9)</sup> Journ. of the chem. soc. Bd. 35, S. 589. 1879; Bd. 37, S. 613. 1880.

<sup>10)</sup> Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 134, S. 245. 1902; Bd. 136, S. 117. 1903. Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. Bd. 54, S. 82 u. 657. 1902; Bd. 55, S. 82. 1903; Bd. 62, S. 718. 1907.

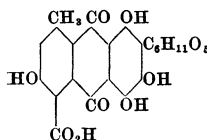
<sup>11)</sup> Monatshefte f. Chem. Bd. 28, S. 991. 1907. Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 42, 1, S. 765. 1909.

<sup>12)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 55, S. 1655. 1922.

<sup>13)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 36, 3, S. 3303. 1903; Bd. 37, 2, S. 1868. 1904.

nur löslich in einigen hochsiedenden Lösungsmitteln beim Erwärmen, wie Chinolin, Nitrobenzol, Phenol und Benzoesäureäthylester. Die Farbe ist ein nicht besonders leuchtendes rotstichiges Violett. Sein Spektrum zeigt einen Absorptionsstreifen beiderseits der *D*-Linie. Er ähnelt dem Indigo darin, daß er durch alkalische Reduktion, etwa durch Hydrosulfit, in eine gelbe Küpelnlösung zu verwandeln ist, die bei Luftzutritt den Farbstoff regeneriert. Durch Oxydation wird er nicht reversibel entfärbt.

317. Farbstoffe der Schildläuse. In verschiedenen Arten von Schildläusen (Coccidae) sind Farbstoffe beobachtet worden, die untereinander nahe verwandt, jedoch nicht identisch sind. Besonders reich an Farbstoff sind die Weibchen kurz vor der Eiablage, wovon sogar für die technische Gewinnung<sup>1)</sup> Gebrauch gemacht wird. Näher untersucht sind von diesen Farbstoffen die Kermessäure und die Carminsäure, in geringerem Maßstab auch die Laccainsäure. Sie haben sich alle als Anthrachinonderivate erwiesen (Dimroth und Mitarbeiter, s. unten).



318. Carminsäure  $C_{22}H_{20}O_{13}$  oder, weniger wahrscheinlich,  $C_{22}H_{22}O_{13}$  (Dimroth u. Kämmerer<sup>2)</sup>), der Farbstoff der Cochenille, den getrockneten Weibchen von *Coccus cacti* *Coccinellifera*. Man gewinnt den Farbstoff, der 9–10% vom Trockengewicht der Cochenille ausmacht (Liebermann<sup>3)</sup>), in Krystallen durch Fällung eines wässrigen Cochenilleauszuges mit Bleiacetat (Warren de la Rue<sup>4)</sup>), Schunk u. Marotlewski<sup>5)</sup>), Zerlegung des Bleisalzes durch methyalkoholische Schwefelsäure und Umkrystallisieren der freien Carminsäure aus wässrigem Methylalkohol (Dimroth<sup>6)</sup>).

**Eigenschaften.** Die Carminsäure besteht aus prächtig granatroten, schräg abgeschnittenen prismatischen Nadelchen, die bei 130° nachzudunkeln beginnen und bei etwa 205° verkohlen. Sie löst sich mittelschwer in Wasser in der Kälte, gut in heißem Wasser, wässrigen Alkalien und Alkalicarbonaten, sowie konzentrierter Schwefelsäure. Aceton löst gut, schwerer Alkohole, kaum Äther, nicht Benzol, Chloroform und Eisessig. Mit den Hydroxyden mehrwertiger Metalle tritt sie zu stark gefärbten Komplexverbindungen (Farblacken) zusammen. Die Carminsäure ist optisch aktiv, in wässriger Lösung ist  $[\alpha]_{645}^{25} = +51,6^\circ$ .

**Spektrum.** Die cochenillerothe Lösung der Carminsäure in Alkalien hat 2 Absorptionsstreifen, deren Maxima bei 570 und 530  $\mu\mu$  liegen, in konzentrierter Schwefelsäure ebenfalls 2 Streifen bei 535 und 505  $\mu\mu$  (Dimroth u. Goldschmidt<sup>7)</sup>), Dimroth und Fick<sup>8)</sup>).

**Derivate.** Es sind zahlreiche Salze<sup>9)</sup> der Carminsäure bekannt, meistens werden 2 Äquivalente des betreffenden Metalls gebunden, gelegentlich auch nur 1 Äquivalent. Auch organische Basen sind zur Salzbildung befähigt. Bei der Acetylierung mit Essigsäureanhydrid allein erhält man ein Hexacetat  $C_{34}H_{32}O_{19}$ , Fp. 170°, bei Gegenwart von etwas Schwefelsäure ein Octacetat  $C_{38}H_{36}O_{21}$ , Fp. 155–165° (Miller und v. Rohde<sup>10)</sup>), Dimroth und Kämmerer). Bei der Methylierung mit Jodmethyl und Silberoxyd sind 2–6 Methylgruppen einzuführen, von denen eine die Carboxylgruppe verestert (Liebermann<sup>11)</sup>), Dimroth<sup>12)</sup>).

<sup>1)</sup> Näheres über techn. Einzelheiten der Gewinnung und Verwendung in der Färberei bei Rupe: Die Chemie der natürl. Farbstoffe, Bd. I, S. 170–201. Braunschweig 1900.

<sup>2)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 53, 1, S. 474. 1920. <sup>3)</sup> desgl. Bd. 18, 2, S. 1970. 1885.

<sup>4)</sup> Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 64, S. 1. 1848.

<sup>5)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 27, 3, S. 2979. 1894.

<sup>6)</sup> Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 399, S. 16. 1913.

<sup>7)</sup> Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 399, S. 71. 1913. <sup>8)</sup> desgl. Bd. 411, S. 334. 1916.

<sup>9)</sup> Zusammenstellung bei Samuely: Biochem. Handlex. Bd. VI, S. 326. Berlin 1911.

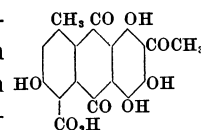
<sup>10)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 30, 2, S. 1759. 1897. <sup>11)</sup> desgl. Bd. 42, 2, S. 1922. 1909.

<sup>12)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 42, 2, S. 1611 Anm. 1909.



Beim Abbau der Carminsäure sind zahlreiche Derivate<sup>1)</sup> erhältlich. Bei der Zinkstaubdestillation der Carminsäure wird Anthracen, wahrscheinlich auch  $\alpha$ -Methylantracen, erhalten (Dimroth). Kalischmelze führt zum Coccinin (Hlasiwetz und Grabowski<sup>2)</sup>), von Dimroth als substituiertes Anthranol erwiesen. Brom führt in  $\alpha$ - und  $\beta$ -Bromcarmin über (Will u. Leymann<sup>3)</sup>), Miller und v. Rohde<sup>4)</sup>), v. Rohde und Dorfmueller<sup>5)</sup>). Salpetersäure oxydiert zur Nitrokokkussäure (Warren de la Rue), Kaliumpersulfat zur Cochenillesäure (Liebermann und Voswinkel<sup>6)</sup>), vorsichtige Oxydation mit Übermangansäure zum Carminazarin, neben anderen substituierten Naphthochinon-carbonsäuren (Dimroth<sup>7)</sup>).

319. Kermessäure  $C_{18}H_{12}O_9$ , 1, 3, 4, 6-Tetraoxy-2-aceto-8-methylanthrachinon-5-carbonsäure, der Hauptfarbstoff des Kermes, den getrockneten Weibchen von *Coccus ilicis* oder *bafica*. Sie ist von Heise<sup>8)</sup> zuerst isoliert, von Dimroth<sup>9)</sup>, teilweise gemeinsam mit Scheurer<sup>10)</sup> und Fick<sup>11)</sup>, seiner Konstitution nach aufgeklärt worden.



Zur Gewinnung wird das technische Material von Kermes erst mit Äther erschöpft, der Rückstand mit ätherischer Salzsäure behandelt, wodurch die Kermessäure aus einem Salz in Freiheit gesetzt wird, die jetzt bei einer zweiten Ätherextraktion in den Äther hineinwandert. Die weitere Reinigung des Verdampfungsrückstandes erfolgt am besten über das in Natriumacetatlösung schwer lösliche Dinatriumsalz der Kermessäure (Dimroth und Fick). Die aus dem Natriumsalz in Freiheit gesetzte Kermessäure krystallisiert man aus Wasser oder verdünntem Alkohol.

Die Kermessäure besteht aus ziegelroten Nadelchen, die keinen Schmelzpunkt haben. Von 250° an ist Zersetzung zu beobachten, bei höherer Temperatur Verkohlung unter Bildung eines kleinen, roten Sublimats. Sie ist schwer löslich in kaltem Wasser, besser in heißem, gut in Alkalien und Alkalicarbonaten sowie konzentrierter Schwefelsäure. Gut lösen Methyl- und Äthylalkohol, mäßig Äther, nicht Benzol und Chloroform. Die Farbe der freien Säure ist in Lösungen gelbrot, Alkalien geben zunächst rote Lösungen, die mit mehr Alkali violett werden. Die Farbe in Schwefelsäure ist violett und wird rein blau auf Zusatz von Borsäure.

Die Absorptionsstreifen ähneln sehr denen der Carminsäure, in Alkalien die Lage der Streifen identisch, in Schwefelsäure sind sie etwas nach Rot verschoben, die Maxima liegen bei 550 und 512  $\mu\mu$  (Dimroth und Fick).

Von Salzen sind ein Dinatrium- und Bariumsalze bekannt. Methylierung der Kermessäure mit Alkali und Methylsulfat ergibt ein Trimethylprodukt, orangerote Nadeln, aus Eisessig, Fp. 310°. Eine der 3 Methyle hat die Carboxylgruppe verestert. Acetylierung mit Essigsäureanhydrid ergibt ein Tetraacetat, gelbe Nadeln aus Eisessig, Fp. 245°.

Der Abbau mit heißer konzentrierter Salpetersäure ergibt Nitrokokkussäure, mit Permanganat Cochenillesäure, mit Brom  $\alpha$ -Bromcarmin, unter anderen Bedingungen Monobromcoccin, das weiter in Tribromcoccin übergeht. Reduktion

<sup>1)</sup> Zusammenstellung mit Konstitutionsbildern bei Brigl: Chemische Erforschung der Naturfarbstoffe. S. 46—54. Braunschweig 1921.

<sup>2)</sup> Liebig's Ann. d. Chem. Bd. 141, S. 329. 1867.

<sup>3)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 18, 2, S. 3180. 1885. <sup>4)</sup> desgl. Bd. 26, 3, S. 2653. 1893.

<sup>5)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 43, 2, S. 1363. 1910.

<sup>6)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 30, 1, S. 688 u. 2, 1733. 1897.

<sup>7)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 42, 2, S. 1611. 1909.

<sup>8)</sup> Arb. a. d. Reichs-Gesundheitsamte 1895, S. 513.

<sup>9)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 43, 2, S. 1387. 1910.

<sup>10)</sup> Liebig's Ann. d. Chem. Bd. 399, S. 43. 1913. <sup>11)</sup> desgl. Bd. 411, S. 315. 1916.

mit Zinkstaub in Eisessig führt zum 1, 4, 6-Trioxo-8-methyl-anthrachinon, Destillation mit Zinkstaub zum  $\alpha$ -Methylantracen (Dimroth).

**Laccainsäure.** Laccainsäure  $C_{16}H_{12}O_8$ , der Farbstoff der Lackschildlaus (*Coccus laccae*). Er ist nach seinem ganzen Farbcharakter mit der Kermes- und Carminsäure nahe verwandt. Er ist bisher noch nicht völlig aufgeklärt. Einzelheiten bei Dimroth und Goldschmidt<sup>1)</sup>.

**320. Sehpurpur<sup>2)</sup>, Rhodopsin, Erythroopsin**, der Farbstoff der Stäbchenschicht der Retina bei allen Wirbeltieren. Um eine blutfarbstofffreie Sehpurpurlösung zu erhalten, extrahiert man die Netzhäute mit einer völlig alkoholfreien, wässrigen, sehr schwach alkalisch reagierenden Lösung von gallensaurem Natron, sättigt die Lösung mit kristallisiertem Magnesiumsulfat, wäscht den harzigen Niederschlag, welcher das Cholat und den Farbstoff enthält, aber frei von Blutfarbstoff ist, mit gesättigter Magnesiumsulfatlösung aus und löst ihn in Wasser. Statt dessen kann man auch die mit Alaun gehärteten Netzhäute zunächst mit Wasser, dann mit 10 proz. Kochsalzlösung behandeln und nun mit einer Lösung von gallensaurem Salz extrahieren. Zur Konservierung der Sehpurpurlösungen empfiehlt sich Sättigung mit Kochsalz. Die Lösung ist purpurrot. Entfernt man das Cholat durch Dialyse, so scheidet sich der Sehpurpur ab. Im Sonnenlicht geht die Farbe in Rot, Orange und Gelb über. Beim Erwärmen auf etwas über 50° wird der Farbstoff allmählich zerstört, ebenso zerstören ihn Alkalien, Säuren, Alkohol und Äther. Im Spektrum ruft er keine bestimmten Absorptionstreifen hervor, sondern nur eine diffuse Absorption, besonders bei E. Nach Koettgen und Abelsdorff<sup>3)</sup> ist der Sehpurpur der Fische durch abweichendes Absorptionsmaximum von dem der Säuger, Vögel und Amphibien verschieden.

**321. Turacin** wurde ein rotvioletter Farbstoff von Church<sup>4)</sup> genannt, den er aus den roten Partien der Flügelfedern von einigen Species der Musophagiden mit verdünntem Ammoniak extrahiert und mit Säuren aus dieser Lösung gefällt hat. Man kann bis zu 0,1 g aus einem Exemplar des Helmvogels isolieren. Seine alkalischen Lösungen zeigen zwei deutliche Absorptionstreifen in Grün und Gelb und einen auf der Grenze von Grün und Blau, nach H. Fischer und Hilger<sup>5)</sup> bei 573,8 und 557,0  $\mu\mu$  liegend. Auf Grund der procentigen Zusammensetzung (C 53,69, H 4,60, N 6,96, Cu 7,01) erteilte ihm Church die Formel  $C_{82}H_{81}N_9Cu_2O_{33}$ . H. Fischer und Hilger wiesen nach, daß die Analysen aber ebensogut zu einer Formel  $C_{40}H_{34}N_4O_{16}Cu$  paßten, der Formel des komplexen Kupfersalzes des Uroporphyrins (§ 293). Für die Annahme einer Identität des Turacins mit dem Kupfersalz des Uroporphyrins spricht weiter das gleiche spektrale Verhalten in ammoniakalischer Lösung. Ferner lassen sich beide Kupferverbindungen durch vorsichtige Behandlung mit Dimethylsulfat in Ester von gleicher Krystallform überführen. Es ist aber bisher noch nicht gelungen, aus dem Ester des Turacins das Kupfer zu entfernen und zum charakteristischen Ester des Uroporphyrins zu kommen. Durch Einwirkung von konzentrierter Schwefelsäure entsteht nach Church ein kupferfreier purpurroter Farbstoff, welcher weitgehende Übereinstimmung mit einem Porphyrin zeigt und Turacoporphyrin genannt wurde.

Zahlreiche andere Farbstoffe sind aus Vogelfedern und aus Avertebraten in mehr oder weniger reinem Zustande dargestellt worden. Ihre Besprechung würde zu weit führen.

**Vorkommen.** **322. Pyocyamin  $C_{14}H_{14}N_2O$**  ist von Fordos<sup>6)</sup> der vom *Bac. pyocyaneus* gebildete Farbstoff genannt worden. In der voraseptischen Zeit wurde häufig eine Blaufärbung des Eiters beobachtet; sie kommt auch heute noch gelegentlich vor. Ferner kann der *Bacillus* die Schweißdrüsen infizieren, worauf ein bläulicher Schweiß sezerniert wird. Lücke<sup>7)</sup>, welcher zuerst diese Erscheinung auf die Gegenwart dieser Mikroorganismen zurückführte, isolierte den Farbstoff aus den mit dem blauen Eiter getränkten Kompressen. Ledderhose<sup>8)</sup> gewann ihn in größeren Mengen durch Ausschütteln der Reinkulturen des *Bac. pyocyaneus* mit Chloroform und untersuchte ihn genauer.

**Eigenschaften.** Pyocyamin krystallisiert in mikroskopischen Nadeln oder durch rechtwinklige Kanten begrenzten Blättchen. Die Krystalle sind luftbeständig, schmelzen beim Erhitzen und zersetzen sich. Sie lösen sich leicht in Wasser, Alkohol und Chloroform, schwerer in Äther. Durch Säuren färbt sich eine Pyocyaminlösung rot und durch Alkalien wieder blau. Schüttelt man die Chloroformlösung mit wässriger Alkalilösung, so geht der Farbstoff in diese unter Violettfärbung über. Mit Pikrinsäure und Platinchlorid bildet es krystallisierende Verbindungen. Aus der alkoholischen oder wässrigen Lösung wird es durch Alaun oder Bleiacetat nicht gefällt. Es zeigt keine

1) Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 399, S. 62. 1913.

2) W. Kühne: Untersuch. a. d. phys. Inst. d. Univ. Heidelberg Bd. 1—4. — L. Hermann: Handb. d. Physiol. Bd. 3, S. 235. — Kühne: Zeitschr. f. Biol. Bd. 32, S. 21. 1895. — P. Trendelenburg: Arch. f. (Anat. u.) Physiol., Suppl.-Bd. 1904, S. 228. Dort Literatur.

3) Sitzungsber. d. preuß. Akad. d. Wiss. 1895, S. 621.

4) Chem. News Bd. 19, S. 265. 1869; Bd. 65, S. 218. 1892.

5) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 128, S. 167. 1923.

6) Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 56, S. 1128. 1862.

7) Langenbecks Arch. f. Chirurg. Bd. 3, S. 135. 1862.

8) Dtsch. Zeitschr. f. Chirurg. Bd. 28, S. 201. 1888.

deutlichen Absorptionsstreifen, aber schwefelsaures Pyocyanin absorbiert sehr stark das Licht von *D* bis *F*.

In verdünnten Säuren gelöst ist es ziemlich beständig, während es besonders in unreiner Umwandlungen. wässriger oder alkoholischer Lösung, auch unreinem Chloroform sich bald zerlegt. Starke Säuren verändern es beim Erwärmen. Durch Chlor, rauchende Salpetersäure und Terpentinöl wird es zerstört. Es geht leicht über in einen von Fordos Pyoxanthose genannten gelben Farbstoff, der in Wasser wenig, in Äther, Chloroform, Alkohol leicht löslich ist und in mikroskopischen Nadeln krystallisiert.

### Proteine (Eiweißstoffe).

(Bearbeitet \*) von K. T h o m a s - Leipzig).

**Allgemeines.** Die Proteine finden sich bei Menschen und Tieren in allen Geweben und Flüssigkeiten und bilden in den meisten die Hauptmasse der festen Stoffe. Sehr arm an ihnen sind im normalen Zustande Tränen, Schweiß und Harn. Es sind hochmolekulare Verbindungen, welche alle Kohlenstoff, Sauerstoff, Stickstoff und Wasserstoff, zumeist auch Schwefel enthalten. In vielen findet sich auch Phosphor, in manchen Eisen, in einzelnen auch Kupfer, Jod, Brom, Chlor. Sie stimmen darin überein, daß sie die Biuretreaktion (S. 449, 8) geben, beim Erhitzen den Geruch nach verbranntem Horn entwickeln und bei der hydrolytischen Spaltung Mono- und Diaminosäuren liefern. Eine rationelle, auf chemischer Basis ruhende Einteilung dieser großen Körperklasse ist bei der ungenügenden Kenntnis des chemischen Aufbaues zur Zeit noch nicht möglich. Es erscheint zweckmäßig, folgende Gruppen zu unterscheiden:

#### I. Einfache Proteine.

##### A. Eigentliche Eiweißstoffe.

1. Albumine und Globuline.
2. Koagulierte Eiweißstoffe.
3. Prolamine.
4. Histone.
5. Protamine.

##### B. Albuminoide oder Skleroproteine.

##### C. Umwandlungsprodukte einfacher Proteine.

1. Acidalbumine und Alkalbuminate (Metaproteine).
2. Intermediäre Spaltungsprodukte (Albumosen, Peptone, Kyrine, Polypeptide).
3. Oxydations- und Substitutionsprodukte.

#### II. Gekoppelte Proteine (Proteide).

1. Blutfarbstoffe.
2. Nucleoproteide.
3. Phosphorproteide.
4. Glucoproteide.

Diese Einteilung, welche nur zum Teil auf chemischen Prinzipien, hauptsächlich auf rein äußeren Merkmalen und Unterschieden im physikalischen Verhalten beruht, ist nur eine vorläufige und keine scharfe. Manche Proteine können mit demselben Recht mehreren Gruppen zugeteilt werden.

\*) Mit Ausnahme der Proteide.

**Eigentliche Eiweißstoffe.***Albumine und Globuline.*

Zusammensetzung  
und allgemeine  
Eigenschaften.

323. Sie enthalten alle Kohlenstoff, Sauerstoff, Stickstoff, Wasserstoff und Schwefel, aber in wechselnden Mengen, doch liegen die gefundenen Werte innerhalb folgender Grenzen:

C 51,5—53,5%	O 21,5—24,0%	N 15,0—16,7%
H 6,5— 7,3%	S 0,5— 2,3%	

Die Molekulargewichte sind sehr hoch, haben aber noch nicht mit Sicherheit festgestellt werden können. Am genauesten ist in dieser Hinsicht Eieralbumin untersucht, für das Sörensen ein Molekulargewicht von etwa 34 000 annimmt.

Bei der gewöhnlichen Darstellungsweise werden sie amorph erhalten, unter bestimmten Bedingungen ist es gelungen, manche krystallinisch zu gewinnen. Alle enthalten etwas Asche, welche auch durch Dialyse nicht ganz entfernt werden kann<sup>1)</sup>. Sie sind zum Teil in Wasser, zum Teil nur in salzhaltigem Wasser löslich, in Äther, Schwefelkohlenstoff, Chloroform und derartigen Lösungsmitteln unlöslich; in Alkohol lösen sich manche in geringem Grade. Sie diffundieren nicht (oder richtiger außerordentlich langsam), ihre Lösungen zeigen alle Linksdrehung, veränderlich mit der Reaktion der Lösung (Pauli, Samec und Strauß<sup>2)</sup>). Sie verhalten sich wie Basen und wie Säuren, indem sie sowohl mit Säuren wie mit Metallen lockere Verbindungen einzugehen vermögen. Auch mit Neutralsalzen gehen sie komplexe Verbindungen ein (Lippich<sup>3)</sup>, vor allem Pfeiffer<sup>4)</sup>.

Die Verbindungen mit Alkalien sind in Wasser löslich, die mit Schwermetallen unlöslich, die mit Säuren zum Teil löslich, zum Teil unlöslich. Die Eiweißstoffe werden aus ihren wässrigen Lösungen durch Eintragen von Ammon- oder Zinksulfat ausgefällt („ausgesalzen“), manche auch durch Magnesiumsulfat oder Natriumchlorid oder andere Neutralsalze. Ebenso werden sie durch Alkohol abgeschieden. In beiden Fällen erfolgt die Abscheidung ohne Änderung der Eigenschaften. Auch durch Eintrocknen ihrer Lösungen bei niedriger Temperatur auf mit Paraffin überzogenen Glasplatten werden die Eiweißkörper unverändert als glasig spröde Schicht gewonnen, die in Wasser leicht wieder gelöst werden kann, wenn vorheriges Zerreiben der Lamellen vermieden wird (Herzfeld und Klinger<sup>4)</sup>).

Umwandlungs-  
und nächste  
Spaltungs-  
produkte.

Durch längere Alkoholeinwirkung erleiden die nativen Eiweißstoffe eine Änderung: sie gehen in den denaturierten Zustand über\*) und werden dabei mehr oder weniger rasch in den gewöhnlichen Lösungsmitteln unlöslich, koaguliert. Die gleiche Umwandlung tritt beim Erhitzen einer Eiweißlösung bei Gegenwart von Salz und bei schwach saurer Reaktion ein. Das Eiweiß scheidet sich als koaguliertes Eiweiß (§ 344) ab. Eine beginnende Hydrolyse läßt sich dabei nicht nachweisen<sup>5)</sup>, dagegen scheint damit in manchen Fällen eine Abspaltung von Ammoniak<sup>6)</sup> und eine Änderung in der Wasserstoffionenkonzentration der Lösung<sup>7)</sup> verbunden zu sein. Durch Säuren und Alkalien werden die Eiweißstoffe ebenfalls umgewandelt (denaturiert) und in Acidalbumine

\*) „Metaprotein“ nach der britischen Bezeichnung.

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. angew. Chem. 1923, Heft 19, S. 137.

<sup>2)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 59, S. 470. 1914.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 74, S. 360. 1911; Bd. 90, S. 236. 1914.

<sup>4)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 78, S. 349. 1917.

<sup>5)</sup> Hirsch - Pogany: Biochem. Zeitschr. Bd. 128, S. 396. 1922.

<sup>6)</sup> Sörensen u. Höyrup: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 103, S. 247. 1918.

<sup>7)</sup> Quagliariello: Biochem. Zeitschr. Bd. 44, S. 157. 1912.

(§ 392) und Alkalialbuminate (§ 393) übergeführt. Durch eine Reihe spaltender Agenzien entstehen aus ihnen Albumosen, Peptone usw. (§ 395ff.). Sie bilden Oxydations- und Substitutionsprodukte (§ 414ff.).

**324. Zersetzungen der Eiweißstoffe.** Von den Produkten, welche beim Kochen von Eiweißstoffen mit Säuren, z. B. mit konzentrierter Salzsäure, entstehen, sind bis jetzt isoliert: Ammoniak, Glykokoll, Alanin, Aminobuttersäure, Valin, Leucin, Isoleucin, Norleucin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Cystin, Serin, Oxyglutaminsäure, Arginin, Lysin, Histidin, Prolin, Oxyprolin, Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan, Glucosamin, ferner als sekundäre Produkte Kohlensäure, Schwefelwasserstoff, Äthylsulfid (?), Furfurol, Huminsubstanzen. Auf den verschiedenen relativen Mengen, in denen diese Elementargruppen an dem Aufbau der einzelnen Eiweißstoffe beteiligt sind, beruht jedenfalls zum Teil wenigstens ihre Verschiedenheit.

Über die Methoden zur Isolierung dieser Spaltungsprodukte s. § 475ff.

Beim Kochen mit Alkalien oder Erhitzen mit gesättigtem Barytwasser auf 150° erfolgt die Spaltung in ähnlicher Weise, wenn auch unter Bildung mancher sekundärer Produkte.

Wirkt verdünntes Alkali bei mäßiger Temperatur ein, so werden die Eiweißstoffe „razemisiert“ (Kosset<sup>1)</sup> und Dakin<sup>2)</sup>, d. h. nach der Spaltung wird ein Teil der Bausteine in beiden optischen Formen aufgefunden.

Unter den Produkten der bakteriellen Zersetzung sind nachgewiesen: Ammoniak, Kohlensäure, Schwefelwasserstoff, Methylmercaptan, Essigsäure, Buttersäure, Isobuttersäure, Isovaleriansäure, d-Valeriansäure, d-Caprionsäure, Bernsteinsäure,  $\beta$ -Aminopropionsäure,  $\gamma$ -Aminobuttersäure,  $\delta$ -Amino-n-valeriansäure, Leucin, Tyrosin, Oxyphenyläthylamin, Hydro-p-cumarsäure, p-Oxyphenylessigsäure, Kresol, Phenol, Phenyläthylamin, Phenylpropionsäure, Phenylessigsäure, Tryptophan, Indoläthylamin, Indolpropionsäure, Indolessigsäure, Skatol, Indol, Imidazoläthylamin.

Durch das Trypsin erfolgt die Spaltung in nicht so weitgehender Weise wie durch Kochen mit Säure.

Beim trocknen Erhitzen unter Ausschluß von Luft verflüssigt sich das Eiweiß unter Zersetzung und Aufspaltung; es entstehen unter anderem auch Albumosen und Peptone (Heiduschka<sup>3)</sup>. Bei der Destillation im Vakuum gehen Essig-, Propion- und Buttersäure, Bernsteinsäure, Acetamid und Propionsäureamid, Dihydroanilin (?), Indolabkömmlinge über. Lävoglucosan wurde nicht gefunden (Pictet und Cramer<sup>4)</sup>.

Beim Schmelzen mit Ätzkali hat man Ammoniak, Kohlensäure, Wasserstoff, Schwefelwasserstoff, Methylmercaptan, Leucin, Tyrosin, p-Oxybenzoesäure, Skatol, Indol, Phenol, flüchtige Fettsäuren, Oxalsäure erhalten. Beim Erhitzen mit Natronkalk destillieren Ammoniak, Pyrrol und ähnliche Stoffe über.

Bei der Oxydation mit Permanganat entstehen flüchtige Fettsäuren, Oxalsäure, Oxamid, Bernsteinsäure, Benzoesäure, Guanidin, bei der Oxydation mit Wasserstoffsperoxyd und Eisensalz entsteht Aceton. Destillation mit Kaliumchromat oder Braunstein und Schwefelsäure bildet aus den

<sup>1)</sup> Kosset u. Weiß: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 59, S. 492. 1909; Bd. 60, S. 311. 1909; Bd. 68, S. 165. 1910.

<sup>2)</sup> Dakin u. Dudley: Journ. of biol. Chem. Bd. 15, S. 263, 271. 1913. — Dakin u. Dale: Biochem. Journ. Bd. 13, S. 248. 1919. — Dudley u. Woodman: Biochem. Journ. Bd. 9, S. 97. 1915. — Kober: Journ. of biol. Chem. Bd. 22, S. 438. 1915.

<sup>3)</sup> Heiduschka u. Komm: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 121, S. 221. 1922; Bd. 124, S. 37. 1923; Bd. 126, S. 261. 1923.

<sup>4)</sup> Helvetica chim. acta Bd. 2, S. 188. 1919.

Eiweißstoffen verschiedene flüchtige Fettsäuren, Blausäure, Aldehyde, Nitrile, Bittermandelöl, Kohlensäure. Unterchlorigsaures Salz zersetzt sie unter Entwicklung von Stickstoff, Kohlensäure und reichlicher Oxalsäurebildung. Königswasser bildet Oxalsäure, Fumarsäure, Chlorazol. Salpetersäure<sup>1)</sup> bildet Benzoesäure, Phenyllessigsäure, m- und p-Nitrobenzoesäure (aus Phenylalanin, nicht aus Tyrosin und Tryptophan), Pikrinsäure, Imidazolglyoxylsäure, Nitroimidazolcarbonsäure, Oxalsäure, Methylsulfosäure, Terephtalsäure, Bernsteinsäure,  $\alpha$ -Oxyisobuttersäure, Azelainsäure.

**Nachweis.** 325. **Reaktionen der Eiweißstoffe.** Man teilt sie ein in Fällungs- und Farbenreaktionen. Da keine einzige an und für sich für Eiweißstoffe charakteristisch ist, so ist es für die sichere Erkennung unerlässlich, mehrere dieser Reaktionen anzustellen.

**Fällungsreaktionen.** A. **Fällungsreaktionen:** 1. Beim Sättigen einer Eiweißlösung mit Ammonsulfat fällt alles Eiweiß aus. Der Niederschlag ist unverändertes Eiweiß.

2. Beim Erhitzen einer Eiweißlösung, die durch Zusatz von verdünnter Essigsäure schwach sauer oder von Salpetersäure stark sauer gemacht ist, zum Kochen, entsteht ein Niederschlag von koaguliertem Eiweiß. Ist die Eiweißlösung salzfrei oder salzarm, so ist zunächst Salz, z. B. das gleiche Volumen gesättigter Natriumsulfatlösung, hinzuzufügen.

3. Durch Salpetersäure werden Eiweißlösungen schon in der Kälte gefällt. Bringt man unter eine Eiweißlösung in einem Reagensglas konzentrierte Salpetersäure, so entsteht an der Berührungsstelle eine weiße Ausscheidung (Hellersche Probe).

4. Fügt man zu einer Eiweißlösung etwas Salzsäure und dann tropfenweise vorsichtig Natriummetaphosphat, so entsteht ein im Überschuß der Säure und des Metaphosphats löslicher Niederschlag.

5. Salze der Schwermetalle (Kupfersulfat, Eisenchlorid, Sublimat, neutrales und basisches Bleiacetat u. a.) rufen Niederschläge hervor, die zum Teil im Überschuß des Fällungsmittels löslich sind.

6. Säuert man Eiweißlösung mit Essigsäure oder Salzsäure an und fügt dann einige Tropfen Ferrocyankalium hinzu, so entsteht ein weißer, flockiger Niederschlag. Ist die Flüssigkeit sehr reich an Kochsalz oder anderen Salzen, so entsteht der Niederschlag erst nach Verdünnen mit Wasser. Spuren von Eiweiß geben diesen Niederschlag erst nach einigen Stunden gut erkennbar.

7. Wie Ferrocyankalium und Essigsäure wirken auch andere sog. Alkaloidreagenzien fällend, z. B. Phosphorwolframsäure + Salz- oder Schwefelsäure, Kaliumquecksilber- oder Kaliumwismutjodid + Salzsäure, Gerbsäure + Essigsäure, Pikrinsäure + Citronensäure, Trichloressigsäure, Sulfosalicylsäure.

Manchmal ist es zweckmäßig, in der sauren Eiweißlösung noch ein Salz aufzulösen, um das Protein abzuschneiden. Die einzelnen An- und Kationen wirken dabei spezifisch, was beim Arbeiten nach den Angaben weiter unten zu berücksichtigen ist.

Nach den Bestimmungen von Hofmeister<sup>2)</sup> geben die Eiweißstoffe des Blutserums mit Gerbsäure, Phosphorwolframsäure, Kaliumquecksilber- oder Kaliumwismutjodid noch in 0,001proz. Lösung erkennbare Fällung oder Trübung, mit Essigsäure und Ferrocyankalium höchstens noch in 0,002proz. Lösung. Die Anwendung dieses letzteren Reagens bietet aber gegenüber den anderen den Vorteil, daß der in verdünnten Lösungen erhaltene und auf dem Filter gesammelte Niederschlag noch mit Hilfe der Farbenreaktionen (s. weiter unten) geprüft werden kann, was bei den durch die anderen Reagenzien erhaltenen Fällungen nicht ohne Gefahr von Täuschungen möglich ist.

<sup>1)</sup> C. Th. Mörner: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 93, S. 175. 1914; Bd. 95, S. 263. 1915; Bd. 98, S. 93. 1916; Bd. 101, S. 15. 1918; Bd. 103, S. 80. 1918. — Knoop: desgl. Bd. 101, S. 210. 1918. — Lissizin: desgl. Bd. 62, S. 226. 1909.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 2, S. 288. 1878/79.

B. **Farbenreaktionen.** Mit Hilfe dieser Reaktionen können außer Flüssigkeiten auch feste Massen sowie die nach 1, 2, 3, 4, 6 erhaltenen Niederschläge auf ihre Eiweißnatur geprüft werden. Farbenreaktionen.

8. **Biuretprobe.** Mit überschüssiger Natronlauge\*) und sehr wenig verdünnter Kupfersulfatlösung entsteht violette Färbung. Tritt sie nicht alsbald ein oder verschwindet sie bald, so ist noch mehr Kupfersulfat zuzusetzen, ein Überschuß aber sorgfältig zu vermeiden, da bei zuviel Kupferzusatz Blaufärbung eintritt, welche nicht charakteristisch ist.

9. **Millonsche Probe.** Mit Millonschem Reagens (Anh.) erhitzt tritt purpurrote Färbung ein.

Diese Reaktion beruht auf der Anwesenheit von Tyrosin im Eiweißmolekül.

10. **Xanthoproteinprobe.** Mit einigen Tropfen starker Salpetersäure versetzt und erhitzt tritt Gelbfärbung und auf nachherigen Zusatz von Ammoniak oder Natronlauge im Überschuß orangerote Färbung ein.

Diese Reaktion beruht auf der Anwesenheit von aromatischen Atomkomplexen, welche in gelbgefärbte Nitroderivate übergeführt werden, sowie von Tryptophan, welches ebenfalls die Xanthoproteinprobe gibt (Rohde<sup>1</sup>), Salkowski<sup>2</sup>). Die Farbtintensitäten verhalten sich wie 1:3:9:45 für Tyrosin sauer, Tryptophan sauer, Tryptophan ammoniakalisch, Tyrosin ammoniakalisch (C. Th. Mörner<sup>3</sup>).

11a) **Adamkiewiczsche Probe.** Mit Glyoxylsäurelösung\*\*) (Anh.) und konzentrierter Schwefelsäure entsteht Blauviolettffärbung. Bei passender Verdünnung zeigt die spektroskopische Prüfung einen Absorptionsstreifen zwischen *b* und *F*. Die Lösung zeigt auch schwache Fluorescenz.

Die Schwefelsäure muß rein, frei von oxydierenden Verunreinigungen sein, die Formaldehyd bilden. Gegenwart von Nitrat, Chlorat, Nitrit und viel Chlorid stört. Granuliertes Zink setzt Dreidahl<sup>4</sup>) zu. Beim Erhitzen von Eiweiß, welches zuvor mehrmals mit Alkohol ausgekocht und mit Äther behandelt worden ist, mit starker Salzsäure, tritt ebenfalls eine schöne tiefe Blauviolettffärbung ein (Liebermanns Reaktion). Diese Reaktion ist nach Cole<sup>5</sup>) identisch mit der Probe von Adamkiewicz, denn sie beruht auf dem Gehalt des Äthers an Glyoxylsäure.

b) **Edlbachersche Probe<sup>6</sup>).** Man schüttelt eine Eiweißlösung mit Natronlauge und Dimethylsulfat und unterschichtet nach der Zersetzung des letzteren das Reaktionsgemisch mit konzentrierter Schwefelsäure: blaurote Farbzone an der Berührungsstelle. Die Reaktion ist empfindlicher als die Bromreaktion auf freies Tryptophan (S. 316).

c) Beim Erhitzen mit einer Spur Rohrzucker und konzentrierter Salzsäure entsteht purpurrote Färbung (Furfurolbildung aus Rohrzucker). Streifen im blauwärtsgelagerten Teile des Grünen etwa von  $\lambda$  490—560 (Cole).

Eine leichte Reaktion wird bisweilen beobachtet, wenn gewisse Eiweißkörper mit starker Salzsäure oder 50 proz. Schwefelsäure allein erhitzt werden, indem das für den Eintritt der Reaktion nötige Furfurol aus Eiweiß selbst gebildet wird.

\*) In kalter Natronlauge unlösliche Stoffe kocht man mit Natronlauge und prüft nach dem Erkalten.

\*\*) Statt des ursprünglich von Adamkiewicz<sup>7</sup>) benutzten Eisessigs, dessen Wirksamkeit, wie Hopkins und Cole<sup>8</sup>) fanden, nur auf seinem Gehalt an Glyoxylsäure beruht, nach Voisenet<sup>9</sup>), wahrscheinlich auf Formaldehyd.

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 44, S. 170. 1905. <sup>2</sup>) desgl. Bd. 12, S. 218. 1888.

<sup>3</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 107, S. 203. 1919.

<sup>4</sup>) Biochem. Journ. Bd. 9, S. 36. 1915. <sup>5</sup>) Journ. of physiol. Bd. 30, S. 311. 1903/04.

<sup>6</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 105, S. 240. 1919.

<sup>7</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 8, S. 161. 1875. Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 9, S. 156. 1874. Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 3, S. 423. 1875.

<sup>8</sup>) Proc. of the roy. soc. of London Bd. 68, S. 21. 1901.

<sup>9</sup>) Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 166, S. 789. 1919; Bull. Soc. Chim. de France [4] Bd. 23, S. 361; ref. Chem. Zentralbl. 1919; II, S. 649.

d) Reichlsche Probe<sup>1)</sup>. Beim Erhitzen mit einigen Tropfen einer alkoholischen Lösung von Benzaldehyd, ziemlich viel 50proz. Schwefelsäure und 1 Tropfen Eisenchloridlösung entsteht dunkelblaue Färbung.

e) Ehrlich - Neubauersche Probe. Fügt man einige Tropfen einer 5proz. schwach schwefelsauren Lösung von p-Dimethylaminobenzaldehyd hinzu und darauf vorsichtig und unter Umschütteln konzentrierte Schwefelsäure, so tritt rotviolette Färbung auf, welche nach kurzer Zeit einen dunkelvioletten Ton annimmt (Neubauer<sup>2)</sup>, Rohde<sup>3)</sup>.

Die unter 11a—e angeführten Reaktionen beruhen auf der Anwesenheit des Tryptophan im Eiweißmolekül.

12. Diazoreaktion. Beim Versetzen einer sodaalkalischen Eiweißlösung mit einigen Kubikzentimetern einer unmittelbar vorher bereiteten sodaalkalischen Lösung von einer Spur Diazobenzolsulfosäure\*) tritt sofort oder nach wenigen Minuten eine mehr oder minder dunkel kirschrote Färbung ein (Pauly<sup>4)</sup>).

Diese Reaktion beruht auf der Anwesenheit von Histidin und von Tyrosin im Eiweißmolekül.

13. Schwefelbleiprobe. Beim Kochen mit wenig Bleiacetat und überschüssiger Natronlauge entsteht Gelb-, Braun- oder Schwarzfärbung oder ein schwarzer Niederschlag von Schwefelblei.

Diese Reaktion beruht auf der Anwesenheit von Cystin im Eiweißmolekül.

14. Nitroprussidreaktion<sup>5)</sup>. Zu 1—2 ccm Eiweißlösung oder einer Aufschwemmung von koaguliertem Eiweiß wird gepulvertes Ammonsulfat gegeben, einige Tropfen einer frischbereiteten etwa 5proz. Lösung von Nitroprussidnatrium hinzugefügt und darauf erst mit einigen Tropfen Ammoniak alkalisch gemacht; es tritt rotviolette Färbung auf.

Die Reaktion beruht auf der Anwesenheit einer SH-Gruppe im Eiweißmolekül. Manche Eiweißkörper geben sie erst nach der Denaturierung oder Hydrolyse. Ihre Stärke steht im umgekehrten Verhältnis zur Menge isolierbaren Cystins.

15. Molischsche Probe. Mit einigen Tropfen alkoholischer Lösung von  $\alpha$ -Naphthol und etwas konzentrierter Schwefelsäure entsteht rote bis violette Färbung.

Diese Reaktion wird auf die Anwesenheit eines Kohlenhydratkomplexes im Eiweißmolekül bezogen. Indessen ist bei der außerordentlichen Empfindlichkeit der Reaktion für Kohlenhydrate (noch 0,1 mg Glucose oder Arabinose geben eine starke Reaktion) schwer eine Täuschung durch beigemengtes Kohlenhydrat auszuschließen.

Abscheidung aus  
Flüssigkeiten.

326. Abscheidung der Eiweißstoffe aus Flüssigkeiten. 1. Zur Abscheidung von nativen Eiweißstoffen aus Flüssigkeiten kocht man diese und fügt, falls nicht schon saure Reaktion vorhanden ist, solange verdünnte Essigsäure hinzu, bis eine gute flockige Gerinnung erreicht ist. Wegen der Löslichkeit der

\*) Herstellung: 2 g feingepulverte Sulfanilsäure werden mit 3 ccm Wasser und 2 ccm konzentrierter Salzsäure zu einem Brei geschüttelt und in kleinen Portionen innerhalb einer Minute mit einer Lösung von 1 g frischem Kaliumnitrit in 1—2 ccm Wasser versetzt, wobei nach jedem Zusatz mit kaltem Wasser gekühlt wird. Die Sulfanilsäure geht größtenteils rasch in Lösung und an ihre Stelle tritt ein dichter, weißer, krystallinischer Niederschlag von Diazobenzolsulfosäure, der nach einigen Minuten abgesaugt und mit wenig Wasser ausgewaschen wird. Anwesenheit von unveränderter Sulfanilsäure schadet nicht (Pauly).

<sup>1)</sup> Monatshefte f. Chem. Bd. 10, S. 317. 1889; Bd. 11, S. 155. 1890.

<sup>2)</sup> Sitzungsber. d. Ges. f. Morph. u. Phys. in München 1903, H. 2, S. 32.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 44, S. 161. 1905.

<sup>4)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 42, S. 518. 1904; Bd. 94, S. 284. 1915.

<sup>5)</sup> Arnold: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 70, S. 300. 1910/11. — Harris: Proc. of the roy. soc. of London (B) Bd. 94, S. 430. 1923.



Albuminstoffe in überschüssiger Essigsäure ist es nötig, mit dem Zusatz der Säure sehr vorsichtig zu verfahren. Eine völlige Abscheidung, welche sich durch Ausbleiben jeglicher Trübung auf Zusatz von einem Tropfen Ferrocyankalium\*) zum Filtrat zu erkennen gibt, wird auf diese Weise nur selten erreicht. Um auch die in Lösung gebliebenen Reste (sowie etwa vorhandenes Acidalbumin und Alkalialbuminat) zu entfernen, empfiehlt es sich, nach Hofmeister<sup>1)</sup> das Filtrat mit frischgefälltem Bleihydroxyd unter Zusatz von etwas Bleiacetat, besonders bei Gegenwart größerer Mengen von phosphor- oder schwefelsauren Salzen, einige Minuten zu kochen und wieder zu filtrieren. An Stelle des Bleihydroxyds kann auch Zinkoxyd oder Zink- bzw. Bleicarbonat benutzt werden.

Die Entfernung von nativen Eiweißstoffen (sowie von Acidalbumin und Alkalialbuminat) läßt sich auch nach 2 und 3 erreichen:

2. Die Flüssigkeit, welche außer nur wenig Essigsäure keine andere freie Säure enthalten darf, wird mit einer Lösung von essigsauerm Eisenoxyd in genügender Menge versetzt, zum Kochen erhitzt und solange im Sieden erhalten, bis das Eisenoxyd als basisches Salz ganz ausgefällt ist. Die filtrierte Lösung soll eisenfrei sein. Es ist zuweilen zweckmäßiger, eine Mischung von Eisenchlorid und überschüssigem Natriumacetat anzuwenden (Hoppe - Seyler) und mit Natriumphosphat Eisenreste zu entfernen.

3. Ammon- oder Zinksulfat in Substanz wird bis zur vollständigen Sättigung bei Siedetemperatur und neutraler oder saurer Reaktion eingetragen.

Fürchtet man den Einfluß hoher Temperatur auf andere in der Lösung befindliche Substanzen, so kann die Abscheidung von Eiweißstoffen (sowie von Acidalbumin und Alkalialbuminat) auch bewirkt werden:

4. Durch vorsichtigen Zusatz von Bleiessig, solange ein Niederschlag entsteht, und nachträgliches Zufügen von wenigen Tropfen Ammoniak; bleibt die Bleifällung kolloidal in Lösung, so setzt man Natriumphosphat zu.

5. Durch Gerbsäure, Kaliumquecksilberjodid oder Phosphorwolframsäure. Die Lösungen müssen hierbei freie Säure enthalten, und zwar ist bei Anwendung der Gerbsäure schwach essigsäure, des Kaliumquecksilberjodids mäßig salzsaure und der Phosphorwolframsäure stark salz- oder schwefelsäure Lösung zu empfehlen.

6. Durch Zusatz von Alkohol im Überschuß zu der neutralisierten und mit etwas Salz versetzten Flüssigkeit.

7. Durch Zusatz von 4 Volumenteilen reinen Acetons ohne Erwärmen zur mit Essigsäure schwach angesäuerten\*\*) Eiweißlösung. Nach 1stündigem Stehen wird auf der Nutsche abgesaugt, das acetonefeuchte Koagulum von neuem mit 80volumenproz. Aceton behandelt. Aus den Filtraten wird das Aceton beim Destillieren zurückgewonnen (Blum und Grützner<sup>2)</sup>).

Albumosen und Peptone, welche übrigens in den meisten tierischen Flüssigkeiten nicht vorkommen, werden durch die unter 1. und 2. aufgeführten Verfahren nicht oder nur unvollständig, vollständiger durch die unter 4. und 5. aufgeführten ausgefällt.

8. Durch Mastix, Kaolin oder kolloidales Eisenhydroxyd. Über diese und weitere sehr brauchbare Methoden s. bei „Untersuchung der serösen Flüssigkeiten“, § 652.

Über die Abscheidung des Eiweißes aus Harn s. § 567.

\*) Durch Essigsäure und Ferrocyankalium werden allerdings auch manche Albumosen gefällt, doch scheinen diese in den tierischen Flüssigkeiten (mit Ausnahme der Verdauungsflüssigkeiten) für gewöhnlich nicht vorzukommen.

\*\*) Bei Blut nicht ansäuern.

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 2, S. 288. 1878; Bd. 4, S. 253. 1880.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 85, S. 464. 1913.

## Albumine.

Allgemeine Eigenschaften der Albumine.  
Unterscheidung von Globulinen.

327. Sie sind löslich in Wasser in allen Verhältnissen. Die wässerigen Lösungen werden nicht gefällt durch sehr verdünnte Säuren oder verdünnte Alkalicarbonatlösungen, auch nicht bei neutraler Reaktion durch Sättigung mit Kochsalz oder Magnesiumsulfat oder durch Halbsättigung mit Ammonsulfat, wohl aber durch Sättigung mit diesem Salze. Durch Erhitzen der wässerigen Lösung bei Gegenwart von neutralen Alkalisalzen oder Salzen der alkalischen Erden werden sie gefällt und zugleich in koagulierte Eiweißstoffe übergeführt. Durch Alkohol werden sie weniger leicht gefällt als die Globuline und bei Berührung mit Alkohol langsamer koaguliert als diese. Sie sind in Krystallen erhalten worden, und zwar sind die Krystalle der verschiedenen Albumine wenn nicht identisch, so doch isomorph (Wichmann<sup>1</sup>). Sie enthalten gar kein Glykokoll, eine mittlere Menge Hexonbasen und sind unter den nativen Proteinen die schwefelreichsten.

Vorkommen

328. **Serumalbumin** findet sich reichlich im Blutplasma und Serum, in der Lymphe im Chylus, in pathologischen Transsudaten und tritt bei Nierenkrankheiten von den Eiweißstoffen meist am reichlichsten in den Harn über.

Darstellung.

Um es aus Blutserum oder pathologischen Traussudaten in reinem Zustande zu gewinnen, sättigt man diese Flüssigkeiten bei 30° mit gepulvertem Magnesiumsulfat, wäscht den entstandenen Niederschlag (Serumglobulin) bei 30° mit gesättigter Magnesiumsulfatlösung aus und sättigt das Filtrat mit Ammoniumsulfat. Der abfiltrierte und ausgepreßte Niederschlag wird in Wasser gelöst, durch Sättigen mit Ammoniumsulfat bei 40° wieder zur Abscheidung gebracht und abermals in Wasser gelöst. Nach Entfernung der Salze durch sehr anhaltende Dialyse gegen destilliertes Wasser fällt man die Lösung durch im Überschuß zugesetzten starken Alkohol, filtriert den Niederschlag und wäscht ihn mit Alkohol und Äther (Hammarsten und Starke<sup>2</sup>). Statt dessen kann man auch das Filtrat der Magnesiumsulfatfällung mit 1% Essigsäure versetzen, den Niederschlag nach einigen Stunden abfiltrieren, abpressen, in wenig Wasser lösen, die neutralisierte Lösung (evtl. nach mehrmaliger Wiederholung des ganzen Prozesses) durch Dialyse von Salz befreien und mit Alkohol fällen (Johansson<sup>3</sup>).

Krystallisiert ist es zuerst von Gürber<sup>4</sup>) aus Pferdeblutserum erhalten. Gürber erhielt es auch aus Kaninchenblut, doch gelang dies anderen nicht. Auch in bezug auf Blut von Hund, Katze, Ochse, Schwein, Hammel, Gans waren die Bemühungen vergeblich, nur Gruzewska<sup>5</sup>) gibt an, es auch aus dem Blut von Meerschweinchen, Katzen, Ochsen und Nattern erhalten zu haben. Aus menschlicher Ascitesflüssigkeit, die 8 Jahre mit Ammonsulfat konserviert war, erhielt es Oswald<sup>6</sup>) noch in Globuliten.

Darstellung von krystallisiertem Serumalbumin.

Das Darstellungsverfahren ist von Pemsel<sup>7</sup>) verbessert worden: Pferdeblutserum (oder auch durch Kaliumoxalat ungerinnbar gemachtes Pferdeblutplasma) wird mit dem gleichen Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt, nach mehrstündigem Stehen vom Niederschlag abfiltriert und zum globulinfreien Filtrat  $\frac{1}{5}$ -Schwefelsäure bis zur beginnenden bleibenden Trübung zugefügt (auf 100 ccm in der Regel 10—12—14 ccm). Beim Stehen scheiden sich allmählich, manchmal erst sehr langsam, Krystalle ab; bei Zimmertemperatur

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 27, S. 575. 1899.

<sup>2</sup>) Malys Jahresber. d. Tierchem. 1881, S. 17.

<sup>3</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 9, S. 310. 1885.

<sup>4</sup>) Sitzungsber. d. phys.-med. Ges. zu Würzburg 1894, S. 143. — Michel: Verhandl. d. phys.-med. Ges. zu Würzburg N. F. Bd. 29, S. 117. 1895.

<sup>5</sup>) Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 128, S. 1535. 1899.

<sup>6</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 95, S. 102. 1915.

<sup>7</sup>) Bei Krieger: Diss. Straßburg 1899.

rascher und reichlicher als in der Kälte, noch günstiger ist eine Temperatur von 40° (Inagaki<sup>1</sup>). Stets aber krystallisiert nur ein Teil des Serumalbumins. Das Umkrystallisieren erfolgt aus wässriger Lösung durch Zusatz von Ammonsulfat und Säure. Beim ersten und zweiten Umkrystallisieren löst sich nicht alles in Wasser, später erfolgt stets völlige, wenn auch langsame Lösung (Cohn<sup>2</sup>). Die von anderen gemachten Angaben, daß schon nach 1—2 maligem Umkrystallisieren keine Krystallisation mehr erfolgt, sondern nur amorphe Abscheidung, konnte Cohn nicht bestätigen.

Nach Moll<sup>3</sup>) erfolgt die Krystallisation rascher und frei oder fast frei von amorphen Beimengungen, wenn das Serum vor der Fällung mit Ammonsulfat durch Zusatz von 25 ccm  $\frac{n}{10}$ -Salzsäure auf 100 ccm neutralisiert wird. Das globulinfreie Filtrat versetzt er auch bis zur beginnenden Trübung mit  $\frac{n}{5}$ -H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Um ein salzfreies Präparat zu erhalten, wird die wässrige Lösung der Krystalle in heißen Alkohol gegossen und das Koagulum mit Wasser gewaschen.

Die Zusammensetzung wurde gefunden für:

Zusammensetzung.

	C	H	N	S	
amorphes Serumalbumin aus Pleuratranssudat .	52,25	6,65	15,88	2,27%	} (Hammarsten u. Starke)
amorphes Serumalbumin aus Pferdeblutserum .	53,05	6,85	16,04	1,79%	
krystallisiertes Serumalbumin aus Pferdeblutserum . . . . .	53,08	7,1	15,93	1,9 %	(Michel).

K. Mörner<sup>4</sup>) fand, daß das Serumalbumin aus Pferdeblut Neigung hat, während seiner Darstellung eine feste Verbindung mit Schwefelsäure einzugehen. In den Krystallen liegt eine Verbindung von Albumin und Schwefelsäure vor (s. auch Inagaki). Nach ihrer Entfernung aus dem krystallisierten und koagulierten Präparate durch Auswaschen mit Ammoniak fand er 1,73% S. Der Prozentgehalt des bleischwärenden Schwefels beträgt 1,29% (Schulz<sup>5</sup>, Mörner). Harris<sup>6</sup>) fand 66% des Schwefels locker gebunden; er isolierte aus 100 g Serumalbumin 2,549 g Cystin und berechnet daraus unter Berücksichtigung der Verluste durch Zersetzung des Cystins bei der Hydrolyse einen Gehalt von 6,45% = 89% des aus dem Schwefelgehalt berechneten Gehaltes an Cystin.

Die Frage nach der Identität des krystallisierten und amorphen Serumalbumins und nach der Einheitlichkeit des amorphen ist noch zu beantworten. Zwingende Gründe, die Existenz mehrerer Serumalbumine anzunehmen, liegen zur Zeit nicht vor (s. darüber auch Oppenheimer<sup>7</sup>), Inagaki). Mellanby<sup>8</sup>) ist wieder für das Vorkommen von 2 Albuminen (ein krystallisiertes und ein amorphes) eingetreten.

Das Serumalbumin ist klar in Wasser löslich, gerinnt in 1 proz. möglichst salzfreier neutraler Lösung bei etwa 50°, durch Kochsalzzusatz wird die Koagulationstemperatur erheblich erhöht. In der Mischung mit Serumglobulin, wie es im Blutserum sich findet, tritt über 60° Trübung und bei 72—75° flockige Fällung ein. Durch Schütteln der wässrigen, etwas salzhaltigen Lösung mit Äther wird es nicht koaguliert, in ziemlich salzfreier Lösung ist es durch starken Alkohol ohne Veränderung fällbar, bei Anwesenheit von etwas Salz wird es durch Alkohol koaguliert (Unterschied von Ovalbumin).

Koagulation.

Für amorphes Serumalbumin aus Pferdeblut fand Starke  $[\alpha]_D = -60,05^\circ$ , für krystallisiertes derselben Herkunft Michel  $[\alpha]_D = -61-61,2^\circ$ .

Optische Eigenschaften.

Refraktometerinkrement für eine 1 proz. Lösung von Hammarstenschem Serumalbumin bei 17,5° 0,00183 nach Reiss<sup>9</sup>), 0,00177 nach Robertson<sup>10</sup>), ferner für krystallisiertes Albumin nach Reiss 0,00201.

Refraktometrisches Verhalten.

<sup>1</sup>) Verhandl. d. phys.-med. Ges. zu Würzburg N. F. Bd. 38, Nr. 1. 1905.  
<sup>2</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 43, S. 42. 1904/05.  
<sup>3</sup>) Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 4, S. 567. 1904.  
<sup>4</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 34, S. 243. 1902. <sup>5</sup>) desgl. Bd. 25, S. 16. 1898.  
<sup>6</sup>) Proc. of the roy. soc. of London (B) Bd. 94, S. 449. 1923.  
<sup>7</sup>) Verhandl. d. physiol. Ges. zu Berlin Bd. 28, S. 10. 1903.  
<sup>8</sup>) Journ. of physiol. Bd. 36, S. 288. 1907/08.  
<sup>9</sup>) Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 51, S. 19. 1904; Zeitschr. f. Elektrochem. Bd. 14, S. 613. 1908.  
<sup>10</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 11, S. 179. 1912.

Verhalten zu  
Säuren.

Durch Kohlensäure, Essigsäure und andere in Wasser lösliche Fettsäuren wird das Serumalbumin nicht aus seinen wässerigen Lösungen gefällt. Wenn die Temperatur nicht hoch ist, auch die Säure in großer Verdünnung angewendet wird und ihre Einwirkung nicht zu lange dauert, kann durch vorsichtiges Neutralisieren mit Calciumcarbonat, Soda oder verdünntem Ammoniak eine klare neutrale Lösung von Serumalbumin wieder erhalten werden. Je höher dagegen die Temperatur, je stärker die Konzentration der zugesetzten Säure und je größer ihre relative Quantität ist, desto schneller wird das Serumalbumin in Acidalbumin umgewandelt. Gegen Mineralsäuren ist es viel resistenter als das Eialbumin. Versetzt man eine Lösung mit einer geringen Menge einer verdünnten Mineralsäure, so wird es weder gefällt noch verändert. Erst bei einem Salzsäuregehalt von 14—15% sind nach 1 Stunde bei Zimmertemperatur Acidalbumin und Albumosen in reichlicher Menge nachweisbar. Ein Niederschlag tritt bei dieser Konzentration nur allmählich und in geringer Menge ein, erst nach vielen Stunden oder bei Erhöhung der Temperatur auf 40° wird er reichlich (Goldschmidt<sup>1</sup>). Der mit starker Salzsäure entstehende Niederschlag, der in Wasser gelöst die spezifische Drehung  $[\alpha]_D = -78,7^\circ$  gezeigt hat und aus salzsaurem Acidalbumin besteht, löst sich im Überschuß der Salzsäure. Salze schwerer Metalle bilden meist schnell Acidalbumin. Auch der durch Essigsäure und Ferrocyanium erzeugte Niederschlag wird nach kurzem Stehen in Acidalbumin umgewandelt. Durch Hitze koaguliertes Serumalbumin löst sich leicht in Salpetersäure (Unterschied von Ovalbumin).

Verhalten zu  
Alkalien.

Von verdünntem Ammoniak wird Serumalbumin nur allmählich verändert. Kali- und Natronlauge verwandeln es in wässriger Lösung unter Steigerung der Zirkumpolarisation in Albuminat und Albumosen; selbst geringe Mengen Kali (0,2%) haben diese Wirkung. Konzentrierte Kali- oder Natronlauge zu konzentrierter Serumalbuminlösung gesetzt bringt die Lösung zur Erstarrung als gallertiges Alkalialbuminat.

Nach Moll<sup>2</sup>) wird Serumalbumin beim Erhitzen seiner wässerigen, Hydroxyde, Carbonate oder Phosphate der Alkalien in bestimmter geringer Menge enthaltenden Lösung auf etwa 60° zum Teil in Substanzen übergeführt, welche in bezug auf ihre physikalischen Reaktionen (Wasserunlöslichkeit, Salzlöslichkeit und Fällungsgrenzen) sowie auf ihren Schwefelgehalt mit dem Serumglobulin (Eu- und Pseudoglobulin) (S. 463) übereinstimmen. Bei fortgesetzter Einwirkung entsteht Alkalialbuminat.

Hydrolyse.

Über die Produkte der hydrolytischen Spaltung s. die Tabelle § 500. Stickstoffverteilung (Albumin von Rinderserum) nach van Slyke:  $\text{NH}_3\text{-N}$  5,8, Melanin-N 1,1, Cystin + Diaminosäuren-N 36,9%, davon Arginin-N 10,4, Histidin-N 6,7, Lysin-N 16,3, Monamino-säuren-N 56,5%, wovon 2,3% Nichtamino-N. Ähnliche Zahlen gelten für Albumin aus Pferdeserum (Hartley<sup>3</sup>). Auch war kein Unterschied festzustellen im Gehalt des Albumins aus Gänse- und Pferdeblut an Tyrosin und Glutaminsäure, Glykokoll fehlte beiden<sup>4</sup>). Im Serumalbumin des Rindes und Pferdes ist etwa die Hälfte vom Lysinstickstoff formoltitrierbar (Hartley<sup>5</sup>). Langstein<sup>6</sup>) erhielt aus Serumalbumin nach vorausgegangener tiefgreifender Alkalibehandlung durch Kochen mit Säure Glucosamin. Die Menge war aber so klein (in einem Versuche wurde nichts erhalten), daß die Möglichkeit, das gefundene Glucosamin entstamme einer

<sup>1</sup>) Diss. Straßburg 1898.

<sup>2</sup>) Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 4, S. 563. 1904 u. Bd. 7, S. 311. 1906.

<sup>3</sup>) Biochem. Journ. Bd. 8, S. 541. 1914.

<sup>4</sup>) Abderhalden u. Slavu: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 59, S. 247. 1909.

<sup>5</sup>) Biochem. Journ. Bd. 9, S. 269. 1915.

<sup>6</sup>) Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 1, S. 259. 1902.

Verunreinigung, nicht von der Hand zu weisen ist. (Abderhalden, Bergell und Dörpinghaus<sup>1</sup>).

**329. Ovalbumin (Eieralbumin).** Die ersten Untersuchungen über Abscheidung, Zusammensetzung und Eigenschaften des Eieralbumins stammen von Hammarsten und Starke (a. a. O.). Doch war das von ihnen untersuchte Präparat vermutlich ein Gemenge. Es ist von Osborne, Jones und Leavenworth<sup>2</sup>) und besonders eingehend von Sörensen und Höyrup<sup>3</sup>) untersucht worden; sie bedienten sich zur Darstellung des krystallisierten Ovalbumins des von Hopkins und Pinkus<sup>4</sup>) modifizierten Verfahrens von Hofmeister<sup>5</sup>) in folgender Weise: Das Weiße von 60 frischen Eiern\*) (etwa 21) wird mit dem gleichen Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung vermischt, gut zu Schaum geschlagen und nach einigen Stunden oder am nächsten Tage der Niederschlag abfiltriert. Zu dem klaren rotgelben, nach Ammoniak riechenden Filtrat (etwa 3300 ccm) fügt man aus der Bürette gesättigte Ammonsulfatlösung bis zur bleibenden Trübung (etwa 140 ccm) und dann soviel  $\frac{1}{5}$  Schwefelsäure, daß  $p_H = 4,58$  (etwa 500—600 ccm, an einer Probe vorher zu bestimmen). Bei Zusatz von Schwefelsäure löst sich zuerst die Trübung, dann geht die rotgelbe Farbe in Gelb über und zuletzt scheidet sich ein amorpher voluminöser Niederschlag aus, der sich anfangs durch Rühren oder Schütteln löst, später aber immer schwieriger in Lösung zu bringen ist. Aus der stark opaleszierenden Lösung beginnt die Krystallisation gewöhnlich schon nach einer Stunde; sie wird durch Impfen und häufiges Rühren gefördert. Die Temperatur der Lösung soll nicht unter  $12^\circ$  und nicht über  $29^\circ$  betragen. Nach 2—5 Tagen ist die Krystallisation beendet. Dann wird ohne Saugen durch gewöhnliche Filter (Durchmesser 24 cm) filtriert und dabei der Niederschlag auf etwa 5 Filter verteilt. Um die Ammonsulfatkonzentration der Waschflüssigkeit kennenzulernen, füllt man je 10 ccm gesättigte Ammonsulfatlösung mit steigenden Mengen Wasser in Reagensgläser und gibt zu jedem einige Kubikzentimeter des Filtrats. Mit der Mischung, die eben das Filtrat noch vor Trübung bewahrt, werden dann die Filter einmal aufgefüllt und so die Mutterlauge verdrängt. Am nächsten Tage wird der Niederschlag vom Filter genommen, Reste vom Papier mit ausgekochtem Wasser abgelöst und die vereinigten Lösungen in Standzylindern erneut mit Ammonsulfat versetzt, bis ein bleibender Niederschlag (nicht nur Trübung) entsteht. Die Fällung wird rasch krystallinisch, was leises Schütteln des Gefäßes begünstigt. Bei der mikroskopischen Prüfung sieht man nur Krystalle, und zwar in Garben zusammenliegende feine Nadeln, die abfiltriert eine schneeweiße Masse darstellen. Für 1 g Trockensubstanz enthalten sie 0,22 g Wasser. Zur vollkommenen Entfernung von Ovomuroid, Conalbumin und Asche genügt 3 maliges Umkrystallisieren, sofern das verwendete Ammonsulfat rein war (vgl. dazu auch Schulz und Zsigmondy<sup>6</sup>).

Darstellung von  
krystallisiertem  
Ovalbumin.

\*) Auch aus Truthenneneiern ist krystallisiertes Ovalbumin erhalten (Worms<sup>7</sup>); über Albumin aus Tauben- und Enteneiern s. Panormow<sup>8</sup>). Über Unterschiede im krystallisierten Albumin aus Hühner- und Enteneiern bei der Racemisierung, die besonders die Leucin-, Asparaginsäure- und Histidinfraktion betreffen s. Dakin und Dale<sup>9</sup>).

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 41, S. 530. 1904.

<sup>2</sup>) Americ. Journ. of physiol. Bd. 24, S. 252. 1909.

<sup>3</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 103, S. 16. 1918.

<sup>4</sup>) Journ. of physiol. Bd. 25, S. 306. 1900.

<sup>5</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 14, S. 165. 1890; Bd. 16, S. 187. 1892.

<sup>6</sup>) Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 3, S. 147. 1903.

<sup>7</sup>) Ref. Chem. Zentralbl. 1906, II, S. 1508.

<sup>8</sup>) Ref. Chem. Zentralbl. 1900, II, S. 770 u. 1906, I, S. 372.

<sup>9</sup>) Biochem. Journ. Bd. 13, S. 248. 1919.

Die wieder abgeschiedenen Krystalle lösen sich stets in Wasser leicht (K. A. H. Mörner<sup>1</sup>). Um das Ovalbumin salzfrei zu erhalten, gießt man die wässrige Krystalllösung in Alkohol und wäscht das entstandene Koagulum mit Wasser. Sörensen stellte ganz besonders reines Ovalbumin auch in größerer Menge dar, indem er die Lösung unter vermindertem Drucke durch Kollodiumhäutchen gegen destilliertes Wasser, zum Schluß unter Zusatz von verdünntem Ammoniak dialysierte<sup>2</sup>).

Langstein<sup>3</sup>) empfiehlt ebenfalls Schwefelsäure (und nicht Essigsäure) als Zusatz bei der Krystallisation. Das Weiße jedes Eies muß auf seine Reaktion geprüft werden, nur wenn es Lackmus bläut, darf es benutzt werden. Mit dem Alter der Eier nimmt die Ausbeute an krystallisiertem Albumin ab. Die Sulfate können nicht durch beliebige andere Salze ersetzt werden. Denn bei  $p_H = 4,63$  enthalten die Krystalle auf 125 mg-Äquiv. Proteinstickstoff 1 Äquiv. Schwefelsäure. Erst ganz neuerdings ist Sörensen die Krystallisation auch mit Phosphat gelungen. Haas<sup>4</sup>) empfiehlt die Säure ebenfalls tropfenweise zuzusetzen, bis Lackmus deutlich gerötet wird, und nach jedem Zusatz energisch zu schütteln. Bei  $p_H = 7$  oder mehr wird kein oder nur noch amorpher Niederschlag erhalten, Krystalle dagegen, wenn alizarinsulfosaures Natrium rot, Rosolsäure gelb, Methylorange gelb, Cochenille lila, Kongorot scharlachrot, Alizarin braungelb, Lackmuslösung violettblau und Lackmuspapier blaurot gefärbt wird.

Das Molekulargewicht vom krystallisierten Eieralbumin, aus dem osmotischen Druck berechnet, beträgt etwa 34000.

Zusammensetzung.

Die Zusammensetzung wurde gefunden:

C	H	N	S	
53,28	7,26	15,00	1,09%	(Hofmeister)
52,70	7,12	15,43	1,57%	(Hopkins)
52,75	7,10	15,51	1,62%	(Osborne und Campbell <sup>5</sup> )
52,46	7,19	15,29	1,34%	(Langstein)
		15,63		(Sörensen und Höyrup <sup>6</sup> ).

Osborne und Campbell fanden im Gegensatz zu den anderen noch 0,12% P, ebenso Willcock<sup>7</sup>) 0,13% P. Auch Kaas<sup>8</sup>) fand in verschiedenen Präparaten Phosphor, dessen Menge aber mit jeder Umkrystallisation abnahm, nach Sörensen und Höyrup aber auch noch in der sechsten Krystallisation vorhanden ist und von ihnen als ein integrierender Bestandteil des Proteinmoleküls angesehen wird, also wohl nicht auf Beimengungen zu beziehen ist. Der Prozentgehalt des bleischwänzenden Schwefels beträgt 0,43—0,49 (Schulz<sup>9</sup>), Osborne<sup>10</sup>), Mörner). Der Schwefel ist nur zum Teil als Cystin, zum Teil in anderer Form vorhanden (Mörner). Bei einer  $C_H = 13 \cdot 10^{-6}$  wird weder Schwefelsäure noch Ammoniak im Überschuß gebunden, erst bei wesentlich davon abweichenden  $C_H$ -Werten merkliche Mengen<sup>11</sup>). Die schwefelsäurereicheren Krystalle zeigen eine mehr zugespitzte Form, die  $NH_3$ -reichen die normale (Sörensen und Höyrup, a. a. O. S. 256). Am isoelektrischen Punkt kommen auf 2 Mol. Albumin 8 Mol. Schwefelsäure. Harris<sup>12</sup>) isolierte aus 100 g reinstem Ovalbumin nur 0,342 g Cystin, unter Berücksichtigung des Cystinverlustes während der Hydrolyse, es sind also nur 14% vom Schwefel als Cystin vorhanden.

Koagulation.

2,5—5 proz. Lösungen von krystallisiertem Ovalbumin in reinem Wasser trüben sich bei 60° und werden bei 64° flockig gefällt. Die Ausscheidungen lösen sich auch nicht vollständig wieder, wenn die Temperatur beim Einengen 50° nicht überschritten hat (Kaas). Anwesenheit von Kochsalz erhöht den Koagulationspunkt, bei 10% Kochsalzgehalt trübt sich eine 2,5 proz. Lösung

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 34, S. 274. 1902. <sup>2</sup>) desgl. Bd. 103, S. 15. 1918.

<sup>3</sup>) Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 1, S. 83. 1902.

<sup>4</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 35, S. 119. 1918.

<sup>5</sup>) Journ. of the Americ. chem. soc. Bd. 22, S. 422. 1900 oder 23. Report of the Connect. Agricult. Exper. Station 1900, S. 348.

<sup>6</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 103, S. 227. 1918.

<sup>7</sup>) Willcock u. Hardy: Ref. Chem. Zentralbl. 1907, II, S. 821.

<sup>8</sup>) Monatshefte f. Chem. Bd. 27, S. 403. 1906.

<sup>9</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 25, S. 16. 1898.

<sup>10</sup>) Stud. for the Res. Labor. of the Connectic. agr. exp. stat., Report f. 1900, S. 443.

<sup>11</sup>) Sörensen u. Höyrup: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 103, S. 240. 1918; s. auch Willcock: Journ. of physiol. Bd. 37, S. 27. 1908.

<sup>12</sup>) Proc. of the roy. soc. of London (B) Bd. 94, S. 449. 1923.

bei 68° und gerinnt flockig bei 70° (Osborne und Campbell). Durch Schütteln der wässerigen Lösung mit und ohne Äther wird es allmählich koaguliert, Alkohol koaguliert salzhaltige und ziemlich salzfreie Lösungen (Unterschied von Serumalbumin).

Die spezifische Drehung für krystallisiertes Ovalbumin beträgt  $[\alpha]_D = -30,70^\circ$  (unabhängig von Anwesenheit von Ammonsulfat) (Hopkins); Willcock<sup>1)</sup> fand sie um einige Zehntel niedriger, nach Osborne und Campbell beträgt sie im Mittel  $-29,4^\circ$ . Die Abweichungen erklären sich wohl aus den für die Darstellung des Albumins benutzten Methoden. Durch Einwirkung von Säuren und Alkalien wird die spezifische Rotation der Lösungen des Eieralbumins erhöht, ohne daß sie jemals die Höhe der spezifischen Rotationen des Serumalbumins erreicht (s. darüber auch Willcock).

Optische Eigenschaften.

Der isoelektrische Punkt liegt bei  $C_H = 15,74 \cdot 10^{-6}$  (Sörensen<sup>2)</sup>).

Gegen Säure ist Eieralbumin viel weniger resistent als Serumalbumin, schon bei 0,2—0,3% Salzsäuregehalt der Lösung ist nach 1 Stunde reichlich Acidalbumin und Albumose nachweisbar. Bei 3,6% Salzsäuregehalt entsteht sofort ein voluminöser, flockiger Niederschlag, der sich gegen den weiteren Angriff der Säure auch bei 40° äußerst widerstandsfähig erweist (Goldschmidt). In starker Salzsäure löst sich Eieralbumin schwieriger als Serumalbumin. Durch Hitze koaguliertes Eieralbumin löst sich schwer in Salpetersäure. Durch starke Kalilauge wird es in genügend konzentrierter Lösung in eine fest gallertige Masse verwandelt (Lieberkühnsches Alkalialbuminat), aber auch schon bei schwach alkalischer Reaktion (0,25%) beginnt alsbald die Umwandlung in Alkalialbuminat. Bei  $p_H = 4,2$  erscheint im Ultramikroskop nur gelegentlich ein Submikron, bei Alkalizugabe bis  $p_H = 4,8$  öfters. Hier beginnt die Fällung oder Denaturierung (Mc Clendon und Prendergast<sup>3)</sup>).

Verhalten gegen Säuren und Alkalien.

Ovalbumin (auch koaguliertes) vermag bei Zimmertemperatur oder 40° aus Schwefel Schwefelwasserstoff zu bilden und andere Reduktionen auszuführen (Heffter<sup>4)</sup>). Ovalbumin, das durch Kochen, Zusatz von starkem Alkohol in der Wärme, Säure oder Lauge denaturiert ist, gibt positive Nitroprussidreaktion (S. 450, 14); sie fehlt dem rohen Eiweiß, auch wenn es krystallisiert ist (Harris<sup>5)</sup>).

Reduktionsvermögen.

Über die Produkte der hydrolytischen Spaltung s. die Tabelle § 500. Stickstoffverteilung: 1,34% Amid-, 10,58% Monamino-, 3,30% Diamino- und 0,29% Melaninstickstoff (Osborne und Harris<sup>6)</sup>).

Hydrolyse.

Bei der hydrolytischen Spaltung entstehen flüchtige Schwefelverbindungen, aber kein Schwefelwasserstoff (Mörner). Nur 14% des Schwefels ist als Cystin isolierbar, so daß das Vorhandensein noch anderer unbekannter schwefelhaltiger Bausteine wahrscheinlich ist (Harris<sup>7)</sup>).

Beim Kochen des am besten vorher in Alkali gequollenen Ovalbumins mit Salzsäure wird Glucosamin abgespalten (Seemann<sup>8)</sup>, Langstein<sup>9)</sup>; die erhaltenen Mengen sind sehr verschieden und nehmen mit dem Umkrystallisieren ab. Osborne, Jones und Leavenworth (a. a. O. S. 259) erhielten aus den Produkten der Säurespaltung eines 6 mal umkrystallisierten Ovalbumins

<sup>1)</sup> Journ. of physiol. Bd. 37, S. 27. 1908.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 103, S. 210. 1918.

<sup>3)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 38, S. 549. 1919.

<sup>4)</sup> Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 5, S. 213. 1904.

<sup>5)</sup> Proc. of the roy. soc. of London (B) Bd. 94, S. 426. 1923.

<sup>6)</sup> Journ. of the Americ. chem. soc. Bd. 25, S. 323. 1903.

<sup>7)</sup> Proc. of the roy. soc. of London (B) Bd. 94, S. 449. 1923.

<sup>8)</sup> Diss. Marburg 1898.

<sup>9)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 31, S. 49. 1901.

Glucosazon äquivalent einem Glucosamingehalt von 1,23%; das Glucosamin selbst oder sein Phenylhydantoin zu fassen, gelang ihnen nicht.

Über Protalbinsäure und Lysalbinsäure aus Eiereiweiß s. Kennedy und Gortner<sup>1)</sup>; kein Unterschied beider in der Stickstoffverteilung gegen Eieralbumin.

330. **Conalbumin** nennen Osborne und Campbell (a. a. O.) sowie Sörensen<sup>2)</sup> das Gemisch des Albumins, das sie im Hühnereiweiß neben dem Ovalbumin fanden. C 52,25, H 6,99, N 16,11, S 1,70%. Es hat einen niedrigeren Koagulationspunkt und eine höhere spezifische Drehung als das Ovalbumin, ist nicht kristallisiert erhalten worden und stellt vielleicht das erste Abbauprodukt des kristallisierbaren Eieralbumins dar (Sörensen, S. 44 Anm.). Beim Kochen mit Salzsäure wird ebenfalls Glucosamin abgespalten (Langstein<sup>3)</sup>). Stickstoffverteilung: 1,21% Amid-, 10,49% Monamino-, 4,16% Diamino- und 0,26% Melaninstickstoff (Osborne und Harris<sup>4)</sup>).

**Darstellung.** 331. **Lactalbumin.** Zu seiner Darstellung sättigt man Milch oder Colostrum bei 30° mit Magnesiumsulfat, fällt das Filtrat durch Zusatz von 0,5—1% Essigsäure und filtriert ab. Der abgepreßte Niederschlag wird in wenig Wasser gelöst, die Lösung genau mit Natronlauge neutralisiert, anhaltend gegen destilliertes Wasser dialysiert und nach Eindunsten in flacher Schale bei 30—40° auf kleines Volumen mit starkem Alkohol gefällt. Der mit Alkohol und Äther gewaschene und getrocknete Niederschlag stellt ein feines, weißes Pulver dar (Sebelien<sup>5)</sup>). Von Wichmann<sup>6)</sup> wurde es kristallisiert erhalten.

Osborne und Wakeman<sup>7)</sup> sättigen die Milch zuerst mit Ammonsulfat, lösen die so erhaltenen gesamten Proteine in dem der Milch gleichen Volumen Wasser und wiederholen die Fällung mit Ammonsulfat bei neutraler Reaktion mehrmals, um die übrigen Bestandteile der Milch möglichst zu entfernen. Die wässrige Lösung wird durch 1proz. Schwefelsäure in der Kälte vom Casein befreit und das klare Filtrat mit Ammoniak gegen Lackmus neutralisiert. Die Lösung soll dabei aber klar bleiben, sonst muß nochmals filtriert werden. Darauf wird mit Schwefelsäure ganz schwach angesäuert und wiederum mit Ammonsulfat gesättigt, in  $\frac{1}{4}$  des ursprünglichen Milchvolumens Wasser gelöst und die Umfällung mit Ammonsulfat wiederholt. Dann erst wird die neutrale Lösung mit Magnesiumsulfat gesättigt und das Filtrat aufs Vierfache mit Wasser verdünnt, wie oben angesäuert und bei 90° ausgeflockt. Der Niederschlag wird mit Wasser und Alkohol ausgewaschen und getrocknet; er ist frei von Phosphor und Lactoglobulin.

**Eigenschaften.** Die amorphe Substanz hat die Zusammensetzung C 52,19, H 7,18, N 15,77, S 1,73%. Osborne fand C 52,51, H 7,10, N 15,43, S 1,92%. Sie stimmt mit dem Serumalbumin in der Gerinnungstemperatur und in ihrem Verhalten gegen Säuren und Alkalien überein, ist ihm in der Stickstoffverteilung und in der Zusammensetzung aber nur ähnlich<sup>8)</sup> und dreht bedeutend schwächer.

**Optische Eigenschaften.**  $[\alpha]_D = -36,4—36,98^\circ$ .

**Hydrolyse.** Über die Produkte der hydrolytischen Spaltung s. § 500.

Stickstoffverteilung nach van Slyke: 7,93% NH<sub>3</sub>-N, 1,82% Melanin-N, 26,72% Basen-N, 2,18% Cystin-N, 7,56% Arginin-N, 4,44% Histidin-N, 12,54% Lysin-N, 62,49% nichtbasischer N, darunter 2,65% Nichtamino-N. Ähnliche Zahlen fanden Osborne und Mitarbeiter.

<sup>1)</sup> Journ. of the Americ. chem. soc. Bd. 39, 2734. 1918; ref. Chem. Zentralbl. 1918, II, S. 194.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 103, S. 24. 1918.

<sup>3)</sup> Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 1, S. 100. 1902.

<sup>4)</sup> Journ. of the Americ. chem. soc. Bd. 25, S. 323. 1903.

<sup>5)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 9, S. 453. 1885. <sup>6)</sup> desgl. Bd. 27, S. 575. 1899.

<sup>7)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 33, S. 8. 1918.

<sup>8)</sup> Abderhalden u. Przibram: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 51, S. 409. 1907. — Osborne, van Slyke, Leavenworth u. Vinograd: Journ. of biol. chem. Bd. 22, S. 266. 1915. — Crowther u. Raistrick: Biochem. Journ. Bd. 10, S. 434. 1916.



332. **Myogen\***) (Myosinogen von Halliburton<sup>1)</sup>, Myoprotein von Darstellung. Botazzi<sup>2)</sup>. Zur Darstellung nach v. Fürth<sup>3)</sup> dient die Preßflüssigkeit frischer, durch Ausspülen mit 0,6 proz. Kochsalzlösung blutfrei gemachter, quergestreifter Muskeln von Wirbeltieren, z. B. Kaninchen. Dieses Muskelplasma wird entweder dialysiert, nach dem Filtrieren zur Entfernung von Myosinresten auf 52° erhitzt, wieder filtriert und mit Alkohol gefällt oder mit 1 $\frac{1}{4}$  Vol. gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt und nach Abfiltrieren der Fällung mit gepulvertem Ammonsulfat gesättigt. Den abfiltrierten, mit gesättigter Ammonsulfatlösung gewaschenen und abgepreßten Niederschlag löst man in Wasser, erhitzt die wässrige Lösung auf 40° (zur Entfernung von löslichem Myogenfibrin), filtriert und fällt das Filtrat mit Alkohol.

Die Lösungen koagulieren, schnell erhitzt, zwischen 55 und 65°. Durch Dia- Eigenschaften. lyse scheidet sich Myogen aus seinen Lösungen nicht aus oder erst nach monatelanger Dialyse (Botazzi). Die Lösungen erscheinen bei ultramikroskopischer Betrachtung klar. Sie werden durch Sättigung mit Kochsalz oder Magnesiumsulfat etwas (wenn auch nur sehr unvollkommen) gefällt, durch Halbsättigung mit Ammonsulfat noch nicht, aber durch Sättigung mit diesem Salze vollkommen. Mineralsäuren geben im Überschuß lösliche Fällungen, Essigsäure und ebenso Schwermetallsalze nur bei Gegenwart von Neutralsalzen. Eine Lösung von Myogen mit Natronlauge vorsichtig erwärmt gibt auf Zusatz von 15 proz. Salmiaklösung einen voluminösen, gallertigen Niederschlag (Unterschied von Myosin).

Während salzfreie Myogenlösungen beständiger sind, kommt es in salzhaltigen, besonders beim Erwärmen auf 30—40°, zur Bildung von löslichem Lösliche Myogenfibrin. Myogenfibrin (bei 40° koagulierend) und weiterhin zur Abscheidung von Myogenfibrin. v. Fürth<sup>4)</sup> hält heute in Anlehnung an Botazzis Beobach- Myogenfibrin. tungen beide Substanzen für identisch und sieht in ihnen nur zwei Stufen des verschieden weit fortgeschrittenen Agglutinationsvorganges. Diese Umwandlung wird befördert durch die Anwesenheit mancher Substanzen, z. B. Calcium- oder Ammoniumchlorid, Rhodannatrium, salicylsaurem Natron, Coffeinsalzen usw. Das Myogen wird sehr leicht in Acidalbumin umgewandelt, schon durch 1 proz. Essigsäure.

Der aus den Wirbellosen durch ein entsprechendes Verfahren erhaltene Eiweißstoff stimmt mit dem Myogen nicht überein (v. Fürth<sup>5)</sup>, Prziбраm<sup>6)</sup>). Der aus glatten Muskelfasern gewonnene ist noch nicht genügend untersucht. Die vorliegenden Angaben stimmen nicht überein (Velichi<sup>7)</sup>, Vincent<sup>8)</sup>).

### Globuline.

333. Sie sind löslich in verdünnter Lösung neutraler Salze, wie Allgemeine Eigenschaften der Globuline. Unterschiede von den Albuminen. Chloratrium, Chlorammonium, Magnesiumsulfat. Diese Lösungen werden beim Erhitzen koaguliert. In Wasser sind sie unlöslich oder schwer löslich und werden deshalb bei gewöhnlicher Temperatur durch Zusatz von viel Wasser oder durch Dialyse aus ihren salzhaltigen Lösungen abgeschieden\*\*). Der Niederschlag

\*) Das Myogen weicht in manchen Punkten von den Albuminen ab.

\*\*\*) Eine Ausnahme machen die Krystalline (§ 341), welche ihrer sonstigen Eigenschaften wegen den Globulinen zugerechnet werden müssen, aber in Wasser löslich sind.

<sup>1)</sup> Journ. of physiol. Bd. 8, S. 133. 1887.

<sup>2)</sup> Botazzi u. Quagliariello: Atti d. R. accad. Roma [5] Bd. 22, II, S. 52. 1913.

<sup>3)</sup> Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 36, S. 231. 1895 u. Bd. 37, S. 389. 1896.

<sup>4)</sup> Ergebn. d. Physiol. Bd. 17, S. 382. 1919.

<sup>5)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 31, S. 338. 1900/01.

<sup>6)</sup> Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 2, S. 143. 1902.

<sup>7)</sup> Zentralbl. f. Physiol. Bd. 12, S. 351. 1899.

<sup>8)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 34, S. 417. 1901/02.

mancher Globuline wird beim längeren Stehen unter Wasser in neutraler Salzlösung unlöslich. Alle Globuline werden durch Sättigung der neutralen Lösung mit Magnesiumsulfat\*) bei 30° ohne Änderung ihrer Eigenschaften ausgefällt, ebenso durch Sättigung mit Ammoniumsulfat, vollständig oder fast vollständig auch schon durch Halbsättigung mit letzterem Salz. Einige (Serumglobulin, Fibrinogen, Fibringlobulin, Myosin) werden durch Sättigung ihrer neutralen Lösung mit Kochsalz gefällt, andere ( $\alpha$ - und  $\beta$ -Krystallin, Thyreoglobulin) nicht. Durch Alkohol werden die Globuline leichter gefällt als die Albumine und bei Berührung mit Alkohol schneller koaguliert.

Wie bei den Albuminen findet sich unter den Produkten ihrer hydrolytischen Spaltung eine mittlere Menge Hexonbasen, immer jedoch auch Glykokoll; sie sind ärmer an Schwefel als die Albumine.

**334. Myosin.** Mit diesem Namen bezeichnet man sowohl das aus frischem Muskelplasma dargestellte und von Halliburton<sup>1)</sup> Paramyosinogen genannte Globulin als auch das aus toter Muskelsubstanz gewonnene. Die Angaben über das Verhalten beider, z. B. in bezug auf die Koagulationstemperatur, Fällbarkeit durch Salze sind nicht ganz übereinstimmend. Ob diese Verschiedenheiten durch die Annahme, daß das aus den toten Muskeln erhaltene Globulin mit Myogen verunreinigt ist, ihre Erklärung finden, bedarf weiterer Untersuchung.

Nach Botazzi bestehen die im Muskelpreßsaft vorkommenden ultramikroskopisch sichtbaren Granula aus dem Myosin, das den Fibrillen entstammt. **Darstellung.** Zur Darstellung aus Muskelplasma nach v. Fürth<sup>2)</sup> wird die Preßflüssigkeit frischer durch Ausspülen mit physiologischer Kochsalzlösung blutfrei gemachter (Kaninchen-) Muskeln entweder der Diffusion unterworfen oder mit  $\frac{3}{4}$  Vol. gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt. Die abgeschiedene Substanz wird mit physiologischer Kochsalzlösung behandelt, filtriert, das Filtrat wieder mit  $\frac{3}{4}$  Vol. gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt und Lösung und Fällung nochmals wiederholt. Die ganze Darstellung muß schnell geschehen; trotzdem ist die Ausbeute eine geringe, da das Myosin die Neigung hat, unlöslich zu werden. Um das Myosin aus toten Muskeln zu erhalten, wird die gut zerkleinerte, schnell mit kaltem Wasser sorgfältig ausgewaschene Masse mit 10—15proz. Salmiaklösung zusammengerührt, einige Stunden stehen gelassen und zuerst durch Leinwand, dann durch Papier filtriert. Man läßt die Lösung in Wasser tropfen, wäscht die ausgeschiedenen Gerinnsel mit Wasser gut aus, löst sie wieder in Salmiaklösung und fällt abermals mit Wasser (Danilewsky<sup>3)</sup>).

Zur Darstellung der Myosingranula von Botazzi wird der (meist saure) Preßsaft  $\frac{1}{2}$  Stunde lang auf 48° erwärmt oder 24—48 Stunden gegen destilliertes Wasser dialysiert.

**Koagulation.** Die wässrige Lösung des Myosins aus Muskelplasma trübt sich bei längerem Stehen spontan, schneller beim Erwärmen bis auf 35°; der Niederschlag, Myosinfibrin, ist in Neutralsalzlösungen unlöslich und zeigt die Eigenschaften koagulierter Albuminstoffe (§ 344). Beim schnellen Erhitzen auf 44—47° trübt sich die Lösung; ein Niederschlag erfolgt bei 47—50°, eine vollständige Abscheidung bei 50—53° (v. Fürth). Die Salmiaklösung des aus toten Muskeln dargestellten Myosins beginnt bei 42° sich zu trüben und wird bei 55° flockig koaguliert (Danilewsky).

\*) Viele pflanzliche Globuline verhalten sich insofern anders, als sie durch Sättigung mit Magnesiumsulfat nicht gefällt werden und durch Ammonsulfat erst bei weit über Halbsättigung.

<sup>1)</sup> Journ. of physiol. Bd. 8, S. 133. 1887.

<sup>2)</sup> Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 36, S. 231. 1895.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 5, S. 158. 1881.

Beim Zufügen von Ammonsulfat zu einer Lösung von Myosin (aus Muskelplasma) beginnt die Fällung bei 12—17% Salzgehalt und ist bei 28% beendet (v. Fürth). Das aus toten Muskeln gewonnene Myosin verlangt zu seiner Abscheidung aus Lösungen einen höheren Prozentgehalt an Magnesiumsulfat als das aus Muskelplasma gewonnene (Halliburton). Säuren rufen in Myosinlösungen Niederschläge hervor, die im Überschuß sich leicht lösen. Myosin wird durch Säuren und Alkalien leicht in Acidalbumin resp. Alkalialbuminat umgewandelt. Eigenschaften.

Aus glatter Muskulatur erhält man nach dem Verfahren von v. Fürth ein Globulin, über dessen Eigenschaften Velichi (a. a. O.) und Vincent (a. a. O.) abweichende Angaben machen, das aber jedenfalls nicht mit dem Myosin übereinstimmt. Ebenso ist das aus dem Muskelplasma der Wirbellosen dargestellte Myosin kein typisches (v. Fürth<sup>1</sup>).

**335. Fibrinogen** enthalten alle diejenigen Flüssigkeiten, welche beim ruhigen Vorkommen. Stehen bei gewöhnlicher Temperatur von selbst gerinnen unter Bildung von Fibrin oder zur Gerinnung gebracht werden, wenn man einige Tropfen der aus frischem, geronnenem Blut ausgepreßten Flüssigkeit hinzufügt und die Mischung eine Zeitlang stehen läßt. Es findet sich in Blut, Lymphe, Knochenmark (P. Th. Müller<sup>2</sup>), manchen Trans- und Exsudaten.

Zur Darstellung wird durch Oxalatzusatz (0,3%) ungerinnbar gemachtes Darstellung. (Pferde-) Blut zentrifugiert, das Plasma bei 0° stehen gelassen, bis sich ein profermenthaltiger Niederschlag gebildet hat, was meist nach 24 Stunden der Fall ist. Dann wird filtriert und mit dem halben Volumen kalkfreier gesättigter Kochsalzlösung versetzt; die von dem geringfügigen Niederschlag abfiltrierte Flüssigkeit wird nun mit so viel gesättigter Kochsalzlösung versetzt, daß auf 1 Tl. Oxalatplasma 2 Tl. kommen. Der jetzt entstehende Niederschlag wird in 6—8proz. Kochsalzlösung gelöst, mit dem gleichen Volumen gesättigter Kochsalzlösung gefällt und dieses Verfahren mehrmals wiederholt. Löst man jetzt den stark abgepreßten Niederschlag in Wasser und diffundiert gegen ganz schwache (0,003proz.) Natronlauge, so erhält man eine salzfreie oder fast salzfreie reine Fibrinogenlösung, aus der durch Alkohol das Fibrinogen abgeschieden werden kann (Hammarsten<sup>3</sup>).

Piettre und Vila<sup>4</sup>) dialysieren das Salzplasma in Kollodiumsäckchen gegen Zuckersirup (spez. Gew. 1,38) 24 Stunden lang und dann gegen destilliertes Wasser, wobei sich Fibrinogen abscheidet.

Nach Huiskamp<sup>5</sup>) enthält die Fibrinogenlösung noch Fibringlobulin (§ 336) in lockerer Verbindung mit dem Fibrinogen. Um es zu entfernen, versetzt man die Lösung mit dem doppelten Volum gesättigter Fluornatriumlösung, löst den entstandenen gallertigen Fibrinogenniederschlag in  $\frac{1}{22}$ proz. Ammoniak, neutralisiert nach Zusatz von Kochsalz bis zu 3—5% und wiederholt die Fällung. Das Fibringlobulin bleibt in Lösung.

Nach Reye<sup>6</sup>) gewinnt man Fibrinogen durch Versetzen von 12 Tl. durch Fluornatrium (0,56—0,6%) ungerinnbar gemachten Plasmas mit 30 Tl. Wasser und 16 Tl. gesättigter Ammonsulfatlösung und Auswaschen des abfiltrierten Niederschlags mit entsprechend konzentrierter Ammonsulfatlösung als schneeweißen, flockigen Niederschlag, der, an der Luft getrocknet und bei 80° koaguliert, mit heißem Wasser salzfrei gewaschen werden kann.

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 31, S. 338. 1900/01.

<sup>2</sup>) Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 6, S. 454. 1905.

<sup>3</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 22, S. 333. 1897 u. Bd. 28, S. 98. 1899; Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 19, S. 563. 1879 u. Bd. 22, S. 431. 1880 u. Malys Jahresber. d. Tierchem. 1882, S. 11.

<sup>4</sup>) Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 156, S. 482. 1913.

<sup>5</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 44, S. 182. 1905 u. Bd. 46, S. 273. 1905.

<sup>6</sup>) Diss. Straßburg 1898.

- Zusammensetzung.** Das aus Pferdeblut dargestellte Fibrinogen hat die Zusammensetzung: C 56,93, H 6,90, N 16,66, S 1,25% (Hammarsten). Mörner fand 1,13% S und 0,465% bleischwärenden Schwefel. Der Schwefel ist nur zum Teil, vielleicht zur Hälfte, in Form von Cystin vorhanden (Mörner).
- Koagulation.** Seine salzhaltige Lösung koaguliert nach Hammarsten<sup>1)</sup> bei 52—55°, nach Frédéricq<sup>2)</sup> bei 55—56°.
- Eigenschaften.** Kohlensäure und verdünnte Säuren rufen Fällungen hervor, die alsbald in verdünnten Salzlösungen unlöslich werden. Durch das gleiche Volumen gesättigter Kochsalzlösung werden selbst sehr verdünnte Fibrinogenlösungen ziemlich reichlich gefällt, während Serumglobulin bei diesem Salzgehalt (16%) nur dann ausfällt, wenn es sehr reichlich vorhanden ist; auch durch Ammonsulfat wird es schon bei einem geringeren Salzgehalt als Serumglobulin gefällt. In salzfreien, mit sehr wenig Alkali hergestellten, nicht aber in salzhaltigen Lösungen ruft Chlorcalcium einen Niederschlag von Fibrinogenkalk hervor. Das durch Aussalzen, durch Wasserzusatz oder durch Säure ausgeschiedene Fibrinogen verliert sehr leicht die Fähigkeit, sich wieder zu lösen.
- Optische Eigenschaften.** Für Fibrinogen aus Pferdeblut fand Mittelbach<sup>3)</sup>  $[\alpha]_D = -52,5^\circ$ , für Fibrinogen aus Rinderblut Cramer<sup>4)</sup>  $[\alpha]_D = -36,8^\circ$ . Dieses aus Rinderblut dargestellte zeigte auch eine abweichende Zusammensetzung.
- Hydrolyse.** Über die Produkte der hydrolytischen Spaltung s. § 500.
- Gerinnung.** Auf Zusatz von Fibrinferment gerinnt eine Fibrinogenlösung unter Abscheidung von Fibrin (§ 344), in Lösung bleibt Fibringlobulin (§ 336), gealterte Lösungen gerinnen nicht mehr (Nolf<sup>5)</sup>).
336. **Fibringlobulin** nennt Hammarsten<sup>6)</sup> ein bei etwa 64° koagulierendes Globulin von der Zusammensetzung C 52,70, H 6,98, N 16,06% (Schwefel wurde nicht bestimmt), welches aus Fibrinogenlösung, nachdem sich die Umwandlung zu Fibrin vollzogen hat, durch Sättigung mit Kochsalz abgeschieden werden kann. Es ist auch im Blutserum vorhanden und läßt sich durch Versetzen von 2 Tl. Serum mit 5,2 Tl. Wasser und 2,8 Tl. gesättigter Ammonsulfatlösung zusammen mit anderen Stoffen abscheiden (Hammarsten<sup>7)</sup>). Beim Erhitzen einer Fibrinogenlösung auf 55—60° bleibt gleichfalls ein Körper von obiger Koagulationstemperatur in Lösung (Hammarsten<sup>8)</sup>) und desgleichen bei der Fällung einer Fibrinogenlösung mit Essigsäure (Frederikse<sup>9)</sup>). Nach Huiskamp ist das Fibringlobulin im Blutplasma in lockerer, zum Teil schon hydrolytisch gespaltener Verbindung mit dem eigentlichen (gerinnungsfähigen) Fibrinogen vorhanden. Über seine Abtrennung s. § 335 am Schluß.
- Vorkommen.** 337. **Serumglobulin** (Paraglobulin, fibrinoplastische Substanz) ist in Blut, Lymphe, Transsudaten, anscheinend in sehr geringer Menge in der Milch, (Sebelien<sup>10)</sup>) und krankhafterweise auch im Harn vorhanden.
- Darstellung.** Nach Hammarsten<sup>11)</sup> wird es gewonnen durch Verdünnen des schwach mit Essigsäure angesäuerten Blutserums mit der 10—15fachen Menge Wasser und Reinigen des entstandenen Niederschlags entweder durch wiederholtes Auflösen in möglichst verdünntem Alkali und Fällen mit wenig Essigsäure oder durch Auflösen in verdünnter Kochsalzlösung und Fällen mit Wasser. Nach Reye<sup>12)</sup> erhält man Serumglobulin, indem man Serum auf 30 proz. Sättigung

1) Malys Jahresber. d. Tierchem. 1876, S. 15.

2) Bull. de l'acad. de Belg. (2) Bd. 64, Nr. 7. 1877.

3) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 19, S. 289. 1894. 4) desgl. Bd. 23, S. 74. 1897.

5) Ann. de l'inst. Pasteur Bd. 31, S. 155. 1917.

6) Malys Jahresber. d. Tierchem. 1882, S. 11.

7) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 28, S. 98. 1899.

8) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 22, S. 431. 1880.

9) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 19, S. 143. 1894. 10) desgl. Bd. 9, S. 445. 1885.

11) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 17, S. 413. 1878; Bd. 18, S. 38. 1878; Bd. 22, S. 431. 1880. — Freund u. Joachim: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 36, S. 430. 1902. — Huiskamp: desgl. Bd. 46, S. 394. 1905.

12) Diss. Straßburg 1898.

mit Ammonsulfat bringt (2 Tl. Serum, 5 Tl. Wasser und 3 Tl. gesättigte Ammonsulfatlösung), von dem entstandenen Niederschlag (Fibringlobulin) abfiltriert und zu dem Filtrat so viel Ammonsulfatlösung zufügt, daß eine nahezu halbgesättigte Lösung von Ammonsulfat entsteht. Das dabei ausfallende Globulin wird mehrfach in Wasser gelöst und mit Ammonsulfat gefällt. Es enthält ganz kleine Mengen von Nucleoproteid. Auch durch Sättigung des Serums mit Magnesiumsulfat wird Serumglobulin ausgefällt zusammen mit Fibringlobulin und Nucleoproteid, die allerdings nur in sehr geringer Menge vorhanden sind. In der Nähe des isoelektrischen Punktes ist die Wasserstoffionenkonzentration von großem Einfluß auf die Menge des Niederschlags (Chick<sup>1</sup>).

Das Serumglobulin wird (abgesehen von den eben genannten Beimengungen) für ein Gemenge gehalten. Die Menge des durch Verdünnung oder Säurezusatz oder Dialyse aus dem Serum erhaltenen Globulins ist immer bedeutend geringer als die durch Halbsättigung mit Ammonsulfat oder Sättigung mit Magnesiumsulfat gewonnene. Das durch Salzfallung erhaltene scheidet sich bei der Dialyse seiner Lösungen zum Teil ab (wasserunlöslicher Teil), zum Teil bleibt es in Lösung und ist auch durch Kohlensäuredurchleiten und Essigsäurezusatz nicht fällbar (wasserlöslicher Teil). Indessen stimmen beide in Zusammensetzung, Drehung, Koagulationstemperatur und Verhalten gegen Fällungsmittel überein (Hammarsten<sup>2</sup>), Marcus<sup>3</sup>), Hartley<sup>4</sup>). Durch fraktionierte Fällung mit Ammonsulfat ist das durch Salzfallung erhaltene in zwei Teile zerlegt worden, von denen der leichter fällbare (28—30 proz. Sättigung mit Ammonsulfat) dem wasserunlöslichen Teil, der schwerer fällbare (34—46 proz. Sättigung dem wasserlöslichen Teil entsprechen sollte (Fuld und Spiro<sup>5</sup>), Pick<sup>6</sup>). Ersterer wurde Euglobulin, letzterer Pseudoglobulin genannt. Indessen enthalten nach Freund und Joachim<sup>7</sup>) (vgl. auch Hammarsten<sup>8</sup>) beide Fraktionen wasserunlösliche und wasserlösliche Teile. Auch Porges und Spiro<sup>9</sup>), welche das Globulin durch Fällung mit Ammonsulfat in drei Fraktionen zerlegten, fanden gelegentlich in jeder dieser drei Fraktionen wasserlösliches und wasserunlösliches. Das durch Verdünnen und Essigsäurezusatz gewonnene Globulin scheidet sich bei der Dialyse seiner Lösungen ebenfalls nicht völlig ab und läßt sich durch Ammonsulfat auch fraktioniert fällen. Alle die durch verschiedene Fällbarkeit und verschiedene Löslichkeit erhaltenen Fraktionen zeigen aber dieselbe Zusammensetzung, dasselbe Lichtbrechungsvermögen (Reiss<sup>10</sup>), ungefähr dieselbe Gerinnungstemperatur (die von Freund und Joachim beobachteten Unterschiede sind zu wenig prägnant) und dieselbe spezifische Drehung (die von Porges und Spiro gefundenen Differenzen sind zu klein, als daß sie sich nicht durch die Ungenauigkeit der Methode erklären ließen). Da auch die Unterschiede in bezug auf Lösungsvermögen in Wasser sowie in bezug auf Fällbarkeit durch Säure auf aus dem Serum stammende Beimengungen zurückzuführen sind (Hammarsten, K. Mörner<sup>11</sup>), so gründet sich die Annahme, daß das Globulin ein Gemenge darstellt, lediglich auf seine fraktionierte Fällbarkeit durch Ammonsulfat und andere Salze. Auch Euglobulin und Pseudoglobulin des Kuhkolostrum scheinen in ihrer Struktur übereinzustimmen, da die „racemisierten“ Proteine Aminosäuren von gleichem optischen Verhalten bei der Hydrolyse geben (Dudley und Woodman<sup>12</sup>). Nach Haslam<sup>13</sup>) und Chick<sup>14</sup>) ist das Euglobulin eine mechanische Komplexverbindung des Pseudoglobulins mit Lecithin, beide Globuline können künstlich ineinander übergeführt werden.

Mittlere Zusammensetzung C 52,71, H 7,01, N 15,85, S 1,11% (Hammarsten). K. A. H. Mörner<sup>11</sup>) fand 1,02% S und 0,67% bleischwärenden Schwefel. Wahrscheinlich ist die Gesamtmenge des Schwefels als Cystin vorhanden (Mörner).

<sup>1</sup>) Biochem. Journ. Bd. 7, S. 318. 1913; ref. Chem. Zentralbl. 1914, I, S. 555.

<sup>2</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 8, S. 467. 1883/84.

<sup>3</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 28, S. 559. 1899.

<sup>4</sup>) Biochem. Journ. Bd. 8, S. 541; ref. Chem. Zentralbl. 1916, I, S. 1158 u. Biochem. Journ. Bd. 9, S. 269; ref. Chem. Zentralbl. 1916, I, S. 1253.

<sup>5</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 31, S. 140. 1901.

<sup>6</sup>) Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 1, S. 360. 1902.

<sup>7</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 36, S. 407. 1902.

<sup>8</sup>) Ergebn. d. Physiol. Bd. 1, S. 346. 1902.

<sup>9</sup>) Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 3, S. 277. 1903. <sup>10</sup>) desgl. Bd. 4, S. 150. 1904.

<sup>11</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 34, S. 253. 1902.

<sup>12</sup>) Biochem. Journ. Bd. 12, S. 339. 1918. <sup>13</sup>) desgl. Bd. 7, S. 492. 1913.

<sup>14</sup>) Biochem. Journ. Bd. 9, S. 404. 1914.

- Koagulation.** Koagulationstemperatur in 10proz. Kochsalzlösung 69—76° (Hammarsten). Die Lösungen werden durch Halbsättigung mit Ammonsulfat und durch Sättigung mit Magnesiumsulfat bei gewöhnlicher Temperatur vollkommen, durch Sättigung mit Kochsalz nur unvollkommen gefällt (Hammarsten). Durch Dialyse und durch Säurezusatz findet nur teilweise Fällung statt.
- Optische Eigenschaften.** Das aus Rinder- und Pferdeblut nach dem Säureverfahren dargestellte Serumglobulin zeigt in verdünnter Kochsalz- oder Magnesiumsulfatlösung  $[\alpha]_D = -47,8^\circ$  (Frédéricq<sup>1</sup>).
- Refraktometrisches Verhalten.** Das Refraktometerinkrement für eine 1proz. Lösung bei 17,5° beträgt für Euglobulin nach Reiss<sup>2</sup>) 0,00 230, nach Robertson<sup>3</sup>) 0,00 229, für Pseudoglobulin I nach Reiss 0,00 224, für Pseudoglobulin II nach Reiss 0,00 230, im Mittel für die Globuline 0,00 227.
- Hydrolyse.** Über die Produkte der hydrolytischen Spaltung s. die Tabelle § 500. Serumglobulin aus Gänse- und Pferdeblut ergab bei der Hydrolyse gleiche Mengen von Glykokoll, Glutaminsäure und Tyrosin (Abderhalden und Slavu<sup>4</sup>). Im Gehalt an den 3 Diaminosäuren besteht kein Unterschied zwischen Serumglobulin vom Pferde, das bei 34 und bei 40% Sättigung mit Ammonsulfat gewonnen worden ist (Lock und Thomas<sup>5</sup>). Stickstoffverteilung nach van Slyke ist von Hartley<sup>6</sup>) für die gesamten Globuline, Pseudo- und Euglobulin I und II vom Rind und Pferd untersucht. Die Zahlen stimmen annähernd überein. Vom Gesamtstickstoff sind bei Rinderglobulin enthalten in NH<sub>3</sub> 7,7, Melanin 2,0, mit Phosphorwolframsäure fällbar 28,2%, davon in Cystin 2,0, Arginin 10,9, Histidin 6,3, Lysin 9,0%. Von den 62,9% Monaminosäurenstickstoff sind 2,2% als Nichtaminostickstoff vorhanden. Der freie Aminostickstoff soll gleich dem halben Lysinstickstoff sein (Hartley<sup>7</sup>).
- Daß beim Kochen mit Säuren aus Serumglobulin (aus Blut, Ascitesflüssigkeit, Harn) ein reduzierendes und osazonbildendes Kohlenhydrat abgespalten wird, fand zuerst K. Mörner<sup>8</sup>). Langstein<sup>9</sup>) wies die Anwesenheit von Glucose und Glucosamin nach, fand die Menge der reduzierenden Substanz auf Traubenzucker berechnet zu etwa 1,3%, und bemühte sich, die Muttersubstanz dieser Kohlenhydrate zu isolieren. Abderhalden, Bergell und Dörpinghaus<sup>10</sup>), welche nur Traubenzucker feststellen konnten, fanden etwa 0,1% reduzierende Substanz (auf Traubenzucker berechnet). Die Möglichkeit, daß diese Kohlenhydrate aus Beimengungen des Globulins stammen, ist nicht ganz von der Hand zu weisen.
- Desamidierung.** Über die Einwirkung von salpetriger Säure auf Globulin s. Lampel<sup>11</sup>).
- Glutolin.** Faust<sup>12</sup>) isolierte aus dem hauptsächlich Serumglobulin enthaltenden Niederschlag, welcher beim Versetzen von Pferdeblutserum mit dem gleichen Volum gesättigter Ammonsulfatlösung entsteht, einen Körper von der Zusammensetzung C 51,21, H 7,24, N 17,47, S 0,64%, der in Neutralsalzlösungen jeder Konzentration unlöslich, nur in Alkalien und Ammoniak löslich und aus diesen Lösungen durch Säure wieder fällbar war. Er gab die Biuret- und die Millonsche Reaktion, letztere nicht sehr stark, nicht oder nur sehr schwach die Schwefelbleiprobe.

<sup>1</sup>) Arch. de biol. Bd. 1, S. 17. 1880.

<sup>2</sup>) Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 51, S. 19. 1904; Zeitschr. f. Elektrochem. Bd. 14, S. 613. 1908.

<sup>3</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 11, S. 179. 1912.

<sup>4</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 59, S. 247. 1909. <sup>5</sup>) desgl. Bd. 87, S. 74. 1913.

<sup>6</sup>) Biochem. Journ. Bd. 8, S. 541; ref. Chem. Zentralbl. 1916, I, S. 1158.

<sup>7</sup>) Biochem. Journ. Bd. 9, S. 269. 1915.

<sup>8</sup>) Zentralbl. f. Physiol. Bd. 7, S. 581. 1894. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 34, S. 253. 1901/02.

<sup>9</sup>) Monatshefte f. Chem. Bd. 24, S. 445. 1903; Bd. 25, S. 453. 1904; Bd. 26, S. 531. 1905. Ergebn. d. Physiol. Bd. 3, S. 460. 1904.

<sup>10</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 41, S. 530. 1904.

<sup>11</sup>) Monatshefte f. Chem. Bd. 28, S. 625. 1907.

<sup>12</sup>) Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 41, S. 309. 1898.

Bei der hydrolytischen Spaltung entstand Glykokoll. Faust hält das Glutolin für eine Zwischenstufe zwischen den Eiweißstoffen und Glutin. Aus Hummerblut erhielten Alsberg und Clark<sup>1)</sup> ein ähnliches Produkt, das erst nach mehrfachem Lösen in Alkali und Fällen mit Säure keine  $\alpha$ -Naphthol-, Orcin- und Trommersche Probe (§§ 97 und 100) mehr gab. Millonsche Probe negativ. C 50,15, H 7,1, S 0,57. Die Methode der Darstellung erregt den Verdacht, daß es sich um ein Umwandlungsprodukt des Serumglobulins handelt. S. darüber Spiro<sup>2)</sup> und Hammarsten<sup>3)</sup>.

**338. Percaglobulin** ist in den Rogen (und zwar in dem Saft der Ovarialhöhle, nicht in Darstellung. den Eiern) von Barsch enthalten und von C. Th. Mörner<sup>4)</sup> genau untersucht. Im Rogen vom Meerbarsch wurde es von ihm gefunden<sup>5)</sup>. Man behandelt die aufgeschnittenen frischen Ovarien 10 Minuten lang mit dem etwa gleichen Gewicht  $n/_{10}$ -Kochsalzlösung, kocht, wiederholt die Behandlung mit dem halben Gewicht der Kochsalzlösung und filtriert die vereinigten Kolate. Aus dieser Lösung fällt es durch Verdünnen mit Wasser, besonders bei geringem Zusatz von Säure oder Einleiten von Kohlensäure, durch Dialyse und ferner durch teilweise oder vollständige Sättigung mit gewissen Neutralsalzen.

Es unterscheidet sich von anderen Globulinen durch seinen adstringierenden Geschmack, Eigenschaften. hohen Schwefelgehalt (1,92%), seine Fällbarkeit durch  $3/4\%$  Salzsäure, seine Eigenschaft, gewisse Glucoproteide und Polysaccharide auszufällen und selbst durch sie ausgefällt zu werden.

Es geht leicht, besonders bei längerer Berührung mit Wasser, in eine schwerlösliche Modifikation über, das Percaglobulin, welches auch in bezug auf Fällbarkeit von der nativen Substanz abweicht.

**339. Ovoglobulin.** Zu seiner Darstellung versetzt man Hühnereiweiß mit dem gleichen Volum gesättigter Ammonsulfatlösung und reinigt den entstandenen Niederschlag durch wiederholtes Lösen in verdünnter Kochsalzlösung (wobei sich ein Teil als unlöslich erweist) und Ausfällen mit Ammonsulfatlösung. Es scheidet sich auch durch Sättigung der Eiweißlösung mit Magnesiumsulfat aus. Bei der hydrolytischen Spaltung wurde ungefähr 11% Glucosamin gewonnen (Langstein<sup>6)</sup>).

Eichholz<sup>7)</sup>, Osborne und Campbell<sup>8)</sup> nennen das Globulin, welches sie durch Verdünnen des Eiweiß mit Wasser bzw. durch Halbsättigung mit Ammonsulfat und Dialyse des Niederschlages erhielten, Ovomucin. Die von Langstein und von Osborne und Campbell erhaltenen Substanzen zeigten nicht dieselbe Zusammensetzung. Ob das Ovoglobulin eine einheitliche Substanz bildet, ist noch unentschieden. S. besonders die Arbeit von Langstein.

Über ein Globulinalgemenge aus den Eiern von *Squalus acanthias* s. Alsberg und Clark<sup>9)</sup>. **Lactoglobulin**, s. darüber die Arbeiten von Sebelien<sup>10)</sup>, Tiemann<sup>11)</sup>, Morochowetz<sup>12)</sup>. Osborne und Wakeman<sup>13)</sup> stellten es aus der durch Sättigen mit Magnesiumsulfat erhaltenen (s. S. 458) Fällung dar. Es war frei von Albumin, enthielt einen Teil des Phosphors in Form von Phosphatiden. C 51,88, H 6,96, N 15,44, S 0,86, P 0,24%. In einem Liter Milch sind 0,5—0,7 g vorhanden. Es ist noch unentschieden, ob es von dem Serumglobulin verschieden ist.

Stickstoffverteilung nach van Slyke: 7,57%  $\text{NH}_3$ -N, 2,16% Melanin-N, 25,23% Basen-N, 1,90% Cystin-N, 10,79% Arginin-N, 3,96% Histidin-N, 8,58% Lysin-N, 64,10% nichtbasischer N, darunter 1,13% Nichtamino-N (Crowther und Raistrick<sup>14)</sup>).

**340. Krystallisierendes Globulin aus Harn** wurde ein einziges Mal aus dem Harn eines Kranken von Noël-Paton<sup>15)</sup> gewonnen. Der Harn schied, manchmal schon nach 1—2 Tagen, ein reichliches krystallinisches Sediment (lange, schmale Tafeln mit zweiflächiger stumpfwinkliger Zuspitzung) ab, unlöslich in Wasser, gesättigter Kochsalz- und Magnesiumsulfatlösung, halbgesättigter Ammonsulfatlösung, löslich in verdünnten Neutralsalzlösungen, Säuren, Alkalien. Zusammensetzung: C 51,89, H 6,88, N 16,06, S 1,24%. Die Lösungen in Neutralsalz koagulieren

<sup>1)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 5, S. 323. 1908.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 28, S. 174. 1899.

<sup>3)</sup> Ergebn. d. Physiol. Bd. 1, S. 337. 1902.

<sup>4)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 40, S. 429. 1903/04.

<sup>5)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 58, S. 452. 1908/09.

<sup>6)</sup> Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 1, S. 83. 1902.

<sup>7)</sup> Journ. of physiol. Bd. 23, S. 163. 1898.

<sup>8)</sup> Journ. of the Americ. chem. soc. Bd. 22, S. 422. 1900 oder 23. Report of the Connecticut Agric. Exp. Station 1900, S. 348.

<sup>9)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 5, S. 243. 1908.

<sup>10)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 9, S. 446. 1885. <sup>11)</sup> desgl. Bd. 25, S. 363. 1898.

<sup>12)</sup> Le Physiol. Russe Bd. 9, S. 48. 1906; zit. nach Biol. Zentralbl. Bd. 6, S. 409. 1907.

<sup>13)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 33, S. 11. 1918. <sup>14)</sup> Biochem. Journ. Bd. 10, S. 434. 1916.

<sup>15)</sup> Reports of the Lab. of the Roy. coll. of Physic, Edinburgh Bd. 4, S. 47. 1892. — Huppert: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 22, S. 500. 1897. Zentralbl. f. d. med. Wiss. 1898, S. 481.

bei 56—59°. Durch verdünnte Salzsäure wurde es langsam in der Kälte, schnell in der Wärme in Acidalbumin umgewandelt. Seine Lösungen konnten durch Blut nicht zur Gerinnung gebracht werden.

**341. Globuline der Krystalllinse** wurden von C. Th. Mörner<sup>1)</sup> und Jeß<sup>2)</sup> genauer untersucht und unterscheiden sich von den anderen Globulinen dadurch, daß sie aus ihren Lösungen durch Wasser nicht gefällt werden können; sie werden auch nicht durch Kochsalz gefällt, aber durch Sättigung mit Magnesiumsulfat und Natriumsulfat bei 30° und durch das 1½fache Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung völlig ausgeschieden.

**α-Krystallin.** α-Krystallin fällt aus dem filtrierten Wasserauszug der Linsen durch Zusatz von Essigsäure bis zu einem Gehalt von 0,03% aus und kann durch wiederholtes Lösen in ganz verdünntem Ammoniak und Fällen mit Essigsäure gereinigt werden. Es ist aus wässriger salzfreier oder salzärmer Lösung durch Kohlensäure und vorsichtigen Zusatz von Essigsäure fällbar, hat die Zusammensetzung C 52,83, H 6,94, N 16,68, S 0,56% und koaguliert bei etwa 72°.  $[\alpha]_D = -46,9^\circ$  (annähernd). Nitroprussidreaktion schwach positiv.

**β-Krystallin.** β-Krystallin wird dargestellt, indem man den filtrierten wässrigen Auszug des inneren Viertels der Linsen vorsichtig mit verdünnter Essigsäure ausfällt, das neutralisierte Filtrat mit Magnesiumsulfat sättigt und die dialysierte Lösung des Niederschlags mit Alkohol fällt. Es ist aus seiner salzfreien Lösung nur unvollkommen durch Kohlensäure und Essigsäure fällbar, enthält 17,4% N und 1,27% S und koaguliert bei 63°.  $[\alpha]_D = -43,2^\circ$ . Nitroprussidreaktion stark positiv.

Über die bei der Hydrolyse entstehenden Spaltungsprodukte s. § 500.

**Darstellung.** **342. Thyreoglobulin.** Das jodhaltige Globulin der Schilddrüse erhält man nach Oswald<sup>3)</sup> als schneeweiße Masse, indem man den Wasserauszug der fein zerkleinerten Drüsensubstanz mit dem gleichen Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt, den mit halbgesättigter Ammonsulfatlösung gewaschenen Niederschlag in Wasser löst, klar filtriert, Fällung und Lösung wiederholt und nun entweder direkt mit Essigsäure fällt und den Niederschlag auf dem Filter mit schwach angesäuertem Wasser salzfrei wäscht oder dialysiert und mit Alkohol fällt.

**Zusammensetzung und Eigenschaften.**

Die aus den Schilddrüsen und Kröpfen (soweit sie kolloidhaltig sind) verschiedener Tiere und des Menschen erhaltenen Präparate stehen einander in Eigenschaften und Zusammensetzung nahe, enthalten aber verschiedene Jodmengen. Auch Präparate, die von verschiedenen Individuen derselben Spezies gewonnen wurden, zeigten Unterschiede im Jodgehalt. Das Thyreoglobulin aus Schweinedrüsen C 52,21, H 6,83, N 16,59, J 0,46, S 1,86%. Die aus Züricher Kälbern gewonnenen Präparate waren jodfrei; ebenso auch die aus kolloidfreien rein parenchymatösen Kröpfen erhaltenen. In 10% Magnesiumsulfat enthaltender Lösung koagulieren die Präparate aus Schweinedrüsen bei 65—66°, die aus Hammel-, Ochsen-, Kalbsdrüsen bei 67°. Durch Sättigen der Lösungen mit Kochsalz tritt nur Trübung ein, durch Sättigung mit Magnesiumsulfat oder Halbsättigung mit Ammoniumsulfat Ausfällung. Durch verdünnte Essig- oder Salzsäure wird es aus seinen salzhaltigen Lösungen gefällt. Der Niederschlag löst sich im Überschuß des Fällungsmittels. Das Jod ist in fester Bindung, erst nach dem Veraschen mit Natron und Salpeter nachweisbar (§ 57); beim

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 18, S. 61. 1894.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 110, S. 269. 1920 u. Bd. 122, S. 160. 1922.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 27, S. 14. 1899 u. Bd. 32, S. 121. 1901. Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 2, S. 545. 1902. Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. Bd. 169, S. 444. 1902. Zusammenfassendes Referat Biol. Zentralbl. Bd. 1, S. 249. 1903.



Kochen mit konzentrierter Salzsäure tritt der größte Teil des Jods aus der organischen Bindung heraus. Nach dem Kochen mit verdünnter Säure reduziert die Flüssigkeit Fehlingsche Lösung, außerdem entsteht Jodothyryn (Thyreojodin), ein Körper, den zuerst Baumann<sup>1)</sup> aus der mit Säure gekochten Schilddrüse gewonnen hat. Es stellt ein bräunliches, nicht einheitliches, in Wasser unlösliches, in Alkalien lösliches Pulver mit wechselndem Jodgehalt (bis über 14%) dar. Thyroxin (§ 224) ist von Kendall<sup>2)</sup> aus der ganzen Drüse, nicht aus dem reinen Thyreoglobulin durch alkalische Hydrolyse erhalten worden.

**343. Eiweißkörper von Bence Jones.** In sehr seltenen Fällen (es handelte sich stets um Vorkommen. Kranke mit Knochenmarksveränderungen) tritt im Harn ein zuerst von Bence Jones<sup>3)</sup> beobachteter Eiweißkörper auf, der dem Harn die Eigenschaft verleiht, beim Erwärmen auf 40–60° oder höher eine Fällung zu geben, die bei höherer Temperatur eine völlige oder mehr weniger völlige Lösung erfährt, beim Erkalten wieder erscheint. Mit Hilfe des Anaphylaxieversuchs läßt sich in solchen Fällen der Eiweißkörper auch im Blut feststellen (Abderhalden<sup>4)</sup>). Die Angaben über die in den einzelnen Fällen isolierten Stoffe weichen nicht unerheblich voneinander ab, vielleicht weil sich die Ausscheidung dieses Eiweißkörpers zu einer anderen Albuminurie hinzuaddiert hat. Die Eigenschaften stimmen in manchen Punkten mit denen der Albumosen überein, doch scheinen sie den genuinen Eiweißkörpern zuzugehören.

Die Isolierung aus dem Harn erfolgt durch Versetzen mit dem doppelten Volumen gesättigter Ammoniumsulfatlösung oder mit dem doppelten Volumen Alkohol. Kochsalz, das durch Dialyse leichter zu entfernen ist, ist nur manchmal zur Fällung brauchbar. Krystallisiert wurde er von Grutterink und de Graaff erhalten, einmal gelegentlich auch von Magnus-Levy und Wilson

C	H	N	S
52,42	6,83	15,66	1,46 % (Grutterink und de Graaff),
51,68	6,81	16,21	1,18 % (Hopkins).

Der durch Alkohol ausgefällte Körper löst sich, wenigstens wenn die Einwirkung des Alkohols nur kurz dauerte, mehr oder weniger leicht wieder in Wasser. Die wässrige Lösung des Ammoniumsulfatniederschlags läßt sich durch Dialyse salzfrei machen, ohne daß eine Ausscheidung erfolgt. Beim Erwärmen auf 50–60° beginnt die Abscheidung (in manchen Fällen erfolgte sie in einer salzfreien Lösung nicht), wobei die Gegenwart von Ca, Sr, Ba, Mg oder Al die Koagulation begünstigen, bei höherer Temperatur und bei Gegenwart von viel Salz findet wieder Lösung statt. Dabei wirkt  $Sr = Mg = Ba < Ca, Al$ . Magnus-Levy konnte in seinem Falle durch Zusatz von Salmiak die Wiederlösung bei 100° begünstigen. Auch Malengreau sah eine sehr günstige Beeinflussung der Wiederauflösung durch sehr geringe Mengen von Alkalisalz. Zusatz von Harnstoff kann das Auftreten des Niederschlags beim Erwärmen ganz verhindern. Das in der Wärme entstandene Koagulum löste sich in manchen Fällen in Wasser, in anderen nicht, aber in Sodalösung. Salpetersäure gibt einen Niederschlag, der in manchen Fällen im Überschuß löslich war, in anderen nicht, beim Erwärmen sich in den einzelnen Fällen mehr oder weniger vollständig löste. Gerbsäure, Pikrinsäure, Metallsalze, Essigsäure + Ferrocyankalium geben Fällungen; alle Farbenreaktionen der Eiweißstoffe (§ 325, B) sind positiv. Bei Zusatz von Lauge oder Säure und darauffolgender Neutralisation entstand in den meisten Fällen Niederschlag (Neutralisationspräcipitat). In den meisten Fällen war der Körper der Dialyse unzugänglich. Wilson sah ihn spontan bei ganz schwach essigsaurer Reaktion krystallisieren; Gegenwart von Salz störte. Vom Gesamtstickstoff gehören dem freien Aminostickstoff 4,86% an, was gegen Albumosencharakter spricht. Bei der Verdauung mit Pepsin-Salzsäure entstehen Deuteroalbumosen und Pepton, Magnus-Levy und Grutterink und de Graaff erhielten auch Protalbumose.

Über die Produkte der hydrolytischen Spaltung s. die Tabelle § 500. Bei der hydrolytischen Spaltung eines krystallisierten Präparates wurden von Grutterink und de Graaff 25,10% des

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 21, S. 319 u. 481. 1896; Bd. 22, S. 1. 1897. — Roos: desgl. Bd. 25, S. 1. 1898.

<sup>2)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 40, S. 265. 1919.

<sup>3)</sup> Philosoph. Transact. Bd. 1, S. 55. 1848. Weitere Untersuchungen rühren von Magnus-Levy: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 30, S. 200. 1900 (hier Literatur); Grutterink u. de Graaff: desgl. Bd. 34, S. 393. 1902 u. Bd. 46, S. 472. 1905; Abderhalden u. Rostoski: desgl. Bd. 46, S. 125. 1905; Hopkins u. Savory: Journ. of physiol. Bd. 42, S. 189. 1911; Malengreau: Arch. internat. de physiol. Bd. 18, S. 151. 1921; Lüscher: Biochem. Journ. Bd. 16, S. 556. 1922; Wilson: Journ. of biol. chem. Bd. 56, S. 203. 1923 her.

<sup>4)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 106, S. 130. 1919.

Gesamtstickstoffs als Basenstickstoff (3,99% im Ammoniak, 3,26% im Histidin, 9,80% im Arginin, 8,05% im Lysin) erhalten.

Stickstoffverteilung nach van Slyke:  $\text{NH}_3\text{-N}$  9,43, Melanin-N 0,90, Basen-N 23,11, darin Cystin-N 1,25, Arginin-N 9,27, Histidin-N 4,54, Lysin-N 8,04%. Mit Phosphorwolframsäure nicht fällbar 66,84%, davon Nichtamino-N 5,15, Tryptophan-N (colorimetrisch) 2,44% (Lüscher).

### *Koagulierte Eiweißstoffe.*

- Darstellung.** 344. **Fibrin.** Es entsteht aus Fibrinogen (§ 335) bei der Gerinnung des aus der Ader gelassenen Blutes, bei der Gerinnung von Lymphe, Transsudaten, von reiner Fibrinogenlösung nach Zusatz von Fibrinferment als Gallerte, die sich allmählich zusammenzieht und beim Schlagen faserig und elastisch wie Kautschuk wird. Frei von eingeschlossenen Blutkörperchen erhält man es aus filtriertem Pferdeblutplasma und Transsudaten. Mit sehr verdünnter Chlornatriumlösung läßt es sich gut auswaschen. Zur Reinigung behandelt man es dann weiter mit Wasser, Alkohol, Äther.
- Zusammensetzung und Eigenschaften.** Seine Zusammensetzung ist in guter Übereinstimmung mit zahlreichen älteren Analysen von Hammarsten<sup>1)</sup> gefunden zu C 52,68, H 6,83, N 16,91, S 1,10, O 22,48%. Das nichterhitzte und nicht mit Alkohol behandelte Fibrin löst sich langsam unter Quellung in nicht zu verdünnten und nicht zu konzentrierten wässerigen Lösungen neutraler Salze wie Kalium- oder Natriumnitrat, Chlornatrium, Bromkalium, Jodkalium, chloresurem Kali. In verdünnter Salzsäure ebenso in Essigsäure oder Alkalilauge quillt frisches Fibrin hoch auf und löst sich sehr langsam; in sehr verdünnter Salzsäure löst es sich zunächst fast gar nicht. In abnehmender Stärke wirken auf Fibrin ebenso wie auf Gelatine quellend starke Salzsäure, Oxalsäure, Ameisensäure, Essigsäure, Chloressigsäure, Phosphorsäure, Milchsäure, Weinsäure, wesentlich schwächer Schwefelsäure, Salpetersäure und sehr gering i-Buttersäure und i-Valeriansäure<sup>2)</sup>. Es gibt die in § 325 B beschriebenen Farbenreaktionen. Durch Einwirkung von Alkohol wird es koaguliert, noch schneller durch Erhitzen auf 75°. Koaguliertes Fibrin ist weniger durchscheinend weiß und weniger dehnbar als frisches; bei der Pepsin- oder Trypsinverdauung und bei der Fäulnis geht es langsamer in Lösung, ohne daß sich die Bildung von Globulinen (wie das bei frischem Fibrin der Fall ist) nachweisen läßt (Hasebroek<sup>3)</sup>.
- Fibrin aus Rinder-, Schaf- und Schweineblut zeigte in der Stickstoffverteilung nach van Slyke keine Unterschiede (Gortner und Wuertz<sup>4)</sup>.
- Darstellung.** 345. **Andere koagulierte Eiweißstoffe** entstehen aus Albuminen, Globulinen, Fibrin durch Erhitzen bei Anwesenheit von Wasser oder durch längere Einwirkung von Alkohol in neutraler Lösung, ferner durch anhaltendes Schütteln der wässerigen Lösungen.
- Eigenschaften.** Sie sind sämtlich in kaltem und heißem Wasser, in verdünnter Salzlösung, in Alkohol, in Äther unlöslich, lösen sich schwer in verdünnten Alkalien, auch in Ammoniak, in verdünnter Salzsäure oder Essigsäure. Mit der Änderung der physikalischen Beschaffenheit ist auch eine Änderung der chemischen Eigenschaften verknüpft. Sie geben die in § 325 B beschriebenen Farbenreaktionen. Ovalbumin gibt die Nitroprussidreaktion (S. 450, 14) in rohem Zustande nicht, auch nicht wenn das Protein ausgesalzen oder durch Alkohol ausgefällt worden ist. Erst wenn es durch Kochen koaguliert oder in Lösung längere Zeit der Einwirkung von Lauge oder Säure bei 40° ausgesetzt gewesen ist, also in den ersten

<sup>1)</sup> Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 22, S. 431. 1880.

<sup>2)</sup> Somogyi: Biochem. Zeitschr. Bd. 120, S. 103. 1921.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 11, S. 348. 1887.

<sup>4)</sup> Journ. of the Americ chem. soc. Bd. 39, S. 2239. 1917.

Stadien zur Umwandlung in Metaprotein (§ 392 und 393) sich befindet und denaturiert ist, fällt die Nitroprussidreaktion positiv aus (Harris<sup>1</sup>).

Durch starke Mineralsäuren werden die koagulierten Eiweißstoffe in Acidalbumine (§ 392) und durch konzentrierte Alkalilaugen in Alkalialbuminate (§ 393) übergeführt.

#### **Prolamine.**

346. Einfache pflanzliche Proteine, unlöslich in Wasser, löslich in 60—80 proz. Alkohol, reich an Dicarbonsäuren, mäßiger Gehalt an Hexonbasen, arm an Lysin. Sie kommen reichlich in den Samen der Gramineen vor. Im Tierreiche ist von Osborne und Wakeman<sup>2</sup>) ein Eiweiß von ähnlichen Lösungsverhältnissen als Begleiter des Caseins aufgefunden worden. Seine Zusammensetzung ähnelt zwar mehr letzterem, es ist aber mit ihm nach dem Ergebnis von Anaphylaxieversuchen sicher nicht nahe verwandt.

Casein wird aus Zentrifugmilch mit Salzsäure abgeschieden und mehrfach umgefällt. Der abgepreßte, noch feuchte Niederschlag wird in 92 proz. Alkohol zerteilt, die Filtrate im Vakuum eingengt, die schmierige Fällung erneut in Alkohol eingetragen und schließlich aus einer 70 proz. Alkohol enthaltenden Lösung mit absolutem Alkohol gefällt. C 54,91, H 7,17, N 15,71, S 0,95, P 0,08 %. 1 g bindet in wässriger Lösung 2,5 ccm  $\frac{1}{10}$ -Alkali bis zur Neutralisation gegen Phenolphthalein. Millon-, Tryptophan- und Biuretreaktion stark positiv. 100 g enthalten Arginin 2,92, Histidin 2,28, Lysin 3,98, Tyrosin 2,47 g.

#### **Histone.**

347. Die Histone finden sich im Körper in Verbindung mit sauren Atomkomplexen (Nucleinsäure, Nuclein). Die Aufstellung dieser Gruppe rührt von Kossel<sup>3</sup>) her, welcher das erste Histon aus den roten Blutkörperchen der Gans isolierte. Weitere Histone wurden aus Nucleohiston und verschiedenen Fischspermen gewonnen. Die Testikel aller Fische scheinen im unreifen Zustande ein Histon zu enthalten, dasselbe geht bei einigen beim Reifwerden in Protamin über, bei anderen bleibt es erhalten.

Über die Darstellung, welche auf der Löslichkeit der Histone in verdünnter Salzsäure beruht, s. die einzelnen Histone.

Die Histone sind stickstoffreicher als die Eiweißstoffe (die am besten bekannten enthalten 18—18,6%) und zeigen basischen Charakter; sie nehmen eine Zwischenstellung zwischen den Eiweißstoffen und den stark basischen Protaminen ein. In ihren Reaktionen stimmen sie zum Teil mit den Eiweißstoffen, zum Teil mit den Protaminen, zum Teil mit den Albumosen überein. Charakteristisch für die typischen Histone (d. h. die aus roten Blutkörperchen, Nucleohiston und Gadus) sind folgende Reaktionen. Eine salzfreie neutrale Lösung wird gefällt:

1. Durch Zusatz von Ammoniak (Kossel).
2. Durch Zusatz von Alkalien und alkalischen Erden. Überschuß von Alkalien wirkt lösend (Kossel).
3. Durch Salpetersäure. Der Niederschlag verschwindet beim Erwärmen, um beim Erkalten wiederzukommen (Kossel).
4. Durch Alkaloidreagenzien (phosphorwolframsaures Natron, pikrinsaures Natron, Ferrocyanalkalium) außer bei saurer auch bei neutraler Reaktion (Bang).
5. Durch Eiweißlösungen (Bang) und Lösungen primärer Albumosen.
6. Sie wird beim Kochen nicht koaguliert, aber wohl nach Zusatz von etwas Salz. Der Niederschlag ist in Salzsäure leicht löslich (Kossel, Bang).

Durch Pepsinsalzsäure entstehen aus ihnen peptonartige Körper, darunter das Histopecton (§ 354), bei der Säurespaltung liefern sie verhältnismäßig viel Diaminosäuren (bis zu 40% basischen Stickstoff). Melanin tritt bei der Spaltung

Spaltung durch Pepsin. Hydrolyse.

<sup>1</sup>) Proc. of the roy. soc. of London (B) Bd. 94, S. 426. 1923.

<sup>2</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 33, S. 17. 1917 u. Bd. 33, S. 243. 1918.

<sup>3</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 8, S. 511. 1884. — Bang: desgl. Bd. 27, S. 463. 1899.

gar nicht oder in nur sehr geringer Menge auf. Vom Stickstoff läßt sich ein Teil des formoltitrierbaren Stickstoffs durch Dimethylsulfat völlig methylieren (Edlbacher<sup>1</sup>).

**Darstellung.** 348. **Histon aus den roten Blutkörperchen der Vögel** wurde von Kossel erhalten durch Behandlung von Blutkörperchenbrei (Gans) mit Wasser unter Zusatz von Äther, Filtrieren und Behandlung des mit Wasser gewaschenen Rückstandes mit verdünnter Salzsäure. Aus der abfiltrierten salzsauren Lösung fällt man das Histon durch Eintragen von Kochsalz, schwemmt es in Wasser auf und dialysiert. Dabei geht das Histon in Lösung.

**Eigenschaften.** Der durch Ammoniak hervorgerufene Niederschlag (C 52,31, H 7,09, N 18,46%, Schwefel nicht bestimmt) ist nach Kossel ganz unlöslich und verhält sich wie ein koagulierter Eiweißstoff; nach Bang löst er sich in überschüssigem Ammoniak und wird aus der Lösung durch Ammoniaksalz wieder abgeschieden. Die Histonlösung wird außerdem gefällt durch mehr oder weniger vollständige Sättigung mit Ammonsulfat, Magnesiumsulfat, Kochsalz, Natriumcarbonat, durch Alkohol (der Niederschlag C 50,67, H 6,99, N 17,93, S 0,5% ist in Wasser leicht löslich); nicht gefällt durch Chlorcalcium, Sublimat, neutrales und basisches Bleiacetat, Natriumphosphat. Sie gibt die Biuret-, die Xanthoproteinprobe, schwache Millonsche Probe.

**Hydrolyse.** Bei der Spaltung mit Barytwasser wurde Leucin und Tyrosin erhalten.

**Darstellung.** 349. **Histon aus Nucleohiston** wird als Niederschlag erhalten, wenn man Nucleohiston (§ 438) mit 0,8proz. Salzsäure behandelt und das Filtrat mit Ammoniak versetzt (Lilienfeld<sup>2</sup>).

Histon aus Kalbsthymus nach Felix<sup>3</sup>). Die frischen, freipräparierten und zerkleinerten Organe werden mit der 2<sup>1</sup>/<sub>2</sub>fachen Menge Wasser solange geschüttelt, bis ein gleichmäßiger gallertiger Brei entstanden ist, der dann unter Toluol 24 Stunden im Eisschranke stehen bleibt. Hierauf wird kolliert, das trübe Filtrat mit Essigsäure angesäuert und das Nucleohiston abfiltriert. Der Kolierrückstand wird noch 2mal auf die gleiche Weise behandelt. Aus dem Nucleohiston wird das Histon mit verdünnter Schwefelsäure (auf 1000 ccm Wasser 1 ccm konzentrierte Schwefelsäure) auf der Schüttelmaschine extrahiert. Die Extraktion wird so oft wiederholt, bis der Auszug mit Ammoniak keinen Niederschlag mehr gibt. Die vereinigten Auszüge werden mit Ammonsulfat gesättigt. Das ausgesalzene Histon wird im Pergamentbeutel bis zur Salzfreiheit dialysiert. Dabei löst es sich, die Lösung wird, wenn nötig, filtriert. Die opaleszierende Flüssigkeit wird mit dem 3fachen Volumen Alkohol versetzt und das auf einem Filter gesammelte Histonsulfat solange umgefällt, bis es rein weiß wird. Schließlich wird mit Alkohol und Äther getrocknet. Ausbeute aus 1 kg frischem Organ 12 g.

**Eigenschaften.** Die Zusammensetzung fand Fleroff<sup>4</sup>) zu C 52,37, H 7,70, N 18,35, S 0,62%. Bang<sup>5</sup>) berechnet als Mittel der Analyse mehrerer Autoren C 52,35, H 7,50, N 18,10, S 0,62%. Es stimmt in seinem Verhalten mit dem im vorigen Paragraph beschriebenen überein. Der durch Ammoniak in der salzfreien Lösung erhaltene Niederschlag löst sich im Überschuß, auf Zusatz von Ammoniaksalz tritt er wieder auf. Huiskam<sup>6</sup>) fand indessen umgekehrt, daß die Gegenwart von Salmiak die Fällung durch

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 108, S. 287. 1919.

<sup>2</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 18, S. 473. 1894. — Bang: desgl. Bd. 27, S. 463. 1899. Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 4, S. 331. 1904.

<sup>3</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 119, S. 67. 1922. <sup>4</sup>) desgl. Bd. 28, S. 307. 1899.

<sup>5</sup>) Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 4, S. 331. 1904.

<sup>6</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 32, S. 149. 1901; Bd. 34, S. 32. 1901; Bd. 39, S. 55. 1903.

Ammoniak hindert. Das saure Chlorid ist in Wasser und 70 proz. Alkohol leicht löslich und nur durch Alkoholäther fällbar. Das Sulfat ist in Wasser leicht löslich, in 70 proz. Alkohol unlöslich; das Phosphat ist in Wasser weniger leicht löslich (Bang). Biuret-, Xanthoprotein- und Millonsche Reaktion positiv, Adamkiewicz- und Schwefelbleiprobe negativ oder sehr schwach, Molischsche Probe negativ.

Über die hydrolytischen Spaltungsprodukte s. die Tabelle § 500. Vom Hydrolyse. Gesamtstickstoff kommen auf Histidin 1,8, auf Arginin 25,2, auf Lysin 8,3 auf Ammoniak 7,5% (Kossel und Kutscher<sup>1</sup>). Durch Erepsin wird es langsam gespalten (Cohnheim<sup>2</sup>).

**350. Gadushiston** wurde von Kossel und Kutscher<sup>1</sup>) dargestellt durch Darstellung. Extrahieren der mit Alkohol und Äther behandelten und getrockneten reifen Spermatozoen von Kabeljau mit verdünnter Salzsäure, Sättigen der filtrierten Flüssigkeit mit Kochsalz, Dialysieren des mit Wasser angeriebenen Niederschlags und Fällen der im Dialysierschlauch entstandenen Lösung durch Ammoniak.

Es enthält 18,65% N, zeigt im allgemeinen die Histonreaktionen (§ 347). Eigenschaften. Genauere Angaben liegen nicht vor.

Über die hydrolytischen Spaltungsprodukte s. die Tabelle § 500. Vom Hydrolyse. Gesamtstickstoff kommen 3,3% auf Ammoniak, 26,9% auf Arginin, 8,5% auf Lysin und 3,3% auf Histidin (Kossel und Kutscher).

**351. Lotahiston**, von Ehrström<sup>3</sup>) aus dem reifen Sperma von *Lota vulgaris* dargestellt, enthält 16,46% N. Es zeigt die in § 347 unter 1, 2, 4 und 5 aufgeführten Eigenschaften. Reaktionen; der durch Ammoniak hervorgerufene Niederschlag ist im Überschuß löslich und erscheint auf Zusatz von Salmiak wieder. Ammonsulfat und Kochsalz wirken fällend, ebenso basisches Bleiacetat, nicht fällend: Kupfersulfat, Quecksilbernitrat, Eisenchlorid und Bleizucker. Es unterscheidet sich darin von den anderen, daß der durch Kochen der neutralen salzhaltigen Lösung entstehende Niederschlag in Säuren unlöslich ist, und daß Salpetersäure keinen Niederschlag hervorruft. Seine mit Schwefelsäure hergestellte Lösung wird durch Alkohol gefällt, die mit Salzsäure hergestellte nicht. Biuret- und Xanthoproteinreaktion positiv, Reaktionen von Millon und Adamkiewicz schwach, Reaktion von Molisch stark.

Über die hydrolytischen Spaltungsprodukte s. die Tabelle § 500. Vom Hydrolyse. Gesamtstickstoff kommen 3,3% auf Ammoniak, 23,4% auf Arginin, 3,7% auf Lysin und 4,1% auf Histidin.

**352. Centrophorushiston** aus den Testikeln von *Centrophorus* von Kossel<sup>4</sup>) dargestellt.

Bei der hydrolytischen Spaltung fällt vom Gesamtstickstoff auf Histidin 4,5%, Arginin 25,4%, Lysin 7,1% und Ammoniak 1,7%.

**353. Scomberhiston** wurde von Bang<sup>5</sup>) durch Extraktion von mit Alkohol Darstellung. ausgekochtem und getrocknetem, unreifem Makrelensperma mit 0,8 proz. Salzsäure, Fällen der salzsauren Lösung mit Natronlauge und Wiederholung des Lösungs- und Fällungsprozesses erhalten.

Die Zusammensetzung ist C 49,86, H 7,23, N 19,79, S 0,79%. Es gibt die Eigenschaften. in § 347 unter 1, 3, 4, 5 und 6 aufgeführten Reaktionen, unterscheidet sich aber darin, daß seine Lösungen etwas mehr Alkali zur Fällung und viel mehr zur Wiederlösung des Niederschlags brauchen, als es bei den anderen Histonen

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 31, S. 165. 1901. <sup>2</sup>) desgl. Bd. 35, S. 140. 1902.

<sup>3</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 32, S. 350. 1901. <sup>4</sup>) desgl. Bd. 49, S. 307. 1906.

<sup>5</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 27, S. 463. 1899.

der Fall ist, und daß sie durch Sublimat gefällt werden. Ammonsulfat und Kochsalz geben Niederschläge. Biuret-, Xanthoprotein- und Schwefelbleiprobe positiv, Millonsche Probe sehr schwach.

**Andere Histone.** Dem Scomberhiston ähnlich verhalten sich aus unreifem Sperma von Hering und Quappe dargestellte Histone (Bang), sowie die von Miescher<sup>1)</sup> aus unreifer Lachsmilch isolierte „Albuminose“.

Histon aus Echinodermen wurde von Kossel und Edlbacher<sup>2)</sup> aus den Testikeln von *Astropekten aurantiacus* als Sulfat gewonnen. Das Sulfat ist ein weißes, in Wasser lösliches Pulver mit 15,83% N und 12,28% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Die Lösung wird durch Ammoniak gefällt, Biuretreaktion und Millonsche Probe positiv, die Naphtholreaktion von Molisch, die Schwefelbleiprobe sowie die Reaktionen auf Tryptophan mit Glyoxylsäure und p-Dimethylaminobenzaldehyd negativ, Diazoreaktion von Pauly positiv, Histidin scheint zu fehlen. Bei der Hydrolyse entsteht Tyrosin, Arginin (10,9%), Lysin (10,8%), Spuren von Ammoniak. Vom Gesamtstickstoff sind 39,2% durch Phosphorwolframsäure fällbar, 3,7% gehen in die „Histidin“-fraktion. Bei der Verdauung mit Pepsinsalzsäure entsteht ein Histopecton.

Histonsulfat aus den Testikeln von *Echinus acutus* und *Strongylocentrotus lividus* verhält sich ebenso, Molischprobe stark positiv.

**Entstehung.** 354. **Histopecton.** Bei der mehrtägigen Verdauung mit Pepsinsalzsäure oder auch durch verdünnte Mineralsäuren bei Wasserbadtemperatur entsteht aus Histonen (aus Thymus, Vogelblutkörperchen, Fischtestikeln gewonnen) neben anderen Produkten ein pepton- oder albumoseartiger Körper, der von Kossel<sup>3)</sup> isoliert und als Histopecton bezeichnet wurde. In dieser Form sind etwa 30% des Histonstickstoffs vorhanden.

**Darstellung.** Zur Darstellung wird das Histon oder auch direkt der Niederschlag, welchen Alkohol in dem mit 1—2proz. Schwefelsäure hergestellten Auszug des zerkleinerten histonhaltigen Organs (Testikel des Kabeljau, Milz, Lymphdrüsen, Darmschleimhaut, Leber, Kalbthymus) hervorruft (Krasnosselsky<sup>4)</sup>, etwa 10 Tage mit Pepsinsalzsäure digeriert, darauf die neutralisierte und filtrierte Flüssigkeit mit Natriumpikrat ausgefällt, der Niederschlag nach dem Auswaschen mit Natriumpikratlösung und Zusatz von Schwefelsäure durch Äther von der Pikrinsäure befreit und aus der schwefelsauren Lösung das Histopecton als Sulfat durch Alkohol gefällt. Zur weiteren Reinigung benutzt man das Silberbarytverfahren. Dasselbe läßt sich auch zur Isolierung verwenden. Wurde die Silberbarytfällung bei verschiedener Wasserstoffionenkonzentration durchgeführt, so konnten keine untereinander verschiedenen Histopectone erhalten werden.

Das Filtrat vom Natriumpikratniederschlag wird nach Entfernung der Pikrinsäure mit Phosphorwolframsäure gefällt und ebenfalls durch das Silberbarytverfahren weiter aufgeteilt, wobei ein zweites, von den obigen verschiedenes Histopecton erhalten wird (Felix).

**Eigenschaften.** Das Sulfat des Histopectons ist ein weißes Pulver. Das aus Thymushiston erhaltene enthält 14,09% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und 17,16% N, das aus Kabeljau-testikeln erhaltene 14,06% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und 16,78% N, das aus Milz erhaltene 13,97% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und 16,87% N\*). Es ist in Wasser leicht löslich. Die wässrige

\*) Zu den Analysen dienten Präparate, die mit der Silberbarytmethode gereinigt worden waren.

<sup>1)</sup> Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 37, S. 151. 1896.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 94, S. 264. 1915.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 49, S. 301. 1906. — Felix: desgl. Bd. 119, S. 66. 1922 u. Bd. 120, S. 94. 1922.

<sup>4)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 49, S. 322. 1906.

Lösung gibt mit Ammoniak keinen Niederschlag, auch nicht mit Ferrocyan-  
kalium oder Kupfersulfat. Das Pikrat ist in heißem Wasser löslich und fällt  
beim Erkalten in öligen Tropfen aus.

· Biuret- und Millonsche Reaktion positiv, Adamkiewicz- und Schwefel-  
bleiprobe negativ.

Bei der hydrolytischen Spaltung des eigentlichen Histopecton fällt Hydrolyse.  
vom Gesamtstickstoff 3,6% auf Histidin, 28,4% auf Arginin, 15,9% auf die  
Lysinfraktion, wovon aber nur 77% formaltitrierbar und als Lysinpikrolonat  
isolierbar sind, 1,2% auf Tyrosin, 27,0% auf die Monaminosäuren. Ammoniak  
und Melaninsubstanzen treten nicht auf. Beim Schmelzen mit Kali entstehen  
nur Spuren von Indol.

Der mit Silberbaryt fällbare Anteil des zweiten Histopecton enthält  
25,5% Arginin-N, 10,7% Histidin-N und nur 5,4% Lysin-N, aber 38,6% Mon-  
aminosäuren-N; die Millonsche Probe ist negativ. In dem mit Silberbaryt nicht  
fällbaren und mit Phosphorwolframsäure wieder zur Darstellung gebrachten An-  
teil fehlt Histidin, die braune Diazoreaktion ist auf reichlich vorhandenes Tyrosin  
zu beziehen. Trotz der Nichtfällbarkeit mit Silberbaryt sind als Argininstick-  
stoff 17% vorhanden, die Guanidogruppe also offenbar zur Bindung benutzt, als  
Lysinstickstoff sind 13,0%, als Monaminosäurenstickstoff 70,0% vorhanden.

#### Globin, Arbacin, Parahiston.

355. **Globin**, der im Hämoglobin (§ 424) neben der Farbstoffgruppe haupt- Darstellung.  
sächlich vorkommende Proteinstoff wird nach Schulz<sup>1)</sup> in folgender Weise  
dargestellt: Eine salzfreie Hämoglobinlösung wird mit sehr wenig stark ver-  
dünnter Salzsäure\*) versetzt, bis eine flockige braune Fällung eben wieder  
gelöst ist,  $\frac{1}{5}$  Vol. 80proz. Alkohol hinzugefügt und mehrmals mit dem halben  
Volumen Äther geschüttelt. Die klare wässrige Lösung scheidet beim Neutrali-  
sieren mit Ammoniak einen flockigen Niederschlag ab, der schnell abgesaugt,  
mit Wasser gewaschen, dann in Wasser unter Zusatz einiger Tropfen verdünnter  
Essigsäure gelöst und dialysiert wird. Aus der so erhaltenen klaren Lösung  
fällt das Globin auf Zusatz von Alkohol aus.

Seine Zusammensetzung ist C 54,97, H 7,20, N 16,89, S 0,42%. Es ist Eigenschaften.  
basenreich, gibt die unter § 347 2—6 aufgeführten Histonreaktionen und  
wurde deshalb von Schulz u. a. den Histonen zugerechnet, unterscheidet sich  
aber von diesen durch sein Verhalten zu Ammoniak. Der in der salzfreien  
neutralen Lösung durch Ammoniak entstehende Niederschlag löst sich außer-  
ordentlich leicht im Überschuß, in dieser ammoniakalischen Lösung ruft Salmiak  
nur dann einen Niederschlag hervor, wenn die Lösung nicht zu viel Ammoniak  
enthält. Salzfreie neutrale Lösung wird schon durch sehr geringen Zusatz von  
Ammonsulfat und Kochsalz, ferner durch Alkohol gefällt, nicht gefällt durch  
Chlorcalcium, neutralisiertes Bleiacetat, Kupfersulfat, Eisenchlorid, Natrium-  
phosphat. Schöne Biuretreaktion, Xanthoproteinprobe, Millonsche und Ada-  
mkiewiczische Probe schwach, Molischsche so gut wie negativ, Schwefelblei-  
probe nur bei Gegenwart von Zink positiv.

Eine 0,98proz. schwach saure wässrige alkoholische Lösung zeigt  $[\alpha]_D = -65,5^\circ$  Optische Eigen-  
schaften.  
(Gamgee und Hill<sup>2)</sup>).

\*) Nach Gamgee und Hill<sup>2)</sup> sind für eine Lösung, welche in 200 ccm 1,84 g Hämoglobin  
enthält, 20 ccm  $\frac{2}{10}$ -Salzsäure nötig, um eine vollständige Trennung des Globins vom Farbstoff  
zu erzielen.

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 24, S. 449. 1898 u. Bd. 25, S. 33. 1898. —  
Bang: desgl. Bd. 27, S. 463. 1899.

<sup>2)</sup> Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 4, S. 6. 1904.

Refraktometrisches Verhalten.	Refraktometerinkrement für 1proz. Lösung in $n_{10}$ -Kalilauge und $n_{10}$ -Salzsäure $0,00169 \pm 0,00005$ (Robertson <sup>1</sup> ).
Hydrolyse.	Über die hydrolytischen Spaltungsprodukte s. die Tabelle § 500, über das bei unvollständiger Hydrolyse entstehende Kyrin s. § 404. Nach Hausmann <sup>2</sup> ) ist von dem Gesamtstickstoff 4,62% Amidstickstoff, 67,08% Monamino- und 29,37% Diaminostickstoff.
Vorkommen.	356. <b>Arbacin</b> wurde von Mathews <sup>3</sup> ) durch Extraktion der reifen, mit heißem Alkohol und Äther erschöpften Spermatozoen von Arbacia (Seeigel) mit 1—2proz. Schwefelsäure und Fällen des Auszuges mit Alkohol als Sulfat erhalten. Das Sulfat enthält 15,9% N. Es gibt die in § 347 unter 4. und 5. aufgeführten Reaktionen, wird aber nicht durch Ammoniak gefällt oder wenigstens nur in konzentrierter Lösung teilweise. Es gibt die Millonsche und Biuretreaktion.
Darstellung.	357. <b>Parahiston</b> nennt Fleroff <sup>4</sup> ) einen neben dem Histon aus der Thymusdrüse darstellbaren, ebenfalls basischen Eiweißstoff, der nicht nur in seinem Verhalten, sondern vor allem darin von den Histonen abweicht, daß er bei der Spaltung nur wenig basische Stoffe <sup>5</sup> ) liefert.
Eigenschaften.	Zu seiner Darstellung wird die zerkleinerte, mit Alkohol und Äther erschöpfte Drüse 48 Stunden mit 2proz. Schwefelsäure ausgezogen, der in dem Auszuge durch die dreifache Menge Alkohol hervorgerufene Niederschlag abfiltriert, in heißem Wasser gelöst und mit Natriumpikrat versetzt, das Pikrat mit 2proz. Schwefelsäure und Äther von der Pikrinsäure befreit und die Lösung mit Alkohol gefällt. Das durch wiederholtes Lösen und Fällen gereinigte Sulfat (ein weißes Pulver) wird in heißem Wasser gelöst, die heiße Lösung mit überschüssigem Ammoniak gefällt (der Niederschlag ist Lilienfelds Histon, s. § 349). Filtrat und Waschwasser werden mit überschüssigem Alkohol gefällt. Die Lösung des Niederschlages in heißem Wasser versetzt man zunächst mit wenig Alkohol, filtriert von der Trübung ab und schlägt aus dem Filtrat durch Alkohol und Äther das Parahiston nieder.
	Die Zusammensetzung ist C 51,84, H 7,93, N 17,84, S 1,99%. Die wässrige Lösung reagiert alkalisch. Ammoniak fällt weder bei An- noch bei Abwesenheit von Ammoniaksalzen. Salpetersäure fällt nicht, beim Kochen der wässrigen Lösung entsteht kein Niederschlag. Alkaloidreagenzien fallen es, mit Serumeiweiß gibt es einen Niederschlag, nicht aber mit Ovalbumin und Pepton Witte. Gesättigte Ammonsulfatlösung gibt Fällung, gesättigte Zinksulfat- oder Kochsalzlösung nicht, auch nicht Sättigen mit Kochsalz. Biuretreaktion positiv, Millonsche Reaktion sehr schwach, Adamkiewiczische Reaktion negativ.

#### **Protamine.**

Vorkommen.	358. Die Protamine sind bisher nur in Verbindung mit Nucleinsäure in den Spermatozoen der Fische aufgefunden worden. Miescher <sup>6</sup> ) hat das erste Protamin aus Lachssperma dargestellt und genauer beschrieben. Die Aufstellung der Gruppe, die Feststellung ihrer Zugehörigkeit zu den Proteinen, ihre Charakterisierung als einfachste Eiweißstoffe usw. rühren von Kossel <sup>7</sup> ) her. Genauer sind bis jetzt die Protamine aus den Spermatozoen von <i>Salmo salar</i> , <i>Clupea harengus</i> , <i>Scomber scomber</i> , <i>Cyclopterus lumpus</i> , <i>Cyprinus carpio</i> , <i>Accipenser sturio</i> , <i>Perca flavescens</i> , <i>Stizostedion vitreum</i> , <i>Esox lucius</i> , <i>Coregonus albus</i> , <i>Salvelinus Namaycush</i> , <i>Pelamys sarda</i> , <i>Xiphias gladius</i> , <i>Crenilabrus pavo</i> untersucht worden. Außerdem liegen noch Angaben über basische Stoffe aus den Spermatozoen von <i>Silurus glanis</i> <sup>8</sup> ), <i>Accipenser stellatus</i> <sup>8</sup> ), <i>Salmo fario</i> <sup>9</sup> ), <i>Coregonus oxyrhynchus</i> <sup>9</sup> ),
------------	--

<sup>1</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 13, S. 460. 1912/13.

<sup>2</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 29, S. 143. 1900. <sup>3</sup>) desgl. Bd. 23, S. 399. 1897.

<sup>4</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 28, S. 307. 1899. — Bang: desgl. Bd. 30, S. 518. 1900. Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 4, S. 336. 1904.

<sup>5</sup>) Kossel u. Kutscher: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 31, S. 212 Fußn. 1901.

<sup>6</sup>) Miescher: Verhandl. d. naturf. Ges. in Basel Bd. 4, Heft 1, S. 153. 1874. Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 7, S. 376. 1874. Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 37, S. 100. 1896. Piccard: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 7, S. 1714. 1874.

<sup>7</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 22, S. 176. 1897; Bd. 25, S. 165. 1898; Bd. 26, S. 588. 1899; Bd. 40, S. 311 u. 565. 1903/04; Bd. 41, S. 407. 1904; Bd. 44, S. 342. 1905; Bd. 49, S. 301. 1906. Zusammenfassende Darstellung Biol. Zentralbl. Bd. 5, S. 1 u. 33. 1906/07.

<sup>8</sup>) Kurajeff: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 32, S. 197. 1901. — Malenück: desgl. Bd. 57, S. 99. 1908. — S. dazu Kossel: desgl. Bd. 69, S. 140. 1910.

<sup>9</sup>) Kossel: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 22, S. 181. 1897.



C. oncorhynchus<sup>1)</sup> vor, über deren Zugehörigkeit zu den Protaminen genauere Untersuchungen entscheiden müssen.

Zur Darstellung der Protaminsulfate<sup>2)</sup> nach Kossel unter Benutzung Darstellung. weiterer Erfahrungen von Schmiedeberg<sup>3)</sup> werden die reifen oder fast reifen Testikel zerhackt, mit Wasser anhaltend geschüttelt und durch ein Tuch geseiht. Die in der milchigen kolierten Flüssigkeit suspendierten morphotischen Elemente ballen sich auf Zusatz einiger Tropfen Essigsäure zusammen, werden abfiltriert, mehrmals mit Alkohol ausgekocht, mit Äther extrahiert und bei Zimmertemperatur getrocknet. Die trockene Masse (etwa 100 g) wird mit einer Lösung von 100 g Kupferchlorid in 1 l Wasser im Bruttofen bei 37° unter öfterem Umschütteln digeriert. Nach 3 Tagen wird die über dem Sperma stehende Flüssigkeit vorsichtig auf eine Nutsche gegossen und abgesaugt, der Rückstand 3 mal mit Wasser aufgeschlemmt, und schließlich auf der Nutsche abfiltriert und so lange gewaschen<sup>4)</sup>, bis das Filtrat mit konzentrierter Natriumpikratlösung keinen merklichen Niederschlag mehr gibt. Die vereinigten Filtrate werden unter Umrühren mit so viel konzentrierter wässriger Natriumpikratlösung versetzt, bis der gelbe Niederschlag des Protaminpikrats sich gut zusammenballt und schnell zu Boden setzt. Es wird abfiltriert, mit wenig Wasser, dem einige Kubikzentimeter der Natriumpikratlösung zugesetzt werden, gewaschen und noch feucht in Aceton unter Erwärmen gelöst, wobei vorsichtig so viel Wasser zugesetzt wird, bis eine klare Lösung entsteht. (Manchmal bleibt die Lösung durch schleimige Aggregate getrübt. Ist ein Abfiltrieren nicht möglich, so verarbeitet man die Lösung wie sie ist. Durch die späteren häufigen Umfällungen des Protaminsulfats wird die Substanz noch genügend gereinigt.) Nach Zusatz des halben Volumens Alkohol wird unter fleißigem Umrühren tropfenweise 20 proz. Schwefelsäure zugefügt, bis kein weiterer Niederschlag mehr entsteht. Ein Überschuß von Schwefelsäure löst wieder und macht die Fällung schmierig. Die über dem sich gut absetzenden leicht schmierigen gelblichen Niederschlag stehende Flüssigkeit wird durch ein Filter gegossen und der Rückstand mit absolutem Alkohol versetzt, wodurch er so körnig und hart wird, daß er sich leicht mit einem unten breitgedrückten Glasstabe zerreiben läßt. Man dekantiert ihn mehrmals mit Alkohol, dann mit Äther, filtriert ab und wäscht mit Äther, bis das Filtrat wasserklar und farblos ist. Das im Exsiccator von Äther befreite Sulfat wird in Wasser gelöst, mit einer salzsauren Pepsinlösung versetzt (auf etwa 10 g Sulfat 250 g Wasser, 0,1 g käufliches Pepsin und 0,5 g HCl) und 24 Stunden bei 37° verdaut. Aus der mit Soda neutralisierten Verdauungsflüssigkeit wird das Protamin als Pikrat mit konzentrierter wässriger Natriumpikratlösung gefällt, durch Lösen des Niederschlags in Aceton und Fällen mit 20 proz. Schwefelsäure in das Sulfat übergeführt, das, wie oben angegeben, durch Waschen mit Alkohol und Äther in feste Form gebracht wird. Durch Lösen in Wasser und Ausfällen mit Alkohol und Äther wird das Protaminsulfat gereinigt, und zwar wird die Umfällung so oft wiederholt, bis der Niederschlag feinkörnig und weiß geworden ist. Nach dem Trocknen soll die weiße Masse leicht zu pulvern sein. Ausbeute etwa 10 g Sulfat aus 100 g trockenem Sperma.

359. Die Protamine sind schwefelfreie, stickstoffreiche (25—30% N) Substanzen stark basischer Natur von hohem Molekulargewicht. Die Allgemeine Eigenschaften. Elementaranalysen haben bisher nur bei dem Salmin zu übereinstimmenden Resultaten geführt. In den übrigen Protaminen liegen möglicherweise Gemische

<sup>1)</sup> Nelson-Gerhardt: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 105, S. 270. 1919.

<sup>2)</sup> Nelson-Gerhardt: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 105, S. 270. 1919.

<sup>3)</sup> Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 43, S. 57. 1900.

<sup>4)</sup> Über die Geschwindigkeit der Extraktion s. Robertson: Journ. of biol. chem. Bd. 14, S. 237. 1913.

vor, deren Trennung noch nicht gelungen ist (s. Goto<sup>1</sup>). Sie zeichnen sich durch einen hohen Gehalt an Diaminosäuren aus. Besonders Arginin ist sehr reichlich, in einigen Protaminen als alleiniger basischer Baustein vertreten (Salmingruppe). Andere enthalten verhältnismäßig wenig Arginin und dafür sehr viel Lysin (Cypriningruppe). Im allgemeinen kommt auf zwei basische Bausteine eine Monamino-säure. Die Protamine lassen sich formoltitrieren und entwickeln Aminostickstoff nach van Slyke. Über die quantitativen Beziehungen zwischen diesen beiden Stickstoffgruppen und dem Gehalt der Protamine an den einzelnen Hexonbasen besteht noch keine Einigkeit<sup>2</sup>).

Die freien Basen. Die freien Basen, deren Eigenschaften bisher wenig untersucht sind, ziehen Kohlensäure an, bläuen Lackmus und lassen sich leicht mit Säuren titrieren. Sie sind in Wasser leicht löslich, in Alkohol und Äther unlöslich. Sie koagulieren nicht beim Kochen, diffundieren nicht, zeigen Linksdrehung und geben die Biuretreaktion. Der positive Ausfall anderer Farbenreaktionen ist bei den einzelnen Protaminen erwähnt.

Sulfate. Die Sulfate, welche von den Salzen am genauesten untersucht sind, bilden im trockenen Zustande weiße Pulver und scheiden sich beim Erkalten ihrer sauer reagierenden, heißen, wässerigen Lösungen besonders auf Zusatz von Äther als Öl ab. Dieses im allgemeinen für die Protamine charakteristische Verhalten zeigen indessen die Cyprinine nicht. Die Chloride sind leichter löslich als die Sulfate, auch die Carbonate und Nitrate sind, soweit untersucht, in Wasser leicht löslich. Die Platindoppelsalze, Silbersalze, Quecksilbersalze sind unlöslich oder schwer löslich. Die Platindoppelsalze erhält man am besten durch Ausfällen einer wasserfreien methylalkoholischen Lösung von Protaminchlorid mit frisch bereiteter, wasserfreier methylalkoholischer Platinchloridlösung. Die Silbersalze werden auch durch überschüssiges Barytwasser nicht zersetzt. Auch mit Basen geben Protamine Verbindungen. Kupferhydroxyd löst sich mit violetter Farbe in einer Protaminlösung.

Chloride, Carbonate, Nitrate.  
Platindoppelsalze u. andere Salze.  
Silbersalze.  
Verbindungen mit Basen.

Die wässerigen Lösungen der Salze werden schon in neutraler, ja schwach alkalischer, leichter noch in saurer Lösung durch phosphorwolframsaures, wolframsaures, pikrinsaures, chromsaures, ferrocyanwasserstoffsäures Alkali gefällt. Auch durch Eintragen von Ammonsulfat oder Kochsalz werden sie aus ihren Lösungen ausgeschieden.

Verhalten: zu Alkaloidreaktionen  
zu Ammonsulfat und Kochsalz

Mit anderen Proteinen und primären Albumosen, nicht aber mit den meisten Deuteroalbumosen, Peptonen und Polypeptiden geben die Protamine in wässriger oder schwach alkalischer Lösung Niederschläge. Eine Zusammenstellung der in dieser Beziehung geprüften Substanzen sowie Beschreibung der dabei entstehenden Verbindungen s. bei Hunter<sup>3</sup>).

zu anderen Proteinen

Aus einer Lösung von nucleinsaurem Natron wird durch die Lösung eines Protaminsalzes nucleinsaures Protamin gefällt.

zu Nucleinsäure.

Durch Pepsinsalzsäure und durch Arginase werden die Protamine, soweit die Untersuchungen reichen, nicht gespalten. Durch Kochen mit Schwefelsäure ebenso durch Trypsin<sup>4</sup>) und Erepsin<sup>5</sup>) werden sie gespalten, und zwar entstehen

Verhalten zu Fermenten u. Hydrolyse.

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 37, S. 94. 1902/03.

<sup>2</sup>) Kossel u. Cameron: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 76, S. 457. 1911/12. — Kossel u. Gawrilow: desgl. Bd. 81, S. 274. 1912. — Felix: desgl. Bd. 110, S. 217. 1920. — Edlbacher: desgl. Bd. 110, S. 153. 1920; Bd. 112, S. 80. 1921. — Engeland: desgl. Bd. 116, S. 226. 1921. — van Slyke u. Birchard: Journ. of biol. chem. Bd. 16, S. 539. 1913/14. — Osborne, van Slyke, Leavenworth u. Brautlecht: desgl. Bd. 22, S. 259. 1915.

<sup>3</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 53, S. 526. 1907.

<sup>4</sup>) Kossel u. Mathews: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 25, S. 190. 1898.

<sup>5</sup>) Cohnheim: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 35, S. 140. 1902. — Kossel u. Dakin: desgl. Bd. 41, S. 323. 1904.

zunächst peptonartige Stoffe, Protone (§ 372) und weiterhin neben einer kleinen Menge von Monamino-säuren hauptsächlich Diamino-säuren. Mehrere enthalten über 80% Diamino-säuren und die meisten hauptsächlich Arginin. Als Spaltungsprodukte hat man bisher isoliert Arginin, Lysin, Histidin, Alanin, Serin, Aminovaleriansäure, Aminocapronsäure, Prolin und Tyrosin, während Ammoniak, Glykokoll, Cystin, Glutaminsäure, Asparaginsäure, Oxyprolin, Phenylalanin nicht nachgewiesen werden konnten. Eigentümlicherweise walten Bausteine mit 5 Kohlenstoffatomen der Menge nach vor. Die erwähnten Spaltungsprodukte sind aber niemals in einem Protamin vereinigt, vielmehr sind in jedem Protamin nur einige, in den einfachsten nur 4 oder 5 enthalten. Aus diesem Grunde werden sie von Kossel als einfachste Proteine bezeichnet. Protaminsulfat aus *Echinus esculentus* zeigte im Osmometer ein Molekulargewicht von 8780 (Moore, Whitley und Webster<sup>1</sup>).

Über nitrierte, acylierte und methylierte Protamine s. S. 515 und 516.

360. **Salmin**, zuerst von Miescher aus Lachssperma gewonnen und als „Protamin“ bezeichnet, wurde von Kossel genauer untersucht und findet sich vielleicht neben Clupein auch im Heringssperma. Ein dem Salmin aus Rheinlachs völlig gleiches Protamin findet sich im Sperma des kalifornischen Lachses<sup>2</sup>). Die Analysen des Platinsalzes ergaben im Mittel C 22,96, H 4,22, N 14,83, Pt 24,73, Cl 26,56% (Goto<sup>3</sup>).

Das Sulfat löst sich zu 1,27% in Wasser bei Zimmertemperatur und zeigt Eigenschaften.  $[\alpha]_D = -81^\circ$ , bezogen auf 1 g Stickstoff  $-273^\circ$ . Das sich beim Erkalten nicht zu verdünnter warmer Lösungen abscheidende farblose Öl hat den Brechungskoeffizienten 1,442. Eine 5proz. saure Lösung des Sulfates wird durch das gleiche Volumen\* gesättigter Kochsalzlösung, eine 2proz. durch  $\frac{3}{4}$  Vol. gesättigter Ammonsulfatlösung ausgefällt. Eine schwer lösliche Kupferoxydulverbindung entsteht, wenn man die Lösung des Sulfates mit Kupfersulfat und Natriumhyposulfit zusammenbringt. Versetzt man eine alkalische Salminlösung mit Benzoylchlorid, so fällt die schwer lösliche Benzoylverbindung aus.

Bei der hydrolytischen Spaltung (s. § 500) entstehen von Diamino-säuren nur Hydrolyse. Arginin, ferner Aminovaleriansäure<sup>4</sup>), Serin<sup>4</sup>) und Prolin<sup>5</sup>), und zwar kommen vom Gesamtstickstoff 89,2% auf Arginin, 3,25% auf Serin, 1,65% auf Aminovaleriansäure und 4,3% auf Prolin (Kossel und Kutscher<sup>6</sup>), Kossel und Dakin<sup>7</sup>). Taylor<sup>8</sup>) fand 91,73% Arginin, 8,70% Serin, 5,35% Aminovaleriansäure, 10,83% Prolin. Diese quantitativen Spaltungsversuche würden ebenso wie die Elementaranalysen von Goto dafür sprechen, daß im Salmin auf je 2 Mol. Arginin je 1 Mol. Monamino-säure kommt; dabei nimmt Taylor an, daß es zusammengesetzt ist aus 12 Mol. Arginin, 3 Mol. Serin, 1 Mol. Valin und 2 Mol. Prolin; Kossel und Dakin<sup>7</sup>) diskutierten eine Zusammensetzung von 12 Mol. Arginin, 2 Mol. Serin, 1 Mol. Valin und 3 Mol. Prolin.

Über die bei unvollständiger Spaltung nachweisbare Zunahme des Alkali-bindungsvermögens s. Nelson<sup>9</sup>), Nelson-Gerhardt<sup>10</sup>).

<sup>1</sup>) Biochem. Journ. Bd. 7, S. 142; Ref. Chem. Zentralbl. 1913, II, S. 1813.

<sup>2</sup>) A. E. Taylor: Journ. of biol. chem. Bd. 5, S. 389. 1908/09.

<sup>3</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 37, S. 94. 1902/03.

<sup>4</sup>) Kossel u. Dakin: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 40, S. 565. 1903/04.

<sup>5</sup>) Kossel: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 40, S. 311. 1903/04.

<sup>6</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 31, S. 181. 1900/01.

<sup>7</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 41, S. 413. 1904.

<sup>8</sup>) Taylor: Journ. of biol. chem. Bd. 5, S. 389. 1908.

<sup>9</sup>) Nelson: Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 59, S. 331. 1908.

<sup>10</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 105, S. 265. 1919.

**Nitrosalmin.** Nitrosalmin<sup>1)</sup> löst sich leichter in Wasser als Nitroclupein, wird durch Alkohol ausgefällt und gibt bei der Hydrolyse Nitroarginin.

361. **Percin** wurde von Kossel<sup>2)</sup> aus *Perca flavescens* über das ölige Sulfat gewonnen. Tryptophan-, Schwefelblei- und Millonsche Reaktion negativ, mit Diazobenzolsulfosäure und Soda roter Niederschlag. Kein formoltitrierbarer Stickstoff vorhanden, die basischen Gruppen gehören dem Arginin an.

**Hydrolyse.** Stickstoffverteilung bei der Hydrolyse mit Schwefelsäure Ammoniak 0%, im Barytniederschlag 1,7%; mit Silberbaryt fällbar 85,5%, davon gefunden (Kjeldahl) als Histidin 5,6%, Arginin 78,1%; Lysin fehlt; Monaminosäurenstickstoff 9,8%. Unter diesen wurde eine Aminovaleriansäure sowie Prolin nachgewiesen.

Ein Protamin fast gleicher Zusammensetzung wurde von Kossel<sup>3)</sup> aus *Stizostedion vitreum* dargestellt. Ausbeute an Protaminsulfat 2,8% des trockenen Spermapulvers. Die Hydrolyse und Stickstoffverteilung ergab Ammoniak 0%, mit Silberbaryt fällbar 85,2%, davon als Histidin 6,7%, als Arginin 76,3% gefunden, Lysin fehlt, Monaminosäurenstickstoff 10,7%.

362. **Esocin** aus Hecht (*Esox lucius*) (Kossel<sup>4)</sup>). Biuretreaktion positiv, Millonsche Reaktion negativ, wird von Pepsin nicht angegriffen.  $[\alpha]_D = -327^\circ$  für 1 g Stickstoff. Vom Stickstoff gehören 86,3% dem Arginin, 4,3% den Monaminosäuren an. Histidin, Lysin und Ammoniak fehlen unter den Spaltungsprodukten.

363. Ein ähnliches Protamin ist **Coregonin** aus *Coregonus albus* (Kossel<sup>5)</sup>, Lynch<sup>6)</sup>). In den reifen Spermatozoenköpfen sind 4 Mol. Nucleinsäure mit 1 Mol. Protamin verbunden. Vom Stickstoff gehören 87,3% dem Arginin, 9,4% den Monaminosäuren an.

364. **Salvelin** wurde von Kossel<sup>7)</sup> neben anderen Proteinen aus dem abgestrichenen Sperma von *Salvelinus Namaycush* erhalten. Vom Stickstoff gehören 88,9% dem Arginin, 7,1% den Monaminosäuren an, es ist frei von Histidin, Lysin, und gibt bei der Hydrolyse kein Ammoniak.  $[\alpha]_D = -10,45^\circ$  für 1 g Stickstoff.

**Zusammensetzung.** 365. **Clupein** wurde von Kossel aus Heringssperma gewonnen. Die Analysen der Salze verschiedener Präparate haben nicht übereinstimmende Resultate gehabt, so daß es sich wahrscheinlich um ein Gemisch einander nahestehender Protamine handelt. Goto<sup>8)</sup> fand für das Platinsalz C 22,81, H 4,30, N 12,59 Pt 24,64, Cl 26,57%.

**Eigenschaften.** Das Sulfat zeigt eine ähnliche Löslichkeit in Wasser und ähnliche spezifische Drehung wie das Salminsulfat (Kurajeff<sup>9)</sup> und verhält sich auch im übrigen wie dieses. Das Chlorid diffundiert, das Sulfat nicht (Goto).

**Hydrolyse.** Bei der hydrolytischen Spaltung entstehen von Diaminosäuren nur Arginin, ferner Alanin<sup>10)</sup>, Serin<sup>11)</sup>, Aminovaleriansäure<sup>12)</sup> und Prolin<sup>10)</sup>, und zwar kommen vom Gesamtstickstoff 88—89% auf Arginin (Pringle<sup>13)</sup>). Bei der Spaltung mit

<sup>1)</sup> Wechsler: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 78, S. 53. 1912.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 88, S. 168. 1913. — Kossel und Edlbacher: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 88, S. 188. 1913.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 88, S. 169. 1913.

<sup>4)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 88, S. 180. 1913. <sup>5)</sup> desgl. Bd. 88, S. 179. 1913.

<sup>6)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 44, S. 326. 1920.

<sup>7)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 88, S. 179. 1913.

<sup>8)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 37, S. 94. 1902/03; Kossel und Dakin: Bd. 41, S. 413. 1904.

<sup>9)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 26, S. 524. 1899.

<sup>10)</sup> Kossel u. Dakin: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 41, S. 414. 1904.

<sup>11)</sup> Kossel u. Dakin: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 40, S. 567. 1903/04.

<sup>12)</sup> Kossel: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 26, S. 590. 1899.

<sup>13)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 49, S. 302. 1906.

Salzsäure entsteht Ammoniak, bei der Spaltung mit Schwefelsäure nicht (Goto<sup>1</sup>). Über Aufspaltung durch Fermente siehe (Rogozinski<sup>2</sup>).

Unter den Spaltungsprodukten des methylierten Clupeins (§ 420) wurde weniger Arginin gefunden (Rogozinski<sup>3</sup>). Bei der Alkalieinwirkung auf Clupein entstehen peptonartige Spaltprodukte, die statt Arginin Ornithin enthalten (Kossel und Weiß<sup>4</sup>).

Nitroclupein s. S. 515.

366. **Scombrin** wurde aus Makrelensperma von Kurajeff<sup>5</sup>) dargestellt. Die Analysen der Salze verschiedener Präparate stimmen nicht miteinander überein. Goto<sup>1</sup>) fand für das Platinsalz C 23,49, H 4,75, N 13,57, Pt 24,09, Cl 25,99%. Das Sulfat verhält sich dem Clupeinsulfat sehr ähnlich.  $[\alpha]_D = -71,81^\circ$  (Kurajeff),  $[\alpha]_D = -72,2^\circ$  (Goto<sup>1</sup>).

Nitroclupein.  
Zusammensetzung  
und Eigen-  
schaften.

Bei der hydrolytischen Spaltung entstehen von Diaminosäuren nur Arginin, ferner Alanin und Prolin<sup>6</sup>), und zwar kommen vom Gesamtstickstoff 88,8% auf Arginin und 3,8% auf Prolin (Kossel<sup>7</sup>).

Hydrolyse.

367. **Thynnin**, aus dem Thunfisch des Mittelmeeres zuerst von Ulpiani<sup>8</sup>) dargestellt und von Kossel<sup>9</sup>), der es von einem schleimigen Begleiter abtrennte, als Protamin weiter charakterisiert. Sulfat ölig.

Biuret-, Millonsche und Paulysche Diazoreaktion positiv, Niederschlag mit Wittepepton bei Gegenwart von Ammoniak. Die Stickstoffverteilung ergab Ammoniak 0%, im Barytniederschlag 7,3, Histidin 0, Arginin 79,5, Lysin 0, Monaminosäuren 11,0%, davon Tyrosin 0,6%. Außerdem wurde unter den Spaltprodukten eine Aminovaleriansäure als  $\beta$ -Naphthalinsulfoverbindung vom Fp. 160° und Prolin als Phenylhydantoin nachgewiesen. Carbonat  $[\alpha]_D^{21} = -24,87^\circ$ .

Aus *Pelamys sarda* wurde ein Protamin, das ebenfalls frei von Histidin war, von Kossel gewonnen; hierher gehört auch das **Xiphiin** aus dem Schwertfisch (*Xiphias gladius*<sup>10</sup>). Vom Stickstoff sind 81,5% als Arginin, der Rest in den Monaminosäuren vorhanden, worunter Tyrosin anwesend ist. Histidin, Lysin und Ammoniak fehlen bei der Hydrolyse vollständig.

368. **Cyprinin** wurde von Kossel und Dakin<sup>11</sup>) aus Karpfensperma isoliert. Bei verschiedenen Darstellungen wurden Protamine von verschiedenem Typus erhalten, welche zunächst als Cyprinin- $\alpha$  und - $\beta$  unterschieden werden, womit aber nicht gesagt sein soll, daß in diesen Körpern chemische Individuen vorliegen.

Cyprinin- $\alpha$ -sulfat stellt ein weißes Pulver dar, welches sich in Wasser langsam zu einer schwer filtrierbaren Flüssigkeit löst. Eine Abscheidung als Öl konnte nicht beobachtet werden. Aus der mit Natriumacetat oder gewissen anderen Salzen gesättigten Lösung wird die Base durch Natronlauge abgeschieden. Cyprinin- $\beta$  gibt die Millonsche Reaktion, Cyprinin- $\alpha$  nur ganz schwach.

Eigenschaften.

Vom Gesamtstickstoff werden 23,6% nach van Slyke abgespalten (Kossel und Cameron<sup>12</sup>).

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 37, S. 94. 1902/03; Kossel u. Dakin: Bd. 41, S. 413. 1904

<sup>2</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 79, S. 398. 1912.

<sup>3</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 80, S. 371. 1912. <sup>4</sup>) desgl. Bd. 60, S. 311. 1909.

<sup>5</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 26, S. 524. 1899.

<sup>6</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 44, S. 345. 1905. <sup>7</sup>) desgl. Bd. 49, S. 310. 1906.

<sup>8</sup>) Gaz. chim. ital. Bd. 32, II, S. 215; ref. Chem. Zentralbl. 1902, II, S. 1515. — Dezani: Giorn. Acad. Medic. Turin Bd. 71, S. 114. 1908; ref. Chem. Zentralbl. 1909, I, S. 34.

<sup>9</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 88, S. 172. 1913. — Kossel u. Edlbacher: desgl. Bd. 88, S. 186. 1913.

<sup>10</sup>) Kossel: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 88, S. 175 u. 176. 1913.

<sup>11</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 40, S. 567. 1903/04.

<sup>12</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 76, S. 463. 1911/12.

Hydrolyse. Bei der hydrolytischen Spaltung entstehen:

aus Cyprinin- $\alpha$  von Diaminosäuren Arginin und Lysin, ferner Aminovaleriansäure und eine Spur Tyrosin, und zwar kommen vom Gesamtstickstoff 8,7% auf Arginin, 30,3% auf Lysin (s. auch die Tabelle § 500);

aus Cyprinin- $\beta$  von Diaminosäuren Arginin und Lysin, ferner Aminovaleriansäure und Tyrosin, und zwar kommen vom Gesamtstickstoff 28% auf Arginin, 6,6% auf Lysin und 1,5% auf Tyrosin.

Es ist wahrscheinlich, daß der geringe im Cyprinin- $\alpha$  gefundene Tyrosin-gehalt auf eine Verunreinigung mit Cyprinin- $\beta$  zu beziehen ist.

369. **Crenilabrin**, aus *Crenilabrus pavo* (Kossel<sup>1</sup>). Sulfat ölig, die schwach ammoniakalische Lösung fällt mit Wittepepton, Millonsche Reaktion positiv, Glyoxylsäurereaktion negativ. Histidin fehlt. Stickstoffverteilung: Ammoniak 0, Arginin 42,3 (als Pikrolonat 37,6), Lysin 11,0 (als Pikrat 2,9), Monaminsäuren 25,1%.

370. **Cyclopterin** wurde aus *Seehasensperma* von Morkowin<sup>2</sup>) dargestellt. Millonsche Reaktion positiv, ebenso Tryptophanreaktion<sup>3</sup>)

Hydrolyse. Bei der hydrolytischen Spaltung entstehen von Diaminosäuren Arginin, ferner Tyrosin, und zwar kommen vom Gesamtstickstoff 67,7% auf Arginin und 2,2% auf Tyrosin (Kossel und Kutscher<sup>4</sup>).

371. **Sturin** wurde aus Sperma des deutschen Störs von Kossel<sup>5</sup>), des kaspischen Störs von Malenück<sup>6</sup>) dargestellt. Die Analysen der Salze verschiedener Präparate stimmen nicht ganz miteinander überein. Goto<sup>7</sup>) fand für das Platinsalz 24,32% C, 4,49% H, 14,20% N, 23,10% Pt und 25,42% Cl.

Eigenschaften. Das Sulfat ist löslicher als das Salminsulfat, so daß sich aus einer 10proz. Lösung beim Erkalten noch kein Öl abscheidet. Es enthält etwa 22,5% Schwefelsäure. Ammoniak erzeugt in nicht zu verdünnter Lösung ölige Fällung und ebenso erfolgt auf Zusatz von Äther oder einigen Tropfen Alkohol oder Aceton sofort die Abscheidung einer öligen Masse. Auch durch Kochsalz werden seine Lösungen schwerer gefällt. Mit Benzoylchlorid gibt es ebenso wie Salmin eine unlösliche Verbindung. Für das Sulfat fand Goto<sup>7</sup>) in 2 Versuchen  $[\alpha]_D = -60^\circ$  und  $58,8^\circ$ .

Hydrolyse. Bei der hydrolytischen Spaltung (s. auch § 500) entstehen von Diaminosäuren Arginin, Lysin und Histidin, ferner Alanin<sup>8</sup>) und eine Substanz von der Zusammensetzung des Leucins<sup>8</sup>) (während Serin, Aminovaleriansäure Prolin, Tyrosin und Tryptophan nicht erhalten wurden), und zwar kommen vom Gesamtstickstoff 63,5 bis 67,4% auf Arginin, 7,5—8,4% auf Lysin und 10,1—11,8% auf

Nitrosturin. Histidin (Kossel und Kutscher<sup>9</sup>), Kossel und Weiß<sup>10</sup>). Über Nitrosturin s. Desamidosturin. Kossel und Weiß<sup>11</sup>). Desamidosturin<sup>12</sup>).

Peptidproton  $C_{18}H_{35}N_7O_5$  (?) (Kossel und Mathews<sup>13</sup>), krystallisierte  $AgNO_3$ -Verbindung, vgl. S. 481.

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 69, S. 138. 1910. <sup>2</sup>) desgl. Bd. 28, S. 313. 1899.

<sup>3</sup>) Kossel: Bull. de la soc. chim. de Paris 30. Mai 1903.

<sup>4</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 31, S. 186. 1900/01.

<sup>5</sup>) Kossel: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 25, S. 165. 1898. — Kossel u. Kennaway: desgl. Bd. 72, S. 486. 1911. — Kossel u. Weiß: desgl. Bd. 78, S. 402. 1912.

<sup>6</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 57, S. 99. 1908; s. dazu auch Kossel: desgl. Bd. 69, S. 140. 1910.

<sup>7</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 37, S. 94. 1902/03.

<sup>8</sup>) Kossel u. Dakin: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 44, S. 343. 1905.

<sup>9</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 31, S. 184. 1900/01.

<sup>10</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 78, S. 404. 1912. <sup>11</sup>) desgl. Bd. 78, S. 409. 1912.

<sup>12</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 78, S. 407. 1912.

<sup>13</sup>) Kossel u. Mathews: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 25, S. 193. 1898.

**372. Protone.** Protone<sup>1)</sup> (Clupeon, Sturon usw.) nennt Kossel die ersten Spaltungsprodukte der Protamine, welche aus ihnen durch Kochen mit Säuren, durch verdünntes Alkali bei niedriger Temperatur oder durch Fermente (Trypsin, Erepsin) entstehen, bevor es zu einer weiteren Zertrümmerung des Moleküls kommt. Trypsin zertrümmert das Protamin schneller als bei schwach saurer Reaktion wirkende Fermente (Lieno- $\beta$ -Protease, Endotryptase der Hefe, Papayotin<sup>2)</sup>).

Vom Gesamtstickstoff werden 6—7% nach van Slyke abgespalten (Kossel und Cameron<sup>3)</sup>, Felix<sup>4)</sup>).

Sie werden als Sulfate erhalten durch 3stündiges Kochen der Protamine mit 10 volumenproz. Schwefelsäure, bis eine Probe der mit überschüssigem Ammoniak versetzten Flüssigkeit mit Eiweißlösungen keinen Niederschlag mehr gibt, Fällern der Flüssigkeit mit Alkohol und Reinigen des Niederschlags durch wiederholtes Lösen in Wasser und Fällern mit Alkohol. Darstellung.

Die Protone fällen kein Eiweiß, sie geben Niederschläge mit Natriumpikrat, Natriumwolframat, Ferrocyanium, Jodjodkalium, Gold-, Platin- und Quecksilberchlorid. Auch Phosphorwolframsäure und Quecksilberjodjodkalium rufen in salzsaurer Lösung Niederschläge hervor. Ebenso werden sie durch das Silberbarytverfahren und durch alkoholische Pikrolonsäure gefällt. Gesättigte Kochsalzlösung fällt nicht. Protone lösen ebenso wie Protamine Kupferhydroxyd mit violetter Farbe (Goto). Biuretreaktion positiv. Sie drehen links, die spezifische Drehung ist geringer wie die der Protamine. Es wurde gefunden für Clupeonsulfat  $[\alpha]_D = -49,11^\circ$ , für Scombronsulfat  $[\alpha]_D = -41,25^\circ$ , für Sturonsulfat  $[\alpha]_D = -22,5^\circ$  (Goto), doch sind die untersuchten Protone wahrscheinlich Gemische. Eigenschaften.

Das Pikrolonat von Clupeon krystallisiert aus Alkohol in doppeltbrechenden Nadeln (Kossel und Weiß<sup>5)</sup>) und gibt eine teilweise krystallinische  $\beta$ -Naphthalinsulfoverbindung (Hirayama<sup>6)</sup>).

Bei der Spaltung liefert das Clupeon ungefähr soviel d-Arginin wie das Clupein; ist das Clupeon aber durch Alkalieinwirkung entstanden, so entsteht d,l-Ornithin (Kossel und Weiß<sup>7)</sup>). Hydrolyse des Clupeon.

Durch salpetrige Säure entsteht ein „Desaminoproton“, welches bei der Hydrolyse durch Säuren (an Stelle von Arginin) Ornithin gibt (Kossel und Pringle). Lysin fehlt, sein Stickstoff erscheint bei der Aufteilung nach van Slyke in der Monaminosäurefraktion. Desaminoproton aus Clupeon.

Ein Clupeon ( $\beta$ -Clupeon), welches ebenfalls bei der Hydrolyse (neben Arginin, 69,7% des Gesamtstickstoffs) Ornithin lieferte, wurde erhalten bei der längeren Einwirkung von Darmextrakt auf Clupein. Es zeigte im übrigen im wesentlichen die Eigenschaften der Protone (Kossel und Dakin<sup>8)</sup>). Hydrolyse des  $\beta$ -Clupeon.

Über Protongemische aus Sturin s. Kossel und Weiß<sup>9)</sup>. Einmal erhielten Kossel und Mathews<sup>10)</sup> aus den Spaltungsprodukten von Sturin eine krystallisierte Silbernitratdoppelverbindung, die vielleicht aber den Polypeptiden zuzurechnen ist; ihre Analyse ließ die Formel  $C_{18}H_{35}O_5N_7$  zu. Protone aus Sturin.

<sup>1)</sup> Kossel: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 25, S. 174. 1878. — Kossel u. Mathews: desgl. Bd. 25, S. 190. 1890. — Cohnheim: desgl. Bd. 35, S. 140. 1902. — Kossel u. Dakin: desgl. Bd. 41, S. 323. 1904. — Goto: desgl. Bd. 37, S. 106. 1902/03. — Kossel u. Pringle: desgl. Bd. 49, S. 301. 1906.

<sup>2)</sup> Takemura: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 63, S. 201. 1909.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 76, S. 463. 1911/12.

<sup>4)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 110, S. 217. 1920.

<sup>5)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 59, S. 281. 1909. <sup>6)</sup> desgl. Bd. 59, S. 287. 1909.

<sup>7)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 59, S. 492. 1909; Bd. 60, S. 312. 1909.

<sup>8)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 42, S. 185. 1904. <sup>9)</sup> desgl. Bd. 78, S. 412. 1912.

<sup>10)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 25, S. 193. 1898.

### Albuminoide oder Skleroproteine.

373. Die Albuminoide bilden eine Klasse von Stoffen, welche an der Bildung der Gewebe, der Formgebung und Festigkeit der Organe beteiligt sind und sich durch Reaktionen, durch ihre Verdauungs- und Spaltungsprodukte als nahe Verwandte der Eiweißstoffe erkennen lassen. Andere sind erhärtete Sekrete.

Sie kommen in der Natur in unlöslichem Zustande vor. Die meisten von ihnen werden von den proteolytischen Fermenten des Darmes der höheren Tiere schwer angegriffen.

Viele zeichnen sich durch einen sehr hohen Gehalt an Glykokoll aus, basische Bausteine enthalten sie in mittlerer Menge, Lysin fehlt manchmal, einzelne sind sehr reich an Schwefel, andere sehr arm daran, einzelnen fehlen auch manche zyklische Bausteine (Tyrosin, Tryptophan).

Von den Bestandteilen der Organe höherer Tiere gehören hierher die Gruppe der Keratine, die Substanzen der Eihäute, das Koilin, das Elastin, die Gruppe der Kollagene, die Linsen-, Knorpel- und Knochenalbumoide, die Membranine, von den Bestandteilen der Avertebraten die Seide (Fibroin und Sericin), die Spinnenseide, der Byssus, das Conchiolin, das Cornein, das Spongine.

**Vorkommen.** 374. Keratine bilden den Hauptbestandteil der Hornsubstanzen (Haare, Nägel, Epidermis, Horn, Schildpatt, Fischbein, Federn). Man erhält sie als unlösliche Rückstände, wenn man die fein zerkleinerten Substanzen mit Alkohol, Äther und Wasser auskocht und dann nacheinander der peptischen und tryptischen Verdauung unterwirft.

**Zusammensetzung.** Ihre Zusammensetzung schwankt bedeutend: C 49,5—55,0, H 6,4—7,0, N 16,2—17,7, S 2,59—5,63%, so daß man mehrere Keratine unterscheiden muß. Charakteristisch für die ganze Gruppe ist der hohe Schwefelgehalt. Über genaue Schwefelbestimmungen in verschiedenen Keratinen s. bei Mohr<sup>1)</sup>. K. A. H. Mörner<sup>2)</sup> fand in Menschenhaaren bei 5,63% Gesamtschwefel 4,07% bleischwärenden, in Rinderhorn bei 3,39% Gesamtschwefel 2,48% bleischwärenden.

**Eigenschaften.** Die Keratine sind in Wasser, Alkohol, Äther unlöslich. In Wasser quellen sie wenig, sind aber trocken recht hygroskopisch. Beim Kochen mit Wasser ändern sie sich kaum. Mit Wasser auf 150° längere Zeit erhitzt, lösen sie sich auf, ebenso in kochenden Alkalien (langsam auch in der Kälte) und in konzentrierter Schwefelsäure, aber in allen Fällen unter Zersetzung (s. weiter unten). Der Magen- und Pankreasverdauung und ebenso der Fäulnis widerstehen sie hartnäckig. Die Farbenreaktionen der Eiweißstoffe fallen positiv aus.

**Hydrolyse.** Beim 24stündigen Erhitzen mit Wasser auf 150° löst sich Keratin (Hornspäne) unter Entwicklung von Schwefelwasserstoff und einer lauchartig riechenden flüchtigen Substanz (wahrscheinlich Methylmercaptan) und Bildung von Stoffen, die als Atmidkeratin und Atmidkeratose bezeichnet werden und mit dem bei gleicher Behandlung aus Fibrin und anderen Eiweißstoffen entstehenden Atmidalbumin und Atmidalbumose (§ 400) die größte Ähnlichkeit haben (Bauer<sup>3)</sup>. Bei der Lösung in Alkalien entstehen neben Schwefelalkali Albuminat und Albumosen. Deuterokeratose von Langecker s. S. 500. Keratin-pepton s. S. 505.

Bei mehrstündigem schwachen Sieden (von Rinderhornkeratin) mit 1- bis 2proz. Schwefelsäure entstehen neben unlöslichem Keratomelanin Albumosen und Peptone, von denen nach dem Verfahren von Pick (§ 397) Heterokeratinose, Protokeratinose und Deuterokeratinose A und B isoliert

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 20, S. 403. 1895. <sup>2)</sup> desgl. Bd. 34, S. 207. 1902.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 35, S. 343. 1902.



wurden. Deuterokeratinose C wurde nicht gefunden. Sie enthalten alle denselben hohen Schwefelgehalt (3—3,5%) und geben alle starke Millonsche Reaktion, die Deuterokeratinose B im Gegensatz zu den anderen auch Molischsche Reaktion (Strauß<sup>1</sup>). Beim Erhitzen unter Luftabschluß verflüssigt sich lufttrockenes Keratin. Das so erhaltene Albumosegemenge wurde von Heiduschka u. Komm<sup>2</sup>) nach dem Verfahren von Pick (§ 397) aufgeteilt. Sie konnten aber nicht zu einheitlichen, wohldefinierten und reproduzierbaren Verbindungen gelangen.

Über die hydrolytischen Spaltungsprodukte verschiedener Keratine s. die Tabelle § 500. Aus den dort aufgeführten Werten ergibt sich ebenfalls, daß zu der Gruppe der Keratine Substanzen ganz verschiedener Zusammensetzung gerechnet werden. Keratin gleicher Herkunft besitzt im Alter vielleicht etwas weniger Glutaminsäure<sup>3</sup>). Starke Abweichungen zeigen sich auch im Cystingehalt. Buchtala<sup>4</sup>) fand in Übereinstimmung mit Mörner den höchsten Cystingehalt 14—15% in Menschenhaaren, ferner in Roßhaaren 7,98% und in Rinderhaaren 7,27%, in Schweineborsten 7,22%, in Menschennägeln 5,15%, in Pferdehufen 3,20%, in Rinderklauen 5,37%, in Schweineklauen 2,17%. Die Federn vom Huhn enthalten (ebenso wie die Haare) mehr Schwefel als die Krallen und Zehenschuppen beim gleichen Tiere<sup>5</sup>). Menschenhaar übertrifft die Keratine anderer Säugetiere auch im Gehalt an Glykokoll und Alanin um ein Beträchtliches. Die übrigen Monamino-säuren sind in ungefähr der gleichen Menge zum Aufbau verwendet wie sonst. Von allen bisher untersuchten Tierhaaren zeigt die Schafwolle die größte Ähnlichkeit mit Menschenhaar, nur enthält sie sehr viel weniger Glykokoll. Der Stickstoff verteilt sich bei den einzelnen Keratinen in ziemlich gleicher Weise, die Isolierung der Bausteine zeigt aber doch große Unterschiede im Aufbau an, ebenso die Verschiedenheit in der Menge des bei der Säurehydrolyse abgespaltenen Ammoniaks (Buchtala).

Bei der hydrolytischen Spaltung (Rinderhorn, Menschenhaare) entsteht auch Brenztraubensäure aus unbekannter Muttersubstanz (Mörner<sup>6</sup>). Die von Friedmann<sup>7</sup>) aufgefundene  $\alpha$ -Thiomilchsäure entsteht nach Mörner<sup>8</sup>) erst sekundär entweder durch Einwirkung von Schwefelwasserstoff auf Brenztraubensäure oder durch Spaltung des Cystins.

Stickstoffverteilung (in Drehspänen): 1,17% Amid-, 11,81% Monamino-säuren-, 2,95% Diaminosäuren- und 0,42% Melaninstickstoff (Gümbel<sup>9</sup>).

Weitere Analysen von Buchtala:

	Keratin aus:				
	Schildpatt	Schuppen	Epidermis von Elephant	Boa Constrictor	Python
Gesamtstickstoff . . . . .	14,14	14,21	14,26	13,80	14,42
Ammoniakstickstoff . . . . .	0,43	1,25	1,47	0,59	0,17
Melaninstickstoff . . . . .	0,07	0,07	0,20	0,16	0,23
Monamino-säurenstickstoff . . . . .	13,41	12,71	12,25	12,67	13,74
Diamino-säurenstickstoff . . . . .	0,44	0,56	0,32	0,33	0,56

Unter den bei der Einwirkung von Wasserstoffsperoxyd auf Menschenhaare entstehenden Produkten ließen sich nachweisen Schwefel, Schwefelsäure, Oxydation.

<sup>1</sup>) Studien über die Albuminoide. Heidelberg 1904.

<sup>2</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 126, S. 130. 1923.

<sup>3</sup>) Abderhalden u. Fuchs: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 57, S. 339. 1908.

<sup>4</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 52, S. 474. 1907; Bd. 85, S. 241 u. 335. 1913.

<sup>5</sup>) Buchtala: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 69, S. 310. 1910.

<sup>6</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 42, S. 121. 1904.

<sup>7</sup>) Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 3, S. 184. 1903.

<sup>8</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 42, S. 365. 1904.

<sup>9</sup>) Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 5, S. 310. 1904.

Kohlensäure, Essigsäure, Acetaldehyd, Oxalsäure, Bernsteinsäure, Salpetersäure, Ammoniak, Aminosäuren (Breinl und Baudisch<sup>1</sup>), außerdem sehr geringe Mengen von Azelainsäure.

Mit Salpetersäure entsteht p-Nitrobenzoesäure (aus Phenylalanin) zu 0,7% aus Pferdehaar- und 1,7% aus Gänsefederkeratin<sup>2</sup>), auch aus sorgfältig gereinigten Hornspänen<sup>3</sup>).

**375. Neurokeratin**, Bestandteil der markhaltigen Nerven, wurde zuerst von Kühne und Chittenden<sup>4</sup>) dargestellt und untersucht. Zu seiner Gewinnung wird das durch Aceton von Wasser und der Hauptmenge des Cholesterins befreite und fein zerkleinerte Gehirn nacheinander mit Äther, 75proz. Alkohol bei 40° und kochender Mischung von gleichen Teilen Benzol und Alkohol erschöpft, darauf abwechselnd der Trypsinverdauung und der Behandlung mit heißem Benzol-Alkohol unterworfen. Neurokeratin hinterbleibt schließlich als Rückstand. Das Nähere s. bei Argiris<sup>5</sup>). Die Zusammensetzung wurde gefunden, auf aschefreie Substanz berechnet, im Mittel C 56,20, H 7,30, N 14,18, S 1,75% (Kühne und Chittenden); C 56,61, H 7,45, N 14,16, S 2,27% (Argiris). Es löst sich schwer in heißer starker Kalilauge und gibt beim Neutralisieren mehr Niederschlag als Keratin bei gleicher Behandlung. Auch in ziemlich konzentrierter Schwefelsäure ist das Neurokeratin nur langsam löslich. Ein Keratin aus den Neurogliazellen des Gehirns, das aber nur 54,87% C und 13,17% N enthielt, gab bei der Stickstoffverteilung nach van Slyke: NH<sub>3</sub>-N 5,24, Melanin-N 14,51, Arginin-N 2,69, Cystin-N 4,40 Histidin-N 6,28, Lysin-N 11,73%, Stickstoff aus Prolin, Oxyprolin, Tryptophan 27,95%, Stickstoff aus Glutaminsäure, Asparaginsäure, Tyrosin, Leucin Isoleucin, Alanin und Glykokoll 25,21% (Nelson<sup>6</sup>). Über die hydrolytischen Spaltungsprodukte s. die Tabelle § 500.

**376. Substanz der Eihäute von Hühnereiern** (Lindwall<sup>7</sup>). Die Reinigung geschieht durch mehrtägiges Digerieren mit 0,1proz. Natronlauge und mit verdünnter Essigsäure, Extraktion mit verdünnter Salzsäure, Waschen mit kaltem und kochendem Wasser, Behandeln mit Alkohol und Äther.

Aschefrei. C 49,78, H 6,64, N 16,43, S 4,25%. In Wasser unlöslich, verhält sich gegen Alkalien und Säuren wie Keratin. Mit Millons Reagens gibt es keine typische Reaktion (Mörner<sup>8</sup>). Beim Sieden mit 0,5proz. Schwefelsäure entstehen Albumosen und Peptone, aber kein Melanin. Isoliert wurden nach dem Verfahren von Pick (§ 397) Hetero-, Prot- und Deuteroalbumose A und B. Deuteroalbumose C tritt nicht auf. Die Deuteroalbumose B gibt im Gegensatz zu den anderen starke Molischsche Reaktion (Strauß<sup>9</sup>).

Über die hydrolytischen Spaltungsprodukte s. die Tabelle § 500. Stickstoffverteilung in einem lufttrockenen, 13,6% N enthaltenden Präparat: 0,89% Amid-, 9,81% Monamino-, 2,77% Diamino- und 0,028% Melaninstickstoff (Hofmann und Pregl<sup>10</sup>).

Substanz der Eihäute von *Seyllium stellare* (Pregl<sup>11</sup>). Die Reinigung geschieht durch mehrtägiges Quellen in 1proz. Salzsäure und mechanische Entfernung der gallertigen Massen, Behandeln mit Alkohol-Äther.

C 53,92, H 7,33, N 15,08, S 1,44%. In Wasser unlöslich, in 5proz. Natronlauge im Wasserbad allmählich löslich, ebenso beim Erwärmen in konzentrierter Mineralsäure. Biuret-, Millonsche, Xanthoprotein-, Ehrlichsche Probe positiv, Molischsche negativ. Gegen Verdauungsfermente sehr widerstandsfähig.

Über die hydrolytischen Spaltungsprodukte s. die Tabelle § 500. Cystin ließ sich nicht isolieren (Buchta<sup>12</sup>). Stickstoffverteilung: 0,7% Amid-, 10,96% Monamin-, 2,17% Diamino-, 0,08% Melaninstickstoff (Buchta).

Über Zusammensetzung der Eihäute einiger anderer Selachier und die Stickstoffverteilung in ihnen s. Buchta.

Substanz der Eihäute von *Testudo graeca* (Abderhalden und Strauß<sup>13</sup>). Die Reinigung geschieht durch Entfernung der harten Schalen auf mechanischem Wege und mit Hilfe von verdünnter Salzsäure. Aufkochen mit verdünnter Essigsäure, Auskochen mit Alkohol und Äther. Schwefelbleiprobe sehr stark, Millonsche Probe negativ.

Über die hydrolytischen Spaltungsprodukte s. die Tabelle § 500.

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 52, S. 159. 1907.

<sup>2</sup>) C. Th. Mörner: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 98, S. 93. 1917.

<sup>3</sup>) Lissizin: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 62, S. 226. 1909.

<sup>4</sup>) Zeitschr. f. Biol. Bd. 26, S. 291. 1889.

<sup>5</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 54, S. 86. 1907/08.

<sup>6</sup>) Journ. of the Americ. chem. soc. Bd. 38, S. 2558. 1916.

<sup>7</sup>) Malys Jahresber. d. Tierchem. 1881, S. 38.

<sup>8</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 34, S. 231. 1901/02.

<sup>9</sup>) Studien über Albuminoide. Heidelberg 1904.

<sup>10</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 52, S. 468. 1907. <sup>11</sup>) desgl. Bd. 56, S. 1. 1908.

<sup>12</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 56, S. 10. 1908. <sup>13</sup>) desgl. Bd. 48, S. 535. 1906.

**377. Koilin.** So bezeichnen Hofmann und Pregl<sup>1)</sup> die zuerst von Hedenius<sup>2)</sup> untersuchte und keratinoide Substanz benannte hornige Auskleidung des Vogelmagens. Durch sehr verdünntes Ammoniak, essigsäurehaltiges Wasser, Wasser, Alkohol und Äther gereinigt, hat es die Zusammensetzung C 53,21, H 7,17, N 15,78, S 1,13, Asche 0,47% (Hedenius). Hofmann und Pregl fanden ungefähr dieselben Werte. Über die Zusammensetzung des Koilin aus anderen Vögeln s. bei Hofmann und Pregl.

Getrocknet zeigt es spröde Beschaffenheit, in Wasser ganz unlöslich, in 5—10proz. Kalilauge bei Zimmertemperatur löslich, ebenso in konzentrierter Salzsäure. Die Farbenreaktionen positiv, nur die Molischsche negativ. Gegen Verdauungsfermente sehr widerstandsfähig. Über die Produkte, welche durch Einwirkung von Alkalien bei Zimmertemperatur und beim Erhitzen mit Wasser auf 130° entstehen, s. bei Hofmann und Pregl.

Über die hydrolytischen Spaltungsprodukte s. die Tabelle § 500. Die Isolierung von Cystin (ist Buchtala<sup>3)</sup>) gelungen, er erhielt aus 100 g Koilin aber nur 0,5 g Cystin. Stickstoffverteilung: 1,26% Amid-, 9,39% Monamino-, 3,36% Diamino- und 0,186% Melaninstickstoff.

**378. Elastin** bildet die Substanz des elastischen Gewebes. Am reichlichsten Vorkommen. findet es sich im Lig. nuchae. Nach Engel<sup>4)</sup> und Neumeister<sup>5)</sup> besteht die organische Grundsubstanz der Schalen mancher Reptilien- und Fischeier aus Elastin.

Zu seiner Darstellung wäscht man das fein zerleinerte Nackenband des Darstellung. Rindes gründlich mit Wasser, extrahiert zur Entfernung von Eiweißstoffen und Proteiden einige Tage mit mehrfach gewechseltem, halbgesättigtem Kalkwasser, kocht nach Auswaschen des Kalkes mit Wasser völlig aus, behandelt einige Stunden mit 10proz. kochender Essigsäure, darauf etwa ebenso lange mit kalter 5proz. Salzsäure, wiederholt die Behandlung mit Essig- und Salzsäure, wäscht mit Wasser säurefrei und kocht mit Alkohol und Äther aus.

Das so gewonnene Elastin hatte die Zusammensetzung C 54,14, H 7,33, Zusammen-  
setzung. N 16,87, S 0,14, O 21,52% (Richards und Gies<sup>6)</sup>), es muß seiner Darstellung nach reiner sein als die ohne Kalkwasser (Chittenden und Hart<sup>7)</sup>) oder die mit heißer 1proz. Kalilauge anstatt des Kalkwassers gewonnenen Präparate. Die letzteren waren schwefelfrei (Horbaczewski<sup>8)</sup>). Chittenden und Hart fanden C 54,08, H 7,20, N 16,85, S 0,30, O 21,57%. Ein aus dem elastischen Gewebe der Gefäße (ohne Anwendung von Kalkwasser oder Alkali) dargestelltes Elastin enthielt C 53,95, H 7,03, N 16,67, S 0,38% (Schwarz<sup>9)</sup>). Die Analysen des Elastins aus der Aorta von Bergh<sup>10)</sup> weichen etwas ab. Die Substanz der Lig. flava und das Elastin der Ohrknorpel bedürfen noch weiterer Untersuchung.

Das, wie oben angegeben, gewonnene Elastin besitzt eine gelbliche Farbe Eigenschaften. und läßt sich leicht zu feinem Pulver zerreiben. Beim Kochen mit Wasser wird es nicht angegriffen; fein gepulvert löst es sich bei langem Stehen etwas in 0,2proz. kalter Salzsäure, völlig in 1proz. Kalilauge beim Erwärmen, ebenso in kalter konzentrierter Kalilauge. Beim längeren Kochen mit 1proz. Kalilauge wird der Schwefel abgespalten. Millonsche und Xanthoproteinreaktion sind positiv, die Schwefelbleiprobe gab das Elastin von Richards und Gies nicht.

Bei der peptischen und tryptischen Verdauung geht Elastin in Lösung, Verdauung. wenn auch langsamer als Eiweißstoffe. Die hierbei sowie beim Kochen mit Wasser auf 130—140° entstehenden Stoffe gehören in die Gruppe der Prot- und Deuteroalbumosen und sind als Protelastose (Hemielastin) und als

1) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 52, S. 448. 1907.

2) Skandinav. Arch. f. Physiol. Bd. 3, S. 244. 1892.

3) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 69, S. 312. 1910.

4) Zeitschr. f. Biol. Bd. 27, S. 374. 1890. 5) desgl. Bd. 31, S. 413. 1894.

6) Americ. Journ. of physiol. Bd. 7, S. 93. 1902.

7) Zeitschr. f. Biol. Bd. 25, S. 368. 1889.

8) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 6, S. 330. 1882. 9) desgl. Bd. 18, S. 487. 1894.

10) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 25, S. 337. 1898.

Deuteroelastose (Elastinpepton) bezeichnet worden. Näheres über diese Körper s. in den Arbeiten von Horbaczewski und Chittenden und Hart. Bei sehr lange fortgesetzter peptischer Verdauung entsteht auch Pepton (Richards und Gies).

**Hemielastin.** Hemielastin enthält 1,86% Arginin, 0,53% Histidin, 2,48% Lysin. Stickstoffverteilung in Prozenten des Gesamtstickstoffs:  $\text{NH}_3$  0,4, Humin I 3,1, Humin II 4,9, Histidin 1,0 (als Pikrolonat) Arginin 4,2 (als Pikrolonat), Lysin 3,4 (Kjeldahl), Monamino-säuren 71,1 (Wechsler<sup>1</sup>).

**Vollständige Hydrolyse.** Über die hydrolytischen Zersetzungsprodukte s. die Tabelle § 500, über aus Elastin gewonnene Polypeptide s. § 406ff. Beim Schmelzen mit Kali auf 200° entstehen Indol, Skatol, Benzol, Phenol (Schwarz), bei der Zersetzung durch Mikroorganismen: Mercaptan, Ammoniak, Buttersäure, Valeriansäure, Glykokoll, Leucin, kein Phenol, kein Indol und Skatol (Wälchli<sup>2</sup>), Zoja<sup>3</sup>).

**Ichthylepidin.** **Ichthylepidin** bildet zusammen mit Kollagen die organische Grundsubstanz der Schuppen vieler Fische (C. Th. Mörner<sup>4</sup>) und bleibt als unlösliche Masse von der ursprünglichen Gestalt und Struktur der Schuppen zurück, wenn man diese zunächst nacheinander in der Kälte tagelang mit 0,5 proz. Salzsäure, 0,05 proz. Kalilauge, 0,01 proz. Essigsäure und destilliertem Wasser zur Entfernung der Eiweißspuren, des Guanins und der Mineralbestandteile, darauf mehrere Tage mit mehrmals gewechselter 0,1 proz. Salzsäure bei 40° zur Entfernung des Kollagens und schließlich mit Wasser behandelt.

Mörner fand im Mittel 15,98% N und 1,09% S, wenig Asche. Abderhalden und Voitino-vici<sup>5</sup>) fanden 50,87% C, 6,56% H, 15,69% N, 1,02% S, 0,06% Asche. Weder in kaltem noch in kochendem Wasser löslich, in verdünnten Säuren und Alkalien erst bei Siedehitze löslich, durch Pepsin- und Trypsinverdauung in Lösung gehend. Millonsche, Xanthoprotein-, Biuret- und Schwefelbleireaktion positiv, Adamkiewiczsche Reaktion negativ. Über hydrolytische Spaltungsprodukte s. § 500.

Mit Salpetersäure entsteht 1% p-Nitrobenzoesäure, womit die Gegenwart von Phenylalanin wahrscheinlich gemacht ist (C. Th. Mörner<sup>6</sup>).

**Kollagen. Vorkommen.** **379. Kollagen und Glutin (Leim).** Das Kollagen stellt die Hauptmenge der die Bindegewebszellen umgebenden Grundsubstanz im lockeren Bindegewebe, in Sehnen, Bändern, Fascien dar, ebenso im Knochen die Hauptmenge der organischen Grundsubstanz, welche die Knochenkörperchen umgibt; es beteiligt sich an dem Aufbau der organischen Grundsubstanz des Knorpels<sup>7</sup>), der Cornea<sup>8</sup>), der Fischschuppen<sup>9</sup>).

**Darstellung.** Zur Darstellung des Kollagens befreit man Knochen durch Extraktion mit Salzsäure von anorganischen Stoffen und durch Behandlung mit verdünnten Alkalien von organischen Beimengungen, oder fein zerkleinerte Sehnen am besten durch tagelang fortgesetzte Trypsinverdauung von Mucin, Elastin und anderen Proteinen und wäscht das zurückbleibende Gewebe gründlich mit Wasser aus.

**Eigenschaften.** Kollagen ist farblos, quillt in kaltem Wasser, noch mehr in verdünnten Säuren oder sehr schwachen Alkalilaugen und in Salzlösungen. Die Gesetzmäßigkeiten darüber, wie die einzelnen Ionen wirken und sich gegenseitig beeinflussen,

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 67, S. 486. 1910.

<sup>2</sup>) Journ. f. prakt. Chem. N. F. Bd. 17, S. 71. 1878.

<sup>3</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 23, S. 236. 1897.

<sup>4</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 24, S. 125. 1898; Bd. 37, S. 88. 1902/03. — Green u. Tower: desgl. Bd. 35, S. 196. 1902.

<sup>5</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 52, S. 368. 1907. <sup>6</sup>) desgl. Bd. 98, S. 93. 1917.

<sup>7</sup>) Morochowetz: Verhandl. d. naturh.-med. Vereins zu Heidelberg Bd. 1, S. 480. 1877. — C. Th. Mörner: Skandinav. Arch. f. Physiol. Bd. 1, S. 210. 1889.

<sup>8</sup>) Morochowetz: a. a. O. — C. Th. Mörner: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 18, S. 213. 1894.

<sup>9</sup>) Weiske: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 7, S. 466. 1883. — C. Th. Mörner: desgl. Bd. 24, S. 125. 1898.

sind viel untersucht und sind in Spezialbüchern der physikalischen (Kolloid-) Chemie einzusehen. Kollagen ist unlöslich in Alkohol, Äther, Chloroform, quillt auch in starken Alkalien und löst sich in ihnen beim Erhitzen, nicht in Soda-lösung. Durch Magensaft wird Kollagen gelöst, durch Pankreasverdauung nur dann, wenn es vorher mit Wasser über 70° erhitzt oder durch verdünnte Säure gequollen war. In (4proz.) Formol gehärtetes Kollagen, z. B. mit Trypsin gereinigte Sehnen des Mäuseschwanzes, schnurren in Wasser erst bei 93° rasch auf  $\frac{1}{3}$  ihrer Länge zusammen und dehnen sich dann in kaltem Wasser sofort wie eine zusammengedrückte Spiralfeder wieder auf  $\frac{2}{3}$  der normalen Länge aus. Bei längerem Liegen (einige Stunden) in kaltem Wasser erreichen sie dann wieder vollkommen die ursprüngliche Länge und Form (Aug. Ewald<sup>1</sup>). Durch Gerbsäure wird es zum Schrumpfen gebracht und in Leder verwandelt (Lohgerberei). In siedendem Wasser löst sich Kollagen nach zuerst eingetretener Quellung und Abnahme seiner Kohärenz und der Schärfe der Konturen der Fasern, indem es unter Ammoniakentwicklung (Emmett und Gies<sup>2</sup>) in

Glutin übergeht. Die Leichtigkeit, mit welcher diese Umwandlung des Kollagens zu Glutin (Leim) geschieht, ist am größten bei Fischen\*) und nackten Amphibien, schwieriger und langwieriger geschieht die Lösung bei Säugern und Vögeln, besonders langsam bei alten Tieren. Auch das Kollagen verschiedener Gewebe desselben Tieres verhält sich verschieden. Durch die Anwesenheit schon ganz geringer Säuremengen wird die Umwandlung in Glutin außerordentlich beschleunigt. Bei wochenlangem Stehen unter Alkohol oder Äther verliert Kollagen allmählich seine Fähigkeit, in Glutin umgewandelt zu werden (Tebb<sup>3</sup>).

Die Leimlösung erstarrt bei nicht zu großer Verdünnung (schon bei einem Gehalt von 0,5—1%) beim Erkalten bald zu einer Gallerte und wird beim Erwärmen wieder flüssig. Die Gelatinierung erleidet durch die Anwesenheit von Chloriden und besonders von Kaliumjodid eine Verzögerung (C. Th. Mörner<sup>4</sup>). Sulfate, Citrate, Tartrate, Acetate, Glycerin, Traubenzucker erhöhen, Chloride, Chlorate, Nitrate, Bromide, Jodide, Alkohol, Harnstoff erniedrigen den Erstarrungspunkt (Pauli und Rona<sup>5</sup>); er hängt auch sehr von der Reaktion ab<sup>6</sup>).

Um käuflichen Leim (Gelatine) zu reinigen, wäscht man ihn tagelang mit ätherhaltigem Wasser, behandelt ihn einige Wochen mit häufig gewechselter schwacher (bis 1proz.) Kalilauge, dann mit Wasser, sehr verdünnter Essigsäure und wieder mit Wasser. Schließlich wird er durch Alkohol gehärtet, in heißem Wasser gelöst und mit Alkohol ausgefällt (Mörner).

Ein anderes Verfahren der Reinigung käuflichen Leims, sowie auch ein Verfahren zur Darstellung von Leim aus leimgebendem Gewebe, z. B. Knochen, ist von Sadikoff<sup>7</sup>) angegeben worden.

\*) Das Kollagen der Hausenblase geht schon bei Zimmertemperatur in gelatinierenden Leim über und unterscheidet sich auch sonst von dem Kollagen der höheren Wirbeltiere (Hofmeister<sup>8</sup>). Auch das Kollagen der Cephalopoden weicht nach Krukenberg<sup>9</sup>) in seinem Verhalten von letzterem ab.

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 105, S. 136. 1919.

<sup>2</sup>) Proc. of the Americ. soc. of biol. chem. Bd. 1, S. 42. 1907. — Manning u. Schryver: Biochem. Journ. Bd. 15, S. 523. 1921.

<sup>3</sup>) Journ. of physiol. Bd. 27, S. 463. 1902.

<sup>4</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 28, S. 471. 1899.

<sup>5</sup>) Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 2, S. 1. 1902.

<sup>6</sup>) D. L. Lloyd: Biochem. Journ. Bd. 16, S. 530. 1922; ref. Chem. Zentralbl. 1922, III, S. 1263.

<sup>7</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 48, S. 130. 1906.

<sup>8</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 2, S. 299. 1878/79.

<sup>9</sup>) Physiol. Studien. Heidelberg 1881, 5. Abt., S. 24.

Zusammensetzung.	Zusammensetzung:	C	H	N	S	Asche
	Glutin aus Sehnen a. aschefr. S. berechn.	50,06	6,56	17,86	0,277	0,346 % (van Name <sup>1)</sup> )
	" " " " " " "	50,87	6,85	18,25	0,480	0,21 % (Sadikoff <sup>2)</sup> )
	Gerein. käufl. Gelatine . . . . .	49,09	6,76	17,68	0,48	0,42 % (Faust <sup>3)</sup> )
	" " " " " " "	50,09	6,68	18,12	0,57	0,07 % (Paal <sup>4)</sup> )
	" " " " a. aschefr. S. ber.	—	—	—	0,2	— % (Mörner <sup>5)</sup> )
	" " " " " " "	51,45	7,88	18,18	0,435	1,54 % (Sadikoff <sup>2)</sup> )
	Glutin a. Nasenknorpel „ „ „ „	50,33	6,98	17,76	0,59	1,3 % (Sadikoff <sup>6)</sup> )
	" „ Cornea . . . . .	—	—	17,02	0,31	0,62 % (Mörner <sup>7)</sup> )
	" „ Fischechuppen . . . . .	—	—	17,51	0,52	0,1—0,2 % (Mörner <sup>8)</sup> )

Die verschiedene Zusammensetzung und andere Momente sprechen dafür, daß es verschiedene Glutine und Kollagene gibt. Vielleicht handelt es sich auch um Gemenge. Glutin ist in kaltem Wasser nur quellbar, geht aber unter Umständen leicht, z. B. schon durch längere Einwirkung von Wasser, in eine in Wasser lösliche Modifikation über (Sadikoff). Es löst sich in Alkalien, aber in ganz schwachen Alkalilaugen (bis 0,5%) so wenig, daß sie zur Reinigung des Glutins benutzt werden können (Mörner<sup>9</sup>). Über die Löslichkeit des Glutins in Salzlösungen vgl. auch Sadikoff<sup>10</sup>). Durch Sättigung seiner Lösungen mit Ammonsulfat, ebenso durch Zusatz von Essigsäure nach Sättigung mit Kochsalz wird es abgeschieden. In Alkohol ist es unlöslich, beim Eingießen einer konzentrierten heißen wässerigen Lösung in Alkohol scheidet es sich ab. Säuren und Alkalien beeinträchtigen die Fällung 1—2proz. Lösungen durch Alkohol, ebenso gewisse Salze bei bestimmten Konzentrationen. Näheres hierüber W. O. Fenn<sup>11</sup>). Bei Gegenwart von Säure löst es sich in 70proz. Alkohol und fällt bei der Neutralisation wieder aus (Sadikoff). Seine Lösungen werden durch Säuren und im allgemeinen auch durch Metallsalze nicht gefällt. Ferrocyanalkalium + Essigsäure ruft Niederschlag hervor, doch nur dann, wenn die Leimlösung nicht zu konzentriert, nicht warm, nicht salzreich, die Essigsäuremenge nicht zu gering und die Ferrocyanalkaliummenge nicht zu groß ist (Mörner). Niederschläge entstehen ferner durch Pikrinsäure, Gerbsäure bei Gegenwart von Salz (Trunkel<sup>12</sup>), Phosphorwolfram- oder Phosphormolybdänsäure + Salzsäure, Kaliumquecksilberjodid, durch Quecksilberchlorid bei Gegenwart von Kochsalz und Salzsäure. Biuretreaktion und Probe von Molisch positiv, Millonsche (man verwende nur einige Tropfen Reagens) und Xanthoproteinreaktion positiv, aber schwach, Schwefelbleiprobe und die Proben auf Tryptophan negativ.

Glutinlösungen zeigen starke linksseitige Polarisierung<sup>13</sup>). Die Änderungen der Drehung mit Konzentration, Temperatur usw. bedürfen noch eingehender Untersuchung. Bei der Umwandlung in Glucose usw. (s. S. 489) nimmt die Drehung ab.

Die Glutine aus Knorpel zeigen im Gegensatz zu den übrigen nach dem Kochen mit Mineralsäuren ein ganz schwaches Reduktionsvermögen, geben eine

<sup>1)</sup> Journ. of exp. med. Bd. 2, S. 117. 1897.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 39, S. 396. 1903.

<sup>3)</sup> Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 41, S. 309. 1898.

<sup>4)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 25, S. 1202. 1892.

<sup>5)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 28, S. 471. 1899. <sup>6)</sup> desgl. Bd. 39, S. 411. 1903.

<sup>7)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 18, S. 225. 1894. <sup>8)</sup> desgl. Bd. 24, S. 135. 1898.

<sup>9)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 28, S. 471. 1899.

<sup>10)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 41, S. 15. 1904; Bd. 46, S. 387. 1905.

<sup>11)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 33, S. 294. 1918; Bd. 34, S. 141. 1918; ref. Malys Jahresber. d. Tierchem. 1919, S. 917, sowie die Handbücher der Kolloidchemie.

<sup>12)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 26, S. 458. 1910.

<sup>13)</sup> de Bary: Med.-chem. Unters. v. Hoppe-Seyler, Heft 1, S. 73. 1866. — Framm: Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 68, S. 144. 1897. — Trunkel: Biochem. Zeitschr. Bd. 26, S. 493. 1910.

Farbenreaktion mit Phloroglucinsalzsäure und werden deshalb als Gluteine bezeichnet (Sadikoff).

Wird Leim bei 130° längere Zeit getrocknet, so geht er nach Hofmeister<sup>1)</sup> in einen dem Kollagen ähnlichen Körper über, der durch Erhitzen mit Wasser wieder in gelatinierenden Leim übergeführt werden kann. Das Kollagen wurde hiernach als Anhydrid des Glutins aufgefaßt, wie es auch den Gewichtsverhältnissen entspricht. Nach Emmett und Gies entsteht indessen beim Erhitzen von Leim auf 130° kein Kollagen, denn die Substanz wird in neutraler Trypsinlösung bei 40° schnell verdaut. Die Umwandlung des Kollagens in Glutin, welche mit einer Ammoniakentwicklung einhergeht, ist nach ihnen nicht als einfache Hydratbildung anzusehen.

Angebliche Rück-  
verwandlung in  
Kollagen.

Durch anhaltendes Kochen mit viel Wasser wird der Leim nach Hofmeister unter geringer Wasseraufnahme gespalten in die beiden Körper Semiglutin und Hemicollin, ersteres fällbar durch Alkohol, bei gewöhnlicher Temperatur fällbar durch Platinchlorid, dieser Niederschlag löst sich, wenn frisch gefällt, beim Erhitzen und fällt beim Erkalten wieder aus. Das Hemicollin wird weder durch Alkohol noch durch Platinchlorid gefällt. Über Protokyrine aus Leim s. § 404. Bei der Pepsin- und Trypsinverdauung auftretende Körper sind von Klug<sup>2)</sup> sowie von Chittenden und Mitarbeitern<sup>3)</sup> als Glucose (Gelatose) und Glutin- (Gelatin-) Pepton beschrieben worden. Über salzsaure Peptonsalze und Peptone, erhalten aus Glutin durch Einwirkung von verdünnter Salzsäure in der Wärme oder durch Pepsinsalzsäure, s. Paa. Über Pepsin- und Trypsinglutinpepton s. S. 501 und 502. Über ein Dipeptid aus Leim s. § 509. Krystallinische Spaltungsprodukte treten auch bei langandauernder Trypsinverdauung nur in geringer Menge auf, reichlicher nur Glykokoll und Ammoniak (Reich<sup>4)</sup>, Levene<sup>5)</sup>).

Hydrolyse.  
(Bildung von albu-  
mose- u. pepton-  
artigen Körpern.)

Verdauung.

Über die hydrolytischen Zersetzungsprodukte s. die Tabelle § 500. Die genaueste Untersuchung stammt von Dakin<sup>6)</sup>; frühere Untersuchungen wie diejenigen von Levene, Beatty u. a. sind dadurch überholt. Die von Skraup<sup>7)</sup> bei der Hydrolyse aufgefundene Leimsäure (S. 249) bedarf weiterer Untersuchung. Weder beim Kochen mit Säuren oder Alkalien, noch durch die Fäulnis entstehen Phenol, Indol oder Skatol, dagegen bildet sich bei der Fäulnis neben anderen Körpern Phenyläthylamin (§ 156). Bei der Hydrolyse methylierter Gelatine fehlt Lysin; Histidin, Arginin und Glutaminsäure wurden in kleinerer Menge isoliert (Skraup<sup>8)</sup>). Ornithin ist in den durch Alkalieinwirkung entstandenen peptonartigen Spaltungsprodukten nicht vorhanden, das Arginin scheint also im Glutin besser geschützt zu sein als im Clupein (Kossel und Weiß<sup>9)</sup>). Selitrenny<sup>10)</sup> erhielt bei der Zersetzung des Leims durch Bac. liquef. magnus Methylmercaptan, flüchtige Fettsäuren, Glykokoll, Leucin, Phenylpropionsäure, durch die Bacillen des Rauschbrandes Methylmercaptan, flüchtige Fettsäuren, Phenylpropionsäure und Phenylessigsäure.

Vollständige  
Hydrolyse.

Bakterielle Zer-  
setzung.

Bei der Oxydation mit Permanganat wird zunächst ebenso wie aus den Eiweißstoffen eine der Oxyprotosulfonsäure (§ 414) entsprechende Substanz gebildet, die, mit Ätzbaryt bis 190° längere Zeit erhitzt, Ammoniak, Pyrrol, Fett-

Oxydation.

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 2, S. 299. 1879.

<sup>2)</sup> Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 48, S. 100. 1891.

<sup>3)</sup> Journ. of physiol. Bd. 12, S. 23. 1891. Americ. Journ. of physiol. Bd. 2, S. 176. 1899.

<sup>4)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 34, S. 119. 1902.

<sup>5)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 41, S. 8 u. 99. 1904.

<sup>6)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 44, S. 499. 1920.

<sup>7)</sup> Monatshefte f. Chem. Bd. 26, S. 243. 1905. <sup>8)</sup> desgl. Bd. 31, S. 1035. 1911.

<sup>9)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 68, S. 165. 1910.

<sup>10)</sup> Monatshefte f. Chem. Bd. 10, S. 908. 1889.

säuren, Leucin, Glutaminsäure neben Benzoesäure liefert (Maly<sup>1</sup>). Bei weiterer Oxydation mit Permanganat in der Wärme entstehen Guanidin (aus Arginin) (Kutscher und Zickgraf<sup>2</sup>), flüchtige Fettsäuren, Benzoesäure, Benzaldehyd, Oxalsäure, Bernsteinsäure, Oxaluramid (Seemann<sup>3</sup>), Oxaminsäure (aus Glykoll), Oxamid (Kutscher und Schenk<sup>4</sup>). Bei der Oxydation mit saurehaltigem Wasserstoffhyperoxyd und Eisensalz wurden erhalten Aceton und Isovaleraldehyd (Neuberg und Blumenthal<sup>5</sup>). Über die Einwirkung der salpetrigen Säure s. Skraup<sup>6</sup> und Seemann<sup>7</sup>). Bei der Einwirkung von Salpetersäure entsteht p-Nitrobenzoesäure aus Phenylalanin, aber nur Spuren von Oxalsäure (C. Th. Mörner<sup>8</sup>). Brom wird unter den Bedingungen der Reaktion von Koppeschaar von der Gelatine mehr verbraucht als von der Summe ihrer Spaltprodukte, was nach Siegfried und Reppin dafür spricht, daß im Eiweiß Ringgebilde vorhanden sind, die bei der Hydrolyse gespalten werden<sup>9</sup>).

**Reticulin.** Reticulin nennt Siegfried<sup>10</sup>) eine von ihm isolierte Substanz, welche zusammen mit Kollagen die Grundsubstanz des retikulären (adenoiden) Bindegewebes in Lymphdrüsen, Darmmucosa und anderen Organen (Leber, Niere, Milz) ausmacht. Zu seiner Darstellung wird Darm-schleimhaut mit Wasser, verdünnten Säuren und Natronlauge behandelt, mit Trypsin verdaut ausgewaschen, mit Alkohol und mehrere Tage mit Äther extrahiert. Nach Wiederholung der Behandlung mit Trypsin, Alkohol und Äther bleibt das Gewebe in Form von quellbaren hellgrauen Strähnen zurück. Kocht man jetzt mit Wasser  $\frac{1}{2}$  Stunde, so geht ein Teil der Substanz als Leim in Lösung, während der als unlösliches Pulver zurückbleibende Rest Reticulin darstellt. C 52,88, H 6,97, N 15,63, S 1,88, P 0,34, Asche 2,27%. Es ist unlöslich in verdünnten Mineralsäuren; in verdünnter Natronlauge löst es sich langsam, widersteht der Magen- und Pankreasverdauung und gibt die Xanthoprotein-, Biuret- und Adamkiewicz'sche Probe, nicht die Millon'sche. Bei andauerndem Kochen mit viel Wasser löst es sich ein wenig, rascher beim Kochen mit 10 proz. Natronlauge. Es gibt ebenfalls wie Kollagen die Formol-Schnurreaktion (S. 487) von Aug. Ewald<sup>11</sup>). Bei der hydrolytischen Spaltung entstehen Ammoniak, Schwefelwasserstoff, Aminovaleriansäure, Lysin, kein Tyrosin. Die Einwände von Tebb<sup>12</sup>), welche das Reticulin im wesentlichen für Kollagen, welches durch die Behandlung, besonders durch Alkohol und Äther, eine Umwandlung erlitten hat und sich infolgedessen schwerer in Glutin überführen läßt, hält Siegfried<sup>13</sup>) nicht für begründet.

**Chondrin.** 380. Chondrin. Die beim Erkalten gelatinierende Substanz der beim Kochen des Knorpels mit Wasser entstehenden Knorpelleimlösung ist kein einheitlicher Körper, sondern ein Gemenge von Glutin und Verbindungen der Chondroitinschwefelsäure mit Eiweiß und Leim. Die Reaktionen, welche eine Chondrinlösung von einer Glutinlösung unterscheiden (Fällbarkeit der ersteren durch Säuren und Metallsalze, Reduktion nach Kochen mit Säuren) sind bedingt durch die Anwesenheit der Chondroitinschwefelsäure (§ 257). Ein durch Behandeln mit Alkalien von der Chondroitinschwefelsäure befreiter Knorpel gibt, wie zuerst Morochowetz<sup>14</sup>) fand, beim Kochen eine typische Glutinlösung.

381. **Albumoid der Linse** nennt C. Th. Mörner<sup>15</sup>) die organische Grundsubstanz der Linsenfasern, die nach völliger Entfernung der Eiweißstoffe durch verdünnte Kochsalzlösung in der unveränderten Form der Fasern zurückbleibt. In Wasser und Salzlösungen ganz unlöslich, in verdünntem Ammoniak und Essigsäure sehr schwer löslich, sehr leicht löslich in verdünnten Mineral-

<sup>1</sup>) Monatshefte f. Chem. Bd. 10, S. 26. 1889.

<sup>2</sup>) Sitzungsber. d. preuß. Akad. d. Wiss. Bd. 28, S. 624. 1903. — Zickgraf: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 41, S. 259. 1904.

<sup>3</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 44, S. 229. 1905.

<sup>4</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 37, 3, S. 2928. 1904 u. Bd. 38, 1, S. 455. 1905.

<sup>5</sup>) Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 2, S. 238. 1902.

<sup>6</sup>) Monatshefte f. Chem. Bd. 27, S. 653. 1906; Bd. 28, S. 447. 1907.

<sup>7</sup>) Zeitschr. f. Biol. Bd. 49, S. 494. 1907.

<sup>8</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 98, S. 93 u. 97. 1917.

<sup>9</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 95, S. 26. 1915.

<sup>10</sup>) Habilitationsschrift. Leipzig 1892.

<sup>11</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 105, S. 157. 1919.

<sup>12</sup>) Journ. of physiol. Bd. 27, S. 463. 1902. <sup>13</sup>) desgl. Bd. 28, S. 319. 1902.

<sup>14</sup>) Verhandl. d. naturh.-med. Ver. zu Heidelberg Bd. 1, S. 480. 1877.

<sup>15</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 18, S. 61. 1894. — Jess: desgl. Bd. 110, S. 269. 1920; Bd. 122, S. 160. 1922.



säuren und verdünnten Laugen und aus diesen Lösungen durch Neutralisation wieder vollkommen fällbar. Durch die Behandlung mit verdünntem Alkali geht es in einen albuminatähnlichen Körper über, der nun zwar in Wasser und Salzlösung unlöslich, aber in verdünnter Essigsäure und Ammoniak sehr leicht löslich ist. Er hat die Zusammensetzung C 53,12, H 6,80, N 16,62, S 0,79%. Dieselbe Zusammensetzung zeigt das Albumoid. Millonsche, Adamkiewiczse, Xanthoprotein- und Schwefelbleiprobe positiv. Nitroprussidreaktion negativ. Über die bei der Hydrolyse entstehenden Spaltprodukte s. § 500.

382. **Albumoid des Knorpels** nennt C. Th. Mörner<sup>1)</sup> einen im Balkennetz der Grundsubstanz abgelagerten Körper, der bei wiederholtem Auskochen des Knorpels mit Wasser bei 110—120° zusammen mit den Knorpelzellen als schwammige Masse zurückbleibt. Hawk und Gies<sup>2)</sup> fanden für Präparate, bei deren Darstellung der Knorpel vor dem Auskochen mit Wasser noch mit verdünnter Salzsäure und verdünntem Alkali behandelt worden war, die Zusammensetzung C 50,46, H 7,05, N 14,95, S 1,86%. Es löst sich in Säuren und Alkalien bei Zimmertemperatur nur wenig, leicht beim Kochen, dabei in Acid- bzw. Alkalialbuminat übergehend. Magensaft löst langsam. Millonsche, Adamkiewiczse, Xanthoprotein- und Schwefelbleiprobe positiv.

383. **Albumoid des Knochens** (Osseoalbumoid) bleibt als Rückstand, wenn fein zerkleinerten Knochen die anorganischen Salze durch verdünnte Salzsäure, Mucoid und Nucleoproteid durch verdünnte Alkalien, und das Kollagen durch Auskochen mit Wasser entzogen werden. C 50,16, H 7,03, N 16,17, S 1,18%. Dem vorigen sehr ähnlich (Hawk und Gies<sup>2)</sup>).

384. **Tierische Membranine**<sup>3)</sup> bilden die Grundlage der Linsenkapselmembran und der Descemetschen Haut und werden bei der Behandlung dieser Gebilde mit verdünntem Alkali und Wasser als Rückstand erhalten. Das Membranin der Linsenkapselmembran enthält N 14,10, S 0,83%, das Membranin der Descemetschen Haut N 14,77, S 0,90%. Sie sind bei gewöhnlicher Temperatur in Wasser, Salzlösungen, verdünnten Säuren und Alkalien unlöslich, bei höheren Temperaturen (100—130°) lösen sie sich zu nicht gelatinierender Flüssigkeit. Konzentrierte Säuren und Alkalien lösen schon bei Zimmertemperatur. Es bilden sich dabei keine Albuminate. Durch Trypsin- und Pepsinverdauung werden sie gelöst. Biuret-, Xanthoprotein- und Millonsche Reaktion positiv. Nach dem Kochen mit Säuren reduziert die Flüssigkeit. Gegen alle Lösungsmittel ist das Membranin der Descemetschen Haut sehr viel widerstandsfähiger als das andere.

385. **Fibroin**, einer der beiden Hauptbestandteile der Seide, wird nach Cramer<sup>4)</sup> erhalten durch 2—3 mal wiederholtes je 3stündiges Kochen von Seide mit der 25fachen Menge Wasser bei 117—120—145° in einem Porzellan-gefäß. Dabei geht das Sericin (§ 388) in Lösung, während das Fibroin als eine Substanz von der Festigkeit, aber nicht mehr von dem Glanze und der Weichheit der Seide zurückbleibt. Nach Engel<sup>5)</sup> besteht die organische Grundsubstanz der Brutzellendeckel der Wespen aus Fibroin. Auch die Gespinste anderer Herkunft bestehen aus einem Fibroin (Abderhalden<sup>6)</sup>).

C 48,22, H 6,26, N 18,30% (Cramer). C 48,30, H 6,50, N 19,20% (Vignon<sup>7)</sup>). Es löst sich in konzentrierten Säuren und Alkalien und fällt beim Neutralisieren, allerdings verändert, wieder aus. Biuret-, Millonsche und Adamkiewiczse Reaktionen sind positiv, letztere schwach. Beim Eingießen der Lösung von Fibroin in konzentrierte Salzsäure in Alkohol fällt ein amorphes, in Wasser fast unlösliches Produkt aus, welches etwas weniger Stickstoff enthält als Fibroin und Sericoin genannt worden ist (Weyl<sup>8)</sup>).

Über die bei der Hydrolyse entstehenden Polypeptide s. § 406 ff. Bei stufenweiser Aufspaltung mit 50 volumenproz. Schwefelsäure bei 37° wurden 5% d-Alanyl-

<sup>1)</sup> Skandinav. Arch. f. Physiol. Bd. 1, S. 234. 1889.

<sup>2)</sup> Americ. Journ. of Physiol. Bd. 7, S. 340. 1902.

<sup>3)</sup> C. Th. Mörner: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 18, S. 233. 1894.

<sup>4)</sup> Journ. f. prakt. Chem. Bd. 96, S. 76. 1865.

<sup>5)</sup> Zeitschr. f. Biol. Bd. 27, S. 374. 1890.

<sup>6)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 74, S. 428. 1911; außerdem desgl. Bd. 58, S. 340. 1908/09; Bd. 59, S. 173. 1909; Bd. 59, S. 237. 1909; Bd. 61, S. 205, 256. 1909; Bd. 62, S. 129. 1909; Bd. 64, S. 460. 1910; Bd. 71, S. 365. 1911; Bd. 80, S. 202. 1912. — Suzuki u. Mitarbeiter: Journ. of Coll. Agric. Tokyo Bd. 1, S. 59. 1909.

<sup>7)</sup> Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 115, S. 613. 1892.

<sup>8)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 21, S. 1407. 1888.

glycinanhydrid, wenig Glycyl-1-Tyrosinanhydrid erhalten (Abderhalden<sup>1</sup>). Fibroin aus italienischer Seide enthält verhältnismäßig viel Glykokoll, Tussahseide ist weniger reich daran. Der Gehalt an Alanin und Tyrosin ist hoch, an Hexonbasen gering. Über die hydrolytischen Zersetzungsprodukte s. die Tabelle § 500.

**Nitrofibroin.** Nitrofibroin s. S. 515.

**386. Spinnenseide** (von *Nephila madagascariensis*) unterscheidet sich von der gewöhnlichen Seide durch das Fehlen von wasserlöslicher Substanz (Seidenleim) und zeigt große Ähnlichkeit mit dem Fibroin (E. Fischer<sup>2</sup>). Beim gelinden Erwärmen mit Normalalkali geht die natürliche gelbe bis orange Farbe der Seide in ein leuchtendes Gelbrot über und beim Kochen erfolgt Lösung unter Entwicklung von Ammoniak und Abnahme der Farbe. In starker Salzsäure löst es sich unter Entfärbung und gibt beim Fällen mit Alkohol ein Produkt von ähnlichen Eigenschaften wie das Sericoïn (§ 385). Auch in bezug auf die hydrolytischen Spaltungsprodukte kommt die Verwandtschaft mit dem Fibroin zum Ausdruck. S. die Tabelle § 500.

**387. Byssus** ist das an der Luft zu seidenartigen Fäden erstarrende Sekret der Fußdrüse mancher Muscheln. Über die hydrolytischen Spaltungsprodukte des braun gefärbten und seidenartig glänzenden Byssus von *Pinna nobilis* s. die Tabelle § 500.

**388. Sericin** (Seidenleim), der zweite Hauptbestandteil der Seide (15—28%), geht beim Auskochen von Seide mit Wasser in Lösung (s. § 385). Näheres über die Darstellung s. bei Bondi<sup>3</sup>). Farbloses Pulver von der Zusammensetzung C 44,32, H 6,18, N 18,30% (Cramer); C 45,0, H 6,32, N 17,13% (Bondi). In heißem Wasser löslich, aber leicht in unlösliche Modifikation übergehend. Die Lösung gelatiniert beim Erkalten und wird durch Alkohol teilweise gefällt. Essigsäure und Mineralsäuren rufen in bestimmten Mengenverhältnissen Niederschläge hervor, ebenso wirken viele Schwermetallsalze, sowie Gerbsäure, Pikrinsäure, Phosphorwolframsäure + Salzsäure fällend. Biuret-, Millonsche, Xanthoprotein-, Molischsche, Thymolprobe, Adamkiewicz-Hopkinsche und Liebermannsche Reaktion positiv, die anderen Farbenreaktionen negativ (Bondi, Türk, Abderhalden). Vom Stickstoff gehören 8,24% Amid- und 10,0% basischen Gruppen an (Wetzel<sup>4</sup>). Es ist ärmer an Glykokoll, Alanin und Tyrosin als Seidenfibroin.

**389. Conchiolin**, die organische Grundsubstanz der Schalen von Muscheln und Schnecken, wird dargestellt durch Entkalkung mit verdünnter Salzsäure und Behandlung mit 1 proz. Natronlauge, peptischer und tryptischer Verdauungsflüssigkeit, Wasser, Alkohol und Äther. Nach Krukenberg<sup>5</sup>) enthalten auch die Eierschalen von *Murex Conchiolin*. Es ist unlöslich in Wasser, Alkohol und Äther, nicht angreifbar durch Pepsin- und Trypsinverdauung, sehr widerstandsfähig gegen Natronlauge (besonders das Conchiolin aus älteren Schalen), wird aber schließlich darin aufgelöst; in der Kälte ist es in konzentrierten anorganischen Säuren nicht löslich, in der Wärme auch in verdünnten. Conchiolin aus roter Steckmuschel (*Pinna nobilis*) hat die Zusammensetzung: C 52,87, H 6,54, N 16,6, S 0,85% (Wetzel<sup>4</sup>). Biuret-, Xanthoprotein- und Millonsche Probe positiv, Adamkiewicz'sche und Schwefelbleiprobe negativ. Conchiolin aus *Miesmuscheln* (*Mytilus edulis*) lieferte bei der hydrolytischen Spaltung Ammoniak, Glykokoll, wenig Leucin, Tyrosin, durch Phosphorwolframsäure fällbare Stoffe (Wetzel).

**390. Cornein (Gorgonin)** ist von Valenciennes die hornige Substanz des Achsenskeletts von Gorgoniden (Hornkorallen) und Antipathiden genannt worden. Sie wird in derselben Weise wie das Conchiolin gewonnen und verhält sich diesem sehr ähnlich.

Die mehr oder weniger dunkel gefärbte Substanz hat nach Krukenberg<sup>6</sup>) die Zusammensetzung: C 48,78, H 5,95, N 17,07% und enthält außerdem Halogene (C. Th. Mörner<sup>7</sup>), und zwar ist Jod in allen Fällen von Spuren bis gegen 7%, Brom in allen Fällen (ausgenommen bei 2 Antipathiden) von 0,25—4%, Chlor in allen Fällen (in der Regel nur ein oder einige Zehntel Prozent, bei den Antipathiden 0,5—0,75%) gefunden worden. Ferner enthält Cornein Schwefel (0,5—1,5%). Schwache Millonsche Reaktion. Es ist vollkommen widerstandsfähig gegen Pepsinsalzsäure.

Kocht man Gorgonin mit verdünnter Schwefelsäure mehrere Stunden, engt die Lösung dann auf dem Wasserbad stark ein, so scheiden sich Krystalle ab, welche von Krukenberg als Corni-krystallin beschrieben, von C. Th. Mörner<sup>8</sup>) als Jod erkannt wurden. Untersuchungen über

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 120, S. 211. 1922. <sup>2</sup>) desgl. Bd. 53, S. 126. 1907.

<sup>3</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 34, S. 481. 1901/02. — Türk: desgl. Bd. 111, S. 70. 1920.

<sup>4</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 29, S. 386. 1900.

<sup>5</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 18, 1, S. 989. 1885. Zeitschr. f. Biol. Bd. 22, S. 241. 1886. — Vgl. auch Engel: Zeitschr. f. Biol. Bd. 27, S. 374. 1890 u. Bd. 28, S. 345. 1891.

<sup>6</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 17, 2, S. 1843. 1884. Vgl. physiol. Studien. Heidelberg 1881, 5. Abt., S. 1.

<sup>7</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 51, S. 33. 1907; Bd. 55, S. 77. 1908.

<sup>8</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 55, S. 223. 1908.

die Spaltungsprodukte des Gorgonin aus *Gorgonia Cavolini* sind von Drechsel<sup>1)</sup> und besonders von Henze<sup>2)</sup>, von A. Oswald<sup>3)</sup> und C. Th. Mörner<sup>4)</sup> ausgeführt worden. Bei der Spaltung mit Schwefelsäure entstehen in reichlicher Menge Tyrosin, Arginin und Lysin, in sehr geringer Menge Leucin, Histidin, ferner Schwefelwasserstoff und Ammoniak und viel Jod, wahrscheinlich auch Phenylalanin und Jodgorgosäure (§ 214). Glykokoll, Cystin, Asparagin- und Glutaminsäure scheinen nicht gebildet zu werden. Bei der Spaltung mit Barytwasser entstehen in reichlicher Menge Glykokoll, ferner Alanin, Leucin, Asparaginsäure, Glutaminsäure und Tyrosin, ferner Ammoniak und Jodgorgosäure und wahrscheinlich eine chlorhaltige krystallisierende Substanz von saurem Charakter. Aus dem Skelett von *Primnoa lepodifera* hat Mörner durch Barytspaltung Bromgorgosäure erhalten.

Pennatul. in, die organische Grundsubstanz des Achsenskeletts der Pennatulaceen Pennatul. in (C. Th. Mörner<sup>5)</sup>). Es enthält wenig Jod (bis zu 0,2%) und Chlor (bis zu 0,13%), etwas mehr Brom (bis zu 1,89%) und Schwefel (bis zu 1,4%), ist stets fast ungefärbt (schwach gelblich) und löst sich zum Teil schon bei der Digestion mit verdünnter Salz- oder Essigsäure, fast vollständig bei der Digestion mit Pepsinsalzsäure auf (Unterschied von Gorgonin).

391. Spong. in. Die Substanz der Bade- und anderer Schwämme wird durch Extraktion der fein zerkleinerten Schwämme mit verdünnter Salzsäure und Auswaschen mit Wasser gewonnen. Ein von Harnack<sup>6)</sup> aus Badeschwamm dargestelltes Spong. in hatte die Zusammensetzung: C 48,51, H 6,30, N 14,79, S 0,73, J 1,5, Asche 0,35%. Hundeshagen<sup>7)</sup> fand in der Trockensubstanz tropischer Hornschwämme 8—14% Jod. Es wird in Alkalien viel leichter zerklüftet und gelöst als Conchiolin und Cornein; auch kaltes Barytwasser löst es bei längerer Einwirkung. Ebenso wird es beim Erhitzen mit Wasser im zugeschmolzenen Glasrohr auf 160° gelöst. Konzentrierte Mineralsäuren lösen es in der Kälte nur sehr langsam. In Kupferoxydammoniaklösung schrumpft es zu zerreiblicher Masse. Biuret-, Schwefelbleiprobe, Xanthoprotein- und Molischsche Probe positiv, Proben von Millon und Adamkiewicz negativ. Bei mehrstündiger Einwirkung 0,5 proz. siedender Schwefelsäure entstehen Albumosen und Peptone, von denen (nach dem Verfahren von Pick, § 397) Heterospong. inose, Protospong. inose und eine Deuterosp. inose (es scheint nur eine einzige aufzutreten) isoliert und untersucht wurden (Strauß<sup>8)</sup>). Die Heterospong. inose ist durch ihren hohen Jod- und Schwefelgehalt ausgezeichnet, die Deuterosp. inose durch ihre starke Molischsche Reaktion. Die bei der Spaltung mit Säuren auftretende unlösliche Substanz ist zuerst von Harnack untersucht worden. Er nennt sie

Jodospong. in und erhielt sie durch achttägiges Behandeln von Spong. in mit 38 proz. Schwefel- Jodospong. in säure bei mäßig warmer Temperatur, Abfiltrieren der abgetrennten, fein verteilten pulverigen Masse, Lösen derselben in verdünnter Natronlauge, Wiederausfällen durch Mineralsäure und Wiederholung von Lösung und Fällung. Der feinflockige Niederschlag wird in Ammoniak gelöst, durch Eintragen von Ammonsulfat ausgesalzen und der Dialyse unterworfen. Er ist braunschwarz und hat die mittlere Zusammensetzung: C 45,01, H 5,95, N 9,62, S 6,29\*, J 8,20%. Es ist unlöslich in Wasser, leicht löslich in Alkalien. Biuret-, Molischsche und Adamkiewicz'sche Reaktion negativ, Schwefelbleiprobe positiv, Millon'sche Probe unsicher. Das Jod ist sehr fest gebunden, bei mehrstündigem Kochen mit verdünnter Schwefelsäure wird es sehr allmählich als Jodwasserstoff abgespalten, nicht aber durch Kochen oder Schmelzen mit Alkalien.

In ihren Eigenschaften ähnliche Substanzen, aber von anderer Zusammensetzung, besonders geringerem Schwefel- und Jodgehalt, erhielten auch Rosenfeld<sup>9)</sup> und Strauß. Über weitere Versuche zur Isolierung des jodhaltigen Atomkomplexes s. Scott<sup>10)</sup>.

Über die hydrolytischen Spaltungsprodukte des Spong. in s. die Tabelle § 500. Es treten bei der Spaltung auch Jod und Jodwasserstoff in erheblicher Menge auf und unterscheidet sich das Spong. in hierin vom Gorgonin, das sich auch mit Baryt viel leichter aufspalten läßt (Oswald<sup>11)</sup>). Tyrosin wurde nicht erhalten. Nach Zalocostas<sup>12)</sup> soll es in geringer Menge bei der Barytspaltung auftreten. Bei der Oxydation mit Salpetersäure entsteht Oxalsäure (Mörner<sup>13)</sup> und 0,3% p-Nitrobenzoesäure aus Phenylalanin<sup>14)</sup>.

Vollständige  
Hydrolyse des  
Spong. in.

\*) Ein Teil des Schwefels ist erst während der Behandlung mit Schwefelsäure eingetreten, denn ein in derselben Weise mit Salzsäure hergestelltes Präparat enthielt nur 4,7% S.

1) Zeitschr. f. Biol. Bd. 33, S. 90. 1890.

2) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 38, S. 60. 1903. 3) desgl. Bd. 75, S. 353. 1911.

4) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 88, S. 138. 1913.

5) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 55, S. 77. 1908. 6) desgl. Bd. 24, S. 412. 1898.

7) Zeitschr. f. angew. Chem. 1895, S. 473. 8) Über die Albuminoide. Heidelberg 1904.

9) Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 45, S. 51. 1901.

10) Biochem. Zeitschr. Bd. 1, S. 367. 1906.

11) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 75, S. 361. 1911.

12) Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 107, S. 252. 1888.

13) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 98, S. 112. 1917. 14) desgl. Bd. 98, S. 93. 1917.

## Umwandlungsprodukte einfacher Proteine.

### *Acidalbumine und Alkalialbuminate (Metaproteine).*

- Darstellung.** 392. **Acidalbumine (Syntonine<sup>1</sup>)** entstehen 1. durch Einwirkung von Säuren auf Eiweißstoffe. Die Schnelligkeit, mit der die Umwandlung erfolgt, ist bei den verschiedenen Eiweißstoffen verschieden (bei Globulinen leichter wie bei Albuminen, bei Eieralbumin leichter als bei Serumalbumin) und unabhängig von Konzentration der Säuren und Temperatur. Koagulierte Eiweißstoffe werden erst in der Wärme oder durch starke Mineralsäuren in Acidalbumin umgewandelt; 2. durch Einwirkung von Pepsin-Salzsäure auf native und koagulierte Eiweißstoffe, Fibrin; 3. bei der Fällung der Eiweißstoffe durch Salze schwerer Metalle, z. B. Eisenchlorid, Sublimat, Platinchlorid.
- Eigenschaften.** Sie sind in Wasser und neutralen Salzlösungen unlöslich, leicht löslich in verdünnten Säuren und verdünnten Alkalien, auch kohlen sauren Alkalien, und werden durch Neutralisation unverändert wieder ausgeschieden, zum Teil gallertartig wie das Syntonin aus Myosin. Ihr Bindungsvermögen für Säure hat um etwa 20% zugenommen, das für Lauge nicht. In einer alkalischen Lösung entsteht durch Zusatz einer Säure eine Fällung bei noch alkalischer Reaktion (Unterschied von Albuminaten). Beim Eintragen von Neutralsalzen in ihre saure Lösung fallen sie aus. Sie sind keine Säuren wie die Albuminate. Sie geben alle die in § 325 B beschriebenen Farbenreaktionen. Durch Einwirkung von Alkalien in mäßiger Wärme, auch von Alkalicarbonaten, werden sie in Albuminate übergeführt. Ihre Unlöslichkeit im Säureüberschuß mag zum Teil nur durch den Hydratations- und Ionisationszustand des Eiweißsalzes bedingt sein.

Die aus den einzelnen Eiweißstoffen hervorgegangenen Acidalbumine zeigen Verschiedenheit in Zusammensetzung, spezifischer Drehung usw.

- Hemiprotein.** Hemiprotein (Antialbumid). Durch Kochen mit verdünnten Säuren<sup>2</sup>, auch schon durch Säurewirkung bei niederer Temperatur<sup>3</sup> (die Bedingungen, unter denen die Bildung erfolgt, sind bei den einzelnen Eiweißstoffen sehr verschieden) entsteht aus Eiweiß neben in Säure löslichem Syntonin, Albumosen usw., ein Körper, der in Säure unlöslich, in Alkalien löslich, gegen Säure und Pepsin-Salzsäure sehr widerstandsfähig ist und erst beim Erhitzen mit stärkeren Säuren unter gleichzeitigem Zerfall in entferntere Spaltungsprodukte gelöst wird. Dieser Körper wurde von Schützenberger Hemiprotein, von Kühne<sup>4</sup> Antialbumid genannt. Vickery<sup>5</sup> lehnt die Präexistenz einer solchen Gruppe im Eiweiß ab.

Die Acidalbumine und Hemiproteine, ihre Beziehungen zueinander und zu den Eiweißstoffen, aus denen sie hervorgehen, bedürfen noch sehr der Untersuchung.

- Darstellung.** 393. **Albuminate (Alkalialbuminate, Albuminsäuren)** entstehen durch Einwirkung von Alkalien auf Eiweißstoffe schon bei gewöhnlicher Temperatur und geringem Alkaleszenzgrad, schneller in der Wärme und bei stärkerer Konzentration<sup>6</sup>). Beim Zusammenbringen von starken Alkalien und konzentrierten

<sup>1</sup>) Panum: Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. Bd. 4, S. 419. 1851. — Hoppe-Seyler: Zeitschr. f. analyt. Chem. Bd. 3, S. 424. — Soyka: Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 12, S. 347. 1876. — Mörner: desgl. Bd. 17, S. 468. 1878. — Rollett: Sitzungsber. d. Akad. Wien Bd. 84, Abt. III, S. 332. 1881. — Johansson: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 9, S. 310. 1885. — Goldschmidt: Diss. Straßburg 1898. — Pauli u. Handovsky: Biochem. Zeitschr. Bd. 18, S. 340. 1909. — Adolf u. Spiegel: desgl. Bd. 104, S. 175. 1920. — Wagner: desgl. Bd. 104, S. 190. 1920.

<sup>2</sup>) Schützenberger: Bull. de la soc. chim. de Paris Bd. 23, S. 121. 1875.

<sup>3</sup>) Goldschmidt: a. a. O.

<sup>4</sup>) Zeitschr. f. Biol. Bd. 19, S. 159. 1883.

<sup>5</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 56, S. 415. 1923.

<sup>6</sup>) Lieberkühn: Poggendorffs Ann. Bd. 86, S. 118. 1852. — Hoppe-Seyler: a. a. O. — Soyka: a. a. O. — Mörner: a. a. O. — Rollett: a. a. O. — Schmiedeberg: Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 39, S. 1. 1897. — Maas: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 30, S. 61. 1900.

Eiweißlösungen scheidet sich das Albuminat als Gallerte ab (Lieberkühn). Die Umwandlung koagulierter Eiweißstoffe findet erst in der Wärme oder durch starke Alkalien statt.

Die Bildung geht einher mit einer Abspaltung von Ammoniak, evtl. auch von Schwefelwasserstoff<sup>1)</sup>; sie können nicht in Acidalbumine umgewandelt werden.

Sie sind in Wasser und Alkohol etwas löslich, in neutralen Salzlösungen unlöslich, leicht löslich in verdünnten Säuren und Alkalien, auch kohlen-sauren Alkalien, durch Neutralisation wieder abscheidbar, und zwar erfolgt die Fällung einer alkalischen Lösung auf Zusatz einer Säure bei saurer Reaktion (Unterschied von den Acidalbuminen). Aus den sauren Lösungen werden sie durch Eintragen von Neutralsalz gefällt, aus den alkalischen nur schwierig oder gar nicht. Die Albuminate sind Säuren, ihre wässerigen Lösungen reagieren sauer; in Wasser zerteilt treiben sie aus Barium-, Strontium-, Calciumcarbonaten Kohlensäure aus und lösen sich als Verbindungen mit diesen Metallen (Unterschied von Acidalbuminen). Aus ihren möglichst neutralen Lösungen werden sie durch Kupfersalze und andere Schwermetallsalze gefällt. Sie geben die Farbenreaktionen (§ 325 B), die Schwefelbleiprobe kann negativ ausfallen. Sie drehen die Ebene des polarisierten Lichtes stärker nach links als die Eiweißstoffe, aus denen sie entstanden, nach vorübergehender „Racemisierung“ des Proteins (Kossel, Dakin, § 324). Serumalbumin zeigt bei Behandlung mit starker Kalilauge eine Steigerung von  $[\alpha]_D$  auf  $-86,0^\circ$ , Eieralbumin auf  $-47,0^\circ$ .

Die einzelnen Albuminate zeigen Verschiedenheiten untereinander, je nach der Herkunft und der Intensität der Alkaliwirkung.

Körper, die sich den Reaktionen nach wie Alkalialbuminate verhalten, entstehen auch durch Einwirkung von organischen Basen, Cholin, Piperidin, ferner von Harnstoff und anderen Säureamiden (die hier wie typische Basen wirken) in konzentrierter Lösung auf Eiweißlösungen. Diese Stoffe vermögen auch koagulierte Eiweißstoffe zu lösen<sup>2)</sup>.

#### *Intermediäre Spaltungsprodukte der Eiweißstoffe und ihrer Umwandlungsprodukte.*

394. Durch Fermente, Einwirkung von Wasser bei erhöhter Temperatur, von Mineralsäuren, Alkalien, oxydierenden Mitteln, Mikroorganismen erfahren die nativen Eiweißstoffe und ihre Umwandlungsprodukte (ebenso wie andere Proteine) eine mehr und mehr fortschreitende hydrolytische Spaltung, welche, wenn die spaltenden Kräfte stark genug sind, schließlich eine vollständige wird (Zerfall in Aminosäuren und Diaminosäuren). Aus der großen Zahl intermediärer Spaltungsprodukte, welche bei diesem Prozeß neben- und nacheinander auftreten, sind unzweifelhafte chemische Individuen bisher nur in kleiner Anzahl isoliert worden. Sie stellen alle schon verhältnismäßig kleine Moleküle dar und gehören in die Gruppe der Polypeptide (§ 405 ff.). Die Hauptmenge des Gemisches der Spaltungsprodukte, speziell die ganze Menge der der Muttersubstanz noch näher stehenden und noch Eiweißcharakter zeigenden Produkte der Hydrolyse, harrt trotz vielfacher Bemühungen noch der Entwirrung. Man nennt nach einem Vorschlage von Kühne die durch Ammonsulfat ausfällbaren Spaltungsprodukte Albumosen (§§ 395 ff.), die durch dieses Salz nicht fällbaren und noch Biuretreaktion gebenden Peptone (§ 401 ff.), und nimmt an, daß erstere größere Moleküle darstellen, während in den Peptonen Produkte einer weiter vorgeschrittenen Hydrolyse vorliegen.

<sup>1)</sup> Dakin u. Dudley: Journ. of biol. chem. Bd. 15, S. 263. 1913. — Harris: Proc. of the roy. soc. of London (B) Bd. 94, S. 426. 1923.

<sup>2)</sup> Vgl. darüber Spiro: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 30, S. 182. 1900.

Diese Auffassung ist nicht mehr aufrecht zu erhalten, seitdem man weiß, daß manche einfach zusammengesetzte Polypeptide ebenfalls durch Ammonsulfat aussalzbar sind, während andere komplizierter gebaute diese Fällbarkeit nicht zeigen. Skraup und v. Hardt-Stremayr<sup>1)</sup> halten die Abspaltung von Ammoniak beim Beginn der Hydrolyse zur Bildung von Albumosen für wichtig.

Das Prinzip, auf dem diese Trennung beruht, das verschiedene Verhalten der einzelnen Spaltungsprodukte Salzen gegenüber, ist auch zur weiteren Aufteilung der Albumosen benutzt worden. Es mag hier gleich bemerkt werden, daß eine Isolierung chemischer Individuen mit diesen Methoden nicht möglich ist.

Aus dem Peptongemenge hat Siegfried einige Substanzen isoliert (§ 404). Hierher gehört eine Gruppe basischer Spaltungsprodukte, welche Siegfried isoliert und als Protokyrine (§ 404) beschrieben hat.

### Albumosen.

395. Die Trennung\*) der Albumosen von den Peptonen und der Albumosen voneinander mit Hilfe von Salzfällungen ist zuerst von Kühne und seinen Schülern Chittenden und Neumeister<sup>2)</sup> in Angriff genommen, dann von Hofmeister und seinen Schülern<sup>3)</sup> weitergeführt worden. Aber erst Haslam<sup>4)</sup> hat die Methode auf eine zuverlässigere Basis gestellt und die einzelnen Fraktionen besser voneinander trennen gelehrt.

Darstellung nach  
Kühne.

396. Darstellung nach Kühne. 1. Kühne benutzte zur Trennung von Albumosen und Peptonen Ammonsulfat: Bei der Sättigung der Lösung mit Ammonsulfat fallen die Albumosen aus, die Peptone nicht. Unter den Albumosen unterschied er primäre Albumosen\*\*) (Protalbumose und Heteroalbumose) und Deuteroalbumosen\*\*), deren Trennung durch Kochsalz bewirkt wurde. Der beim Sättigen der neutralen Lösung mit Kochsalz entstehende Niederschlag besteht aus primären Albumosen, im Filtrat ruft mit Kochsalz gesättigte Salzsäure einen zweiten Niederschlag hervor (Rest der primären Albumosen und Deuteroalbumosen). Das Filtrat dieses Niederschlages enthält nur Deuteroalbumosen. Die Trennung der primären Albumosen geschieht mit Hilfe der Diffusion: Die Heteroalbumose scheidet sich dabei als in reinem Wasser sehr wenig löslich ab, die Protalbumose bleibt in Lösung.

Darstellung nach  
Pick.

397. Darstellung nach Pick<sup>5)</sup>. Hofmeister und seine Schüler benutzen zur Trennung die fraktionierte Fällung mit Ammonsulfat und verfahren in folgender Weise:

Die Flüssigkeit, z. B. eine 5proz. Lösung von Pepton-Witte oder eine von koagulablen Eiweißstoffen und vom Neutralisationsniederschlag befreite peptische Verdauungsflüssigkeit wird mit dem gleichen Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung gefällt, die abgeschiedene Masse mit halbgesättigter Ammonsulfatlösung gewaschen, in heißem Wasser gelöst und in derselben Weise wieder gefällt. Lösung und Fällung werden wiederholt: Fraktion I. (Primäre Albumosen.)

Das Filtrat wird durch Zusatz des halben Volumens gesättigter Ammonsulfatlösung auf  $\frac{2}{3}$  Sättigung gebracht, die sich absetzende Masse mit einer  $\frac{2}{3}$  gesättigten Ammonsulfatlösung gewaschen und durch Wiederholung von Lösung und Fällung gereinigt: Fraktion II. (Deuteroalbumose A.)

Das Filtrat wird durch Eintragen von feingepulvertem Ammonsulfat gesättigt, die Abscheidung mit gesättigter Ammonsulfatlösung gewaschen, durch wiederholtes Lösen und Fällern gereinigt: Fraktion III. (Deuteroalbumose B.)

\*) Als Untersuchungsmaterial hat in den meisten Fällen das sog. Wittepepton, ein durch peptische Verdauung von Fibrin gewonnenes Präparat, gedient.

\*\*) Diese Namen, welche ursprünglich in der Annahme gewählt wurden, daß die Deuteroalbumosen erst sekundär aus den Protalbumosen entstanden sind, sagen über die genetischen Beziehungen der einzelnen Albumosen zueinander nichts aus (Pick<sup>5)</sup>, (Zunz<sup>6)</sup>).

<sup>1)</sup> Monatshefte f. Chem. Bd. 29, S. 255. 1909.

<sup>2)</sup> Kühne u. Chittenden: Zeitschr. f. Biol. Bd. 20, S. 11. 1884. — Kühne: Verhandl. d. naturh.-med. Vereins zu Heidelberg N. F. Bd. 3, S. 286. 1885. — Neumeister: Zeitschr. f. Biol. Bd. 23, S. 381. 1887; Bd. 24, S. 267. 1888; Bd. 26, S. 324. 1889. — Kühne: Zeitschr. f. Biol. Bd. 29, S. 1. 1892.

<sup>3)</sup> Pick: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 24, S. 267. 1898; Bd. 28, S. 219. 1899. Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 2, S. 481. 1902.

<sup>4)</sup> Journ. of physiol. Bd. 32, S. 267. 1905; Bd. 36, S. 164. 1907/08.

<sup>5)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 24, S. 267. 1898. <sup>6)</sup> desgl. Bd. 28, S. 132. 1899.

Das Filtrat wird mit  $\frac{1}{10}$  Vol. ammoniumsulfatgesättigter  $\frac{n}{10}$ -Schwefelsäure versetzt, die Abscheidung in entsprechender Weise behandelt: Fraktion IV. (Deuteroalbumose C.)

Das Filtrat wird mit einer ammoniumsulfatgesättigten Jodjodkalilösung (2 Tl. Jodkali, 1 Tl. Jod) so lange versetzt, bis eine Probe der Flüssigkeit keine Fällung mehr gibt. Der in 96proz. Alkohol gebrachte Niederschlag löst sich zum Teil. Der unlösliche Teil wird in wenig warmem Wasser gelöst, die schwachsaure jodjodkaliumhaltige Flüssigkeit mit Ammonsulfat gesättigt und mit salzgesättigter Jodjodkalilösung gefällt. Der in warmem Wasser gelöste Niederschlag fällt auf Zusatz von überschüssigem 96proz. Alkohol wieder aus und wird nach dem Auswaschen mit Alkohol durch Schütteln mit Äther von den letzten Jodresten befreit: Fraktion V. (Pepton A.)

Der in Alkohol lösliche Teil wird nach dem Verdunsten des Alkohols in Wasser gelöst, durch Schütteln mit Äther und Äther-Chloroform (evtl. durch Kochen seiner wässerigen neutralen Lösung mit Bleioxyd) jodfrei gemacht und zur Trockne eingedampft. Es bleibt ein fester gelbgefärbter Körper zurück: Fraktion VI. (Pepton B.)

Von diesen 6 Fraktionen entsprechen die erste den primären Albumosen, die zweite dritte und vierte den Deuteroalbumosen, die fünfte und sechste den Peptonen Kühnes.

Pick hat dann weiter, besonders mit Hilfe von Alkohol, die Fraktion I<sup>1)</sup> in Hetero- und Protalbumose zerlegt und auch die Fraktionen II und III<sup>2)</sup> noch weiter geteilt.

E. Zunz<sup>3)</sup> hat Protalbumose noch weiter mit 50proz. Alkohol aufgeteilt; der unlösliche Anteil gleicht Haslams  $\alpha$ -Protalbumose, der lösliche Anteil der  $\beta$ -Protalbumose (S. 499). Levene<sup>4)</sup> und Birchard<sup>5)</sup> benutzten ebenfalls Alkohol zur Aufteilung und reinigten die Heteroalbumose durch Dialyse, die Protalbumose mit Hilfe der Carbinoreaktion Siegfrieds. Der lösliche Teil wurde dann wieder mit Alkohol gefällt. Vgl. auch Heiduschka und Komm<sup>6)</sup>.

**398. Darstellung nach Haslam.** Haslam<sup>7)</sup>, wie schon andere vor ihm, z. B. Cerny<sup>8)</sup>, zeigte, daß durch die übliche Methode der fraktionierten Fällung keine Trennung erreicht wird, indem jede Fraktion mehr oder weniger Beimengungen anderer Fraktionen enthält, und gab folgende Verfahren zur Prüfung einer Fraktion auf Beimengung schwerer und leichter fällbarer Anteile und zur Entfernung solcher Beimengungen an.

Darstellung  
nach Haslam.

Zur Prüfung einer Fraktion auf Beimengung schwerer fällbarer Stoffe, welche also an und für sich erst bei reichem Salz- oder Alkoholgehalt ausfallen, wird die Substanz in einer bestimmten Menge Wasser gelöst, das Fällungsmittel in der der Fraktion entsprechenden Menge zugefügt, der Niederschlag nach längerem Stehen abfiltriert und in ganz derselben Weise nochmals behandelt. Ergeben nun Stickstoffbestimmungen in beiden Filtraten, daß das erste Filtrat mehr Stickstoff enthält als das zweite, so ist die Fraktion noch mit schwerer fällbaren Anteilen verunreinigt. Um sie zu entfernen, wiederholt man das eben beschriebene Verfahren so lange, bis zwei aufeinanderfolgende Filtrate denselben Stickstoffgehalt zeigen.

Zur Prüfung einer Fraktion auf Beimengung leichter fällbarer Stoffe, welche also an und für sich schon bei geringerem Salz- oder Alkoholgehalt ausfallen, wird die Substanz in einer bestimmten Menge Wasser gelöst und mit gemessener Menge des Fällungsmittels bis zum ersten Auftreten eines Niederschlages versetzt, dieser Niederschlag abfiltriert, seine wässrige Lösung gemessen und wieder mit gemessener Menge des Fällungsmittels versetzt. Erfolgt jetzt die Fällung früher, d. h. schon bei Zusatz von weniger Fällungsmittel, so enthält die Fraktion leichter fällbare Anteile beigemischt. Auch die Beimengung einer an und für sich unlöslichen Substanz, welche nur durch die vorhandenen löslichen Stoffe in Lösung gehalten wird, läßt sich auf diese Weise feststellen, indem der auf Zusatz des Fällungsmittels zuerst ausfallende Anteil sich nun als in Wasser unlöslich erweist. Auch auf dieses Prinzip der Subfraktionierung läßt sich eine freilich sehr umständliche und mit großem Materialverlust einhergehende Reinigung aufbauen.

Abscheidung der Albumosen aus einem Albumose-Peptongemisch. Die verdünnte etwa 2proz. Lösung wird bei 37° mit Natriumsulfat\*) gesättigt und nach 3stündigem Stehen bei dieser Temperatur der entstandene

\*) Die Sättigung mit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  bei 37° fällt ebenso vollständig wie die mit Ammonsulfat, dieser aber wegen der Stickstoffbestimmungen in diesem Fall vorzuziehen.

1) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 28, S. 219. 1899.

2) Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 2, S. 481. 1902.

3) Chem. Zentralbl. 1911, II, S. 1819. 4) Journ. of biol. chem. Bd. 1, S. 45. 1905/06.

5) Levene, van Slyke u. Birchard: Journ. of biol. chem. Bd. 8, S. 270. 1910/11; Bd. 10, S. 57. 1911. — Birchard: Diss. Leipzig 1907.

6) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 126, S. 261. 1923.

7) Journ. of physiol. Bd. 32, S. 267. 1905; Bd. 36, S. 164. 1907/08.

8) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 87, S. 614. 1901.

Niederschlag abfiltriert. Ein Waschen des Niederschlags mit gesättigter Natriumsulfatlösung hat keinen Zweck. Man zerreibt ihn mit kleinen Mengen gesättigter Natriumsulfatlösung etwa 20 Minuten bei 50°, filtriert und wiederholt das Zerreiben und Filtrieren so oft, bis 2—3 ccm des Filtrats beim Erhitzen mit dem gleichen Volumen konzentrierter Schwefelsäure nur eine leichte Färbung zeigen und 2 aufeinanderfolgende Filtrate, in dieser Weise geprüft, keinen Unterschied in der Färbung erkennen lassen. Jetzt löst man in gemessener Menge Wasser, sättigt bei 37° mit Natriumsulfat, filtriert nach 3stündigem Stehen bei dieser Temperatur, wiederholt Lösung und Fällung nochmals in derselben Weise und bestimmt in den beiden Filtraten die Stickstoffmenge. Wenn sie gleich ist oder wenigstens in der vorangehenden nicht höher als in der folgenden, so ist die Trennung beendet, andernfalls muß Lösung, Fällung und Stickstoffbestimmung (nach Kjeldahl) wiederholt werden. Zur Abscheidung der Albumosen kann man nach Entfernung des Salzes durch Dialyse und Einengen mit Alkohol fällen.

Abscheidung der primären Albumosen aus einem Albumose-Peptongemisch oder einem Albumosengemenge. Die verdünnte (etwa 1 proz.) Lösung wird mit dem gleichen Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt, der Niederschlag abfiltriert, in Wasser gelöst, die Lösung wieder mit dem gleichen Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt und dieses Verfahren fortgesetzt, bis 2 aufeinanderfolgende Filtrate den gleichen Stickstoffgehalt (nach Kjeldahl) zeigen. Die orientierende Probe mit konzentrierter Schwefelsäure ist hier nicht anwendbar. Vor Ausführung der Stickstoffbestimmung ist das Ammoniak zu entfernen. Zu dem Zwecke erwärmt man die Flüssigkeit in einer Schale auf dem Wasserbade mit Magnesia bis zum Verschwinden der Ammoniakreaktion und setzt dann das Erwärmen noch eine Viertelstunde fort.

Abscheidung der Deuteroalbumosen aus einem Albumosengemenge. Die Lösung wird mit dem gleichen Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung gefällt, das Filtrat mit Ammonsulfat gesättigt, der Niederschlag in Wasser gelöst usw., bis die Lösung bei Halbsättigung mit Ammonsulfat keinen oder nur einen ganz geringen Niederschlag gibt. Diese Lösung, welche ungefähr 2 proz. sein soll, wird mit einer gesättigten Ammonsulfatlösung versetzt, bis ein geringer Niederschlag erscheint. Er wird abfiltriert, in Wasser zu etwa 2% gelöst, die Lösung mit dem gleichen Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt, der dabei entstehende Niederschlag abfiltriert, das Filtrat der Hauptflüssigkeit zugefügt. In dieser Weise fährt man fort, entfernt so nach und nach immer mehr von den noch vorhandenen primären Albumosen, bis man schließlich eine Fällung erhält, deren wässrige Lösung auf Zusatz des gleichen Volumens gesättigter Ammonsulfatlösung keinen Niederschlag gibt. Jetzt stellt die Lösung eine annähernd reine Deuteroalbumosenlösung dar, wenn auch kleine Quantitäten von primären Albumosen durch Subfraktionierung der Fraktionen immer noch nachgewiesen und entfernt werden können. Zur Abscheidung der Albumosen kann man die durch Dialyse von der Hauptmenge und durch Baryt von den Resten der Schwefelsäure befreite Lösung nach Einengen mit Alkohol fällen.

Weitere Aufteilung der primären und Deuteroalbumosen. Aus den primären Albumosen isolierte Haslam mit Hilfe von Alkohol als Fällungsmittel und unter Benutzung von prinzipiell gleichem Verfahren 3 Albumosen (Heteroalbumose,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Protoalbumose) und ebenso aus den Deuteroalbumosen 2 Albumosen ( $\alpha$ - und  $\beta$ -Deuteroalbumose).

Eine Trennung der Deuteroalbumosen mit Hilfe von weiterer fraktionierter Ammonsulfatfällung, wie sie Pick ausgeführt hat (§ 397), gelingt nach Haslam



nicht, ebenso existiert nach ihm die Deuteroalbumose C von Pick (§ 397) als besondere Fraktion nicht.

**399. Allgemeine Eigenschaften der Albumosen.** Es sind amorphe Substanzen, mit Ausnahme der Heteroalbumose in Wasser löslich, beim Erhitzen nicht koagulierbar, linksdrehend, etwas diffundierend. Durch Neutralsalze und durch Alkohol verschieden leicht fällbar, aber auch durch längere Einwirkung von Alkohol nicht koagulierbar, alle beim Sättigen ihrer Lösung mit Natriumsulfat bei 37° und mit Ammonsulfat fällbar.

Eigenschaften der Albumosen im Allgemeinen.

Salpetersäure ruft bei Gegenwart von Salz einen Niederschlag hervor, der sich beim Erwärmen löst, um beim Erkalten wiederzukommen und auch in überschüssiger Säure löslich ist (dieses Verhalten gilt als für die Albumosen besonders charakteristisch). Pikrinsäure, Gerbsäure ohne und mit gleichzeitiger Kochsalzsättigung, Quecksilberjodidjodkalium + Salzsäure, Wismutjodidjodwasserstoffsäure\*), Phosphorwolframsäure rufen Niederschläge hervor. Die Fällung mit Phosphorwolframsäure ist verhältnismäßig wenig löslich in Acetonwasser (Wechsler<sup>1</sup>). Ferrocyanidkalium + Essigsäure, Kupfersulfat, Kupferacetat rufen in manchen Albumoselösungen Trübungen oder Niederschläge hervor, in anderen nicht\*\*). Manche der Fällungen lösen sich beim Erwärmen ganz oder teilweise und erscheinen beim Abkühlen wieder\*\*\*).

Biuret- und Xanthoproteinreaktion positiv, die erstere zeigt einen mehr roten Farbenton, von den übrigen Farbenreaktionen kann die eine bei dieser, die andere bei jener Albumose schwächer auftreten oder ganz fehlen.

**400.** Was die einzelnen isolierten Albumosen betrifft, so sind die von Pick dargestellten Prot- und Heteroalbumose<sup>2</sup>), welche sich in Eigenschaften und Zusammensetzung von den Kühneshen unterscheiden, und ebenso die von Pick isolierten Deuteroalbumosen<sup>3</sup>) eingehend beschrieben. Eine tabellarische Übersicht über die Zusammensetzung und manche Eigenschaften dieser Albumosen, besonders auch über ihre Farbenreaktionen, findet sich bei Pick<sup>3</sup>) und E. Zunz<sup>4</sup>).

Einzelne Albumosen und ihre Eigenschaften.

Über die von Haslam isolierten Albumosen, welche ihrer Darstellung nach als die reinsten angesehen werden müssen, liegen folgende allerdings nur spärliche Angaben vor:

$\alpha$ -Protalbumose. Leicht löslich in Wasser und aus dieser Lösung schon auf Zusatz von weniger als dem gleichen Volum Alkohol fast vollständig fällbar, auch bei 40°. Durch Halbsättigung mit Ammonsulfat fällbar, ebenso, wenn auch nicht ganz so vollständig, durch Sättigung mit Kochsalz. Adamkiewiczische Probe positiv, bei Millonscher Reaktion nur tiefgelbe Farbe.

$\alpha$ -Protalbumose von Haslam.

Levene und Birchard Albumose (S. 497) enthielt vom Gesamtstickstoff 6,58% als Amino-stickstoff. Der Gehalt an Glutaminsäure ist im Gegensatz zu dem der Heteroalbumose von Levene und Birchard (S. 500) sehr gering, vielleicht sogar gleich Null bei weiterer Reinigung. Ebenso ist die Leucingruppe, besonders Valin, in der Protalbumose wenig enthalten, im Gehalt an Hexonbasen besteht kein Unterschied zwischen beiden.

Protalbumose von Levene und Birchard.

$\beta$ -Protalbumose. Leicht löslich in Wasser und ebenso in gleichen Teilen Alkohol und Wasser. Gegen Ammoniumsulfat und Kochsalz verhält sie sich ebenso wie die  $\alpha$ -Protalbumose. Adamkiewiczische Reaktion positiv, ebenso Millonsche Reaktion.

$\beta$ -Protalbumose von Haslam.

\*) 50 g Jodnatrium, 100 g Jodwismut in 100 ccm 0,5proz. Jodwasserstoffsäure in Wasser; man fällt bei Gegenwart von 0,25% Jodwasserstoffsäure.

\*\*) Mit Hilfe des verschiedenen Verhaltens zu Kupferacetat hat Folin<sup>5</sup>) eine Trennung der Albumosen vorgenommen.

\*\*\*) Gerbsäure wird mit Bleiacetat nach Lösen der Fällung in Acetonwasser entfernt, die Schwermetalle mit Schwefelwasserstoff, von den dann noch vorhandenen Salzen usw. wird am besten durch Fällung mit Phosphorwolframsäure befreit<sup>6</sup>).

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 73, S. 138. 1911.

<sup>2</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 28, S. 219. 1899; s. auch Friedmann: desgl. Bd. 29, S. 51. 1900. — Haslam: desgl. Bd. 32, S. 54. 1901. — Hart: desgl. Bd. 33, S. 347. 1901. — Levene: Journ. of biol. chem. Bd. 1, S. 45. 1905. — Zunz: Ann. et bull. de la soc. roy. des sciences méd. et natur. de Bruxelles Bd. 13, Heft 3; ref. Biochem. Zentralbl. Bd. 3, S. 432. 1904/05.

<sup>3</sup>) Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 2, S. 481. 1902.

<sup>4</sup>) Bull. acad. roy. Belgique, Classe des sciences 1911, S. 653—734.

<sup>5</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 25, S. 152. 1898. S. dazu Haslam: Journ. of physiol. Bd. 32, S. 295. 1905.

<sup>6</sup>) Kossel u. Weiß: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 68, S. 167. 1910.

Heteroalbumose von Haslam.	Heteroalbumose. Sehr wenig löslich in Wasser, auch in heißem. Adamkiewiczische Reaktion positiv, Molischsche Reaktion stark, bei Millonscher Reaktion nur tiefgelbe Farbe.
Heteroalbumose von Levene und Birchard.	Levene und Birchards <sup>1)</sup> Heteroalbumose (S. 497) löste sich nur zu 0,025%. $[\alpha]_D = -70,11^\circ$ . 6,3% vom Gesamtstickstoff reagiert vor der Hydrolyse nach van Slyke. Hoher Gehalt an Glutaminsäure im Gegensatz zu der Protalbumose der beiden Autoren (S. 499).
$\alpha$ -Deuteroalbumose von Haslam.	$\alpha$ -Deuteroalbumose. Leicht löslich in Wasser, nicht fällbar durch Sättigung ihrer Lösung mit Kochsalz, wohl aber durch Sättigung mit Ammonsulfat, und zwar in Form von Krusten, welche an der Oberfläche schwimmen. Adamkiewiczische Reaktion positiv, die Reaktionen von Molisch und Millon sind schwach ausgeprägt.
$\beta$ -Deuteroalbumose von Haslam.	$\beta$ -Deuteroalbumose. Leicht löslich in Wasser, verhält sich gegen Kochsalz und Ammonsulfat wie die vorige, fällt aber als klebrige, an Wandungen und Glasstab haftende Masse aus. Adamkiewiczische Reaktion positiv, die Molischsche Reaktion fällt noch schwächer und die Millonsche Reaktion stärker aus als bei der vorigen.
Atmidalbumin, Atmidalbumose.	Atmidalbumin und Atmidalbumose nennt Neumeister <sup>2)</sup> Stoffe, die beim einständigen Erhitzen von Fibrin und anderen Eiweißstoffen mit Wasser auf $160^\circ$ unter Schwefelwasserstoffentwicklung entstehen und von denen das Atmidalbumin zwischen den Eiweißstoffen und Albumosen steht, die Atmidalbumose eine Albumose darstellt. Gegen Verdauungsfermente sind sie widerstandsfähig, durch Kochen mit Schwefelsäure entstehen Deuteroalbumosen und Peptone.
Deuterokeratose.	Deuterokeratose <sup>3)</sup> aus Horn durch $\frac{n}{2}$ - und $\frac{n}{1}$ -Natronlauge bei $70^\circ$ während 14 Tagen entstehend; hellgelbes, wenig hygroskopisches Pulver, etwa 12,5% N, 1,97% S. $[\alpha]_D = -34,7$ bis $-39^\circ$ , bei Darstellung durch Säure $-50,9^\circ$ . Keine Aufspaltung durch Pepsin und Trypsin, langsame Aufspaltung durch Trypsin + Erepsin. Stickstoffverteilung nach van Slyke ergab etwa 30% basischen Stickstoff. Auf gleiche Weise aus Casein und Weizeneiweiß durch Lauge hergestellte Albumosen wurden durch die proteolytischen Fermente nicht angegriffen. Über „Albumose“ aus Horn durch trockenes Erhitzen im abgeschlossenen Raum s. Heiduschka und Komm <sup>4)</sup> und ihre weitere Aufteilung nach der Methode von Pick dieselben <sup>5)</sup> .
Alkalialbumose.	Als Alkalialbumose beschreibt Maas <sup>6)</sup> einen Körper, den er durch mehrstündige Einwirkung von Normalkalilauge auf Hühnereiweiß im kochenden Wasserbade erhielt und der in seinen Eigenschaften von den Verdauungsprodukten weit abweicht.

### Peptone.

Darstellung nach Siegfried.

**401. Darstellung der Peptone nach Siegfried.** Zur Darstellung wird die nur noch wenig Albumosen enthaltende Verdauungsflüssigkeit in saurer, neutraler und ammoniakalischer Lösung mit Ammonsulfat gesättigt, von den sich ausscheidenden Albumosen befreit und nun nach Ansäuern mit Schwefelsäure mit Ammonsulfat gesättigter Eisenammoniakalaunlösung ausgefällt (Niederschlag 1). Im Filtrat ruft weiterer Zusatz derselben Eisenammoniakalaunlösung und Neutralisation mit konzentriertem wässrigen Ammoniak eine neue Fällung (Zwischenfällung) hervor, welche verworfen wird. In das Filtrat rührt man nun feingepulverten Eisenammoniakalaun ein und stumpft die saure Reaktion mit konzentriertem wässrigen Ammoniak unter Vermeidung der Neutralisation ab. Das Einrühren des Eisenammoniakalauns und Abstumpfen mit Ammoniak wird abwechselnd solange wiederholt, bis nach Absitzen des Niederschlags (Niederschlag 2) eine Probe nur noch eine schwache Biuretreaktion gibt. Niemals darf dabei die Reaktion neutral werden.

Nachdem nun beide Eisenniederschläge mehrfach mit gesättigter Ammonsulfatlösung verrieben und abgenutscht sind, wird Niederschlag 1 in Wasser verrührt und mit Ammoniak zerlegt. Nach Entfernen des Eisenhydroxyds

<sup>1)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 8, S. 270. 1910/11; Bd. 10, S. 57. 1911.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. Biol. Bd. 26, S. 57. 1889; Bd. 36, S. 420. 1898. — Salkowski: desgl. Bd. 34, S. 190. 1896; Bd. 37, S. 404. 1899. — Chittenden u. Maas: Journ. of physiol. Bd. 15, S. 501. 1894.

<sup>3)</sup> Langecker: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 108, S. 230. 1919.

<sup>4)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 121, S. 221; Bd. 124, S. 37. 1923.

<sup>5)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 126, S. 261. 1923.

<sup>6)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 30, S. 61. 1900.

befreit man das Filtrat durch Sättigen mit Ammonsulfat in neutraler, saurer und ammoniakalischer Lösung von den letzten Albumoseresten, fällt aufs neue mit Ammonsulfat gesättigter Eisenammoniakalaunlösung und wäscht den Niederschlag aus. Niederschlag 2 wird in gesättigter Ammonsulfatlösung verrührt, durch Zusatz von konzentrierter Schwefelsäure in Lösung gebracht und durch Abstumpfen mit konzentriertem Ammoniak wieder ausgefällt und gewaschen.

Beide Niederschläge werden nun mit Baryt unter Vermeidung eines großen Überschusses zersetzt und die Filtrate mit Ammoncarbonat von Baryt befreit. Die so erhaltenen Peptonlösungen werden im Vakuum bei 40° eingedampft und die Sirupe nach Zufügen von 12proz. Essigsäure mit soviel Alkohol versetzt, daß der Niederschlag sich eben wieder löst. Die Lösungen werden filtriert und unter Rühren in absoluten Alkohol gegossen, die ausfallenden Peptone mit Alkohol und Äther gewaschen. Wegen weiterer Einzelheiten der umständlichen Darstellung s. Siegfried<sup>1)</sup>. Eine weitere Reinigung erfolgt über die Bariumsalze der Carbamate und durch die Kosselsche Silberbarytmethode.

Alle diese Peptone sind weiße amorphe Substanzen, in Alkohol schwer löslich, in Wasser leicht löslich, diffundierend, nicht koagulierbar. Es sind ausgesprochene Säuren, welche Kohlensäure austreiben und Salze (Barium-, Zinksalze) bilden. Die angegebenen Formeln sind Äquivalentformeln. Nach Neumann<sup>2)</sup> sind Pepsinfibrinpepton und Pepsinglutinpepton wahrscheinlich dreibasische Säuren und zweisäurige Basen, die Trypsinfibrinpeptone  $\alpha$  und  $\beta$  wahrscheinlich zweibasische Säuren und einsäurige Basen.

Allgemeine  
Eigenschaften.

Pepsinfibrinpepton  $\alpha^3$ ) (aus Niederschlag 1)  $C_{21}H_{34}N_6O_9$   $[\alpha]_D^{20} = -36,36^\circ$ .  
Pepsinfibrinpepton  $\beta^3$ ) (aus Niederschlag 2) von der wahrscheinlichen Äquivalentformel  $C_{21}H_{36}N_6O_{10}$  geht beim Erwärmen auf 100° in das Pepsinpepton  $\alpha$  über.

Pepsinfibrin-  
peptone.

Die wässrigen Lösungen geben mit Ferrocyankalium + Essigsäure, Bleiessig, Metaphosphorsäure keine Trübung, mit Phosphorwolframsäure, Gerbsäure Fällung, mit Pikrinsäure Fällung, die in der Wärme verschwindet. Biuret-, Millonsche, Adamkiewiczsche, Xanthoproteinreaktion positiv, Molischsche Reaktion negativ. Bei der tryptischen Verdauung entstehen Trypsinfibrinpepton  $\alpha$  und  $\beta$  (s. weiter unten) unter Abspaltung von Tyrosin und Arginin, vielleicht auch noch anderer Amino- und Diaminosäuren.

Eigenschaften der  
Pepsinfibrin-  
peptone.

Pepsinglutinpepton<sup>4)</sup> (aus Niederschlag 1)  $C_{23}H_{39}N_7O_{10}$ .

Pepsinglutin-  
pepton.

Es zeigt dieselben Fällungsreaktionen wie die Fibrinpeptone. Biuretreaktion positiv (mit roter Farbe), Xanthoprotein- und Adamkiewiczsche Reaktion negativ. Unter den Produkten der Säurespaltung wurden Arginin, Lysin, Glutaminsäure, Leucin, Prolin und Glykokoll nachgewiesen, Histidin entsteht nicht. Von dem Stickstoff kommen etwa 70% auf Monamino- (davon etwa 11% auf Glutaminsäure) und bis zu 30% auf Diaminosäuren. Arginin zu Lysin gleich 2 : 1. Carbaminoquotient 1 : 7.  $[\alpha]_D^{20} = -81,67$  bis  $-65,81^\circ$ , etwa 12% vom Stickstoff formoltitrierbar, 11% van Slyke-Stickstoff. Amidstickstoff ist nicht vorhanden.

Hydrolyse des  
Pepsinglutin-  
peptons.

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 38, S. 259. 1903. Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 136, S. 185. 1910.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 45, S. 216. 1905.

<sup>3)</sup> Mühle: Diss. Leipzig 1901. — Siegfried: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 38, S. 259. 1903. — Borke: desgl. Bd. 38, S. 289. 1903.

<sup>4)</sup> Scheermesser: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 37, S. 363. 1902/03; Bd. 41, S. 68. 1904. — Siegfried u. Schmitz: desgl. Bd. 65, S. 295. 1910. — Siegfried: desgl. Bd. 90, S. 271. 1914.

$\beta$ -Naphthalinsulfoverbindung Fp. 205—210°, 4-Nitrotoluol-2-sulfo-Verbindung Fp. 165—170°.

Trypsinfibrinpeptone. Trypsinfibrinpepton  $\alpha^1$ ) (Antipepton  $\alpha$ ) (aus Niederschlag 2)  $C_{10}H_{17}N_3O_5$ . Aus essigsaurer Lösung mit Alkohol gefällt  $[\alpha]_D^{20} = -24,5^\circ$ .

Trypsinfibrinpepton  $\beta^1$ ) (Antipepton  $\beta$ ) (aus Niederschlag 1)  $C_{11}H_{19}N_3O_5$ . Aus essigsaurer Lösung mit Alkohol gefällt  $[\alpha]_D^{20} = -32,4^\circ$ .

Eigenschaften der Trypsinfibrinpeptone. Beide Trypsinpeptone geben in verdünnten Lösungen mit Ferrocyankalium + Essigsäure, Bleiessig, Pikrinsäure, Gerbsäure, Metaphosphorsäure, Sublimat, Phosphorwolframsäure keine oder schwache Trübungen. Biuret- und Xanthoproteinreaktion positiv, Millonsche und Molischsche Reaktion negativ. Gegen weitere Trypsinverdauung sind beide sehr widerstandsfähig. Unter den Säurespaltungsprodukten von Pepton  $\alpha$  wurden Arginin, Lysin, Glutaminsäure (12%) unter den Säurespaltungsprodukten von Pepton  $\beta$  Arginin nachgewiesen. Bei beiden beträgt der Basenstickstoff weniger als 25% des Gesamtstickstoffs. Bei der Zersetzung mit Schwefelsäure spaltet Pepton  $\alpha$  21,9% seines Stickstoffs als Ammoniak ab, Pepton  $\beta$  16,1%.

Bromverbrauch nach Koppeschaar s. Siegfried und Reppin<sup>2</sup>).

Trypsinpeptone aus Wittepepton. Trypsinpeptone von derselben Zusammensetzung und wesentlich denselben Eigenschaften wurden aus Wittepepton erhalten (Siegfried<sup>3</sup>).

Trypsinglutinpeptone. Trypsinglutinpepton<sup>4</sup>) (aus Niederschlag 1)  $C_{19}H_{30}N_6O_9 \cdot [\alpha]_D^{20} = -100,8^\circ$ .

Eigenschaften des Trypsinglutinpeptons. Die Reaktionen sind dieselben wie bei den anderen Trypsinpeptonen. Gegen Trypsin ist es sehr widerstandsfähig. Unter den Produkten der Säurespaltung wurden nachgewiesen Lysin, Arginin, Glutaminsäure und Glykokoll (Siegfried<sup>5</sup>).

Trypsincaseinpepton. Trypsincaseinpepton<sup>6</sup>) liefert bei der Spaltung 10,7%  $NH_3$ -Stickstoff, 23,4% Basenstickstoff, wobei 17,1% durch Ag-Baryt fällbar, 65,6% Monamino-säurenstickstoff; Arginin, Lysin, kein Histidin, Glutaminsäure Oxyprolin, kein Prolin. Carbaminoquotient 1 : 2,36.

Bromverbrauch s. Siegfried und Reppin<sup>2</sup>).

Fleischsäure. Für nahe verwandt oder identisch mit diesen Körpern (speziell mit dem Trypsinfibrinpepton  $\alpha$ ) hält Siegfried<sup>7</sup>) die Fleischsäure welche er als Spaltungsprodukt der von ihm aus Fleischextrakt und aus von Eiweiß befreiten Muskelauszügen als Eisenverbindung isolierten Phosphorfleischsäure erhielt. Er beschreibt sie als einbasische Säure von der Formel  $C_{10}H_{17}N_3O_5$  oder  $C_{10}H_{15}N_3O_5$ . S. dazu die Arbeiten von Mays<sup>8</sup>), Folin<sup>9</sup>) und Kutscher<sup>10</sup>).

Darstellung nach Hofmeister. 402. **Darstellung der Peptone nach Hofmeister.** Hofmeister und seine Schüler haben versucht, aus den Peptonfraktionen, welche durch Fällung der nach Sättigung mit Ammonsulfat filtrierten (peptischen und tryptischen) Verdauungsflüssigkeiten mit Kupfersulfat, Eisenammoniakalaun und Quecksilberjodidjodkalium erhalten werden, durch Darstellung von Benzoyl-, Benzosulfo-, Naphthalinsulfo- und Phenylisocyanatverbindungen einheitliche Körper zu gewinnen.

<sup>1</sup>) Siegfried: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 35, S. 164. 1902; Bd. 38, S. 259. 1903. — Müller: desgl. Bd. 38, S. 265. 1903. — Siegfried u. Liebermann: desgl. Bd. 54, S. 446. 1908.

<sup>2</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 95, S. 27. 1915. <sup>3</sup>) desgl. Bd. 35, S. 164. 1902.

<sup>4</sup>) Krüger: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 38, S. 320. 1903.

<sup>5</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 35, S. 187. 1902.

<sup>6</sup>) Siegfried: Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 136, S. 185. 1910.

<sup>7</sup>) Arch. f. Anat. u. Physiol., Physiol. Abt. 1894, S. 401. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 21, S. 360. 1896. — Balke: desgl. Bd. 22, S. 248. 1897.

<sup>8</sup>) Zeitschr. f. Biol. Bd. 34, S. 268. 1896.

<sup>9</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 25, S. 152. 1898. <sup>10</sup>) desgl. Bd. 26, S. 110. 1899.

Die besten Isolierungsergebnisse wurden mit Phenylisocyanat erzielt. S. hierüber die Arbeiten von Stookey<sup>1)</sup>, Raper<sup>2)</sup> und Rogozinski<sup>3)</sup>.

### Plasteine.

403. Plasteine nennt man die Niederschläge (flockige oder gallertige), welche in konzentrierten Lösungen von Albumosen oder Polypeptiden allmählich bei Körpertemperatur unter der Einwirkung von Fermenten entstehen. Danilewsky beobachtete sie zuerst bei Labzusatz<sup>4)</sup>. Sie entstehen auch durch Magensaft<sup>5)</sup>, Papayotin<sup>6)</sup>, Extrakte von frischen<sup>7)</sup> und autolytierten Organen<sup>8)</sup>. Über die Frage nach der Muttersubstanz der Plasteine geben die Untersuchungen widersprechende Antwort, doch scheint es nach Sawjalow<sup>9)</sup>, daß sie aus dem Albumosengemenge und nicht aus einer einzelnen Albumose hervorgehen. Der Niederschlag macht immer nur einen Teil der in Lösung befindlichen Albumosen aus und ist das Produkt eines reversiblen Prozesses, der je nach Konzentration in der einen oder anderen Richtung verläuft<sup>10)</sup>.

Zur Reinigung wird der Niederschlag ausgewaschen, in Alkali gelöst, vorsichtig durch Säurezusatz gefällt, wieder in Wasser mit Hilfe von Säure gelöst und mit sehr wenig gesättigter Ammonsulfatlösung gefällt. Dieses Lösen in angesäuertem Wasser und Fällen mit Ammonsulfat wird mehrmals wiederholt, bis das Filtrat beim Sättigen mit Ammonsulfat völlig klar bleibt (Lukomnik<sup>11)</sup>).

Sawjalow (von dem auch der Name Plasteine herrührt) beschreibt die durch Labferment erhaltenen gereinigten Plasteine als in Wasser unlösliche, in verdünnten Säuren und Alkalien leicht lösliche, beim Neutralisieren dieser Lösungen wieder ausfallende Substanzen, deren Lösungen in Alkalilauge (unter Vermeidung eines Überschusses) beim Erwärmen zu einer durchsichtigen Masse erstarren. Schon die geringsten Mengen von Salzen rufen in den Lösungen gallertige Niederschläge hervor. Die Farbenreaktionen der Eiweißstoffe fallen positiv aus, die Biuretreaktion ist rotviolett. Lawrow<sup>12)</sup> teilt die Produkte der peptischen Verdauung weiter in albumosenähnliche und peptidähnliche Gemenge (Koalbumosen und Koapeptide) mit verschiedenem Basengehalt.

Koalbumosen und  
Koapeptide.

Levene und van Slyke<sup>13)</sup> fanden im Plastein aus Wittepepton ein albumoseartiges Produkt von annähernd dem gleichen Aufbau wie Fibrin.

Kurajeff hält die durch Papayotin hervorgerufenen Niederschläge für verschieden von den Koagulosen durch Lab bewirkten und nennt sie Koagulosen.

Reine Substanzen liegen in den Plasteinen selbstverständlich nicht vor. Eine Tabelle über die Zusammensetzung findet sich bei Sawjalow<sup>9)</sup>.

Von Albumosen und Peptonen möglichst weitgehend befreite Verdauungsflüssigkeiten geben auch auf Zusatz von Labferment Abscheidungen. Diese zeigen aber andere Eigenschaften als die Plasteine und geben die Farbenreaktionen nicht oder nur ganz schwach (Bayer<sup>14)</sup>, Lawrow<sup>15)</sup>, Sawjalow<sup>16)</sup>).

### Protokyrine.

404. Mit diesem Namen bezeichnet Siegfried Peptone basischer Natur, welche durch Einwirkung von verdünnter Salzsäure bei Bruttemperatur aus Proteinen erhalten werden.

<sup>1)</sup> Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 7, S. 590. 1906.    <sup>2)</sup> desgl. Bd. 9, S. 168. 1907.

<sup>3)</sup> Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 11, S. 229 u. 241. 1908.

<sup>4)</sup> Okunew: Malys Jahresber. d. Tierchem. 1895, S. 291. — Sawjalow: desgl. 1899, S. 58 u. Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 85, S. 171. 1901. — Lawrow: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 51, S. 1. 1907.

<sup>5)</sup> Sawjalow: a. a. O. — Lawrow u. Salaskin: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 36, S. 277. 1902.

<sup>6)</sup> Kurajeff: Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 1, S. 121. 1902; Bd. 2, S. 411. 1902; Bd. 4, S. 476. 1904.

<sup>7)</sup> Okunew: a. a. O.

<sup>8)</sup> Nürnberg: Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 4, S. 543. 1904.

<sup>9)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 54, S. 119. 1907/08.

<sup>10)</sup> Henriques u. Gjaldbæk: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 71, S. 485. 1911; Bd. 81, S. 447. 1912. — Glagolew: Biochem. Zeitschr. Bd. 50, S. 162. 1913; Bd. 56, S. 195. 1913.

<sup>11)</sup> Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 9, S. 205. 1907.

<sup>12)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 56, S. 343. 1908; Bd. 60, S. 520. 1909.

<sup>13)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 13, S. 458. 1908; Bd. 16, S. 203. 1909.

<sup>14)</sup> Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 4, S. 554. 1904.

<sup>15)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 51, S. 1. 1907; Bd. 53, S. 1. 1907; Bd. 56, S. 343. 1908.

<sup>16)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 54, S. 119. 1907/08.

**Darstellung.** Zu ihrer Darstellung werden die Proteine mit der 10fachen Menge 12- bis 16proz. Salzsäure eine bis mehrere Wochen bei 38° behandelt. Die filtrierte Flüssigkeit wird mit Phosphorwolframsäure ausgefällt, der Niederschlag mit 5proz. Schwefelsäure chlorfrei gewaschen, bei 40° in ammoniakalischem Wasser gelöst und zuerst mit gepulvertem Baryt und schließlich mit Barytwasser (unter Umständen nach vorheriger Filtration) unter Vermeidung eines Überschusses zerlegt, das Filtrat durch Ammoniumcarbonat von Barium befreit und das Filtrat vom Bariumcarbonat mit konzentrierter wässriger Bleiacetatlösung völlig ausgefällt. Das bleihaltige Filtrat wird mit Schwefelwasserstoff behandelt und das bleifreie Filtrat auf dem Wasserbade zum Sirup eingedampft (Rohkyrin). Zur Reinigung führt man das Kyrin durch Zusatz von Schwefelsäure in das Sulfat über und gießt die filtrierte mit Alkohol vermischte Flüssigkeit in dünnem Strahle in eine große Menge absoluten Alkohols unter beständigem Umrühren ein. Das ausfallende Sulfat wird in derselben Weise und so oft aus schwefelsaurer Lösung durch Alkohol gefällt, bis die Zusammensetzung eine konstante ist.

**Eigenschaften.** Die Kyrine sind in Wasser leicht löslich, reagieren stark alkalisch, geben die Biuretreaktion (rot mit einem Stich ins Bordeauxrote). Die wässrige Lösung der Kyrinjodide gibt mit Kaliumquecksilberjodid keine Fällung. Die Sulfate sind amorph, in Wasser leicht löslich, in Alkohol fast unlöslich, sie reagieren auch gegen Kongo sauer, sind optisch inaktiv.

Die Phosphorwolframate (aus der Lösung der freien Base oder der mit Natronlauge alkalisch gemachten Lösung des Sulfats ausgefällt) sind in kaltem Wasser schwer löslich, aus der Lösung in heißem Wasser scheiden sie sich beim Erkalten wieder ab, und zwar die des Caseino-, Fibrino- und Glutokyrins in mikroskopischen Krystallen (kugelförmige Aggregate feiner Nadeln oder zu Sternen und Büscheln gruppierte Nadeln), das des Hämoglobinokyrins amorph.

**Hydrolyse.** Bei der Spaltung liefern sie hauptsächlich Basen, Silberbaryt sprengt eine bei der Säurehydrolyse beständige Bindung.

**Glutokyrine.** Glutokyrin  $\alpha^1$ ) (aus Trypsinglutinpepton und aus Gelatine dargestellt). Aus den Analysen des Sulfats läßt sich die Formel  $C_{21}H_{39}N_9O_8$  ableiten. Es gibt eine Verbindung mit  $\alpha$ -Naphthylcyanat. Bei der Säurespaltung entstehen Arginin, Lysin, Glutaminsäure und Glykokoll, kein Ammoniak und Histidin.  $\frac{2}{3}$  des Stickstoffs kommt auf die Basen und  $\frac{1}{3}$  auf die Aminosäuren.

Glutokyrin  $\beta^2$ )  $C_{17}H_{33}O_6N_7 \cdot 2 H_2SO_4$  als Diskussionsformel. Mit Mercurisulfat, Sublimat, Metaphosphorsäure keine Fällung. Optisch inaktiv. Vom Stickstoff kommen bis zu 87% auf Basen.  $\beta$ -Naphthalinsulfoverbindung siehe Original. Bei der Spaltung entstehen Arginin, Lysin, Glutaminsäure (?). Ein Glutokyrin, nach der gleichen Methode von Levene und Birchard<sup>3</sup>) dargestellt, ließ sich aufspalten in ein Peptid, das nur aus Arginin und Glutaminsäure bestand, und einen Rest, der bei der weiteren Spaltung Glykokoll, Alanin, Lysin und wahrscheinlich Prolin ergab.

**Caseinokyrin.** Caseinokyrin<sup>4</sup>). Aus den Analysen des Sulfats läßt sich die Formel  $C_{23}H_{47}N_9O_8$  ableiten. Bei der Säurespaltung entstehen Arginin, Lysin und Glutaminsäure, kein Histidin und Ammoniak. Von dem Stickstoff kommt

<sup>1</sup>) Siegfried, Ber. d. math.-phys. Klasse d. K. S. A. d. W. zu Leipzig. 2. März 1903 u. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 43, S. 44. 1904/05. — Loewy u. Neuberg: Biochem. Zeitschr. Bd. 2, S. 449, Fußnote 1. 1907.

<sup>2</sup>) Siegfried u. Pilz: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 58, S. 215. 1908. — Siegfried u. Schunke: desgl. Bd. 97, S. 233. 1916; Bd. 84. S. 288. 1913.

<sup>3</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 13, S. 277. 1912.

<sup>4</sup>) Siegfried: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 43, S. 46. 1904/05; Bd. 48, S. 54. 1906; Bd. 50, S. 163. 1906/07.

etwa 84—85% auf die Basen, 15—16% auf die Aminosäuren. Levene und van der Scheer<sup>1)</sup> haben das Kyrin durch Silberbaryt und Auskochen der Phosphorwolframate mit Wasser weiter zerlegt. Die mit Silberbaryt nicht fällbare Fraktion, deren Phosphorwolframat in kochendem Wasser unlöslich ist, gab ein Sulfat der Zusammensetzung  $C_{16}H_{30}N_4O_5 \cdot H_2SO_4$ , vielleicht ein Tripeptid aus Lysin, Oxyprolin und Valin, wovon aber nur Lysin als Baustein gefaßt werden konnte.

Globinokyrin<sup>2)</sup> (aus Hämoglobin). Bei der Säurespaltung entstehen Arginin, Lysin, Histidin und Glutaminsäure, Ammoniak nur in Spuren. Von dem Stickstoff kommen 76—77% auf die Basen und 23—24% auf die Aminosäuren.

Fibrinokyrin<sup>3)</sup> (aus Fibrin).

Pepton (Kyrin) aus Keratin<sup>4)</sup>.

Globinokyrin.

Fibrinokyrin.

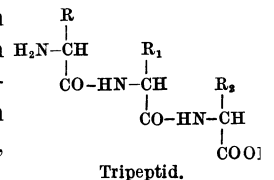
Keratinkyrin.

### Polypeptide.

405. Mit dem Namen Polypeptide bezeichnet E. Fischer<sup>5)</sup> die amidartigen Anhydride der Aminosäuren, deren Synthese er nach verschiedenen von ihm angegebenen Methoden ausgeführt hat. Nach der Anzahl der miteinander verbundenen Aminosäuren unterscheidet er Di-, Tri- usw. Peptide. Die niederen Di-, Tri- und Tetrapeptide, zu denen die Mehrzahl der synthetischen gehört, umfassen fast alle aus Proteinen erhaltenen Aminosäuren.

Manche sind in Wasser leicht, andere schwer löslich, in absolutem Alkohol sind die meisten fast ganz unlöslich. In Mineralsäuren und Alkalien sind sie leicht löslich, viele auch in etwas wässriges Ammoniak enthaltendem Alkohol. Die meisten schmelzen erst über 200° unter Zersetzung. Sie schmecken schwach bitter oder schwach fade. Mit der Länge der Kette wächst das Fällungsvermögen durch Phosphorwolframsäure. Ihre wässrige Lösung färbt sich beim Kochen mit gefällttem Kupferoxyd blau. Die Biuretreaktion fällt bei vielen positiv aus. Durch alkoholische Salzsäure werden sie leicht in die Ester übergeführt. Die Ester sind unlöslich in Petroläther und nur wenig löslich in Äther (Unterschied von den Estern der Aminosäuren). Die Ester der Dipeptide gehen ziemlich glatt durch alkoholisches Ammoniak in die Anhydride (Diketopiperazine) über. Durch 5stündiges Kochen mit konzentrierter Salzsäure werden sie völlig gespalten, gegen Alkalien sind sie bei gewöhnlicher Temperatur sehr widerstandsfähig. Durch Magensaft werden die Polypeptide nicht gespalten, soweit die Erfahrung reicht. Durch Trypsin werden manche gespalten, andere nicht. Erepsin spaltet auch solche, welche Trypsin nicht zu zerlegen vermag. In der Regel werden aber durch Trypsin und durch Erepsin nur diejenigen Kombinationen gespalten, welche aus den in der Natur vorkommenden optisch aktiven Aminosäuren gebildet sind.

406. Solche Polypeptide sind unter den Produkten der vorsichtigen Säurehydrolyse von Seidenfibroin, Elastin, Gliadin von E. Fischer und Abderhalden<sup>6)</sup> und unter den Produkten der energischen Säurehydrolyse von Gliadin von Osborne und Clapp<sup>7)</sup> aufgefunden worden, auch einzeln aus Chymus dargestellt. Auch aus Hefe und aus tierischen Organen wurde ein Dipeptid (Glutathion) von Hopkins gewonnen.



Allgemeine Eigenschaften.

<sup>1)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 22, S. 425. 1915.

<sup>2)</sup> Kirbach: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 50, S. 129. 1906/07.

<sup>3)</sup> Siegfried: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 48, S. 67. 1906. — Geide: Diss. Leipzig 1907.

<sup>4)</sup> Heiduschka u. Komm: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 126, S. 130. 1923.

<sup>5)</sup> S. die zusammenfassende Darstellung in Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 39, 1, S. 551. 1906 u. Sitzungsber. d. Kgl. preuß. Ak. d. Wiss. 1907, IV, S. 35 sowie zahlreiche Arbeiten in den Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 39, 40 u. 41.

<sup>6)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 39, 1, S. 752 u. 2, 2315. 1906; Bd. 40, 3, S. 3544. 1907.

<sup>7)</sup> Americ. journ. of physiol. Bd. 18, S. 123. 1907.

Auftreten:

bei Säurehydrolyse

bei der Verdauung

in Organen

bei tryptischer  
Verdauung

Das Anhydrid eines Dipeptids (Kombination von Prolin und Glykokoll) wurde von Levene<sup>1)</sup> mit Sicherheit in der tryptischen Verdauungsflüssigkeit der Gelatine, ein anderes (Alanylalaninanhydrid) von Jona im Fleischextrakt aufgefunden, während die Angabe von Salaskin<sup>2)</sup>, ein weiteres Anhydrid, das Leucinimid, bei der peptischen und tryptischen Verdauung des Hämoglobins gefunden zu haben, noch der Bestätigung bedarf.

bei vollständiger  
Säurehydrolyse.

Dipeptidanhydride (Leucinimid, l-Phenylalanyl-d-alaninanhydrid, vielleicht auch l-Leucyl-d-valinanhydrid) wurden auch unter den Produkten der vollständigen Hydrolyse von Casein und anderen Proteinen nachgewiesen (Ritthausen, Cohn, Abderhalden und Funk<sup>3)</sup>, Dakin<sup>4)</sup>). Doch sind diese isolierten Anhydride wahrscheinlich nicht im Eiweiß vorgebildet, sondern erst sekundär entstanden. Ebenso sind die von Ssadikow und Zelinsky<sup>5)</sup> erhaltenen „Peptine“ voraussichtlich erst durch die zur Spaltung angewandte Methode entstanden, s. dazu Brigl<sup>6)</sup> und Abderhalden<sup>7)</sup>. Über ihre Darstellung s. § 410.

Darstellung aus  
schwach hydroly-  
sierter Protein-  
lösung  
als Diketopi-  
perazine

**Darstellung aus der schwach hydrolysierten Proteinflüssigkeit nach E. Fischer und Abderhalden<sup>8)</sup>:**

407. Als Diketopiperazine\*). Das wasserfrei getrocknete Eiweiß wird in auf 0° abgekühlte Säure (Salzsäure vom spez. Gew. 1,19 oder 70volumenproz. Schwefelsäure) eingerührt. Mit nicht abgekühlter Säure entstehen leicht gallertige Nebenprodukte<sup>9)</sup>. Man nimmt das 3—10fache Volumen und läßt bei Zimmertemperatur oder bei 37° von 2 bis zu 10 Tagen stehen. Auch wird mit verdünnter (50-, 25-, 10—1proz.) Säure gearbeitet, am Rückfluß oder im Drucktopf gekocht. Am besten orientiert die Menge des freigewordenen Aminostickstoffs (s. § 475) über den Grad der Hydrolyse. Die eiskalte schwefelsaure Lösung wird mit Wasser und Eis auf das 10fache verdünnt und unter Turbinieren gepulverter Baryt (alkalifrei!) eingetragen. Das Filtrat und die kalt gewonnenen Waschwässer des Bariumsulfatniederschlages werden im Vakuum eingeeengt, wobei auf Freiheit von Barium und Sulfat wiederholt geachtet werden muß. Die salzsaure Flüssigkeit wird mit Wasser sehr stark verdünnt und mit konzentrierter Phosphorwolframsäurelösung ausgefällt, das Filtrat durch Baryt von Phosphorwolframsäure und durch Schwefelsäure vom Barium befreit und dann zur Entfernung des größten Teils der Salzsäure mit Kupferoxydul geschüttelt. Aus dem Filtrat schafft man durch Schwefelwasserstoff das Kupfer und durch einen Luftstrom den Schwefelwasserstoff fort und engt es dann unter geringem Druck in einem Bade, dessen Temperatur nicht über 40° steigt, zum Sirup ein. Schäumen wird hintangehalten, wenn die Flüssigkeit während der Vakuumdestillation langsam zutropft.

Der Sirup wird mit absolutem Methyl- oder Äthylalkohol übergossen und nun langsam mit Salzsäure gesättigt, so daß die Temperatur nicht über 50° geht. Nach 14stündigem Stehen wird die alkoholische Lösung bei 12 mm Druck und einer Badtemperatur nicht über 35° verdampft und die Veresterung und Verdunstung in derselben Weise mehrfach wiederholt. Der Rückstand wird nun in absolutem Methyl- oder Äthylalkohol gelöst, die Lösung mit etwas weniger

\*) Die Dipeptide gehen nach erfolgter Esterifizierung leicht in Diketopiperazine über.

<sup>1)</sup> Levene u. Beatty: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 39, 2, S. 2060. 1906. — Levene u. Wallace: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 47, S. 145. 1906.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 32, S. 592. 1901; Bd. 38, S. 573. 1903.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 53, S. 19. 1907.

<sup>4)</sup> Biochem. Journ. Bd. 12, S. 290. 1918. Journ. of biol. chem. Bd. 44, S. 499. 1920.

<sup>5)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 136, S. 241. 1923.

<sup>6)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 56, S. 1887. 1923.

<sup>7)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 128, S. 119. 1923.

<sup>8)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 40, 3, S. 3544. 1907. — Abderhalden u. Suwa: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 66, S. 13. 1910.

<sup>9)</sup> Abderhalden: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 65, S. 417. 1910.



als einer 2proz. Lösung von Natriummethylat bzw. -äthylat versetzt, als zur Entfernung der Salzsäure nötig ist und nach Entfernung des Kochsalzes durch Filtration bei geringem Druck und einer Temperatur des Wasserbades unter  $65^\circ$  destilliert, wobei Alkohol und Aminosäureester übergehen. Der Rückstand wird zunächst zur Entfernung noch vorhandener Aminosäureester wiederholt mit trockenem Äther ausgeschüttelt und dann in heißem absoluten Alkohol gelöst. Beim Stehen (wochenlangem) scheiden sich allmählich die Anhydride der Di-peptide ab. So erhaltene Diketopiperazine sind z. B. Glycyl-d-alaninanhydrid, Glycyl-d-valinanhydrid, Glycyl-l-leucinanhydrid, Glycyl-l-tyrosinanhydrid, d-Alanyl-l-leucinanhydrid.

408. Als  $\beta$ -Naphthalinsulfoverbindungen. In dieser Form wurde z. B. als  $\beta$ -Naphthalinsulfoverbindungen. das Glycylalanin aus Seidenfibroin isoliert. Das Verfahren ist zunächst das oben beschriebene. Die unter geringem Druck in einem Bade, dessen Temperatur nicht über  $40^\circ$  beträgt, eingeengte Flüssigkeit wird durch Schütteln mit überschüssigem Silberoxyd von Salzsäure befreit, im Filtrat das gelöste Silber quantitativ mit Salzsäure gefällt und nun die Flüssigkeit wieder unter geringem Druck eingeengt. Der Rückstand, ein gelber dicker Sirup, welcher Biuret- und Millonsche Reaktion gab, aber aus konzentrierter wässriger Lösung mit Ammonsulfat nicht gefällt wurde, wurde in sehr verdünntem Alkali gelöst und mit einer ätherischen Lösung von  $\beta$ -Naphthalinsulfochlorid behandelt. Beim Ansäuern der alkalischen Lösung fiel ein Öl aus, das sich beim Abkühlen auf  $0^\circ$  langsam in eine zähe Masse verwandelte. Diese wurde in verdünntem Alkali gelöst, bei  $0^\circ$  durch Ansäuern wieder gefällt, zerrieben und nach Auslaugen mit ziemlich viel Äther in heißem Wasser gelöst und mit etwas Tierkohle gekocht. Beim Abkühlen schieden sich allmählich feine Nadelchen und glänzende Blättchen ab.

409. Als Polypeptide. Bei geeigneten Eiweißkörpern kann man versuchen, als Polypeptide. Peptide unmittelbar zu isolieren (Abderhalden<sup>1</sup>). Er ging beim Seidenfibroin u. a. so vor, daß er es 4 Tage mit der 5fachen Menge 70proz. Schwefelsäure stehen ließ, die Säure dann mit Baryt entfernte und den in der beschriebenen Weise erhaltenen Sirup in eine reichliche Menge trockenen Äthylalkohols eintropfen ließ. Von der körnigen Fällung wurde abgossen und die Lösung bis zum Sirup im Vakuum eingeengt und wiederum mit absolutem Alkohol aufgenommen. d-Alanylglycin krystallisierte nach wechselnder Zeit aus. Beim weiteren freiwilligen Verdunsten folgten weitere Krystallabscheidungen, die getrennt gesammelt wurden. Sobald die Abscheidungen die Millonsche Reaktion geben (s. S. 449), soll die weitere Verdunstung der Mutterlaugen ganz langsam vor sich gehen. Meistens wird man die Lösung erst noch einer weiteren Reinigung unterziehen. Phosphorwolframsäure entfernt höher molekulare, die Krystallisation hemmende Spaltprodukte. Quecksilbersulfat nach Hopkins (S. 313), alkoholische Sublimatlösung, Quecksilberacetat, Silbernitrat werden benutzt und damit Peptide bestimmter Prägung vorzugsweise gefällt. Sie werden aus Wasser unter Zusatz von Alkohol umkrystallisiert. Reine Substanzen hat man aber erst erhalten, wenn neben den sonstigen üblichen Merkmalen die verschiedenen Fraktionen gleiche spezifische Drehung aufweisen.

Um d-Alanyl-l-leucin aus Elastin und l-Leucyl-d-glutaminsäure aus Gliadin zu isolieren, wurde die schwefelsaure Flüssigkeit nach Verdünnen mit Wasser durch Baryt von dem größten Teile der Schwefelsäure befreit und nach weiterer Verdünnung mit Wasser mit Phosphorwolframsäure ausgefällt;

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 58, S. 386. 1909; Bd. 62, S. 315. 1909. Bd. 63, S. 401. 1909; Bd. 65, S. 417. 1910; Bd. 68, S. 312. 1910; Bd. 72, S. 1. 1911; Bd. 81, S. 315. 1912; Bd. 114, S. 292. 1921; Bd. 120, S. 211. 1922; Bd. 128, S. 119. 1923.

das Filtrat zur Entfernung der Phosphorwolframsäure mit Baryt behandelt und der überschüssige Baryt genau mit Schwefelsäure entfernt. Das Filtrat wurde nun bei 12 mm Druck und einer Temperatur unter 40° zum Sirup verdunstet. Über die weiteren Verfahren, welche zur Isolierung der krystallisierten Dipeptide führten, s. die Originalarbeit.

Darstellung aus stark hydrolysierten Proteinen.

410. Darstellung von Dipeptidhydriden (s. S. 506 oben) aus stark hydrolysierten Caseinflüssigkeit nach Abderhalden und Funk<sup>1)</sup>. Die mit 25 proz. Schwefelsäure 20 Stunden gekochte Flüssigkeit wird von Schwefelsäure befreit, im Vakuum stark eingengt, mit geblühtem Seesand vermengt und im Soxhletschen Apparat mit Essigäther erschöpft. Aus dem beim Verdunsten des Essigäthers zurückbleibenden Öl lassen sich durch Krystallisation aus Alkohol einzelne Fraktionen gewinnen, welche durch Umkrystallisieren aus Wasser gereinigt werden. So wurden z. B. l-Leucinanhydrid, l-Phenylalanyl-d-alaninanhydrid, l-Leucyl-d-valinanhydrid erhalten. Die mit Essigäther erschöpfte Masse wird nunmehr mit reinem trockenem Aceton ausgezogen. Aus dieser Fraktion gelingt es meist nur sehr schwer, krystallisierte Produkte zu gewinnen. Wird jetzt mit Methylalkohol extrahiert, so erhält man beim Einengen leicht Krystallfraktionen in erheblicher Menge, die nach dem weiter oben beschriebenen Verfahren auf einheitliche Substanzen zu verarbeiten sind.

Dipeptide u. Anhydride von Dipeptiden.

411.  $\beta$ -Naphthalinsulfoglycyl-d-alanin  $C_{15}H_{16}N_2SO_5$ <sup>2)</sup> (aus Seidenfibroin s. § 408). Es krystallisiert aus heißem Wasser in feinen Nadelchen und Blättchen und schmilzt bei 155° (korr.). Es zeigte sich identisch mit dem synthetischen Präparat<sup>3)</sup>. Beim 2stündigen Erhitzen mit 10 proz. Salzsäure am Rückflußkühler zerfällt es in d-Alanin und  $\beta$ -Naphthalinsulfoglycin. Da beim Erhitzen der Naphthalinsulfoverbindungen der Polypeptide mit mäßig verdünnter Salzsäure die Polypeptidkette gesprengt wird, während die beständigere Bindung der Naphthalinsulfogruppe mit der Aminosäure erhalten bleibt, so ist durch dieses Ergebnis der Beweis geliefert, daß bei der Hydrolyse des Seidenfibroins Glycyl-d-alanin entstanden war.

Glycyl-d-alaninanhydrid  $C_5H_8N_2O_2$ <sup>4)</sup> (aus Seidenfibroin s. § 407). Nadelförmige Krystalle, in Wasser leicht, in warmem Alkohol ziemlich leicht löslich. Im Capillarrohr erhitzt, fängt es gegen 235° an braun zu werden und schmilzt zwischen 240 und 242° (korr.) unter geringer Zersetzung und teilweiser Sublimation. Es schmeckt schwach bitter. Bei der Hydrolyse entstehen Glykokoll und d-Alanin. Es stimmt in allen Punkten mit dem synthetischen<sup>5)</sup> überein, zeigt nur etwas geringere Drehung  $[\alpha]_D^{20} = -3,9$  gegenüber  $[\alpha]_D^{20} = -5,0$ , was wohl auf eine schwache Racemisierung zurückzuführen ist.

Glycyl-d-valinanhydrid  $C_7H_{12}N_2O_2$ <sup>6)</sup> (aus Elastin s. § 407). Es scheidet sich gallertig aus seinen Lösungen ab. Es läßt sich destillieren und das Destillat erstarrt völlig krystallinisch (Fp. 248—252,5° korr.). Beim Umlösen der Krystallmasse aus Essigäther oder anderen Lösungsmitteln erfolgt die Abscheidung wieder in amorphem, gequollenen Massen. Bei der Hydrolyse entstehen Glykokoll und d-Valin. Das synthetische Produkt zeigt die gleichen Eigenschaften, nur liegt sein Schmelzpunkt 10° höher.

Glycyl-l-leucin  $C_8H_{16}N_2O_3$  ist von Abderhalden<sup>7)</sup> wahrscheinlich bei der partiellen Barythydrolyse von Elastin aufgefunden worden.

Glycyl-l-leucinanhydrid  $C_8H_{14}N_2O_2$ <sup>8)</sup> (aus Elastin s. § 407). Es scheidet sich aus heißem Aceton oder Alkohol teils amorph, teils in filzartig zusammen-

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 53, S. 19. 1907.

<sup>2)</sup> E. Fischer u. Abderhalden: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 40, 3, S. 3544. 1907.

<sup>3)</sup> E. Fischer u. Bergell: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 36, 2, S. 2594. 1903.

<sup>4)</sup> E. Fischer u. Abderhalden: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 39, 1, S. 752. 1906. — Abderhalden u. Suwa: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 66, S. 13. 1910. — Abderhalden: Ebenda Bd. 131, S. 290. 1923.

<sup>5)</sup> E. Fischer u. A. Schulze: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 40, 1, S. 943. 1907.

<sup>6)</sup> E. Fischer u. Abderhalden: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 40, 3, S. 3544. 1907.

<sup>7)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 62, S. 315. 1909.

<sup>8)</sup> E. Fischer u. Abderhalden: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 39, 2, S. 2315. 1906.

gelagerten Nadelchen ab. Es schmilzt gegen  $253^{\circ}$  (korr.) und zeigt in wässriger Lösung  $[\alpha]_{\text{D}}^{20^{\circ}} = +29,2^{\circ}$ . Das synthetische schmolz bei  $254\text{--}255^{\circ}$  (korr.) und zeigte  $[\alpha]_{\text{D}}^{20^{\circ}} = +31,7^{\circ}$ . Bei der Hydrolyse entstehen Glykokoll und l-Leucin.

**Glycyl-prolinanhydrid**  $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$  wurde aus einer 15 Monate alten tryptischen Verdauungsflüssigkeit der Gelatine von Levene<sup>1)</sup> isoliert. Über die Darstellung s. Levene und Wallace<sup>1)</sup>. Prismatische Nadeln vom Fp. 182 bis  $183^{\circ}$ , es schmeckt bitter und entwickelt bei der Sublimation Pyrrol. Bei der Hydrolyse entstehen Glykokoll und Prolin. Synthetisch ist das Dipeptid noch nicht dargestellt worden.

Einen Körper derselben Zusammensetzung, ebenfalls ein Anhydrid aus l-Prolin und Glycin, erhielt Abderhalden<sup>2)</sup> aus Gliadin. Es krystallisiert aus Aceton. Fp.  $209^{\circ}$ , nachdem es bei  $198^{\circ}$  zu sintern beginnt.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20^{\circ}}$  in Wasser =  $-206,5^{\circ}$ .

**Glycyl-l-phenylalanin**  $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3$  (im Chymus des Dünndarms aufgefunden von Abderhalden<sup>3)</sup>). Lange, sehr dünne Nadeln. Schmelzpunkt gegen  $270^{\circ}$  unter Zersetzung.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20^{\circ}}$  in Wasser =  $+36,8^{\circ}$ . Wenig löslich in kaltem, leicht löslich in heißem Wasser, löslich in Methylalkohol. Das synthetische Produkt braucht 15—20 Tl. heißes Wasser;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20^{\circ}} = +42,0^{\circ}$ . Über das Verhalten nach van Slyke siehe Abderhalden und v. Slyke<sup>4)</sup>. Über den Methylester übergeführt in

**Glycyl-l-phenylalaninanhydrid**  $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$ . In Wasser sehr wenig lösliche Nadeln. Fp.  $270^{\circ}$ .  $[\alpha]_{\text{D}}^{20^{\circ}} = +98,52^{\circ}$  (Abderhalden<sup>3)</sup>).

**Glycyl-l-tyrosin**  $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_4$  wurde von Abderhalden<sup>5)</sup> aus Seidenfibroin und den Kokons des Ailanthusspinner<sup>6)</sup> gewonnen. In reinem Zustande leicht in makroskopischen Blättchen krystallisierend. Schmelzpunkt des wasserfreien Präparates  $176\text{--}180^{\circ}$  unter Zersetzung.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20^{\circ}} = +50,08$ . Das synthetische Produkt hat eine spezifische Drehung von  $+46,7^{\circ}$  und kommt in mehreren Krystallformen vor. Wird von Trypsin gespalten, nicht von Pepsin.

**$\beta$ -Naphthalinsulfoglycyl-l-tyrosin**  $\text{C}_{31}\text{H}_{26}\text{O}_8\text{N}_2\text{S}_2$  (Abderhalden und Funk<sup>7)</sup>). Sehr wenig löslich in Wasser, löslich in Chloroform, daraus mit Äther fällbar, keine Rotfärbung mit Millonschem Reagens. Sintert bei  $90^{\circ}$ , zersetzt sich unter Aufschäumen bei  $110^{\circ}$ , gibt bei 3stündigem Kochen mit 10proz. Salzsäure  $\beta$ -Naphthalinsulfoglycin und den  $\beta$ -Naphthalinsulfosäureester des l-Tyrosin.

**Glycyl-l-tyrosinanhydrid**  $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_3$ <sup>8)</sup> (aus Seidenfibroin s. § 407). Es krystallisiert aus heißem Wasser in schönen farblosen, meist stern- oder kugelförmig vereinigten Nadeln, schmilzt bei raschem Erhitzen nicht ganz scharf unter Zersetzung zwischen  $278$  und  $283^{\circ}$  (korr.) und gibt starke Millonsche Reaktion. Eine Lösung in wässrigem Ammoniak zeigte  $[\alpha]_{\text{D}}^{20^{\circ}} = +123,3^{\circ}$  und  $+110,5^{\circ}$ . Bei der Hydrolyse entstehen Glykokoll und l-Tyrosin. Das synthetische Präparat<sup>9)</sup> zeigte völlige Übereinstimmung, nur drehte es etwas stärker  $[\alpha]_{\text{D}}^{20^{\circ}} = +126,4^{\circ}$ .

<sup>1)</sup> Levene u. Beatty: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 39, 2, S. 2060. 1906. — Levene u. Wallace: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 47, S. 145. 1906.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 128, S. 124. 1923.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 81, S. 315. 1912. <sup>4)</sup> desgl. Bd. 74, S. 507. 1911.

<sup>5)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 62, S. 315. 1909; Bd. 72, S. 4. 1911.

<sup>6)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 80, S. 198. 1912. <sup>7)</sup> desgl. Bd. 64, S. 440. 1910.

<sup>8)</sup> E. Fischer u. Abderhalden: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 39, 2, S. 2315. 1906. — Abderhalden u. Mitarbeiter: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 62, S. 315. 1909; Bd. 66, S. 13. 1910; Bd. 72, S. 4. 1911; Bd. 80, S. 202. 1912.

<sup>9)</sup> E. Fischer u. Schrauth: Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 354, S. 28. 1907.

**d-Alanyl-glycin**  $C_5H_{10}O_3N_2$  wurde von Abderhalden<sup>1)</sup> in einer Ausbeute von etwa 8% aus Seidenabfällen gewonnen. Derbe Krystalle aus 50proz. Alkohol. Sintert bei 245° und schmilzt unter Zersetzung bei 250°.  $[\alpha]_D^{20} = +46,7^\circ$  und  $+49,5^\circ$ , des synthetischen Präparates  $+50,2^\circ$ . Leicht löslich in Wasser, wenig löslich in organischen Lösungsmitteln, wird von Darm- und Hefesaft gespalten. Zur Charakterisierung dient das Anhydrid (s. S. 508).

**d-Alanin-anhydrid**  $C_6H_{10}O_2N_2$  aus Fleischextrakt (Jona<sup>2)</sup> und bei der Hydrolyse von Seide (Abderhalden und Suwa<sup>3)</sup>. Schmelzpunkt gegen 296°. Löslich in Wasser, verdünnten Säuren und Alkalien, nicht löslich in absolutem Alkohol, schmeckt etwas bitter;  $[\alpha]_D^{20} = -28,1^\circ$ . Bei der Aufspaltung des entsprechenden synthetischen Körpers wurde erhalten:

**d-Alanyl-d-alanin**  $C_6H_{12}O_3N_2$  (E. Fischer<sup>4)</sup>. Aus wässrigem Alkohol dünne lange Prismen. Fp. 298°,  $[\alpha]_D^{20} = -21,6^\circ$ . Wird von Hefe-, Speichel- und Darmsaft gespalten, Trypsin spaltet langsam.

**d-Alanyl-l-leucin**  $C_9H_{18}N_2O_3$ <sup>5)</sup> (aus Casein und Elastin s. § 409). Es löst sich sehr leicht in Wasser und krystallisiert aus heißem Alkohol in zugespitzten Blättchen. Schmelzpunkt gegen 256° (korr.). Eine wässrige Lösung zeigt  $[\alpha]_D^{20} = -16,6^\circ$ . Es stimmt ganz mit dem synthetischen<sup>6)</sup> ( $[\alpha]_D^{20} = -17,21^\circ$ ) überein. Bei der Hydrolyse wurden d-Alanin und l-Leucin erhalten. Analyse nach van Slyke<sup>7)</sup>. Wird durch Hefe, Erepsin und langsamer durch Trypsin gespalten.

**d-Alanyl-l-leucin-anhydrid**  $C_9H_{16}N_2O_2$ <sup>8)</sup> (aus Elastin s. § 407). Es krystallisiert aus heißem Wasser nicht deutlich, zeigt aber unter dem Mikroskop die Struktur einer fein verfilzten Masse, die wahrscheinlich aus dünnen Nadelchen besteht. Es schmilzt gegen 248° (korr.). Seine Lösung in Eisessig zeigte  $[\alpha]_D^{20} = -25,9^\circ$ . Bei der Hydrolyse entstehen l-Leucin und d-Alanin. Die angegebenen Merkmale stimmen im wesentlichen mit den Eigenschaften des synthetischen Körpers<sup>9)</sup> überein, nur ist der letztere leicht krystallisiert zu erhalten und auch in Wasser schwerer löslich.

**Alanin-prolin-anhydrid**<sup>8)</sup>. Sein Vorkommen im hydrolysierten Elastin (§ 407) ist wahrscheinlich gemacht.

**d, l-Leucylglycin**  $C_8H_{16}O_3N_3$  aus Elastin bei 10 stündiger Barytspaltung bei 90° (Abderhalden<sup>10)</sup>. Nadeln aus wässrigem Alkohol. Fp. 243°. Gibt tiefblaues Kupfersalz; wird von Hefe und Preßsaft aus Tumoren gespalten<sup>11)</sup>.

**l-Leucyl-d-valin-anhydrid**<sup>12)</sup> (aus Casein s. § 410). Das Vorhandensein dieses synthetisch noch nicht dargestellten Körpers ist höchstwahrscheinlich gemacht. Isoliert durch Ausziehen mit Essigester und Umlösen des Rückstandes des Essigesterauszugs aus Alkohol. Fp. 289°, löslich in heißem Alkohol, Essigester, in 70 Tl. heißem Amylacetat, leicht löslich in Eisessig, unlöslich in Äther;  $[\alpha]_D$  in Eisessig  $-53,0^\circ$  und  $-45,9^\circ$ .

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 63, S. 401. 1909; Bd. 65, S. 417. 1910; Bd. 72, S. 1. 1911.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 83, S. 460. 1913. <sup>3)</sup> desgl. Bd. 66, S. 13. 1910.

<sup>4)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 39, 1, S. 467. 1906.

<sup>5)</sup> E. Fischer u. Abderhalden: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 40, 3, S. 3544. 1907. — Abderhalden u. Fodor: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 81, S. 13, 47. 1912. — Abderhalden: Ebenda Bd. 131, S. 293. 1923.

<sup>6)</sup> E. Fischer: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 40, 2, S. 1766. 1907.

<sup>7)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 74, S. 507. 1911.

<sup>8)</sup> E. Fischer u. Abderhalden: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 40, 3, S. 3544. 1907.

<sup>9)</sup> E. Fischer: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 39, 3, S. 2917. 1906.

<sup>10)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 62, S. 315. 1909.

<sup>11)</sup> Abderhalden u. Medigreceanu: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 66, S. 270. 1910.

<sup>12)</sup> Abderhalden u. Funk: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 53, S. 19. 1907. — Skraup: Monatshefte f. Chem. Bd. 29, S. 791. 1908. — Abderhalden: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 128, S. 123. 1923; Bd. 131, S. 292. 1923.

**l-Leucinanhydrid** (l-Leucinimid) (aus Casein s. § 410). Nähere Angaben über diesen Körper s. S. 239.

**l-Leucyl-d-glutaminsäure**  $C_{11}H_{20}N_2O_5^1$ ) (aus Gliadin s. § 409). Sie krystallisiert aus heißem Wasser besonders auf Zusatz von Alkohol in langen, häufig drusenartig verwachsenen Nadeln. In verdünnter Salzsäure ist sie sehr leicht löslich, bildet ein in Wasser schwer lösliches Silbersalz, das zu ihrer Isolierung diene. Sie schmilzt nicht scharf gegen  $232^\circ$  (korr.). In Normalsalzsäure  $[\alpha]_D^{20} = +10,20^\circ$ . Sie stimmt völlig überein mit der synthetischen<sup>2)</sup>. Bei der Hydrolyse wurden l-Leucin und d-Glutaminsäure erhalten.

**l-Phenylalanyl-d-alaninanhydrid**  $C_{12}H_{14}N_2O_2^3$ ) (aus Casein s. § 410). In Wasser schwer lösliche Krystalle, welche, rasch erhitzt, gegen  $258^\circ$  sintern und bei  $265^\circ$  völlig zersetzt sind.  $[\alpha]_D^{20} = -59,73^\circ$ . Das synthetische Präparat zeigte  $[\alpha]_D^{20} = +66,32^\circ$ .

**Dipeptid aus Tryptophan und Glutaminsäure**<sup>4)</sup>, aus Edestin bei 5tägigem Stehenlassen mit der 5fachen Menge 70proz. Schwefelsäure bei  $20^\circ$ ; amorph;  $[\alpha]_D^{20} = +19,8^\circ$ . Fällbar mit Phosphorwolframsäure und löslich im Überschuß des Fällungsmittels; gibt mit Mercurisulfat Niederschlag.

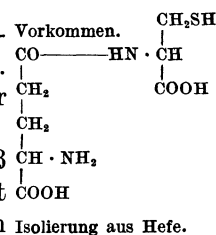
**l-Prolyl-l-leucinanhydrid** (aus Gliadin, Abderhalden<sup>5)</sup>). Schmelzpunkt gegen  $160^\circ$ .  $[\alpha]_D^{20} =$  etwa  $-120^\circ$ .

**l-Prolyl-l-phenylalanin**  $C_{14}H_{18}N_2O_3$  wurde von Osborne und Clapp<sup>6)</sup> unter den Produkten, die beim Erhitzen von Gliadin mit einem Gemisch von 5 Tl. Wasser und 1 Tl. konzentrierter Schwefelsäure zunächst 6 Stunden auf  $100^\circ$ , dann 13 Stunden im Ölbad entstehen, nachgewiesen und von E. Fischer und Lunia<sup>7)</sup> durch die Synthese identifiziert. Es krystallisiert zum Teil aus der von Schwefelsäure befreiten eingeengten Flüssigkeit direkt aus.

Sehr schwer löslich in kaltem Wasser, leicht löslich in verdünnten Säuren und Alkalien, krystallisiert aus heißem Wasser in langen flachen Prismen von Perlmutterglanz. Lufttrocken enthalten sie 1 Mol. Wasser, das bei  $120^\circ$  vollständig fortgeht. Schnell erhitzt zersetzt sich die Substanz bei etwa  $249^\circ$  unter Gasentwicklung zu einem roten Öl. Das Kupfersalz ( $C_{14}H_{16}N_2O_3Cu + 3\frac{1}{2}H_2O$ ) krystallisiert im orthorhombischen System, es verliert an der Luft seine blaue Farbe und zerfällt zu einem grünen Pulver. Das Dipeptid gibt die Xanthoprotein- und Pyrrolreaktion und dreht links.  $[\alpha]_D^{20}$  (20proz. Salzsäure) =  $-40,93^\circ$  und  $41,55^\circ$  (das synthetische  $-40,90^\circ$ ). Bei der Hydrolyse entsteht Phenylalanin und Prolin.

**Glutathion**<sup>8)</sup> (Glutaminylcystein)  $C_8H_{14}O_5N_2S$ . Zu 0,01—0,02% in Pflanzengewebe, Hefe, Bakterien und frischen tierischen Organen (Muskel, Leber). Es fehlt im Bindegewebe, Blutserum und -plasma. Im Gewebe der Kaltblüter scheint es in geringerer Menge vorhanden zu sein als bei Warmblütern.

45 kg Preßhefe werden 3 mal mit je 10 l Wasser ausgekocht, die Hefe heiß abgesaugt und gut ausgewaschen. Die vereinigten klaren Auszüge werden mit Natronlauge abgestumpft, so daß sie gegen Lackmus eben noch sauer reagieren



<sup>1)</sup> E. Fischer u. Abderhalden: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 40, 3, S. 3544. 1907. — Abderhalden u. Fodor: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 81, S. 13, 47. 1912. — Abderhalden: Ebenda Bd. 131, S. 293. 1923.

<sup>2)</sup> E. Fischer: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 40, 2, S. 3711. 1907.

<sup>3)</sup> Abderhalden u. Funk: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 53, S. 19. 1907.

<sup>4)</sup> Abderhalden: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 58, S. 381. 1908.

<sup>5)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 128, S. 124. 1923.

<sup>6)</sup> Americ. Journ. of physiol. Bd. 18, S. 123. 1907.

<sup>7)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 42, 4, S. 4752. 1909.

<sup>8)</sup> Hopkins: Biochem. Journ. Bd. 15, S. 286. 1921. — Quastel, Stewart, Tunnicliffe: Biochem. Journ. Bd. 17, S. 586. 1923.

und mit neutralem Bleiacetat ausgefällt. Der mit kaltem Wasser ausgewaschene Bleiniederschlag wird mit Portionen von  $\frac{1}{2}$  n-Schwefelsäure angerieben, solange bis in dieser die Nitroprussidreaktion ausbleibt. Der Schwefelsäureauszug wird mit Uranylacetat im Überschuß versetzt (Tüpfelprobe mit Ferrocyankali) und dann mit heißgesättigter Lösung von Barythydrat ausgefällt, bis durch dieses kein weiterer Niederschlag mehr entsteht. Die Lösung ist jetzt frei von störenden Polypeptiden und Phosphorsäure. Entfernen von Barium durch Schwefelsäure. Das schwach schwefelsaure Filtrat wird dann mit dem Quecksilbersulfatreagens von Hopkins (S. 313) ausgefällt, der Niederschlag mit Schwefelwasserstoff und das Filtrat vom Sulfid mit Luft behandelt. Die Lösung (1000—1500 ccm) wird auf einen Gehalt von  $\frac{1}{2}$  n-Schwefelsäure gebracht und mit Phosphorwolframsäure gelöst in  $\frac{1}{2}$  n-Schwefelsäure gefällt. Man setzt ziemlich viel mehr Reagens zu als zur maximalen Fällung nötig ist. Hierdurch werden störende Beimengungen allerdings mit einem Teil des Glutathion entfernt. Sein Phosphorwolframat ist aber im Überschuß des Reagens löslicher als das der Beimengungen. Die Nitroprussidprobe ist jetzt in der Lösung zwar schwächer als vorher, aber doch deutlich. Der Niederschlag wird abgesaugt, im Filtrat die Phosphorwolframsäure mit Baryt und dieser mit Schwefelsäure entfernt. Die Lösung, die jetzt nicht mehr als 4 l messen soll, wird nun mit der zureichenden Menge Mercurisulfat ausgefällt, der weiße Niederschlag mit Schwefelwasserstoff zerlegt. In der schwach schwefelsauren Lösung fallen jetzt die Schwefelbleiprobe und die Nitroprussidreaktion (nach Entfernen des Schwefelwasserstoffs durch Kochen) stark positiv aus. Die endgültige Reinigung bedient sich der Kupferverbindung, die wie die des Cystein als schwer lösliche graublau Verbindung ausfällt, wenn die Lösung der reduzierten Form des Glutathions mit frisch gefälltem Kupferhydroxyd durchgeschüttelt wird. In die obige Lösung wird daher am besten ein Überschuß von Kupferhydroxyd eingetragen, die überstehende Flüssigkeit durch Natronlauge gegen Lackmus neutralisiert und dadurch die Fällung vervollständigt. Der Niederschlag wird mit Schwefelwasserstoff behandelt, das Filtrat nach Entfernung des Schwefelwasserstoffüberschusses durch Kochen mit Baryt alkalisch gemacht. Dann bläst man Luft durch die Lösung, bis die Nitroprussidreaktion verschwunden ist. Die Lösung wird jetzt sorgfältig von Barium- und Sulfationen befreit, im Vakuum auf etwa 10 ccm eingeengt und in 100 ccm absoluten Alkohol eingetragen. Die Cystinverbindung fällt als weißes amorphes Pulver aus. Statt der Kupferverbindung kann man sich zur endgültigen Reinigung auch der Bleiverbindung bedienen, die aber leichter löslich ist.

Isolierung aus  
Organen.

Bei der Isolierung aus tierischen Geweben werden diese zerhackt und mit dem gleichen Volumen Wasser bei  $40^{\circ}$  2—3 Stunden digeriert, das Gemisch durch Leinwand koliert und mit dem Rückstand die Extraktion wiederholt. Die Auszüge werden an der Pumpe filtriert und mit neutralem Bleiacetat gefällt. Die weitere Verarbeitung der Bleifällung erfolgt wie bei der Hefe. Bequemer ist es, die Organe mit dem gleichen Gewicht  $\frac{1}{10}$  n-Schwefelsäure über Nacht stehen zu lassen, dann die Säure mit Natronlauge abzustumpfen, zum Sieden zu erhitzen und während des Kochens sorgfältig zu neutralisieren. Man saugt ab und zieht den Rückstand 2 mal mit kochendem Wasser aus. Die vereinigten Filtrate werden am besten jetzt schon mit Uranylacetat ausgefällt und das Filtrat davon mit Bleiacetat gefällt. Der schwefelsaure Auszug der Bleifällung braucht dann nur noch mit Baryt behandelt zu werden.

Eigenschaften.

Die reduzierte Form wird (bei Vermeiden einer Wiederoxydation) aus ihrer konzentrierten wässerigen Lösung durch Alkohol krystallinisch gefällt; sie ist ziemlich leicht löslich in Alkohol. Nach 3 tägigem Stehen unter Äther-Alkohol

hat sich eine in Wasser schwer lösliche Verbindung (Diketopiperazin?) gebildet, die aus heißem Wasser in Nadeln krystallisiert.

Die oxydierte Form ist ein schneeweißes, nicht hygroskopisches, amorphes Pulver; leicht löslich in Wasser, unlöslich in organischen Lösungsmitteln. Es wird bei 165—167° weich und schmilzt bei 182—185° unter Kohlensäureentwicklung und Aufblähen. Nach van Slyke wird nur die Hälfte Stickstoff entwickelt. Ninhydrinreaktion (S. 219) positiv. Glutathion wird leicht durch Zink und Schwefelsäure oder Schwefelwasserstoff reduziert und ist bei saurer Reaktion ( $p_H < 6,8$ ) in dieser Form beständig. Bei alkalischer Reaktion wird es bereits durch den Luftsauerstoff dehydriert. Bei schwach alkalischer Reaktion ( $p_H = 7,4$ ) wirkt das Glutathion als Überträger von Wasserstoff aus Gewebsbestandteilen auf Acceptoren (eigene Gewebsbestandteile oder fremde Farbstoffe), ohne aber selbst reduziert zu werden.

Beide Formen des Glutathion werden durch Mercurisulfat und Phosphorwolframsäure in schwefelsaurer Lösung gefällt. Die Fällung ist im Überschuß des Reagens löslich; nur mit der reduzierten Form erzeugt neutrales Bleiacetat teilweise und Kupferhydroxyd ziemlich vollständig eine graublau Fällung. Auch Silbersalz und Baryt fällt beide Formen.

Kondensationsprodukt mit 2, 3, 4-Trinitrotoluol ( $C_{15}H_{17}O_9N_4S_2$ )<sup>1)</sup>. Halb-  
krystallinisch, gelb, sehr leicht löslich in Wasser, leicht löslich in Alkohol, unlöslich in Äther und Benzol. Wird bei 115° weich und schmilzt scharf unter Zersetzung bei 202° (unkorr.). Bei der Spaltung mit Schwefelsäure entsteht Cystein und eine gelbe, in Wasser und Alkohol leicht lösliche Substanz, wahrscheinlich das Kondensationsprodukt von Trinitrotoluol mit Glutaminsäure. Verbindung mit Trinitrotoluol.

Bei 8stündigem Kochen mit 25proz. Salzsäure bzw. Schwefelsäure ent-  
steht d-Glutaminsäure und l-Cystin. Mit Silbernitrit und Salzsäure und nachfolgender Säurespaltung entsteht  $\alpha$ -Oxyglutarsäure. Bei der Oxydation mit Wasserstoffsuperoxyd bei Gegenwart von Ferrosalz entsteht erst nach der Säurespaltung des Oxydationsproduktes Bernsteinsäure. Spaltungen.

412. **d-Alanylglycyl-l-tyrosin**  $C_{14}H_{19}N_3O_5$  (von Abderhalden<sup>2)</sup> aus Seiden-  
abfällen gewonnen, s. § 409). Es krystallisiert aus den Mutterlaugen vom d-Alanylglycin (S. 509) aus, wenn diese zuvor mit Phosphorwolframsäure von einem schwerer löslichen öligen Phosphorwolframat befreit worden sind. Krystallisiert aus wässrigem Äthylalkohol in feinen Nadeln, löslich in 2 Tl. kaltem Wasser, unlöslich in Alkohol, Essigester, Äther, Chloroform. Die gesättigte wässrige Lösung gibt mit Ammonsulfat eine ölige, beim Stehen in Eis erstarrende Ausscheidung. Bei raschem Erhitzen schäumt die Substanz gegen 145° auf und zersetzt sich bei 185°.  $[\alpha]_D^{20} = +45,1^\circ$ . Die sichere Charakterisierung durch das Naphthalinsulfoderivat ist nicht gelungen. Das synthetische Tripeptid krystallisiert nicht und hat eine geringere Drehung. Tripeptide.

**Tripeptid aus Tryptophan, l-Leucin und Glutaminsäure** (Abderhalden<sup>3)</sup>, gibt Fällungen mit überschüssiger Phosphorwolframsäure, mit Gerbsäure und mit gesättigter Ammonsulfat- oder salpetersäurehaltiger Kochsalzlösung.

**Tripeptid aus l-Tyrosin, l-Leucin und Glykokoll?** (Abderhalden<sup>4)</sup>.

**Tripeptid aus 2 Mol. Tryptophan und 1 Mol. Alanin?** durch Barythydrolyse aus Casein als amorphes Bariumsalz (Fraenkel u. Nassau<sup>5)</sup>.

**Tripeptid aus d-Alanin, l-Leucin und Prolin** beim stufenweisen Abbau von Casein (Abderhalden<sup>6)</sup>).

<sup>1)</sup> Biochem. Journ. Bd. 17, S. 588. 1923.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 72, S. 1. 1911; Bd. 42, 4, S. 4752. 1909.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 58, S. 382. 1908. <sup>4)</sup> desgl. Bd. 58, S. 386. 1908.

<sup>5)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 110, S. 287. 1920.

<sup>6)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 131, S. 288. 1923.

**Tetrapeptid.** 413. **Tetrapeptid.** Eine Substanz, die recht wahrscheinlich ein Tetrapeptid (aus 2 Tl. Glykokoll, 1 Tl. d-Alanin und 1 Tl. l-Tyrosin) darstellt, wurde von E. Fischer u. Abderhalden<sup>1)</sup> aus hydrolysiertem Seidenfibroin, und zwar aus dem Phosphorwolframsäureniederschlag (§ 407) erhalten.

Es krystallisiert nicht, ist in Wasser leicht löslich, in absolutem Alkohol unlöslich. Molekulargewicht 335—355 (berechnet 366,2). Aus der wässrigen Lösung fällt es auf Zusatz einer gesättigten Ammonsulfatlösung in dicken Flocken, ebenso auf Zusatz von Tannin als dicker, im Überschuß des Fällungsmittels löslicher Niederschlag. Starke Kochsalzlösung ruft nur bei Gegenwart von etwas Salpetersäure oder Essigsäure starke Trübung hervor. Ferrocyanalkali + Essigsäure oder Sublimat geben keine Fällungen, schwach salpetersaure Lösung von Mercuronitrat nur ganz unbedeutende Fällung. Biuret- und Millonsche Reaktion sehr stark. Pankreassaft spaltet Tyrosin ab, aber nicht vollständig. Bei der totalen Hydrolyse entstehen Glykokoll, d-Alanin und l-Tyrosin, und zwar in Mengen, die von den berechneten nicht allzusehr abweichen; bei der partiellen ließen sich Glycyl-d-alaninhydrat und Glycyl-l-tyrosinhydrat isolieren. Eine Synthese dieses Körpers ist noch nicht gelungen (E. Fischer<sup>2)</sup>).

#### *Oxydations- und Substitutionsprodukte der Proteine.*

**Darstellung und Zusammensetzung.** 414. **Oxyprotosulfonsäure.** Aus Eiereiweiß wurde zuerst von Brücke, dann von Maly<sup>3)</sup> durch mehrtägige Einwirkung von Kaliumpermanganat (auf 300 g in Wasser gelöstes Eiweiß 170 g Permanganat) eine Säure, Oxyprotosulfonsäure, erhalten, die aus dem Filtrat des Manganschlammes mit Säure gefällt in Wasser fast unlöslich ist, amorph erscheint, in konzentrierten Mineralsäuren leicht löslich, durch Wasser wieder ausfällbar ist, sich in Alkalien leicht löst und ebenso in den Lösungen neutraler Salze organischer Säuren, z. B. Natriumacetat, unter Zuhilfenahme eines Teils des Alkalis. Aus ihren Lösungen in Alkalien wird sie durch Zusatz gesättigter Ammonsulfatlösung gefällt.

Buraczewski und Krause<sup>4)</sup> stellten ein ähnliches Produkt auch aus Serumalbumin und Casein dar; es ließ sich aufteilen in eine in Eisessig unlösliche  $\alpha$ -Säure, eine  $\beta$ -Säure, die in warmer Essigsäure löslich ist, beim Erkalten amorph ausfällt, und saure Körper, die auch in kalter Essigsäure gelöst bleiben. Behandlung mit Alkohol teilt sie in darin unlösliche, darin nur in der Wärme lösliche, und darin auch in der Kälte lösliche, mit Äther aus der alkoholischen Lösung fällbare Fraktionen auf. Die Analyse weist auf die nahe Verwandtschaft zum Ausgangsmaterial hin (C 47,6—52,3, H 6,7—7,3, N 13,3—15,4, S 1,0—1,7%).

**Eigenschaften.** Außer der Oxyprotosulfonsäure entstehen noch Albumosen und Peptone, Fettsäuren, basische Körper, welche nach Ausscheidung der Oxyprotosulfonsäure im Filtrat nachgewiesen werden können, sowie Kohlensäure und Ammoniak (Bernert<sup>5)</sup>). Die Oxyprotosulfonsäure sowie die Albumosen und Peptone geben die Biuret- und Molischsche Reaktion, nicht aber die Xanthoproteinprobe und die Reaktionen von Millon und Adamkiewicz. Die Schwefelbleiprobe fällt bei der  $\alpha$ -Säure Buraczewskis sehr stark positiv aus, bei der  $\beta$ -Säure weniger, und fehlt bei der  $\gamma$ -Säure; es scheint also, daß die Löslichkeit der Oxydationsprodukte zunimmt mit fortschreitender Oxydation an der schwefelhaltigen Gruppe im Eiweiß.

**Zersetzungen.** Beim Schmelzen mit Ätzkali entstehen schweflige Säure, Säuren der Fett- und Oxalsäurereihe und von aromatischen Körpern nur Benzol und Pyrrol; auch die Albumosen und Peptone liefern bei der gleichen Behandlung weder Indol noch Skatol. Bei der Oxydation mit Chromsäuregemisch entsteht Benzoesäure, bei der Spaltung mit konzentrierter Salzsäure Leucin, Asparaginsäure, basische Produkte, kein Tyrosin.

415. **Peroxyprotosäure.** Durch weitere mehrwöchige Einwirkung von Kaliumpermanganat erhielt Maly die Peroxyprotosäure, welche aber nach v. Fürth<sup>6)</sup> aus einem Gemenge von mindestens drei verschiedenen hochmolekularen Substanzen besteht, die durch fraktionierte Fällung mit Silbernitrat, Bleiessig und Quecksilberacetat voneinander getrennt werden können. Durch mehrstündiges Kochen mit Barytwasser entsteht aus ihnen durch Abspaltung von Oxalsäure und eines erheblichen Teiles des Stickstoffs eine neue Art von Substanzen, welche die Biuretreaktion noch geben, die Desaminoprotosäuren, welche durch neuerliche Oxydation mit Permanganat in die Kyprotosäuren, die auch noch die Biuretreaktion geben, übergeführt werden.

<sup>1)</sup> E. Fischer u. Abderhalden: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 40, 3, S. 3544. 1907. — Abderhalden u. Fodor: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 81, S. 13, 47. 1912.

<sup>2)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 41, 1, S. 850. 1908.

<sup>3)</sup> Monatshefte f. Chem. Bd. 6, S. 107. 1885; Bd. 9, S. 255. 1888.

<sup>4)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 71, S. 156. 1911; Bd. 76, S. 37. 1911/12.

<sup>5)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 26, S. 272. 1899.

<sup>6)</sup> Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 6, S. 296. 1905. Probleme der physiologisch-pathologischen Chemie Bd. 1, S. 26—30. 1912.



O. Eisler<sup>1)</sup> oxydierte Casein und Seidenfibroin mit Calciumpermanganat; er erhielt Kyroprotsäuren als Quecksilbersalz und bestimmte darin die Stickstoffverteilung. Ein sicherer Einblick in den Aufbau dieser Produkte ist noch nicht erhalten worden.

416. **Oxyprotein** nennt Schulz<sup>2)</sup> ein durch Wasserstoffsperoxyd aus Eialbumin erhaltenes Produkt, das schon früher von Chandelon und Wurster beobachtet worden ist. Bei der Einwirkung von Wasserstoffsperoxyd bei Gegenwart von Platinmohr auf eine Lösung von krystallisiertem Ovalbumin bei Bluttemperatur scheidet es sich im Verlauf mehrerer Tage ab. Durch Lösen des abfiltrierten und gewaschenen Niederschlags in ganz schwacher Natronlauge, Wiederausfällen durch Neutralisieren mit Salzsäure und mehrfaches Wiederholen dieses Prozesses läßt es sich reinigen. C 50,85, H 6,74, N 14,62, S 1,2%. Löslich in äußerst verdünntem Alkali, durch Neutralsalze oder Neutralisation mit Säure fällbar, im Überschuß der Säure nicht löslich, ebenfalls nicht löslich in Natriumacetatlösung (Unterschied von Oxyprotsulfonsäure). Die Farbenreaktionen fallen positiv aus. Bei der hydrolytischen Spaltung wurde kein Tyrosin gefunden.

Bei der Benutzung von reinem (säurefreiem) Wasserstoffsperoxyd entsteht keine Albumose und kein Pepton, sondern nur Oxyprotein.

417. **Xanthoproteinsäure (Xanthoprotein)**. Dieses Produkt, welches aus Eiweiß bei der Einwirkung von Salpetersäure unter Eintritt von Nitrogruppen und gleichzeitiger Oxydation entsteht, ist von v. Fürth<sup>3)</sup> untersucht worden, der auch feststellte, daß nebenbei eine reichliche Bildung von meist ebenfalls nitrierten Albumosen und Peptonen erfolgt. Man stellt die Substanz nach v. Fürth dar durch vorsichtiges Eintragen von feingepulvertem Casein in das Doppelte seiner Gewichtsmenge reiner, etwas Harnstoff enthaltender, konzentrierter Salpetersäure. Nach erfolgter Lösung bringt man die Flüssigkeit in das mehrfache Volumen Wasser, filtriert den entstandenen hellgelben Niederschlag ab, löst ihn in Natronlauge und fällt die rotbraune Lösung mit Essigsäure. Lösung und Fällung wird wiederholt, der Niederschlag schließlich dialysiert. Er sieht gelb aus und löst sich in Alkalien mit rotbrauner Farbe. Millonsche Probe und Schwefelbleiprobe negativ. Bei der Spaltung bildet sich kein Tyrosin, bei der Verdauung entstehen nitrierte Albumosen und Peptone.

418. **Andere nitrierte Proteine**. Sie enthalten an Stelle von Arginin zu einem mehr oder weniger großen Teil Nitroarginin. Im Kosselschen Institut<sup>4)</sup> wurden vor allem Protamine und Histone nitriert, z. B. Clupein, Salmin, Sturin und Histon.

Nitroclupein. 2 g Clupeinsulfat werden mit 4 ccm konzentrierter Schwefelsäure und 2 ccm rauchender Schwefelsäure (10 proz. SO<sub>3</sub>) unter Abkühlung mit Eis zur gleichmäßig dicklichen Masse verrührt. Man fügt 1 ccm eiskalte, rauchende Salpetersäure hinzu und mischt unter Abkühlen gut durch; es soll keine Verfärbung und Gasentwicklung auftreten. Nach 5—10 Minuten läßt man die dickliche Masse in etwa 200 ccm Eiswasser tropfen. Das Nitroclupein scheidet sich als rein weißer Niederschlag aus, der nach einigem Stehen zerreiblich wird. Es wird gut ausgewaschen, in 2 proz. Natronlauge gelöst und mit Schwefelsäure erneut gefällt. Bei der Säurespaltung entsteht Nitroarginin.

Löslich in kaustischen und kohlensauren Alkalien, fällbar durch Säuren, Biuretreaktion positiv.

Nitrofibroin aus Seidefibroinxanthoproteinsäure<sup>5)</sup>. 20 g Seide werden mit 1000 ccm Salpetersäure (spez. Gew. 1,12) überschießt und 12 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen; hellgoldgelb;  $[\alpha]_D^{17} = -43,39-44,10^\circ$ . Millonsche Reaktion nicht mehr positiv. Biuretreaktion kommt nicht zum Ausdruck in der orangefarbenen alkalischen Lösung. Unlöslich in kalten Laugen und Eisessig, bei der Säurespaltung 4-Oxy-3-nitrophenylalanin.

419. **Desaminoproteine**. Sie werden durch Einwirkung von verdünnter salpetriger Säure auf Proteine erhalten; das Reaktionsprodukt wird nach den für Eiweiß üblichen Methoden aufgearbeitet. Eine Gewähr für ein einheitliches Produkt und dafür, daß Peptidbindungen nicht aufgespalten sind, hat man jedoch nicht. Bei der hydrolytischen Spaltung gaben sie, soweit untersucht, kein Lysin, dafür eine entsprechende Zunahme des Stickstoffes in der Monaminosäurefraktion. Der Tyrosingehalt nimmt ab, ebenso der formoltitrierbare und nach van Slyke bestimmbare Stickstoff. Die Desaminoproteine verbinden sich mit Säuren noch zu Proteinsalzen<sup>6)</sup>, entsprechend ihrem (meist unveränderten) Gehalt an Arginin und Histidin. Von Pepsin und Trypsin werden sie langsam, von Erepsin erst nach vorheriger tryptischer Verdauung angegriffen.

1) Biochem. Zeitschr. Bd. 51, S. 27. 1913.

2) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 29, S. 86. 1900.

3) Habilitationsschrift. Straßburg 1899; hier auch die ältere Literatur.

4) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 72, S. 487, 488. 1911; Bd. 78, S. 54, 409. 1912; Bd. 84, S. 1, 4. 1913.

5) Johnson, Hill u. O'Hara: Journ. of the Americ. chem. soc. Bd. 37, S. 2170. 1915; Bd. 38, S. 1392. 1916.

6) Blasel u. Matula: Biochem. Zeitschr. Bd. 58, S. 417. 1914.

Verfüttert erscheint ihr Stickstoff als Harnstoff im Harn. Im einzelnen s. die Arbeiten von Skraup u. Hörnes<sup>1)</sup>, Skraup<sup>2)</sup>, Lampel<sup>3)</sup>, J. v. Braun<sup>4)</sup>, Skraup u. Krause<sup>5)</sup>, Levites<sup>6)</sup>, Treves u. Salomone<sup>7)</sup>, Dunn u. Lewis<sup>8)</sup>.

420. **Methylierte Proteine** wurden von Skraup<sup>9)</sup> in alkoholischer Lösung mit Jodmethyl und Kalilauge hergestellt; später wurden sie in ätherischer Lösung mit Diazomethan von Geake und Nierenstein<sup>10)</sup>, von Herzig und Landsteiner<sup>11)</sup> oder in wässrig-alkalischer Lösung mit Dimethylsulfat im Institut von Kossel<sup>12)</sup> erhalten. An ihnen und ihren Hydrolyseprodukten wird der formoltitrierbare, der nach van Slyke bestimmbare Stickstoff, die mit Sauerstoff und Stickstoff verbundenen Methylgruppen bestimmt in den einzelnen Fraktionen und die Werte in Beziehung zum Gesamtstickstoff der Fraktionen gebracht. Auch acetylierte<sup>13)</sup> und desamidierte Proteine<sup>14)</sup> wurden methyliert. Inwieweit einzelne Gruppen im Eiweiß monomethyliert oder betainisiert werden, steht noch nicht fest. Millonsche und Paulysche Diazoreaktion verschwinden meist bei der Methylierung. Die proteolytischen Fermente des Darms spalten nicht auf.

421. **Acylierte Proteine.** Acetyl-<sup>14)</sup>, Benzoyl-<sup>15)</sup> und Sulfoäurereste<sup>16)</sup> wurden in Proteine eingeführt. Näheres s. in den Originalarbeiten.

422. **Halogensubstituierte Proteine.** Ein natürlich vorkommendes ist das Thyreoglobulin (§ 342). Auch die zu den Albuminoiden gehörigen natürlich vorkommenden Cornein (§ 390) und Spongine (§ 391) sind halogenhaltig. Durch Einwirkung von Halogen auf die verschiedensten Eiweißstoffe hat man auch künstlich Halogen in das Eiweiß eingeführt und Körper hergestellt, welche Halogen in fester Bindung enthalten. Es sind das braune oder graue amorphe Substanzen, die schneeweiß und lichtbeständig erhalten werden können, wenn in der Kälte und ohne Überschuß von Jod gearbeitet wird; sie sind in Wasser unlöslich, löslich in Alkalien, durch Säuren wieder fällbar. Sie geben von den Farbenreaktionen nur die Biuret-, die Xanthoprotein- und die Molischsche Probe. Bei der Hydrolyse entsteht Jodgorgosäure (§ 214). Der maximale Halogengehalt ist für die verschiedenen Eiweißstoffe verschieden, z. B. für Jodoalbumin 9%, für Jodserumalbumin 12%, Jodmucoid (aus Achillessehne des Rindes) rund 14% Jod. Näheres über Jodeiweißstoffe und die Methode ihrer Darstellung s. besonders in den Arbeiten von Hofmeister<sup>17)</sup>, Kurajeff<sup>18)</sup>, Blum<sup>19)</sup>, Oswald<sup>20)</sup>, über die übrigen Halogeneiweißstoffe bei Blum und Vaubel<sup>21)</sup>, Hopkins<sup>22)</sup>, Habermann und Ehrenfeld<sup>23)</sup>, Panzer<sup>24)</sup> und G. M. Meyer<sup>25)</sup>.

<sup>1)</sup> Monatshefte f. Chem. Bd. 27, S. 631. 1906; hier auch die ältere Literatur.

<sup>2)</sup> Monatshefte f. Chem. Bd. 27, S. 653. 1906; Bd. 28, S. 447. 1907. Biochem. Zeitschr. Bd. 10, S. 245. 1908.

<sup>3)</sup> Monatshefte f. Chem. Bd. 28, S. 625. 1907.

<sup>4)</sup> J. v. Braun: Med.-Naturw. Arch. Bd. 2, S. 172. 1908.

<sup>5)</sup> Monatshefte f. Chem. Bd. 30, S. 44. 1909.

<sup>6)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 43, S. 202. 1904/05. Biochem. Zeitschr. Bd. 20, S. 224. 1909.

<sup>7)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 7, S. 11. 1908.

<sup>8)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 49, S. 327, 343. 1921.

<sup>9)</sup> Monatshefte f. Chem. Bd. 30, S. 447. 1909; Bd. 31, S. 1035. 1910.

<sup>10)</sup> Biochem. Journ. Bd. 8, S. 827. 1914.

<sup>11)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 61, S. 458. 1914; Bd. 67, S. 334. 1914. Monatshefte f. Chem. Bd. 39, S. 269. 1918. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 110, S. 156. 1920; Bd. 111, S. 223. 1920; Bd. 117, S. 1. 1921.

<sup>12)</sup> Rogozinski: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 80, S. 371. 1912. — Edlbacher: desgl. Bd. 107, S. 52. 1919; Bd. 108, S. 287. 1919; Bd. 110, S. 153. 1920; Bd. 112, S. 80. 1921.

<sup>13)</sup> Troensegaard: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 127, S. 148. 1923.

<sup>14)</sup> Landsteiner u. Prasek: Biochem. Zeitschr. Bd. 58, S. 362. 1914; Bd. 74, S. 388. 1916; — Troensegaard: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 112, S. 86. 1921; Bd. 127, S. 144. 1923.

<sup>15)</sup> Schroetter: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 22, 2, S. 1950. 1889. — Blum u. Umbach: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 88, S. 285. 1913.

<sup>16)</sup> Hirayama: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 59, S. 285. 1909. — Edlbacher u. Fuchs: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 114, S. 133. 1921.

<sup>17)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 24, S. 159. 1898. <sup>18)</sup> desgl. Bd. 26, S. 462. 1899.

<sup>19)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 28, S. 288. 1899.

<sup>20)</sup> Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 3, S. 391, 514. 1903. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 95, S. 351. 1915.

<sup>21)</sup> Journ. f. prakt. Chem., N. F. Bd. 56, S. 393. 1897; Bd. 57, S. 365. 1898.

<sup>22)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 30, 2, S. 1860. 1897; Bd. 31, 2, S. 1311. 1898.

<sup>23)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 32, S. 467. 1901; Bd. 34, S. 566. 1901/02.

<sup>24)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 33, S. 131, 595. 1901; Bd. 34, S. 66. 1901/02.

<sup>25)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 7, S. 11. 1910.

Daß die schwefelhaltige Gruppe im ursprünglichen Eiweiß verändert wird, zeigt der negative Ausfall der Schwefelbleiprobe und das Fehlen von  $\text{SO}_2$  unter den Produkten der Einwirkung von Wasserstoffsperoxyd (Baudisch<sup>1</sup>).

### Oxyproteinsäure, Antoxyproteinsäure, Alloxyproteinsäure.

423. Diese hochmolekularen, stickstoff- und schwefelhaltigen, sauerstoffreichen Säuren, welche als Produkte unvollständiger Zersetzung von Proteinstoffen aufzufassen sind, wurden von Bondzynski<sup>2</sup>) und seinen Mitarbeitern aus menschlichem Harn (die erstgenannte auch aus Hundeharn, und aus diesem besonders reichlich nach Phosphorvergiftung) in Form ihrer Baryt- und Silbersalze isoliert. Nach Browinski<sup>3</sup>) finden sie sich auch im Pferdeharn und Pferdeblut sowie in Blut und Lymphe des Menschen. Die Oxyproteinsäure soll im 24stündigen Harn in einer Menge von 3—4 g, die Alloxyproteinsäure in einer Menge von 1—2 g vorhanden sein, bei Carcinom in vermehrter Menge (Kojo<sup>4</sup>). Mit der Oxyproteinsäure steht Moores Urein, mit der Antoxyproteinsäure die „Peptide“ des Harns in Beziehung. Aminostickstoffbestimmungen benutzten zur Charakterisierung der Säuren Browinski und Dombrowski<sup>5</sup>) sowie Glagolew<sup>6</sup>). Edlbacher betont, daß ein innerer Zwang dazu, diese verschiedenartigen Körper in einer Gruppe zusammenzufassen, abzulehnen ist.

Vorkommen  
im Harn.

Zur Darstellung wird der im Vakuum zum dünnen Sirup eingedampfte Harn bis zur schwachen Blaufärbung von Kongopapier mit verdünnter Schwefelsäure und darauf mit 1½ Vol. Alkohol versetzt und von ausgeschiedenen Alkalisulfaten abfiltriert. Aus dem Filtrat wird der Alkohol durch Verdunsten im Vakuum bei 35° entfernt, die Flüssigkeit nun mit Äther extrahiert und mit Barytwasser gefällt, der Barytüberschuß gleich mit Kohlensäure gefällt, die Flüssigkeit vom gesamten Barytniederschlag abfiltriert, im Vakuum zum Sirup eingedampft und nach Entfernung eines großen Teils des Natriumchlorids durch Auskrystallisieren in der Kälte mit absolutem Alkohol gefällt. Der aus Bariumsalzen bestehende Niederschlag wird nach dem Trocknen im Exsiccator in Wasser gelöst und die Lösung mit Bleiessig gefällt. Aus dem Filtrat werden die Säuren der Oxyproteinsäuregruppe (Oxyproteinsäure und Antoxyproteinsäure) gewonnen, aus dem Bleiessigniederschlag die Säuren der Alloxyproteinsäuregruppe, speziell die Alloxyproteinsäure und Urochrom (S. 301). Über die Trennungverfahren s. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 46, S. 83. 1905, über die Darstellung des Urochroms auch S. 301.

Darstellung.

Oxyproteinsäure<sup>7</sup>). Die aus den für das Silbersalz gefundenen Mittelwerten berechnete Zusammensetzung: C 39,62, H 5,64, N 18,08, S 1,12, O 35,54%.

Oxyproteinsäure.

Alkalisalze zerfließlich und auch in Alkohol nicht schwer löslich. Bariumsalz, weißes, an der Luft zerfließliches Pulver, schwer löslich in Alkohol, wenn auch leichter als antoxyproteinsaures Barium, optisch inaktiv; Silbersalz in Alkohol und Wasser viel leichter löslich als antoxyproteinsaures Barium.

Die Säure ist durch Bleiessig und Phosphorwolframsäure nicht fällbar, aber durch Quecksilberacetat schon aus essigsaurer Lösung, reichlicher aus neutraler, vollständig bei sodaalkalischer Reaktion.

Biuret-, Xanthoprotein-, Diazoprobe negativ, Millonsche ganz schwach chamois, bildet beim Kochen mit bleihaltiger Lauge kein Schwefelblei. Die freie Säure scheint nicht existenzfähig zu sein, ihr Stickstoff wird dabei als Harnstoff frei. Tyrosin und Hexonbasen sind sicher nicht vorhanden, andere Aminosäuren höchstens in Spuren.

Sie gleicht Moores Urein und ist möglicherweise ein Kunstprodukt.

Antoxyproteinsäure<sup>8</sup>). Die aus den für das Silbersalz gefundenen Mittelwerten berechnete Zusammensetzung: C 43,21, H 4,91, N 24,40, S 0,61, O 26,33%.

Antoxyproteinsäure.

Alkalisalze in Wasser sehr leicht löslich. Bariumsalz, weißes, in Wasser sehr leicht, in absolutem Alkohol sehr schwer lösliches Pulver. Seine wässrige Lösung reagiert alkalisch. Silbersalz in Wasser löslich, in Alkohol noch schwerer als das Bariumsalz.

<sup>1</sup>) Chemiker-Zeit. Bd. 32, S. 620. 1908.

<sup>2</sup>) Bondzynski u. Gottlieb: Zentralbl. f. med. Wiss. 1897, S. 577. — Bondzynski u. Panek: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 35, 3, S. 2959. 1902. — Bondzynski, Dombrowski u. Panek: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 46, S. 83. 1905; vgl. auch Cloetta: Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 40, S. 29. 1898.

<sup>3</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 54, S. 548. 1908; Bd. 58, S. 134. 1908. — Gawinski: desgl. Bd. 58, S. 454. 1908. — Czernecki: Anz. d. Akad. Krakau (A.) 1910, S. 399; ref. Chem. Zentralbl. 1911, I, S. 902.

<sup>4</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 73, S. 430. 1911. <sup>5</sup>) desgl. Bd. 77, S. 92. 1912.

<sup>6</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 89, S. 432. 1914.

<sup>7</sup>) Edlbacher: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 120, S. 74. 1922; Bd. 131, S. 177. 1923.

<sup>8</sup>) Edlbacher: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 127, S. 186. 1923.

Die Säure ist durch Bleiessig nicht fällbar, aber aus konzentrierter Lösung durch Phosphorwolframsäure. Ferner wird sie gefällt durch Quecksilbernitrat und durch Quecksilberacetat und durch letzteres Reagens schon aus stark essigsaurer Lösung, dabei fällt oxyproteinsaures Quecksilber mit (Edlbacher).

Biuret-, Xanthoprotein- und Millonsche Probe negativ, Schwefelbleiprobe positiv. Die Diazoprobe gelingt schon mit einigen Milligrammen der Salze.

Sie ist ziemlich stark rechtsdrehend.

Dem Sirup der freien Säure läßt sich mit Äther in sehr kleinen Mengen ein Phenol (Diazoreaktion positiv, Millonsche Reaktion positiv) entziehen (Edlbacher).

Auch beim mäßigen Erwärmen mit verdünnter Salzsäure wird reichlich Schwefelwasserstoff abgespalten.

Bei der Hydrolyse entstehen reichlich Monamino-säuren, ferner Histidin, Arginin und Lysin.

Pregls Substanz  
aus Harn.

In Beziehung zur Antoxyproteinsäure steht vielleicht auch die von Pregl aus dem Harn isolierte schwer dialysierbare Substanz, welche bei der Säurespaltung Glykokoll, Alanin, Leucin, Glutaminsäure, Phenylalanin, wahrscheinlich auch Asparaginsäure lieferte (Abderhalden u. Pregl<sup>1</sup>).

Alloxyprotein-  
säure.

Alloxyproteinsäure. Die aus den für das Silbersalz gefundenen Mittelwerten berechnete Zusammensetzung: C 41,33, H 5,70, N 13,55, S 2,19, O 37,23%.

Alkalisalze in Wasser leicht löslich. Bariumsalz nicht an der Luft zerfließlich, aber in Wasser sehr leicht mit alkalischer Reaktion löslich und durch Alkohol flockig fällbar, inaktiv. Silbersalz in Wasser schwer, in Alkohol noch schwerer löslich. Die Salze unterscheiden sich von den Salzen der Oxy- und Antoxyproteinsäure durch ihre geringere Löslichkeit in Alkohol.

Die Säure ist durch Bleiessig und durch Quecksilberacetat fällbar, nicht durch Phosphorwolframsäure und durch Eisenchlorid.

Die Biuret-, Xanthoprotein- und Millonsche Reaktion negativ, ebenso auch die Diazoprobe. Schwefelbleiprobe positiv. Auch bei mäßigem Erwärmen mit verdünnter Salzsäure wird reichlich Schwefelwasserstoff abgespalten.

Urochrom.

Urochrom s. S. 301.

Uroprotsäure.

Die Uroprotsäure von Cloetta<sup>2</sup>) und eine von Hari<sup>3</sup>) aus menschlichem Harn gewonnene stickstoff- und schwefelhaltige Säure stehen offenbar den beschriebenen nahe, können aber ihrer Darstellung nach nicht als einheitliche Substanzen angesehen werden.

Uroferrinsäure.

Uroferrinsäure wurde aus menschlichem Harn von Thiele<sup>4</sup>) nach einem Verfahren, welches auf ihrer Fällbarkeit aus ammoniumsulfatgesättigter Lösung mit ammoniumsulfatgesättigter Eisenammoniakalaunlösung beruht, gewonnen.

Die Zusammensetzung entspricht der Formel  $C_{35}H_{56}N_8SO_{19}$  (C 45,45, H 6,08, N 12,12, S 3,46%). Lockeres, weißes, nur wenig hygroskopisches Pulver, sehr leicht in Wasser, gesättigter Ammonsulfatlösung und trockenem Methylalkohol löslich.

Das Zinksalz und das Bariumsalz sind in Wasser löslich und werden aus ihren Lösungen durch Alkohol in weißen Flocken gefällt.

Phosphorwolframsäure, Quecksilbersulfat und -nitrat rufen schon in verdünnten Lösungen, Eisenchlorid, Bleiacetat, Silbernitrat erst in konzentrierten Lösungen Niederschläge hervor.

Biuret-, Adamkiewiczische, Xanthoprotein-, Millonsche und Schwefelbleiprobe negativ. Die Säure dreht links, annähernd  $[\alpha]_D = -32,5^\circ$ .

Beim längeren Kochen mit Salzsäure wird etwa die Hälfte des Schwefels als Schwefelsäure abgespalten, ferner ließen sich unter den Spaltungsprodukten Schwefelwasserstoff, Ammoniak, Melaninsubstanzen und Asparaginsäure nachweisen.

Nach Bondzynski<sup>5</sup>) ist die Uroferrinsäure nicht im Harn vorgebildet, sondern ein Zeretzungsprodukt einer oder mehrerer Alloxyproteinsäuren. S. dazu die Einwände von Liebermann<sup>6</sup>).

**Proteide** sind Verbindungen, welche durch einfache Spaltung mittels Wasser, Säuren, Alkalien in Eiweißstoffe und eine nicht eiweißartige Gruppe, die von Kossel sogenannte prosthetische Gruppe, zerlegt werden. Man rechnet zu ihnen die Blutfarbstoffe, Nucleoproteide, Phosphorproteide und Glucoproteide.

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 46, S. 19. 1905.

<sup>2</sup>) Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 40, S. 29. 1898.

<sup>3</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 46, S. 1. 1905.

<sup>4</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 37, S. 251. 1902/03.

<sup>5</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 46, S. 114. 1905.

<sup>6</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 52, S. 129. 1907.

**Blutfarbstoffe und ihre nächsten Derivate.**

(Bearbeitet von P. Brigl-Tübingen.)

Die Blutfarbstoffe Hämoglobin und Oxyhämoglobin sind Verbindungen von Eiweißstoff mit den Farbstoffgruppen Hämochromogen (§ 285) bzw. Hämatin (§ 286). Oxyhämoglobin ist eine molekulare Verbindung von Hämoglobin und Sauerstoff. Sie finden sich im Protoplasma der roten Blutkörperchen der Wirbeltiere (nach Hoppe - Seyler<sup>1</sup>) vermutlich in Verbindung mit einem anderen Stoff) und können mehr oder weniger leicht krystallisiert erhalten werden. Im arteriellen Blut überwiegt bei weitem das Oxyhämoglobin, im Erstickungsblut findet sich fast ausschließlich Hämoglobin, im venösen ein Gemenge beider. Es ist noch strittig, ob das Oxyhämoglobin aller Wirbeltiere verschieden ist. Für eine Verschiedenheit je nach der Tierart sprechen Unterschiede in Krystallform, Löslichkeit und Zusammensetzung, insbesondere Unterschiede in der Proportion Fe:S. Jedenfalls erstreckt sich eine Verschiedenheit nur auf die Eiweißkomponente, die Farbkomponente ist sicher identisch. Gegen die Annahme verschiedener Hämoglobinarten wird angeführt, daß selbst bei der gleichen Tierart die Zusammensetzung schwankt je nach der Darstellung. Auch aus dem Blut verschiedener Avertebraten (vieler Würmer und Crustaceen, einiger Mollusken und Insekten) sind Farbstoffe erhalten worden, welche im optischen Verhalten, in Reaktionen und Zersetzungen mit dem Oxyhämoglobin übereinstimmen. Der Muskelfarbstoff steht dem Blutfarbstoff sehr nahe, wenn er auch bisher nicht krystallisiert erhalten werden konnte und im spektroskopischen Verhalten eine geringe Abweichung zeigt (K. Mörner<sup>2</sup>).

**424. Oxyhämoglobin.** Zur Darstellung möglichst reinen Oxyhämoglobins mischt man nach Hoppe - Seyler das defibrinierte Blut mit dem 10fachen Volumen einer Chlornatriumlösung, welche auf 1 Vol. gesättigter Salzlösung 9 Vol. Wasser enthält. (Natriumsulfatlösung kann recht wohl an Stelle der Chlornatriumlösung auch bei Säugetierblut verwendet werden, bietet aber hier keine Vorteile, ist dagegen unbedingt vorzuziehen bei Vogel-, Amphibien- oder Fischblut.) Man läßt die Mischung 1—2 Tage in flachen Glasschalen an einem kühlen Orte stehen oder beschleunigt den Absatz der roten Blutkörperchen durch 2—3ständiges Zentrifugieren, gießt die Flüssigkeit vom dicken Blutkörperchenbrei ab, bringt letzteren mit nicht zu viel Wasser (nach Abderhalden<sup>3</sup>) je nach der Tierart 1—2 Volumina des Blutkörperchenbreies) in einen Scheidetrichter, gießt fast ebensoviel Äther hinzu, schüttelt gut um, jedoch nicht zu heftig, filtriert die abgelassene dunkelrote, wässrige Lösung schnell, läßt auf 0° abkühlen, mischt sie genau mit  $\frac{1}{4}$  ihres Volumens Alkohol, der gleichfalls auf 0° erkaltet ist, und läßt die Mischung bei 0° (evtl. bei — 2° bis — 10°) einen bis mehrere Tage stehen. Meerschweinchen-, Ratten-, Eichhörnchen- und Hunde-Oxyhämoglobinkrystalle bilden sich in der Regel nach dem Schütteln der Blutkörperchen mit Äther so schnell, daß beim nachherigen Filtrieren ein meist nicht geringer Teil auf dem Filter sich ausscheidet. Zeigt die mikroskopische Untersuchung, daß dies der Fall ist, so löst man sie mit nicht zu viel Wasser im Wasserbade bei 30—40°, filtriert schnell, läßt auf 0° erkalten, fügt  $\frac{1}{4}$  Vol. stark abgekühlten Alkohol hinzu und läßt unter 0° stehen. Auf diese Weise können auch die gebildeten, in der Kälte abfiltrierten und abgepreßten Krystalle

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 13, S. 479. 1889.

<sup>2</sup>) Nordiskt med. Ark., Festbd. No. 2. 1897. Malys Jahresber. d. Tierchem. Bd. 27, S. 456. 1898.

<sup>3</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd 24, S. 545. 1898. Zeitschr. f. Biol. Bd. 39, S. 143 1900.

mehrmals umkrystallisiert werden. Zur vollständigen Reinigung (Entfernung anderer Eiweißstoffe) ist mehrmaliges Umkrystallisieren nötig. Die Oxyhämoglobine der eben genannten Tierarten sind in Wasser schwer löslich und krystallisieren deshalb leicht. Dasselbe gilt vom Pferdeoxyhämoglobin. Die Oxyhämoglobine vom Menschen, Rind, Schwein, von der Katze sind leicht löslich und deshalb schwieriger krystallinisch zu erhalten. Bei der Schildkröte und den Vögeln kann bei der Auflösung der Blutkörperchen eine von den Zellkernen herrührende nachträgliche Gerinnung sehr stören. Man erwärmt dann vor dem ersten Filtrieren einige Zeit auf 35° oder sogar 50° und filtriert dann vom Gerinnsel ab. (Bardachzi<sup>1</sup>), Abderhalden und Medigreceanu<sup>2</sup>).

Die Anwendung des Alkohols wird bei einer von Hofmeister und seinen Schülern<sup>3</sup>) angegebenen Methode, die von der Aussalzbareit durch Ammonsulfat Gebrauch macht, vermieden.

nach Heidelberg.

Das prinzipiell verschiedene Verfahren von Heidelberg<sup>4</sup>), das eine Weiterbildung eines von Dudley und Evans<sup>5</sup>) angegebenen ist, macht Gebrauch von der Ausfällbarkeit des Oxyhämoglobins aus einer Hämoglobinlösung durch einen Kohlensäure-Sauerstoffstrom. Abzentrifugierte und 3 mal mit isotonischer Kochsalzlösung (0,85%) gewaschene rote Blutkörperchen von Hund oder Pferd werden in wenig Wasser suspendiert, mit dem 7. Teil des Volumens an Toluol überschichtet und, unter Eiskühlung, ein lebhafter Strom von 1 Vol. Sauerstoff und 3 Vol. Kohlendioxyd eingeleitet. Durch lebhaftes Rühren mit dem Gaseinleitungsrohr befördert man die Hämolyse. Nach einigen Minuten, wenn die Masse dicklich zu werden beginnt, unterbricht man die Gaseinleitung, verschließt sofort mit einem Stopfen und läßt über Nacht in Eis stehen. Zeigt eine mikroskopische Prüfung noch viele nicht aufgelöste rote Blutkörperchen, so wiederholt man das Einleiten des Sauerstoff-Kohlendioxyds und läßt 1—2 Tage länger stehen. Durch Zentrifugieren in einem kühlen Raum trennt man die Mischung in eine obere Toluolschicht und eine wässrige Schicht, zwischen denen die Zelltrümmer schweben und einen Bodensatz von Oxyhämoglobinkrystallen. Man gießt vom Bodensatz ab, der in einem schwachen Kohlendioxydstrom auf Ton von der Mutterlauge befreit wird, ohne daß er aber ganz eintrocknen darf. Zur Reinigung verreibt man mit dem gleichen Volumen Wasser und setzt, unter Eiskühlung und Rühren, soviel normale Natriumcarbonatlösung hinzu, bis eine klare Lösung erfolgt, oder wenigstens keine weitere Aufhellung der trüben Lösung zu beobachten ist. Man klärt völlig durch Zentrifugieren und leitet, unter Kühlung, das obige Gasgemisch ein, bis die Krystallisation beginnt, die über Nacht vervollständigt wird. Man saugt, unter Eiskühlung und Überleiten eines Kohlendioxydstroms, durch ein gehärtetes Filter ab und wäscht mit wenig Eiswasser, das mit Kohlendioxyd gesättigt ist. Für viele Zwecke sind die Krystalle genügend rein, sie sind durch Wiederholung des Verfahrens aber leicht umzu-krystallisieren. Durch Dialyse gegen kohlenstoffhaltiges Wasser kann man schließlich noch von Elektrolyten befreien. Zu achten ist bei diesem Verfahren, das für Hunde- und Pferdeblut erprobt ist, auf dauerndes Arbeiten in der Kälte, stete Gegenwart von Kohlendioxyd, um Wiederauflösung zu verhindern, und Vermeiden von Austrocknung der Krystalle, solange sie noch weiter verarbeitet werden.

1) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 49, S. 465. 1906.

2) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 59, S. 165. 1909.

3) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 28, S. 182. 1899.

4) Journ. of biol. chem. Bd. 53, S. 31. 1922.

5) Biochem. Journ. Bd. 15, S. 487. 1921.

Die Krystalle<sup>1)</sup> der Oxyhämoglobine sind oft nur mikroskopisch nachweisbar, meist mit der Lupe gut erkennbar, selten über 5 mm lang. Die Krystalle des Meerschweinchen- und des Rattenbluts sind Tetraeder und Oktaeder, die des Eichhörnchenbluts hexagonale Tafeln, die des Hunde- und des Pferdeblutes meist lange, rhombische Nadeln, die letzteren aber auch, bei der Darstellung nach Heidelberg<sup>2)</sup>, hexagonale Tafeln, die des Hamsterbluts Rhomboeder wohl des monoklinen Systems, die des Schweinebluts Nadelbüschel des gleichen oder triklinen Systems, die des Gänseblutes dünne rhombische Tafeln. Sie enthalten alle Krystallwasser in verschiedener Menge, dessen Bestimmung Schwierigkeiten bietet. Unter 0° im Vakuum völlig getrocknete Krystalle können auf 100° und höher ohne Zersetzung erhitzt werden; sehr geringe Menge von Wasser dagegen bedingt allmähliche Zersetzung schon bei gewöhnlicher, schneller bei höherer Temperatur. Solange die Krystalle die schöne, hellarterielle Farbe besitzen, sind sie unzersetzt (Hoppe-Seyler). Nach Aron und Müller<sup>2)</sup> verlieren im Vakuum bei gewöhnlicher Temperatur bis zur Konstanz getrocknete Krystalle bei 116° noch 14,35%. Bei höherer Temperatur, etwa von 160° an, tritt völlige Zersetzung ein.

Die Analysen haben zum Teil gut übereinstimmende, zum Teil sehr abweichende Resultate ergeben, aus denen ersichtlich ist, daß verschieden behandelte Stoffe analysiert sind. Die Hauptursache liegt in der Schwierigkeit, das Mitausfallen von Serumbestandteilen zu vermeiden. Eine Analyse des Präparats von Heidelberg<sup>2)</sup> liegt nicht vor.

	C %	H %	N %	S %	O %	Fe %	
Hundeblutkrystalle . . . . .	53,85	7,32	16,17	0,39	21,84	0,43	Hoppe-Seyler <sup>3)</sup>
„ . . . . .	54,57	7,22	16,38	0,57	20,93	0,34	Jaquet <sup>4)</sup>
Pferdeblutkrystalle . . . . .	54,87	6,97	17,31	0,65	19,73	0,47	Hoppe-Seyler u. Kossel <sup>5)</sup>
„ . . . . .	—	—	—	0,44	—	0,39	Hoppe-Seyler
„ . . . . .	54,56	7,15	17,33	0,43	—	—	Schulz <sup>6)</sup>
„ . . . . .	54,76	7,03	17,28	0,67	19,81	0,45	Otto <sup>7)</sup>
„ . . . . .	54,40	7,20	17,61	0,65	19,67	0,47	Bücheler <sup>8)</sup>
„ . . . . .	54,75	6,98	17,35	0,42	20,12	0,38	Abderhalden <sup>9)</sup>
Rinderblutkrystalle . . . . .	54,66	7,25	17,70	0,45	19,54	0,40	Hüfner <sup>8)</sup>
Katzenblutkrystalle . . . . .	54,60	7,25	16,52	0,62	20,66	0,35	Abderhalden <sup>10)</sup>
Meerschweinchenblutkrystalle . . . . .	54,12	7,36	16,78	0,58	20,68	0,48	Hoppe-Seyler <sup>3)</sup>
Eichhörnchenblutkrystalle . . . . .	54,09	7,39	16,09	0,40	21,44	0,59	Hoppe-Seyler <sup>3)</sup>
Schweineblutkrystalle . . . . .	54,17	7,38	16,23	0,66	21,36	0,43	Otto <sup>7)</sup>
„ . . . . .	54,71	7,38	17,43	0,48	19,60	0,40	Hüfner <sup>8)</sup>
Gänseblutkrystalle . . . . .	54,26	7,10	16,21	0,54	20,69	0,43	Hoppe-Seyler <sup>3)</sup>
Hühnerblutkrystalle . . . . .	52,47	7,19	16,45	0,86	22,50	0,335	Jaquet <sup>4)</sup>
Seeschildkrötenblutkrystalle . . . . .	54,77	6,99	17,07	0,38	20,38	0,41	Bardachzi <sup>11)</sup>

In den Blutkrystallen von Vögeln ist Phosphor enthalten (Hoppe-Seyler), der aber auf die Beimengung eines Nucleoproteids zurückzuführen ist (Inoko<sup>12)</sup>, Abderhalden und Medigreceanu).

<sup>1)</sup> Abbildungen von Blutkrystallen bei Friboes: Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 98, S. 434. 1903; bei Möllenhoff, Zeitschr. f. Biol. Bd. 79, S. 93. 1923. Dort auch Literatur. — Landois-Rosemann: Physiol. d. Menschen. 13. Aufl. S. 72. Berlin-Wien 1921.

<sup>2)</sup> Arch. f. Anat. u. Physiol., Physiol. Abt. 1906, Suppl. S. 121.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seyler: Med.-chem. Unters. Heft 3, S. 370. 1868.

<sup>4)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 14, S. 289. 1890. <sup>5)</sup> desgl. Bd. 2, S. 149. 1879.

<sup>6)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 24, S. 469. 1898. <sup>7)</sup> desgl. Bd. 7, S. 61. 1883.

<sup>8)</sup> Hüfner: Gratulationsschrift an C. Ludwig. 1886.

<sup>9)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 37, S. 494. 1902/03.

<sup>10)</sup> Lehrb. d. physiol. Chem. 5. Aufl. S. 688. Berlin 1923.

<sup>11)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 49, S. 465. 1906. <sup>12)</sup> desgl. Bd. 18, S. 57. 1893.

Osborne<sup>1)</sup> fand in Hundeblutkrystallen 0,583% Gesamtschwefel und 0,335% locker gebundenen Schwefel. Aus den besten Analysen des Pferde- und Rinderbluthämoglobins ergibt sich, daß auf 1 Atom Eisen 2 Atome Schwefel kommen, beim Hunde- und Katzenoxyhämoglobin auf 1 Atom Eisen 3 Atome Schwefel. Nach den letzten Untersuchungen von Hufner<sup>2)</sup> erhält das Rinderoxyhämoglobin 0,336% Fe. 1 g Hämoglobin vermag nach Hufner 1,34 ccm Sauerstoff (bei 0° und 760 mm Druck) zu binden, was 1 Mol. Sauerstoff auf 1 Eisen entspräche. Diese an reinen Lösungen von Oxyhämoglobin ermittelten Zahlen, die noch neuerdings durch Burn<sup>3)</sup> und Wertheimer<sup>4)</sup> bestätigt wurden, sind nicht ohne weiteres auf das Blut übertragbar. Schon Bohr, Hasselbalch und Krogh<sup>5)</sup> fanden eine Abhängigkeit der Sauerstoffaufnahme von der Kohlensäurespannung, Barcroft und Mitarbeiter<sup>6)</sup> stellten die Abhängigkeit der Sauerstoffaufnahme vom Gehalt des Bluts an Kohlensäure, Salzen und der Temperatur endgültig fest, wofür Hill<sup>7)</sup> den mathematischen Ausdruck fand. Die Bindung des einen Moleküls Sauerstoff im Oxyhämoglobin ist eine lockere, dissoziierbare. Nicht nur andere Stoffe, die mit Hämoglobin eine Verbindung eingehen, wie Kohlenoxyd, Stickoxyd, Schwefelwasserstoff, können den Sauerstoff verdrängen, auch Durchleiten indifferenten Gase, wie Wasserstoff, oder sogar Evakuieren bewirkt Reduktion zum Hämoglobin. Rascher wirken alkalische Reduktionsmittel, wie Schwefelammonium, Hydrazin oder Stokesche Lösung (Anh.), wovon zum spektroskopischen Nachweis Gebrauch gemacht wird (§ 426).

Eigenschaften.

Oxyhämoglobin ist nach Michaelis<sup>8)</sup> ein Ampholyt mit einem isoelektrischen Punkt bei  $p_H = 6,8$ , nach Hills Berechnung eine Säure etwa von der Stärke der Kohlensäure. Im Blut ist es als Alkaliverbindung anzunehmen und wird auch bei der Darstellung der Blutkrystalle als Alkaliverbindung erhalten, die erst durch Dialyse gegen kohlensäurehaltiges Wasser zerlegt wird (Bottazzi<sup>9)</sup>, Heidelberger). Die nicht dialysierten Oxyhämoglobinkrystalle sind in Wasser mit feurigroter Farbe löslich, aber verschieden leicht, je nach der Tierart (vgl. bei Darstellung). Spuren von Alkalicarbonaten erhöhen die Löslichkeit sehr. In organischen Lösungsmitteln ist es unlöslich, nur in sehr verdünntem Alkohol etwas löslich, und diese Lösung ist bei niedrigerer Temperatur auch ziemlich beständig. Eine verdünnte wässrige Lösung von Oxyhämoglobin ist haltbarer als eine konzentrierte, und eine mit ein wenig Alkalicarbonat versetzte bei gewöhnlicher Temperatur haltbarer als eine neutrale. Neutrales und basisches Bleiacetat fällen eine wässrige Lösung nicht, auch nicht auf Zusatz von Ammoniak, auch salpetersaures Silber fällt nicht, aber beim Stehen finden bald Zersetzungen statt und die Zersetzungsprodukte veranlassen dann Fällungen. Eintragen von pulverigem Kaliumcarbonat in konzentrierte wässrige Lösungen fällt Oxyhämoglobin, und zwar bei niedriger Temperatur zunächst ohne Veränderungen, desgleichen Eintragen von Ammonsulfat bis zur Sättigung. Auch Alkohol fällt Oxyhämoglobin aus seinen Lösungen. Der zuerst entstehende rote Niederschlag ist in Wasser zum Teil sofort wieder löslich; allmählich (schneller beim Erhitzen) geht die Farbe des Niederschlags in Braun über und jetzt ist die Spaltung in Eiweißstoff

<sup>1)</sup> Stud. for the Res. Lab. Connecticut Agr. Exp. Stat. Rep. f. 1900, S. 460.

<sup>2)</sup> Arch. f. Anat. u. Physiol., Physiol. Abt. 1894, S. 130.

<sup>3)</sup> Journ. of physiol. Bd. 45, S. 482. 1913; ref. Chem. Zentralbl. 1913, I, S. 1440.

<sup>4)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 106, S. 12. 1920.

<sup>5)</sup> Zentralbl. f. Physiol. Bd. 17, Nr. 22. 1904.

<sup>6)</sup> Journ. of physiol. Bd. 39, S. 118 und 143. 1909/10.

<sup>7)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 51, S. 359. 1922. — Brown u. Hill: Proc. of the roy. soc. of London Bd. 94, S. 297. 1923; ref. Ber. üb. d. ges. Physiol. Bd. 18, S. 361. 1923; Bioch. Journ. Bd. 17, S. 544. 1923.

<sup>8)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 29, S. 439. 1910; Bd. 41, S. 102. 1912; Bd. 118, S. 144. 1921.

<sup>9)</sup> Arch. di fisiol. Bd. 11, S. 397. 1913; ref. Malys Jahresber. d. Tierchem. Bd. 43, S. 97. 1913.



und Hämatin geschehen. Auch durch Chloroform wird Oxyhämoglobin aus seinen wässrigen Lösungen ausgefällt (Formanek<sup>1</sup>). Der Niederschlag ist in Wasser unlöslich (Krüger<sup>2</sup>). Über weitere Fällungsmittel, die aber gleichzeitig eine Zersetzung des Blutfarbstoffes bewirken, s. weiter unten. Oxyhämoglobin dreht rechts, und zwar wurde für 1,2 proz. Lösungen  $[\alpha]_D = +10,0^\circ$  gefunden (Gammee und Hill<sup>3</sup>). Über das spektroskopische Verhalten der Oxyhämoglobine s. § 426. Optische Eigenschaften.

Wird eine Oxyhämoglobinlösung einige Zeit über  $80^\circ$  erhitzt, so entsteht zunächst Methämoglobin, dann erfolgt Spaltung unter Wasseraufnahme in Hämatin und sich abscheidenden Eiweißstoff. Die gleiche Spaltung bewirken Alkalien und besonders schnell Säuren, und zwar erfolgt dieselbe um so schneller, je höher die Konzentration und die Temperatur ist. Dabei bildet sich nur dann ein Niederschlag, wenn der entstehende Eiweißstoff in der Flüssigkeit unlöslich ist. So tritt diese Zersetzung ohne Niederschlag ein bei Einwirkung von Essigsäure, Weinsäure, Kalilauge usw., dagegen mit Bildung von Niederschlag, wenn hinreichend Salpetersäure oder Schwefelsäure zugesetzt wird. Löst man Oxyhämoglobin unter Zusatz einer Spur Kochsalz in Eisessig und erhitzt, so fällt allein Hämin (§ 287) in meist mikroskopischen Krystallen aus. Schon die schwächsten Säuren, auch Kohlensäure, zeigen baldige Einwirkung, indem sie zunächst zur Bildung von Acidhämoglobin (§ 431) führen, dann weiter zersetzen. Durch Ammoniak wird Oxyhämoglobinlösung nur sehr langsam gespalten. Bei allen diesen Spaltungen entstehen neben Hämatin und Eiweißstoff (hauptsächlich Globin, § 355) noch geringe Mengen von Ameisensäure, Buttersäure und vielleicht auch anderen Säuren. Phosphorwolframsäure, Gerbsäure, Kaliumquecksilberjodid, Ferrocyankalium fallen Blutfarbstoff in saurer Lösung unter gleichzeitiger Zersetzung, desgleichen alle diejenigen Salze, besonders schwerer Metalle, welche unter Bildung basischer Verbindungen leicht Säure abgeben. Durch Pepsin- und Trypsinverdauung entstehen aus Oxyhämoglobin Hämatin und weitere Spaltungsprodukte der Eiweißstoffe, durch Fäulnis Methämoglobin und weiter Hämoglobin. Über die hydrolytischen Spaltungsprodukte s. § 500. Über die Umwandlung in Methämoglobin s. § 429. Über Verbindungen, welche durch Einwirkung von Kohlenoxyd, Blausäure, Schwefelwasserstoff auf Oxyhämoglobin entstehen, s. die §§ 427, 430, 433. Umwandlungen  
u. Spaltungen.

425. **Hämoglobin** unterscheidet sich von dem Oxyhämoglobin durch das Fehlen des locker gebundenen Sauerstoffs. Es entsteht, wie S. 522 erwähnt, wenn man durch eine Oxyhämoglobinlösung (oder Blut) indifferente Gase leitet, wenn man sie in das Vakuum bringt, reduzierende Stoffe, z. B. Schwefelammonium, Stokesche Lösung oder Hydrazinhydrat auf sie einwirken oder sie faulen läßt. (Beim Schütteln einer so hergestellten Hämoglobinlösung mit Luft findet alsbald eine Rückverwandlung in Oxyhämoglobin statt.) Überläßt man Blut oder eine genügend konzentrierte Oxyhämoglobinlösung, in Glasröhren eingeschmolzen, der Fäulnis, so scheidet sich allmählich Hämoglobin in Krystallen ab (Hüfner<sup>4</sup>). Über die Gewinnung von Hämoglobinkrystallen s. auch Nencki und Sieber<sup>5</sup>) sowie Uhlik<sup>6</sup>). Darstellung.

Die Krystalle sind prachtvoll dunkelrot, im allgemeinen den Oxyhämoglobinkrystallen isomorph, aber leichter löslich in Wasser. An die Luft gebracht Eigenschaften.

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 29, S. 416. 1900.

<sup>2</sup>) Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 3, S. 67. 1903.

<sup>3</sup>) Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 4, S. 1. 1904.

<sup>4</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 4, S. 382. 1880.

<sup>5</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 19. 1, S. 128 u. 410. 1886.

<sup>6</sup>) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 104, S. 64. 1904.

wandeln sie sich unter Sauerstoffaufnahme alsbald in kleine Oxyhämoglobin-kristalle von arterieller Färbung um. Eine Lösung von Hämoglobin ist dunkler rot als eine gleichkonzentrierte Oxyhämoglobinlösung. Sie wird ebenso wie eine Oxyhämoglobinlösung weder durch neutrales noch durch basisches Bleiacetat, auch nicht nach Zufügen von Ammoniak gefällt, wenn die Reagenzien vorsichtig und unter Vermeidung eines Überschusses zugefügt werden.

Hämoglobin reagiert mit den gleichen Gasen wie das Oxyhämoglobin. Es vermag auch Kohlensäure zu binden, und zwar gibt es nach Bohr<sup>1)</sup> verschiedene Carbohämoglobine, in denen die Menge der locker gebundenen Kohlensäure wechselt, während nach Straub und Meyer<sup>2)</sup> die Kohlensäureaufnahme vom  $p_{\text{H}}$  abhängt. Wegen der Gasbindung vgl. auch Buckmaster<sup>3)</sup> und vor allem van Slyke, Heidelberger und Mitarbeiter<sup>4)</sup>.

Über die auch zum Nachweis benutzte Eigenschaft<sup>5)</sup> des Hämoglobins, Sauerstoff aus Peroxyden auf Guajaconsäure zu übertragen und letztere zu bläuen, vgl. Nachweis von Blut im Harn (§ 621).

**Spaltungen.** Von locker gebundenem Sauerstoff vollständig befreites Hämoglobin wird in wässriger Lösung bei völliger Abwesenheit von Sauerstoff durch alkoholische oder wässrige Lösungen von Säuren oder Alkalien unter Auftreten purpurröter Farbe gespalten in Eiweißstoff und Hämochromogen (§ 285), welches in sauren Lösungen leicht seinen Eisengehalt verliert und in Hämatoporphyrin (§ 288) übergeht. Das Hämoglobin soll im Gegensatz zum Oxyhämoglobin der Fäulnis und Pankreasverdauung auch bei jahrelanger Einwirkung widerstehen.

**426. Optisches Verhalten und spektroskopischer Nachweis von Oxyhämoglobin und Hämoglobin.** Die Oxyhämoglobinlösungen absorbieren am wenigsten das Licht vom Anfang des Spektrums im Rot bis nahe zur Linie *D*; das letzte Viertel des Zwischenraumes zwischen *C* und *D*, welches an *D* angrenzt, wird schon stärker absorbiert. Die Größe der Absorption wurde von Hüfner<sup>6)</sup> bestimmt. Er fand für die Oxyhämoglobine der verschiedenen Tierarten in sodaalkalischer Lösung übereinstimmend ein Absorptionsverhältnis

$$t_0 \text{ (im Spektralgebiet } 554 - 565 \text{ } \mu\mu) = 0,002070,$$

$$t'_0 \text{ (im Spektralgebiet } 531,5 - 542,5 \text{ } \mu\mu) = 0,001312$$

und das Verhältnis  $\frac{t_0}{t'_0} = \frac{\epsilon'_0}{\epsilon_0} = 1,58$ , wobei  $\epsilon'_0$  und  $\epsilon_0$  die Extinktionskoeffizienten bezeichnen. Diese Zahlen sind vielfach bestätigt worden, neuerdings noch durch Hári<sup>7)</sup>, nur ergeben die Lösungen anfänglich, innerhalb der ersten 15 Minuten nach dem Lösen, einen höheren Wert etwa von 1,60.

Wandelt man eine Oxyhämoglobinlösung in eine Hämoglobinlösung um (s. oben), so wird das Licht zwischen *C* und *D* viel stärker absorbiert und hiermit die Lösung sehr viel dunkler im durchfallenden Licht. Das Absorptionsverhältnis, im gleichen Spektralbereich wie beim Oxyhämoglobin, ist nach Hüfner für Hämoglobin  $t_r = 0,001354$ ,  $t'_r = 0,001778$  und die Proportion  $\frac{t_r}{t'_r} = 0,7617$ .

<sup>1)</sup> Skandinav. Arch. f. Physiol. Bd. 3, S. 47. 1891.

<sup>2)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 89, S. 156; Bd. 90, S. 305. 1918. Literatur.

<sup>3)</sup> Journ. of physiol. Bd. 51, S. 164; Malys Jahresber. d. Tierchem. Bd. 47, S. 69. 1917.

<sup>4)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 54, S. 121 u. 481. 1922. Literatur.

<sup>5)</sup> Literatur bei v. Czyhlarz u. v. Fürth: Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 10, S. 358. 1907. — Willstätter u. Pollinger: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 130, S. 281. 1923.

<sup>6)</sup> Arch. f. (Anat. u.) Physiol. 1894, S. 130.

<sup>7)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 82, S. 229. 1917. Dort Literatur.

Verdünt man eine konzentrierte Oxyhämoglobinlösung in einem Gefäß mit planparallelen Glasseitenwandungen, so zeigt dieselbe, immer in gleicher Dicke der Schicht untersucht, schnelle Aufhellung bis zur Linie *D*, bald tritt bei weiterer Verdünnung Licht zwischen den Linien *E* und *F* im Grün auf; dann breitet sich in der noch mehr verdünnten Flüssigkeit das Spektrum über die Linie *F* ins Blau hinein aus, während zugleich, etwa in der Mitte zwischen *D* und *E* ein hellgrüner Lichtstreif erscheint, eingeschlossen von zwei sehr starken und beständigen Absorptionsstreifen. Bei noch weiter fortgesetztem Verdünnen entwickelt sich das Spektrum vollständig bis zum Violett, nur die beiden in der Spektraltafel dargestellten Absorptionsstreifen (Oxyhämoglobin-

Spektrum des  
Oxyhämoglobins.

streifen) bleiben noch, langsam schwächer werdend, beim Verdünnen bis zum Gehalte von 1 g Oxyhämoglobin in 10 l Lösung deutlich sichtbar, wenn man diese Lösung in einer Flüssigkeitsschicht von 1 cm Dicke im Spektralapparate mit zerstreutem Tageslicht beobachtet. Der näher an der Linie *D* liegende Streifen ist schmaler, dunkler und schärfer begrenzt als der andere bei *E* gelegene und verschwindet schließlich bei fortgesetzter Verdünnung ein wenig später als der andere. Die Mitte des ersten Streifens entspricht einer Wellenlänge von 578,1, die des zweiten einer solchen von 541,7 (Formánek<sup>1</sup>). Außerdem findet sich im ultravioletten Teil ein Streifen, dessen dunkelster Teil  $\lambda$  414 entspricht (Gamgee<sup>2</sup>), zwei weitere bei  $\lambda$  346 und 276 (Newcomer<sup>3</sup>). Lewin, Miethe und Stenger<sup>4</sup>) geben den dunkelsten Teil der ersten 3 Streifen entsprechend den Wellenlängen 579, 542, 415 an, Schumm<sup>5</sup>) fand für das Gitterspektrum 577,5, 541,7 und 413,4—414,0 für Menschen- und Pferdeblut. Das Spektrum der neutralen Lösung von Oxyhämoglobin unterscheidet sich nicht wesentlich von dem der Alkaliverbindung (Hári<sup>6</sup>).

Läßt man eine passend verdünnte Blut- oder Oxyhämoglobinlösung verschlossen einige Zeit stehen oder fügt man einige Tropfen Schwefelammonium, Hydrazinhydrat oder Stokessche Flüssigkeit hinzu, so geht alsbald die helle arterielle Färbung in eine dunkle und venöse über. Bei der Spektralprüfung ist der helle Zwischenraum zwischen den beschriebenen 2 Absorptionsstreifen verschwunden, die Streifen selbst werden blasser, und an der Stelle des früheren hellen Zwischenraums zwischen beiden, zwischen *D* und *E* und etwas über *D* hinüberreichend bleibt ein dunkler Absorptionsstreifen (Hämoglobinstreifen),

Spektrum des  
Hämoglobins.

dessen dunkelste Stelle nach Formánek einer Wellenlänge von 555, nach Lewin, Miethe und Stenger von 558  $\mu\mu$  entspricht (Spektraltafel). Er hat weniger scharf begrenzte Ränder und verschwindet beim Verdünnen der Lösung früher als die beiden Streifen einer gleich starken Oxyhämoglobinlösung. Schüttelt man eine Hämoglobinlösung nur ein paar Sekunden mit etwas Luft, so sind sogleich die beiden Absorptionsstreifen des Oxyhämoglobins zu sehen, und die Lösung ist wieder heller rot; das Hämoglobinspektrum tritt unter Verdunkelung bald wieder ein, wenn noch reduzierende Stoffe sich in der Lösung befinden oder Fäulnis einwirkt. Ein zweiter Streifen liegt nach Gamgee im violetten Teil des Spektrums, mit der maximalen Absorption bei *G*, nach Lewin, Miethe und Stenger entspricht sie der Wellenlänge 429.

Trennung und  
Nachweis.

Zur Trennung des Oxyhämoglobins und Hämoglobins von Methämoglobin, Hämatin, Hämatoporphyrin kann das Verhalten gegen neutrales und basisches Bleiacetat benutzt werden, durch welche die drei zuletzt genannten Stoffe und

<sup>1</sup>) Zeitschr. f. analyt. Chem. Bd. 40, S. 505. 1901.

<sup>2</sup>) Zeitschr. f. Biol. Bd. 34, S. 505. 1896.

<sup>3</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 37, S. 465. 1919.

<sup>4</sup>) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 118, S. 80. 1907.

<sup>5</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 83, S. 1. 1913.

<sup>6</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 95, S. 257. 1919.

zahlreiche andere gefärbte Substanzen gefällt werden. Zum Nachweis selbst kleiner Mengen eignen sich vor allem die eigentümlichen Absorptionerscheinungen ihrer Lösungen und die charakteristischen Veränderungen, welche dieselben unter der Einwirkung bestimmter Reagenzien erleiden. In letzterer Beziehung kommen besonders in Betracht die Umwandlung des Oxyhämoglobins durch Reduktionsmittel in Hämoglobin und Rückbildung des letzteren in Oxyhämoglobin durch Luft, die Überführung in Kohlenoxydhämoglobin (§ 427), welches durch Schwefelammonium nicht verändert wird, sowie die Umwandlung in Hämochromogen durch Erhitzen mit Natronlauge und Versetzen der alkalischen Lösung mit Schwefelammonium oder einem anderen geeigneten Reduktionsmittel. Einzelheiten in den späteren Abschnitten: Nachweis von Blutfarbstoff in Blut (§ 676), Harn (§ 621), Mageninhalt (§ 785), Galle (§ 797), Faeces (§ 826).

Quantitative Bestimmung.

Die quantitative Bestimmung wird in dem Abschnitt „Untersuchung des Bluts“ geschildert (§ 677 u. 678).

Bildung.

427. **Kohlenoxydhämoglobin** ist eine von Hoppe-Seyler<sup>1)</sup> zuerst beschriebene, molekulare Verbindung von Hämoglobin und Kohlenoxyd, welche beim Durchleiten dieses Gases durch Blut oder eine wässrige Lösung von Hämoglobin oder Oxyhämoglobin entsteht und sich im Blut mit Kohlenoxyd vergifteter Personen (Leuchtgas-, Kohlendunstvergiftung) findet.

Darstellung.

Zur Darstellung in Krystallen leitet man durch eine genügend konzentrierte Oxyhämoglobinlösung Kohlenoxyd und behandelt diese Lösung ebenso wie es im § 424 für die Gewinnung der Oxyhämoglobinkrystalle nach Hoppe-Seyler angegeben ist. Die sich ausscheidenden Krystalle sind den entsprechenden Oxyhämoglobinkrystallen isomorph, jedoch etwas schwerer löslich und beständiger. Im Kohlenoxydhämoglobin kommt nach Hüfner<sup>2)</sup> auf 1 g Hämoglobin 1,34 ccm CO (bei 0° und 760 mm). Seine wässrigen Lösungen, ebenso mit Kohlenoxyd behandeltes Blut, haben keine scharlachrote, sondern eine mehr dem Carmin entsprechende Farbe.

Eigenschaften.

Die Verbindung widersteht (im Gegensatz zum Oxyhämoglobin) reduzierenden Stoffen. Durch das Vakuum, ebenso durch längeres Einleiten von Wasserstoff- oder Stickstoffgas, noch schneller durch Einleiten von Sauerstoff- und Stickoxydgas wird das Kohlenoxyd ausgetrieben und entweder Hämoglobin oder Oxy- oder Stickoxydhämoglobin gebildet. Auch beim Stehen von Kohlenoxydhämoglobinlösungen an der Luft geht allmählich eine Umwandlung in Oxyhämoglobin und weiter in Methämoglobin vor sich. Der Grad der Umwandlung ist abhängig vom Partialdruck des Sauerstoffs (Hüfner<sup>3)</sup>, Douglas und Haldane<sup>4)</sup>). Durch Ferricyankalium entsteht unter Austreibung von Kohlenoxyd Methämoglobin (ebenso wie aus Oxyhämoglobin unter Austreibung von Sauerstoff, s. S. 528) (Haldane<sup>5)</sup>). Es dreht rechts, und zwar ebenso stark wie Oxyhämoglobin  $[\alpha]_D = +10,0^\circ$  (Gamgee und Hill<sup>6)</sup>).

Optische Eigenschaften.

Spektrum.

Die wässrigen Lösungen absorbieren das blaue Licht weniger als die Oxyhämoglobinlösungen und zeigen, bei genügender Verdünnung spektroskopisch untersucht, 2 Absorptionsstreifen (Spektraltafel) zwischen den Linien *D* und *E* wie Oxyhämoglobinlösungen, jedoch ein wenig von *D* nach *E* hin verschoben,

<sup>1)</sup> Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. Bd. 11, S. 288. 1857. Zentralbl. f. med. Wissenschaft 1864/65. Med.-chem. Unters. Heft 2. 1867; Heft 3. 1868. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 1, S. 131. 1878 u. Bd. 13, S. 477. 1889.

<sup>2)</sup> Arch. f. Anat. u. Physiol., Physiol. Abt. 1894, S. 130; 1903, S. 217.

<sup>3)</sup> Arch. f. Anat. u. Physiol., Physiol. Abt. 1895, S. 213. Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 48, S. 87. 1902.

<sup>4)</sup> Journ. of physiol. Bd. 44, S. 275. 1912; ref. Malys Jahresber. d. Tierchem. 1912, S. 162.

<sup>5)</sup> Journ. of physiol. Bd. 22, S. 298. 1898.

<sup>6)</sup> Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 4, S. 1. 1904.

so daß der helle Raum, welcher die Linie *D* vom ersten Streifen trennt, etwas breiter ist als bei den Oxyhämoglobinlösungen. Die Mitte des ersten Streifens entspricht einer Wellenlänge von 572, die des zweiten einer solchen von 536 (Hoppe - Seyler). Nach Lewin, Miethe und Stenger entsprechen die dunkelsten Stellen der beiden Streifen den Wellenlängen 570 und 542. Außerdem findet sich ein Streifen im violetten Teil, dessen Mitte einer Wellenlänge von 420,5 (Gammgee), dessen dunkelste Stelle einer Wellenlänge von 416 (Lewin, Miethe und Stenger) entspricht.

Erhitzt man eine wässrige neutrale Lösung zum Sieden, so entsteht ein hellrotes Koagulum (Unterschied von Oxyhämoglobin), das aus Eiweißstoff und Kohlenoxydhämochromogen (S. 399) besteht und sich an der Luft erst allmählich unter Abspaltung des Kohlenoxyds und Bildung von Hämatin dunkler färbt. Durch starke Natronlauge (spez. Gew. 1,3) wird eine wässrige Lösung oder mit Kohlenoxyd gesättigtes Blut (im Gegensatz zu normalem, sich braun verfärbendem Blut) hellrot gefällt (Hoppe - Seylers Probe). Der Niederschlag, welcher aus Kohlenoxydhämoglobin besteht, zersetzt sich zu Kohlenoxydhämochromogen und Eiweißstoff und wird an der Luft allmählich braun unter Bildung von Hämatin. Auch Gerbsäure, die mit normalem Blut einen braunen Niederschlag gibt, fällt Kohlenoxydhämoglobin hell karmoisinrot (Kunkels Probe<sup>1</sup>).

Gegen Fäulnis bei Abwesenheit von freiem Sauerstoff und ebenso gegen Pankreasverdauung ist die Verbindung völlig widerstandsfähig. Wässrige Lösungen oder Kohlenoxydblut aus Leichen von mit Kohlenoxyd vergifteten Personen, in Glasröhren eingeschmolzen, zeigen noch nach vielen Jahren trotz eingetretener Fäulnis das unveränderte Spektrum und liefern beim Evakuieren Kohlenoxyd.

Zur Unterscheidung einer Kohlenoxydhämoglobinlösung von einer Oxyhämoglobinlösung dienen besonders die Unveränderlichkeit des Spektrums auf Zusatz von Reduktionsmitteln, ferner der hellrote Niederschlag, welcher beim Kochen oder auf Zusatz von starker Natronlauge oder mit Gerbsäure entsteht.

428. **Stickoxydhämoglobin**, eine molekulare Verbindung von Hämoglobin und Stickoxyd, entsteht beim Einleiten von diesem Gase in eine Lösung von Kohlenoxydhämoglobinkristallen und ebenso beim Schütteln einer Methämoglobinlösung mit Stickoxyd (§ 429) und läßt sich in der beim Oxyhämoglobin beschriebenen Weise (§ 424) krystallinisch erhalten (Hermann<sup>2</sup>). Die Krystalle sind denen des Oxyhämoglobins isomorph und zeigen auch genau die gleiche Färbung. Bei der spektroskopischen Prüfung ihrer Lösungen erkennt man 2 Streifen, die in Lage und Aussehen mit den Oxyhämoglobinstreifen völlig übereinstimmen. Auch im violetten Teil findet sich ein Streifen, dessen Mitte einer Wellenlänge von 420,5 entspricht (Gammgee<sup>3</sup>). Die Verbindung wird durch Reduktionsmittel nicht zerlegt.

Acetylenhämoglobin, von Bistrow und Liebreich<sup>4</sup>) durch Einwirkung von Acetylen auf Hämoglobinlösung erhalten, ist wenig beständig. Seine Lösung ähnelt sehr der des Oxyhämoglobins und gibt das Acetylen leicht ab (Brocinier<sup>5</sup>), Manchot<sup>6</sup>); auch eine entsprechende Äthylenverbindung wird beschrieben (Manchot).

429. **Methämoglobin** wurde von Hoppe - Seyler<sup>7</sup>) entdeckt. Es entsteht aus Oxyhämoglobin durch Einwirkung verschiedener Stoffe<sup>8</sup>) (oxydierender,

<sup>1</sup>) Sitzungsber. der physikal. mediz. Ges. Würzburg 1888, S. 86.

<sup>2</sup>) Jahresber. f. Chem. 1865, S. 663; vgl. auch Hoppe - Seyler: Med.-chem. Untersuchungen, Heft 2, S. 204. Berlin: Hirschwald 1867.

<sup>3</sup>) Zeitschr. f. Biol. Bd. 34, S. 505. 1896. <sup>4</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 1, S. 220. 1868.

<sup>5</sup>) Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 121, S. 773. 1896.

<sup>6</sup>) Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 370, S. 260, 264. 1909.

<sup>7</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 2, S. 150. 1878/79 u. Bd. 6, S. 166. 1882.

<sup>8</sup>) Eine Zusammenstellung zahlreicher methämoglobinbildender Stoffe s. bei Araki: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 14, S. 405. 1890. — Dittrich: Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 29, S. 247. 1892.

reduzierender und auch indifferenten, z. B. neutraler Salze) auf Oxyhämoglobinlösungen oder Blut. Methämoglobinbildend wirken besonders von anorganischen Stoffen Ferricyankalium, Nitrite, Permanganat, Chlorate, Ozon, Wasserstoff im Entstehungszustande bei Gegenwart von freiem Sauerstoff, Wasserstoffsuperoxyd. Von organischen Substanzen sind stark wirksam Pyrogallol, Phenylhydroxylamin-derivate und solche Nitro- und Aminverbindungen des Benzols, die in substituierte Hydroxylamine übergehen können (Lipschitz<sup>1)</sup>, Ellinger<sup>2)</sup>. Auch einzelne Narkotica, Chloroform, Äther, wirken methämoglobinbildend (Ellinger u. Rost<sup>3)</sup>. Ferner entsteht es durch Einwirkung von Wärme allein auf Oxyhämoglobinlösungen sowie beim Eintrocknen dieser Lösungen oder von Blut an der Luft. Auch ultraviolettes Licht ist wirksam (Hasselbalch<sup>4)</sup>. Im Organismus findet es sich normalerweise nicht, wohl aber in Extravasaten, in Struma- und anderen Cysten, ferner im Blut, in den Nieren und im Harn nach Einbringung von Amylnitrit, Pyrogallol, gallensauren Salzen und vielen anderen Stoffen in den Blutstrom, nach Zerstörungen von Blutkörperchen bei Hautverbrennungen usw.

Wie Haldane<sup>5)</sup>, Hüfner<sup>6)</sup> und v. Zeynek<sup>7)</sup> fanden, wird beim Versetzen einer Oxyhämoglobinlösung mit Ferricyankalium die ganze Menge des locker gebundenen Sauerstoffs abgespalten und Ferricyankalium zu Ferrocyanalium reduziert. Die gleichzeitig vor sich gehende Umwandlung von Oxyhämoglobin in Methämoglobin kommt nun nach ihrer Ansicht wahrscheinlich so zustande, daß an Stelle des locker gebundenen Sauerstoffs Sauerstoff oder Hydroxylgruppen, welche bei der Reduktion des Ferricyankaliums frei werden, in das Hämoglobinmolekül eintreten und hier eine festere Bindung erfahren. Die Umwandlung des Oxyhämoglobins in Methämoglobin durch Kaliumpermanganat erfolgt gleichfalls unter Sauerstoffentwicklung. Bei der Umwandlung von Oxyhämoglobin in Methämoglobin durch Wärme oder ultraviolette Strahlen ist wohl eine direkte Änderung der Bindungsart des lose gebundenen Sauerstoffs im Oxyhämoglobin anzunehmen.

**Darstellung.** Um Methämoglobin krystallisiert zu erhalten, versetzt man eine möglichst konzentrierte Oxyhämoglobinlösung (aus Schweine-, Pferde- oder Hundeblood) mit 10proz. Ferricyankaliumlösung bis zur tiefen Braunfärbung, kühlt auf 0° ab und versetzt mit dem 4. Teil ebensoweit gekühlten Alkohols. Beim Stehen in einer Kältemischung scheiden sich innerhalb einiger Tage rehbraune Krystalle, meist feine Nadeln, ab (Hüfner und Otto<sup>8)</sup>). Aus Rinderblut wurde es bisher nicht krystallinisch erhalten. Man reinigt die erhaltenen Krystalle durch Lösen in Wasser und Auskrystallisieren unter abermaligem Alkoholzusatz in der Kälte. Nach Hasselbalch erhält man aber nach dieser Methode nicht mit Sicherheit reines Material, besser ist zur Darstellung von einheitlichen Lösungen das Belichten einer Oxyhämoglobinlösung mit ultraviolettem Licht. Durch Dialyse einer mit 10% Alkohol versetzten wässrigen Lösung von Pferdeoxyhämoglobin gegen  $\frac{1}{200}$ — $\frac{1}{220}$  n-Salzsäure mit 10% Alkohol läßt sich ein etwas abweichendes, sogenanntes Säuremethämoglobin in krystallisierter Form erhalten (v. Zeynek<sup>9)</sup>). Vgl. a. Acidhämoglobin S. 530.

**Zusammensetzung.** Die Zusammensetzung des Methämoglobins ist nicht sicher bekannt. Während anfänglich die Zusammensetzung wie die des Oxyhämoglobins angenommen wurde (Hüfner und Otto, Otto<sup>10)</sup>, Haldane<sup>11)</sup>, entsprechend

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 109, S. 189. 1920. <sup>2)</sup> desgl. Bd. 111, S. 86. 1920.

<sup>3)</sup> Arch. f. exp. Pathol. u. Pharm. Bd. 95, S. 281. 1922.

<sup>4)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 19, S. 435. 1909.

<sup>5)</sup> Journ. of physiol. Bd. 22, S. 298. 1898.

<sup>6)</sup> Arch. f. Anat. u. Physiol., Physiol. Abt. 1899, S. 491. <sup>7)</sup> desgl. 1899, S. 460.

<sup>8)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 7, S. 65. 1882/83; Bd. 8, S. 366. 1883/84.

<sup>9)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 130, S. 242. 1923.

<sup>10)</sup> Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 31, S. 245. 1883.

<sup>11)</sup> Journ. of physiol. Bd. 22, S. 301. 1898.

der Formeln  $\text{HbO}_2$  ( $\text{Hb}$  = Hämoglobinmolekül), oder wenigstens  $\text{Hb}(\text{OH})_2$  (v. Zeynek<sup>1</sup>), Hüfner<sup>2</sup>), wobei zwar die Oxydationsstufe von der des Oxyhämoglobins verschieden angenommen wurde, während die Formel sich nur durch den Mehrgehalt von 2 Wasserstoffen unterschied, wurde später die schon von Hoppe-Seyler erwogene Formel  $\text{HbOH}$  befürwortet (Küster<sup>3</sup>), Letsche<sup>4</sup>), v. Reinbold<sup>5</sup>). Sicher ist nur, daß der Sauerstoff im Methämoglobin fester gebunden ist als im Oxyhämoglobin und weder durch das Vakuum noch beim Durchleiten von indifferenten Gasen oder Kohlenoxyd aus einer wässerigen Lösung austreibbar ist, wohl aber durch Stickoxyd, indem beim Schütteln einer Methämoglobinlösung mit Stickoxyd bei Gegenwart von Harnstoff Stickoxydhämoglobin (§ 428) entsteht (Hüfner und Külz<sup>6</sup>). 1 g Methämoglobin nimmt 2,685 ccm Stickoxyd (bei 0° und 760 mm) auf (Hüfner und Reinbold<sup>7</sup>).

Die Krystalle sind in Wasser leicht löslich. Die sauren und neutralen Eigenschaften. Lösungen sind braun, die alkalischen rot. Durch vorsichtigen Zusatz von Bleiessig und Ammoniak werden Methämoglobinlösungen gefällt (Unterschied von Oxyhämoglobin- und Hämoglobinlösungen).

Lösungen, welche nicht stark alkalisch, sondern neutral oder schwach sauer Spektrum. sind oder wenig Alkalicarbonat enthalten, ebenso mit Wasser verdünntes Blut, dem einige Tropfen einer frisch hergestellten konzentrierten Ferricyankaliumlösung zugefügt sind, zeigen bei der spektroskopischen Untersuchung einen Absorptionsstreifen im Rot, welcher zwischen den Linien *C* und *D* (Spektraltafel) näher an *C* liegt. Nach Ziemke und Müller<sup>8</sup>) entspricht seine Lage den Wellenlängen 630—620, das Maximum der Absorption nach Lewin, Miethe und Stenger der Wellenlänge 626. Neben diesem charakteristischen Streifen beobachtet man noch 3 andere Streifen, von denen 2 mit den Oxyhämoglobinstreifen übereinstimmen, während der 4. zwischen *b* und *F* liegt. Nach Hasselbalch, dem sich auch Quagliariello<sup>9</sup>) im wesentlichen anschließt, liegen in einer neutralen, nach seiner Methode dargestellten Methämoglobinlösung die Maxima der Absorption bei  $\lambda = 630, 580, 540$  und  $500 \mu\mu$ . Arbeitet man nach der älteren Methode, so verblassen bei genügend zugesetztem Ferricyankalium die 3 letzten Streifen nach einiger Zeit fast ganz, während der Streifen im Rot unverändert bleibt. Bei etwas stärkerem Zusatz von Alkali aber verschwindet der Streifen im Rot sofort und die Absorptionsstreifen im Grünen treten wieder deutlich hervor, wenn sie in der sauren oder alkalischen Lösung nicht bereits allzusehr verblaßt waren. Nach Ziemke und Müller zeigt der rotwärts gelegene Streifen in der alkalischen Lösung eine schattenhafte Verlängerung über *D* hinaus. Im ultravioletten Teil des Spektrums findet sich ein Absorptionsstreifen bei  $415 \mu\mu$  (Gamgee, Lewin, Miethe und Stenger).

Durch Einwirkung reduzierender Substanzen in schwach-alkalischer Lösung, Umwandlung in Hämoglobin. ebenso durch Fäulnis bei Abwesenheit von freiem Sauerstoff wird Methämoglobin in Hämoglobin und durch Schütteln mit Luft dieses in Oxyhämoglobin übergeführt. Diese Umwandlungen, welche sich sehr leicht mit Hilfe des Spektroskops verfolgen lassen, unterscheiden das Methämoglobin von Hämatin,

<sup>1</sup>) Arch. f. (Anat. u.) Physiol. 1899, S. 487.

<sup>2</sup>) Arch. f. Anat. u. Physiol., Physiol. Abt. 1907, S. 463.

<sup>3</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 43, I, S. 370. 1910.

<sup>4</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 80, S. 412. 1912.

<sup>5</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 85, S. 250. 1913.

<sup>6</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 7, S. 366. 1882/83.

<sup>7</sup>) Arch. f. (Anat. u.) Physiol. 1904, Suppl. S. 391.

<sup>8</sup>) Arch. f. (Anat. u.) Physiol. 1901, Suppl. S. 178.

<sup>9</sup>) Arch. di scienze biol. Bd. 3, S. 65. 1922; ref. Ber. d. ges. Physiol. Bd. 13, S. 322. 1922.

dessen saure Lösungen einen ähnlichen Absorptionsstreifen zeigen (S. 401); letzteres wird durch dieselben reduzierenden Substanzen (z. B. Schwefelammonium), welche aus dem Methämoglobin Hämoglobin bilden, in Hämochromogen übergeführt. Schwache Säuren und Alkalien spalten Methämoglobin in Hämatin und Eiweißstoff.

**Nachweis.** Zum Nachweis dient das spektroskopische Verhalten sowie das Verhalten zu Reduktionsmitteln.

**Bildung.** 430. **Cyanhämoglobin.** Dieser schon seit längerer Zeit (Preyer, Hoppe-Seyler) bekannte, aber erst von Kobert<sup>1)</sup> genauer beschriebene und als Cyanmethämoglobin bezeichnete Farbstoff ist von v. Zeynek<sup>2)</sup> kristallisiert erhalten und eingehend untersucht worden. Bei seiner Bildung findet eine Aufnahme von einer Cyangruppe bzw. eines Mol. Blausäure in ein Mol. Blutfarbstoff statt. Das Cyanhämoglobin ist, wie zuerst Haldane<sup>3)</sup> fand, identisch mit dem Photomethämoglobin von Bock.

**Darstellung.** Es entsteht sofort beim Zusammenbringen einer Methämoglobinlösung (aus Pferdeblut) mit 0,5 proz. Blausäurelösung unter Umschlagen der rehbraunen in eine rote Farbe und scheidet sich aus einer stark abgekühlten etwa 25—30% Farbstoff enthaltenden Lösung auf Zusatz von  $\frac{1}{4}$  Vol. auf 0° abgekühlten Alkohols bei -10° in 1—2 Tagen kristallinisch ab. Bequemer erhält man es durch mehrstündige Einwirkung von 0,5 proz. Blausäurelösung auf Oxyhämoglobinlösung bei Körpertemperatur (nicht in der Kälte). Mit Hämoglobin reagiert Blausäure nicht, beim Einleiten von Cyangas in eine Hämoglobinlösung entsteht allmählich Cyanhämoglobin, aber nicht durch Einwirkung von Cyangas auf Kohlenoxyd- oder Stickoxydhämoglobinlösung.

**Eigenschaften.** Das aus Methämoglobin dargestellte Cyanhämoglobin kristallisierte in manchen Fällen in langen, hygroskopischen Prismen mit ungefähr 5,7% Krystallwasser, in anderen Fällen in weniger hygroskopischen Rhomben mit ungefähr 10,4% Krystallwasser. Sie enthalten 0,158% Cyan. Die Krystalle sind in Wasser leicht löslich mit roter, einen Stich ins Gelbliche zeigender Farbe.

**Spektrum.** Neutrale und ebenso schwach alkalische Lösungen zeigen übereinstimmend einen breiten Streifen im Grün, ähnlich dem Hämoglobinspektrum, aber etwas nach Violett verschoben. Schütteln mit Luft ändert das Spektrum nicht.

**Umwandlungen.** Beim Erwärmen im Vakuum auf 40°, ebenso beim Durchleiten indifferenten Gase wird keine Blausäure abgegeben, wohl aber beim Kochen unter gewöhnlichem Druck. Beim Einleiten von Schwefelwasserstoff in eine vollkommen sauerstofffreie Lösung von Cyanhämoglobin findet eine Umwandlung in Hämoglobin statt. Schwefelammonium bewirkt Umwandlung in Hämoglobin (Ziemke und Müller<sup>4)</sup>). Mineralsäuren bewirken Zersetzung unter Braunfärbung.

431. **Acidhämoglobin.** Dieser aus Blutfarbstoff durch Einwirkung ganz schwacher Säuren, auch durch Kohlensäure, entstehende Körper wurde früher für identisch mit Methämoglobin gehalten, ist aber nach Harnack<sup>5)</sup> von diesem zu unterscheiden. Seine Lösungen zeigen dieselbe braune Farbe wie die Methämoglobinlösungen und auch einen Streifen im Rot, der aber mehr rotwärts verschoben ist. Durch weitere Säurewirkung wird es leicht in Hämatin und Eiweiß gespalten. Nach v. Zeynek<sup>6)</sup> ist das kristallisiert zu erhaltende erste Produkt der Säureeinwirkung ein dem Methämoglobin sehr nahestehendes Säuremethämoglobin (S. 528).

432. **Kathämoglobin** nennt van Klaveren<sup>7)</sup> einen Körper, der aus Hämoglobin und Methämoglobin durch Abspaltung eines organischen, wasserlöslichen, diffusionsfähigen, eisenhaltigen Komplexes entsteht, sich aber vom Ausgangsmaterial, abgesehen von einem geringeren Eisengehalt, in der Zusammensetzung kaum unterscheidet. Man erhält ihn durch Versetzen von 100 ccm einer möglichst konzentrierten Blutfarbstofflösung mit 200 ccm 96 proz. Alkohols und 1—2 ccm gesättigter Kalilauge, Erhitzen auf 60°, sofortiges Neutralisieren mit Salzsäure, Abkühlen und starkes Verdünnen mit destilliertem Wasser als Niederschlag, der durch Waschen mit Wasser, Lösen in 60 proz. Alkohol unter Zusatz von Kochsalz bei 60° und Wiederfällen mit Wasser gereinigt werden kann. Man erhält ihn ferner durch Schütteln einer Methämoglobinlösung mit dem gleichen Volumen Alkohol als Niederschlag, der in der angegebenen Weise gereinigt wird.

**Eigenschaften.** Es ist in Wasser und Alkohol unlöslich, löslich in kochsalzhaltigem Alkohol, besonders beim Erwärmen, mit schön roter Farbe. Diese Lösung zeigt 2 Streifen zwischen *D* und *b*, einen schmäleren und schwächeren nach *D* zu und einen breiteren stärkeren, der bis zur Linie *b* reicht. Beim Erhitzen wird die Farbe braun und das Spektrum des alkalischen Hämatins tritt auf, beim Abkühlen

<sup>1)</sup> Über Cyanmethämoglobin und den Nachweis der Blausäure. Stuttgart: Enke 1891. — Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 82, S. 615. 1900.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 33, S. 426. 1901.

<sup>3)</sup> Journ. of physiol. Bd. 25, S. 230. 1900.

<sup>4)</sup> Arch. f. (Anat. u.) Physiol. 1901, Suppl. S. 178.

<sup>5)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 26, S. 558. 1899. <sup>6)</sup> desgl. Bd. 130, S. 248. 1923.

<sup>7)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 33, S. 293. 1901.



kehrt die rote Farbe und das ursprüngliche Spektrum zurück. Auf Zusatz von Alkali erscheint der Streifen des Hämatins und fügt man nun Stokessche Lösung (Anh.) hinzu, so sieht man die beiden Streifen des Hämochromogens.

Arnold<sup>1)</sup>, der diesen Körper zuerst beschrieben hat, hielt ihn für Hämatin und nannte ihn neutrales Hämatin; er enthält aber Eiweiß, ist also noch ein Proteid, aus dem erst durch stärkeres oder längeres Erwärmen mit alkoholischer Kalilauge Hämatin abgespalten wird.

**433. Sulfhämoglobin, Schwefelmethämoglobin.** Sulfhämoglobin ist gelegentlich zu Sulfhämoglobin beobachtet im Blut von Patienten mit starker Störung der Darmtätigkeit (Hymans v. d. Bergh<sup>2)</sup>, auch nach Eingabe von Anilinderivaten (Snapper<sup>3)</sup>). Es entsteht nach Harnack<sup>4)</sup> beim Durchleiten von Schwefelwasserstoff durch Lösungen von Blutfarbstoff oder Kohlenoxydhämoglobin, nicht aber nachdem die Lösung vorher etwas stärker alkalisch gemacht oder angesäuert oder nachdem ein Kohlensäurestrom durch sie gegangen ist. Die Lösungen sind Spektrum. dunkelrot und zeigen einen Streifen im Rot zwischen *C* und *D* neben den nie ganz verschwindenden Streifen des Oxyhämoglobins. Clark und Hurtle<sup>5)</sup> fanden, daß Sulfhämoglobin und Kohlenoxydsulfhämoglobin, welches letzteres sowohl durch Einleiten von Kohlenoxyd in eine Sulfhämoglobinlösung als auch durch Einleiten von Schwefelwasserstoff in eine Kohlenoxydhämoglobinlösung erhalten wird, sich durch die Lage der Streifen unterscheiden. Der Streifen des Sulfhämoglobins liegt von  $\lambda$  610—625, der des Kohlenoxydsulfhämoglobins etwas mehr nach *D* zu von  $\lambda$  605—620. Der Bildung des Sulfhämoglobins geht die Reduktion des Blutfarbstoffs zu Hämoglobin voraus (Clark und Hurtle). Durch verdünnte Säuren findet Spaltung in Schwefelwasserstoff und Acidhämoglobin statt. Eine Isolierung der Substanz ist noch nicht ausgeführt worden. Von dem spektroskopisch sehr ähnlichen Methämoglobin unterscheidet sich Sulfhämoglobin durch seine Beständigkeit gegen  $\text{NH}_4\text{SH}$ .

Beim gleichzeitigen Durchleiten von Schwefelwasserstoff und Sauerstoff (oder Luft) durch Blut oder beim Durchleiten von Schwefelwasserstoff allein durch neutrale Oxyhämoglobinlösungen tritt eine starke Änderung der Färbung (grün in dünneren, rot in dickeren Schichten) ein (Hoppe-Seyler und Araki<sup>6)</sup>. (Nach Harnack entsteht hierbei zunächst auch Sulfhämoglobin, dann alsbald tiefgreifende Zersetzung.) Hoppe-Seyler nennt den hierbei sich bildenden Farbstoff Schwefelmethämoglobin. Derselbe bedingt die grüne oberflächliche Färbung faulender blutiger Organe (Bauchdecken der Leichen usw.).

Es ist ausgezeichnet durch 2 Absorptionsstreifen im Rot, die bei der spektroskopischen Prüfung ins Auge fallen. Der eine beginnt noch ein wenig vor der Linie *C*, faßt dieselbe in seinen Rand ein, der andere nimmt ungefähr die Mitte zwischen *C* und *D* ein; zwischen beiden Streifen ist aber kein helles Licht zu sehen, sondern eine Beschattung, welche beide dunklere Streifen miteinander verbindet. Zwischen *D* und *E* sind auch nach sehr anhaltender Behandlung mit Schwefelwasserstoff und Luft noch die beiden Absorptionsstreifen des Oxyhämoglobins (§ 426) zu sehen. Läßt man starke Natronlauge auf Schwefelmethämoglobin bei gewöhnlicher Temperatur einwirken, so verschwindet der Streifen an der Linie *C* nicht, wohl aber der Streifen mitten zwischen *C* und *D*. Erhitzt man die Lösung dann unter Zusatz von etwas Schwefelammonium, so verschwinden alle Absorptionsstreifen im Rot und es sind allein die schönen Absorptionsstreifen des Hämochromogens zu sehen. Diese Spektralumwandlungen beweisen, daß durch Erwärmen in stark alkalischer Lösung der Schwefel aus der Verbindung herausgelöst und Hämochromogen gebildet wird.

**434. Die roten Farbstoffe der Vanessen** sind von M. Gräfin v. Linden<sup>7)</sup> eingehend untersucht worden und gehören nach ihr in die Gruppe der Proteide. Krystallisationsfähig, löslich in kaltem und heißem Wasser, Glycerin, konzentrierten Mineralsäuren, weniger in Chloroform, unlöslich in absolutem Alkohol, Äther, Schwefelkohlenstoff. Sie geben viele der Fällungsreaktionen der Eiweißstoffe, die Millonsche und Xanthoproteinreaktion, ferner die Gmelinsche Reaktion. Das Absorptionsspektrum ist dem des Urobilin ähnlich; mit dem Urobilin stimmen sie auch darin überein, daß auf Zusatz von Ammoniak und Chlorzink grüne Fluorescenz eintritt.

Salzsaure Alkohol bewirkt eine Spaltung in eine gefärbte alkohollösliche und eine ungefärbte wasserlösliche Komponente.

**435. Hämocyanin, Oxyhämocyanin.** Dieser kupferhaltige Blutfarbstoff findet sich bei vielen Mollusken und bedingt in seiner oxydierten Stufe als Oxyhämocyanin die blaue Farbe des Bluts, während die reduzierte Stufe farblos ist.

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 29, S. 78. 1900.

<sup>2)</sup> Chem. Zentralbl. 1921, III, S. 1255; 1923, I, S. 794. <sup>3)</sup> desgl. 1923, I, S. 795.

<sup>4)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 26, S. 558. 1899.

<sup>5)</sup> Journ. of physiol. Bd. 36, S. 62. 1907.

<sup>6)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 14, S. 412. 1890.

<sup>7)</sup> Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 98, S. 1, 1903. Dort auch Literatur über andere Schmetterlingsfarbstoffe.

Zuerst näher untersucht wurde der Farbstoff der Weinbergsschnecke (Harless<sup>1</sup>), er fand sich dann noch im Blut zahlreicher anderer Gastropoden, Lammelli-branchier und Cephalopoden<sup>2</sup>). Am meisten studiert, weil am leichtesten zugänglich, ist das Hämocyanin der Weinbergsschnecke und das von *Octopus vulg.* (Frédéricq<sup>3</sup>), Dhéré<sup>4</sup>). Ein zum mindesten sehr ähnlicher Farbstoff ist aus dem Blut mancher höherer, jedoch nicht aller Crustaceen isoliert worden, von denen Hummern oder Krabben ein geeignetes Untersuchungsmaterial darstellen (Frédéricq, Krukenberg<sup>5</sup>), Halliburton<sup>6</sup>), Alsberg und Clark<sup>7</sup>), Dhéré).

**Darstellung.** Die Darstellung aus *Octopus*blut in krystallisierter Form ist zuerst Henze<sup>8</sup>) gelungen. Man versetzt das zentrifugierte und filtrierte Blut mit gesättigter Ammonsulfatlösung bis zur Trübung, beseitigt diese wieder durch einige Tropfen Essigsäure und setzt wieder Ammonsulfatlösung bis zur beginnenden Trübung zu. Beim ruhigen Stehen setzt sich das Oxyhämocyanin als grauer Krystallbrei ab.

Aus *Helix*blut erhält man es nach Dhéré<sup>9</sup>) krystallisiert, indem man dieses in Kollodiumsäckchen gegen destilliertes Wasser 8—10 Tage im Eisschrank dialysiert. Den nur teilweise krystallinischen Niederschlag im Innern des Säckchens löst man in verdünnter Essigsäure und scheidet ihn, jetzt gut krystallisiert, durch abermalige Dialyse ab.

Über eine geeignete Methode zur Gewinnung des *Helix*blutes selber vgl. Philippi<sup>10</sup>).

**Zusammensetzung.** Die Zusammensetzung ist C 53,66, H 7,33, N 16,09, S 0,86, Cu 0,38% (Henze). Es verhält sich in vieler Hinsicht wie ein Kupferkomplexsalz eines Eiweißkörpers, jedoch ist die Gegenwart eines Pyrrolkomplexes sehr wahrscheinlich gemacht (Philippi). Bei der Hydrolyse treten Leucin, Glutaminsäure, Lysin, Histidin, Tyrosin auf (Henze).

**Eigenschaften.** Oxyhämocyanin löst sich in Wasser bei Gegenwart von Spuren von Elektrolyten und ist durch Dialyse oder Versetzen mit Ammonsulfat ausfällbar. Die blaue Lösung beginnt bei 68° zu opalescieren und ist bei 72° völlig geronnen. Die nach Henze gewonnenen Krystalle bestehen aus 3—4 mm langen, doppeltbrechenden Prismen, die nach Dhéré erhaltenen aus Oktaedern.

**Spektrum.** Die Lösung des Molluskenoxycyanins absorbiert stark das Gelb, mit einem Maximum bei 580  $\mu\mu$ , die Absorption ist geringer im Grün und erreicht ein Minimum bei 470  $\mu\mu$  im Blau. Das Oxycyanin der Crustaceen hat das Maximum der Absorption bei 556—560, das Minimum bei 488—495 (Quagliariello<sup>11</sup>). Diese Absorption im sichtbaren Teil ist wenig charakteristisch, da auch die Kupferverbindungen anderer Albumine ähnliche Auslöschung zeigen. Charakteristisch

<sup>1</sup>) Müllers Arch. 1847, S. 148; zitiert nach v. Fürth: Vgl. chem. Physiol. nied. Tiere. Jena 1903, S. 61.

<sup>2</sup>) Zusammenstellung des Vorkommens bei Kobert: Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 98, S. 411. 1903; — v. Fürth<sup>1</sup>) und bei v. Reinbold in Biochem. Handlex. Bd. VI, S. 222. Berlin 1911.

<sup>3</sup>) Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 87, S. 996. 1878; Bd. 115, S. 61. 1892.

<sup>4</sup>) Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 157, S. 309. 1913; Bd. 158, S. 978. 1914.

<sup>5</sup>) Zentralbl. f. med. Wissensch. 1880, S. 417.

<sup>6</sup>) Journ. of physiol. Bd. 6, S. 300. 1885. <sup>7</sup>) Journ. of biol. Chem. Bd. 8, S. 1. 1905.

<sup>8</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 33, S. 370. 1901 u. Bd. 43, S. 290. 1904/05.

<sup>9</sup>) Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 146, S. 784. 1908. — Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. Bd. 64, S. 788. 1908.

<sup>10</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 104, S. 88. 1919.

<sup>11</sup>) Publ. d. zool. Station zu Neapel Bd. 1, S. 57. 1922. Ber. f. d. ges. Physiol. Bd. 16, S. 87. 1923.

soll dagegen von einer Absorption im Ultraviolett bei 346 und 278  $\mu\mu$  das erste Band sein (Dh  r  <sup>1</sup>).

Das blaue Oxyh  mocyamin verhält sich dem Oxyhämoglobin insofern ähnlich, als es lose gebundenen Sauerstoff enthält, den es, unter Übergang in Farblos, abgeben kann beim Hindurchleiten von indifferenten Gasen oder beim Evakuieren. Von Verbindungen mit anderen Gasen ist nur eine grüne krystallisierte NO-Verbindung bekannt, dagegen reagieren nicht Kohlenoxyd und Kohlenwasserstoffe (Dh  r   und Schneider<sup>2</sup>). Gegen Säuren ist Oxyh  mocyamin ziemlich unbeständig, durch verdünnte Salzsäure wird Kupfer abgespalten unter Fällung eines weißen Acidalbumins (Henze). Durch warmes Alkali erfolgt Abspaltung eines dunkelgrünen Körpers, der starke Kupfer- und Pyrrolreaktion gibt (Philippi). Umwandlungen.

### Nucleoproteide.

(Bearbeitet von H. Steudel-Berlin.)

436. Allgemeines. Zieht man frische, zerkleinerte tierische Organe mit Wasser aus und versetzt das Filtrat vorsichtig mit Essigsäure, so bekommt man in den meisten Fällen Niederschläge, die aus einem Teil der in den Zellen resp. in den Zellkernen vorhandenen sauren und basischen Bestandteile bestehen. Die F  llungen werden mit dem Sammelnamen „Nucleoproteide“ bezeichnet. Sie enthalten als sauren Bestandteil einen Körper aus der Nucleins  uregruppe und als basischen Teil einen Eiweißkörper, die zusammen ein Salz bilden. Die Art und Festigkeit der Bindung ist abhängig von dem Grade der Acidität resp. Basicität der einzelnen Komponenten\*).

Vorkommen,  
Darstellung u.  
Eigenschaften.

In Alkalien sind die Niederschläge leicht löslich und aus der alkalischen Lösung können durch Zusatz von wenig Essigsäure wieder F  llungen gewonnen werden, die aber unter Umständen schon nicht mehr den ursprünglichen Niederschlägen gleich sind, weil sowohl gewisse Nucleinsäuren gegen Alkalien nicht beständig sind, als auch die Eiweißkörper durch die Lauge weiter verändert werden können. Da es aber kaum andere Methoden gibt, die zuerst erhaltenen Niederschläge von fremden Stoffen zu reinigen, die bei der ersten Fällung immer mechanisch mitgerissen werden, so kann auf die Umf  llung meist nicht verzichtet werden. Denn die ersten Wasserauszüge aus den Organen sind gewöhnlich trübe, opaleszierende Flüssigkeiten, aus denen auf Zusatz von Essigsäure auch das noch darin suspendierte Fett, die Farbstoffe und manches andere ausgefällt wird.

Werden die mehrfach umgef  llten Niederschläge erschöpfend mit Alkohol und Äther ausgezogen, so erhält man als Endprodukte weiße, amorphe, nicht hygroskopische Pulver, die sich durch ihren Phosphorgehalt (0,5—6,1%) charakterisieren lassen. Ob manche Nucleoproteide Eisen in ihrem Molekül enthalten, muß dahingestellt bleiben. Bei den genauer daraufhin untersuchten Nucleoproteiden hat sich jedenfalls ergeben, daß das Eisen nicht dem Molekül des Nucleoproteids angehört, sondern nur einer Verunreinigung. In sehr verdünnter Salzsäure sind die Substanzen leicht löslich, werden aber bald von

\*) Die Nucleoproteide sind also nucleinsäure Eiweißsalze. Der Name „Nucleoproteide“ stammt aus einer Zeit, in der man diese Verhältnisse noch nicht klar übersehen konnte. Er wird teils aus historischen Gründen beibehalten, teils weil die nucleinsäuren Eiweißkörper manches Gemeinschaftliche haben, das ihre Zusammenfassung in eine besondere Gruppe rechtfertigt.

<sup>1</sup>) Journ. de physiol. et de pathol. g  n. Bd. 18, S. 1081. 1920. Ber. f. d. ges. Physiol. Bd. 6, S. 236. 1921.

<sup>2</sup>) Journ. de physiol. et de pathol. g  n. Bd. 20, S. 1. 1922. Ber. f. d. ges. Physiol. Bd. 14, S. 303. 1922.

ihr angegriffen und weiter verändert. Sie sind, soweit man sie bisher untersucht hat, rechtsdrehend, offenbar weil das Drehungsvermögen der Nucleinsäure bei weitem das Drehungsvermögen des basischen Eiweißanteils überwiegt. Nur das Nucleoclupein (§ 437) dreht schwach links.

Auf die vorbeschriebene Weise sind Nucleoproteide aus den verschiedensten Organen gewonnen worden, aber die wenigsten dieser Körper sind genauer untersucht worden. Es ist dabei zu bedenken, daß wässrige Auszüge tierischer Organe eine ganze Reihe von Fermenten enthalten, die sowohl Nucleinsäuren wie Eiweißkörper angreifen. Da nun solche Organauszüge nur langsam filtrieren, man aber auf klare Filtrate bei sauberem Arbeiten durchaus angewiesen ist, so ist man nie sicher, ob und wieweit die erhaltenen Substanzen schon durch die Fermente verändert sind. Es ist also nicht auffallend, daß die verschiedenen Forscher, die Nucleoproteide dargestellt haben, oft über die Nucleoproteide ein und desselben Organs die allerverschiedensten Angaben gemacht haben, weil ihnen damals bei ihren Arbeiten diese Verhältnisse noch nicht genügend bekannt waren. Die durch Extraktion in der Kälte gewonnenen Nucleoproteide sind meist eiweißreicher wie die in der Siedehitze erhaltenen. Das hat seinen Grund darin, daß die Eiweißkörper größtenteils in der Siedehitze koagulieren und nur ein kleiner Teil von ihnen unter diesen Bedingungen an Nucleinsäure gebunden in Lösung geht.

Die Wirkung der Fermente kann man vermeiden, wenn man die zu untersuchenden Organe in fein zerteiltem Zustande in Alkohol bringt und den Organbrei wiederholt mit Alkohol und Äther auskocht. Dann erhält man ein trockenes entfettetes Organpulver, das sich gut zur Gewinnung von Nucleoproteiden eignet.

Zur völligen Charakteristik eines Nucleoproteids gehört außer der Isolierung und Identifizierung der Nucleinsäure auch diejenige des in die Verbindung eingehenden Eiweißkörpers. Solche Untersuchungen sind bisher aber nur an einigen wenigen Nucleoproteiden angestellt worden. Sie finden bis jetzt bald eine Grenze, weil häufig die Nucleinsäuren aus den wässrigen Organauszügen verschiedene Eiweißkörper in wechselnden Mengen niederschlagen, deren Aufteilung natürlich sehr schwer ist. Meist haben die Untersucher sich damit begnügt, den Phosphorgehalt der Substanz nachzuweisen und festzustellen, ob der fragliche Körper bei der Hydrolyse, z. B. mit Schwefelsäure, Nucleinbasen abspaltete.

Erkennung der Nucleoproteide.

Man hat den Nucleoproteiden früher den Charakter von schwachen Säuren zugeschrieben, aber seitdem man weiß, daß die Nucleinsäuren in schwach essigsaurer Lösung eiweißfällend wirken und neutrale Salze mit den basischen Eiweißkörpern geben, hat dies Charakteristicum an Bedeutung verloren.

Als nucleinsaure Eiweißsalze geben die Nucleoproteide alle Farbreaktionen der Eiweißkörper, soweit eben die Eiweißkomponente diese gibt.

Nucleoprotamine.

437. **Nucleoprotamine** kommen in den Köpfen der reifen Spermien mancher Fische vor. Sie sind zuerst von Miescher<sup>1)</sup> aus Lachsspermien, dann von Mathews<sup>2)</sup> aus Heringsspermien dargestellt und bestehen nach den Untersuchungen von Steudel<sup>3)</sup> z. B. beim Hering aus neutralem nucleinsauren Clupein (73,5% Thymonucleinsäure und 26,5% Clupein).

Darstellung der Nucleoprotamine.

Zur Darstellung<sup>4)</sup> werden lebend frische reife Testikel durch ein feinmaschiges Sieb getrieben, um die geringen Reste Bindegewebe zu entfernen. Dann wird die erhaltene Flüssigkeit, die trübe und milchig aussieht, so oft mit immer

<sup>1)</sup> Gesammelte Abhandlungen Bd. 2, S. 359. Leipzig: C. F. W. Vogel.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 33, S. 410.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 72, S. 305. 1911; Bd. 73, S. 471. 1911; Bd. 83, S. 72. 1913.

<sup>4)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 72, S. 307. 1911.

wieder erneuertem destilliertem Wasser in einer gut laufenden Zentrifuge ausgeschleudert, bis sich die reinen Spermatozoenköpfe als weißes schweres Pulver absetzen und die darüberstehende Waschflüssigkeit vollkommen klar und farblos ist. Auf diese Weise werden die Zwischenzellenflüssigkeit und die Bestandteile der Schwänze vollständig entfernt. Mikroskopisch sieht man dann nur noch die Köpfe der Spermatozoen. Der weiße Rückstand wird nun durch mehrmaliges Auskochen mit Alkohol und Äther erschöpfend ausgezogen und es hinterbleibt ein blendend weißes, schweres, nichthyroskopisches Pulver.

Bei 120° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet enthält Nucleoclupein Nucleoclupein. im Mittel 6,42 % P und 20,78 % N. In Natronlauge gelöst (1 g in 100 ccm Normal-NaOH) ist die Substanz schwach linksdrehend (0,25° im 22-cm-Rohr). Bei längerem Stehen bei Zimmertemperatur geht das Drehungsvermögen auf 0° zurück. Parallel mit der Drehungsabnahme geht eine Abnahme der Viscosität<sup>1)</sup>.

Das Nucleoclupein läßt sich auch künstlich gewinnen durch Zusammenbringen der äquivalenten Mengen von nucleinsaurem Natrium und Clupeinsulfat. Man erhält dann einen in Wasser schwer löslichen Körper, der analytisch vollkommen dem natürlichen Produkt gleicht, nur in alkalischer Lösung geringe Unterschiede in der optischen Aktivität und in der Viscosität zeigt (H. Steudel<sup>2)</sup>. Künstliche Darstellung des Nucleoclupein.

Andere künstliche Nucleoclupeine s. bei H. Steudel und E. Peiser<sup>3)</sup>.

**438. Nucleoproteide der Thymusdrüse.** Aus der Thymusdrüse sind von verschiedenen Untersuchern verschiedene Nucleoproteide dargestellt worden. Die Unterschiede in den einzelnen Präparaten werden verständlich, wenn man bedenkt, daß die in den Kernen der Thymuszellen vorhandene Thymonucleinsäure unter verschiedenen Bedingungen wechselnde Mengen von basischen Eiweißkörpern fällt. Am eingehendsten untersucht ist das zuerst von Lilienfeld dargestellte Nucleohiston, das größtenteils aus thymonucleinsaurem Histon besteht. Nucleoproteide der Thymusdrüse.

Zur Darstellung des Lilienfeldschen Nucleohistons nach H. Steudel<sup>4)</sup> werden 3000 g rein präparierte Thymusdrüsen zerkleinert und mit 6 l Wasser unter Zusatz von Toluol 4 Stunden im Schüttelapparat geschüttelt und über Nacht auf Eis gelegt. Dann wird die Masse durch ein Haarsieb getrieben, mit 40 l Wasser verdünnt und zentrifugiert. Man erhält eine hellgelbe, schwach opaleszierende Lösung und sehr wenig eines schleimigen Rückstandes. Die Lösung wird nun vorsichtig mit Essigsäure ausgefällt, der Niederschlag abfiltriert, ausgeschleudert und mit essigsauerm Wasser ausgewaschen. Die schneeweiße Substanz wird jetzt in 3—4 l Wasser, dem auf 100 H<sub>2</sub>O 200 ccm 10proz. Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung zugesetzt sind, aufgelöst, die Lösung auf 10 l verdünnt, über Seesand an der Saugpumpe von geringen schleimigen Rückständen abgesaugt, das Filtrat noch einmal mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt und wieder mit Essigsäure ausgefällt. Der Niederschlag wird abfiltriert und wiederholt mit Alkohol und Äther ausgekocht. Ausbeute 160—170 g eines weißen, feinen, staubenden Pulvers. Zusammensetzung C 48,38, H 6,92, N 16,80, P 3,15, S 0,72%.

Darstellung des Nucleohistons aus Thymusdrüsen.

Der gesamte Phosphor ist in Form von Thymonucleinsäure im Nucleohiston enthalten. Außer dem Histon enthält die Substanz noch andere basische Eiweißkörper, die bisher nicht näher untersucht sind. Wahrscheinlich ist diesem Gemenge thymonucleinsaurer Eiweißsalze, das nach der eben beschriebenen

<sup>1)</sup> H. Steudel: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 83, S. 76. 1913.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 83, S. 72. 1913.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 122, S. 298. 1922.

<sup>4)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 87, S. 207. 1913.

Methode gewonnen wird, noch Fett in geringer Menge beigelegt, denn wenn man die ersten opaleszierenden Filtrate vorsichtig ausäthert, erhält man Präparate, die etwas weniger Kohlenstoff, aber mehr Phosphor enthalten.

Eigenschaften des Nucleohistons aus Thymusdrüsen.

In 5proz. Ammonacetatlösung dreht das Nucleohiston rechts.  $[\alpha]_D = +37,5^\circ$  (Gamgee und Jones<sup>1</sup>).

In Wasser ist das Nucleohiston unlöslich, durch Zusatz von Alkalien kann es in Lösung gebracht und aus der Lösung durch Essigsäurezusatz wiedergewonnen werden, entsprechend der allgemeinen Eigenschaft der Thymonucleinsäure, in essigsaurer Lösung mit Eiweißkörpern schwer lösliche Salze zu geben. Durch Extraktion mit 0,8proz. Salzsäure läßt sich aus dem Nucleohiston nur ein Teil des Histons extrahieren, weil die Salzsäure auch sehr bald die Nucleinsäure unter Abspaltung der Nucleinbasen weiter verändert (Steudel<sup>2</sup>).

Andere Darstellungsweise der Nucleoproteide aus Thymusdrüsen.

Andere Methoden für die Darstellung von Nucleoproteiden aus der Thymusdrüse sind von Bang<sup>3</sup>), Huiskamp<sup>4</sup>) und Malengreau<sup>5</sup>) angegeben worden. Die erhaltenen Produkte sind Gemenge, die größtenteils aus nucleinsaurem Histon bestehen, daneben noch unbekannte Begleiter enthalten.

Künstliche Darstellung des Nucleohiston.

Künstlich läßt sich Nucleohiston erhalten<sup>6</sup>), wenn man äquivalente Mengen thymonucleinsaures Natrium und Histonsulfat zusammengibt. Der ausfallende, in Wasser schwer lösliche Niederschlag zeigt ein Verhältnis von P : N = 1 : 3,21, während ein gereinigtes natürliches Nucleohiston P : N = 1 : 3,44 und 1 : 3,23 ergab. Auch aus dem künstlichen Nucleohiston läßt sich ebenso wie beim natürlichen Produkt durch Salzsäureextraktion nicht die ganze Menge Histon erhalten.

Nucleoproteide der Pankreasdrüse.

**439. Nucleoproteide der Pankreasdrüse.** Aus der Pankreasdrüse lassen sich mehrere Nucleoproteide gewinnen, je nachdem man das Organ in der Kälte oder in der Wärme extrahiert, oder indem man von Trockenpankreas (mit Alkohol und Äther extrahiert) ausgeht. Extrahiert man mit Wasser in der Kälte, so kann das Proteid der spaltenden Wirkung der Fermente (Trypsin, Nuclease) ausgesetzt sein. Bei der Extraktion der Drüse mit Wasser in der Siedehitze werden ähnlich wie bei der Verarbeitung der vorher getrockneten Organe zwar diese sekundären Reaktionen vermieden, es werden aber die Eiweißkörper teilweise denaturiert und das Nucleoproteid wird eiweißärmer.

$\alpha$ -Nucleoproteid aus Pankreasdrüse.

$\alpha$ -Nucleoproteid, von Hammarsten<sup>7</sup>) zuerst aufgefunden, läßt sich nach Umber<sup>8</sup>) durch Extrahieren der frisch zerkleinerten Drüsen mit physiologischer Kochsalzlösung, Fällen des klaren Filtrats mit Essigsäure, Dekantieren des Niederschlags mit essigsäurehaltigem Wasser, Lösen in Wasser unter Zusatz von möglichst wenig Soda, schnelles Filtrieren, Wiederholung der Fällung und Behandlung des Niederschlags mit Alkohol und Äther erhalten, aber nur dann, wenn zur Vermeidung der Selbstverdauung des Organs alle Operationen bei niedrigerer Temperatur ausgeführt werden. Mittlere Zusammensetzung C 51,35, H 6,81, N 17,12, P 1,67, S 1,29, Fe 0,13%. Es ist in Wasser unlöslich, in Laugen löslich, beim Ansäuern sich wieder abscheidend, in schwacher Essigsäure unlöslich, in starker zum Teil löslich.

<sup>1</sup>) Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 4, S. 10. 1904.

<sup>2</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 90, S. 291. 1914.

<sup>3</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 30, S. 508. 1900. Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 4, S. 115, 331. 1904; Bd. 5, S. 317. 1904.

<sup>4</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 32, S. 145. 1901; Bd. 34, S. 32. 1901/02; Bd. 39, S. 55. 1903.

<sup>5</sup>) Ref. Malys Jahresber. d. Tierchem. 1900, S. 38; 1901, S. 43; 1903, S. 45.

<sup>6</sup>) H. Steudel: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 90, S. 291. 1914.

<sup>7</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 19, S. 19. 1894.

<sup>8</sup>) Zeitschr. f. klin. Med. Bd. 40, S. 464. 1900.

Beim Kochen mit Wasser wird es verändert und es läßt sich aus dem klaren Filtrat durch Essigsäure ein viel phosphorreicherer Nucleoproteid abscheiden. Ein solches phosphorreiches  $\beta$ -Nucleoproteid mit 4,48% P erhielt Hammarsten durch Kochen der Pankreasdrüse mit Wasser und Fällen des Filtrates mit verdünnter Salzsäure oder Essigsäure.

$\beta$ -Nucleoproteid von Hammarsten. Zu seiner Darstellung nach Steudel und Brigl<sup>1)</sup> werden 25 kg frische, rein präparierte und zerkleinerte Drüsen mit 17 l siedendem Wasser übergossen und etwa 10 Minuten lang im Kochen gehalten. Dann werden sie zum völligen Erkalten fortgestellt. Es sammelt sich das Fett, das selbst einer sorgfältigen Präparation immer noch entgeht und im warmem flüssigen Zustande die Filter bald verstopfen würde, als fester Kuchen an der Oberfläche und kann leicht abgehoben werden. Der nach der Filtration bleibende Rückstand wird noch einmal mit 6 l Wasser aufgekocht und filtriert. Man erhält ein hellgelbes klares Filtrat, dem 5—10‰ Essigsäure und das gleiche Volumen 96proz. Alkohols zugesetzt werden. Es fällt ein Nucleoproteid in reichlichen Mengen, das mit Alkohol und Äther wiederholt ausgekocht wird. Ausbeute etwa 500 g.

Nach Knopf<sup>2)</sup> liefert das  $\beta$ -Nucleoproteid bei der Hydrolyse 6,5% Guanin und 0,85% Adenin. Aus dem  $\beta$ -Nucleoproteid ist zuerst die Guanylsäure gewonnen, die im Proteid wahrscheinlich an eine Thymonucleinsäure gebunden ist (s. Nucleinsäuren § 271 ff.).

Nucleoproteid aus Trockenpankreas. Wenn man die sekundären Fermentwirkungen, die sich in wässrigen Pankreasauszügen leicht abspielen, möglichst vermeiden will, geht man zweckmäßig von Trockenpankreas aus.

a) Nach Jones und Whipple<sup>3)</sup>. Fein zerkleinerte Pankreasdrüsen vom Schwein werden mit 70proz., 95proz. und absolutem Alkohol und dann mit Äther verrieben. Darauf werden sie mit wenig 2proz. Ammoniak und dann mit Wasser behandelt. Die beiden durch Leinen gepreßten, unfiltrierbaren Auszüge werden in der Kälte mit Essigsäure angesäuert und von einer dabei sich abscheidenden schleimigen Substanz abfiltriert. Das klare Filtrat scheidet beim Eingießen in das 4fache Volumen Alkohol das Proteid als Ammoniumsalz in völlig weißen Flocken ab. Aus seiner wässrigen Lösung fällt auf Zusatz von Essigsäure das Nucleoproteid aus. C 45,23, H 6,26, N 17,42, P 5,05%.  $[\alpha]_D = +37,5^\circ$  (Gamgee und Jones). Bei der Spaltung liefert es von Nucleinbasen Guanin und Adenin im Verhältnis von 4 : 1.

b) Nach E. Hammarsten<sup>4)</sup>. Entblutete Pankreasdrüsen vom Rinde werden von Fett und Lymphgewebe frei präpariert, zu einem Brei gemahlen und in 96proz. Alkohol eingelegt. Nach 1 Stunde wird der Alkohol abgepreßt und die Masse aufs neue mit 96proz. Alkohol versetzt. In dieser Weise wird die Drüsenmasse noch 3 mal (nach 3, 12 und 24 Stunden) mit 96proz. Alkohol ausgezogen. Dann wird 2 mal mit Äther behandelt, die Masse an der Luft getrocknet und durch eine Scheuermühle getrieben. Die Alkohol-Ätherbehandlung ist notwendig, um später filtrierbare Extrakte mit Natronlauge zu bekommen. 600 g von dem staubenden grauweißen Pulver werden unter Umrühren mit 4 l 0,06 n-Salzsäure 24 Stunden bei  $+6^\circ$  extrahiert, das Ungelöste zu einem festen Kuchen abgepreßt, mit 1 l Wasser angerührt und aufs neue von Flüssigkeit scharf abgepreßt. Die feste Masse wird mit 2 l Wasser von  $0^\circ$  angerieben und dann unter Kühlung des Extraktionsgefäßes und Umrühren 0,06 n-Natronlauge von  $0^\circ$  in kleinen Portionen zugesetzt. Hierbei muß

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 68, S. 40. 1910.    <sup>2)</sup> desgl. Bd. 89, S. 170. 1913.

<sup>3)</sup> Americ. Journ. of physiol. Bd. 7, S. 423. 1902.

<sup>4)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 109, S. 141. 1920.

genau darauf geachtet werden, daß die Temperatur niemals über  $+5^{\circ}$  steigt, und daß die Mischung im Extraktionsgefäß unmittelbar nach jedem Alkalizusatz nicht mehr als schwach blaviolette Farbenreaktion mit neutralem Azolithminpapier gibt. Man braucht hierzu etwa 4 Stunden und 4400 ccm 0,06n-Natronlauge. Dann wird durch dichte Leinwand abgeseiht und das trübe braungelbe Filtrat auf doppeltgefaltete Filter gegossen. Das Filtrieren muß im Kälteraum bei  $0^{\circ}$  vorgenommen werden. Werden die Filter öfter gewechselt, so kann man das ganze Extrakt in 72 Stunden filtrieren. Das völlig klare Filtrat wird mit 20 g 10proz. HCl pro Liter versetzt, die reichlich entstehende grobflockige, weiße Fällung abzentrifugiert und mit 1proz. Essigsäure mehrmals in der Zentrifuge gewaschen. Der Bodensatz wird nun mit 11 Wasser von  $0^{\circ}$  angerührt und mit schwacher Natronlauge bis zur neutralen Reaktion versetzt. Die etwas trübe Flüssigkeit wird nochmals bei  $0^{\circ}$  filtriert, das völlig klare Filtrat mit 20 g 10proz. Salzsäure gefällt, der Niederschlag abzentrifugiert, in der Zentrifuge mehrmals mit 1proz. Essigsäure und dann 6 mal mit 96proz. Alkohol gewaschen. Endlich wird er 2 mal mit absolutem Alkohol und dann mehrmals mit Äther angerieben und jedesmal scharf abgesaugt. An der Luft getrocknet hat das Präparat eine fast rein weiße Farbe. Es ist nicht hygroskopisch, in Wasser nicht, in Alkalien dagegen leicht, und schon bei noch saurer Reaktion, löslich. Lufttrocken enthält die Substanz 17,09% N, 5,61% P. Eine 2proz. Lösung wird von Essigsäure, Salzsäure und Calciumchloridlösung grobflockig gefällt. Die mit Calciumchlorid entstehende Fällung besteht aus einer Nucleinsäure (Guanylnucleinsäure) (s. S. 388).

Nucleoproteid  
aus Milz.

440. **Nucleoproteid aus Milz**<sup>1)</sup>. 5 Rindermilzen, die zusammen etwa 5000 g wiegen, werden durch eine Fleischmühle getrieben und mit 3,5 l Wasser ausgekocht. Nach dem Erkalten wird filtriert; man erhält etwa 3 l wasserklaren Filtrates von schwach saurer Reaktion, die mit 40 ccm 50proz. Essigsäure versetzt werden. Nach dem Zusatz des gleichen Volumen Alkohols zur Flüssigkeit erhält man einen weißen flockigen Niederschlag, der mit Alkohol und Äther getrocknet wird. Ausbeute etwa 34 g. Ein nochmaliges Auskochen des voluminösen Rückstandes lohnt nicht. Der Niederschlag enthält 2,5% P und 15% N. Sämtlicher Phosphor ist in Form von Nucleinsäure, wahrscheinlich Guanylnucleinsäure, in dem Nucleoproteid enthalten, so daß es als guanylnucleinsaures Eiweiß angesehen werden kann (H. Steudel).

Ein ähnliches Nucleoproteid ist durch Fällen des Natriumbicarbonatauszuges der Milz sowie des durch Kochen mit Wasser erhaltenen Auszuges mit Essigsäure von Levene und Mandel<sup>2)</sup> erhalten worden. Ferner hat Bang<sup>3)</sup> ein Nucleoproteid aus Milz beschrieben. Wie aus Milz sind auch aus anderen lymphatischen Organen verschiedene nucleinsaure Eiweißverbindungen gewonnen worden, die je nach den Darstellungsmethoden wechselnde Zusammensetzung haben.

Nucleoproteid aus  
Gänseblut-  
körperchen.

441. **Nucleoproteid aus Gänseblutkörperchen**. Die Kerne der Vogelblutkörperchen bestehen fast ganz aus nucleinsaurem Eiweiß. Man kann sie bequem nach folgender Methode<sup>4)</sup> gewinnen:

Das unter Umrühren fibrinfrei gewonnene Blut von Hühnern oder Gänsen (einige Liter) wird möglichst frisch mit 0,9proz. NaCl-Lösung verdünnt und in

<sup>1)</sup> H. Steudel: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 114, S. 255. 1921.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 47, S. 151. 1906. Biochem. Zeitschr. Bd. 5, S. 33. 1907.

<sup>3)</sup> Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 4, S. 362. 1904.

<sup>4)</sup> H. Plenge (Ackermann): Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 43, S. 300. 1904. — Bang: Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 5, S. 317. 1904.



einer 4 l fassenden Zentrifuge ausgeschleudert. Die abgesetzten Blutkörperchen werden noch einmal mit 0,9proz. NaCl-Lösung aufgeschwemmt und zentrifugiert.

Die gewaschenen Blutkörperchen werden je nach der Menge in 1 oder 2 Scheidetrichtern von je 2 l Inhalt eingebracht und in jedem mit 1500 ccm Wasser von 40° geschüttelt. Nach einiger Zeit werden zu je 1500 ccm Wasser 500 ccm NaCl-Lösung von 3,6% hinzugefügt. Dann wird zentrifugiert. Die abgesetzten Kernmassen werden von neuem in einem Scheidetrichter in 1500 ccm Wasser von 40° suspendiert. Nach Hinzufügen von 500 ccm 3,6proz. NaCl-Lösung wird wieder zentrifugiert. Dies Vorgehen wird so oft wiederholt, bis die Masse ein farbloses glasiges Aussehen ohne rote Streifen hat und an die Kochsalzlösung keinen Blutfarbstoff mehr abgibt. Dann wird die Kernmasse wieder in Wasser zum Aufquellen und mit dem doppelten Volumen Alkohol zur Schrumpfung gebracht, zentrifugiert, in 96proz. Alkohol gebracht, abgesaugt, noch einmal mit 96proz. Alkohol verrieben und abgesaugt, dann in absolutem Alkohol und darauf in Äther getrocknet und abgesaugt.

Die ganzen Manipulationen dürfen bis zum Einbringen in Alkohol nicht mehr als 3 Tage in Anspruch nehmen. Es empfiehlt sich, die Kernmassen nachtsüber nicht in Wasser allein, sondern nach Zufügung der NaCl-Lösung an einem kühlen Platze aufzubewahren.

Durch Lösen der Kerne in höchst verdünnter Natronlauge (unter 0,1% NaOH) und Ansäuern mit Essigsäure kann man Niederschläge erhalten, die sich wie Nucleoproteide verhalten. Die Kerne enthalten 3,93% P und 17,20% N. Durch Extraktion mit Salzsäure kann man fast den gesamten basischen Eiweißkörper, das Histon, in Lösung bringen, die Nucleinsäure bleibt ungelöst zurück.

**442. Nucleoproteide aus anderen Organen.** Man hat viele Organe nach den oben beschriebenen Verfahren auf sog. Nucleoproteide untersucht. Entweder wurden die wässerigen Auszüge mit Essigsäure gefällt und die Fällung nach dem Umfällen auf ihre Elementarzusammensetzung untersucht oder es wurden die mit Alkohol und Äther getrockneten Organe mit schwachen Alkalien ausgezogen und die Auszüge mit schwachen Säuren ausgefällt. Diese als „Nucleoproteide“ bezeichneten Fällungen — nucleinsäure Eiweißsalze — bedürfen dringend einer weiteren Untersuchung, um sowohl die Art der Nucleinsäure wie des Eiweißkörpers festzustellen. Im folgenden werden die teilweise ganz unzulänglichen Angaben früherer Autoren kurz wiedergegeben:

Nucleoproteide aus  
verschiedenen  
Organen:

**Nucleoproteid aus Nebennieren.** Nach der Methode von Jones <sup>aus Nebennieren</sup> und Whipple<sup>1)</sup> (s. Nucleoproteide aus Pankreas, S. 537) aus Nebennieren von Schafen und Rindern gewonnen. C 46,22, H 6,10, N 17,92, P 4,70% (Schaf). C 46,81, H 6,38, N 17,85, P 4,72% (Rind). Wenig löslich in Wasser, leicht in Alkalien und Ammoniak, durch Essigsäure fällbar und erst in großem Überschuß der Essigsäure wieder löslich.  $[\alpha]_D = +48,1^\circ$ . Bei der Spaltung entstehen von Nucleinbasen nur Guanin und Adenin, und zwar im Verhältnis 4:1. Die zugrundeliegende Nucleinsäure liefert auch Thymin.

**Nucleoproteid aus Knochenmark<sup>2)</sup>** fällt beim schwachen Ansäuern des wässerigen <sup>aus Knochenmark</sup> Auszuges des Knochenmarks mit Essigsäure aus und wird durch Lösen in Natriumcarbonat und abermaliges Fällen mit Essigsäure gereinigt. Schneeweißes Pulver. C 45,01, H 5,91, N 14,21, P 1,78, S 0,315%. Orcinsalzsäurereaktion positiv.

**Nucleoproteid aus Thyreoidea** wurde von Oswald<sup>3)</sup> aus dem Auszug der Schilddrüse <sup>aus Thyreoidea</sup> mit physiologischer Kochsalzlösung nach Entfernung des Thyreoglobulins (durch Versetzen des Auszuges mit dem gleichen Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung) durch Sättigen mit Ammonsulfat abgeschieden. Jodfrei, 0,16% P enthaltend. In salzhaltigem Wasser und Alkali löslich, durch verdünnte Säure fällbar, in 10proz. Magnesiumsulfatlösung bei 73° gerinnend.

<sup>1)</sup> Americ. Journ. of physiol. Bd. 7, S. 423. 1902.

<sup>2)</sup> Wohlgemuth: Arb. a. d. pathol. Inst. Berlin 1906, S. 627.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 27, S. 35. 1899.

- aus Leber Nucleoproteid aus Leber<sup>1)</sup>. Aus Leber kann man ähnlich wie aus der Pankreasdrüse eine Fällung erhalten, wenn man alle Operationen in der Kälte ausführt. Wird die Substanz erhitzt, so koaguliert ein Teil des Eiweißes und man erhält ein sog.  $\beta$ -Nucleoproteid, C 45,22, H 5,72, N 16,67, P 3,06, S 0,64%. Ob das in der Substanz vorhandene Eisen zum Moleküle gehört, bleibt noch zu entscheiden. Die Substanz entspricht dem Ferratin Schmiedebergs<sup>2)</sup>, das er nach dem gleichen Verfahren aus Schweineleber darstellte. Das Ferratin enthält 6% Fe.
- aus Hepatopankreas von Octopus Nucleoproteid aus Hepatopankreas von Octopus<sup>3)</sup>. Die zerschnittenen und mit Alkohol und Äther, darauf mehrmals mit Wasser behandelten Organe wurden wiederholt mit 0,5%<sub>00</sub> Sodalösung extrahiert. Aus der klar filtrierten Lösung fiel auf Zusatz von Essigsäure das Nucleoproteid. Lösung und Fällung wurde mehrmals wiederholt, der Niederschlag dann mit Wasser, Alkohol und Äther gewaschen. Fast weißes Pulver. N 14,23, P 0,92, Cu 0,96%. Eiweiß- und Pentosereaktionen positiv. Bei der Hydrolyse werden Nucleinbasen abgespalten.
- aus Submaxillardrüse Nucleoproteid aus Submaxillardrüse. Die fein zerschnittenen und ausgewaschenen, dann in gefrorenem Zustande mit Sand fein zerriebenen Drüsen werden mit Wasser, das durch Zentrifugieren abgetrennt wird, ausgewaschen, bis es mit Essigsäure keine Trübung mehr gibt, dann mit 0,05proz. Ammoniak 24 Stunden lang behandelt (Holmgren<sup>4)</sup>). Aus der durch Zentrifugieren getrennten Flüssigkeit fällt durch Essigsäure das in überschüssiger Essigsäure lösliche Proteid (15% N). Das durch Pepsin-Salzsäure abgespaltene Nuclein enthält 2,9% P. Unter den Nucleinbasen wurden Xanthin und Guanin nachgewiesen. Nach dem Kochen mit Säuren reduziert die Flüssigkeit Fehlingsche Lösung.
- aus Milchdrüse Nucleoproteid aus Milchdrüse erhielt Odenius<sup>5)</sup> durch Aufkochen der fein zerhackten Kuheuter mit Wasser und Fällen des klaren erkalteten Filtrats mit verdünnter Essigsäure. Durch wiederholtes Auflösen in Wasser mit Hilfe von möglichst wenig Alkali und Fällen mit Säure sowie durch Extraktion mit Alkohol und Äther wurde es gereinigt. Mittlere Zusammensetzung: C 47,02, H 6,10, N 17,27, S 0,889, P 0,277, Asche 0,942%. Ziemlich leicht zersetzlich. Beim Kochen mit verdünnter Säure wird Pentose und reichlich Guanin abgespalten; andere Nucleinbasen wurden nicht gefunden.
- aus Placenta Nucleoproteid aus Placenta<sup>6)</sup>. Das fein zerhackte und mit Wasser gewaschene Gewebe wird mit 0,5-, 5- und 10proz. Kochsalzlösung extrahiert. Der aus den Extrakten durch Essigsäure gefällte Niederschlag wird in ammoniakhaltigem Wasser gelöst, wieder gefällt und Lösung und Fällung wiederholt, der Niederschlag schließlich mit Alkohol, Äther und Chloroform extrahiert. C 50, H 7,3, N 15, S 1, P 0,45%. Biuret-, Xanthoprotein-, Millonsche und Adamkiewiczische Reaktion positiv. Nach der Hydrolyse sind Pentose und Nucleinbasen nachweisbar.
- aus Muskeln Nucleoproteid aus Muskeln. Durch Extraktion der vorher mit Wasser behandelten quergestreiften Muskeln mit 0,15proz. Sodalösung und Fällung des Auszugs mit Essigsäure von Pekelharing<sup>7)</sup> in geringer Menge erhalten, in Wasser unlöslich. Unter den Nucleinbasen hauptsächlich Xanthin, wenig Guanin.
- aus Gehirn Nucleoproteid aus Gehirn<sup>8)</sup>. Die Gehirnmasse wird mit 4proz. Ammoniumchloridlösung und darauf wiederholt mit Wasser extrahiert. Die durch Dekantation getrennten Flüssigkeiten wurden durch wiederholte Filtration vollständig geklärt und durch Essigsäure gefällt. Der Niederschlag wird mit angesäuertem Wasser und dann mit Wasser ausgewaschen, bis das Waschwasser keine Biuret- und Chlorreaktion mehr zeigt. C 42,36, H 5,90, N 15,46, S 1,28, P 0,56%. Das Nucleoproteid ist frisch gefällt löslich in schwachen Alkalien, verliert aber diese Löslichkeit durch längere Einwirkung von angesäuertem Wasser. Bei der Hydrolyse entstehen von Nucleinbasen nur Guanin und Adenin. Durch Pepsinsalzsäure wird Nuclein (1,42% P) erhalten.
- aus elastischem Gewebe Nucleoproteid aus elastischem Gewebe<sup>9)</sup>. Das rein präparierte und in Streifen geschnittene Ligament. nuchae vom Rind wurde mit fließendem Wasser behandelt, dann nach feiner Zerkleinerung mit Wasser extrahiert. Aus dem Filtrat fiel auf Zusatz von Essigsäure (0,5 ccm 36proz. Säure auf 100 ccm) ein flockiger Niederschlag, welcher in 0,3proz. Sodalösung gelöst wird. Lösung und Fällung wurde mehrmals wiederholt, der Niederschlag dann gewaschen und mit Alkohol und Äther behandelt. Phosphorgehalt 0,47%. Bei der Hydrolyse entstehen Nucleinbasen.

<sup>1)</sup> Wohlgemuth: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 37, S. 475. 1902/03; Bd. 42, S. 519. 1904; Bd. 44, S. 530. 1905. Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 37, S. 4362. 1904.

<sup>2)</sup> Arch. f. exp. Pathol. u. Physiol. Bd. 33, S. 106. 1894.

<sup>3)</sup> Henze: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 55, S. 433. 1908.

<sup>4)</sup> Malys Jahresber. d. Tierchem. 1897, S. 36.

<sup>5)</sup> Malys Jahresber. d. Tierchem. 1900, S. 39.

<sup>6)</sup> Savarè: Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 11, S. 73. 1908.

<sup>7)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 22, S. 245. 1897.

<sup>8)</sup> Levene: Arch. of neurol. a. psychopath. Bd. 2, S. 1. 1899, abgedruckt bei W. J. Gies: Biochem. researches Bd. 1, Nr. 12. 1903.

<sup>9)</sup> Richards u. Gies: Americ. Journ. of physiol. Bd. 7, S. 125. 1902.

Nucleoproteid aus Blutserum. Dieser von Pekelharing<sup>1)</sup> aufgefundene Körper aus Blutserum. wurde von Huiskamp<sup>2)</sup>, Freund und Joachim<sup>3)</sup> und zuletzt von Liebermeister<sup>4)</sup> untersucht.

Zu seiner Darstellung wurde in mit dem 20fachen Volumen Wasser verdünntes Pferdeblutserum Kohlensäure eingeleitet, die Trübung (Nucleoproteid und Globulin) nach Absitzen und Entfernen der überstehenden Flüssigkeit durch Zentrifugieren abgeschieden und mit etwa der 5fachen Menge 1 proz. Kochsalzlösung vorsichtig übergossen. Nach 6 Stunden wird die Salzlösung, welche das Globulin gelöst hat, abgegossen, der schleimige fadenziehende Bodensatz in 1 proz. Kochsalzlösung unter Zusatz einer Spur Natriumcarbonat gelöst und die Lösung mit wenig verdünnter Essigsäure ausgefällt. Der Niederschlag wird filtriert, mit Alkohol, Äther, Chloroform gereinigt. C 51,85, H 7,24, N 14,03, P 0,083, Asche 0,34%. In Wasser unlöslich, ebenso in 1 proz. Kochsalzlösung, in Sodalösung und Natronlauge löslich. Durch Behandlung mit Alkohol verliert es diese Löslichkeit. Aus seiner schwach alkalischen Lösung wird es durch Ammonsulfat bei 38–44% Sättigung und durch Sättigung mit Magnesiumsulfat ausgefällt, ebenso durch Essigsäure. In überschüssiger Essigsäure löst es sich, aber viel schwerer als Globulin. Pekelharing trennt es auf diese Weise vom Globulin. Es wird auch durch Calciumchlorid gefällt, im Überschub löst es sich wieder auf. Durch Calciumchlorid kann es auch aus Blutserum ausgefällt werden, am besten bei einem Gehalt von 0,1% CaCl<sub>2</sub> (Huiskamp).

443. Als Nucleine sind früher Substanzen beschrieben worden, die man als Nucleine. erste Spaltungsprodukte der Nucleoproteide angesehen hat. Es sollte ein Teil des Eiweißes aus dem Nucleoproteid abgespalten werden und ein phosphorreicherer Körper zurückbleiben. Nun werden selbstverständlich die Eiweißkörper der  $\alpha$ -Nucleoproteide teilweise beim Erhitzen denaturiert, es kann sich koaguliertes Eiweiß abscheiden. Es richtet sich dies ganz nach der Art und Menge der Eiweißkomponente in der nucleinsäuren Eiweißverbindung. Ferner sollte man durch Verdauung mit Pepsinsalzsäure zu einem phosphorreichereren „Nuclein“ kommen. Aber durch die Einwirkung der Salzsäure, besonders bei Brutschranktemperatur, wird nicht allein das Eiweiß verändert, sondern es werden auch aus der Nucleinsäure Alloxurbasen abgespalten<sup>5)</sup>. Dann wird natürlich das Reaktionsprodukt auch phosphorreicher. Den Begriff „Nuclein“ läßt man am besten ganz fallen. Angaben über Eigenschaften und Darstellung solcher „Nucleine“ finden sich bei Milroy<sup>6)</sup>, Umber<sup>7)</sup>, Giertz<sup>8)</sup>.

### Phosphorproteide.

(Bearbeitet von H. Steudel-Berlin.)

444. Die Phosphorproteide haben, ähnlich wie die Nucleoproteide, Phosphorsäure als Bestandteil ihres Moleküls. Die Ähnlichkeit ist aber nur eine ganz äußerliche, denn während der Phosphor in den Nucleoproteiden als Bestandteil einer Nucleinsäure auftritt, ist er in den Phosphorproteiden wahrscheinlich einfache Phosphorsäure, die mit dem Aminosäureskelett verknüpft ist. Die Körper wurden früher als Paranucleoproteide (Nucleoalbumine) bezeichnet; diese Benennung läßt man aber zweckmäßig fallen, denn mit dem Zellkern stehen die Substanzen in gar keiner Beziehung.

Sie finden sich besonders als Bestandteile der Nahrung wachsender Organismen (Milch, Eidotter, Pflanzensamen), aber auch in Sekreten und vielleicht überhaupt in weiter Verbreitung in den Zellen.

<sup>1)</sup> Untersuchungen über das Fibrinferment. Amsterdam 1892. S. 7.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 32, S. 190. 1901.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 36, S. 422. 1902.

<sup>4)</sup> Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 8, S. 439. 1906.

<sup>5)</sup> Nakagawa: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 124, S. 274. 1923.

<sup>6)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 22, S. 307. 1897.

<sup>7)</sup> Zeitschr. f. klin. Med. Bd. 43, S. 282. 1901.

<sup>8)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 28, S. 115. 1899.

**Eigenschaften.** Sie sind Säuren, unlöslich in Wasser, dagegen löslich in Alkalien und durch Säure wieder fällbar. Sie bilden mit Alkalien Salze; die neutralen Lösungen koagulieren in der Hitze nicht.

Bei der Einwirkung von Pepsinsalzsäure kommt es meist zur Abscheidung von sog. Pseudonuclein (Paranuclein), die aber bei Benutzung von gut wirkenden Pepsinpräparaten auch gänzlich ausbleiben kann (Salkowski<sup>1</sup>), Wróblewski<sup>2</sup>). Aus mehreren Phosphorproteiden sind auch phosphorhaltige Säuren, die von den Nucleinsäuren sehr verschieden sind, auch noch Biuret- und andere Farbenreaktionen geben (Paranucleinsäuren), erhalten worden.

Durch Einwirkung von Natronlauge wird der Phosphor als Phosphorsäure vollständig abgespalten.

Durch Behandlung mit Phosphoroxychlorid kann man Phosphorsäure in Eiweißstoffe einführen, man erhält Substanzen, die sich ähnlich wie die Phosphorproteide verhalten (Neuberg<sup>3</sup>).

Zu den Phosphorproteiden gehören das Casein, Vitellin und die Ichthuline.

**Vorkommen.** 445. Casein wurde bisher nur in der Milch nachgewiesen; die caseinähnlichen Stoffe im Hauttalg (Hoppe - Seyler), in der Bürzeldrüse der Vögel (de Jonge<sup>4</sup>), im Kropf der Tauben nach Auskriechen der Jungen aus den Eiern (Cl. Bernard<sup>5</sup>) bedürfen weiterer Untersuchung.

**Darstellung:** Zur Darstellung aus Kuh- oder Ziegenmilch versetzt man die mit dem aus Kuhmilch 4—10fachen Volumen Wasser verdünnte, abgerahmte Milch vorsichtig mit verdünnter Essigsäure bis zur möglichst guten Ausfällung, reinigt den durch Leinwand filtrierten, käsigen Niederschlag durch wiederholtes Lösen in Wasser mit Hilfe einiger Tropfen Natronlauge und Ausfällen mit Essigsäure, wäscht mit Wasser, mit Alkohol und Äther, extrahiert im Soxhletapparat und trocknet (Hoppe - Seyler). Andere Methoden siehe bei Bleyer und Seidl<sup>6</sup>).

**aus Frauenmilch.** Für die Darstellung aus Frauenmilch eignet sich diese Methode nicht, weil das Frauencasein durch Essigsäure und Kohlensäure nur unvollkommen gefällt wird. Nach J. Schmidt<sup>7</sup>) gelingt aber die Abscheidung, wenn die Milch-Wassermischung während des Ansäuerns mit Essigsäure und während des halbstündigen Einleitens von Kohlensäure auf 40° gehalten wird. Die begünstigende Wirkung der erhöhten Temperatur ist auch von anderen angegeben worden. Nach Kobrak<sup>8</sup>) erfolgt die Abscheidung auch beim mehrtägigen Dialysieren der mit  $\frac{1}{5}$  Vol.  $\frac{1}{10}$ -Essigsäure versetzten Frauenmilch gegen täglich gewechseltes Chloroformwasser.

Um das Calciumphosphat, welches das Casein immer begleitet, völlig zu entfernen, haben v. Slyke und Bosworth<sup>9</sup>) vorgeschlagen, das Calcium mit Ammoniumoxalat auszufällen. Durch vorsichtigen, fraktionierten Säurezusatz (Normalmilchsäure oder 1 Tl. Salzsäure und 2 Tl. Essigsäure) haben v. Slyke und Baker<sup>10</sup>) ein sehr aschearmes Casein erhalten.

<sup>1</sup>) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 59, S. 225. 1895; Bd. 63, S. 401. 1896. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 27, S. 297. 1899.

<sup>2</sup>) Beiträge zur Kenntnis des Frauencaseins. Inaug.-Diss. Bern 1894.

<sup>3</sup>) Neuberg u. Pollak: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 43, S. 2060. 1910. Biochem. Zeitschr. Bd. 26, S. 529. 1910.

<sup>4</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 3, S. 225. 1879.

<sup>5</sup>) Leçons sur les propriétés physiol. des liquid. Bd. 2, S. 232. 1859.

<sup>6</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 128, S. 48. 1922.

<sup>7</sup>) Malys Jahresber. d. Tierchem. 1884, S. 175.

<sup>8</sup>) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 80, S. 69. 1900.

<sup>9</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 14, S. 203. 1913; Bd. 19, S. 67. 1914.

<sup>10</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 35, S. 127. 1918.

Das Casein der Kuhmilch hat nach Hammarsten<sup>1)</sup>, dessen Arbeiten die Zusammensetzung. Kenntnis des Caseins besonders gefördert haben, ungefähr die Zusammensetzung C 53,0, H 7,0, N 15,7, S 0,8, P 0,7, O 22,8%. Nach K. A. H. Mörner<sup>2)</sup> enthält es 0,064% bleischwärenden Schwefel. Für das Casein der Frauenmilch fand Makris<sup>3)</sup> C 52,35, H 7,27, N 14,65, S + O 25,73% (Phosphor wurde nicht bestimmt), Wróblewski<sup>4)</sup> C 52,24, H 7,32, N 14,97, P 0,68, S 1,12, Asche 1%. Analysen der Caseine verschiedener Tiere finden sich bei Tangl<sup>5)</sup>.

Casein stellt ein weißes, nichthyroskopisches Pulver dar von den Eigenschaften. scharften einer schwachen Säure und schließt sich in seinen Eigenschaften den Alkalialbuminaten an. In Wasser ist es unlöslich, in Alkalien, Alkalicarbonaten, Baryt- und Kalkwasser löst es sich leicht zu den entsprechenden Salzen. Die Lösung in Kalkwasser wird durch vorsichtigen Zusatz verdünnter Phosphorsäure bis zur neutralen Reaktion nicht gefällt. Das Casein bleibt kolloidal gelöst. Ebenso löst es sich in essigsäuren und oxalsäuren Alkalien und auch in Wasser bei Gegenwart von Calciumcarbonat unter Austreibung von Kohlensäure. Die Lösungen, welche klar (Caseinalkalisalze) oder mehr oder weniger opaleszierend (Caseinerdalkalisalze) sind, gerinnen beim Erhitzen nicht. Die Caseinkalklösungen überziehen sich beim Kochen mit einer Haut. Das Casein kann nach v. Slyke und Bosworth und Winter<sup>6)</sup> 4 Reihen von Salzen mit Erdalkalien bilden. Monocalciumcaseinat mit 0,22% Ca ist unlöslich in Wasser, löslich in 5proz. NaCl-Lösung unter Umwandlung in Natriumcaseinat und Chlorcalcium. Ein Salz, das gegen Lackmus neutral reagiert, enthält 1,07% Ca, ein gegen Phenolphthalein neutral reagierendes, basisches Salz enthält 1,78% Ca. Ähnliche Verbindungen sind von Söldner<sup>7)</sup> beschrieben. Die Dissoziation der Caseinate ist von Robertson<sup>8)</sup> untersucht. Durch vorsichtigen Zusatz von Essigsäure oder Salzsäure wird Casein ausgefällt, und zwar das Kuhcasein in Flocken, das Frauencasein mehr gallertartig; Überschuß, besonders der Salzsäure, wirkt wieder lösend. Bei Gegenwart von Chloralkalien bedarf es mehr Essigsäure zur Hervorrufung des Niederschlags. Seine mit Natronlauge hergestellten neutralen Lösungen werden gefällt durch Schwermetallsalze. Durch Sättigen mit reinem Kochsalz werden sie nicht gefällt, wohl aber durch käufliches Kochsalz (wegen der in diesem enthaltenen Calcium und Magnesiumsalze) (Schmidt-Nielsen<sup>9)</sup>). Durch Sättigung mit Magnesiumsulfat und durch Halbsättigung mit Ammonsulfat werden die Lösungen ausgefällt. Die Farbenreaktionen der Eiweißstoffe sind positiv. Millonsche Reaktion sehr stark, Molischsche und Schwefelbleireaktion äußerst schwach, aber deutlich. Nach Röhmann gibt das Frauencasein die Molischsche Probe stark.

Nach v. Slyke und Bosworth<sup>10)</sup> ist das Casein eine achtbasische Säure vom Molekulargewicht 8888 und vom Äquivalentgewicht 1111, was mit den Ergebnissen von Laqueur und Sackur<sup>11)</sup> übereinstimmen würde.

1) Malys Jahresber. d. Tierchem. 1872, S. 118; 1874, S. 135; 1877, S. 158. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 7, S. 227. 1883; Bd. 9, S. 273. 1885; Bd. 22, S. 103. 1897. — Lehrbuch d. physiol. Chem. 9. Aufl. S. 511. 1921.

2) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 34, S. 285. 1902.

3) Diss. Straßburg 1876.

4) Malys Jahresber. d. Tierchem. 1894, S. 211.

5) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 121, S. 534. 1908.

6) Journ. of biol. chem. Bd. 14, S. 227. 1913; Bd. 17, S. 287. 1914.

7) Die Salze der Milch. Landwirtschaftl. Versuchs-Stationen Bd. 35. S. 351. 1888.

8) Journ. of biol. chem. Bd. 5. S. 147. 1908

9) Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 9, S. 311. 1907.

10) Journ. of biol. chem. Bd. 14, S. 227, 231. 1913.

11) Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 3, S. 193. 1903.

Optische Eigen-  
schaften.

Hoppe - Seyler fand für Kuhcasein  $[\alpha]_D$  in neutraler Lösung =  $-80^\circ$ , in schwach alkalischer =  $-75^\circ$ , in stark alkalischer =  $-91^\circ$ . Für sorgfältig gereinigtes Casein fand Long<sup>1)</sup> in 5proz. Lösung, welche gerade soviel Natron enthielt, als zur Lösung nötig war,  $[\alpha]_D = -95,2^\circ$ . Mit zunehmendem Alkali-gehalt stieg die spezifische Drehung.

Nach Dakin und Dudley<sup>2)</sup> kann man Casein durch Behandeln mit  $\frac{1}{2}n$ -NaOH bei  $37^\circ$  racemisieren. Dieses racemisierte Casein wird im Organismus bei der Verfütterung nicht angegriffen.

In dem nach Dakin racemisierten Casein aus Kuh- und Schafmilch fanden Dudley und Woodman<sup>3)</sup> Unterschiede im optischen Verhalten einiger durch Hydrolyse erhaltener Aminosäuren.

Veränderung  
bei  $100^\circ$ .

Beim Erhitzen auf  $100^\circ$  erleidet das Casein (auch Ziegen- und Frauencasein) eine Veränderung, infolge deren ein Teil in verdünnten Alkalien unlöslich wird (Laqueur und Sackur<sup>4)</sup>). Der lösliche Teil wird von ihnen Isocasein, der unlösliche Caseid genannt.

Umwandlung durch  
Labferment.

Caseinlösungen (ebenso Milch) gerinnen bei neutraler oder schwach saurer Reaktion auf Zusatz von Lab. Diese Gerinnung findet aber nur statt bei Gegenwart löslicher Kalkverbindungen, wie sie in der Milch vorhanden sind. Das Labferment bewirkt wahrscheinlich eine Spaltung des Caseins in das in Wasser schwer lösliche Paracasein (Käse) bis zu 90% und eine in geringer Menge auftretende, leicht lösliche albumoseähnliche Substanz, das Molkeneiweiß (Hammarsten, s. auch Schmidt-Nielsen<sup>5)</sup>, Fuld<sup>6)</sup>, Freid<sup>7)</sup>, in dem Köster<sup>8)</sup> 13,2% N fand. Diese Spaltung erfolgt auch, wenn kein Kalksalz in Lösung ist, aber die Gerinnung tritt erst auf Zusatz eines löslichen Kalksalzes ein (Hammarsten). Das Paracasein verhält sich dem Casein sehr ähnlich, löst aber weniger Calciumphosphat wie dieses und wird durch alle Fällungsmittel leichter gefällt (Loevenhart<sup>9)</sup>, Laqueur<sup>10)</sup>, Schmidt-Nielsen). Frauencasein gerinnt durch Lab nur unvollkommen schleimig oder gar nicht. Nach Bosworth und nach v. Slyke soll das Caseinmolekül in 2 Mol. Paracasein gespalten werden und das Molekulargewicht des Paracaseins soll halb so groß wie das des Caseins sein. Die innere Reibung von Paracaseinlösungen ist geringer (um 20%) als die von Caseinlösungen (Laqueur, Freid).

Nach van Dam<sup>11)</sup> spielen nicht die löslichen Kalksalze die Hauptrolle bei der Gerinnung, sondern es soll die Menge des an Casein gebundenen Kalkes das Ausschlaggebende sein.

Ist das Casein mit starker Säure oder viel Alkali behandelt oder hat es einige Zeit gefällt unter Wasser gestanden, so ist es verändert und gibt mit Lab keine Gerinnung mehr.

Läßt man Lab fortgesetzt auf Casein einwirken, so treten sekundäre Veränderungen auf, wahrscheinlich weil die Labpräparate mit anderen Fermenten verunreinigt sind<sup>12)</sup>.

<sup>1)</sup> Journ. of the Americ. chem. soc. Bd. 27, S. 363. 1905.

<sup>2)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 15, S. 263, 71. 1913.

<sup>3)</sup> Biochem. journ. Bd. 9, S. 97. 1915.

<sup>4)</sup> Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 3, S. 193. 1903. <sup>5)</sup> desgl. Bd. 9, S. 322. 1907.

<sup>6)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 4, S. 488. 1907. <sup>7)</sup> Diss. Breslau 1914.

<sup>8)</sup> Malys Jahresber. d. Tierchem. Bd. 11, S. 14.

<sup>9)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 41, S. 177. 1904.

<sup>10)</sup> Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 7, S. 273. 1906.

<sup>11)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 58, S. 295. 1909.

<sup>12)</sup> Petry: Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 8, S. 339. 1906. — Slowtzoff: desgl. Bd. 9, S. 149. 1907. — Herwerden: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 52, S. 184. 1907. — v. Dam: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 61, S. 147. 1909.

Läßt man Casein in einem sauren Medium gerinnen, so findet eine tiefgreifende Spaltung statt unter Albumosebildung.

Bei der Pepsinsalzsäureverdauung wird das Casein gespalten in sich abscheidendes Paranuclein und in Lösung gehende Albumosen und Peptone<sup>1)</sup>. Der Phosphor befindet sich zum Teil im Paranuclein (es enthält über 2% organisch gebundenen Phosphor), zum Teil in Lösung in Form einer organischen Säure mit 4,05% P, der Paranucleinsäure (S. 546). Unter sehr günstigen Verdauungsbedingungen (1 Tl. Casein auf 500 Tl. Verdauungsflüssigkeit) bleibt gar kein Paranuclein zurück und aller Phosphor findet sich in Lösung (Salkowski<sup>2)</sup>). Eine Abspaltung von Orthophosphorsäure findet dabei nicht statt. Reh<sup>3)</sup> sah bei Benutzung von Pepsin. anglicum von Parke, Davis & Co. im ganzen Verlauf der Verdauung überhaupt keine Trübung auftreten. Aus der Verdauungsflüssigkeit isolierte er mit Hilfe von Uranacetat eine als Polypeptidphosphorsäure (S. 546) bezeichnete Verbindung mit 6,9% P. Das Frauencasein verhält sich wohl ebenso. Nach Kobrak spaltet es Paranuclein ab, nach anderen, z. B. Zaitschek<sup>4)</sup>, nicht.

Umwandlung durch Pepsinsalzsäure.

Bei der Trypsinverdauung geht in 24 Stunden der gesamte Phosphor in Lösung, und zwar zu 35% als Phosphorsäure, zu 65% in organischer Verbindung. Durch aktiven Pankreassaft wird Tyrosin rasch unvollständig abgeschieden, die Glutaminsäure ganz allmählich (Abderhalden und Voegtlin<sup>5)</sup>).

Umwandlung durch Trypsin.

Durch 1proz. Natronlauge geht der Phosphor in 24 Stunden vollständig als Phosphorsäure in Lösung (Plimmer und Bayliss<sup>6)</sup>).

Einwirkung von Natronlauge.

Das Casein besitzt im Unterschied gegen die meisten anderen Eiweißstoffe kein Glykokoll als Baustein seines Moleküls, ebenso fehlt eine Kohlenhydratgruppe, dagegen ist es sehr reich an Tryptophan und an Tyrosin. Die Menge der hydrolytischen Spaltungsprodukte findet man in der Tabelle (§ 500). Über weitere noch ungenügend untersuchte Spaltungsprodukte s. Skraup<sup>7)</sup>. Über die aus der hydrolysierten Flüssigkeit gewonnenen Diketopiperazine und Polypeptide siehe §§ 510, 511, 513. Über das bei mäßiger Hydrolyse entstehende Kyrin s. § 404. Als sekundäre Zersetzungsprodukte scheinen bei der Hydrolyse auch Brenztraubensäure und Propionylameisensäure aufzutreten (Mörner<sup>8)</sup>), ferner Guanidin (Otori<sup>9)</sup>). Stickstoffverteilung im Casein: 1,61% Amid-, 10,31% Monoamino-, 3,49% Diamino-, 0,21% Melaninstickstoff (Osborne und Harris<sup>10)</sup>).

Hydrolyse.

Bei der Oxydation mit Kaliumpermanganat wurde Guanidin erhalten (Otori<sup>9)</sup>), bei der Oxydation mit Salpetersäure Oxalsäure, p-Nitrobenzoesäure, Benzoesäure, Pikrinsäure,  $\alpha$ -Oxyisobuttersäure (C. Th. Mörner<sup>11)</sup>). Über die Einwirkung von Ozon s. Harries und Langheld<sup>12)</sup>, von Bromlauge s. Skraup und Witt<sup>13)</sup>, von salpetriger Säure s. Skraup und Hoernes<sup>14)</sup>).

Oxydation.

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 25, S. 411. 1898.

<sup>2)</sup> Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 59, S. 225. 1895; Bd. 63, S. 401. 1896.

<sup>3)</sup> Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 11, S. 1. 1908.

<sup>4)</sup> Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 104, S. 550. 1904.

<sup>5)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 53, S. 315. 1907.

<sup>6)</sup> Journ. of physiol. Bd. 33, S. 439. 1906.

<sup>7)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 42, S. 274. 1904.

<sup>8)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 42, S. 121. 1904.

<sup>9)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 43, S. 74. 1904/05.

<sup>10)</sup> Journ. of the Americ. chem. soc. Bd. 25, S. 323. 1903.

<sup>11)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 93, S. 175. 1914/15; Bd. 95, S. 263. 1915; Bd. 98, S. 89. 1916/1917.

<sup>12)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 51, S. 342. 1907.

<sup>13)</sup> Monatshefte f. Chem. Bd. 28, S. 605. 1907.

<sup>14)</sup> Monatshefte f. Chem. Bd. 27, S. 631. 1906.

**Paranucleinsäure.** Paranucleinsäure (Salkowski<sup>1</sup>). Zur Isolierung (die genauen Angaben s. in der Originalarbeit) versetzt man die vom Paranuclein abfiltrierte Verdauungsflüssigkeit (S. 545) mit Ferriammonsulfat, erhitzt, filtriert den Niederschlag (Eisenverbindung der Säure) ab, zerlegt ihn in der Wärme mit verdünnter Natronlauge, fällt aus dem mit Essigsäure versetzten Filtrate die Säure mit Kupferacetat, zerlegt diesen Niederschlag mit Schwefelwasserstoff und fällt die eingeeengte Flüssigkeit mit Alkohol. Die so gewonnene Säure, deren Einheitlichkeit indes noch nicht sicher festgestellt ist, stellt ein weißes Pulver dar von der Zusammensetzung C 42,96, H 7,09, N 13,55 P 4,05%, in Wasser löslich, in Alkohol unlöslich. Die wässrige Lösung löst Calciumcarbonat unter Kohlensäureentwicklung. In 1proz. Lösungen rufen Kupferacetat, Bleiessig, Gerbsäure, Phosphorwolframsäure starke, Sublimat, Trichloressigsäure erst bei reichlichem Zusatz geringe Niederschläge hervor; Silbernitrat, Metaphosphorsäure, Essigsäure + Ferrocyankalium bewirken keine Fällung. Eiereiweiß und Pepton-Witte rufen Trübungen hervor.  $[\alpha]_D = -46^\circ$  (ungefähr). Biuretprobe positiv, Xanthoprotein- und Millonsche Probe schwach positiv, Proben von Molisch und Adamkiewicz negativ. Beim Kochen einer 10proz. Lösung mit dem gleichen Volumen gesättigten Barytwassers scheidet sich ein reichlicher, flockiger Niederschlag ab, welcher nicht aus phosphorsaurem Barium besteht; kocht man längere Zeit mit Barytwasser oder kocht man mit starker Natronlauge mehrere Minuten lang, so wird Phosphorsäure abgespalten.

**Polypeptidphosphorsäure.** Polypeptidphosphorsäure (Reh<sup>2</sup>). Zur Isolierung wird die neutralisierte, konzentrierte, filtrierte und mit Essigsäure stark angesäuerte Verdauungsflüssigkeit des Caseins (S. 545) mit Uranylacetat ausgefällt und der Niederschlag, welcher den gesamten Phosphor enthält, durch wiederholtes Umfällen (Lösen in 10proz. Salzsäure, Fällung mit Uranylacetat, Natronlauge und Natriumacetat), bis das Filtrat keine Biuretreaktion mehr gibt, gereinigt. Getrocknet läßt sich die Verbindung zu einem leicht gelben Pulver zerreiben. Mittlere Zusammensetzung: C 24,02, H 4,00, N 7,59, P 4,27, U 33,33%. P : U = 1 : 1. Sie löst sich leicht in Salzsäure, ist fällbar durch Phosphorwolframsäure. Biuret-, Xanthoprotein-, Millonsche Reaktion positiv, Molischsche und Tryptophanreaktion negativ.

Beim halbstündigen Kochen mit Barytwasser entsteht ein voluminöser Niederschlag, welcher den gesamten Phosphor enthält. Stickstoffverteilung: 23,8% Amid-, 56,7% Monamino-, 18,7% Diaminostickstoff. Bei der Hydrolyse wurden Alanin, Aminovaleriansäure, Leucin, Isoleucin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Arginin, Lysin, Histidin, Prolin, Phenylalanin und Tyrosin erhalten, aber nicht in denselben Verhältnissen wie aus dem Casein.

Die Polypeptidphosphorsäure scheint kein einheitlicher Körper zu sein, denn Dietrich<sup>3</sup>) hat aus den nach Reh erhaltenen Produkten 4 verschiedene Kalksalze von Peptoncharakter dargestellt, die er als polypeptidartige Verbindungen mit Phosphorsäure (Caseinphosphorsäure) auf- faßt. Der Phosphorgehalt betrug 10,0, 4,1, 3,84 und 3,88%.

**Opalisin.** Opalisin nennt Wróblewski<sup>4</sup>) einen Stoff, der nach ihm präformiert in der Milch vorhanden ist und aus dem Filtrat der Essigsäurefällung des Caseins durch Aussalzen erhalten werden kann. In Frauenmilch soll es in reichlicher, in Stutenmilch in kleinerer, in Kuhmilch in sehr kleiner Menge vorkommen. Es enthält C 45,0, H 7,3, N 15,1, S 4,7, P 0,8% und ist in Wasser sehr wenig löslich, in Alkalien löslich. Die Lösungen opalescieren und werden weder beim Kochen, noch bei der Dialyse gefällt. Essigsäure fällt es aus, der Niederschlag ist im Überschuß nicht völlig löslich, die Flüssigkeit opalesciert stark und bildet beim Schütteln kleine, klebrige, faserige Flockchen. Es gibt die Farbenreaktionen der Eiweißstoffe, die Schwefelbleiprobe sehr schwach, reduziert nicht nach dem Kochen mit Säuren und spaltet bei der peptischen Verdauung kein Paranuclein ab. Weitere Untersuchung ist notwendig.

**Darstellung und Zusammensetzung.**

**446. Vitellin.** Es findet sich im Hühnereigelb in Verbindung mit Lecithin (§ 547) und läßt sich durch wiederholtes Ausschütteln des mit etwa 10proz. Kochsalzlösung vermischten Eigelbs mit Äther, Dialysieren der wässrigen Lösung oder Eingießen derselben in das 10—20fache Volumen Wasser, Lösen des entstandenen Niederschlags in Salzsäure, mehrfache Wiederholung dieses Verfahrens und schließliches Behandeln des Niederschlags mit Alkohol (evtl. heißem) erhalten (Osborne und Campbell<sup>5</sup>). Die Zusammensetzung (aschefrei berechnet) ist: C 51,24, H 7,16, N 16,38, S 1,03 (bleischwäzender Schwefel S 0,36), P 0,94%, außerdem enthält es Eisen in organischer Bindung. Gross<sup>6</sup>) fand für ein mit

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 32, S. 245. 1901.

<sup>2</sup>) Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 11, S. 1. 1908.

<sup>3</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 22, S. 120. 1909.

<sup>4</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 26, S. 308. 1899.

<sup>5</sup>) Journ. of the Americ. chem. soc. Bd. 22, S. 413. 1900.

<sup>6</sup>) Zur Kenntnis des Ovovitellins. Dissert. Straßburg. Med. Fak. 1899.



Hilfe von Ammoniumsulfatfüllung dargestelltes Vitellin C 48,01, H 6,35, N 15,96, P 0,34, S 0,88, Asche 3,90%.

Bei der Behandlung mit Pepsinsalzsäure entsteht Paranuclein mit Umwandlung: höherem, aber inkonstantem Phosphorgehalt. Levene und Alsberg<sup>1)</sup> erhielten durch Pepsinsalzsäure aus dem Paranucleoproteid durch Spaltung mit Ammoniak eine in Wasser durch Ammoniak unlösliche, in Ammoniak, essigsauren Salzen lösliche Paranucleinsäure (Vitellinsäure), die nicht durch Essigsäure, aber durch Salzsäure gefällt wird, in essigsaurer Lösung mit Albumosen Niederschläge gibt und in Wasser lösliche Alkalisalze, unlösliche Barium-, Kupfer- und Eisensalze bildet. Sie enthält Eisen und 9—10% P, gibt die Biuret- und Millonsche Reaktion und liefert bei der Spaltung Hexonbasen. Säuren mit im ganzen denselben Eigenschaften, aber nur 7—8% P, sind schon früher von Altmann<sup>2)</sup> und Milroy<sup>3)</sup> aus Hämato-gen (§ 477) dargestellt worden.

Bei der hydrolytischen Spaltung des Vitellin\*) wurden erhalten Glyko-Hydrolyse. koll 1,1, Alanin +, Valin 2,4, Leucin 11,0, Asparaginsäure 0,5, Glutaminsäure 12,2, Serin 0, Prolin 3,3, Phenylalanin 2,8, Tyrosin 1,6% (Abderhalden und Hunter<sup>4)</sup>). Hugounenq<sup>5)</sup> und Levene und Alsberg<sup>6)</sup> fanden fast durchgehend niedrigere Werte. Von ihnen wurden auch Arginin, Lysin und Histidin bestimmt.

Vitellin-Lecithinverbindung. Zur Darstellung dieser Substanz<sup>7)</sup>, die früher als Vitellin Vitellin-Lecithin- bezeichnet wurde, wird das mit Äther erschöpfte Eigelb in 10proz. Kochsalzlösung gelöst und die Verbindung. Lösung durch Wasserzusatz gefällt. Die sich abscheidende Verbindung ist eine lockere, welche bei dem Versuch, sie durch Lösen in Salzlösung und Fällen mit Wasser zu reinigen, leicht Spaltung erleidet. Sie ist in ihren Eigenschaften dem Globulin ähnlich, löst sich nicht in Wasser, aber mehr oder weniger vollständig in verdünnten Salzlösungen, ganz schwachen Säuren und in Alkalien, beim Stehen unter Wasser verliert sie ihre Löslichkeit in Salzlösungen allmählich. Ihre möglichst konzentrierte Lösung in 10proz. Kochsalzlösung koaguliert bei 70—80°. Durch Sättigung mit Kochsalz wird sie nicht gefällt. Über die Einwirkung von Pepsin und Trypsin s. Plimmer und Bayliß<sup>8)</sup>. Durch Alkohol wird das Lecithin abgetrennt und gelöst, und es bleibt Vitellin zurück. Diese Verbindung bedarf sehr der weiteren Untersuchung.

447. Hämato-gen. Dieses Paranuclein wurde von Bunge<sup>9)</sup> bei der Einwirkung von Pepsin auf das mit Äther extrahierte und in verdünnter Salzsäure gelöste Eigelb als Abscheidung erhalten. Es stellte nach Auswaschen mit 1 prom. Salzsäure und Wasser, Auskochen mit Alkohol, Behandlung mit Äther, Fällen seiner ammoniakalischen Lösung mit Alkohol usw. eine gelbbraune, leicht pulverisierbare Masse dar von der Zusammensetzung C 42,11, H 6,08, N 14,73, P 5,19, S 0,55, Fe 0,29%. Eine andere Zusammensetzung fanden Hugounenq und Morel<sup>10)</sup>. Die ammoniakalische Lösung zeigt auf Zusatz von etwas Schwefelammonium zunächst keine Färbung, nach einiger Zeit färbt sie sich grün, am folgenden Tag schwarz von Schwefeleisen. Durch Salzsäure wird es langsam, aber um so schneller, je konzentrierter die Säure, gespalten. Biuret- und Millonsche Reaktion positiv.

448. Ichthulin aus Barscheiern<sup>11)</sup>. Aus seiner Verbindung mit Lecithin, die im folgenden Absatz beschrieben wird, gewann Hammarsten das Ichthulin durch Behandlung mit warmem Alkohol und Äther. Es ist in verdünnter Salzsäure unlöslich, hat die Zusammensetzung C 51,73, H 6,93, N 14,78, S 1,15, P 0,74% (auf aschefreie Substanz bezogen) und enthält auch Eisen. Fortgesetzte Alkohol-extraktion erhöht den Kohlenstoff- und erniedrigt den Phosphorgehalt.

\*) Über die Darstellung dieses Präparates liegen keine Angaben vor. Doch handelt es sich vermutlich um ein durch Alkohol von Lecithin befreites Vitellin.

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 31, S. 543. 1901.

<sup>2)</sup> Arch. f. Anat. u. Physiol. (Physiol. Abt.) 1889, S. 524.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 22, S. 325. 1897. <sup>4)</sup> desgl. Bd. 48, S. 505. 1906.

<sup>5)</sup> Journ. de physiol. et de pathol. gén. Bd. 8, S. 209. 1906.

<sup>6)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 2, S. 127. 1906/07.

<sup>7)</sup> Hoppe-Seyler: Medizinisch-chemische Untersuchungen. H. 2. S. 215. 1867. — Th. Weyl: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 1, S. 74. 1877/78.

<sup>8)</sup> Journ. of physiol. Bd. 33, S. 451. 1906.

<sup>9)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 9, S. 49. 1882.

<sup>10)</sup> Journ. de physiol. et de pathol. gén. Bd. 8, S. 391. 1906.

<sup>11)</sup> Hammarsten: Skandinav. Arch. f. Physiol. Bd. 17, S. 113. 1905/06.

Ichthulin-Lecithin-  
verbindung.

Ichthulin - Lecithinverbindung aus Barscheiern. Zu ihrer Darstellung werden die reifen oder unreifen Eier nach Entfernung von Zwischenflüssigkeit und Blut mit der 20fachen Menge Wasser\*) verrührt und mit so viel Salzsäure versetzt, daß der Gehalt 0,05—0,1% beträgt. Die Flüssigkeit wird von dem aus Mucin und Eiresten bestehenden Niederschlag durch Dekantieren und Filtrieren getrennt und mit Natronlauge bis zur ganz schwach sauren Reaktion versetzt, der reichlich entstehende Niederschlag durch Waschen mit Wasser, Lösen in möglichst wenig Alkali oder Säure und Fällen durch Säure oder Alkali und Wiederholung dieses Verfahrens gereinigt.

Sie löst sich nicht in verdünnter Neutralsalzlösung\*\*), leicht in überschüssiger Salzsäure und, wenn auch nicht ganz so leicht, in überschüssiger Essigsäure. Durch Sättigung mit Kochsalz und durch 55 proz. Sättigung mit Ammonsulfat wird sie völlig ausgefällt. Alle Farbenreaktionen der Eiweißstoffe positiv. Beim Kochen mit Säuren tritt keine reduzierende Substanz auf. Aus der salzsauren Lösung scheidet sich nach Zusatz von Pepsin eine reichliche Menge Paranuclein ab, dem das zugleich abgeschiedene Lecithin durch warmen Alkohol und Äther entzogen werden kann.

449. **Ichthulin aus Lachseiern** wurde nach einem, dem von Walter (§ 451) benutzten ähnlichen Verfahren von Noel Paton<sup>1)</sup> isoliert. Es enthielt 0,74% P und Eisen, lieferte beim Kochen mit Säure keine reduzierende Substanz, aber bei der Pepsinverdauung ein Paranuclein.

450. **Ichthulin aus Kabeljaueiern** wurde von Levene<sup>2)</sup> dargestellt durch Schütteln der mit Sand zerriebenen Eier mit 5 proz. Salmiaklösung und Äther, Versetzen der filtrierten wässerigen Flüssigkeit mit der 20fachen Menge Wasser, Abfiltrieren des entstandenen Niederschlags, Wiederholung der Operation (Lösen des Niederschlags in 5 proz. Salmiak, Schütteln mit Äther, Fällen mit Wasser), bis das Wasser keine Biuretreaktion mehr zeigt, Behandeln des Niederschlags mit Alkohol und Äther. C 52,44, H 7,45, N 15,96, S 0,92, P 0,65, Fe + O 22,58%. Die Substanz kann aus ihrer Lösung auch durch Kohlensäure und sehr verdünnte Essigsäure gefällt werden. Sie unterscheidet sich von dem Ichthulin aus Karpfeneiern dadurch, daß sie bei der hydrolytischen Spaltung kein reduzierendes Kohlenhydrat abspaltet, und daß sie bei der Behandlung mit Ammoniak eine Paranucleinsäure (Ichthulinsäure) mit 10,34% P liefert, welche in Zusammensetzung und Verhalten der Vitellinsäure (S. 547) sehr ähnlich ist.

451. **Ichthulin aus Karpfeneiern**, zuerst von Valenciennes und Frémy<sup>3)</sup>, dann in reinem Zustande von Walter<sup>4)</sup> durch Ausfällen des (mit wenig Wasser hergestellten und mit Äther von Fett befreiten) Rogenextraktes mit viel Wasser und Kohlensäure, Abfiltrieren des Niederschlags, Behandeln des Rückstandes mit Alkohol und Äther gewonnen, stellt ein Phosphorprotein dar von der Zusammensetzung C 53,52, H 7,71, N 15,64, S 0,41, P 0,43, Fe 0,10%. Es ist vermutlich in den Eiern als Lecithinverbindung enthalten, welche durch die Behandlung mit Alkohol zerlegt wird. Frisch gefällt, löst es sich in verdünntem Ammoniak oder Natronlauge, in verdünnter Salzsäure oder Essigsäure leicht zu klaren Flüssigkeiten. Verdünnte Salzlösungen bewirken vollständige, aber schwach opaleszierende Lösungen, aus welchen das Ichthulin beim Sättigen mit dem betreffenden Salz mehr oder weniger vollständig abgeschieden wird; auch durch starkes Verdünnen mit Wasser und Einleiten von Kohlensäure wird es aus diesen Lösungen ausgeschieden. Beim längeren Liegen unter Wasser

\*) Durch 5—10 proz. Kochsalzlösung wird die Verbindung auch extrahiert, aus dieser Lösung aber weder durch Dialyse noch durch Verdünnen mit Wasser abgeschieden.

\*\*) Diese Unlöslichkeit ist die Folge einer Denaturierung durch die Salzsäure. Ein unter Vermeidung der Lösung in Salzsäure dargestelltes Präparat zeigt diese Unlöslichkeit nicht, stimmt aber im übrigen ganz mit dem denaturierten überein. Das beschriebene Verfahren empfiehlt sich aber, weil auf diese Weise am besten die Abtrennung des Mucins gelingt.

<sup>1)</sup> Report of investig. on the Life-History of the Salmon. Glasgow 1898. Nach Hammarsten: Skandinav. Arch. f. Physiol. Bd. 17, S. 113. 1905/06.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 32, S. 281. 1901.

<sup>3)</sup> Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 38, S. 471ff. 1854. — Gobley: Journ. de pharmacie et de chim. [34], Bd. 17, 2, S. 10. 1850.

<sup>4)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 15, S. 477. 1891.

verliert es seine Löslichkeit in Salzlösungen. Bei der Verdauung mit Pepsinsalzsäure zerfällt es in Eiweißstoff, einen noch nicht näher bekannten phosphorhaltigen Körper und Paranuclein. Nach dem Kochen mit Säuren reduziert die Flüssigkeit Fehlingsche Lösung.

**452. Ichthulin aus Heringseiern**<sup>1)</sup>. Aus reifen Heringseiern läßt sich ein Ichthulin gewinnen, indem man die Eier mit einer verdünnten Natronlauge auszieht und das Filtrat mit Salzsäure ausfällt. Zusammensetzung C 52,39, H 7,58, N 14,09, P 0,014, S 0,891%; kein Eisen. Eine reduzierende Gruppe ließ sich in ihm nicht nachweisen. Bei der Hexonbasenbestimmung wurden 1,28% Histidin, 6,33% Arginin und 7,40% Lysin gefunden. Der Körper steht dem Vitellin sehr nahe. Aus den Eischalen<sup>2)</sup> läßt sich eine Substanz von fast der gleichen Zusammensetzung gewinnen: C 51,52, H 7,79, N 14,20, P 0,07, S 0,55%. Hexonbasengehalt: 2,09% Histidin, 6,35% Arginin, 5,55% Lysin.

**Ichthulin aus Eiern von *Torpedo marmorata***<sup>3)</sup>. Die in den Eiern enthaltenen Eiweißkrystalle, welche bereits ihre Löslichkeit in Neutralsalzlösungen verloren hatten, wurden durch Behandeln mit Wasser von allen geformten Bestandteilen befreit und durch Behandlung mit Alkohol und Äther von einem gelblichen Öl (offenbar Lecithin, mit dem das Ichthulin in Verbindung gewesen war).

Es enthielt Phosphor und Eisen in der Asche. Alle Farbenreaktionen der Eiweißstoffe positiv. Beim Kochen mit Säuren entstand reduzierende Substanz. Angaben über Stickstoffverteilung in der Originalarbeit.

Von Hugouenq<sup>4)</sup> aus den Eiern gesalzener Heringe und von Galimard<sup>5)</sup> aus Froscheiern isolierte und als Clupeovin und Ranovin beschriebene Substanzen gehören nicht hierher, sofern Clupeovin. Ranovin. sich die Angabe, daß sie weder Phosphor noch Eisen enthalten, bestätigen sollte.

**453.** Von einer Reihe anderer mehr oder weniger gut untersuchter phosphorhaltiger und bei der Einwirkung von Pepsinsalzsäure eine Abscheidung gebender Stoffe läßt sich nicht sagen, ob sie zu den Nucleo- oder den Phosphorproteiden gehören, da Angaben darüber fehlen, ob bei der Spaltung Nucleinbasen entstehen oder nicht. Dazu gehören von Halliburton aus Niere, Leber, Gehirn, Knochenmark usw. durch Fällung der Wasserauszüge mit Essigsäure isolierte Körper, ferner eine von Hammarsten<sup>6)</sup> aus pathologischer Synovia erhaltene mucinähnliche Substanz und ferner Stoffe, welche Lönnberg<sup>7)</sup> aus Nierengewebe und Blasenschleimhaut dargestellt und analysiert hat, sowie von Paijkull<sup>8)</sup> in entzündlichen Transsudaten gefundene Verbindungen. Hierher gehört auch das

**Nucleoalbumin aus Rindergalle.** Es wird durch Fällen der filtrierten Rindergalle mit dem 5fachen Volumen absoluten Alkohols, schnelles Zentrifugieren, Lösen des Bodensatzes in Wasser und mehrfache Wiederholung dieses Verfahrens als Alkaliverbindung erhalten. Durch Fällen seiner wässerigen Lösung mit Essigsäure gewinnt man das Nucleoalbumin (Paijkull<sup>9)</sup>). Aus der Gallenblasenschleimhaut läßt sich derselbe Körper darstellen. Darstellung.

Es hat die Zusammensetzung C 50,89, H 6,7, N 16,14, S 1,66%. Phosphor Eigenschaften. war vorhanden, wurde aber nicht bestimmt. Es löst sich mit Hilfe von möglichst wenig Alkali zu einer schleimigen, fadenziehenden Flüssigkeit, die beim Kochen

<sup>1)</sup> H. Steudel u. E. Takahashi: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 127, S. 210. 1923.

<sup>2)</sup> H. Steudel u. S. Osato: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 127, S. 220. 1923.

<sup>3)</sup> Rothera: Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 5, S. 447. 1904.

<sup>4)</sup> Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 138, S. 1062. 1904; Bd. 143, S. 693. 1906.

<sup>5)</sup> Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 138, S. 1354. 1904.

<sup>6)</sup> Malys Jahresber. d. Tierchem. 1882, S. 480. <sup>7)</sup> desgl. 1890, S. 11.

<sup>8)</sup> Malys Jahresber. d. Tierchem. 1892, S. 558.

<sup>9)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 12, S. 196. 1888.

nicht koaguliert, wohl aber nach Zusatz einer Spur Essigsäure. Essigsäure ruft einen im Überschuß löslichen Niederschlag hervor, desgleichen Salzsäure. Die saure Flüssigkeit wird durch Ferrocyankalium und Sublimat gefällt. Schwermetallsalze rufen in neutralen Lösungen Niederschläge hervor. Pepsinsalzsäure scheidet ein Parannuclein ab. Beim Kochen mit Säure tritt keine reduzierende Substanz auf.

Ein solches Nucleoalbumin ist auch im Sekret der menschlichen Gallenblasenschleimhaut nachgewiesen worden (Wahlgren<sup>1</sup>). Ferner findet sich ein Körper von denselben Eigenschaften, welcher höchstens mit Spuren von Mucin verunreinigt war, in der Blasengalle des Moschusochsen (Hammarsten<sup>2</sup>). Auch die Schleimsubstanz der Blasengalle von Hund, Schaf, Eisbär, Walroß, Nilpferd, Fischen dürfte in der Hauptsache Nucleoalbumin sein. Sie liefert jedenfalls so kleine Mengen reduzierender Stoffe, daß ihre Hauptmasse nicht aus echtem Mucin bestehen kann (Hammarsten<sup>3</sup>).

454. **Nucleone** nennt Siegfried<sup>4</sup>) phosphorhaltige Substanzen, die er aus Fleisch und Milch in Form ihrer Eisenverbindungen isolierte.

Der enteweißte Muskelauszug bzw. Fleischextraktlösung oder von Eiweiß befreite Milch wird durch Chlorcalcium und Ammoniak von Phosphaten befreit und dann in der Hitze mit Eisenchlorid (unter Abstumpfen der sauren Reaktion bis zur schwach sauren mit Ammoniak) so lange versetzt, bis eine filtrierte Probe nach stärkerem Ansäuern eine schwache Eisenreaktion gibt.

Der abgesaugte, mit Wasser, Alkohol und Äther gewaschene Niederschlag, Carniferrin, enthält gegen 30% Fe und 2% P. Es stellt die Eisenverbindung des Nucleons dar, ist in Alkalien löslich und gibt keine Eisenreaktion. Eine Darstellung des Nucleons ist nicht gelungen, da die Entfernung des Eisens ohne gleichzeitige Phosphorsäureabspaltung sich nicht ausführen ließ.

Bei der Spaltung des Nucleons aus Fleisch, das von Siegfried Phosphorfleischsäure genannt wird, entstehen nach Siegfried Fleischsäure, Kohlensäure, Phosphorsäure, Bernsteinsäure, Milchsäure und eine Kohlenhydratgruppe. Nach Osborne und Wakeman<sup>5</sup>) ist das Nucleon aus Milch wahrscheinlich eine Mischung von unkoagulablem Eiweiß und einer noch undefinierten organischen Substanz, welche bei der Hydrolyse Phosphorsäure gibt.

### Glucoproteide.

(Bearbeitet von H. Steudel-Berlin.)

455. Die **Glucoproteide** gehören zu den zusammengesetzten Eiweißkörpern, sie sind Verbindungen von Eiweißstoffen mit einem Kohlenhydrat oder einer Gruppe, an deren Aufbau Kohlenhydrate beteiligt sind. Sie enthalten weniger Stickstoff und Kohlenstoff, dagegen mehr Sauerstoff und Schwefel als die einfachen Eiweißstoffe und reduzieren nach dem Kochen mit Säuren beim Erhitzen Kupferoxyd in alkalischer Lösung.

Sie reagieren sauer und bilden mit Alkalien in Wasser leicht lösliche Verbindungen. Die Farbenreaktionen der Eiweißstoffe fallen, soweit bekannt, positiv aus. Nach vorausgegangenem Erwärmen mit ein wenig Alkalilauge oder Barytwasser geben sie auf Zusatz einer salzsauren Lösung von p-Dimethylaminobenzaldehyd bis zur deutlich sauren Reaktion Rotfärbung, namentlich beim Erhitzen (Ehrlich<sup>6</sup>).

Die prosthetische (Kohlenhydrat enthaltende) Gruppe ist, soweit die Untersuchungen reichen, entweder die glucosaminhaltige Mucoitinschwefelsäure (§ 257) oder die chondrosaminhaltige Chondroitinschwefelsäure (§ 257). Für manche

<sup>1</sup>) Malys Jahresber. d. Tierchem. 1902, S. 508.

<sup>2</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 43, S. 109. 1904/05.

<sup>3</sup>) Ergebn. d. Physiol. Bd. 4, S. 6. 1903.

<sup>4</sup>) Arch. f. Anat. u. Physiol. (Physiol. Abt.) 1894, S. 401. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 21, S. 360. 1896; Bd. 28, S. 524. 1899. — Krüger: desgl. Bd. 22, S. 95. 1897. — Balke: desgl. Bd. 22, S. 248. 1897. — Kutscher u. Steudel: desgl. Bd. 39, S. 375. 1903.

<sup>5</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 33, S. 7. 1918.

<sup>6</sup>) Zeitschr. f. Biol. Bd. 42, S. 562. 1901.

Glucoproteide ist aber bisher nur festgestellt, daß sie bei der Hydrolyse Glucosamin liefern, für andere ist die Natur des dabei auftretenden Kohlenhydrats überhaupt noch nicht ermittelt. Sie sollen daraufhin eingeteilt werden in Mucoitinschwefelsäure bzw. Glucosamin enthaltende, in Chondroitinschwefelsäure enthaltende und in solche, über deren Kohlenhydratgruppe noch nichts bekannt ist.

Das Ovalbumin (§ 329), das bei der Hydrolyse bis zu 10–11% Glucosamin ergeben kann, wird im allgemeinen nicht zu den Glucoproteiden gerechnet, weil es sich in seinem ganzen Verhalten wesentlich von ihnen unterscheidet und es noch unsicher ist, ob es in reinem Zustande überhaupt Glucosamin enthält.

#### Mucoitinschwefelsäure bzw. Glucosamin enthaltende Glucoproteide.

**456. Mucin der Submaxillardrüse (Hammarsten<sup>1</sup>).** Zu seiner Darstellung extrahiert man die fein zerkleinerte Drüse mit Wasser und versetzt das Filtrat vorsichtig mit soviel starker Salzsäure, daß die Mischung 1,5<sup>0</sup>/<sub>00</sub> Salzsäure enthält. Das hierbei zunächst gefällte Mucin löst sich beim Umrühren wieder auf, wird dann aber auf baldigen Zusatz von 2–3 Vol. Wasser gefällt. Es wird durch Abgießen oder Filtration abgetrennt, wieder in 1,5 prom. Salzsäure gelöst und durch Wasserzusatz gefällt, mit Wasser gut gewaschen, mit Alkohol und Äther behandelt und getrocknet.

Weißliches Pulver von saurer Reaktion und der Zusammensetzung C 48,84, H 6,80, N 12,32, S 0,84%. Es löst sich nicht in Wasser, aber wohl auf Zusatz einer Spur Alkali unter Bildung von Salz zu schleimiger Flüssigkeit. Diese Lösungen koagulieren nicht beim Kochen, geben auf Zusatz von Essigsäure einen in überschüssiger Essigsäure unlöslichen, zähen, gallertig-schleimigen Niederschlag und werden auch durch Salze der Schwermetalle, bei Anwesenheit von Neutralsalzen auch durch Alkohol gefällt. Enthalten die Lösungen Kochsalz oder andere Neutralsalze, so ruft wenig Essigsäure keinen Niederschlag hervor. Solche sauren Lösungen werden durch Ferrocyankalium nicht, aber durch Gerbsäure gefällt. Die Farbenreaktionen der Eiweißstoffe fallen positiv aus, ebenso die Aldehydreaktion von Ehrlich (S. 550).

Zusammensetzung  
u. Eigenschaften.

Durch Magen- und Pankreassaft wird es schnell und fast vollständig gelöst und verdaut. Bei der peptischen Verdauung reduziert die Flüssigkeit gar nicht, bei der tryptischen wenig (Fr. Müller).

Verhalten zu Pepsin  
und Trypsin.

Durch verdünnte Alkalien (auch durch Kalkwasser) wird es leicht gespalten. Beim mehrstündigen Erhitzen der neutralen Lösung auf 110–150° entsteht eine Mucinalbumose neben Spuren einer reduzierenden Substanz (Folin<sup>2</sup>).

Verhalten zu  
Alkalien.

Bei der hydrolytischen Spaltung (3stündiges Kochen mit 3 proz. Salzsäure) werden über 20% reduzierende Substanz (als Traubenzucker berechnet) und Essigsäure gebildet; Furfurol und Lävulinsäure ließen sich nicht nachweisen (Fr. Müller<sup>3</sup>). Aus der Reaktionsflüssigkeit wurde mit Hilfe des Benzoylverfahrens und Spaltung der Benzoyl-ester mit Säure Glucosamin erhalten (Fr. Müller). Mit Hilfe des Phenylisocyanatverfahrens gelang die Isolierung nicht (Stuedel<sup>4</sup>). Bei der Hydrolyse mit starken Säuren entstehen Aminosäuren (aber wie es scheint kein Histidin und wenig Diaminosäuren).

Hydrolyse.

Nach Schmiedeberg kann man aus ihm einen Kohlenhydratkomplex, das Hyaloidin<sup>5</sup>) (§ 121), gewinnen.

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 12, S. 163. 1888. — Levene: desgl. Bd. 31, S. 395. 1901.

<sup>2</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 23, S. 347. 1897.

<sup>3</sup>) Zeitschr. f. Biol. Bd. 42, S. 468. 1901.

<sup>4</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 34, S. 375. 1901/02.

<sup>5</sup>) Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 87, S. 1. 1920.

**457. Mucin der Schleimhaut der Luftwege.** Zur Darstellung wird nach Fr. Müller<sup>1)</sup> glasiges, rein schleimiges und von Eiter und Speiseresten freies Sputum in Alkohol eingetragen und geschüttelt. Das Mucin wird dabei feinfaserig und bleibt beim Kolieren durch ein grobes Tuch auf diesem, während zellige Elemente und feinkrümeliges Eiweiß hindurchgehen. Durch Schütteln mit 0,5 proz. Salzsäure, sehr verdünnter Sodalösung und wiederum 0,5 proz. Salzsäure läßt es sich von Eiweiß und Nucleinsubstanzen befreien. Es wird dann in möglichst dünner Natronlauge gelöst, die Lösung filtriert, zentrifugiert, mit Essigsäure angesäuert und mit Alkohol gefällt.

Zusammensetzung  
u. Eigenschaften.

Zusammensetzung C 48,26, H 6,91, N 10,7, S ungefähr 1,4%. Die wässrige Lösung ist opaleszierend, reagiert sauer und wird auf Zusatz von etwas Alkali klar. In 0,1 proz. Salzsäure ist es nur sehr wenig löslich. Die Ausfällung durch Säure wird erst nach Zusatz von Alkohol vollständig. Sättigen mit Magnesiumsulfat ruft nur Trübung, Sättigung mit Ammonsulfat flockigen Niederschlag hervor, Bleiacetat bewirkt nur schwache Opalescenz. Die Aldehydreaktion von Ehrlich ist positiv (S. 550).

Hydrolyse.

Gegen sehr verdünnte Alkalien ist es nicht sehr empfindlich. Bei der hydrolytischen Spaltung (3stündiges Kochen mit 3 proz. Salzsäure) entsteht 30—35% reduzierende Substanz (als Traubenzucker berechnet), ferner Essigsäure. Aus der Lösung ließ sich Glucosamin darstellen (Fr. Müller).

Echtes Mucin findet sich auch in der Menschengalle (neben Nucleoalbumin), wahrscheinlich als Sekret der Schleimhaut der Gallenwege, ist aber noch nicht rein dargestellt worden (Hammarsten<sup>2)</sup>, Brauer<sup>3)</sup>.

**Mucin der Magenschleimhaut.** Aus ihm konnte Levene<sup>4)</sup> Mucoitinschwefelsäure darstellen.

**Mucin des Nabelstrangs** (Jernström<sup>5)</sup> wurde durch Fällen des Kaltwasserauszugs zerkleinerter menschlicher Nabelstränge mit Essigsäure, Lösen des Niederschlags in Kalkwasser, Fällung mit Essigsäure und Behandeln mit Wasser, Alkohol und Äther dargestellt. In 1—2 prom. Salzsäure löslich. Von Levene wurde aus ihm Mucoitinschwefelsäure gewonnen<sup>6)</sup>.

Darstellung.

**458. Pseudomucin (Metalbumin\*)** findet sich in den Ovarialcysten und läßt sich nach Hammarsten<sup>7)</sup> aus solchen Ovarialflüssigkeiten, die weißlich, sehr zähe und schleimig sind, durch Fällen mit Alkohol als faseriges, sich um den Glasstab windendes Gerinnsel ausfällen. Das Gerinnsel wird unter Alkohol fein zerrieben, durch Äther von Alkohol befreit und in Wasser gelöst. Die Lösung wird wieder mit Alkohol gefällt.

Zusammensetzung  
u. Eigenschaften.

Leichtes, weißes Pulver. C 49,44—50,05, H 6,84—7,11, N 10,26—10,30, S 1,25% (auf aschefreie Substanz berechnet); Asche 1,1—1,4%. Es löst sich in Wasser zu opaleszierender, schleimiger Flüssigkeit, in der Essigsäure Trübung, aber keine gute Fällung hervorruft. Mit Gerbsäure, Ferrocyankalium + Essigsäure, Salpetersäure entstehen dickflüssige Fällungen, mit basischem Bleiacetat entsteht flockiger, im Überschuß des Fällungsmittels löslicher Niederschlag. Die S. 550 erwähnte Aldehydreaktion von Ehrlich positiv.

Über aus ihm dargestelltes Hyaloidin siehe § 121.

Reduktions-  
vermögen.

Beim längeren Kochen mit Fehlingscher Lösung oder bei Anwendung von konzentrierter Lauge erfolgt Reduktion von Kupferoxyd

\*) Das Metalbumin von Scherer ist mit dem Pseudomucin identisch, sein Paralbumin dagegen ein Gemenge von Pseudomucin und Eiweißstoffen. Verhandl. d. phys.-med. Ges. in Würzburg Bd. 2, S. 214. 1852. Sitzungsber. dieser Ges. 1864/65.

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. Biol. Bd. 42, S. 468. 1901.

<sup>2)</sup> Malys Jahresber. d. Tierchem. 1893, S. 331.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 40, S. 201. 1903/04.

<sup>4)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 25, S. 511. 1916; Bd. 36, S. 105. 1919.

<sup>5)</sup> Malys Jahresber. d. Tierchem. 1880, S. 34.

<sup>6)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 26, S. 372. 1916; Bd. 36, S. 105. 1919.

<sup>7)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 6, S. 194. 1882.

(Hammarsten<sup>1</sup>). Diese ist aber nach vorausgegangenem Kochen mit Säure viel stärker.

Nach 3stündigem Kochen mit 3proz. Salzsäure wurde von Zängerle<sup>2</sup>) ungefähr 30% reduzierendes Kohlenhydrat (auf Traubenzucker bezogen) erhalten. Verschiedene Präparate lieferten sehr wechselnde Mengen. Aus dieser Flüssigkeit wurde mittels des Benzoylverfahrens Glucosamin erhalten (Zängerle<sup>2</sup>). Nach Neuberg und Heymann<sup>3</sup>) ist Glucosamin das einzige Kohlenhydrat, welches bei der Spaltung entsteht.

Unter den Produkten der Hydrolyse mit Schwefelsäure wurde außer Aminosäuren und Diaminosäuren, Ammoniak, Melaninsubstanzen auch Lävulinsäure nachgewiesen. Über die Mengen und über die Verschiedenheiten im Auftreten der Spaltungsprodukte bei Benutzung von Schwefel- und Salzsäure s. Otori<sup>4</sup>).

Bei der Oxydation mit Permanganat treten Guanidin und andere nicht-identifizierte Substanzen auf (Otori<sup>5</sup>).

459. **Paramucin** wurde von Mitjukoff<sup>6</sup>) eine Substanz genannt, die sich in manchen Ovarialcysten als feste, zitternde, hellgelbe und in Wasser unlösliche Gallerte findet. Die durch Behandeln mit salzsäurehaltigem Wasser zum Schrumpfen gebrachte, mit salzsäurehaltigem Alkohol, Alkohol und Äther behandelte Masse kann als weißes Pulver erhalten werden.

Zusammensetzung C 51,76, H 7,76, N 10,70, S 1,09%. Es ist in Wasser unlöslich, quillt in Alkali zunächst gallertig und löst sich im Überschuß. Die Lösungen verhalten sich ähnlich wie Mucinlösungen. Der durch Essigsäure hervorgerufene Niederschlag löst sich aber im Überschuß, ferner reduziert eine alkalische Lösung beim Erwärmen Kupferoxyd. Durch Einwirkung von Alkohol und Salzsäure, desgleichen durch die Verdauung verliert die Substanz diese letztere Eigenschaft, gewinnt sie aber nach dem Kochen mit Säure wieder (Leathes<sup>7</sup>). Farbenreaktionen der Eiweißstoffe positiv.

Durch 1—2stündiges Kochen mit 3proz. Salzsäure oder Schwefelsäure wurden ungefähr 10% reduzierendes Kohlenhydrat (auf Traubenzucker berechnet) erhalten. In dieser Lösung ließ sich mit Hilfe des Phenylisocyanatverfahrens kein Glucosamin nachweisen, wohl aber nachdem die in der Lösung enthaltene reduzierende Substanz mit konzentrierter Salzsäure 3 Stunden auf 110° erhitzt worden war (Steudel<sup>8</sup>). Bei der Hydrolyse mit Säure entsteht keine Lävulinsäure (Panzer<sup>9</sup>).

Unter den Stoffen, die bei der Hydrolyse mit starker Salzsäure entstehen, ließen sich nachweisen (außer Glucosamin) Alanin, Leucin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Prolin, Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan, Spuren von Diaminosäure, kein Glykokoll (Pregl<sup>10</sup>).

Über das Paramucosin, welches Leathes aus dem Paramucin darstellte, s. S. 147.

<sup>1</sup>) Lehrbuch der physiologischen Chemie. 9. Aufl. 1921. S. 494.

<sup>2</sup>) Münch. med. Wochenschr. 1900, S. 414.

<sup>3</sup>) Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 2, S. 201. 1902.

<sup>4</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 42, S. 453. 1904; Bd. 43, S. 74. 1904/05.

<sup>5</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 43, S. 86. 1904/05.

<sup>6</sup>) Arch. f. Gynäkol. Bd. 49, S. 278. 1895. — Panzer: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 28, S. 363. 1899.

<sup>7</sup>) Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 43, S. 245. 1900.

<sup>8</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 34, S. 383. 1901/02.

<sup>9</sup>) Arch. f. Gynäkol. Bd. 49, S. 278. 1895. — Panzer: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 28, S. 363. 1899.

<sup>10</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 58, S. 229. 1908/09.

**Darstellung.** 460. **Ovomuroid.** Entfernt man aus einer Hühnereiweißlösung die Eiweißkörper durch Kochen unter Essigsäurezusatz, so läßt sich aus dem eiweißfreien Filtrate durch Sättigen mit Ammonsulfat oder nach mäßiger Konzentration durch Fällen mit Alkohol das Ovomuroid (Neumeisters Pseudopepton) abscheiden (Neumeister<sup>1)</sup>, C. Th. Mörner<sup>2)</sup>, Salkowski<sup>3)</sup>).

**Zusammensetzung u. Eigenschaften.** Die aschefreie Substanz enthält nach Mörner N 12,65, S 2,20%, nach Zanetti<sup>4)</sup> C 48,85, H 6,92, N 12,46, S 2,22%. Dieselben Werte erhielten Osborne und Campbell<sup>5)</sup> sowie Langstein<sup>6)</sup>. Es ist in Wasser löslich. Beim Eindampfen der Lösung in der Wärme scheiden sich durchsichtige Häute ab und beim weiteren Eindampfen erstarrt die Masse zu einer durchsichtigen und beim Eintrocknen durchsichtige, gelbe Lamellen bildenden Gallerte. Häute, Gallerte und Lamellen haben ihre Löslichkeit in kaltem Wasser verloren, lösen sich aber in kochendem Wasser, und die so erhaltene Lösung unterscheidet sich durch nichts von der ursprünglichen. Die wässrige Lösung wird weder durch Essigsäure noch durch die gewöhnlichen Eiweißfällungsmittel gefällt, nur Phosphorwolframsäure, Gerbsäure, Bleiessig und Ammoniak, Sättigen mit Ammonsulfat rufen Fällungen hervor. Von den Farbenreaktionen fällt die Adamkiewiczische negativ aus. Langstein fand indessen positiven Ausfall, und Willanen<sup>7)</sup> schwach positiven. Die Aldehydreaktion von Ehrlich (S. 550) positiv.  $[\alpha]_D = -61-61,4^\circ$ .

**Verhalten zu Fermenten.** Bei der Digestion mit Pepsinsalzsäure (in geringerem Grade auch schon bei der Digestion mit Salzsäure allein) wird reduzierende Substanz abgespalten, bei der Digestion mit Trypsin nicht (Willanen).

Über aus ihm gewonnenes Hyaloidin siehe § 121.

**Hydrolyse.** Bei der hydrolytischen Spaltung entsteht Glucosamin (Zanetti). Bei 1stündigem Kochen mit 3proz. Salzsäure wird das Maximum des Reduktionsvermögens erhalten (Seemann<sup>8)</sup>). Seemann erhielt ungefähr 35% (auf Traubenzucker berechnet), Willanen (auch bei längerem Kochen) nur ungefähr 22%. Aus der Lösung konnte Seemann mit Hilfe des Benzoylverfahrens (Verseifung der Benzoylverbindung mit Salzsäure) Glucosamin isolieren, Steudel<sup>9)</sup> mit Hilfe der Phenylcyanatmethode nicht; Oswald<sup>10)</sup> gelang es durch Dialyse.

Von Aminosäuren wurden aus der hydrolytischen Spaltungsflüssigkeit isoliert: Leucin 4%, Asparaginsäure 1,8%, Glutaminsäure 2%, Prolin 2,4%, Phenylalanin 4% (Abderhalden<sup>11)</sup>).

**Darstellung.** 461. **Muroid aus Blutserum** wurde von Zanetti<sup>12)</sup> aus Serum nach Entfernung der koagulablen Eiweißstoffe durch Alkoholfällung erhalten. C 47,60, H 7,10, N 12,93, S 2,38%. Bywaters<sup>13)</sup> fand C 47,32, H 6,84, N 11,43, S 1,81, Asche 1,10%. Gegen Fällungsmittel verhält es sich dem Ovomuroid sehr ähnlich. Adamkiewiczische Probe positiv, Schwefelbleiprobe fast negativ. Beim Kochen mit Säure wird Schwefelsäure und Glucosamin abgespalten. Die Menge

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. Biol. Bd. 27, S. 369. 1890.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 18, S. 525. 1894.

<sup>3)</sup> Zentralbl. f. med. Wissensch. 1893, S. 513.

<sup>4)</sup> Malys Jahresber. d. Tierchem. 1897, S. 31.

<sup>5)</sup> Journ. of the Americ. chem. soc. Bd. 22, S. 422. 1900.

<sup>6)</sup> Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 3, S. 510. 1903.

<sup>7)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 1, S. 108. 1906.

<sup>8)</sup> Diss. Marburg 1898.

<sup>9)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 34, S. 380. 1901/02.

<sup>10)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 68, S. 173. 1910.

<sup>11)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 44, S. 44. 1905.

<sup>12)</sup> Malys Jahresber. d. Tierchem. 1897, S. 31; 1903, S. 10.

<sup>13)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 15, S. 322. 1909.



(als Traubenzucker berechnet) beträgt etwa 25% (Bywaters). S. dazu die Bemerkungen von K. Mörner<sup>1)</sup>. Von Levene wurde aus ihm Mucoitinschwefelsäure gewonnen<sup>2)</sup>.

**462. Corneamucoid** (C. Th. Mörner<sup>3)</sup>. Extrahiert man die von Descemet-scher Haut und Epithel befreite, fein zerhackte Cornea mit Wasser oder ganz schwachem Alkali und versetzt das (nicht fadenziehende) Filtrat mit Essigsäure, so fällt Corneamucoid aus: C 50,16, H 6,97, N 12,79, S 2,07%. In Wasser unlöslich, auf Zusatz von wenig Alkali sich lösend. Die Lösungen verhalten sich im allgemeinen wie echte Mucinlösungen, sind aber nicht fadenziehend. Von Levene ist Mucoitinschwefelsäure aus Corneamucoid isoliert.

**463. Hyalomucoid** (C. Th. Mörner<sup>4)</sup> wird erhalten, wenn man den zerschnittenen Glaskörper filtriert und das Filtrat nach Verdünnen mit dem 2—3fachen Volumen Wasser mit so viel Essigsäure versetzt, daß es ungefähr 1% enthält. N 12,27, S 1,19%. Es verhält sich ebenso wie Corneamucoid. Es enthält Mucoitinschwefelsäure (Levene).

#### Chondroitinschwefelsäure enthaltende Glucoproteide.

**464. Chondromucoid** (C. Th. Mörner<sup>5)</sup>. Extrahiert man fein zerkleinerten Knorpel bei 40° mit Wasser, fügt zu dem Filtrate Salzsäure bis zu 0,2—0,4% und erwärmt im Wasserbade, so scheidet es sich allmählich als weißer, flockiger Niederschlag aus und kann durch wiederholtes Auflösen in Wasser mit Hilfe einer Spur Alkali und Ausfällen mit einer Säure gereinigt werden. Die S. 550 erwähnte Aldehydreaktion von Ehrlich positiv.

Zusammensetzung: C 47,30, H 6,42, N 12,58, S 2,42%. Weißes Pulver von saurer Reaktion, in Wasser unlöslich. Die mit Hilfe von Alkali hergestellte, neutrale Lösung wird durch Essigsäure und Mineralsäuren gefällt, ebenso durch Kupfersulfat, Bleiacetat, Eisenchlorid; nicht gefällt durch Gerbsäure, Sublimat, Silbernitrat. Biuretprobe und die Proben von Adamkiewicz und Millon positiv.

Über das Verhalten zu Verdauungssäften s. S. 556 unten.

Durch Alkalien wird es in Alkalialbuminat und Chondroitinschwefelsäure zersetzt.

**465. Tendomucoid.** Die zerkleinerten Sehnen (Achillessehne vom Rind) werden mit Kochsalzlösung extrahiert, mit Wasser gewaschen und mit Kalkwasser ausgezogen. Das letzte Filtrat wird mit Salz- oder Essigsäure gefällt, der Niederschlag wieder in Kalkwasser gelöst, mit Essigsäure gefällt und mit Wasser, Alkohol und Äther behandelt (Loebisch<sup>6)</sup>).

Mittlere Zusammensetzung nach:	C	H	N	S	Zusammensetzung.
Loebisch . . . . .	48,30	6,44	11,75	0,81%	(0,45% Asche)
Chittenden u. Gies <sup>7)</sup> . . . .	48,76	6,53	11,75	2,33%	} für aschefreie Substanz.
Cutter u. Gies <sup>8)</sup> . . . . .	48,04	6,67	12,47	2,20%	

Geringe Abweichungen in der Darstellung haben auf die Zusammensetzung der Präparate Einfluß, so daß man die Anwesenheit mehrerer Glucoproteide in der Sehne annehmen muß. Auch können sich bei der Darstellung, wie Posner

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 34, S. 254. 1901/02.

<sup>2)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 36, S. 105. 1919.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 18, S. 213. 1894. <sup>4)</sup> desgl. Bd. 18, S. 244. 1894.

<sup>5)</sup> Skandinav. Arch. f. Physiol. Bd. 1, S. 210. 1889.

<sup>6)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 10, S. 40. 1886.

<sup>7)</sup> Journ. of exp. med. Bd. 1, S. 186. 1896.

<sup>8)</sup> Americ. journ. of physiol. Bd. 6, S. 155. 1902.

und Gies<sup>1)</sup> gezeigt haben, eiweißreichere Glucoproteide bilden. Der von Loebisch gefundene Schwefelwert scheint zu niedrig zu sein; denn er wurde in keinem anderen Präparat wieder gefunden.

**Eigenschaften.** Es ist in 1—2 prom. Salzsäure unlöslich und wird durch Kalkwasser nicht leicht verändert. In neutraler oder alkalischer Lösung, welche gleichzeitig Tendomucoid und ein anderes Protein (z. B. Gelatine, Wittepepton, Albuminat, wässrige Auszüge von Muskeln, von Sehnen, Blutserum) enthalten, entstehen auf Zusatz einer Säure Niederschläge, welche Verbindungen von Tendomucoid und Protein darstellen, und zwar fallen diese Verbindungen auf Zusatz von Säure leichter aus als das Mucoid allein. Die Verbindungen haben im allgemeinen die Eigenschaften des Mucoids (Posner und Gies).

Über das Verhalten zu Verdauungssäften s. S. 556 unten.

Durch Kochen mit Säure wird Schwefelsäure und ein osazonbildendes Kohlenhydrat abgespalten.

Levene erhielt aus ihm durch Alkalieinwirkung Chondroitinschwefelsäure<sup>2)</sup>.

466. **Ligamentomucoid** wurde von Richards und Gies<sup>3)</sup> aus Ligamentum nuchae isoliert. N 13,44, S 1,61%. Über das Verhalten zu Verdauungssäften s. unten. Beim Kochen mit Säure wird Schwefelsäure und osazonbildendes Kohlenhydrat abgespalten.

**Darstellung.** 467. **Coriomucoid** wurde von van Lier<sup>4)</sup> aus der Lederhaut (Corium) dargestellt und untersucht. Bei der Hydrolyse tritt Schwefelsäure und reduzierende Substanz auf.

468. **Osseomucoid** (Hawk und Gies<sup>5)</sup>. Zu seiner Darstellung extrahiert man die gereinigten und mit 0,2—0,4 proz. Salzsäure entkalkten Knochen (die Einheiten s. im Original) mit halbgesättigtem Kalkwasser, fällt das Filtrat mit 0,2 proz. Salzsäure und reinigt den Niederschlag durch Dekantation mit schwach salzsaurem und reinem Wasser sowie durch Wiederholung von Lösung und Fällung und durch Behandeln mit Alkohol und Äther.

**Zusammensetzung u. Eigenschaften.** Leichtes, weißes oder schwach cremefarbenes Pulver von saurer Reaktion und der mittleren Zusammensetzung C 47,07, H 6,69, N 11,98, S 2,41 % (aschefreie Substanz). Es löst sich leicht in verdünnten Alkalien, auch in 0,05 proz. Sodalösung und 5 proz. Kochsalzlösung. Durch Säuren wird es gefällt. Biuret-, Millonsche und Xanthoproteinprobe sehr scharf, Schwefelbleiprobe schwach.

Durch Kochen mit Säure wird Schwefelsäure und ein osazonbildendes Kohlenhydrat abgespalten.

**Verhalten zu Verdauungssäften.** Die 4 Substanzen (Chondro-, Tendo-, Ligamento- und Osseomucoid) werden durch Pepsinsalzsäure langsam und unter Hinterlassung eines Rückstandes verdaut, indem Albuminat, Albumosen und Peptone in Lösung gehen. Aus dem unlöslichen Rückstand und meist auch aus den Albumosen läßt sich eine der Chondroitinschwefelsäure ähnliche Säure mit 2—3% N und 6—7% S isolieren, aus den Peptonen nicht (Posner und Gies<sup>6)</sup>. (Aus Chondro- und Tendomucoid ist Chondroitinschwefelsäure dargestellt, s. bei diesen beiden Mucoiden.) Durch Trypsin werden sie leicht verdaut unter reichlicher Bildung von Leucin, Tyrosin, Tryptophan (Posner und Gies).

<sup>1)</sup> Americ. journ. of physiol. Bd. 11, S. 404. 1904.

<sup>2)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 36, S. 105. 1919.

<sup>3)</sup> Americ. journ. of physiol. Bd. 7, S. 116. 1902.

<sup>4)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 61, S. 177. 1909.

<sup>5)</sup> Americ. journ. of physiol. Bd. 5, S. 387. 1901. — Seifert u. Gies: desgl. Bd. 10, S. 146. 1903/04.

<sup>6)</sup> Americ. journ. of physiol. Bd. 11, S. 330. 1904.

Ferner wurde aus Aortenmucoid und aus Skleromucoid von Levene Aortenmucoid,  
Skleromucoid. Chondroitinschwefelsäure dargestellt<sup>1)</sup>.

Glucoproteide, deren Kohlenhydratkomplex noch nicht festgestellt ist.

469. **Serosamucin** findet sich normalerweise in der Synoviaflüssigkeit Vorkommen. (v. Holst<sup>2)</sup> und gelegentlich in Ascitesflüssigkeiten, welche durch seine Anwesenheit eine fadenziehende Beschaffenheit zeigen. Aus diesen wurde es von Umber<sup>3)</sup>, dann in reinerem Zustande von v. Holst isoliert.

Offenbar dieselbe oder eine sehr nahestehende Substanz ist schon früher von Hammarsten<sup>4)</sup> aus Ascitesflüssigkeiten und von Pajkull<sup>5)</sup> aus pleuritischen Exsudaten und Hydroceleflüssigkeiten dargestellt worden. Die durch Kochen nach Essigsäurezusatz entweißten Flüssigkeiten wurden neutralisiert, eingeengt, mit Alkohol gefällt, die Niederschläge in Wasser gelöst, die Lösungen dialysiert und mit Essigsäure gefällt. Der Niederschlag besteht aus Mucoid. Aus dem Filtrat scheidet sich nach Neutralisation auf Zusatz von Alkohol die Mucinalbumose ab, welche sich stets in viel reichlicherer Menge findet als das Mucoid. Das Mucoid C 51,40, H 6,80, N 13,01% (S nicht bestimmt) ist in Wasser unlöslich, löst sich auf Zusatz von sehr wenig Alkali zu einer nicht schleimigen Flüssigkeit; Essigsäure fällt es und löst es erst wieder in großem Überschuß. Die Mucinalbumose C 49,79, H 6,96, N 11,42% (S nicht bestimmt) verhält sich wie eine Albumose.

Man fällt es aus den wenn nötig mit Wasser verdünnten Flüssigkeiten Darstellung. durch Zusatz von Essigsäure bis zu 1% und reinigt die abfiltrierte Substanz durch Lösen in Wasser mit Hilfe von etwas Alkali und Fällen mit Essigsäure, Wiederholung dieses Verfahrens und Behandlung mit Alkohol und Äther. Schwachgelblich weißes Pulver.

Aus Synovia: C 51,05, H 6,53, N 13,01, S 1,34% } aschefrei berechnet.  
Aus Ascitesflüssigkeit: C 51,42, H 6,66, N 13,27, S 1,27% }

S. dazu die Analyse von Hammarsten oben.

Es löst sich in Wasser mit Hilfe von etwas Alkali zu einer neutralen, beim Eigenschaften. Kochen nicht gerinnenden Flüssigkeit von schleimiger, fadenziehender Beschaffenheit. Durch Essigsäure fällbar und in überschüssiger Essigsäure nicht löslich, aber schon in sehr verdünnter Salzsäure. Durch Halbsättigung mit Ammonsulfat wird es gefällt. Die Farbenreaktionen der Eiweißstoffe positiv. Die Orcinprobe wurde von Umber positiv, von v. Holst negativ gefunden. Beim Kochen mit Säuren wird reduzierende Substanz abgespalten, aus der Substanz von Umber nur wenig.

Die von Salkowski<sup>6)</sup> aus krankhaft veränderter Synovia durch Essigsäurefällung erhaltene, Synovin. in überschüssiger Essigsäure unlösliche phosphorfreye Substanz (Synovin) liefert beim Kochen mit Säure entweder gar keine reduzierende Substanz, oder nur äußerst wenig, verhält sich also wie der von Umber dargestellte Körper.

470. **Mucine der Schnecken** (Hammarsten<sup>7)</sup>. a) Mantelmucin. Zu seiner Darstellung trägt man die beim Reizen der Manteloberfläche abgeschiedene, rahmähnliche (durch Calciumcarbonat bewirkt), zähe Masse in 0,01 proz. Kalilauge ein, fällt mit Essigsäure und reinigt das abgeschiedene Mucin durch Lösen in verdünnter Kalilauge und Fällen mit Essigsäure. Fällt man das Sekret direkt

<sup>1)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 36, S. 105. 1919.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 43, S. 145. 1904/05.

<sup>3)</sup> Zeitschr. f. klin. Med. Bd. 48, S. 364. 1904.

<sup>4)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 15, S. 202. 1891.

<sup>5)</sup> Malys Jahresber. d. Tierchem. 1892, S. 558.

<sup>6)</sup> Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. Bd. 131, S. 304. 1893.

<sup>7)</sup> Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 36, S. 373. 1885.

mit Essigsäure, so scheidet sich ein Mucinogen ab, welches in verdünntem Alkali zunächst unlöslich, erst allmählich durch Behandeln mit 0,1proz. Kalilauge unter Umwandlung in Mucin in dieser löslich wird.

Zusammensetzung des Mucinogens: C 50,30, H 6,84, N 13,62, S 1,71%; des Mucins: C 50,34, H 6,84, N 13,67, S 1,79%.

Das Mantelmucin stimmt in seinem Verhalten gegen Reagenzien und in seiner Empfindlichkeit gegen Alkalien mit dem Submaxillarmucin (§ 456) überein. Es löst sich nicht in 1—2prom. Salzsäure.

b) Fußmucin wird erhalten durch Fällen des mit höchstens 0,1proz. Kalilauge hergestellten Auszugs des Schneckenfußes mit Salzsäure. C 50,45, H 6,79, N 13,66, S 1,60%. Es unterscheidet sich dadurch, daß seine kochsalzhaltigen Lösungen durch Essigsäure getrübt werden (vgl. § 456).

471. **Mucin der Barscheier**<sup>1)</sup>. Verdünnt man den wässrigen Auszug der unreifen Barscheier mit der 10—20fachen Menge Wasser, so fällt auf Zusatz von Salzsäure bis zu einem Gehalt von 0,3% das Mucin aus, während das Ichthulin in Lösung bleibt. Durch Auswaschen, Lösen in Wasser mit Hilfe von etwas Alkali, Fällen mit Salzsäure und Wiederholung dieses Verfahrens wird es gereinigt. C 49,09, H 6,69, N 13,04, S 1,54%. Es verhält sich ganz wie typisches in verdünnter Salzsäure (wenigstens bis zu 1%) unlösliches Mucin. In den reifen Eiern findet sich hauptsächlich Mucinogen, welches durch mehrtägige Einwirkung von 0,1—0,2proz. Natronlauge in Mucin umgewandelt wird.

472. **Harnmucoid** ist in der Nubecula des Harns enthalten (K. A. H. Mörner<sup>2)</sup>). Mittlere Zusammensetzung C 49,40, N 12,74, S 2,30%. Es löst sich in schwachem Ammoniak und wird durch Essigsäure gefällt. Gegenwart von Salzen verhindert oder verzögert die Fällung; im Überschuß der Essigsäure oder einer anderen Säure löst sich der Niederschlag. Es stimmt in vieler Beziehung mit dem Ovomuroid des Hühnereies (§ 460) überein.  $[\alpha]_D = -62-67,1^\circ$ . Beim Erwärmen mit alkalischer Kupferlösung reduziert es schwach, nach dem Kochen mit Säure reduziert es langsam, aber stark. Schwefelsäure wird dabei nicht abgespalten.

Vorkommen. 473. **Amyloid**. Mit dem Namen amyloide Substanz hat Virchow einen Körper bezeichnet, der nur pathologisch in feinen konzentrischschaligen Körnchen häufig an dem serösen Überzuge der Hirnteile und Nervenansätze oder als glasglänzende Infiltration in den verschiedensten Organen, Leber, Milz, Nieren usw. Ablagerungen bildet, sich oft dabei als Infiltration der Blutgefäßwandungen zeigt und meist einen wesentlichen Teil der Prostatasteinchen ausmacht. Nach Krawkow<sup>3)</sup> findet sich auch normalerweise Amyloid oder eine ihm sehr nahestehende Substanz in der Arterienwand (Aorta) und an anderen Orten. Bei Anwesenheit von Amyloid tritt auf Zusatz von Jod rötlichbraune bis violette, von Jod und Schwefelsäure violette bis blaue, von Methylviolett, besonders auf Zusatz von Essigsäure, schöne rote oder rötliche Färbung ein.

Darstellung. Das Amyloid wurde von Hanssen<sup>4)</sup> mittels eines mechanischen Verfahrens in Form ganz homogener, ausschließlich runder oder elliptischer Körner isoliert, welche sich nach dem Trocknen zu einem gelblichen oder bräunlichen Pulver zerreiben ließen.

<sup>1)</sup> Hammarsten: Skandinav. Arch. f. Physiol. Bd. 17, S. 130. 1905.

<sup>2)</sup> Skandinav. Arch. f. Physiol. Bd. 6, S. 332. 1895.

<sup>3)</sup> Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 40, S. 195. 1898.

<sup>4)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 13, S. 185. 1908.

C 48,5—52,8, H 7,24—7,58, N 14,23—15,62, S 1,26% (3 verschiedene Präparate), doch war das Kohlenstoffstickstoffverhältnis konstant (3,38—3,42). Es ist in Wasser, schwachen Säuren und Alkalien und in Ammoniak unlöslich. Alle Farbenreaktionen der Eiweißstoffe positiv, ebenso die Jodschwefelsäurereaktion (s. oben). Die Methylviolettreaktion (s. oben) ist wegen der pulverigen Beschaffenheit weniger prägnant. Von Anilingrün wird es rot gefärbt.

Zusammensetzung  
u. Eigenschaften.

Durch Einwirkung von Alkalien und von Ammoniak (schon in schwachen Konzentrationen) erfährt es eine Veränderung, die sich in einem negativen Ausfall der Jodschwefelsäurereaktion zeigt. Dieselbe Einwirkung hat Pepsinsalzsäure (durch sie wird das Amyloid auch löslich in Ammoniak), aber nicht die Verdauung mit Trypsin oder Erepsin.

Veränderungen durch  
Alkalien u. Pepsin-  
salzsäure.

Es enthält keinen Schwefel in Form von Schwefelsäure, also auch keine Chondroitinschwefelsäure (Hanssen).

Krawkow gewann Amyloid in folgender Weise: Das von der Kapsel und größeren Gefäßen möglichst befreite und zerkleinerte Organ wird nach der Extraktion mit kaltem Wasser und schwacher Ammoniakflüssigkeit durch ein feines Drahtnetz zerrieben und die zerriebene Masse solange mit schwachem Ammoniak (zur Entfernung von locker gebundener oder freier Chondroitinschwefelsäure, Glykogen, Nucleinsubstanzen usw.) ausgewaschen, bis die Waschflüssigkeit keine Reaktion auf Chondroitinschwefelsäure (§ 257) mehr gibt, dann mit Wasser gewaschen und mehrere Tage mit Magensaft verdaut. Der unverdaute Rückstand wird mit schwacher Salzsäure und Wasser gewaschen und nun mit sehr schwachem Ammoniak behandelt, worin sich jetzt, nach der Verdauung, das Amyloid löst. In der filtrierten Flüssigkeit ruft verdünnte Salzsäure eine flockige oder gallertige Fällung hervor, die durch Dekantation mit Wasser gewaschen und dann mit Barytwasser im Überschuß behandelt wird. Die Barytlösung wird abfiltriert, mit Salzsäure gefällt und der Niederschlag mit Wasser, Alkohol und Äther gewaschen.

Darstellung mit Hilfe  
von Pepsinsalzsäure.

Dieses Verdauungsamyloid (C 48,9—50,4, H 6,6—7,0, N 13,8—14,1, S 2,65—2,9%), welches regelmäßig die Methylviolettreaktion, aber durchaus nicht immer die Jodschwefelsäurereaktion zeigt und in schwachen Alkalien und Ammoniak löslich ist, enthält Chondroitinschwefelsäure. Es ist als eine erst während der Darstellung entstandene Verbindung von Amyloid mit Chondroitinschwefelsäure oder als ein Gemenge von Amyloid und Verbindungen von Eiweiß mit Chondroitinschwefelsäure anzusehen.

Die Untersuchungen von Neuberger<sup>1)</sup> über Stickstoffverteilung und über die hydrolytischen Spaltungsprodukte sind an einem solchen Verdauungsamyloid ausgeführt worden.

Nach Neuberger soll die Eiweißkomponente basischer Natur sein und den Histonen nahestehen. Mayeda<sup>2)</sup> konnte dies aber nicht bestätigen, denn sein Amyloidprotein verhielt sich nicht wie ein Histon, auch hatte es nur den gleichen Hexonbasengehalt wie ein Albumin und lieferte endlich kein Histozepton. Mayeda konnte gleichfalls keine Chondroitinschwefelsäure in seinem Amyloid auffinden, so daß die Verhältnisse noch recht ungeklärt sind. Möglicherweise haben die verschiedenen Forscher verschiedene Substanzen in Händen gehabt. Auf den positiven oder negativen Ausfall der Farbenreaktionen, die angeblich von der Chondroitinschwefelsäure abhängen, kann man sich nicht recht verlassen, denn auch das Amyloidprotein von Mayeda gab positive Reaktion.

474. **Helicoproteid** wurde von Hammarsten<sup>3)</sup> aus dem Wasserauszug der Eiweißdrüse von *Helix pomatia* durch Versetzen mit Essigsäure als ein in überschüssiger Essigsäure unlöslicher Niederschlag erhalten. C 46,99, H 6,78, N 6,08, S 0,62, P 0,47, Asche 10%. Es ist ein Phosphorgluco-proteid, welches bei der Pepsinverdauung ein Paranuclein abspaltet und bei der Behandlung mit Alkali in Alkalialbuminat und Sinistrin (§ 133) gespalten wird.

<sup>1)</sup> Verhandl. d. dtsh. pathol. Ges. Mai 1904. S. 19.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 58, S. 469. 1909.

<sup>3)</sup> Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 36, S. 428. 1885.

### Isolierung von Monaminosäuren aus der hydrolytischen Zersetzungsflüssigkeit der Proteine nach E. Fischer \*).

(Bearbeitet \*\*) von K. Thomas - Leipzig.)

475. Prinzip. Die Proteine werden mit Mineralsäure, Lauge oder auf fermentativem Wege aufgespalten.

Alkalien oder Säuren werden möglichst weitgehend entfernt, die Hydrolysenflüssigkeit genau neutralisiert und bis zum dicken Sirup eingeeignet. Aus diesem nimmt nach den Feststellungen von Dakin *n*-Butyl- und *n*-Propylalkohol bei tagelanger Extraktion die Monaminomonocarbonsäuren und die Proline heraus. Ein Teil des Glykokolls, Dicarbonsäuren und Hexonbasen bleiben zurück, sie werden mit Phosphorwolframsäure voneinander getrennt und aus beiden Fraktionen nach besonderer Methode isoliert. Aus dem zur Extraktion benutzten Alkohol scheiden sich die übrigen Monoaminomonocarbonsäuren und Oxyaminosäuren krystallinisch ab. Oxyprolin läßt sich den Krystallgemischen durch Methylalkohol entziehen; es zeigt sich dann in dieser Fraktion durch die optische Drehung und dadurch an, daß nicht sämtlicher Kjeldahlstickstoff auch nach van Slyke bestimmbar ist. Die Ausscheidungen werden nach E. Fischer in die Esterchlorhydrate übergeführt, daraus die freien Ester dargestellt und diese unter sehr niedrigem Druck fraktioniert destilliert. Die einzelnen Fraktionen werden verseift und die erhaltenen Aminosäuren durch fraktionierte Krystallisation, mit Hilfe ihres verschiedenen Verhaltens zu Alkohol, ihrer Kupfersalze usw. zu trennen versucht. Im Butylalkohol gelöst bleibt im wesentlichen nur Prolin zurück. Durch die vorherige Aufteilung mit Butylalkohol geraten in eine Fraktion weniger Aminosäuren wie nach dem Verfahren von E. Fischer, so daß die Aufteilung der Gemenge besser und vollständiger gelingt. Alle Bausteine bleiben optisch unverändert.

#### Hydrolyse.

Meist wird Salzsäure oder Schwefelsäure genommen; beide zersetzen einzelne Bausteine unter Bildung von „Huminstoffen“. Eine Dunkelfärbung des Hydrolysats vermeidet man durch allmählichen Zusatz von Zinnchlorür während der Hydrolyse. Fluorwasserstoffsäure besitzt den Vorzug, daß keine Melanine gebildet werden und die Menge des freien Ammoniaks sogar nach 48stündiger Hydrolyse im siedenden Wasserbade geringer ist als bei 9stündigem Kochen mit 20 proz. Salzsäure. Man arbeitet im Bleikolben mit einem Kühler, dessen Innenrohr aus Blei besteht. Zur Verbindung eignet sich roter Paraschlauch. Auch mit Jodwasserstoffsäure ist die Hydrolyse durchgeführt worden.

Schwefelsäure hat den Vorzug, daß sie nach durchgeführter Spaltung durch Bariumhydroxyd leicht vollständig und auf billigere Weise entfernt werden kann als Salzsäure. Immerhin ist die Operation noch unbequem genug, während von der Salzsäure der Überschuß durch einfache Vakuumdestillation wegzubringen ist. Man wird also letztere immer da wählen, wo größere Salz mengen bei der Isolierung der Aminosäuren nicht stören. Von rauchender Salzsäure wird die 3fache Gewichtsmenge benötigt, von Schwefelsäure, die meist in 16—33 volumenproz. Lösung benutzt wird, die  $1\frac{1}{2}$ —3fache Gewichtsmenge vom Protein. Das Protein (50—1000 g\*\*\*) wird im Rundkolben mit der Säure übergossen; es quillt und geht unter häufigem Umschütteln in Lösung, wobei, wenn nötig, auf dem Wasserbade erwärmt wird. Dann wird am Rückfluß im Ölbad gekocht. Die Hydrolyse ist in der salzsauren Lösung manchmal schon nach 6 Stunden, in der schwefelsauren nach 12—16 Stunden beendet, doch werden mitunter auch 24 Stunden benötigt und noch ein 8stündiges Erhitzen im Drucktopf bei 135° (Porzellanbecher) angeschlossen. Der negative Ausfall der Biuretprobe ist kein einwandfreies Zeichen für die Vollständigkeit der Hydrolyse; wenn der freie Aminostickstoff, nach van Slyke oder Sörensen in einer entnommenen Probe bestimmt, nicht weiter zunimmt, gilt die Aufspaltung erst

\*) E. Fischer: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 33, S. 151, 412. 1901. Die erhebliche Verbesserung, welche die Methode durch Dakin<sup>1)</sup> erfahren hat, ist bei der Beschreibung berücksichtigt worden.

\*\*) Die Bearbeitung von K. Thomas umfaßt die §§ 475—500 einschl.

\*\*\*) Bei dem ursprünglichen Verfahren von E. Fischer geht man von etwa 500 g Protein aus.

<sup>1)</sup> Dakin: Biochem. Journ. Bd. 12, S. 290. 1918. Journ. of biol. chem. Bd. 44, S. 499. 1920 Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 130, S. 159. 1923.

Menge der zu verwendenden Salz- oder Schwefelsäure.

Dauer der Hydrolyse.

Feststellung der Beendigung der Hydrolyse.

als beendet<sup>1)</sup>. Zur Entfernung eines großen Teils der überschüssigen Salzsäure wird im Vakuum unter oftmals erneutem Zusatz von Wasser bis zum dicken Sirup eingedampft. Zur Entfernung der Schwefelsäure wird mit dem doppelten Volumen Wasser verdünnt, wenn nötig von Melaninen abfiltriert und mit einer heißen konzentrierten Lösung von Baryt\*) unter Umrühren versetzt, bis Lackmus eben noch gerötet, Kongo nicht mehr gebläut wird. Nun wird abgesaugt oder abgeschleudert und der Bariumsulfatniederschlag solange mit heißem Wasser behandelt, bis dieses keine Ninhydrinreaktion mehr gibt. Filtrat und Waschwässer werden im Vakuum bis zum dünnen Sirup eingeeengt, auf ein bestimmtes Volumen gebracht und in der Lösung der Stickstoffgehalt nach Kjeldahl (§ 558), der Aminostickstoff nach van Slyke (§ 492) bestimmt. Bei tyrosinreichen Proteinen kann soweit eingeeengt werden, daß hier schon etwa 2% durch Krystallisation entfernt werden. Die weitere Verarbeitung erfolgt am besten in solchen Mengen der Lösung, die etwa 150 g Protein entsprechen. Mit Baryt wird neutralisiert, 5 g aufgeschlämmtes Bariumcarbonat zugesetzt und das in Freiheit gesetzte Ammoniak abdestilliert. Nun wird filtriert, die Niederschläge gut ausgewaschen, Filtrat und Waschwässer genau

Entfernung der überschüssigen Salzsäure.

Entfernung der überschüssigen Schwefelsäure.

Entfernung von Tyrosin.

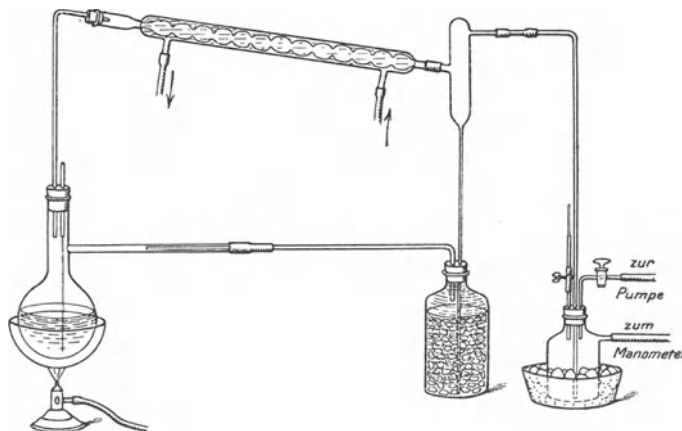


Abb. 19. Apparat zur Extraktion des Proteinhydrolysats mit Butylalkohol.

gegen Lackmus mit Schwefelsäure und Baryt neutralisiert\*\*) und im Vakuum wieder eingeeengt. Der noch warme dünne Sirup wird in einen Extraktionsapparat\*\*\*) überführt (s. Abb. 19<sup>2)</sup>) und mit Normalbutylalkohol bei einem Druck von 10 mm extrahiert. Es genügt dabei, die Temperatur des Wasserbades auf 45—50° zu halten, damit ein rascher Strom des Extraktionsmittels durch die wässrige Lösung perlt. Man extrahiert tagsüber, läßt über Nacht erkalten, saugt die im Rundkolben ausgeschiedenen Krystallmassen von Zeit zu Zeit ab, um lästiges Stoßen zu vermeiden, und wäscht mit etwas Butylalkohol nach. Die alkoholischen Filtrate werden zur weiteren Extraktion benutzt. Wenn über Nacht nichts mehr auskrystallisiert, ist die Extraktion beendet †).

Extraktion mit Butylalkohol.

Man erhält auf diese Weise eine butylalkoholische Lösung, aus Butylalkohol abgeschiedene Krystallisationen und eine mit

\*) Zur Analyse, alkalifrei. Es ist notwendig, nur Reagenzien von hohem Reinheitsgrad zu benutzen und stets im Vakuum einzuengen.

\*\*) oder ganz schwach lackmussauer gelassen.

\*\*\*) Das Optimum der Extraktion hängt von der Reaktion der Lösung ab. Die Monaminocarbonsäuren sollen sich in einer Lösung befinden, die gegen Lackmus genau neutralisiert ist. Die Reaktion der gesamten Hydrolysenflüssigkeit weicht dann bei den einzelnen Proteinen ein wenig davon ab, je nach ihrem wechselseitigen Gehalt an sauren und basischen Eiweißbausteinen.

†) Die erforderliche Zeit wechselt von 36 Stunden bis zu mehreren Tagen; schwer geht vor allem Glykokoll und Serin in den Butylalkohol über.

<sup>1)</sup> van Slyke: Journ. of biol. chem. Bd. 12, S. 295. 1912; s. auch Henriques u. Gjaldbæk: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 67, S. 8. 1910; Bd. 75, S. 363. 1911 und Abderhalden u. Pettibone: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 81, S. 458. 1912.

<sup>2)</sup> Freudenberg u. Vollbrecht: Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 429, S. 290. 1922.

Butylalkohol erschöpfte Flüssigkeit, deren Untersuchungen nach § 476, § 477 und § 482 geschehen.

Extraktion mit  
Propylalkohol.

Mit Vorteil wird die Extraktion mit Propylalkohol zu Ende geführt. Propylalkohol nimmt rasch das Oxyprolin auf; er entzieht dabei der Stammlösung außerdem so viel Wasser, daß nun das zurückbleibende Glykokoll krystallisiert.

*Verarbeitung der butylalkoholischen Lösung. Isolierung von Prolin.*

476. Die filtrierten Extrakte können Diketopiperazine enthalten. Zu ihrer Aufspaltung wird der Butylalkohol mittels Wasserdampf abgeblasen, der Rückstand mit Schwefelsäure hydrolysiert (§ 475), die Schwefelsäure mit Baryt entfernt und die barium- und sulfatfreie Lösung im Vakuum zur Trockne gebracht, der Rückstand mit etwa dem 10fachen Gewicht trockenem Äthylalkohol kochend gelöst und dann mehrere Tage bei 0° aufbewahrt. Das dann ausfallende Gemisch von Monaminosäuren (und Anhydriden) wird abgetrennt und mit Alkohol nachgewaschen. Die alkoholischen Lösungen werden zur Trockne gebracht, nochmals mit absolutem Alkohol aufgenommen, wieder zur Trockne gebracht, und dies solange wiederholt, bis eine glatte Lösung in Alkohol erfolgt.

Die in Alkohol unlöslichen Teile, welche meist neben wenig Leucin, Valin, Alanin auch Glykokoll enthalten, werden in Wasser gelöst und mit den aus dem Butylalkohol abgetrennten Krystallgemischen zu gemeinsamer Verarbeitung vereinigt (§ 477).

Die alkoholischen Auszüge werden eingedampft, der Rückstand in Wasser aufgenommen, mit Tierkohle entfärbt und wieder im Vakuum zum dünnen Sirup eingeengt, um etwa noch vorhandenen Peptid-anhydriden und Tyrosin Gelegenheit zum Auskrystallisieren zu geben. In der wenn nötig filtrierten Lösung — dem Rohprolin — kann der Gehalt an anhaftenden Aminosäuren (meist Valin, Leucin und etwas Tyrosin) durch eine Kjeldahl- und Aminostickstoffbestimmung ermittelt werden. Der Hauptbestandteil der Lösung ist Prolin, und zwar sowohl das optisch aktive als auch das racemische, deren Trennung auf dem verschiedenen Verhalten ihrer Kupfersalze zu absolutem Alkohol beruht.

Isolierung von  
Prolin.

Man dampft nach E. Fischer im Vakuum zur Trockne, kocht die Lösung des Rückstandes mit überschüssigem, frisch gefälltem Kupferoxyd, filtriert, dampft die blaue Lösung im Vakuum wieder zur Trockne ein, kocht den meist etwas sirupösen Rückstand mit absolutem Alkohol und filtriert. Aus dem konzentrierten alkoholischen Filtrat scheidet sich beim Stehen l-Prolinkupfer krystallinisch aus (ein Teil des Kupfersalzes bleibt sirupös und besteht entweder aus Zersetzungsprodukten des Prolins oder noch unbekanntem Stoffen). Das in Alkohol unlösliche Kupfersalz des d,l-Prolin wird aus Wasser umkrystallisiert.

Weitere Vor-  
reinigung des  
Auszugs.

Dakin benutzt zur Abtrennung der Aminosäuren vom Prolin die Nichtfällbarkeit des letzteren durch alkalisches Quecksilberacetat. Man verdünnt mit Wasser so weit, daß die Lösung etwa 10 proz. wird, versetzt mit 2 Mol. Quecksilberacetat in gesättigter Lösung und verteilt dann in dem Gemisch unter gutem Umrühren einen Krystallbrei von 2 Mol. Baryt in 5 Tl. Wasser. Der weiße voluminöse Niederschlag wird sofort abgesaugt, mit kaltem Wasser ausgewaschen und die Filtrate sofort mit einer bereitgestellten Menge Schwefelsäure versetzt, die dem Baryt äquivalent ist. Es wird mit Schwefelwasserstoff entquecksilbert, Barium und Schwefelsäure quantitativ entfernt und im Vakuum eingeengt. Die Lösung kann jetzt Prolin und Anhydride\*) enthalten. Letztere werden mit Bromwasserstoff bei 130° aufgespalten, die Lösung wird mit Silber-

\*) Z. B. aus Oxyprolin und Leucin von annähernd gleicher Elementarzusammensetzung wie Prolin.



oxyd und dann mit Schwefelwasserstoff behandelt, eingeengt und durch allmählichen Zusatz von Alkohol die Monaminosäuren vom Prolin getrennt. War im Vakuum mit Butylalkohol extrahiert worden, so enthält diese Lösung jetzt nur Prolin\*), wie die spezifische Drehung ( $-78^\circ$ ) und das Fehlen von Aminostickstoff ergibt. Eine weitere Reinigung wird weder durch Phosphorwolframsäure noch über das Kupfersalz erzielt. Dagegen ist letzteres ebenso wie das Hydantoin zum Identifizieren geeignet.

Zur Bereitung des Kupfersalzes wird mit überschüssigem frischgefälltem Kupferoxyd gekocht, filtriert, die blaue Lösung zur Trockne eingedampft und der Rückstand mit Alkohol aufgenommen. Ist nur l-Prolin vorhanden, so löst er sich vollständig; bei genügender Konzentration scheidet sich l-Prolinkupfer krystallinisch aus. Etwa vorhandenes in Alkohol unlösliches Kupfersalz des d,l-Prolin wird aus Wasser umkrystallisiert.

Isolierung von  
Prolin als  
Kupfersalz.

Foreman<sup>1)</sup> kocht das sorgfältig getrocknete Rohprolin zunächst mit Chloroform aus, entfernt das Lösungsmittel darauf vollständig und kocht jetzt in absolutem Alkohol mit frischgefälltem und zuvor bei  $100^\circ$  getrocknetem und pulverisiertem Kupferhydroxyd. Dabei geht nur das Kupfersalz vom l-Prolin in Lösung.

Zur Bereitung des Hydantoins wird das Prolin mit etwa dem gleichen Gewichte Kaliumcyanat und dem 10fachen Gewichte Wasser auf dem Wasserbade eingedunstet, der Rückstand mit Wasser aufgenommen, mit Schwefelsäure bis zur Kongobläuung angesäuert und die Lösung mit Äther erschöpft. Nur die aus etwa vorhandenen Aminosäuren entstandenen Uraminosäuren gehen in den Äther über. Die wässrige Lösung wird mit  $\frac{1}{5}$  Vol. 50proz. Schwefelsäure versetzt und 1—2 Stunden im kochenden Wasserbade gehalten. Das Hydantoin vom Prolin (S. 279) läßt sich im Soxhlet mit Äther herausholen und wird aus heißem Wasser umkrystallisiert.

Isolierung von  
Prolin als  
Hydantoin.

*Verarbeitung der Krystallgemische, die sich aus dem Butylalkohol abgeschieden haben\*\*).*

477. Sie bestehen aus Alanin, Valin, den Leucinen, Cystin (?\*\*\*), Phenylalanin, Tyrosin, Oxyprolin. Schwer extrahierbar sind Serin und Glykokoll; sie finden sich daher erst in den späteren Anteilen. Oxyprolin geht an und für sich ziemlich leicht in den Butylalkohol über; ist es reichlich vorhanden (z. B. in Gelatine), so verteilt es sich aber über sämtliche Fraktionen. Es läßt sich dem Gemenge durch 90proz. Methylalkohol entziehen (§ 480).

Oxyprolin.

Aus den einzelnen Abscheidungen sucht man nun die schwer löslichen Aminosäuren Tyrosin, Leucin, Phenylalanin durch Krystallisation aus Wasser und später aus verdünntem Methylalkohol von den leichter löslichen niedrigeren Homologen abzutrennen und dann rein herauszufractionieren. Zuerst scheidet sich das Tyrosin ab; bei Proteinen, die an Tyrosin reich sind, wird man einen Teil schon beim Einengen der neutralisierten Stammlösung (S. 561 oben) entfernt haben. Bei der Extraktion haftet Tyrosin besonders leicht der Prolinfraktion

Abscheidung von  
Tyrosin.

\*) Wurde unter gewöhnlichem Drucke extrahiert, so sind aus den reichlich vorhandenen Diketopiperazinen noch Aminosäuren vorhanden, deren völlige Abtrennung erst durch eine erneute Behandlung mit Quecksilberacetat gelingt. Es ist daher zweckmäßig, in diesem Falle die Spaltung mit Bromwasserstoffsäure der Vorreinigung mit essigsäurem Quecksilber vorausgehen zu lassen (S. 562).

\*\*) Mit ihnen vereinigt werden die beim Herausarbeiten vom Prolin angefallenen Monaminosäurefraktionen (§ 476).

\*\*\*) Über Cystin liegen keine Erfahrungen vor, da es in Gelatine und Zein nicht vorhanden ist, den einzigen Proteinen, bei denen bis heute diese nach dem Dakin-Verfahren erhaltene Fraktion aufgearbeitet worden ist.

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 56, S. 9. 1913.

an, kleine Mengen finden sich aber in allen Fraktionen, wie der stets positive Ausfall der Proben mit Millonschem Reagens und diazotierter Sulfanilsäure beweist.

Abscheidung von  
Leucin.

Nachdem das Tyrosin entfernt ist, fällt bei weiterem Einengen Leucin aus. Man trennt möglichst viel auf diese Weise vom Phenylalanin und prüft seine Reinheit dadurch, daß in den jeweiligen Fraktionen der Gehalt an Stickstoff, Aminostickstoff und die spezifische Drehung bestimmt wird. Der Rest muß über die Ester (§§ 477—479) aufgearbeitet werden. Auch die leichter löslichen Anteile werden über die Ester weiter aufgeteilt.

Andere Abscheidung  
von Tyrosin.

Eine andere Abtrennung von Tyrosin gründet sich auf die Tatsache, daß es sich mit Kaliumcyanat fast quantitativ in die Uraminosäure verwandeln läßt, die mit Äther extrahiert werden kann und in Wasser, im Gegensatz zu den anderen ätherextrahierbaren Uraminosäuren, sehr leicht löslich ist. Das mit heißer Salzsäure daraus bereitete p-Oxybenzylhydantoin läßt sich leicht durch Umkrystallisieren reinigen. Im einzelnen verfährt man etwa folgendermaßen: 10 g des Gemisches der Monaminsäuren werden mit 50 ccm Eisessig zum Kochen erhitzt und dann mit 50 ccm Alkohol versetzt. Der Rückstand wird filtriert und mit alkoholischer Essigsäure ausgewaschen, dann mit 10 ccm Wasser gekocht und nach Abkühlen filtriert. Man erhält so einen Teil Tyrosin in optisch reiner Form. Die vereinigten Filtrate werden im Vakuum konzentriert, der Rückstand in Wasser gelöst, mit Soda neutralisiert und dann 1 Stunde mit allmählich zugefügtem Kaliumcyanat (8 g) gelinde erwärmt. Die Lösung wird dann mit Schwefelsäure gerade kongosauer gemacht. Die schwer löslichen Uraminosäuren (Leucin, Phenylalanin) scheiden sich ab. Das Filtrat davon wird 3 Tage lang im Soxhlet mit Äther extrahiert, der Ätherrückstand in 10 ccm Wasser gelöst, die Lösung wenn nötig filtriert und mit verdünnter Salzsäure verdunstet, mit Wasser aufgenommen und zur Krystallisation stehen gelassen. p-Oxybenzylhydantoin schmilzt aus heißem Wasser umkrystallisiert bei 259—261°.

#### Herstellung der Esterchlorhydrate. Abscheidung von Glykokoll als Esterchlorhydrat.

Abscheidung von  
Glykokoll.

477a. Die Krystallgemische werden gut pulverisiert, in einen Destillierkolben gebracht, mit der 3—5fachen Menge trocknem über Calciumoxyd destilliertem Äthylalkohol übergossen und ohne zu kühlen trocknes Salzsäuregas bis zur Sättigung eingeleitet, d. h. bis die Flüssigkeit stark raucht. Man läßt den gut verschlossenen Kolben einige Zeit stehen, sättigt die abgekühlte Flüssigkeit nochmals mit gasförmiger Salzsäure und läßt wieder etwas stehen. Die Flüssigkeit wird jetzt bei 40° des Wasserbades und möglichst niedrigem Druck (10 bis 15 mm) auf etwa  $\frac{2}{3}$  des ursprünglichen Volumens eingengt, in Eis abgekühlt und mit einem kleinen Krystall von Glykokollesterchlorhydrat geimpft. Bei Anwesenheit von viel Glykokoll beginnt bald eine krystallinische Abscheidung. Nach 12 Stunden saugt man ab, wäscht mit kaltem Alkohol aus, engt Filtrat + Waschalkohol unter denselben Bedingungen bis auf die Hälfte des ursprünglichen Volumens ein, sättigt wieder mit gasförmiger Salzsäure, kühlt ab und impft abermals. Nach Absaugen etwa auskrystallisierten Glykokollesterchlorhydrats und Auswaschen engt man das Filtrat unter vermindertem Druck bis zum zähen Sirup ein, wiederholt unter Anwendung der gleichen Menge absoluten Alkohols die Veresterung und versucht, nach Einengen auf  $\frac{1}{3}$  des Volumens nochmals eine Abscheidung zu erhalten. Es ist vorteilhaft, nach Einengen zum Sirup die Veresterung noch ein drittes Mal zu wiederholen.

Scheidet sich von Anfang an kein Glykokollesterchlorhydrat ab, so engt man sofort zum Sirup ein und wiederholt die Veresterung in gleicher Weise 1—2 mal.

Dieses mehrmalige Behandeln mit Alkohol und Salzsäure (nach zwischengeschaltetem Einengen zum Sirup) ist für eine möglichst weitgehende Esterifizierung notwendig, da sich bei der Veresterung Wasser bildet, welches der Reaktion entgegenwirkt.

#### Herstellung der Ester aus den Esterchlorhydraten.

477b. Es soll schnell und unter guter Kühlung gearbeitet werden. Sie kann nach einer der folgenden Methoden geschehen:

a) Mit Hilfe von Natronlauge, Kaliumcarbonat und Äther. Es ist zweckmäßig, diese Operation mit kleinen Mengen Sirup vorzunehmen, der nicht mehr als 150 g Protein entspricht. Es ist erforderlich, beständig unter guter Kühlung zu arbeiten, den abgegossenen Äther jedesmal rasch zu erneuern und die Aussalzung so vorzunehmen, daß keine großen Klumpen entstehen und zuletzt ein homogenes körniges, gut durchschüttelbares Gemisch übrig bleibt. Im einzelnen verfährt man so: der Sirup wird in möglichst wenig Wasser ( $\frac{1}{3}$  der Menge des Sirups) gelöst, die Lösung mit Äther überschichtet und in einer Kältemischung mit abgekühlter 33 proz. Natronlauge langsam unter stetigem energischem Schütteln des Kolbens versetzt, bis die freie Salzsäure neutralisiert ist\*). Dann fügt man festes Kaliumcarbonat zu, schüttelt kräftig, gießt den Äther ab und erneuert ihn sofort, fügt wieder Alkali und Kaliumcarbonat hinzu, schüttelt, wechselt den Äther und fährt in derselben Weise fort, bis das Gemisch eine einheitliche bröckelige Masse darstellt und der Äther, der anfangs tief gelb bis braun gefärbt war, farblos bleibt und bei der Verdunstung einer Probe keinen Rückstand hinterläßt. Die Menge des zugefügten Alkalis muß natürlich so groß sein, daß die gesamte Salzsäure gebunden wird.

Aus dieser bröckeligen oder dickbreiigen Masse sind durch Wiederholung des ganzen Veresterungsprozesses noch weitere erhebliche Mengen von Aminosäuren zu gewinnen<sup>1)</sup>. Man löst sie zu dem Zweck in Wasser, leitet gasförmige Salzsäure ein, filtriert von ausgeschiedenem Chlorkalium ab, dampft ein, bis Krystallisation erfolgt, filtriert und fährt so fort, solange die sich abscheidende Krystallmasse rein anorganisch ist. Beginnt auch organische Substanz mit auszufallen, so übergießt man die ganze Masse mit Alkohol, leitet gasförmige Salzsäure ein, filtriert von ungelöst bleibenden anorganischen Salzen ab, dampft das Filtrat bei 40° des Wasserbades unter vermindertem Druck zur Trockne ein, wiederholt die Veresterung, filtriert von anorganischen Salzen ab und verfährt nun genau so, wie in § 477a und in diesem Paragraph angegeben. Die dabei erhaltene ätherische Lösung der Ester wird, wie im folgenden Absatz beschrieben, weiter behandelt und die beim Ausschütteln mit Äther hinterbleibende bröckelige oder dickbreiige Masse nochmals in der eben beschriebenen Weise dem Veresterungsprozeß unterworfen. Siehe dazu auch § 481a.

Die einzelnen Ätherportionen gießt man zunächst auf Kaliumcarbonat und filtriert sie nach etwa 15 Minuten langem Stehen in eine Sammelflasche. Nach etwa 12stündigem Trocknen mit geglühtem Natriumsulfat destilliert man den Äther unter gewöhnlichem Druck ab, aber nicht ganz vollständig, um zu verhindern, daß die einfachen Monaminoester wie Glykokoll- und Alaninester mit der letzten Menge Äther übergehen\*\*). (Siehe dazu § 478, Anfang.) Die letzten Reste des Äthers entfernt man unter vermindertem Druck bei gewöhnlicher Temperatur oder bei 20°. Es folgt die fraktionierte Destillation (§ 478).

\*) Dieser anfänglich vorsichtige Zusatz von Alkali hat den Zweck, die gegen Alkali besonders empfindlichen schwach basischen Ester der Asparagin- und Glutaminsäure vor der Zersetzung zu schützen. Hat man mit Butylalkohol extrahiert, so fehlen die Dicarbonsäuren in dieser Fraktion.

\*\*) Geringe Mengen gehen fast stets mit in das Destillat. Um sie zu gewinnen, schüttelt man das Destillat mit verdünnter wässriger Salzsäure durch und dampft die salzsaure Lösung (nach Entfernung des Äthers) auf dem Wasserbade zur Trockne ein. Durch Kochen mit Bleioxyd lassen sich aus den salzsauren Salzen die freien Aminosäuren gewinnen, auch kann man den Rückstand gleich mit Alkohol übergießen und gasförmige trockene Salzsäure einleiten, um Glykokoll als Esterchlorhydrat, wie oben beschrieben, abzuscheiden.

<sup>1)</sup> E. Fischer: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 35, 3, S. 2660. 1902. — Abderhalden: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 37, S. 484, 499. 1902/03.

b) Mit Bariumoxyd und Barythydrat<sup>1)</sup>. Diese Methode eignet sich besonders da, wo der Rückstand nach Ausätherung der Ester erneut verestert werden soll.

Der dünne Sirup wird in einen Metallbecher oder emaillierten Krug gebracht, dessen Boden mit einer eiskalten Aufschwemmung von Barythydrat in Barytwasser bedeckt ist und in einem Kältegemisch steht. Es wird mit einem Holzspatel gründlichst durchgerührt und dabei gepulvertes Bariumhydroxyd rasch zugesetzt. Die Masse ist anfangs fest, erweicht aber rasch und wird alkalisch. Sofort wird sie mit eisgekühltem Äther überschichtet und, während weiterhin tüchtig durchgerührt wird, Bariumoxyd in kleinen Portionen mit Abständen von einigen Minuten eingetragen, bis an Stelle der wässerigen Aufschwemmung eine körnige Masse entstanden ist. Wird zuviel Bariumoxyd gegeben, so entsteht eine Emulsion; sie muß dann durch einen Buchnertrichter gesaugt werden, um die ätherische Lösung zu gewinnen. Während des Eintragens von Bariumoxyd wird der Äther von Zeit zu Zeit durch neuen eisgekühlten ersetzt, je nach der Menge der Ester, die zu erwarten steht. Es wird ausgeäthert, bis einige Tropfen keinen Verdunstungsrückstand mehr geben. Die Ätherportionen werden auf wasserfreies Kaliumcarbonat gegossen, dann gesammelt, filtriert und mit frischgeglühtem Natriumsulfat getrocknet. Weiter § 478. Der barythaltige Rückstand wird mehrere Male mit kaltem Wasser ausgezogen, das Filtrat, das die nichtveresterten Aminosäuren enthält, mit Schwefelsäure behandelt, wieder filtriert, das barium- und sulfatfreie Filtrat im Vakuum zur Trockne gebracht, erneut mit Alkohol und Salzsäure verestert und wenn nötig der ganze Prozeß ein weiteres Mal wiederholt. Es ist von großem Vorteil, alkalifreie Bariumpräparate hierbei zu verwenden.

c) Mit Hilfe von Natriumalkoholat<sup>2)</sup>. Der Sirup wird in wenig Alkohol gelöst und die Lösung auf ein bestimmtes Volumen gebracht. Nachdem dann in einem aliquoten Teil der Chlorgehalt durch Titration ermittelt ist, fügt man zu der mit Äther überschichteten und in Eis gestellten Hauptmenge das dem vorhandenen Chlor entsprechende Natrium in alkoholischer Lösung hinzu, befördert durch weiteren Zusatz von Äther die Abscheidung des Kochsalzes, filtriert oder zentrifugiert und trocknet die alkoholisch-ätherische Lösung der freien Ester durch Schütteln mit geprühtem Natriumsulfat. Nach Abdestillieren des Äthers wird fraktioniert destilliert (§ 478).

Jones und Johns<sup>3)</sup> unterwarfen den Rückstand der vom Kochsalz abfiltrierten alkoholischen Lösung nicht unmittelbar der gebrochenen Destillation, sondern mischten ihn mit wenig Wasser, zogen das Gemisch mit Äther aus und verarbeiteten die ätherische Lösung nach dem Trocknen. Die wässrige Lösung wurde einer erneuten Esterifizierung unterworfen. Osborne und Liddle<sup>4)</sup> beanstanden die großen Mengen alkoholischer Alkoholatlösung, die gebraucht werden, und beim Abdestillieren Esterdämpfe der niederen Aminosäuren mitnehmen. Bei Abderhalden hat sich aber erst neuerdings<sup>5)</sup> diese Methode wieder sehr bewährt.

#### Herstellung der Esterchlorhydrate und der freien Ester nach Foreman<sup>6)</sup>.

477c. Die Aminosäuren werden in ihre trockenen Bleisalze verwandelt, diese in absolutem Alkohol suspendiert und durch Sättigen mit trockenem Salz-

<sup>1)</sup> Levene: Journ. of biol. chem. Bd. 1, S. 45. 1905. — Levene u. Alsberg: desgl. Bd. 2, S. 128. 1906/7. — Levene u. van Slyke: Biochem. Zeitschr. Bd. 13, S. 442. 1908. Journ. of biol. chem. Bd. 6, S. 419. 1909.

<sup>2)</sup> Abderhalden u. Rostoski: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 46, S. 132. 1905.

<sup>3)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 36, S. 323. 1918.

<sup>4)</sup> Americ. journ. of physiol. Bd. 26, S. 295. 1910.

<sup>5)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 120, S. 208. 1922.

<sup>6)</sup> Biochem. Journ. Bd. 13, S. 378. 1919.

säuregas verestert. Die Chlorhydrate der Ester werden in trockenem Chloroform aufgenommen, die Ester durch Schütteln mit trockenem Bariumoxyd in Freiheit gesetzt, nach Verjagen des Chloroforms mit absolutem Äther aufgenommen und in üblicher Weise fraktioniert. Die Oxyaminosäuren scheinen dabei im Barytniederschlag zu bleiben. Im einzelnen arbeitet man wie folgt:

Während die Lösung der Aminosäuren oder ihrer Chlorhydrate durch einen Dampfstrom im Kochen gehalten wird, fügt man anfangs gefälltes Bleihydroxyd, dann in Portionen einen Überschuß von Bleioxyd hinzu. Wird die rohe Hydrolysenflüssigkeit benutzt, so reißt Bleihydroxyd die Huminstoffe in heiß filtrierbarer Form nieder, das Filtrat wird dann weiter mit Bleioxyd behandelt. Mit Bleihydroxyd allein lassen sich die Aminosäuren nicht vollständig in ihre Bleisalze überführen. Die kochend heiße Lösung der Bleisalze wird filtriert und zunächst auf dem Wasserbade eingeengt, dann im Dampftrockenschrank vollständig getrocknet. Der Rückstand kann pulverisiert werden, die Brocken zerfallen aber auch beim Verestern. Die Bleisalze werden in etwa dem 4fachen Gewicht absoluten Alkohols verteilt und mit einem Strom von trockenem Salzsäuregas zunächst bei Zimmertemperatur, dann im Kältegemisch gesättigt. Vom Bleichlorid wird abgesaugt unter Nachwaschen mit absolutem Alkohol. Die vereinigten Filtrate werden im Vakuum bei 40° nicht übersteigender Badtemperatur ungefähr auf die Hälfte eingeengt, dann in einen Emailtopf übergeführt unter Nachspülen mit absolutem Alkohol und im Kältegemisch gekühlt; unter dauerndem Rühren wird dann solange alkoholisches Ammoniak zugefügt, bis die Reaktion nur noch schwach sauer ist und die Lösung sich noch nicht dunkel verfärbt hat. Das Filtrat vom Ammoniumchlorid wird im Vakuum bis zum dicken Sirup unter Nachfügen von trockenem Alkohol eingeengt und in trockenem Chloroform aufgenommen, das die Esterchlorhydrate leicht löst und Ammoniumchlorid zurückläßt. Die Chloroformlösung wird in eine Flasche gebracht, deren Stopfen ein bis fast auf den Boden reichendes Thermometer mit langem Untertheil trägt, und mit Bariumoxyd kräftig geschüttelt, um die Ester in Freiheit zu setzen. Bariumoxyd wird in Portionen zugegeben solange, bis der sich rasch zu Boden setzende Niederschlag körnig geworden, die Temperatur dort nicht mehr ansteigt und im Chloroform keine Chlorionen mehr nachweisbar sind. Es wird von den Bariumniederschlägen abgesaugt, aus dem Filtrat das Chloroform im Vakuum entfernt, der Rückstand mit trockenem Äther aufgenommen, in dem er sich leicht löst. Die Barytniederschläge werden in Wasser zerteilt, die Lösung mit Schwefelsäure bariumfrei gemacht und daraus mit Bleioxyd in der angegebenen Weise eine zweite Portion trockene Bleisalze der Aminosäuren und dann die ätherische Lösung ihrer Ester bereitet. Die beiden Esterfraktionen werden vereinigt und der gebrochenen Destillation unterworfen (§ 478).

Der bei der Bereitung der zweiten Esterfraktion angefallene Barytniederschlag wird wieder in Wasser zerteilt und die Barium- und Chlorionen quantitativ entfernt. Die Lösung enthält Oxyaminosäuren, Serin krystallisiert beim Einengen aus.

Oxyaminosäuren,  
Serin.

### Fraktionierte Destillation der Ester.

478. Beim Einengen der ätherischen Esterlösung ist zu beachten, daß der Äther die Ester von Glykokoll und Alanin mitnimmt; man schaltet daher noch eine zweite mit Salzsäure beschickte Vorlage vor, deren Rauminhalt von der ersten zweckmäßig durch Glashahn abgesperrt werden kann, damit beim Unterbrechen des Vakuums nicht Salzsäuredämpfe in die Apparatur übergehen. Der überdestillierte Äther wird mit Salzsäure ausgeschüttelt. Bezüglich der Apparatur

ist zu bedenken, daß die Ester die Gummistopfen angreifen. Genügend leergewogene Vorlagen sind bereitzuhalten.

Die Destillate, besonders der niederen Fraktionen, sind sofort weiter zu verarbeiten und auf unten angegebenen Wege zu verseifen. Man mache es sich zur Regel, das Gewicht der einzelnen Gemische von Aminosäuren zu bestimmen.

Innerhalb welcher Dampftemperaturen eine Fraktion aufgesammelt wird, wechselt von Fall zu Fall. E. Fischer, der die vorherige Aufteilung durch Butylalkohol noch nicht gekannt hat, sammelte 4 Fraktionen und den nicht destillierbaren Rückstand.

Fraktion	Temperatur des Wasser- oder Ölbad	Druck in mm	enthielt die Ester von
1	bis 60°	12	Glykokoll, Alanin, nur sehr wenig Valin, Leucin, Prolin
2	„ 100°	12	Leucin, Isoleucin, Valin, Alanin, Glykokoll, Prolin
3	„ 100°	0,1—0,5	reichlich Leucin, Isoleucin, daneben Glykokoll, Alanin, Valin, Prolin
4	„ 175°	0,1—0,5	Phenylalanin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Serin
5	Rückstand.		Anhydride, Glutaminsäure, daneben etwas Leucin, Phenylalanin.

Da kin betont, daß durch die Vorbehandlung mit Butylalkohol die Dicarbonsäuren von den Monoaminomonocarbonsäuren abgetrennt sind. Prolin wird ihnen durch absoluten Äthylalkohol, Oxyprolin durch 90 proz. Methylalkohol vollständig entzogen. Der Rest besitzt also eine einfachere Zusammensetzung, seine Ester lassen sich leichter fraktionieren, als dies bei dem älteren Verfahren von E. Fischer möglich war. Es kommt hinzu, daß die einzelnen Monaminomonocarbonsäuren vom Butylalkohol verschieden rasch herausgelöst werden, so daß aus den einzelnen Abscheidungen schon durch einfaches Umkrystallisieren manchmal Aminosäuren in reinem Zustande abgetrennt werden können; auch dadurch ist die Fraktionierung des veresterten Restes erleichtert. Glykokoll geht bei der Extraktion im Vakuum nicht mit über, erscheint also in diesen Fraktionen hier nicht. Erfahrungen über die Trennung dieser einzelnen Fraktionen liegen bisher nur von Da kin für Gelatine und Zein vor. Hier waren durch das Fehlen von Valin, Isoleucin bzw. auch Tyrosin und Cystin besonders einfache Verhältnisse gegeben. Zur Orientierung über die Temperaturen, innerhalb deren Da kin die Fraktion mit dem erwarteten Ester aufgefangen hat, diene die folgende Zusammenstellung, der die Siedetemperatur der Ester gegenübergestellt ist:

Äthylester von	Siedetemperatur	bei mm Hg	Da kin sammelte Dampftemperatur	bei mm Hg
Glykokoll . . . . .	52	10	bis 65°	9 mm
Alanin . . . . .	48	11	bis 90°	9 mm
Valin . . . . .	63,5	8	—	—
Isoleucin . . . . .	—	—		
Leucin . . . . .	84	12	} von 80° an	11 mm
Phenylalanin . . . . .	143	10		
Prolin . . . . .	75	11		
Oxyprolin . . . . .	—	—	von 100° an	10 mm
Asparaginsäure . . . . .	126°	11	} von 100° an	5 mm
Glutaminsäure . . . . .	140°	10		
Oxyglutaminsäure . . . . .	—	—	—	—

Neuerdings (bei der Untersuchung des Zeins) teilt Da kin<sup>1)</sup> die vereinigten durch 3 malige Veresterung erhaltenen Ester in 3 Teile: a) bis 60° bei 10 mm, b) aus dem siedenden Wasserbade destilliert bei 2—3 mm, c) nichtdestillierbarer Rückstand.

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 130, S. 163. 1923.

## Verarbeitung der einzelnen Destillatfraktionen.

479. Der weiteren Beschreibung werden die Fraktionen zugrunde gelegt, die nach dem alten Verfahren von E. Fischer ohne Butylalkoholextraktion erhalten werden. Auch bei dem neuen Dakinschen Verfahren erhält man Gemische der Ester und muß die zugehörigen Aminosäuren voneinander trennen, schlägt dabei das gleiche Verfahren wie Fischer ein und geht von den gleichen Überlegungen aus, findet nur weniger Schwierigkeiten auf diesem Wege, da die Gemische einfacher zusammengesetzt, einzelne Aminosäuren bereits vollständig entfernt sind. Hier wird man also von der folgenden Darstellung abweichen und einfacher arbeiten dürfen.

a) Fraktion 1. Sie enthält hauptsächlich Alaninester und Glykokollester, soweit dieser letztere nicht schon vorher als Esterchlorhydrat entfernt ist. Von Valin-, Leucin- und Prolinestern finden sich höchstens geringe Mengen.

Die Verseifung geschieht durch (6—8stündiges) Kochen am Rückflußkühler mit der etwa 6fachen Menge Wasser bis zum Verschwinden der alkalischen Reaktion. Man dampft nun unter vermindertem Druck zur Trockne ein und kocht den Rückstand mit absolutem Alkohol aus. Über die Untersuchung der alkoholischen Lösung, welche das Prolin enthält, s. oben unter § 476. Von der in Alkohol unlöslichen Masse verestert man einen Teil (durch Übergießen mit der 5fachen Menge absoluten Alkohols und Einleiten gasförmiger trockener Salzsäure), kühlt die Lösung auf 0° ab und impft mit einem kleinen Krystall von Glykokollesterchlorhydrat. Erfolgt eine Krystallisation, so wird die Hauptmenge in derselben Weise behandelt, die Mutterlauge des Glykokollesterchlorhydrats im Vakuum zur Trockne verdampft, die Umwandlung der Chlorhydrate in die freien Ester nach § 477 b, die Verseifung in der eben beschriebenen Weise vorgenommen und die Lösung dann eingeeengt. Es bleibt meist Alanin zurück, das von etwa beigemengtem Valin und Leucin durch fraktionierte Krystallisation befreit werden kann. Zur Trennung von Glykokoll und Alanin kann auch die Schwerlöslichkeit des Glykokollpikrats<sup>1)</sup> benutzt werden. Man löst in möglichst wenig kochendem Wasser und fügt die 4fache Gewichtsmenge Pikrinsäure in warmem Alkohol gelöst hinzu. Das schwer lösliche Glykokollpikrat (Fp. 190°) krystallisiert beim Abkühlen aus. Oder man benutzt die Schwerlöslichkeit des carbaminoessigsäuren Bariums nach Siegfried<sup>2)</sup> oder die Schwerlöslichkeit der Glykokoll-Calciumchloridverbindung in Alkohol nach Pfeiffer<sup>3)</sup>. Ergab sich die Abwesenheit von Glykokoll, so sucht man direkt aus dem in heißem Alkohol unlöslichen Teil durch Krystallisation Alanin zu erhalten.

b) Fraktion 2. Sie kann Leucin-, Isoleucin-, Alanin-, Valin-, Glykokoll-, Prolinester enthalten.

Die Verseifung erfolgt wie bei Fraktion 1. Aus der Lösung scheidet sich (wenn es reichlicher vorhanden) Leucin in Form blättriger Krystalle ab. Man saugt ab, dampft im Vakuum zur Trockne ein und kocht den Rückstand mit absolutem Alkohol aus. Über die Untersuchung der alkoholischen Lösung, welche Prolin enthält, s. oben unter § 476. Der in Alkohol unlösliche Teil wird in heißem Wasser gelöst und die Lösung mit Tierkohle gekocht. Beim Abkühlen fällt Leucin aus, von dem man durch Einengen der Mutterlauge noch mehr gewinnt. Der Gang der weiteren Untersuchung besteht in der Darstellung möglichst zahlreicher Krystallisationen, welche getrocknet und in bezug auf ihren Schmelzpunkt sowie das Drehungsvermögen in saurer, neutraler und alkalischer Lösung untersucht werden. Die ersten Fraktionen bestehen meist aus reinem

<sup>1)</sup> Levene: Journ. of biol. Chem. Bd. 1, S. 413. 1906.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 44, S. 85. 1905. Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 39, 1, S. 400. 1906.

<sup>3)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 48, 1, S. 1045. 1915.

Leucin + Isoleucin. Dann folgen Gemische von Leucin und Valin und dann solche von Valin, Alanin und Glykokoll. Letzteres wird aus den am niedrigsten schmelzenden Fraktionen am besten als Esterchlorhydrat abgeschieden. Leucin, Isoleucin, Valin, Alanin trennt man am besten durch Darstellung ihrer Kupfersalze. Das schwer lösliche blaßblaue Kupfersalz des Leucins läßt sich verhältnismäßig leicht von den übrigen Kupfersalzen abtrennen. Die schnell ausführbare Bestimmung des Kupfergehaltes gibt einen Überblick über das etwa vorhandene Gemisch. Isoleucinkupfer läßt sich vermöge seiner Löslichkeit in Methylalkohol isolieren. Trennung über die Bleisalze (siehe folgenden Absatz) empfehlen Levene und van Slyke<sup>1)</sup>. (Abderhalden<sup>2)</sup> gelang sie nur bei nichtextremem Mengenverhältnis beider zueinander.)

Trennung von Valin, Leucin, Isoleucin. Sie verfahren zur Abtrennung des Valin von Leucin und Isoleucin folgendermaßen: Aus dem Kohlenstoffgehalt des Gemisches wird der Gehalt an Leucin und Isoleucin berechnet =  $\frac{\% C - 51,24}{3,68} \cdot 100 = \% \text{Leucin} + \text{Isoleucin}$

in der Mischung, wobei 51,24 = % C in Valin; 54,92 = % C in den Leucinen; 3,68 = 54,92 - 51,24 ist. Nun wird das gepulverte Gemisch in 7 Tl. kochenden Wassers suspendiert und auf je 1 g 1,5 ccm konzentriertes Ammoniak zugefügt. Unter Schütteln gehen die Aminosäuren in Lösung. Für jedes Gramm Leucin + Isoleucin gibt man 4 ccm einer 1,1 molaren Lösung von Bleiacetat langsam unter Schütteln zu. Es wird in Eiswasser gekühlt, nach 1—2 Stunden abgesaugt, der Niederschlag auf der Nutsche mit 90proz. Alkohol und Äther gewaschen und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet. Wenn die Mischung zu weniger als  $\frac{1}{3}$  ihres Gewichts aus Valin besteht, nimmt man nur 3,7 ccm Bleiacetat für je 1 g Leucin und Isoleucin, engt das Filtrat von Leucinblei im Vakuum ein, bis die Konzentration des Valins etwa 10% beträgt, fügt Ammoniak

Valin. hinzu, filtriert das ausfallende Leucinblei und wäscht wie oben angegeben. Valin wird aus dem Filtrat der Bleifällung gewonnen, indem dieses mit Schwefelwasserstoff vom Blei befreit und zur Trockne gebracht wird. Dem trockenen Rückstande wird dann durch ein Gemisch von Alkohol-Äther (3 : 1) die Essigsäure und das Ammonacetat entzogen. Die Reinheit der Bleisalze wird durch die Bleibestimmung kontrolliert. Ist der Bleigehalt zu hoch, so werden sie gepulvert, in 5 Tl. heißem Wasser +  $\frac{1}{4}$  Tl. Eisessig gelöst und mit 0,5 ccm konzentriertem Ammoniak auf je 1 g Bleisalz erneut gefällt. Aus der Bleifällung wird in essigsaurer Lösung mit Schwefelwasserstoff das Blei, mit Alkohol-Äther nach dem Trocknen des Rückstandes Essigsäure und Ammoniumacetat entfernt. Eine optische Bestimmung in 20proz. Salzsäure ergibt den

Leucin, Isoleucin. Gehalt an Leucin  $\left( = 100 \cdot \frac{37,4 - \alpha}{21,8} \right)$  und Isoleucin  $\left( = 100 \cdot \frac{\alpha - 15,6}{21,8} \right)$ . Zur präparativen Trennung der Isomeren werden die Kupfersalze hergestellt und mit 94 % Methylalkohol das darin lösliche isoleucinsäure Kupfer herausgeholt.

Trennung von Valin und Alanin.

Schwer trennbar ist das Gemisch von Valin und Alanin. Eine Kontrolle über die Reinheit liefert hier vor allem die Bestimmung des Drehungsvermögens der freien Aminosäure in Salzsäure. Levene und van Slyke<sup>3)</sup> benutzen zur Trennung die leichtere Löslichkeit des Valinphosphorwolframat in einer eiskalten Lösung, die 10% Schwefelsäure und 20% Phosphorwolframsäure enthält, und die geringere Löslichkeit des Valin in 80proz. wässrigem Aceton. Glykokoll bleibt beim Alanin, Leucin muß vorher entfernt werden. Das Ge-

<sup>1)</sup> Journ. of biol. Chem. Bd. 6, S. 391. 1909.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 71, S. 458. 1911.

<sup>3)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 16, S. 103. 1913/14.



misch der Aminosäuren wird wieder analysiert und aus dem Kohlenstoffgehalt der Gehalt an Valin berechnet. Es wird in 10proz. heißer Schwefelsäure gelöst, wobei man auf je 1 g Valin 30—40 ccm rechnet. Man fügt Phosphorwolframsäure zu, und zwar 14 g auf je 1 g Alanin, und dann noch 1 g für je 5 ccm der Lösung, die dabei heißgehalten wird. Dann wird gekühlt und für mindestens 24 Stunden bei 0° gehalten. Alaninphosphorwolframat scheidet sich aus; die überstehende Flüssigkeit wird abgegossen und die Abscheidung aus dem gleichen Volumen 10proz. Schwefelsäure umkrystallisiert, in der wieder auf je 5 ccm der Lösung 1 g Phosphorwolframsäure aufgelöst ist. Nach 24stündigem Stehen bei 0° wird wieder abgesaugt und aus dem Phosphorwolframat das Alanin mit einem Verluste von 5—10% isoliert. Hierzu wird seine Lösung mit Bleiacetat behandelt, das neue Filtrat einschließlich der Waschwässer so weit eingengt, daß das Volumen für je 1 g Alanin\*) 50 ccm beträgt, mit dem gleichen Volumen 95proz. Alkohols versetzt und 1 Stunde am Wasserbade zur Entfernung der Reste vom Bleisulfat erwärmt. Das mit Schwefelwasserstoff bleifrei gemachte Filtrat wird im Vakuum zur Trockne gebracht; der Rückstand ist von Valin freies Alanin (unter Umständen gemengt mit Glykokoll). Zur Isolierung von Valin werden die phosphorwolframsauren Mutterlaugen ebenso mit Bleiacetat behandelt und die bleifreie Stammlösung eingengt bis zur beginnenden Krystallisation von Valin. Man fügt das 2—3fache Volumen 80proz. Acetons hinzu und läßt 12 Stunden stehen. Valin krystallisiert mit einem Verluste von 15—20% aus. Die Mutterlaugen werden in gleicher Weise noch einmal aufgearbeitet.

Eine absolut scharfe Trennung von Leucin, Isoleucin, Valin und Alanin gibt es zur Zeit nicht. Man wird stets Zwischenfraktionen erhalten, welche zwar ganz überwiegend aus einer Aminosäure bestehen, aber noch nicht ganz rein sind.

c) Fraktion 3. Sie enthält bei den meisten Proteinen reichliche Mengen von Leucin- und Isoleucin-, ferner Glykokoll-, Alanin-, Valin-, Prolinester.

Die Verseifung erfolgt wie bei Fraktion 1. Aus der Lösung scheidet sich (bei den meisten Proteinen) viel Leucin und Isoleucin ab. Man saugt ab, dampft im Vakuum zur Trockne ein und kocht den Rückstand mit absolutem Alkohol aus. Über die Untersuchung der alkoholischen Lösung, welche das Prolin enthält, s. weiter oben § 476. Der in Alkohol unlösliche Teil besteht bei guter Fraktionierung im wesentlichen nur aus Leucin, Isoleucin und Valin, deren Trennung wie bei der Fraktion 2 durch fraktionierte Krystallisation der Aminosäuren selbst oder ihrer Kupfersalze erfolgt.

Meist genügt zur Identifizierung die Feststellung des Schmelzpunktes, der spezifischen Drehung und die Analyse. Unter Umständen empfiehlt es sich, für diesen Zweck oder auch zur völligen Reinigung eines der für die einzelnen Aminosäuren charakteristischen Derivate darzustellen.

d) Fraktion 4. Sie enthält die Ester des Serin, Oxyprolin, Phenylalanin, der Asparaginsäure und der Glutaminsäure, falls letztere nicht schon als salzsaures Salz abgeschieden ist; bei dem Dakinschen Verfahren besteht sie fast ausschließlich aus den Estern von Leucinresten, Phenylalanin und Serin.

Zur Entfernung des Phenylalaninesters versetzt man das Gemisch mit der etwa 5fachen Menge Wasser (bei reichlicher Anwesenheit des Esters nimmt das Wasser durch den in Tropfen ausfallenden Ester milchige Beschaffenheit an) und schüttelt mit Äther. Dies ist der beste Weg zur Trennung des Leucin

\*) 100 ccm obiger Phosphorwolframatlösung lösen bei 0° 0,15 g des Alanin- und 1,2 g des Valinsalzes.

Phenylalanin. vom Phenylalanin. Der Äther, welcher den Ester des Phenylalanin enthält, wird abgetrennt, mehrmals mit dem gleichen Volumen Wasser gewaschen und abdestilliert, der Rückstand durch wiederholtes Abdampfen mit rauchender Salzsäure verseift. Das zurückbleibende salzsaure Phenylalanin wird durch Umkrystallisieren aus Salzsäure gereinigt. Die wässerige Lösung enthält bei dem Dakin-Verfahren u. a. die Ester von Leucin und Phenylalanin. Sie wird zur Verseifung wie bei Fraktion 1 behandelt. Man wird die Aminosäuren möglichst weitgehend durch direkte Krystallisation aus Wasser voneinander trennen \*). Das untrennbare übrigbleibende Gemisch muß dann wieder verestert und wie oben behandelt werden.

Als eine bequeme Methode für die endgültige Reinigung des Phenylalanins gibt Dakin<sup>1)</sup> folgendes Verfahren an: Das rohe gefärbte Phenylalanin wird in einem Minimum von Jodwasserstoffsäure (spez. Gew. 1,7) gelöst, die Lösung mit dem 5fachen Volumen Alkohol verdünnt und dann mit methylalkoholischem Ammoniak gerade neutralisiert. Das Phenylalanin wird mit sehr geringem Verlust gefällt und gut mit Alkohol und Äther ausgewaschen, während das Ammoniumjodid in der obigen Mischung leicht löslich ist.

Für die Trennung der Dicarbonsäuren und Serin s. auch weiter unten unter § 481, 482. E. Fischer ging folgendermaßen vor: Die durch Äther von Phenylalaninester befreite wässerige Lösung zusammen mit dem zum Waschen des Äthers benutzten Wasser wird mit etwa der doppelten Gewichtsmenge reinem umkrystallisierten Baryt versetzt und durch 2stündiges Erwärmen auf dem Wasserbade verseift. Man läßt nun die Lösung am besten mehrere Tage bei gewöhnlicher Temperatur stehen. Allmählich krystallisiert neben Baryt das Asparaginsäure. Bariumsalz der racemischen Asparaginsäure in feinen Krystalldrusen aus. Es wird abfiltriert, durch Kochen mit Schwefelsäure zersetzt und die überschüssige Schwefelsäure aus verdünnter Lösung quantitativ mit Barytwasser entfernt. Beim Eindampfen des Filtrats erhält man direkt reine Asparaginsäure. Aus der Mutterlauge von asparaginsaurem Baryt fällt man den Baryt quantitativ mit Schwefelsäure, engt dann das Filtrat vom Bariumsulfat am besten unter vermindertem Druck stark ein, leitet gasförmige Salzsäure bis zur Sättigung ein und läßt bei 0° 48 Stunden stehen: Es scheidet sich die Glutaminsäure. Glutaminsäure als salzsaures Salz ab. Aus der eingengten Mutterlauge sucht man weitere Krystallisationen zu erhalten. Sie werden mit der ersten Ausscheidung vereinigt, aus heißer Salzsäure umkrystallisiert und schließlich über Kalk und Schwefelsäure getrocknet.

Die Mutterlauge der Glutaminsäure (die des Rohprodukts und die beim Umkrystallisieren gewonnene) werden unter vermindertem Druck völlig zur Trockne verdampft. Der Rückstand wird durch wiederholtes Aufnehmen in Wasser und Eindampfen von möglichst viel Salzsäure befreit, dann in Wasser gelöst und die Lösung so lange mit gelbem Bleioxyd gekocht, bis keine Chlorreaktion mehr auftritt, darauf filtriert und mit Schwefelwasserstoff behandelt. Aus dem Filtrat vom Schwefelblei, welches Asparaginsäure und Serin enthält, läßt sich erstere durch Einengen abscheiden. Das Serin rein zu erhalten, ist schwierig. Am besten gelingt seine Abscheidung, wenn man, nach Entfernung der Hauptmenge der Asparaginsäure durch Krystallisation, die saure Lösung mit n-Natronlauge genau neutralisiert und einengt. Es krystallisiert oft Serin aus. Wiederholt wurde mit Vorteil die  $\beta$ -Naphthalinsulfomethode (S. 222) zur Isolierung des Serins benutzt.

\*) Dies Verfahren, das bei der einfacher aufgebauten, im besonderen der Leucin-Isomeren ermangelnden Gelatine von Erfolg begleitet war, versagt jedoch vielfach bei anderen Proteinen.

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 130, S. 164. 1923.

e) Destillationsrückstand. Er erstarrt meist nach dem Abkühlen zu einer zähen hell- bis dunkelrotbraunen Masse und enthält neben unbekanntem Zersetzungsprodukten kleine Mengen Anhydride, z. B. Leucinimid und gelegentlich auch reichlich Serinanhydrid, welche sekundär aus den Estern entstanden sein dürften, sowie Glutaminsäureester in oft reichlichen Mengen und Oxyprolin. Auch geringe Mengen von Leucin- und Phenylalaninester sind in ihm gefunden worden.

Zur Isolierung der Glutaminsäure, deren Menge oft beträchtlicher ist als in den Destillaten, löst man den Rückstand in Wasser und kocht mit überschüssigem Baryt mehrere Stunden (bis zu 16 Stunden) am Rückflußkühler. Nach Entfernung des Bariums als Bariumsulfat wird das Filtrat stark eingeeengt, mit Salzsäure gesättigt und abgekühlt. Die sich jetzt und weiter aus der eingeeengten Mutterlauge abscheidende salzsaure Glutaminsäure wird aus Salzsäure umkrystallisiert.

#### Isolierung von Oxyprolin.

480. Es findet sich dem Serin beigemischt unter den Estern, die bei 100° und 10 mm noch nicht übergehen, ferner beim Arbeitsgang nach E. Fischer im Destillationsrückstand. Aus diesem läßt es sich nach § 481a gewinnen. Besser ist die neue Arbeitsweise von Dakin: Die bei der Extraktion mit Butylalkohol unter vermindertem Druck angefallenen Aminosäuren, denen das in Äthylalkohol lösliche Prolin entzogen ist (§ 476), werden mit 90proz. Methylalkohol ausgekocht, wobei Oxyprolin in Lösung geht. Mit diesen Auszügen wird der propylalkoholische Auszug (S. 562 oben) vereinigt, die Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in Wasser gelöst und auf ein bestimmtes Volumen gebracht. Der Unterschied im Gehalt an Gesamtstickstoff nach Kjeldahl und Aminostickstoff nach van Slyke gibt ein Maß für die vorhandene Menge Oxyprolin. Abtrennen basischer Bestandteile durch Phosphorwolframsäure bei schwefelsaurer Reaktion und Entfernen des Überschusses beider Reagenzien mit Baryt und Kohlensäure, Abtrennen des größten Teiles der Monaminosäuren durch Quecksilberacetat und Baryt (§ 476). Das Filtrat wird wie oben von Quecksilber und Baryt befreit und im Vakuum eingeeengt, wobei Oxyprolin zum Teil auskrystallisiert. Ein weiterer Teil kann über das Hydantoin gewonnen werden, da die Uraminosäure vom Oxyprolin in Äther nicht löslich ist. Zu diesem Zwecke werden die Mutterlauge mit Kaliumcyanat versetzt, wobei eine dem vorhandenen Oxyprolin gleiche Gewichtsmenge im 5fachen Volumen Wasser gelöst wird. Nach mehrstündigem Stehen an einem warmen Orte und weiterem Hinzufügen von Cyanat in kleinen Mengen wird 1 Stunde lang im kochenden Wasserbade gehalten, dann mit Schwefelsäure eben kongosauer gemacht und im Soxhlet mit Äther erschöpft. Die wässrige Lösung wird dann mit Salzsäure stark angesäuert und auf dem Wasserbade verdampft, wobei sich das Hydantoin des Oxyprolins bildet. Es wird mit wenig Wasser aufgenommen und wiederum mit Äther erschöpft; die Extraktion geht nur langsam vor sich, da das Hydantoin sich auch in Wasser leicht löst. Umkrystallisieren des Ätherrückstandes durch Verdunstenlassen der wässrigen Lösung oder durch Lösen in sehr wenig Alkohol und Zufügen von Benzol. Rückverwandlung in halbracemisiertes Oxyprolin durch 36stündiges Kochen mit 10proz. Baryt.

#### Isolierung von Serin.

481. Es steckt in den hochsiedenden Fraktionen (s. unter § 479 d u. e) bei den wasserlöslichen Estern und begleitet bei der Aufarbeitung nach Dakin das

Oxyprolin. Aus dessen Mutterlaugen durch direkte Krystallisation es zu gewinnen gelingt meist nicht. Eine sichere Methode zu seiner Isolierung gibt es noch nicht. Zu versuchen ist sie über die Darstellung des Naphthalinsulfoderivates und des Pikrolonates und die Aufarbeitung der extrahierten Stammlösung nach Foreman (§ 482).

Der von den Aminosäureestern durch Ausäthern möglichst befreite Rückstand (s. § 477 b, a).

481 a. In ihm finden sich Hexonbasen und etwa vorhandenes Oxyprolin<sup>1)</sup>. Er wird in der § 477 b beschriebenen Weise (Einengen seiner wässerigen Lösung und Einleiten von Salzsäuregas) möglichst von Salzen und durch Einengen unter vermindertem Druck möglichst von Salzsäure befreit. Darauf löst man in so viel Wasser, daß die Lösung etwa 1% an organischer Substanz enthält, fügt Schwefelsäure bis zu etwa 5% hinzu, fällt mit etwa 10proz. Phosphorwolframsäure, saugt den Niederschlag ab und preßt ihn stark aus. Aus dem Niederschlag lassen sich nach Zerlegung mit Baryt die Hexonbasen gewinnen (§ 483). Das Filtrat wird von der Phosphorwolframsäure durch Baryt und vom überschüssigen Barium durch Schwefelsäure befreit, im Vakuum stark eingengt und zur Entfernung von Salzsäure mit überschüssigem Silbersulfat geschüttelt. Man filtriert, fällt das gelöste Silber genau mit Salzsäure und die Schwefelsäure mit Baryt und engt dann im Vakuum bis zum Sirup ein. Oxyprolin krystallisiert nach längerem Stehen aus. Es kann auch als  $\beta$ -Naphthalinsulfoverbindung (S. 222) nachgewiesen werden.

#### *Verarbeitung der extrahierten Stammlösung.*

482. Sie enthält die Dicarbonsäuren und die Hexonbasen, außerdem Glykokoll\*). Oxyprolin und Serin sind zweckmäßig durch aufeinanderfolgende Extraktion mit Butyl- und Propylalkohol unter vermindertem Druck entfernt worden. Etwa jetzt in der Stammlösung auskrystallisiertes Glykokoll wird abgesaugt, das Filtrat mit Wasser verdünnt und das Extraktionsmittel durch Kochen entfernt. Die Hexonbasen werden mit Phosphorwolframsäure abgetrennt, dabei wird aber ein Teil der Dicarbonsäuren mitgerissen. Deshalb teilt man besser die wässrige Lösung und bestimmt in dem einen Teil die Dicarbonsäuren gesondert, siehe a). Über die Bestimmung der Hexonbasen im anderen Teil s. § 483; über die Darstellung der Dicarbonsäuren aus dem Filtrat der Hexonbasenfällung siehe b).

#### Isolierung der Dicarbonsäuren (und des Glykokoll).

a) Aus einem aliquoten Teil der extrahierten Stammlösung. Die wässrige Lösung wird eingengt und mit Salzsäuregas bei 0° gesättigt. Glutaminsäure. Es wird mit Glutaminsäurechlorhydrat geimpft und bei 0° bis zur Beendigung der Krystallisation stehen gelassen. Die Krystalle werden dann abgesaugt und mit konzentrierter Salzsäure gewaschen. Die Filtrate werden eingengt und wieder in der Kälte mit Salzsäuregas gesättigt, geimpft und so noch weitere Mengen von Glutaminsäurechlorhydrat abgetrennt. Hat man zu weit eingengt und ist viel Glykokoll vorhanden, so kann hier schon dessen salzsaures Salz ausfallen. Die Analyse der Krystalle gibt Aufschluß; sie werden durch Umkrystallisieren aus konzentrierter Salzsäure gereinigt, die anfallende

\*) Wahrscheinlich sämtliches, wenn bei 10 mm extrahiert worden war.

<sup>1)</sup> E. Fischer: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 35, 3, S. 2660. 1902.

Mutterlauge mit der obigen vereinigt. Unter günstigen Umständen kann so fast alle Glutaminsäure erhalten werden.

Die Mutterlaugen werden im Vakuum unter Zusatz von Wasser wiederholt eingedunstet, damit die überschüssige Salzsäure entfernt wird. Der Rückstand wird dann in etwa 10 Tl. heißen Wassers gelöst und mit einem abgekühlten Brei von frischgelöschtem Calciumoxyd geschüttelt und dann so viel 95proz. Alkohol in Portionen dazugegeben, bis bei weiterem Zusatz keine Fällung mehr entsteht<sup>1)</sup>. Die zerfließlichen Kalksalze werden abgesaugt, mit Alkohol ausgewaschen, dann in Wasser gelöst und mit Oxalsäure der Kalk quantitativ entfernt. Die vom Calciumoxalat befreite Lösung wird am Rückflußkühler im Kochen gehalten und dabei portionsweise mit frischgefälltem, gut ausgewaschenem Bleihydroxyd versetzt<sup>2)</sup>, bis sie gegen Lackmus alkalisch reagiert. Es wird noch 15 Minuten länger gekocht und über Nacht in die Kälte gestellt. Es scheidet sich neben Bleichlorid asparaginsaures Blei aus. Der Niederschlag wird abgesaugt und mit kaltem Wasser ausgewaschen; er wird statt wie gewöhnlich mit Schwefelwasserstoff bequemer mit einem kleinen Überschuß von Schwefelsäure zerlegt. Die Lösung wird vom Bleisulfat befreit und mit einem Überschuß von Bariumcarbonat (gefällt, alkalifrei) gekocht, filtriert und auf ein solches Volumen gebracht, daß jedem Gramm in Arbeit genommenen Proteins etwa 1 ccm der Lösung entspricht. Der Stickstoffgehalt nach Kjeldahl ergibt den ungefähren Gehalt an Asparaginsäure. Man fügt 1,5 Mol. einer heißen konzentrierten Lösung von essigsäurem Kupfer hinzu und läßt zur Abscheidung des asparaginsauren Kupfers mehrere Tage in der Kälte stehen.

Die Mutterlaugen vom asparaginsauren Blei und Kupfer werden vom Schwermetall mit Schwefelsäure und Schwefelwasserstoff befreit, die Filtrate vereinigt, auf ein geeignetes Volumen gebracht (z. B. das 3—4fache vom Gewicht des in Arbeit genommenen Proteins), mit 4 Vol.-% Schwefelsäure versetzt, mit Phosphorwolframsäure die Hexonbasen entfernt, im Filtrat mit Baryt die Schwefelsäure und die Phosphorwolframsäure und im neuen Filtrat das überschüssige Barium durch Schwefelsäure ausgefällt. Die jetzt erhaltene Lösung dient zur Isolierung der  $\beta$ -Oxyglutaminsäure<sup>3)</sup> (s. unten) aus Casein.

b) Aus dem Filtrat der Basenphosphorwolframate (§ 483). Schwefelsäure und Phosphorwolframsäure werden mit Baryt entfernt, im Filtrat fester Baryt aufgelöst (auf je 100 g Eiweiß 80 g Barythydrat) und die stark alkalische Lösung mit dem 10fachen Volumen 95proz. Alkohol gefällt. Der Niederschlag enthält die Bariumsalze sämtlicher Dicarbonsäuren und einen Teil vom Glykokoll; er wird mit Alkohol gründlich ausgewaschen, in Wasser gelöst und mit Schwefelsäure vom Barium befreit. Die Lösung wird im Vakuum stark eingeeengt und mehrere Tage bei  $-10^{\circ}$  stehen gelassen. Dicarbonsäuren krystallisieren aus. Der Rest wird aus der Mutterlauge auf folgende Weise gewonnen: Sie wird verestert; von den Estern wird übergetrieben, was bei 5 mm und  $100^{\circ}$  flüchtig ist. Der Kolbenrückstand wird mit Baryt verseift, Barium mit Schwefelsäure ausgefällt, das Filtrat mit Natronlauge neutralisiert und dann abwechselnd mit Silbernitrat und Natronlauge versetzt, solange noch eine weiße Fällung entsteht. Der Niederschlag wird auf Oxyglutaminsäure verarbeitet, das Filtrat entsilbert, eingeeengt und bei  $-10^{\circ}$  stehen gelassen. Es

<sup>1)</sup> Foreman: Biochem. Journ. Bd. 8, S. 463. 1914; ref. Chem. Zentralbl. 1916, I, S. 1097. — Biochem. Journ. Bd. 12, S. 290. 1918.

<sup>2)</sup> Levene u. van Slyke: Journ. of biol. chem. Bd. 8, S. 285. 1910.

<sup>3)</sup> Dakin: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 130, S. 165. 1923.

Asparagin- und  
Glutaminsäure. krystallisiert ein Rest von Asparaginsäure und Glutaminsäure, der nach a) aufgeteilt wird. Das Mengenverhältnis beider Säuren zueinander kann auch aus dem Stickstoffgehalt und Basenäquivalentgewicht (gegen Phenolphthalein titriert) ermittelt werden.

c) Bestimmung von Glykokoll. Ohne Rücksicht auf die Gegenwart anderer Aminosäuren wird der Rückstand, den das Filtrat der Basenphosphorwolframate nach Entfernung der beiden Säuren enthält, verestert und das Glykokoll als Esterchlorhydrat abgeschieden. Von den freien Estern wird nur die Fraktion, die bei 9 mm bis 65° übergeht, auf Glykokollesterchlorhydrat bzw. Glykokoll verarbeitet.

Im Gemisch mit Asparaginsäure und Glutaminsäure läßt sich Glykokoll nach Siegfried als Dithiocarbonsäuremonobenzylester gut abtrennen<sup>1)</sup>.

d)  $\beta$ -Oxyglutaminsäure<sup>2)</sup>. Sie läßt sich bei Proteinen wie Casein, die daran reich sind, einfach gewinnen; bei anderen Proteinen ist sie meist noch mit Glutaminsäure vereinigt, die erst abgetrennt werden muß. Die Lösung s. oben unter b) enthält immer etwas Chlorionen, die nach schwachem Ansäuern mit Salpetersäure durch Silbernitrat entfernt werden. Aus dem Filtrat wird durch abwechselnden Zusatz von konzentrierter Silbernitratlösung und von Natronlauge (etwa  $\frac{1}{1}$ ) ein weißes Silbersalz gefällt. Starker Überschuß von Lauge zersetzt das Silbersalz, es ist zum Schluß durch beigemengtes Silberoxyd leicht braun gefärbt; es wird an der Pumpe abgesaugt, mit kaltem Wasser gewaschen, in Wasser aufgeschwemmt und mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Bei starkem Einengen des Filtrats im Vakuum krystallisiert Oxyglutaminsäure in dicken Prismen. Zur Entfernung der Mutterlauge wird der Brei mit einer Mischung von 1 Tl. Eisessig und 4 Tl. Methylalkohol angerührt, abgesaugt, mit der Mischung und zum Schluß mit Methylalkohol gewaschen. Umkrystallisieren aus Wasser.

Hat das Silbersalz auch das der Glutaminsäure enthalten, so wird diese als basisches Zinksalz nach Kutscher<sup>3)</sup> entfernt. Die Lösung wird mit überschüssigem Zinkoxyd gekocht und nach dem Abkühlen filtriert. Der Niederschlag, der aus glutaminsaurem Zink und Zinkoxyd besteht, wird in verdünnter Essigsäure warm gelöst und in die siedende Lösung Schwefelwasserstoff eingeleitet. Beim Einengen des Filtrats krystallisiert Glutaminsäure aus.

Das Filtrat wird auf die gleiche Weise vom Zink befreit. Oxyglutaminsäure krystallisiert aber beim Einengen auch nicht rein aus; zur Reinigung wird das Strychninsalz bereitet, indem in die heiße wässrige Lösung der Säure Strychnin eingetragen wird, bis lackmusneutrale Reaktion eingetreten ist, wobei von Zeit zu Zeit durch Zusatz von kleinen Mengen Methylalkohol die Base in Lösung gebracht wird. Die neutrale Lösung wird im Vakuum zur Trockne gebracht und 2 mal aus dem 12fachen Volumen wasserhaltigem n-Butylalkohol umkrystallisiert. Das Strychninsalz wird dann mit Natronlauge zersetzt, die Base abfiltriert, das in Lösung gebliebene Alkaloid mit Amylalkohol extrahiert und die wässrige Lösung mit Quecksilberacetat bei neutraler Reaktion gefällt. Der Niederschlag wird mit Schwefelwasserstoff zerlegt, aus dem Filtrat krystallisiert dann die Oxyglutaminsäure, wenn vorsichtig unter Vermeiden von höherer Temperatur eingengt wird.

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 70, S. 160. 1910/11.

<sup>2)</sup> Dakin: Biochem. Journ. Bd. 12, S. 307. 1918. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 130, S. 165. 1923.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 38, S. 117. 1903.

### Isolierung der Hexonbasen\*) (Arginin, Lysin und Histidin) aus der hydrolytischen Zersetzungsflüssigkeit der Proteine nach Kossel und Kutscher<sup>1</sup>).

483. 2—5 g Protamin oder 25—50 g anderer Proteinkörper\*\*) (je nach dem Basenreichtum des benutzten Materials) werden mit einer Mischung von dem 3fachen Gewicht konzentrierter Schwefelsäure und dem 6fachen Gewicht Wasser 14 Stunden am Rückflußkühler gekocht. Die Flüssigkeit wird mit Wasser verdünnt und wenn nötig von Huminstoffen durch Filtrieren befreit. Man kann nun die Hexonbasen gemeinsam mit Phosphorwolframsäure ausfällen und dann erst die aus dem Niederschlag regenerierte Basenlösung mit Silber und Baryt aufteilen; es wird dabei Silber gespart. Die Silberbarytfällung läßt sich aber auch unmittelbar mit dem Hydrolysat durchführen. Es wird mit einer heißen konzentrierten Barytlösung alkalisch gemacht, filtriert, mit Schwefelsäure angesäuert, wieder filtriert, in einem geräumigen Kolben auf etwa 1 l aufgefüllt und kalt mit kochendheißer Silbersulfatlösung\*\*\*) allmählich unter zeitweisem kräftigen Umschwenken solange versetzt, bis ein Tropfen in einem mit Barytwasser gefüllten und auf dunkler Unterlage stehendem Uhrglase nicht mehr eine weiße oder hellgelbe, sondern sofort eine braungelbe Fällung hervorruft. Man kühlt jetzt gut ab, sättigt mit gepulvertem Ätzbaryt (es soll auch nach längerem Umschwenken etwas ungelöster Ätzbaryt am Boden liegen), läßt den Niederschlag absitzen, saugt ihn ab, zerreibt ihn samt Filter in einer Reibschale unter Zufügen von gereinigtem Seesand mit Barytwasser, saugt nochmals ab und wäscht mit barythaltigem Wasser gründlich aus. Der Niederschlag (A) enthält Histidin und Arginin, die Flüssigkeit (B) Lysin.

A. Der Niederschlag (Histidin und Arginin) wird in schwefelsäurehaltigem Wasser mit Hilfe von Sand fein zerrieben und mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Die Flüssigkeit wird durch Kochen von Schwefelwasserstoff befreit, der Niederschlag (Schwefelsilber und Bariumsulfat) abgesaugt und wiederholt ausgekocht, Filtrat und Waschwasser auf etwa 1 l eingedampft, mit Barytwasser genau neutralisiert, mit Bariumnitratlösung versetzt, solange noch ein Niederschlag entsteht, und filtriert. Das auf etwa 300 ccm eingedampfte Filtrat versetzt man in einem Kolben nach Ansäuern mit Salpetersäure mit konzentrierter Silbernitratlösung, bis eine Tropfenprobe (in der oben beschriebenen Weise geprüft) mit Barytwasser einen braungelben Niederschlag gibt. Nun wird mit Barytwasser schwach sauer oder eben neutral gemacht, aufgeschwemmtes Bariumcarbonat zugesetzt und zunächst im Wasserbade angewärmt, dann auf dem Drahtnetz zum einmaligen Aufkochen erhitzt. Die Flüssigkeit soll jetzt Phenolphthalein röten, Thymolphthalein noch nicht bläuen. Nach dem Erkalten

\*) Unter diesem Namen faßt Kossel<sup>2</sup>) Arginin, Lysin und Histidin zusammen.

\*\*) Es sind das die Mengen, welche Kossel und Kutscher für die quantitative Bestimmung der Hexonbasen benutzten. Der oben beschriebene Gang läßt sich leicht quantitativ gestalten und mit einer Bestimmung des Ammoniaks und Melaninstickstoffs verbinden, s. darüber die Originalarbeit. Die Ausbeuten sind natürlich nur geringe. Zur Gewinnung größerer Mengen Hexonbasen ist mehr basenreiches Ausgangsmaterial zu verwenden. Über die präparative Darstellung s. die einzelnen Hexonbasen.

\*\*\*) Verzichtet man bei der präparativen Darstellung der Basen auf die Stickstoffbestimmungen in den Lösungen, so nimmt man hier bequemer das leichter lösliche Silbernitrat. Bis zur völligen Nitratfreiheit läßt sich aber der Niederschlag meist nicht waschen.

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 31, S. 165. 1900/01. Eine genaue Beschreibung dieses Verfahrens unter Berücksichtigung von Verbesserungen von Kossel (Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 49, S. 318. 1906), Steudel (desgl. Bd. 37, S. 219. 1902/03; Bd. 44, S. 157. 1905), Kossel u. Weiß (desgl. Bd. 68, S. 167; Anm. 3. 1910), Kossel u. Edlbacher (desgl. Bd. 110, S. 241. 1920), Weiß (desgl. Bd. 52, S. 107. 1907) und Steudel (Abderhaldens biolog. Arbeitsmethoden, Teil I, 7, S. 203. 1922).

<sup>2</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 25, S. 175. 1898.

und Absitzen filtriert man ab und wäscht mit ganz schwachem Barytwasser (5—6 Tropfen einer 5proz. Ätzbarytlösung auf 100 ccm Wasser) bis zum Verschwinden der Salpetersäurereaktion sorgfältig aus. Der Niederschlag enthält Histidin (a), das Filtrat Arginin (b).

a) Der Niederschlag (Histidinsilber) wird im Kolben mit schwefelsäurehaltigem Wasser in der Hitze bis zur sauren Reaktion versetzt und durch Schwefelwasserstoff zersetzt. Man kocht zur Entfernung des Schwefelwasserstoffs, filtriert, kocht den Niederschlag aus, dampft Filtrat und Waschwasser auf etwa 250 ccm ein, bestimmt den Stickstoffgehalt der Lösung, entfernt die Schwefelsäure durch Ätzbaryt, den überschüssigen Ätzbaryt durch Kohlensäure und dampft ein. Aus der nochmals filtrierten und nötigenfalls von Barytspuren durch wenige Tropfen verdünnter Schwefelsäure befreiten Flüssigkeit, welche etwa 10 ccm betragen soll, scheidet sich das Histidin auf Zusatz eines geringen Überschusses von in wenig heißem Alkohol gelöster Pikrolonsäure allmählich als Histidinmono- oder -dipikrolonat ab, je nachdem man etwas mehr Pikrolonsäure zugefügt hat, als aus dem Stickstoffgehalt der Lösung für 1 oder 2 Mol. berechnet ist. Zum Identifizieren eignet sich die Überführung in Histidindichlorid.

b) Das argininenthaltende Filtrat wird mit gepulvertem Ätzbaryt gesättigt\*), der Niederschlag abgesaugt, nochmals mit Barytwasser verrieben, wieder abgesaugt und bis zum Verschwinden der Salpetersäurereaktion ausgewaschen. Man reibt ihn jetzt mit schwefelsäurehaltigem Wasser bis zur sauren Reaktion an, zersetzt ihn mit Schwefelwasserstoff, entfernt den Schwefelwasserstoff durch Kochen, filtriert und dampft Filtrat und Waschwasser auf etwa 500 ccm ein und bestimmt den Stickstoffgehalt der Lösung. Man entfernt nun die Schwefelsäure in der Hitze mit Barytwasser, den überschüssigen Baryt mit Kohlensäure, dampft ein, filtriert, entfernt nötigenfalls Spuren von Baryt mit wenigen Tropfen verdünnter Schwefelsäure, bringt die Flüssigkeit auf etwa 10 ccm und scheidet das Arginin durch Zufügen von etwas mehr als der berechneten Menge Pikrolonsäure (in wenig heißem Alkohol gelöst) als Arginin pikrolonat ab. Zum Identifizieren wird in das Dinitrat- oder Kupfernitratdoppelsalz übergeführt.

B. Die Flüssigkeit (Lysin) wird mit Schwefelsäure angesäuert, durch Schwefelwasserstoff vom Silber befreit, filtriert, auf etwa 500 ccm eingedampft, mit Schwefelsäure bis zu einem Gehalt von 5% versetzt und mit Phosphorwolframsäure ausgefällt. Der abgesaugte Niederschlag wird mit 5proz. Schwefelsäure angerieben, wieder abgesaugt und ausgewaschen, dann mit Barytwasser zerlegt, das Filtrat durch Kohlensäure vom Baryt befreit, bis fast zur Trockne eingedampft, mit Wasser aufgenommen, filtriert, der Stickstoffgehalt der Lösung bestimmt und nochmals eingedampft. Den Rückstand rührt man jetzt mit einer geringen Menge alkoholischer Pikrinsäure unter Zusatz von Alkohol an und fügt solange kleine Portionen alkoholischer Pikrinsäure zu, als noch weiterer Niederschlag eintritt und feuchtes Lackmuspapier noch nicht gerötet wird. Ein Überschuß von alkoholischer Pikrinsäure muß vermieden werden, da dieser das Lysin pikrat wieder in Lösung bringt. Nach mehrstündigem Stehen wird abfiltriert, mit wenig absolutem Alkohol gewaschen, in siedendem Wasser gelöst und die Lösung eingedampft. Es krystallisiert Lysin pikrat aus. Man erhält

\*) Ist man bei der Hydrolyse nicht von reinem Eiweiß ausgegangen, so wird nur bis zur deutlichen Bläuung von Thymolphthalein mit Baryt versetzt, da bei stärker alkalischer Reaktion auch andere Basen als Silberverbindung ausfallen<sup>1)</sup>.

<sup>1)</sup> Kossel und Edlbacher. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 110, S. 241. 1920.



häufig kaum die Hälfte der Menge Lysinpikrat, die aus dem Stickstoffgehalt der Lösung berechnet ist. Die Mutterlaugen werden nach Entfernung der Pikrinsäure nochmals mit Phosphorwolframsäure gefällt und der Niederschlag auf Lysinpikrat verarbeitet.

Bemerkung. In der Histidinfraktion finden sich unter Umständen, z. B. bei der Autolyse von Organen (§ 724), Thymin, Uracil, Cytosin und Guanidin, in der Argininfraktion Methylguanidin, Kreatinin, beim Lysin wird Ornithin angetroffen, außerdem die mit der Phosphorwolframsäure ausgefällten Monaminosäuren sowie Cholin.

Andere Basen in den einzelnen Fraktionen.

Soeben geben Foster und Schmidt<sup>1)</sup> ein Verfahren zur elektrolytischen Abscheidung der Basen aus der Hydrolysenflüssigkeit und zur Trennung des Histidins von den beiden anderen Basen an, Kossel und Groß<sup>2)</sup> eine neue quantitative Fällung des Arginins (mit einer Dinitronaphtholsulfosäure).

Andere Trennungsverfahren.

### Isolierung einzelner Aminosäuren.

#### *Isolierung von Glutaminsäure.*

484. Die wie oben angegeben (§ 475) mit Salzsäure hydrolysierte Flüssigkeit (500 g Eiweiß\*), 1500 ccm rauchende Salzsäure) wird mit viel Tierkohle aufgekocht, filtriert und unter vermindertem Druck stark eingengt. Man sättigt mit gasförmiger Salzsäure, impft die salzsaure Lösung mit einem Kryställchen von salzsaurer Glutaminsäure und läßt bei 0° stehen. War die Lösung nicht zu stark eingengt und nicht zu sehr verunreinigt, so krystallisiert das Chlorhydrat der Glutaminsäure in großen reinen Krystallen aus. Ist das nicht der Fall, scheiden sich nur feine Kryställchen ab, welche sich schlecht absaugen lassen, oder erfolgt die Krystallisation unvollkommen, so liegt der Grund oft in der starken Dunkelfärbung. Man erreicht dann oft eine gute Entfärbung, wenn man zunächst durch völliges Einengen der mit Wasser verdünnten Lösung unter vermindertem Druck, Aufnehmen des Rückstandes in Wasser und abermaliges Verdampfen möglichst viel Salzsäure entfernt und dann mit Tierkohle kocht. Gelingt das nicht, dann entfernt man die Hauptmenge der Salzsäure durch Schütteln mit überschüssigem Kupferoxydul, filtriert, leitet Schwefelwasserstoff ein und filtriert wieder. Aus der nun nur leicht gelbgefärbten Flüssigkeit läßt sich nach Einengen und Sättigen mit Salzsäure die salzsaure Glutaminsäure in mehreren Krystallfraktionen leicht und vollständig gewinnen.

Jones und Johns<sup>3)</sup> lösen das rohe Glutaminsäurechlorhydrat in Wasser, entfärben mit Tierkohle, machen mit Baryt alkalisch und kochen alles Ammoniak fort, entfernen dann wieder quantitativ den Baryt mit Schwefelsäure und engen zur Krystallisation ein.

#### *Isolierung von Tyrosin.*

485. Die mit Schwefelsäure (§ 475) hydrolysierte Lösung wird durch Baryt von Schwefelsäure befreit und filtriert oder besser zentrifugiert, der Niederschlag mit Wasser ausgekocht, und zwar so oft, bis eine Probe des Filtrats mit Millonschem Reagens keine Reaktion mehr gibt. Filtrat und Waschlösungen werden eingengt, bis Krystallisation erfolgt. Im Bariumsulfatniederschlag bleiben leicht beträchtliche Mengen Tyrosin stecken. Bequemer spaltet man das Eiweiß mit Salzsäure auf, filtriert vom Humin ab, entfärbt mit Tierkohle und engt im Vakuum zur möglichsten Entfernung der überschüssigen Salzsäure wiederholt ein. In einem aliquoten Teile der Lösung

\*) Ein geeignetes Ausgangsmaterial ist Gliadin oder Weizenkleber.

<sup>1)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 56, S. 545. 1923.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 135, S. 167. 1924.

<sup>3)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 36, S. 325. 1918.

bestimmt man den Chlorgehalt, fügt dann die äquivalente Menge konzentrierter Kalilauge der Hauptmenge zu und engt ein. Die von den ausgeschiedenen Krystallen abfiltrierte Mutterlauge dampft man bis zu neuer Krystallisation ein, saugt ab und fährt fort, bis die Mutterlauge keine Millonsche Reaktion mehr zeigt. Dabei kann es vorkommen, daß zwischen die einzelnen Tyrosinfraktionen sich Fraktionen einschieben, die vollständig tyrosinfrei sind und aus Leucin und Valin bestehen; die letzten Mutterlaugen können oft nicht frei von Millonscher Reaktion erhalten werden<sup>1)</sup>. Die vereinigten Ausscheidungen des Rohtyrosins werden unter Benutzung von Tierkohle aus Wasser umkrystallisiert.

Wegen der präparativen Darstellung des Tyrosins aus Seide s. S. 298.

#### *Isolierung von Cystin nach Hopkins und Harris<sup>2)</sup>.*

486. Prinzip. Cystin und Tyrosin werden aus der schwefelsauren Zersetzungsflüssigkeit mit Mercurisulfat gefällt, der häufig schon durch Waschen vom Tyrosin befreite Niederschlag mit  $H_2S$  zerlegt und dadurch das Cystin in das Cystein übergeführt. Bei neutraler Reaktion wird dieses mit Kupferhydroxyd gefällt, wobei Reste von Tyrosin in Lösung bleiben, darauf aus dem Niederschlag regeneriert, bei ammoniakalischer Reaktion mit Hilfe des Luftsauerstoffs wieder zum Cystin oxydiert und dann als solches zur Wägung gebracht. Ausbeute etwa 40% vom vorhandenen Cystin.

Ausführung. Hydrolyse\*) mit dem 6fachen Volumen 25proz. Schwefelsäure 22 Stunden lang bei einer Ölbadtemperatur von  $105^\circ$ . Verdünnen bis zu einem Gehalt an Schwefelsäure von 5%. Ausfällen mit Mercurisulfat (10% in 5proz. Schwefelsäure). Absaugen und Waschen des Niederschlags zuerst mit dem Reagens, dann mit der Schwefelsäure allein; hierbei geht Tyrosin vielfach völlig wieder in Lösung. Aufschwemmen des Niederschlags in Wasser und Zerlegen mit  $H_2S$ . Filtrat vom überschüssigen  $H_2S$  durch Kochen befreien, sofort kühlen und mit Soda neutralisieren. Darauf mit einer Aufschwemmung von frischgefälltem Kupferhydroxyd das Cystin wieder ausfällen, den Niederschlag mit kaltem Wasser waschen, wieder mit  $H_2S$  zerlegen. Das Filtrat wird wieder durch Kochen vom überschüssigen  $H_2S$  befreit und mit Ammoniak alkalisch gemacht. Dann wird ein Luftstrom hindurchgesaugt, bis die Nitroprussidreaktion (§ 325, 14) verschwunden ist. Hierbei färbt sich die Lösung violett und durch eine Nebenreaktion entsteht ein in Wasser leicht lösliches, nach Isocyanat riechendes Produkt. Die oxydierte Lösung, die meist schwach sauer ist, wird durch verdünntes Ammoniak auf  $p_H$  7 gebracht. In einigen Tagen hat sich das Cystin abgeschieden. Durch Einengen können noch weitere 2—3 Fraktionen gewonnen werden.

Siehe auch die S. 253 angegebenen Isolierungsmethoden.

#### *Isolierung von Tryptophan.*

487. Siehe S. 313. Dakin<sup>3)</sup> vereinfachte das Verfahren insofern, als er nur einmal mit Quecksilbersulfat fällt; er erschöpft dann die im Vakuum eingengte Zersetzungsflüssigkeit des Quecksilberniederschlags mit Butylalkohol im Extraktionsapparat. Schon in der Wärme krystallisiert aus dem Alkohol reines Tryptophan aus. Tryptophan wird bei der Hydrolyse mit Säuren zerstört, während es gegen siedendes Alkali<sup>4)</sup> beständig ist und nur racemisiert wird.

\*) Über die Zerstörung von Cystin bei der Säurehydrolyse s. S. 590.

<sup>1)</sup> Johns u. Jones: Journ. of biol. chem. Bd. 36, S. 321. 1918. — Abderhalden u. Fuchs: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 83, S. 470. 1913.

<sup>2)</sup> Proc. of the roy. soc. of London (B) Bd. 94, Nr. 663, S. 443. 1923.

<sup>3)</sup> Biochem. Journ. Bd. 12, S. 302. 1918.

<sup>4)</sup> Homer: Journ. of biol. chem. Bd. 22, S. 369. 1915. — Onslow: Biochem. Journ. Bd. 15, S. 383. 1921.

*Isolierung von Histidin nach Kossel<sup>1)</sup>.*

488. 500 ccm frischer Blutkörperchenbrei wird mit 1000 ccm 37 proz. Salzsäure gemischt und in gewogenem 3-l-Rundkolben am Rückflußkühler 30 Stunden hydrolysiert. Eindampfen im Vakuum bei 60°, Rückstand für 2 Stunden bei 100° trocknen zur möglichsten Entfernung von Wasser und Salzsäure, Gewicht des Rückstandes (R) feststellen, meist 350 g. Wiederlösen in 1000 ccm Wasser, mit gelöschtem Kalk im Überschuß unter häufigem Schütteln versetzen, bis der rötlichbraune Niederschlag hell und homogen wird; nach Zugabe von 500 ccm 95 proz. Alkohol im Vakuum einengen, bis Destillat 800 ccm beträgt und damit alles Ammoniak entfernt ist; absaugen auf großer Nutsche, mit 2 l heißesättigtem Kalkwasser nachwaschen. Filtrat enthält alle Aminosäuren als Kalksalze und ist eisenfrei, wenn genügend mit Kalk behandelt. Zur Isolierung von Tyrosin und Leucin wird das alkalische Filtrat auf 4 l verdünnt, mit soviel Soda (wasserfrei) versetzt, als Rückstand R gewogen hat; nachdem unter Schütteln völlige Umsetzung eingetreten, wird sofort abgesaugt und mit 1 l heißem Wasser nachgewaschen. Das calciumfreie Filtrat wird in 6-l-Flasche unter Wasserkühlung mit konzentrierter Salzsäure bis zur lackmusneutralen Reaktion, dann mit Eisessig bis zur Beendigung des Aufbrausens versetzt. Bei 50—60° im Vakuum bis auf 800 ccm einengen, wo Kochsalz auszukristallisieren beginnt. Nach 4tägigem Stehen im Eisschrank wird über große Nutsche abgesaugt und mit 200 ccm Eiswasser nachgewaschen. Niederschlag enthält etwa 50 g Leucin, 1,5 g Tyrosin und viel Kochsalz; sein weiteres Aufarbeiten geschieht nach Habermann und Ehrenfeld<sup>2)</sup> mit Hilfe von Eisessig, in dem das Leucin viel löslicher ist als das Tyrosin (S. 239 oben).

Das Filtrat wird zur Verarbeitung auf Histidin genau auf 2000 ccm gebracht: je  $\frac{1}{4}$  davon in 6-l-Flasche mit 1500 ccm Wasser verdünnt. Die weiteren Angaben gelten für eine Portion, die andern 3 werden genau so verarbeitet. Zufügen von Sublimat, viermal so viel als der Rückstand R wog, und auf Wasserbad bis zur Lösung erwärmen: ein flockiger, graubrauner Niederschlag bleibt vorläufig unberücksichtigt und wird besser später entfernt. Köhlen. Für je 100 g verbrauchtes Sublimat wird jetzt eine Lösung von 20 g Soda in 430 ccm Wasser in Portionen zugefügt und damit das Histidin als weißer, flockiger Niederschlag gefällt, der sich rasch zu Boden setzt. Klare überstehende Flüssigkeit möglichst weit abhebern. Niederschlag von neuem mit 4 l Wasser dekantieren, dies 7 mal wiederholen. Die 4 Portionen des Histidin-Sublimatniederschlags vereinigen, in 6-l-Flasche mit 37 proz. Salzsäure in Lösung bringen. Kleine Menge graubrauner Flocken bleibt ungelöst, von ihnen wird durch großes Faltenfilter in 10-l-Flasche abfiltriert. Mit Schwefelwasserstoff unter Druck sättigen. Farbloses Filtrat im Vakuum bei 60° in tariertem Kolben einengen und schließlich bei 80° für 2 Stunden im Vakuum halten. Als Rückstand bleibt schwach gelbgefärbter, dicker, flüssiger Sirup von 60—65 g, er wird in 60 ccm 37 proz. Salzsäure in der Wärme auf dem Wasserbad gelöst. Die klare braune Lösung — Trübungen vom Kochsalz durch ungenügendes Auswaschen des Sublimatniederschlags werden später entfernt — erstarrt beim Impfen mit Histidindichlorid.

Nach 2tägigem Stehen bei 0° wird abgesaugt, zuerst mit 50 ccm kalter 37 proz. Salzsäure, dann mit der gekühlten Mischung von 20 ccm Salzsäure (37 proz.) und 20 ccm Alkohol gewaschen. Nach 10stündigem Trocknen bei 100° Ausbeute 17—19 g. Zur Reinigung vereinigt man 30 g des Rohproduktes von

<sup>1)</sup> In der Ausführung von Hanke u. Koeßler: Journ. of biol. chem. Bd. 43, S. 521. 1920; s. auch Brigl: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 64, S. 337. 1910.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 37, S. 18. 1902/03.

Histidinchlorid, löst in 20 ccm heißem Wasser, fügt 200 ccm heißen 95 proz. Alkohol hinzu, erhitzt auf dem Wasserbade bis zum Kochen des Alkohols, wobei nur mitgegangenenes Kochsalz ungelöst bleibt, und filtriert. Nach 24stündigem Stehen im Eisschrank wird abgesaugt und mit 50 ccm 95 proz. Alkohol gewaschen. Ausbeute 21—22 g analysenreines Dichlorid. Mutterlauge zur Trockne verdampft, der Rückstand dann ebenso behandelt, gibt nochmals etwa 6 g reines Produkt.

### Analytische Bestimmung einzelner reaktiver Gruppen und Bausteine vom Eiweiß.

#### *Alkalimetrische Bestimmung von Aminosäuren und Peptiden nach Willstätter<sup>1)</sup>.*

489. Prinzip. Aminosäuren, Peptide, Peptone, Proteine, welche in wässriger Lösung gegen Phenolphthalein neutral reagieren, lassen sich in alkoholischer Lösung alkalimetrisch bestimmen. Ein charakteristischer Unterschied besteht aber zwischen den Aminosäuren einerseits und den anderen 3 Gruppen andererseits hinsichtlich der erforderlichen Alkoholkonzentration: Peptide, Peptone, Proteine verhalten sich schon in 40 proz. Alkohol wie gewöhnliche Carbonsäuren, während die Aminosäuren, welche größtenteils zur völligen Ausschaltung der Aminogruppen sehr hohe Alkoholkonzentration, etwa 97 %, erfordern (so daß die Titration statt mit wässriger mit alkoholischer Normallauge ausgeführt werden muß), in 40 proz. Alkohol in ihrer Mehrzahl nur 28% der zur völligen Absättigung nötigen Alkalimenge gebrauchen. Auf dieses Verhalten haben W. Willstätter und Waldschmidt-Leitz ein Verfahren begründet, um die beiden Gruppen von Verbindungen, wenn sie in Gemischen vorliegen, quantitativ zu bestimmen.

**Ausführung.** Handelt es sich z. B. um eine Pankreasverdauungsflüssigkeit, so benötigt man je 10 ccm, stellt lackmusneutrale Reaktion her und verfährt wie § 507 angegeben.

#### *Die Formoltitration nach Sørensen<sup>2)</sup>.*

490. Prinzip. In einer ganz schwach sauren Lösung ( $p_H = 6,8$ ) von Aminosäuren werden durch großen Überschuß von neutralem Formol die Aminogruppen ausgeschaltet und darauf die freigewordenen Carboxyle mit Lauge titriert, bis  $p_H = 9,3$  ist.

Erforderliche Lösungen. 1. Phenolphthalein (0,5 g in 50 ccm Alkohol + 50 ccm Wasser) oder Thymolphthalein (0,5 g in 1 l Spiritus).

2. Empfindliches Lackmuspapier\*).

3. 0,2 n-Lauge (kohlenstofffrei), 0,2 n-Salzsäure.

4. Gesättigte Ätzbarytlösung.

5. 30—40 proz. Formol. Für jede Reaktion wird die benötigte Menge frisch neutralisiert. Auf 50 ccm Formol werden 1 ccm Phenolphthalein gebraucht und mit 0,2 n-Lauge bis zur beginnenden Rötung versetzt. Wird Thymolphthalein benutzt, so werden 50 ccm Formol mit 25 ccm Alkohol und 5 ccm Indicatorlösung versetzt und bis zum schwachen grünlichen oder bläulichen Farbton Lauge zugegeben.

Ferner für die Entfernung von Phosphor- und Kohlensäure Bariumchlorid in Substanz, etwa 0,2 n-Salzsäure und etwa n-Natronlauge.

\*) Sie sind nach Henriques und Sørensen<sup>3)</sup> in folgender Weise hergestellt:

0,5 g fein gepulvertes Azolithmin werden in einer Schale in 200 ccm Wasser und 22,5 ccm  $n/_{10}$ -Natronlauge gelöst und nach Filtrieren mit 50 ccm Alkohol versetzt. Durch diese Lösung zieht man Streifen guten aschearmen Filtrierpapiertes und hängt sie zum Trocknen auf. Das Papier muß in einer Lösung, welche 3 Teile sekundäres und 7 Teile primäres Natriumphosphat enthält, eine schwach saure Reaktion zeigen, in einer Lösung, welche gleiche Teile beider Phosphate enthält, eine neutrale, und in einer Lösung, welche 7 Teile sekundäres und 3 Teile primäres Phosphat enthält, eine schwach alkalische. Sollte dies nicht der Fall sein, so muß etwas mehr oder etwas weniger als die angegebene Menge  $n/_{10}$ -Lauge zugesetzt werden.

<sup>1)</sup> R. Willstätter u. E. Waldschmidt-Leitz: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 54, 2, S. 2988. 1921. — R. Willstätter: Abderhaldens biolog. Arbeitsmethoden, I. Abt., Teil 7, S. 289. 1922. — F. W. Foreman: Biochem. Journ. Bd. 14, S. 451. 1920. — W. Löffler u. K. Spiro: Helv. chimica acta Bd. 2, S. 540. 1919.

<sup>2)</sup> Sørensen: Biochem. Zeitschr. Bd. 7, S. 45. 1907. — Henriques u. Sørensen: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 64, S. 120. 1910. — Henriques u. Gjaldback: desgl. Bd. 67, S. 8. 1910. — S. auch die ausführliche Beschreibung der Methoden von Jessen-Hansen: Abderhaldens biolog. Arbeitsmethoden, Abt. I, Teil 7, S. 245. 1922. Urban & Schwarzenberg.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 64, S. 133. 1910.

Für die Entfärbung etwa 2 n-Bariumchloridlösung (244 g  $\text{BaCl}_2 + 2 \text{H}_2\text{O}$  in 1000 ccm Wasser), und etwa  $\frac{1}{3}$ -Silbernitratlösung (56,7 g reines  $\text{AgNO}_3$  in 1000 ccm Wasser).

**1. Vorbereitung der Untersuchungsflüssigkeit.** Ammoniaksalze müssen entfernt werden, sobald ihr Gehalt größer als 0,02 molar ist. Ebenso sind Kohlensäure und Phosphorsäure stets zu entfernen, sobald mit Alkalilauge und nicht mit Baryt titriert wird. Inwieweit größere Mengen anderer schwacher Säuren und Salze im Einzelfalle stören, ist besonders festzustellen.

Eigenfarbe der Lösung stört die Titration. Ist die Färbung erheblich, wie z. B. stets beim Eiweißhydrolysat, so muß eine Entfärbung vorgenommen werden. Bei nur wenig gefärbten Lösungen kann man sich in anderer Weise helfen. Siehe darüber unten bei Entfärbung.

Entfernung des Ammoniaks. Sie geschieht durch Destillation im Vakuum nach Krüger-Reich (§ 578). Die in den Hydrolysaten reiner Eiweißkörper oder in Eiweißverdauungsflüssigkeiten enthaltenen Ammoniummengen sind meist so klein, daß sie nicht entfernt zu werden brauchen.

Entfernung der Phosphor- und der Kohlensäure (z. B. im normalen Harn oder in Fermentversuchen, bei denen Phosphatgemisch als Puffer benutzt wurden). Siehe darüber die Angaben § 619, 1.

Entfernung der Phosphor- und Kohlensäure und des Ammoniaks (z. B. in sehr ammoniumreichen Harnen oder solchen, die zur Spaltung von Polypeptiden mit Salzsäure erhitzt und eingedampft sind). Siehe darüber die Angaben § 619, 1.

Entfärbung. Dazu eignet sich die Bildung eines Chlorsilberniederschlags<sup>1)</sup> in der Lösung, deren Säuregehalt etwa 0,1 normal sein soll. Ein Überschuß von Silber ist zu vermeiden. Man bringt z. B. 25 ccm in einen 50-ccm-Meßkolben, stellt durch Zufügen von Salzsäure oder Natronlauge die Acidität (die man vorher durch Titration der Lösung gegen Lackmus ermittelt hat) richtig, fügt etwa 4 ccm der Bariumchloridlösung und darauf tropfenweise unter starkem Schütteln 20 ccm der Silberlösung hinzu. Nach Absetzen des Schaumes füllt man mit kohlenstofffreiem Wasser bis zur Marke auf, schüttelt und filtriert durch trocknes Filter. Ist das Filtrat zunächst nicht ganz klar, muß es zurückgegossen werden. Vor der Titration ist es gegen Lackmus zu neutralisieren.

Ist die Eigenfarbe der Lösung nur gering, so hat man vorgeschlagen, die Kontrollösung, die man für die genaue Feststellung des Endpunktes der Titration verwenden muß (siehe später), durch Zusatz eines geeigneten Farbstoffes (Bismarckbraun, Tropäolin 0 oder 00, Methylviolett) auf denselben Farbton zu bringen, um auf diese Weise zu genauen Resultaten zu gelangen. Dieses Anfärben der Kontrolle ist indessen weniger zu empfehlen, da der genau gleiche Farbton doch nur selten erreicht wird und die Eigenfarbe der Lösung sich während der Titration mit der Reaktion ändern kann. Diese Störung scheidet Walpole<sup>2)</sup> durch eine optische Mischung der Farben aus. Er bedient sich hierbei eines Gestelles, in dem 2 Paar Bechergläser mit flachem Boden übereinandergestellt werden (s. Abb. 20). In C bringt man die auf die Endfarbe eingestellte Kontrollösung, in D Wasser, in A und B je 20 ccm der Versuchslösung. Man versetzt jetzt die Lösung in B mit der Formolmischung und titriert, bis beim Durchsehen von oben gegen eine weiße belichtete Fläche in A und B gleiche Farbennuance beobachtet wird.

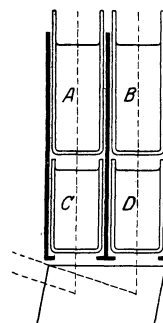


Abb. 20.

<sup>1)</sup> Sørensen u. Jessen-Hansen: Biochem. Zeitschr. Bd. 7, S. 407. 1908.

<sup>2)</sup> Biochem. Journ. Bd. 5, S. 212. 1910.

**2. Ausführung.** Die Titration nimmt man am besten in 20 ccm der Lösung vor, die in bezug auf ihren Stickstoffgehalt ungefähr 0,1n sein soll oder stärker bei geringerem  $\text{NH}_2$ -Gehalt. Um den Endpunkt scharf zu erkennen, bedarf man auch bei ungefärbten Lösungen einer Kontrollösung; sie soll dasselbe Volumen haben, wie dasjenige ist, das bei der eigentlichen Titration erreicht wird, und wird in einem Gefäß gleicher Form und Größe bereitet.

Kontrolle.

Ausführung mit Phenolphthalein.

a) Bei Verwendung von Phenolphthalein werden zu 20 ccm ausgekochten destillierten Wassers 10 ccm neutralisiertes Formol und dann etwa halbsoviel 0,2n-Lauge gegeben, wie bei der eigentlichen Titration verbraucht wird; darauf wird mit 0,2n-Salzsäure zurücktitriert, bis die Flüssigkeit bei gutem Schütteln eben einen schwachen rosa Farbton zeigt (1. Stadium  $p_{\text{H}} = 8,3$ ) und jetzt 1 Tropfen Lauge zugegeben, wodurch die Flüssigkeit deutlich rot gefärbt wird (Zwischenstadium  $p_{\text{H}} = 8,8$ ). Von der zur Untersuchung vorliegenden gegen Lackmus neutralisierten Lösung werden 20 ccm mit 10 ccm Formol versetzt und durch abwechselndes Übertitrieren mit 0,2n-Lauge und 0,2n-Säure genau auf den Farbton der Kontrolle eingestellt. Jetzt wird die Kontrolle durch Zufügen von 2 Tropfen Lauge auf das 2. Stadium ( $p_{\text{H}} = 9,1$ ) stark rote Farbe gebracht und die Lösung in gleicher Weise auf den gleichen Farbton titriert.

Ausführung mit Thymolphthalein.

b) Soll Thymolphthalein benutzt werden, so wird die Kontrolle aus 20 ccm ausgekochtem Wasser und 15 ccm Formollösung bereitet. Das 1. Stadium ist erreicht, wenn die Lösung bläulich opalesciert. Beim Zwischenstadium hat sie eine deutliche blaue Farbe angenommen, beim 2. Stadium ( $p_{\text{H}} = 9,45$ ) erscheint sie schön stark blau.

**3. Berechnung.** Von der Lauge, die bis zum Endpunkt der Titration (2. Stadium) insgesamt nach Abzug der Salzsäure verbraucht worden ist, wird der Laugenüberschuß der Kontrolle abgezogen. Jeder Kubikzentimeter des Restes entspricht 2,8 mg formoltitrierbarem Stickstoff.

**Fehlerquellen der Formoltitration.** Die Werte sind bei Tyrosin zu hoch, bei Prolin zu niedrig<sup>1)</sup>. Harnstoff und Guanidinsalze bleiben auch bei Formolzusatz neutral. Argininsalz läßt sich also glatt wie eine einbasische Säure titrieren. Das Ammoniak entsteht in Hydrolysaten reiner Eiweißkörper meist in so geringer Menge, daß es nicht entfernt zu werden braucht. Bei Fermentversuchen sind die Puffer wieder zu entfernen; man benutzt daher am bequemsten die Phosphatgemische von Sörensen<sup>2)</sup>. Es lassen sich sowohl Aminosäuren mit nicht  $\alpha$ -ständigen Aminogruppen wie Methylaminosäuren formoltitrieren.

#### *Formoltitration in Stadien<sup>3)</sup>.*

491. Prinzip. Es wird das Verhältnis bestimmt, in dem die in einer lackmusneutralen Lösung noch vorhandenen Anionen, die zu den Aminosäuren bzw. Peptiden mit den größten Säuredissoziationskonstanten gehören (ausgedrückt in Kubikzentimeter NaOH bis zur Neutralisation gegen Phenolphthalein auf Rosa), zur Menge der freien Aminogruppen (ausgedrückt im Gesamtverbrauch Alkali bis zum Endpunkt der Formoltitration) stehen. Der Quotient ist bei den Aminosäuren groß, bei den Peptiden klein. Bei der peptischen Verdauung von Eiweiß bleibt das Verhältnis eng, bei der tryptischen wird es mit dem Fortschreiten der Verdauung immer weiter. Werden außerdem die Mengen Lauge mitbestimmt, die notwendig sind, um die Wasserstoffionenkonzentration vor und nach dem Formolzusatz vom lackmusneutralen Punkt zu verschieben bis zu den 2 Konzentrationen, wo Phenolphthalein eben wahrnehmbar und stärker gerötet wird, so können Schlußfolgerungen über die Natur und die Verschiedenheiten der in der titrierten Flüssigkeit vorhandenen Körper gezogen werden, d. h. schätzungsweise die vorhandenen Carboxylgruppen zwischen Aminosäuren und Peptiden aufgeteilt werden.

<sup>1)</sup> Sörensen: Biochem. Zeitschr. Bd. 7, S. 59. 1908.

<sup>2)</sup> Chemikerkalender 1923, II, S. 447.

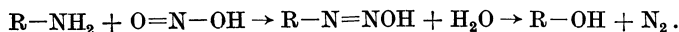
<sup>3)</sup> Henriques u. Sörensen: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 63, S. 27. 1909. — Henriques u. Gjaldbäck: desgl. Bd. 75, S. 363. 1911.

**Ausführung.** Die gegen Lackmus neutralisierte Lösung wird mit Phenolphthalein versetzt und dann mit Lauge bis zur eben beginnenden Rötung (1. Stadium  $p_H = 8,3$ ), dann mit mehr Lauge bis zur starken Rötung (2. Stadium  $p_H = 9,1$ ). Nun wird das neutralisierte Formol zugegeben und die wieder farblos gewordene Lösung erneut mit Lauge bis zur beginnenden Rötung (3. Stadium) und dann bis zur starken Rötung (4. Stadium) versetzt. Die Kontrolle wird in gleicher Weise bis zum 4. Stadium titriert.

**Berechnung:** 
$$\frac{\text{Kubikzentimeter Lauge bis zum 1. Stadium}}{\text{Kubikzentimeter Lauge bis zum 4. Stadium} - \text{Laugenverbrauch der Kontrolle.}}$$

#### *Aminostickstoffbestimmung nach van Slyke<sup>1)</sup>.*

492. **Prinzip.** Stoffe mit aliphatischen primären Aminogruppen werden mit Salpetrigsäureanhydrid über die Diazoverbindung in die Oxyverbindung übergeführt, der dabei freiwerdende Stickstoff mit alkalischer Permanganatlösung von den begleitenden Stickoxyden befreit und gemessen.



**Erforderliche Apparate\*).** Der neue Mikroapparat liefert brauchbare Werte schon bei 0,5 mg N und ist der folgenden Darstellung allein zugrunde gelegt:

1. Zersetzungsgefäß *D* mit Einfülltrichter *A* für Eisessig und Nitritlösung; Bürette *B* mit Skalenteilung für Untersuchungslösung und Hahn *b* mit Winkelbohrung (—); Hahn *d* (—) zum Ablassen der Reaktionsflüssigkeit durch Kreuzstück *k*; Dreiwegehahn *c* (⊥) zur Verbindung von *D*, *F* und *k*.

2. Meßbürette (Azotometer) *F* mit Hahn *f* mit paralleler Doppelbohrung (∞) zur Verbindung von *F* mit *D* und *G* über Capillarrohr *g*.

3. Schüttelpipette *G* gefüllt bis zur Hälfte der oberen Kugel.

4. Elektromotor mit Exzentrerscheibe, deren gummibewehrte Drahtstange 1,5 bis höchstens 2 cm vom Mittelpunkt angreifen soll. Die Scheibe muß zur Ermöglichung raschen Arbeitens 300 bis 500 Umdrehungen pro Minute machen. Der kleine Heißluftmotor von Heinrici, Zwickau, mit Gasheizung paßt gleichfalls.

**Erforderliche Lösungen.** 1. Absperrflüssigkeit in *F* und Birne, 1 proz. Schwefelsäure, um Alkali der Absorptionsflüssigkeit von *G* zu binden.

2. Eisessig, als schwache nicht hydrolysierende Säure.

3. Natriumnitrit, 30 proz. Auch sogenanntes chemisch reines Nitrit in der im Versuch benutzten Menge gibt im Blindversuch 0,2 ccm Gas in 5, 0,3 ccm in 30 Minuten. Jedes neue Nitrit muß auf Gasbildung geprüft werden. Gibt die Lösung im Blindversuch in 5 Minuten mehr als 0,5 ccm Gas, so soll sie nicht verwendet werden.

4. Lösung von 50 g Kaliumpermanganat und 25 g Ätznatron in 1000 ccm Wasser. Wenn der Apparat außer Betrieb ist, muß die Lösung in *G* aus den Capillaren durch Wasser verdrängt werden, da sonst der sedimentierende Braunstein das Lumen verstopft.

5. Hahnfett durch Zusammenschmelzen von Paragummi, Paraffin und Vaseline (1:1:2).

**Ausführung.** Reaktionsgefäß wird mit Chromschwefelsäure und Wasser gereinigt, Hähne gut gefettet und angebunden.

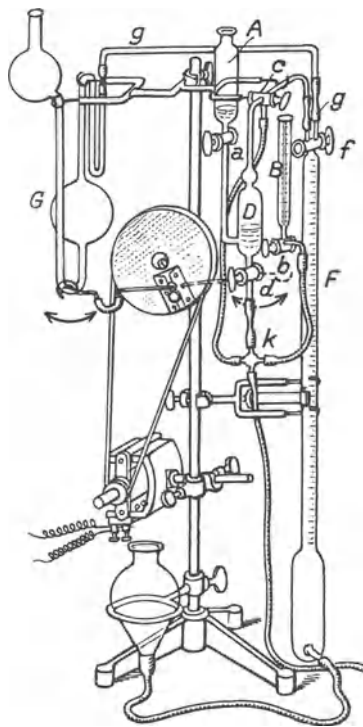


Abb. 21. Aminostickstoffbestimmungsapparat nach van Slyke.

\*) Zu beziehen von Robert Goetze, Leipzig, Nürnbergerstr. 56.

<sup>1)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 43, 3, S. 3170. 1910. — Journ. of biol. chem. Bd. 9, S. 185. 1911; Bd. 16, S. 187. 1913/14; Bd. 22, S. 281. 1915; Bd. 23, S. 407. 1915; s. auch die ausführliche Beschreibung van Slykes in Abderhaldens biologischen Arbeitsmethoden, 1922. Abt. I, Teil 7, S. 263. Urban & Schwarzenberg.

## I. Vertreiben der Luft.

1. Durch Senken der Birne von *F* wird von der Pipette *G* etwaige Luft nach *F* gesaugt und durch Heben der Birne und Drehen von Hahn *f* ( $\nearrow \rightarrow \searrow$ )\* und *c* ( $\vdash$ ) die überfließende Permanganatlösung durch das Kreuzstück *k* entfernt und durch Flüssigkeit ersetzt.

2. Mittels Hahn *c* verbindet man Zersetzungsgefäß *D* mit *k* ( $\vdash \rightarrow \vdash$ ). Nach Schließen von Hahn *a* und *b* ( $\vdash$ ) gibt man in den Einfülltrichter *A* bis zum Teilstrich Eisessig und läßt ihn nach *D*. Hahn *a* wird wieder geschlossen; *A* wird ganz mit Nitritlösung gefüllt und diese so nach *D* geleitet, daß die Flüssigkeit die Luft durch *c* ins Freie schiebt und Niveaugleichheit in *D* und *A* eintritt. Schüttelt man ein wenig mit der Hand, solange in *D* noch etwas Luft zurückgeblieben ist, so bildet sich rasch Gas, das nach Schließen von *c* ( $\perp$ ) die obere Kuppe von *D* füllt und, 2 mal entfernt, die Luftreste aufnimmt. Hahn *a* ist dabei immer geöffnet. Dann schüttelt man mit dem Motor, bis das Gas in *D* den Raum bis zur Marke erfüllt, indem es die Flüssigkeit nach *A* hinüberdrückt. Dazu sind 2—5 Minuten erforderlich.

II. Blindversuch. Er dient zur Bestimmung der Stickstoffmenge, welche von Verunreinigungen des benutzten Natriumnitrit geliefert wird (Bestimmung der bei dem Ergebnis des Hauptversuches anzubringenden Korrektur). Hahn *a* wird geschlossen, sofort *D* ( $\perp$ ) mit *F* ( $\searrow \searrow$ ) verbunden und Gas nach *F* gesaugt. Aus *B* läßt man zuerst die der Analysenlösung entsprechende Wassermenge nach *D* überfließen ( $\_ \rightarrow \sqcap$ ). Hierauf schüttelt man genau entsprechend der Substanzzersetzungsdauer, gewöhnlich 5 Minuten. Das reichlich gebildete  $N_2O_3$  nimmt den entstandenen Stickstoff mit nach *F*. Nach Ablauf der Schüttelzeit treibt man den Rest durch Öffnen von *a* völlig nach *F*. Zur Absorption dreht man Hahn *f* um  $180^\circ$  ( $\searrow \rightarrow \nearrow$ ). Durch Heben der Birne drückt man die Gase bis in die Kugel, nicht nur in die Capillare der Hempelpipette, und schüttelt 1 Minute lang. Restgas wird langsam in die Bürette gesaugt und bei Niveaugleichheit gemessen, gleichzeitig wird Temperatur und Druck notiert. Auf vollständige Absorption prüft man durch Wiederholen des Schüttelns. Man macht mehrere Blindversuche und nimmt das Mittel. *B* wird dann mit Alkohol und Äther gereinigt. Der Apparat ist nun fertig für den Hauptversuch.

III. Hauptversuch mit der aminostickstoffhaltigen Lösung. Er wird in genau gleicher Weise ausgeführt, indem man die aminostickstoffhaltige Lösung aus der Bürette *B* zulaufen läßt und die vorgeschriebene Zeit mechanisch schüttelt. Etwaiges Schäumen verhindert oder entfernt man durch Zugabe von Octylalkohol (Kahlbaum) oder Phenyläther\*\*) von *B* aus. Zersetzt man Eiweißlösungen, so bringt man schon von Anfang an einige Tropfen des Schaumverhinderers nach *D*.

**Berechnung.** Angewandte Menge z. B. 2 ccm mit 2 mg Gesamt-N; abgelesenes Volumen bei  $17^\circ$  745 mm : 1,884 ccm; Korrektur nach dem Mittel aus Blindversuchen 0,2 ccm; Volumen für Aminostickstoff  $\frac{1,884 - 0,2}{2} = 0,842$  ccm  $N_2$ .

Die dem Volumen entsprechende Gewichtsmenge Stickstoff entnimmt man unter Berücksichtigung von Barometerstand und Zimmertemperatur den üblichen Tabellen. Sie beträgt in dem vorliegenden Falle 0,95 mg, d. h. 47,5 % des Gesamt-N.

\*) Die Striche bezeichnen die Stellung der Hahnbohrung.

\*\*)  $C_6H_5 \cdot O \cdot C_6H_5$  Smp.  $28^\circ$ , Sdp.  $252,3^\circ$ ; Überschuß schadet nichts. Mitchell u. Eckstein: Journ. of biolog. chemistry Bd. 33, S. 373. (1918.)



**Bemerkungen.** Fast alle aus hydrolysiertem Eiweiß gewonnenen Aminosäuren geben quantitative Werte.  $\alpha$ -Aminocarbonsäuren reagieren in charakteristischer Weise viel schneller als Säuren mit einer Aminogruppe, die dem Wirkungsbereiche des Carboxyl weiter entzogen ist. Daher reagiert auch Lysin mit seinen beiden Aminogruppen erst in 30 Minuten bei 20°. Guanidin-, Indol-, Pyrrolidin-, Imidazolstickstoff reagieren nicht, daher geben keinen van Slyke-Stickstoff Prolin und Oxyprolin, Tryptophan nur die Hälfte, Histidin  $\frac{1}{3}$ , Arginin  $\frac{1}{4}$  vom Gesamtstickstoff (Kjeldahlstickstoff der Lösung). Asparagin reagiert nur mit der Amino-, nicht mit der Säureamidgruppe. Glykokoll und Cystin werden weiter zersetzt und geben 103 und 107% von der berechneten Stickstoffmenge. Ammoniak und Methylamin brauchen 2 Stunden, Harnstoff bis 8 Stunden zur völligen Zersetzung. Peptide und Proteine reagieren entsprechend ihrem Gehalt an freien Aminogruppen.

**Ungefähre Bestimmung der Stickstoffverteilung in Proteinen in 3 Gruppen nach Hausmann<sup>1)</sup>.**

493. Eine bestimmte Menge (etwa 1 g) des Proteinstoffes wird mit 20 proz. Salzsäure 7—10 Stunden (jedenfalls bis zum Verschwinden der Biuretreaktion) am Rückflußkühler gekocht, die Lösung auf dem Wasserbade auf 2—3 cm eingedampft, mit ungefähr 350 ccm Wasser in einen Kolben gebracht und mit Magnesia, welche durch langes Erhitzen von Ammoniak völlig befreit ist, in geringem Überschuß versetzt. Man destilliert nun, fängt das Destillat in  $\frac{1}{10}$ -Säure auf und bestimmt durch Titration das übergegangene Ammoniak (Amidstickstoff). Der Kolbeninhalt wird durch stickstofffreies Papier filtriert, der quantitativ gesammelte Rückstand mit Wasser gründlich gewaschen und der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt (Huminstickstoff). Das Filtrat wird auf 100 ccm konzentriert, auf 20° abgekühlt und mit 5 g Schwefelsäure und 30 ccm einer Lösung, welche 20 g Phosphorwolframsäure und 5 g Schwefelsäure auf 100 ccm enthält, versetzt. Nach 24 Stunden (oder auch früher, wenn der Niederschlag beim Umrühren rein körnig und frei von jeder flockigen Beimengung erscheint) wird filtriert und mit einer Lösung, die 2,5 g Phosphorwolframsäure und 5 g Schwefelsäure in 100 ccm enthält, 3 mal ausgewaschen, und zwar geschieht das Auswaschen in der Weise, daß man den Niederschlag mit der Waschflüssigkeit in ein Becherglas spritzt und auf das Filter zurückbringt. Die Menge der Waschflüssigkeit beträgt etwa 200 ccm. Den ausgewaschenen Niederschlag samt Filter bringt man in einen Kjeldahlkolben und bestimmt den Stickstoff nach Kjeldahl (Diaminosäurenstickstoff). Den Monamino-säurenstickstoff findet man durch Subtraktion der durch die 3 Operationen gefundenen Stickstoffmengen von dem Gesamtstickstoffgehalt des Proteins oder auch durch Bestimmung des Stickstoffs in einem gemessenen und durch Eindampfen konzentrierten Teile des gesamten Filtrats.

**Bestimmung des in 7 Gruppen verteilten Stickstoffs der Proteine nach van Slyke<sup>2)</sup>.**

494. Prinzip. Nach vollständiger Hydrolyse durch Säure wird Ammoniak durch Vakuumdestillation entfernt, Huminstickstoff auf Kalk niedergeschlagen, die 3 Hexonbasen und Cystin aus verdünnter Lösung durch Phosphorwolframsäure gefällt. Die Aufteilung dieser

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 27, S. 95. 1899; Bd. 29, S. 136. 1900. — Osborne u. Harris: Zeitschr. f. analyt. Chem. Bd. 43, S. 286. 1904 oder Journ. of the Americ. chem. soc, Bd. 25, S. 323. 1903. — Gümbel: Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 5, S. 297. 1904. — Die obige Darstellung folgt im wesentlichen den Angaben von Osborne u. Harris.

<sup>2)</sup> van Slyke: Journ. of biol. chem. Bd. 10, S. 15. 1911; Bd. 22, S. 281. 1915. Abderhaldens biolog. Arbeitsmethoden, Abt. I, Teil 7, S. 53. 1922. — Hiller u. van Slyke: Journ. of biol. chem. Bd. 39, S. 479. 1919.

Fraktion erfolgt auf Grund des Schwefelgehaltes vom Cystin, der Ammoniakabspaltung aus Arginin beim Kochen mit Lauge und des Gehaltes an Amino- und Nichtaminostickstoff ( $\frac{2}{3}$  Histidinstickstoff,  $\frac{3}{4}$  Argininstickstoff). Im Filtrat der Basen wird der Amino- und Gesamtstickstoff bestimmt und dadurch der Nichtaminostickstoff, der Prolin, Oxyprolin und Tryptophan zukommt, berechnet oder auch nach Zerstörung des Aminostickstoffs direkt bestimmt.

**Ausführung.** Doppelanalysen im Mikroapparat nach van Slyke (§ 492). Kontrolle der Reagenzien durch Blindversuche (Kjeldahl) erforderlich. Die Phosphorwolframsäure ist nach Winterstein (siehe Anhang) gereinigt. Möglichst weitgehende Reinigung der Proteine ist erforderlich. Die Anwesenheit von Kohlenhydraten bei der Hydrolyse steigert die Bildung von Huminsubstanzen und vermindert die Ausbeute an Basen, aber auch an Stickstoff der Monaminosäurenfraktion in unregelmäßiger, nicht korrigierbarer Weise<sup>1)</sup>.

**Hydrolyse.** Vom Eiweiß werden 3—6 g benötigt; sie werden im tarierten Kolben am Rückflußkühler mit der 10—20fachen Menge 20proz. Salzsäure gekocht, bis der Aminostickstoffgehalt einer aufs 5—10fache verdünnten Probe unverändert bleibt. Dies ist gewöhnlich nach 24 Stunden der Fall. Am Gewicht der Lösung erkennt man etwaige Änderungen in der Konzentration infolge von Verdampfung. Die Aminostickstoffbestimmungen werden alle unter den gleichen Bedingungen wegen des Ammoniakgehaltes der Lösungen ausgeführt, z. B. indem die salpetrige Säure 6 Minuten bei Zimmertemperatur einwirkt, wobei nur die letzte Minute geschüttelt wird. Die Hydrolysenflüssigkeit wird dann im Vakuum bei einer 40° nicht übersteigenden Badtemperatur eingeengt, bis die überschüssige Salzsäure möglichst weitgehend entfernt ist. Den Rückstand löst man in warmem Wasser und bringt ihn im **Gesamtstickstoff.** Meßkolben auf 100—250 ccm. Zur Bestimmung des Gesamtstickstoffs, auf den die weiteren Analysen bezogen werden, dient ein Volumen, das etwa 0,2 g Protein entspricht.

**Ammoniak.** Das Ammoniak wird im Vakuum unter Zusatz von Kalkmilch und Alkohol in der § 578 angegebenen Weise abdestilliert und der Gehalt im Destillat titriert. An Säure in der Vorlage genügen 30 ccm 0,1 normal, bei pflanzlichem Eiweiß 60 ccm. Das Ammoniak wird gewöhnlich auf die Dicarbonsäuren bezogen<sup>2)</sup>.

**Huminstickstoff 1.** Während der Destillation werden gewöhnlich die gesamten Huminsubstanzen von dem ungelösten Kalke adsorbiert. Man filtriert durch ein Faltenfilter, wäscht chlorfrei und unterwirft den Filtrerrückstand der Kjeldahlbestimmung. Manchmal entgeht hier ein Teil der Huminsubstanzen der Adsorption<sup>3)</sup>. Sie werden dann bei der Zerlegung der Phosphorwolframsäurefällung gefunden.

**Fällung der Basen.** Das Filtrat wird mit Salzsäure neutralisiert, wieder im Vakuum auf etwa 100 ccm eingeengt, dann in einen Erlenmeyerkolben von etwa 200 ccm Fassungsvermögen übergeführt und mit 18 ccm konzentrierter Salzsäure und einer Lösung von 15 g Phosphorwolframsäure versetzt. Man füllt mit Wasser auf 200 ccm auf, erwärmt im Wasserbade, bis die Basenfällung nahezu oder vollständig wieder gelöst ist, läßt abkühlen und 24 Stunden stehen. Dann wird auf 0° abgekühlt und auf Büchnertrichter (5 cm) durch gehärtetes Filter abgesaugt;

<sup>1)</sup> Hart u. Sure: Journ. of biol. chem. Bd. 28, S. 241. 1916. — Gortner: Journ. of the Americ. chem. soc. Bd. 37, S. 1778. 1915. — Osborne, van Slyke, Leavenworth u. Vinograd: Journ. of biol. chem. Bd. 22, S. 259. 1915.

<sup>2)</sup> Osborne, Leavenworth u. Brautlecht: Journ. of biol. chem. Bd. 23, S. 194. 1908. — Osborne u. Nolan: desgl. Bd. 43, S. 311. 1920. — Thierfelder u. v. Cramm: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 105, S. 58. 1919.

<sup>3)</sup> Dowell u. Menaui: Journ. of biol. chem. Bd. 40, S. 131. 1919. — Gortner u. Holm: Journ. of the Americ. chem. soc. Bd. 42, S. 821. 1920.

der Niederschlag wird auf dem Filter gewaschen. Als Waschflüssigkeit dient eine auf 0° abgekühlte Lösung von 2,5% Phosphorwolframsäure und 3,5% Salzsäure. Es werden Portionen von je 10—15 ccm benutzt, mit denen der Niederschlag auf dem Filter vorsichtig angerührt wird. Das Filter muß dabei mäßig fest angesaugt werden. Gewaschen wird, bis das Filtrat frei von Calcium ist\*). Wenn es zum Schluß trüb durchläuft, werden diese Portionen erneut durch ein kleines Filter geklärt.

Der Basenniederschlag wird mit Hilfe eines Spatels vom Filter möglichst entfernt und in einen Scheidetrichter von 500 ccm gebracht; die Reste werden mit 200—300 ccm Wasser übergespült. Es werden 10 ccm konzentrierter Salzsäure zugefügt, mit soviel Amylalkohol-Äther (1 : 1) geschüttelt, daß sich der Niederschlag löst und eine zusammenhängende Schicht auf dem Wasser schwimmt. Gewöhnlich genügen 100 ccm des Gemisches und 2 Minuten langes Schütteln. Die Phosphorwolframsäure geht dabei in den Amylalkohol-Äther. War zu wenig Amylalkohol-Äther genommen, so sinkt ein Teil mit Phosphorwolframsäure beschwert als Öl unter. Bisweilen trennen sich die Schichten schlecht; dann wird durch ein Papierfilter gesaugt und mit Wasser und Amylalkohol-Äther nachgewaschen. Der Filtrerrückstand besteht aus den oben erwähnten nicht adsorbierten Huminsubstanzen. Sein Stickstoffgehalt wird bestimmt. Die wässrige Schicht wird von der alkoholätherischen getrennt und 3 mal mit je  $\frac{1}{4}$  ihres Volumens Amylalkohol-Äther ausgeschüttelt. Zum Schluß werden die vereinigten Amylalkohol-Ätherauszüge nochmals mit wenig Wasser und dieses mit neuem Amylalkohol-Äther ausgeschüttelt. Das Wasser wird mit dem Hauptteil der Basen vereinigt. Die Lösung soll frei von Phosphorwolframsäure sein, d. h. einige Tropfen, in Barytwasser gebracht, sollen keinen Niederschlag geben. Die Lösung der Basen wird dann im Vakuum zur Trockne verdampft, um die Salzsäure zu entfernen, der Rückstand in einen Meßkolben von 50 ccm gespült und zur Marke aufgefüllt.

Zur Argininbestimmung kocht man 25 ccm der Basenlösung nach Zusatz von 12,5 g Ätzkali und Siedesteinchen in einem 200-ccm-Kjeldahlkolben\*\*) genau 6 Stunden gelinde. Der Kolben steht einerseits in Verbindung mit einer, verdünnte Schwefelsäure enthaltenden Waschflasche, andererseits mit einem Rückflußkühler, an dem oben eine 2. Waschflasche, welche gemessene Menge 0,1 n-Säure und 1 Tropfen Indicator enthält, angeschlossen ist. Diese 2. Waschflasche ist mit der Saugpumpe verbunden. Während des Kochens geht ein langsamer Luftstrom durch die kochende Flüssigkeit, wodurch das Stoßen vermieden wird<sup>1)</sup>. Nach 6 Stunden bringt man durch den Kühler 100 ccm Wasser in den Kjeldahlkolben und destilliert den Rest des Ammoniaks am absteigenden Kühler ab, nachdem man in die Vorlage den Inhalt der Waschflasche 2 gebracht hat. Mehr als 200 ccm dürfen nicht überdestillieren, da bei zu starker Konzentration in dem Kolbenrückstand anderweitige Zersetzungen vor sich gehen. Da vom Arginin die Hälfte des Stickstoffs abgegeben wird und die Hälfte der Basenlösung in Arbeit genommen worden ist, entspricht jedes Kubikzentimeter 0,1 n-Säure, das von Ammoniak gebunden worden ist, 5,6 mg Arginin-N. Ist auch Cystin vorhanden, so werden 17% seines Stickstoffs als Ammoniak während der Argininbestimmung entwickelt. Die entsprechende Korrektur ist bei den meisten Proteinen gering, die vorhandene Cystinmenge wird durch die Schwefelbestimmung ermittelt (s. unten). In dem Destillationsrückstand wird

\*) Einige Tropfen des Filtrates müssen mit einer Lösung von Oxalsäure in überschüssiger Natronlauge klar bleiben, auch wenn das Gemisch einige Minuten gestanden hat.

\*\*) Der Kolben leidet und darf nicht öfter als 2—3 mal benutzt werden.

<sup>1)</sup> Koehler: Journ. of biol. chem. Bd. 42, S. 267. 1920.

Umwandlung in Chloride.

Huminstickstoff II.

Argininstickstoff.

der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt. Addiert man zu dem gefundenen Wert den abgespaltenen Argininstickstoff, so erhält man den Gesamtstickstoff der Basen.

**Gesamtstickstoff der Basen.**

**Cystin.** Für die Bestimmung des wirklich vorhandenen Cystins dienen 10 ccm der Basenlösung, in denen der organische Schwefel nach Benedict-Denis<sup>1)</sup> nach Oxydation mit Salpetersäurekupfernitrat als Bariumsulfat zur Wägung gebracht wird (§ 550, b). Die ursprünglich im Eiweiß vorhandene Cystinmenge ist wesentlich größer. Bei 16stündigem Kochen mit 20 proz. Salzsäure werden 41%, bei 24stündigem 50% Cystin so zerstört, daß sein Schwefel nicht mehr in die Basenfällung mit übergeht. Ferner bleibt bei der Basenfällung eine Menge unangegriffenen Cystins in Lösung, die 1,5% des Eiweißstickstoffs ausmacht.

**Aminostickstoff der Basen.** Im Rest der Basenlösung wird der Aminostickstoff bestimmt; bei Verwendung des Mikroapparates können Doppelanalysen unter Benutzung von je 1—2 ccm ausgeführt werden. Da die Aminogruppe des Lysins verhältnismäßig langsam reagiert, muß die Einwirkung der salpetrigen Säure bei 20° auf ½ Stunde, bei niedriger Temperatur auf noch längere Zeit<sup>2)</sup> ausgedehnt werden. Während ebenso langer Zeit ist dann auch der Blindversuch für die Korrektur der Reagenzien durchzuführen. Cystin liefert 107% der Stickstoffmenge, die es eigentlich liefern sollte. Der Gehalt an Histidin wird auf folgende Weise berechnet: Bezeichnet man mit D den gesamten Nichtaminostickstoff der Basen (Unterschied zwischen Gesamt- und Aminostickstoff) und mit Arg den Argininstickstoff, dann ist  $\text{Histidin-N} = \frac{3}{2} (D - \frac{3}{4} \text{Arg}) = 1,5 D - 1,125 \text{Arg}$ . Doppelanalysen stimmen innerhalb 1% überein, Fehler in den Arg-Bestimmungen kommen hier am stärksten zum Ausdruck. Der Lysinstickstoff wird ermittelt, indem man vom gesamten Stickstoff denjenigen von Arginin, Histidin und Cystin abzieht. Die Genauigkeit<sup>2)</sup> hängt hauptsächlich von den Bestimmungen des Cystin- und des Aminostickstoffs ab.

**Histidinstickstoff.**

**Lysinstickstoff.**

**Filtrat der Basenfällung.** Das Filtrat der Basenfällung wird mit der Waschflüssigkeit vereinigt, langsam starke Natronlauge zugegeben, bis die Lösung sich durch Kalkabscheidung eben trübt; dann wird sogleich durch Zusatz von wenig Essigsäure wieder geklärt. Alkali soll auch nicht vorübergehend in einem Überschuß von mehr als einigen Tropfen zugegeben werden, da der Niederschlag sich sonst nicht wieder löst. Die Lösung wird nun im Claisenkolben im Vakuum bis zur beginnenden Krystallisation der Salze eingeengt, dann spült man in einen Meßkolben von 150 ccm und füllt bis zur Marke auf. Die Bestimmung des Gesamtstickstoffs geschieht in 2 Doppelanalysen (zu je 25 ccm nach Kjeldahl, wobei etwa 35 ccm Schwefelsäure benötigt werden (langsam einfließen lassen wegen der Entwicklung von Salzsäure). Nachdem die Lösung klar geworden ist, soll noch 3 Stunden länger erhitzt werden. Für die Bestimmung des Aminostickstoffs dauert die Einwirkung der salpetrigen Säure 6—10 Minuten; sein Volumen ist in der Regel etwa 2,5mal so groß als bei der Kjeldahlbestimmung Kubikzentimeter 0,1n-Säure verbraucht worden sind. Der Nichtaminostickstoff dieser Lösung gehört Prolin, Oxyprolin und Tryptophan an; er kann als Unterschied zwischen Gesamt- und Aminostickstoff berechnet oder auch unmittelbar bestimmt werden<sup>3)</sup>. Hierzu wird der noch vorhandene, gemessene Rest des Filtrats der Basenfällung (etwa 90—95 ccm) mit 5 ccm konzentrierter Salzsäure versetzt und im Scheidetrichter nacheinander mit 75, 50, 25 und 25 ccm Amylalkohol-Äther (1:1)

**Aminostickstoff im Filtrat.**

**Nichtaminostickstoff im Filtrat.**

<sup>1)</sup> Benedict: Journ. of biol. chem. Bd. 6, S. 363. 1909. — Denis: desgl. Bd. 8, S. 401. 1910/11.

<sup>2)</sup> S. dazu auch K. Felix: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 110, S. 217. 1920.

<sup>3)</sup> Hiller u. van Slyke: Journ. of biol. chem. Bd. 39, S. 479. 1919.

ausgeschüttelt und die vereinigten Auszüge noch in der oben angegebenen Weise gereinigt. Die von Phosphorwolframsäure befreite\*) wässrige Lösung wird im Vakuum eingeengt, nötigenfalls filtriert und im Meßkolben auf ein Volumen von 100 ccm gebracht\*\*). Je 20 ccm werden mit 1,2 ccm einer 30proz. Natriumnitritlösung und 5 ccm konzentrierter Salzsäure 45 Minuten im kochenden Wasserbade gehalten und damit der Aminostickstoff entfernt. Es wird dann zur Entfernung der salpetrigen Säure mit Natronlauge neutralisiert, in den Kolben mit dem inzwischen vorbereiteten verkupferten Zink\*\*\*) gespült, 0,75 g Magnesia zugesetzt, mit Wasser auf 200—250 ccm gebracht und gekocht, bis das entstandene Ammoniak entfernt ist (etwa 45 Minuten). Das Reaktionsgemisch wird dann vom Zink abgegossen und dieses quantitativ ausgewaschen und unter Wasser aufbewahrt; es ist für neue Verwendung bereit. Der Stickstoff der Lösung wird nach Kjeldahl bestimmt.

### Colorimetrische und titrimetrische Bestimmung einzelner Aminosäuren.

#### *Colorimetrische Bestimmung von Cystin nach Folin und Looney<sup>1)</sup>.*

495. Prinzip. Cystin wird durch Sulfit, wenn es in großem Überschuß vorhanden ist, vollständig zu Cystein reduziert; dieses bläut Phosphorwolframsäure (Reagens von Folin und Denis<sup>2)</sup>).

Bereitung der Cystinlösung aus Eiweiß. 1—5 g des vakuumtrockenen Proteins werden im 300-ccm-Kolben mit 25 ccm 20proz. Schwefelsäure am Rückfluß 12 Stunden gelinde gekocht (Mikrobrenner); die Lösung wird gekühlt, in einen 100-ccm-Meßkolben übergeführt, mit Wasser zur Marke aufgefüllt und gut gemischt. 1—10 ccm der Lösung†) werden in Meßkolben von 100 ccm überführt, 20 ccm einer gesättigten Sodalösung zugegeben und dann 10 ccm einer 20proz. Natriumsulfitlösung. Nach guter Durchmischung bleibt das Gemisch wenigstens 5 Minuten stehen.

Ausführung. Als Stammlösung zum Vergleich dient eine 5proz. Schwefelsäure, die in 1 ccm 1 mg Cystin enthält, sie ist unbegrenzt haltbar. 2 Vergleichslösungen werden†) bereitete aus 1,0 und 3,0 ccm in 2 100-ccm-Meßkolben der Stammlösung, 20 ccm der gesättigten Sodalösung††) und 10 ccm der 20proz. Natriumsulfitlösung. Nach 5 Minuten langem Stehen werden zu beiden ebenso wie zum Eiweißhydrolysat 3 ccm vom Phenolreagens (s. S. 282, 4) unter Schütteln zugegeben. Nach 10 Minuten langem Stehen werden auf 100 ccm verdünnt und die Farbtiefe der beiden in der Farbe am nächsten stehenden verglichen; sie nimmt langsam in allen 3 Lösungen gleichmäßig ab, so daß man in Ruhe die Messungen durchführen kann.

#### *Colorimetrische Bestimmung von Tyrosin und Tryptophan nach Folin und Looney<sup>3)</sup>.*

496. Prinzip. Beide Aminosäuren bläuen das Phenolreagens von Folin-Denis in sodalkalischer Lösung (Cystin erst bei Gegenwart von Sulfit). Tryptophan läßt sich vom Tyrosin

\*) Prüfung mit Barytwasser.

\*\*) Bei dieser Reinigung sollen nicht mehr als 2—3% vom Stickstoff verloren gehen.

\*\*\*) 80 g aufgerollte Streifen (2 × 8 cm) von Zinkblech werden 1—2 mal mit 1proz. Schwefelsäure blank geätzt, gewaschen und mindestens 8 Minuten lang mit einer Lösung von 10 g CuSO<sub>4</sub>, 5 aq + 6 ccm konzentrierte Schwefelsäure in 2 l Wasser stehen gelassen und darauf wieder sauber gewaschen; sie dürfen 6 mal benutzt werden; ihre Brauchbarkeit ist im Blindversuch mit einer Prolinlösung von bekanntem Gehalt zu prüfen.

†) Zum Abmessen benötigt man Büretten, die in 0,02 ccm geteilt sind.

††) Aus wasserfreiem Natriumcarbonat pro analysi zu bereiten.

<sup>1)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 51, S. 421. 1922.

<sup>2)</sup> Folin u. Denis: Journ. of biol. chem. Bd. 12, S. 240. 1912.

<sup>3)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 51, S. 421. 1922. Das ursprüngliche Verfahren von Folin u. Denis (Journ. of biol. chem. Bd. 12, S. 245. 1912) gab zu hohe Werte, s. Abderhalden (Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 83, S. 468 u. Bd. 85, S. 91. 1913); Fürth (Biochem. Zeitschr. Bd. 127, S. 137. 1922). Eine Prüfung dieses neuen Verfahrens von anderer Seite liegt noch nicht vor.

durch Quecksilbersulfat vollständig trennen, wenn der Schwefelsäuregehalt der Lösung zwischen 3,5 und 7,5% beträgt. Tyrosin fällt erst bei einem geringeren Gehalt an Säure mit.

Bereitung der Lösungen aus dem Proteinhydrolysat. 1 g vom vakuumtrockenen Protein wird in einem langhalsigen Kjeldahlkolben von 300 ccm Inhalt mit 3,5 g kristallisiertem Baryt und 25 ccm Wasser am Rückfluß 40—48 Stunden lang gelinde gekocht (Mikrobrenner). Dann werden 30 ccm 20proz. Schwefelsäure zugegeben und zur Entfernung des Schwefelwasserstoffs  $\frac{1}{2}$ —1 Stunde lang im kochenden Wasserbade gehalten. Das abgekühlte Gemisch wird in einen Meßkolben von 100 ccm überführt, bis zur Marke verdünnt, gemischt und durch trockenes Filter in trockenen Kolben filtriert. 1—8 ccm werden in ein Zentrifugenröhrchen (mit der Marke für 10 ccm) gebracht, 2 ccm des Quecksilbersulfatreagens von Hopkins und Cole (S. 313) zugefügt und mit 5proz. Schwefelsäure bis zur Marke aufgefüllt. Man verschließt mit Gummistopfen, schüttelt durch, läßt 2 Stunden stehen und schleudert dann aus. Die überstehende Flüssigkeit enthält das Tyrosin, sie wird abgegossen, der Bodenkörper so weitgehend als möglich von ihr befreit; er enthält das Tryptophan.

Bestimmung des Tyrosin.

Ausführung der Bestimmung von Tyrosin. Als Stammlösung zum Vergleich dient eine 5proz. Schwefelsäure, die in 1 ccm 1 mg Tyrosin enthält.

5 ccm der tyrosinhaltigen Lösung aus dem Protein (das ist die Hälfte) werden in einen Meßkolben von 100 ccm gebracht, in einen anderen Meßkolben von 100 ccm 1 ccm\*) der Tyrosinstammlösung, zu der man noch 1 ccm des Quecksilberreagens und 3 ccm 5proz. Schwefelsäure fügt. In beide Meßkolben gibt man dann 30 ccm Wasser, 20 ccm gesättigte Sodalösung\*\*) und 4 ccm 5proz. Natriumcyanidlösung\*\*\*) in der angegebenen Reihenfolge. Vor Zugabe des Cyanid wird die sodaalkalische Lösung geschüttelt. Das gelbe Quecksilbercarbonat geht rasch wieder in Lösung auf Zusatz von Cyanid. Man fügt 2 ccm vom Phenolreagens†) zu, läßt 10, besser 30 Minuten stehen, füllt auf und mißt die Farbtiefe aus.

Bestimmung des Tryptophan.

Ausführung der Bestimmung von Tryptophan. Als Stammlösung zum Vergleich dient eine 5proz. Schwefelsäure, die in 1 ccm 1 mg Tryptophan enthält.

Der Bodensatz im Zentrifugierröhrchen wird mit 10 ccm Wasser durch kräftiges Schütteln bei zugestopftem Röhrchen aufgerührt, man fügt innerhalb von 2—3 Minuten 4 ccm der 5proz. Natriumcyanidlösung zu und schüttelt wieder. Die Quecksilberfällung geht in Lösung. Zum Vergleich dient eine Lösung, die man sich in einem 2. Zentrifugenröhrchen auf genau die gleiche Weise aus dem Quecksilberniederschlag aus 1 ccm der Tryptophanstammlösung††) bereitet hat. Beide Lösungen werden in Meßkolben von 100 ccm überführt unter Nachspülen mit Wasser. Das Gesamtvolumen soll jetzt 50 ccm nicht überschreiten. Man fügt 20 ccm der gesättigten Sodalösung unter Schütteln zu, dann 2 ccm Phenolreagens, läßt 10, besser 30 Minuten stehen, füllt bis zur Marke auf und mißt die Farbtiefe.

#### *Colorimetrische Bestimmung von Tryptophan nach von Fürth<sup>1)</sup>.*

497. Prinzip. Die Reaktion beruht auf der Reaktion von Voisenet<sup>2)</sup>: Violettfärbung bei Zusatz von konzentrierter Salzsäure, die ganz wenig Nitrit enthält, zu einer formaldehydhaltigen Tryptophanlösung. Die Reaktion verläuft nur dann glatt, wenn ganz bestimmte, ziemlich eng umgrenzte Versuchsbedingungen eingehalten werden. Fehlergrenze etwa 10% des Wertes. Mit Benzaldehyd Blaufärbung.

\*) Zum Abmessen benötigt man Büretten, die in 0,02 ccm geteilt sind.

\*\*) Aus wasserfreiem Natriumcarbonat pro analysi zu bereiten.

\*\*\*) Gealtert, d. h. 3 Wochen alt oder 1—2 Stunden im kochenden Wasserbad gehalten.

†) S. 282, 4.

††) Denn der Quecksilberniederschlag gibt eine tiefere Bläuung als die gleiche Menge Tryptophan allein.

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 109, S. 108, 124—152. 1920. — Lüscher: Biochem. Journ. Bd. 16, S. 559. 1922. — Eine Abänderung, die bequemes Arbeiten gestattet und zu gleichen Werten zu führen scheint, stammt von Komm u. Böhringer: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 124, S. 293. 1923.

<sup>2)</sup> Chem. Zentralbl. 1906, I, S. 90.

Erforderliche Lösungen. 1. Als Stammlösung zum Vergleich dient eine 2 proz. Natriumfluoridlösung, die in 1 ccm 1 mg Tryptophan enthält. Sie ist ziemlich lange haltbar.

2. 0,05 proz. Natriumnitritlösung; aus einer haltbaren 5 proz. Stammlösung zu bereiten.

3. 2,5 proz. Formaldehydlösung oder 1,9 proz. Benzaldehydlösung in konzentrierter Salzsäure.

4. Konzentrierte Salzsäure.

Ausführung. Die Proteine werden fermentativ aufgespalten oder mit 20—30 proz. Natronlauge durch Erwärmen am Wasserbade in Lösung gebracht. Der Tryptophangehalt der Lösung beträgt am besten 0,05—0,20%.

2 ccm der Stammlösung werden in einem Meßkolben von 20 ccm mit 1 Tropfen Formaldehyd und 15 ccm Salzsäure gemischt. Nach 10 Minuten ist die Flüssigkeit gelblich geworden. Man setzt 10 Tropfen Nitritlösung zu und füllt mit Salzsäure bis zur Marke auf. Die Lösung nimmt eine schön violette Farbe an. Mit der Versuchslösung wird ebenso verfahren; die Menge des Nitrits muß der des Tryptophans genau angepaßt sein. Das Optimum wird durch allmählichen tropfenweisen Zusatz der Nitritlösung ermittelt. Eiweiß löst sich in der konzentrierten Salzsäure meist auf; hat man mit Lauge aufgespalten, so tritt beim Zusatz der Säure eine Salzfallung ein, von der vor der Farbvergleichung abfiltriert wird.

#### *Colorimetrische Bestimmung von Histidin<sup>1)</sup>*

498. Prinzip. Fällen der von Phenolen und Ammoniak befreiten und stark verdünnten Hydrolysenflüssigkeit mit Phosphorwolframsäure. Der Niederschlag enthält unter diesen Bedingungen kein Tyrosin, er wird in Natronlauge gelöst, die Lösung mit diazotierter p-Aminobenzolsulfosäure versetzt und colorimetriert. Histamin und Tyramin würden mitbestimmt werden, sind aber in frischem Material kaum jemals vorhanden.

Erforderliche Lösungen. 1. 4,5 g Sulfanilsäure und 45 ccm 37 proz. Salzsäure in 500 ccm Wasser.

2. 25 g Natriumnitrit (etwa 90 proz.) in 500 ccm Wasser.

3. 5,5 g wasserfreie Soda (pro analysi) in 500 ccm Wasser, aufzuheben in alkalibeständigem Glas.

4. Lösung von Histidindichlorid 1 : 10 000.

Bereitung der Histidinlösung aus Eiweiß. 1—3 g Protein mit 60 ccm 20 proz. Salzsäure in langhalsigem Rundkolben zur Trockne dampfen, dann noch weiter 1 Stunde bei 80° im Vakuum halten, Rückstand in 100 ccm Wasser lösen, mit Überschuß von Calciumhydroxyd und 50 ccm 95 proz. Alkohol behandeln, durch Vakuumdestillation bei 40° Ammoniak, Alkohol und einen Teil des Wassers entfernen, absaugen und Rückstand sorgfältig waschen mit viel heißem Wasser, bis die Pauly'sche Reaktion (S. 268) negativ. Filtrat mit kleinem Überschuß von Salzsäure versetzen, darauf auf Wasserbad in Glasschale bis zur Trockne einengen. Rückstand mit 18 ccm 37 proz. Salzsäure in Erlenmeyerkolben überführen, mit Wasser auf genau 100 ccm auffüllen, auf Wasserbad erwärmen und dann Zufügen 100 ccm einer heißen 15 proz. wässrigen Lösung von Phosphorwolframsäure, Mischung  $\frac{1}{2}$  Stunde auf Wasserbad digerieren, wenn die Zimmertemperatur erreicht ist, für 48 Stunden im Eisschrank und dann noch 24 Stunden bei 0° halten. Histidinphosphorwolframat löst sich bei 20° wesentlich leichter als bei 0°. Korrektur für dann noch in Lösung gebliebenes Histidin 5,71 mg. Absaugen, statt Büchnertrichter besser Platinkonus mit doppelter Papiereinlage und Waschen mit eiskalter Lösung, die 18 ccm 37 proz. Salzsäure und 15 g Phosphorwolframsäure auf 200 ccm enthält und mit Histidinphosphorwolframat gesättigt ist. Niederschlag mitsamt dem Filter in 1000-ccm-Becherglas überführen, in der eben ausreichenden Menge 3,1 n-Natronlauge

<sup>1)</sup> Hanke u. Koeßler: Journ. of biol. chem. Bd. 39, S. 497. 1919; Bd. 43, S. 527. 1920.

lösen (Überschuß schadet!). Durch Faltenfilter in 1000-ccm-Meßkolben filtrieren, sorgfältig waschen und auffüllen.

Diazoreagens. Täglich frisch herzustellen; es werden je 1,5 ccm von Lösung 1 und 2 in einem 50-ccm-Meßkolben zusammengebracht, der Kolben wird für 5 Minuten in Eis getaucht, dann nochmals 6,0 ccm von Lösung 2 hinzugegeben, gemischt und weitere 5 Minuten in Eis getaucht. Auffüllen und in Eis aufbewahren.

Vergleichslösung: Mischen von 1,5 ccm der Diazoreagens mit 10 ccm der Lösung 4 und 3,6 ccm der Lösung 3<sup>1)</sup>.

Ausführung. In einem Zylinder des Duboscqcolorimeters werden 1 — x Wasser und 5,0 ccm von Lösung 3 gemischt, 2,0 ccm vom Reagens zufließen gelassen, dann x ccm der Histidinlösung, darauf wird gemischt und längstens 1 Minute nach Beginn angefangen abzulesen, eingestellt auf 20 mm. x soll zwischen 0,01 und 1,0 ccm betragen. Beste Werte mit 0,5—3% Fehler, wenn Höhe der Vergleichslösung 5—20 mm beträgt. Maximum der Farbe nach 6 Minuten, haltbar 2—3 Minuten.

Berechnung. Millimeter der Vergleichsflüssigkeit  $\times 0,000002$  gibt Gramm Histidindichlorid in x ccm der Lösung.

Fehlerquellen. Cystin fängt erst an zu stören, wenn es im Verhältnis 6 : 1 gegenüber Histidin vorliegt. Leucin, Arginin stören nicht.

Bestimmung anderer  
Imidazolabkömmlinge.

Ein colorimetrisches Bestimmungsverfahren, das auf der gleichen Reaktion beruht, ist von Koeßler und Hanke auch für Histamin<sup>2)</sup> und andere Imidazolabkömmlinge ausgearbeitet worden.

#### *Titrimetrische Bestimmung von Histidin<sup>3)</sup>.*

499. Prinzip. Der Azofarbstoff aus Histidin mit diazotierter Sulfanil- oder Arsanilsäure wird mit Titantrichloridlösung von bekanntem Gehalt in der Siedehitze reduziert und der Überschuß des letzteren mit Eisenalaun zurücktitriert<sup>4)</sup>. Man fügt zu der histidinhaltigen Lösung die Diazolösung im Überschuß hinzu, so daß das Histidin völlig unter Farbstoffbildung umgewandelt wird. Die überschüssige Diazolösung wird sodann durch Alkohol in der Siedehitze zersetzt, während der gebildete Farbstoff unverändert bleibt. Diazobenzolsulfosäure verbindet sich mit Histidin im Verhältnis 1 : 1. Manche Derivate (Carnosin) verhalten sich anders. Tyrosin reagiert ebenfalls mit Diazolösung; eine Abtrennung der Histidinfraktion aus dem Gemisch der hydrolytischen Spaltungsprodukte ist notwendig, zumal auch andere Aminosäuren die Kupplung des Histidins behindern. Dies ist nicht mehr der Fall, wenn die Aminosäuren noch zu größeren Komplexen vereinigt sind. In tyrosinfreien Proteinen läßt sich der Histidingehalt unmittelbar ohne vorangegangene Hydrolyse ermitteln; in tyrosinhaltigen ist die gefundene Zahl auffallenderweise stets viel kleiner, als aus der Summe von Histidin und Tyrosin zu erwarten ist.

Erforderliche Lösungen. 1. Etwa  $\frac{1}{10}$ -Titantrichlorid aus käuflicher 20proz. Lösung oder aus Titantrichlorid mit Zinn bereitet und unter konstantem Wasserstoffdruck aufbewahrt. Vorratsflasche und Bürette sind miteinander verbunden. Die Lösung wird mit einer Ferrilösung eingestellt, die aus Mohrschem Salz mit Permanganat bereitet ist und als Urlösung dient. Der Titer der Titanlösung ist stets frisch zu bestimmen<sup>5)</sup>.

2.  $\frac{1}{10}$ -Eisenoxydalaunlösung.

3. Rhodankali.

4. Salzsäure.

5. 2proz. Diazobenzolsulfosäure, frisch bereitete sodaalkalische Lösung nach Pauly<sup>6)</sup>.

Ausführung. Die zu untersuchende Substanz wird mit der 10fachen Menge konzentrierter Salzsäure oder 33proz. Schwefelsäure 12 Stunden am

1) Weiß u. Ssobilew: Biochem. Zeitschr. Bd. 58, S. 119. 1914.

2) Journ. of biol. chem. Bd. 39, 41, 43 und 50. 1919.

3) Lautenschläger: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 102, S. 226. 1918.

4) Knecht u. Hibbert: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 36, 1, S. 166, 2, S. 1549. 1903; Bd. 38, 3, S. 3318. 1905.

5) H. Meyer: Analyse und Konstitutionsermittlung, 4. Aufl., S. 1040. 1922.

6) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 42, S. 508, Anmerkung. 1904 u. § 325, 12.



Rückfluß im Ölbade hydrolysiert\*). Huminsubstanzen brauchen nicht abfiltriert zu werden. Dem Hydrolysat wird dann soviel konzentrierte Sublimatlösung zugesetzt, daß auf 1 Mol. der zu erwartenden Histidinmenge reichlich 2 Mol. Sublimat entfallen. Nun wird die Lösung durch Natriumcarbonat alkalisch gemacht, filtriert und ausgewaschen. Der Niederschlag wird in Wasser suspendiert, mit Schwefelwasserstoff vom Quecksilber befreit — Huminsubstanzen bleiben im Schwefelquecksilber zurück —, das Filtrat samt Waschwasser auf eine passende Konzentration eingeeengt und titriert.

(Ein anderes Verfahren besteht in der Hydrolyse mit Jodwasserstoffsäure und Phosphorsäure, die später mit Bleiacetat wieder entfernt werden. Aus dem bleifreien Filtrat wird mit Hilfe der Silberbarytfällung das Histidin gewonnen.)

Von der Histidinlösung wird eine etwa 0,1 g enthaltende Menge, wenn nötig, mit Wasser verdünnt, mit 20 ccm 96proz. Alkohol versetzt und die Diazolösung im Überschuß hinzugegeben. Die entstandene Farbstofflösung wird auf dem Wasserbade solange erwärmt, bis der Alkohol vollständig verflüchtigt ist. Die alkalische Lösung wird mit verdünnter Salzsäure angesäuert und in die kochende Lösung unter Einleiten von Kohlensäure Titanlösung im Überschuß (etwa 20 ccm) zufließen gelassen bis zur vollständigen Entfärbung. Es wird abgekühlt, reichlich Rhodansalz zugegeben und mit der Ferrilösung zurücktitriert. Da die Diazobenzolsulfosäure für sich in alkalischer Lösung sehr rasch unter Bildung von Farbstoffen umgewandelt wird, so muß stets ein Blindversuch mit der gleichen Menge Diazolösung daneben ausgeführt werden, dessen Ergebnis bei der Berechnung in Abzug zu bringen ist.

Beispiel. 1. Blindversuch: 10 ccm der Lösung 5 alkalisch mit Alkohol verkocht, dann mit Salzsäure angesäuert, mit 20 ccm  $\frac{n}{10}$ -Titanlösung versetzt brauchen 19,5 ccm  $\frac{n}{10}$ -Eisenlösung beim Zurücktitrieren. 10 ccm Diazolösung verbrauchen also 0,5 ccm Titanlösung.

2. Hauptversuch: 10 ccm einer 1proz. Histidinlösung + 10 ccm der Lösung 5, dann verkocht, angesäuert, 20 ccm  $\frac{n}{10}$ -Titanlösung zugefügt. Bei der Rücktitration werden 13,0 ccm Eisenlösung gebraucht. Das Histidin hat demnach  $7,0 - 0,5 = 6,5$  ccm  $\frac{n}{10}$ -Titanlösung verbraucht entsprechend  $6,5 \cdot 0,0155 = 0,1007$  g Histidin.

\*) Tyrosinfreie Proteine können ohne Hydrolyse für die Bestimmung benutzt werden.

## 500. Gehalt einiger Proteine a

	Serum- albu- min 1)	Ov- albu- min 2)	Lact- albu- min 3)	Fibri- nogen 4)	Serum- globu- lin 5)	$\alpha$ -Kry- stallin 6)	$\beta$ -Kry- stallin 6)	Bence- Jonesscher Körper 7)	Histon aus Nucleo- histon 8)	Gadus- histon 9)	Lota- histon 10)	Globin, be- rechnet aus Hämoglobin 11)
Ammoniak . . .		1.3	1.3						1.7	0.7	0.7	
Glykokoll . . .	0	0	0	3.0	3.5	0	0	1.7	0.5			0
Alanin . . . .	2.7	2.2	2.4	3.6	2.2	3.6	2.6	4.5	3.5			4.2
Valin . . . . .		2.5	3.3	1.0	+	0.9	2.1	5.6				
Leucin . . . . .	20.0	10.7	19.4	15.0	18.7	} 5.7	2.8	5.5	11.8			29.0
Isoleucin . . .												
Asparagin- säure . . . . .	3.1	2.2	9.3	2.0	2.5	1.2	0.4	4.5	+			4.4
Glutamin- säure . . . . .	7.7	9.1	12.9	10.4	8.5	3.6	2.7	8.0	3.7			1.7
Cystin . . . . .	2.5	0.2?	1.7	1.2	0.6			0.6	+			0.3
Serin . . . . .	0.6	?	1.7	0.8	+	+	+	—				0.6
Oxyglutamin- säure . . . . .			10.0									
Arginin . . . .	4.4	2.4	3.5	4.6	3.6	8.0	7.5	6.1	14.4	15.5	12.0	5.4
Lysin . . . . .	8.2	3.2	9.9	5.2	4.8	3.8	4.6	3.7	7.7	8.3	3.2	4.3
Histidin . . . .	2.4	0.7	2.6	2.1	1.3	3.8	2.6	0.8	1.2	2.3	2.9	11.0
Prolin . . . . .	1.0	3.6	4.0	3.6	2.7	1.8	1.4	2.7	1.5			2.3
Oxyprolin . . .												1.0
Phenylalanin	3.1	5.1	2.4	2.5	4.9	5.5	4.1		2.2			4.2
Tyrosin . . . .	2.1	1.8	2.0	3.5	4.2	3.5	3.7		6.3			1.3
Tryptophan . .	+	+	+	1.3	0.8	+	+	0.8				+

1) Abderhalden: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 37, S. 495. 1902/03; Bd. 46, S. 194. 1905. — K. Mörner: desgl. Bd. 34, S. 207. 1901/02. — Lock u. Thomas: desgl. Bd. 87, S. 74. 1913.

2) Osborne, Jones u. Leavenworth: Americ. Journ. of physiol. Bd. 24, S. 252. 1909. — Chapman u. Petrie: Journ. of physiol. Bd. 39, S. 341. 1909. — K. Mörner: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 34, S. 207. 1901/02.

3) Abderhalden u. Pribram: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 51, S. 409. 1907. — Osborne, Jones Leavenworth u. Vinograd: Journ. of biol. chem. Bd. 22, S. 266. 1915. — Jones u. Johns: desgl. Bd. 48, S. 347. 1921.

4) Abderhalden u. Voitnovici: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 52, S. 371. 1907. — K. Mörner: desgl. Bd. 34, S. 268. 1901/02. — Lock u. Thomas: desgl. Bd. 87, S. 74. 1913. — Neuberg u. Popowsky: Biochem. Zeitschr. Bd. 2, S. 357. 1907.

5) Abderhalden: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 44, S. 22. 1905; Bd. 46, S. 194. 1905. — K. Mörner: desgl. Bd. 34, S. 268. 1901/02. — Lock u. Thomas: desgl. Bd. 87, S. 74. 1913.

6) Jeß: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 110, S. 275. 1920; Bd. 122, S. 160. 1922.

7) Abderhalden u. Rostoski: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 46, S. 135. 1905. — Hopkins u. Savory: Journ. of physiol. Bd. 42, S. 229. 1911.

8) Kossel u. Kutscher: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 31, S. 165. 1900/01. — Kutscher: desgl. Bd. 38, S. 114, 126. 1903. — Abderhalden u. Rona: desgl. Bd. 41, S. 278. 1904.

9) Kossel u. Kutscher: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 31, S. 165. 1900/01.

10) Ehrström: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 32, S. 350. 1901.

11) Abderhalden: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 37, S. 484. 1902/03.

## Mono- und Diaminosäuren.

Salmin (Rhein) <sup>12)</sup>	Salmin (Kali- formien) <sup>13)</sup>	Cy- pri- nin- $\alpha$ <sup>14)</sup>	Stu- rin <sup>15)</sup>	Fisch- bein <sup>16)</sup>	Schild- patt <sup>17)</sup>	Elefan- tenepl- dermis <sup>18)</sup>	Schup- pen von Manis japonica <sup>19)</sup>	Epider- mis von Boa con- strictor <sup>20)</sup>	Keratin aus					weißem Men- schen- haar <sup>26)</sup>	
									Rin- der- horn <sup>21)</sup>	Ham- mel- horn <sup>22)</sup>	Schaf- wolle <sup>23)</sup>	Pferde- haar <sup>24)</sup>	Gänse- federn <sup>25)</sup>		
0	0														Ammoniak
0	0			0.8	19.4	8.3	1.3	7.9	0.3	0.5	0.6	4.7	2.6	9.1	Glykokoll
0	0		+	6.4	3.0	5.1	12.0	2.1	1.2	1.6	4.4	1.5	1.8	6.9	Alanin
4.3	5.3	+	0?	9.7	5.2	2.4	4.0		5.7	4.5	2.8	0.9	0.5	+	Valin
0	0		+	3.8	3.3	3.6	10.3	12.4	18.3	15.3	11.5	7.1	8.0	12.1	Leucin
0	0														Isoleucin
0	0			2.5					2.5	2.5	2.3	0.3	1.1		Asparagin- säure
0	0			8.9	0	10.2	3.5	2.1	16-18	17.2	12.9	3.7	2.3	8.0	Glutamin- säure
0	0			4.2	5.2	4.7	4.5	3.8	6.8	7.5	7.3	8.0	0.4	11.6	Cystin
7.8	8.7		0?	1.0					0.7	1.1	0.1	0.6			Serin
															Oxyglut- aminsäure
87.4	91.7	4.9	58.2						2.3	2.7		4.5			Arginin
0	0	28.8	12.9							0.2		1.1			Lysin
0	0		12.9							—?	4.4	+	3.5		Histidin
11.0	10.8		0	2.6			3.5		3.6	3.7		3.4			Prolin
0	0														Oxyprolin
0	0			0.5	1.1	2.3	2.7	3.8	3.0				+	0.6	Phenylalanin
0	0			5.7	13.6	5.2	13.0	10.5	4.6		2.9	3.2	3.6	3.3	Tyrosin
0	0			+											Tryptophan

<sup>12)</sup> Kossel u. Dakin: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 41, S. 407. 1904 und die Angaben § 360.

<sup>13)</sup> Taylor: Journ. of biol. chem. Bd. 5, S. 389. 1909.

<sup>14)</sup> Kossel u. Dakin: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 40, S. 567. 1903/04.

<sup>15)</sup> Kossel u. Kutscher: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 31, S. 184. 1900/01. — Kossel u. Dakin: desgl. Bd. 44, S. 342. 1905. — Kossel u. Weiß: desgl. Bd. 78, S. 404. 1912.

<sup>16)</sup> Abderhalden u. Landau: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 71, S. 455. 1911.

<sup>17)</sup> Buchtala: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 74, S. 212. 1911.

<sup>18)</sup> Buchtala: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 78, S. 55. 1912.

<sup>19)</sup> Buchtala: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 85, S. 241. 1913.

<sup>20)</sup> Buchtala: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 85, S. 338. 1913.

<sup>21)</sup> E. Fischer u. Dörpinghaus: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 36, S. 462. 1902. — Abderhalden u. Voitnovici: desgl. Bd. 52, S. 352. 1907. — Hedin: desgl. Bd. 21, S. 160. 1895/96. — K. Mörner: desgl. Bd. 34, S. 218. 1901/02.

<sup>22)</sup> Abderhalden u. Voitnovici: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 52, S. 351. 1907.

<sup>23)</sup> Abderhalden u. Voitnovici: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 52, S. 349. 1907.

<sup>24)</sup> Abderhalden u. Wells: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 46, S. 31. 1905. — Argiris: desgl. Bd. 54, S. 86. 1907/08. — Buchtala: desgl. Bd. 52, S. 474. 1907.

<sup>25)</sup> Abderhalden u. Le Count: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 46, S. 40. 1905.

<sup>26)</sup> Buchtala: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 85, S. 249. 1913.

## 500. Gehalt einiger Proteine an

	Neurokeratin <sup>27)</sup>	Eihäute				Elastin <sup>32)</sup>	Ichthylepidin von Fischschuppen <sup>33)</sup>	Glutin <sup>34)</sup>	Seidenfibrin <sup>35)</sup>	Spinnenseide <sup>36)</sup>	Bysus <sup>37)</sup>	Sericin Canton <sup>38)</sup>	Sericin Indisch <sup>39)</sup>	Albumoid der Linse <sup>40)</sup>	Spongin <sup>41)</sup>
		Hühner-eier <sup>28)</sup>	Scyllium stellare <sup>29)</sup>	Testudo graeca <sup>30)</sup>	Koilin <sup>31)</sup>										
Ammoniak . . .							0.4		1.2						
Glykokoll . . .		3.9	2.6	+	1.2	25.8	5.7	25.5	40.5	35.1	viel	1.2	1.5	0	13.9
Alanin . . .		3.5	3.2	+?	5.8	6.6	3.1	8.7	25.0	23.4	+	9.2	9.8	0.8	+?
Valin . . .		1.1				1.0		0	+?		+?	?		0.2	+?
Leucin . . .	+	7.4	} 5.8	+	} 13.2	21.4	15.1	7.1	2.5	1.8	+?	5.0	4.8	} 5.3	7.5
Isoleucin . . .															
Asparaginsäure . . .		1.1	2.3	+	2.3		1.2	3.4	0		+	2.5	2.8	0.5	4.7
Glutaminsäure . . .		8.1	7.2	+	5.2	0.8	9.2	5.8	0	11.7		2.0	1.8	4.6	18.1
Cystin . . .	1.5	7.6	0.5		0.8			—	—						
Serin . . .								0.4	1.8	—?	+?	5.8	5.4	+	
Oxyglutaminsäure . . .								0							
Arginin . . .	2.2		3.2		3.6	wenig		8.2	1.5	} 5.2 als Ar- gi- nin ber.			10.3	5—6	
Lysin . . .	2.7		3.7		1.6	wenig		5.9	0.9					3.8	3—4
Histidin . . .	+?		1.7		+?	wenig		0.9	0.8						2.7
Prolin . . .		4.0	4.4	+	5.5	11.5	6.7	9.5	1.0	3.7	viel	2.5	3.0	1.9	6.3
Oxyprolin . . .								14.1							
Phenylalanin			3.3	+?	2.3	3.9	—?	1.4	1.5	—?	+?	0.6	0.3	4.6	
Tyrosin . . .	4.6	0	10.6		5.4	+	1.0	0.01	11.0	8.2	viel	2.3	1.0	3.6	0
Tryptophan . . .								0	0		+?			+	

<sup>27)</sup> Argiris: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 54, S. 86. 1907/08.

<sup>28)</sup> Abderhalden u. Ebstein: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 48, S. 530. 1906. — K. Mörner: desgl. Bd. 34, S. 231. 1901/02.

<sup>29)</sup> Pregl: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 56, S. 1. 1908. — Buchtala: desgl. Bd. 56, S. 11. 1908.

<sup>30)</sup> Abderhalden u. Strauß: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 48, S. 535. 1906.

<sup>31)</sup> Hofmann u. Pregl: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 52, S. 448. 1907. — v. Knaffl-Lenz: desgl. Bd. 52, S. 472. 1907. — Buchtala: desgl. Bd. 69, S. 312. 1911.

<sup>32)</sup> Abderhalden u. Schittenhelm: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 41, S. 293. 1904. — Kossel u. Kutscher: desgl. Bd. 25, S. 551. 1898. — Horbaczewski: Monatshefte f. Chem. Bd. 6, S. 639. 1885. — Richards u. Gies: Americ. Journ. of physiol. Bd. 7, S. 93. 1902. — England: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 120, S. 137. 1922.

<sup>33)</sup> Abderhalden u. Voitinovici: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 52, S. 368. 1907.

<sup>34)</sup> E. Fischer, Levene u. Aders: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 35, S. 70. 1902. — E. Fischer: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 35, 3, S. 2660. 1902. — E. Fischer u. Abderhalden: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 42, S. 543. 1904. — Kossel u. Kutscher: desgl. Bd. 31, S. 203. 1900/01. — Hart: desgl. Bd. 33, S. 358. 1901. — Hopkins u. Cole: Journ. of physiol. Bd. 29, S. 456. 1903. — Dakin: Journ. of biol. chem. Bd. 44, S. 499. 1920.

<sup>35)</sup> E. Fischer u. Skita: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 33, S. 177. 1901; Bd. 35, S. 221. 1902. — E. Fischer: desgl. Bd. 39, S. 157. 1903. — E. Abderhalden: desgl. Bd. 120, S. 208. 1922.

<sup>36)</sup> E. Fischer: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 53, S. 126. 1907.

<sup>37)</sup> Abderhalden: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 55, S. 236. 1908.

<sup>38)</sup> Abderhalden u. Worms: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 62, S. 142. 1909.

<sup>39)</sup> Strauch: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 71, S. 365. 1911.

<sup>40)</sup> Jeß: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 110, S. 275. 1920; Bd. 122, S. 160. 1922.

<sup>41)</sup> Abderhalden u. Strauß: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 48, S. 49. 1906. — Kossel u. Kutscher: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 31, S. 205. 1900/01.

## Mono- und Diaminosäuren. (Fortsetzung von voriger Seite.)

Syntonin <sup>42)</sup>	Witte Pepton <sup>43)</sup>	Fibrin- Prot- albumose <sup>44)</sup>	Fibrin- Hetero- albumose <sup>45)</sup>	Plastein <sup>46)</sup>	Casein von			Vitellin Hühnerei <sup>49)</sup>	Ovom- coid <sup>51)</sup>	Pseudo- mucin <sup>52)</sup>	
					Kuh <sup>47)</sup>	Ziege <sup>48)</sup>	Frau <sup>49)</sup>				
0.8		0.9	1.7		1.6		0	1.3		3.2	Ammoniak
0.5	0.8	1.5	0.2	2.2	0	0	1.2	0		0.2	Glykokoll
4.0	2.8	2.5	3.4	?	1.5	1.5	1.3	0.8			Alanin
0.9	14.7	0.8	3.5	15.6	7.2		8.8	1.9			Valin
7.8		5.8	3.1		9.4	7.4		9.9	4.0	4.7	Leucin
		1.6	3.0								Isoleucin
0.5	1.7	3.0	4.7	2.2	1.4	1.1	1.0	2.2	1.8	+	Asparagin- säure
13.6	8.2	0.6	9.6	10.0	15.6	11.3	11.0	13.0	2.0	0.6	Glutamin- säure
		0.7	4.1		?						Cystin
	1.2				0.5						Serin
											Oxyglut- aminsäure
5.1	1.5	7.7	6.4	2.1	3.8			7.5		0.8	Arginin
3.3	2.7	8.4	4.8	1.4	6.0			4.8		2.7	Lysin
2.7	0.8	2.8	1.8	0.4	2.5			1.9			Histidin
3.3	4.6	5.0	4.3	2.6	6.7	4.6	2.9	4.2	2.4		Prolin
	0				0.3						Oxyprolin
2.5	2.6	4.4	2.5	1.0	3.2	2.8	2.8	2.6	4.0		Phenylalanin
2.2	3.3	4.6	3.5	3.0	4.5	5.0	4.7	3.4	+	1.1	Tyrosin
	+			+	1.5			+			Tryptophan

<sup>42)</sup> Abderhalden u. Sasaki: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 51, S. 404. 1907.  
— Hart: desgl. Bd. 33, S. 355. 1901.

<sup>43)</sup> Levene u. van Slyke: Biochem. Zeitschr. Bd. 13, S. 440. 1908.

<sup>44)</sup> Levene, van Slyke u. Birchard: Journ. of biol. chem. Bd. 10, S. 57. 1911.

<sup>45)</sup> Levene, van Slyke u. Birchard: Journ. of biol. chem. Bd. 8, S. 269. 1910. — Haslam: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 32, S. 54. 1901.

<sup>46)</sup> Levene u. van Slyke: Biochem. Zeitschr. Bd. 13, S. 458. 1908.

<sup>47)</sup> E. Fischer: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 33, S. 151. 1901; Bd. 39, S. 155. 1903. — Abderhalden: desgl. Bd. 44, S. 17. 1905; Bd. 53, S. 19. 1907. — E. Fischer u. Abderhalden: desgl. Bd. 42, S. 540. 1904. — Hart: desgl. Bd. 33, S. 356. 1901. — K. Mörner: desgl. Bd. 34, S. 285. 1901/02. — Hopkins u. Cole: Journ. of physiol. Bd. 27, S. 418. 1902. — Osborne u. Guest: Journ. of biol. chem. Bd. 9, S. 333. 1911.

<sup>48)</sup> Abderhalden u. Schittenhelm: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 47, S. 458. 1906.

<sup>49)</sup> Abderhalden u. Langstein: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 66, S. 8. 1910.

<sup>50)</sup> Osborne u. Jones: Americ. Journ. of physiol. Bd. 24, S. 153. 1909.

<sup>51)</sup> Abderhalden: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 44, S. 17. 1905.

<sup>52)</sup> Otori: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 42, S. 453. 1904; Bd. 43, S. 74. 1904.

**Tierfermente<sup>1)</sup>.**

(Bearbeitet von P. Brigl-Tübingen.)

*Allgemeines.*

- Definition.** 501. Unter Fermenten oder Enzymen versteht man Katalysatoren, die von der lebenden Zelle erzeugt werden, ohne daß ihre Wirkung an den Lebensprozeß als solchen gebunden ist. Es ist bisher noch nicht gelungen, ein Ferment seiner chemischen Natur nach so weit aufzuklären, daß eine Einreihung in irgendeine besondere chemische Gruppe hat erfolgen können. Charakterisiert sind die Fermente ausschließlich durch ihre meist stark spezifische Wirkung und deren Abhängigkeit von bestimmten äußeren Faktoren, besonders der Wasserstoffionenkonzentration.
- Einteilung.** Die Fermente sind zu scheiden in 1. hydrolysierend, 2. oxydierend resp. reduzierend wirkende Substanzen. Die Gruppe, die im Pflanzenreich ferner noch eine große Rolle spielt, die Fermente, die die Kohlenstoffketten der Kohlenhydrate sprengen können, die Gärungsfermente, sind im Tierreich trotz ihrer Wichtigkeit noch nicht genügend erforscht. Die hydrolysierend wirkenden Fermente, die aber vielfach bei anderen Konzentrationsverhältnissen auch synthetisierend wirken können, sind je nach dem Substrat, auf das sie eingestellt sind, einzuteilen in Fermente des Eiweißes und der Polypeptide, der Fette, der Kohlenhydrate, des Arginins, der Nucleinsäuren und der Purinkörper: Für die Namen der Fermente hat sich eine rationelle Nomenklatur noch nicht eingebürgert. Ein Teil wird so bezeichnet, daß man an das von dem betreffenden Ferment gespaltene Substrat die Endung „ase“ anhängt, etwa Amylase für das stärkespaltende Ferment. Daneben bestehen noch die alten, historisch gewordenen Namen.
- Eigenschaften.** Für die Enzyme werden meist eine Reihe von gemeinsamen Eigenschaften angenommen. Da es jedoch noch nicht gelungen ist, ein chemisch reines Ferment zu isolieren, ist es sehr unsicher, wieweit diese Eigenschaften durch die eigentliche katalytisch wirkende Substanz, wieweit durch vorläufig nicht abgetrennte Begleitstoffe bedingt sind. Einzelne Fermente sind bisher nicht von unlöslichen Zellbestandteilen zu trennen gewesen, die Mehrzahl ist in Wasser, viele sind auch in Glycerin löslich, in sonstigen organischen Lösungsmitteln unlöslich, nur stark mit Wasser verdünnter Alkohol löst gelegentlich, stärkerer fällt aber aus. Die Löslichkeit in Wasser ist oft abhängig von der Gegenwart von Elektrolyten, Salzen, Säuren oder Alkalien, so daß bei deren Entfernung oder Abstumpfung Ausfällung eintritt.
- Löslichkeit.**
- Fermente als Kolloide.** Die Fermentlösungen pflegen im allgemeinen kolloidalen Charakter zu haben. Es ist aber unbestimmt, wieweit die Fermente selbst Kolloide sind (Bayliss<sup>2)</sup>, Fodor<sup>3)</sup> oder wieweit der kolloidale Zustand bedingt ist durch Begleitstoffe, die ihrerseits mit dem eigentlichen Katalysator eine Absorptionsverbindung eingehen können. Jedenfalls kann der Dispersionsgrad ein sehr verschiedener sein, je nach der Reinheit der Fermentlösungen. Es gelingt in sehr vielen Fällen, Fermentlösungen, die ursprünglich grob dispers erschienen, soweit zu reinigen, daß sie optisch leer werden. Immerhin ist anzunehmen, daß der kolloidale Zustand, sei es des Ferments, sei es seines Trägers, für die hohe Wirksamkeit des Ferments von ausschlaggebender Bedeutung ist, wenn auch zur Erklärung

<sup>1)</sup> Zusammenfassung bei Oppenheimer: Fermente. Leipzig 1913; Euler: Chemie der Enzyme. II. Aufl. München-Wiesbaden 1920/23; kürzeres Referat in den Vorträgen von Euler, Willstätter, Neuberg, Wieland: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 55, S. 3583—3648. 1923.

<sup>2)</sup> Bayliss, Das Wesen der Enzymwirkung. Dresden-Leipzig 1910; The nature of enzyme action. London 1914.

<sup>3)</sup> Das Fermentproblem. Dresden 1922.

der oft strengen Spezifität der Wirkung die Annahme von Besonderheiten im chemischen Bau nicht zu umgehen ist. Durch den Kolloidcharakter erklären sich eine Reihe von Eigenschaften, die als gemeinsam für Fermentlösungen angegeben werden. Fermente pflegen nicht, oder wenigstens nur schwierig, dialysierbar zu sein, abhängig von der Porengröße des Dialysierschlauchs und dem Material. Näheres darüber bei Reinigung (S. 604). Vor allem zeigen sie die Erscheinungen der Absorption, was gleichfalls in immer steigendem Maße zur Reinigung von Fermentlösungen benutzt wird (Willstätter, Euler<sup>1</sup>). Als eine Absorption ist zunächst die sog. Schüttelinaktivierung von Fermenten aufzufassen. Beim längeren Schütteln tritt eine Inaktivierung mancher Fermentlösungen ein, durch Absorption an Niederschlägen, die sich durch das Schütteln gebildet haben, oder auch nur an der Oberfläche des gebildeten Schaums (Abderhalden und Guggenheim<sup>2</sup>), Schmidt-Nielsen<sup>3</sup>). Auf Absorption beruht vor allem die Fällbarkeit der Fermente durch Stoffe in feinsten Verteilung, eine Eigenschaft, die zuerst von Brücke<sup>4</sup>) zur Reinigung benutzt wurde. Wirksam sind anorganische Niederschläge wie Calciumphosphat, organische wie Cholesterin, Tierkohle, vor allem auch ausfallende hydrophile Kolloide, wie Eiweißstoffe. Um durch Absorption eine Reinigung erzielen zu können, werden neuerdings solche Stoffe mit wirksamer Oberfläche bevorzugt, die einen ausgeprägten sauren (Kaolin) oder basischen (Tonerde) Charakter haben, da diese Stoffe je nach der Polarität des Ferments auswählend fallen können (Michaelis, mit Ehrenreich und Rona<sup>5</sup>). Näheres darüber bei der Besprechung der Reinigung der Fermentlösungen (S. 604). Fermente zeigen auch ausgeprägte Wanderungsfähigkeit durch den elektrischen Strom, einzelne nur in einer Richtung, andere in verschiedener je nach der Reaktion der Lösung (Bierry, Henry und Schaeffer<sup>6</sup>), Michaelis<sup>7</sup>), Iscoresco<sup>8</sup>). Die Wanderungsrichtung ist ebenso wie die Absorption stark abhängig von der Gegenwart und der Natur der Beimengungen (Pekelharing und Ringer<sup>9</sup>), Willstätter<sup>10</sup>), was manche älteren Angaben wertlos macht.

Die Wirksamkeit von Fermentlösungen wird gefördert oder gehemmt von einer ganzen Reihe äußerer Faktoren. Es gibt ein ausgeprägtes Temperaturoptimum, für tierische Fermente meist bei Bruttemperatur liegend, bei höherer Temperatur beginnt bald eine Schädigung, bei etwa 75—80° pflegen wässrige Lösungen meist unwirksam zu werden. In ganz trockenem Zustand und teilweise auch in Glycerinlösung vertragen die Fermente eine viel höhere Temperatur, bis über 100°. Einzelne Fermente sind gegen Licht empfindlich, besonders gegen chemisch wirksame Strahlen. Die Wirksamkeit ist weiter regelmäßig gebunden an eine bestimmte Wasserstoffionenkonzentration. Nur in einem schmalen Bereich pflegt stärkste Wirkung aufzutreten, darüber hinaus,

<sup>1</sup>) Zusammenstellung über Absorption von Fermenten bei Euler: Enzyme. 2. Aufl. Bd. 1, S. 87. München-Wiesbaden 1920, und bei Willstätter u. Waldschmidt-Leitz: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 125, S. 133. 1923.

<sup>2</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 54, S. 352. 1908.

<sup>3</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 60, S. 426. 1909; Bd. 68, S. 317. 1910. Dort Literatur.

<sup>4</sup>) Sitzungsber. d. Akad. Wien, Mathem.-naturw. Kl. Bd. 43, S. 601. 1861; zitiert nach Willstätter: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 55, S. 3611. 1922.

<sup>5</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 10, S. 283. 1908; Bd. 25, S. 359. 1910.

<sup>6</sup>) Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. Bd. 63, S. 226. 1907.

<sup>7</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 16, S. 81 u. 486. 1909; Bd. 17, S. 231. 1909.

<sup>8</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 24, S. 319. 1910.

<sup>9</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 75, S. 282. 1911; Bd. 95, S. 195. 1915.

<sup>10</sup>) Willstätter, Graser u. Kuhn: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 123, S. 55 u. 73. 1922.

sowohl in das saure, wie alkalische Gebiet hinein, werden die Fermente rasch unwirksam. Diese Schädigungen sind meist irreversibel. Daneben können noch eine Anzahl Stoffe<sup>1)</sup> begünstigende oder schädigende Wirkungen ausüben, Salze bestimmter Kationen oder seltener Anionen. Fördernd wirken vielfach Natriumchlorid und besonders Calciumsalze, hemmend die meisten Schwermetallsalze<sup>2)</sup>. Von Einfluß sind auch die Verdauungsprodukte selbst, die meist hemmen, organische Stoffe wie zugefügte Desinfektionsmittel, und vor allem viele in der Lösung enthaltenen Stoffe kolloidaler Natur, die durch Absorption hemmen können. Über solche Stoffe werden bei der Besprechung der Reinigung und bei den Einzelfermenten Angaben gemacht (vgl. auch bei Hedin<sup>3)</sup>. Schließlich nimmt man noch ganz spezifisch fördernde Stoffe, die Kofermente und anderer-

**Kofermente.** Antifermente. seits spezifische Hemmungsstoffe an, die man als Antifermente bezeichnet hat wie Antipepsin usw., ohne aber über ihren wirklichen Fermentcharakter etwas aussagen zu können (vgl. hierzu Abderhalden und Wertheimer<sup>4)</sup>).

**Profermente.** Manche Fermente kommen im Körper zunächst in einer unwirksamen Vorstufe vor, als Proferment oder Zymogen, die erst beim Zusammentreffen mit spezifischen Stoffen von nicht bekannter Konstitution, den Kinasen, zum Ferment werden. In anderen Fällen wirken schon Säuren oder Alkalien als Aktivatoren.

**Kinasen.**

**Desinfektion.** 502. **Das Arbeiten mit Fermenten.** Zunächst ist beim Arbeiten mit Fermenten peinlichste Sauberkeit und genaues Beachten von auch scheinbar Nebensächlichem geboten. Bei der starken Empfindlichkeit der Fermente gegen äußere Faktoren können sonst leicht irrtümliche Beobachtungen gemacht werden, sei es, daß das Ferment zu stark geschädigt wird, sei es, daß im Gegenteil eine Fermentwirkung vorgetäuscht wird, die gar nicht der ursprünglichen Substanz eigentümlich war, sondern erst durch eine Infektion mit Mikroorganismen hervorgerufen wurde<sup>5)</sup>. Gegen Infektion schützt man sich meist durch Anwendung von Desinfektionsmitteln, Chloroform oder Toluol (etwa 1 Vol.-%), von denen das erstere aber häufiger auch das Ferment selbst schädigen kann, während die Desinfektionskraft des zweiten gelegentlich nicht voll ausreicht. Andere Mittel sind Zusatz von Natriumfluorid (0,2—0,4%), Thymol (0,1%), Jodoform. Wichtig ist ferner, während der ganzen Versuchsdauer die optimale Temperatur mit Hilfe eines Thermostaten und die optimale Wasserstoffionenkonzentration aufrecht zu erhalten. Es genügt für das letztere bei vielen Reaktionen, wenn nur dafür gesorgt wird, daß anfänglich die richtige Größe der sauren oder alkalischen Reaktion eingestellt ist; in all den Fällen aber, wo durch die Fermentwirkung saure oder basische Gruppen neu gebildet werden, ist die Verwendung von Puffersystemen angebracht (Michaelis<sup>6)</sup>, Sörensen<sup>7)</sup>. Im sauren Gebiet ist die Verwendung von Essigsäure-Natriumacetat möglich, in weiteren Grenzen variierbar und am häufigsten verwandt ist ein Gemisch von primärem mit sekundärem Natriumphosphat<sup>8)</sup>. Es gibt noch eine ganze Reihe weiterer Puffersysteme. Wegen Einzelheiten muß auf die Monographien von Sörensen und Michaelis verwiesen werden.

Einhaltung des  $p_H$ .

<sup>1)</sup> Zusammenstellung bei Euler: Chemie der Enzyme. 2. Aufl. 1. Bd., S. 134ff. 1920.

<sup>2)</sup> Zusammenstellung bei Euler u. Svanberg: Fermentforschung Bd. 3, S. 330. 1920.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 50, S. 497. 1907; Bd. 52, S. 412. 1907; Bd. 57, S. 468. 1908; Bd. 60, S. 85 u. 364. 1909; Bd. 63, S. 143. 1909; Bd. 64, S. 82. 1910; Bd. 72, S. 187. 1911; Bd. 74, S. 242. 1911; Bd. 76, S. 355. 1911/12; Bd. 82, S. 175 u. 178. 1912.

<sup>4)</sup> Fermentforschung Bd. 6, S. 286. 1922.

<sup>5)</sup> Vgl. die Kontroversen von Schlatter: Biochem. Zeitschr. Bd. 131, S. 362. 1922 mit Acklin: desgl. Bd. 141, S. 70. 1923 und Barthel u. H. v. Euler: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 128, S. 257. 1923 und Baur: desgl. Bd. 131, S. 65. 1923.

<sup>6)</sup> Michaelis: Die Wasserstoffionenkonzentration. Berlin 1914.

Biochem. Zeitschr. Bd. 21, S. 167. 1909. — *Ergebn. d. Physiol.* 1912, S. 5. Chemikerkalender 1923, II, S. 447.



Die Methoden zur Gewinnung einer Fermentlösung aus einem tierischen Organ können sehr verschieden sein. Handelt es sich um eine Drüse, die ein fermenthaltiges Sekret liefert, etwa die Speichel- oder Pankreasdrüse, so wird ein ziemlich reines Sekret vielfach zu gewinnen sein durch Anlegung einer geeigneten Fistel, unter Anwendung der operativen Technik, wie sie für Verdauungssäfte durch die Schule von Pawlow<sup>1)</sup> ausgebildet ist. Sie gestattet auch, durch geeigneten Abschluß der entsprechenden Partien des Magen-Darmtraktus, das Sekret der Magen- oder Darmschleimhaut aus Fisteln zu gewinnen. Hierbei hat man den Vorteil, daß das lebende Versuchstier längere Zeit das gewünschte Sekret liefern kann. Man kann aber auch aus den Drüsen oder Schleimhäuten des frisch getöteten Tieres sich ein fermentativ wirksames Extrakt herstellen. Dies Verfahren wird zur Notwendigkeit, wenn es sich um die Untersuchung von Organen handelt, bei denen in der Norm überhaupt keine Sekretion von Fermenten eintritt, sondern diese intercellulär als „Endoenzyme“ wirksam sind. Die Einzelheiten des Verfahrens können je nach der Natur des Organs und des Ferments stark wechseln, sie können hier nur kurz geschildert werden. Es soll auf einzelne typische Beispiele hingewiesen werden, die in den folgenden Paragraphen zitiert sind. Der einfachste Fall ist die Extraktion einer Schleimhaut (Beispiel: Pepsin, § 503), wo man nur nötig hat, die oberflächlich abgespülte Schleimhaut von ihrer Unterlage abzuschaben, gut zu zerkleinern und mit einem Extraktionsmittel wie Wasser, wässerigen Säuren, Salzlösungen oder Glycerin zu behandeln. Bei Organen ist eine Vorbehandlung zweckmäßig, um gut wirksame Extrakte zu erhalten. Eine genauere Schilderung findet man bei Wiechowski<sup>2)</sup>. Die Organe werden sofort nach der Tötung des Tieres zunächst entblutet durch Spülung mit physiologischer Kochsalzlösung, am besten von einer Vene aus. Gelegentlich spült man zuletzt noch mit Wasser. Nachdem dann das Organ möglichst frei präpariert ist von fremden Gewebsteilen, wird es zerkleinert. Dies kann in sehr verschiedener Weise geschehen. Man treibt weiche Organe direkt durch ein feines Drahtnetz, zähere werden vorher zerquetscht, in einer Reibschale oder zwischen Walzen, und dann erst durchgesiebt. Sehr bequem arbeitet das Verfahren von Kossel<sup>3)</sup>, wobei das Organ durch feste Kohlensäure völlig durchgefroren und dann durch 4 mit 1500 Umdrehungen in der Minute rotierende Messer in einen feinen Schnee verwandelt wird, der nach dem Auftauen zu einem feinen Brei wird. Die tiefe Temperatur während der Zerkleinerung hat den weiteren Vorteil, daß unerwünschte sekundäre Veränderungen des Organs, etwa durch Autolyse, verhindert sind. Bei der Gewinnung von fester haftenden Endoenzymen ist noch eine weitergehende Zertrümmerung der Zellen erforderlich, was in Anlehnung an die Darstellung der Hefezymase von Buchner und Hahn<sup>4)</sup> durch langes Verreiben mit Sand oder Glaspulver erreicht wird. Bei der Verwendung des gleichfalls benutzten Kieselgurs ist bei manchen Fermenten die Gefahr der Absorption groß. Ein anderes Verfahren, das besonders von Wiechowski<sup>5)</sup> ausgearbeitet und erprobt ist, ist das der vorhergehenden Trocknung des Organbreis, der auf paraffinierten Glasplatten dünn ausgebreitet ist, durch einen lebhaften Luftstrom bei Zimmertemperatur. Bei der kurzen Trocknungsdauer von 15 bis

Gewinnung von Fermentlösungen:

aus Verdauungsdrüsen

aus anderen Organen.

Zerkleinerung von Organen.

Trocknung.

<sup>1)</sup> Näheres bei Pawlow: Die Arbeit der Verdauungsdrüsen. Wiesbaden 1898 u. London: in Abderh. Handbuch d. biochem. Arbeitsmeth. Bd. III, S. 75. Berlin-Wien 1910.

<sup>2)</sup> Biochem. Arbeitsmeth. (Abderhalden) Bd. III, S. 282. Berlin-Wien 1910.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 33, S. 5. 1901.

<sup>4)</sup> Zymasegärung. München-Berlin 1903.

<sup>5)</sup> Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 9, S. 232. 1907. Biochem. Arbeitsmeth. Bd. III, S. 289. Berlin-Wien 1910; Biochem. Zeitschr. Bd. 81, S. 278. 1917.

35 Minuten ist eine Zerstörung von Fermenten nicht zu beobachten. Das getrocknete Material kann anschließend mit Toluol kalt extrahiert und so von Lipoiden befreit werden. Die gleichfalls benutzte Trocknung des Organbreies durch Versetzen mit dem mehrfachen Volumen an Alkohol oder Aceton bis zur deutlichen Koagulation des Eiweiß kann besonders bei Alkohol zu Zerstörungen von Fermenten Anlaß geben (Salkowski<sup>1</sup>), Wiechowski und Wiener<sup>2</sup>), Schöndorff und Victorow<sup>3</sup>), Willstätter<sup>4</sup>). Eine letzte Art der Aufschließung von Zellen wäre die durch die Fermente der Zelle selbst, Gewinnung eines Macerationssaftes durch Autolyse (§ 509), wobei aber gleichfalls einzelne Fermente, besonders Oxydasen, zerstört werden können.

Gewinnung von  
Organextrakten.

Aus einem zerkleinerten Organ kann man nun entweder einen Preßsaft gewinnen — Beispiel: Ferment des Lactacidogens, § 519 — durch Auspressen in einer Buchnerpresse bei einem Druck bis zu 500 Atm., oder man extrahiert mit den oben für die Extraktion von Schleimhäuten erwähnten wässerigen Lösungsmitteln — Beispiel: Purindesamidase aus Milz, § 521. Schwierigkeit macht oft die Filtration des feinen Materials, der man durch besonderes Filtrierpapier, aufgeschwemmten Papierbrei, Watte oder Filzfilter, besser oft durch Zentrifugieren zu begegnen sucht. Wichtig ist der Zusatz von Desinfektionsmitteln. Ein getrocknetes Organpulver muß man zunächst mit dem Extraktionsmittel fein verreiben, etwa in einer Farbmühle. Man kann auch direkt mit Glycerin extrahieren — Beispiel: Pankreaslipase, § 512.

Reinigung von  
Extrakten:  
durch Dialyse

Die gewonnenen Fermentlösungen sind weiter zu reinigen. Man kann hierzu die Dialyse entweder direkt anwenden oder sie auch in einem späteren Stadium einschalten — Beispiel: Pepsin, § 503. Die nichtdialysierbaren Fermente bleiben im Dialysierschlauch zurück, während eine ganze Reihe von Stoffen mit niedrigerem Molekulargewicht durch die Membran hindurchwandern. Die Undurchlässigkeit für Fermente ist aber sehr verschieden, je nach dem untersuchten Ferment und dem Material des Dialysierschlauches. Eine Zusammenstellung findet sich bei Euler<sup>5</sup>). Man kann die käuflichen Dialysierschläuche verwenden, wie sie etwa durch die Firma Schleicher und Schüll in den Handel gebracht werden, auch Pergament, Amnionhäute, Schilfschläuche, Chamberlandkerzen mit und ohne Imprägnierung durch Gelatine sind angewandt worden, kurz all die Materialien, die sonst zur Reinigung von kolloidalem Material brauchbar sind. Bevorzugt wurden in letzter Zeit die Kollodiumfilter in ihren verschiedenen Ausführungsformen, etwa als Ultrafilter von W. Ostwald<sup>6</sup>), Membranfilter von Zsigmondy und Jander<sup>7</sup>) oder Ultrafilter nach Bechhold<sup>8</sup>).

durch Absorption

Bei dieser Dialyse kann eine Schwächung der Fermentkraft eintreten durch Zurückhaltung von Fermentteilchen durch die Wandung des Dialysierschlauchs und so schon unbeabsichtigt ein Vorgang eine Rolle spielen, der sich auch bewußt zur Reinigung von Fermentlösungen heranziehen läßt, die Absorption oder Sorption (vgl. S. 601). Wie alle Kolloide zeigen die Fermente große Neigung, von festen Körpern mit großer, wirksamer Oberfläche absorbiert zu werden, so daß sie vielfach bei der Erzeugung eines feinverteilten Niederschlags in der Fermentlösung mehr oder weniger vollständig mit ausgefällt werden. Schon die Fällung einer Eiweiß enthaltenden Fermentlösung mit

<sup>1</sup>) Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. Bd. 147, S. 1. 1897.

<sup>2</sup>) Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 9, S. 280. 1907.

<sup>3</sup>) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 116, S. 495. 1907.

<sup>4</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 125, S. 148. 1923.

<sup>5</sup>) Chemie der Enzyme. 2. Aufl. Bd. 1, S. 91. München-Wiesbaden 1920.

<sup>6</sup>) Kolloid-Zeitschr. Bd. 22, S. 72. 1918.

<sup>7</sup>) Zeitschr. f. analyt. Chem. Bd. 58, S. 241. 1919.

<sup>8</sup>) Bechhold: Die Kolloide in Biologie und Medizin. 4. Aufl. S. 104. 1922.

Alkohol läßt oft das Ferment in den Niederschlag wandern. Wird die Einwirkung des Alkohols solange ausgedehnt, daß das Eiweiß koaguliert, so läßt sich eine an Eiweiß wesentlich ärmere Fermentlösung gewinnen durch Aufnehmen des Niederschlags mit Wasser. Der Nachteil liegt darin, daß viele Fermente durch den Alkohol geschwächt oder unwirksam werden können. Deshalb hat man schon früh — als erster 1861 Brücke — in einer Fermentlösung feinverteilte Niederschläge erzeugt, Calciumphosphat oder Cholesterin — Beispiel: Speicheldiastase, § 514. So reinigte Brücke Pepsin. In neuerer Zeit bevorzugt man, auf Grund der Forschungen von Michaelis, Fällungen mit ausgeprägtem elektropositiven oder negativen Charakter — Beispiel: Trennung der Pankreasfermente, § 512. Basische Stoffe wie die Hydroxyde mehrwertiger Metalle, Eisen, Aluminium, Uran fällen besonders gut Fermente mit ausgeprägt sauren Gruppen, saure Stoffe, wie Kieselgur, Kaolin absorbieren besser Basen. So kann man mit Kieselgur manchen Fermentlösungen beigemengtes Eiweiß entziehen (Michaelis<sup>1</sup>). Aber auch Ampholyte oder neutrale Stoffe mit großer Oberfläche können gut Fermente absorbieren, so Tierkohle und Eiweißniederschläge. Trypsin (§ 506) ist nicht nur durch Seide und Wolle, Fibrin- oder Caseinflocken, sondern auch durch Baumwollfäden, Leinwand- und Papierstreifen, Asbest, Glaswolle, Tierkohle aus verdünnter Lösung absorbierbar (Hedin<sup>2</sup>), Buchner und Klatt<sup>3</sup>). Derartige Absorptionsverbindungen sind anfänglich oft loserer Natur als in einem späteren Stadium, nur anfänglich kann man durch stärkere Absorptionsmittel, Casein oder geeignete Lösungsmittel, das Ferment wieder ablösen (Hedin<sup>4</sup>). Dies Absorbieren und Wiederherauslösen, die Elution, ist durch Elution. in letzter Zeit von Euler und von Willstätter mit großem Erfolg zur weitgehenden Reinigung von pflanzlichen Enzymen<sup>5</sup>) herangezogen worden. Für die weitgehende Reinigung von tierischen Fermenten durch Elution liegt ein erster Schritt vor, bei den Pankreasfermenten (Willstätter und Waldschmidt-Leitz, § 512). Soviel hat sich jedoch schon mit Sicherheit ergeben, daß die älteren Schlüsse aus dem Charakter der absorbierenden Substanz auf den elektropositiven oder negativen Charakter des Ferments nur mit großer Reserve verwertbar sind, da die Fällbarkeit durch den Reinheitsgrad weitgehend beeinflußt wird.

Da wässrige Enzymlösungen wenig haltbar zu sein pflegen, während allerdings Glycerinlösungen ihre fermentative Kraft viel länger bewahren können, ist für länger dauernde Versuche, besonders vergleichender Natur, die Herstellung von haltbaren Dauerpräparaten notwendig. Zur Herstellung solcher Trockenpräparate, bei denen man aber einen gewissen Rückgang der Fermentkraft während des Trockenprozesses meist nicht vermeiden kann, während in trockenem Zustand das verbleibende fermentative Vermögen jahrelang erhalten bleiben kann, gibt es verschiedene, je nach der Fermentart etwas wechselnde Verfahren der Herstellung. Am raschesten zum Ziel führt die direkte Trocknung des Organbreies nach Wiechowski, jedoch hat man dann das Ferment zunächst wenigstens zusammen mit sämtlichen Ballaststoffen des betreffenden Organs. Das Verfahren ist empfehlenswert bei sehr empfindlichen Fermenten. Nach der Trocknung kann man noch, ohne Fermentschädigung, die kalte Extraktion mit Toluol anschließen. Bei weniger empfindlichen Fermenten kann man auch den Organbrei, oder besser seinen wässrigen Auszug, mit Alkohol

<sup>1</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 7, S. 488. 1907.    <sup>2</sup>) desgl. Bd. 9, S. 436. 1908.

<sup>3</sup>) Biochem. Journ. Bd. 1, S. 484. 1906; Bd. 2, S. 81. 1907. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 50, S. 497. 1904.

<sup>4</sup>) Biochem. Journ. Bd. 2, S. 112. 1907; Ergebn. d. Physiol. Bd. 9, S. 433. 1910.

<sup>5</sup>) Zusammenstellung bei Willstätter: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 55, S. 3601. 1922.

oder Aceton entwässern, indem man in das mehrfache Volumen dieser Flüssigkeiten einträgt, den ausgefallenen Teil nach nicht unnötig langer Berührung mit der Flüssigkeit absaugt und im Vakuum trocknet. Die Fällung mit Alkohol ist auch anwendbar bei Glycerinextrakten. Schließlich hat man auch die Möglichkeit, eine gereinigte Fermentlösung sehr vorsichtig zur Trockne einzudampfen oder zum mindesten zu konzentrieren. Dauerpräparate wenigstens der häufigsten Verdauungsfermente sind wegen ihrer technischen und medizinischen Anwendung käuflich zu haben, so von Pepsin, Trypsin, Lab und Lipase, letztere allerdings pflanzlichen Ursprungs, aus Ricinussamen. Zu beachten ist, daß manche Präparate, so von Pepsin, durch starken Zuckerzusatz haltbar gemacht sind. Will man aus einem Trockenpräparat sich eine Fermentlösung machen, so darf man nur im Falle völliger Lösung erwarten, schon nach kürzerer Zeit die gesamte Fermentmenge in Lösung zu haben. Bleibt ein Rückstand, so läßt man zweckmäßig 24 Stunden unter gelegentlich sanftem Schütteln stehen und filtriert dann. Stärkeres Schütteln ist zu vermeiden, da sonst teilweise Schüttelinaktivierung (s. oben) zu befürchten ist. Der Zusatz von Desinfektionsmitteln darf nicht vergessen werden.

Quantitative  
Bestimmung.

Die Methoden zur Bestimmung der relativen Stärke einer Fermentlösung sind bei den Einzelfermenten geschildert. Über die Prinzipien vgl. Michaelis<sup>1)</sup> und Willstätter und Kuhn<sup>2)</sup>.

### *Pepsin.*

Vorkommen.

503. Das Ferment, welches bei Gegenwart von Salzsäure Eiweißstoffe verdaut, findet sich im Magensaft der Wirbeltiere, und zwar, soweit die Untersuchungen reichen, aller Wirbeltiere, mit Ausnahme einiger Fische. Es bleibt im Darm noch einige Zeit in aktiver Form erhalten<sup>3)</sup> und ist auch im Harn nachgewiesen worden<sup>4)</sup>. Es wird von den Drüsen der Magenschleimhaut (hauptsächlich den Fundusdrüsen) in Form eines unwirksamen Zymogens (Pepsinogen, Propepsin) sezerniert. Die Umwandlung in die aktive Form erfolgt sofort durch die Salzsäure des Magensaftes.

Zymogen.

Das von Ebstein und Grützner<sup>5)</sup> entdeckte Zymogen wurde von Langley<sup>6)</sup> und von Glaessner<sup>7)</sup> untersucht. Zur Darstellung einer Propepsinlösung wird nach Glaessner die gereinigte, fein zerkleinerte Schweinemagenschleimhaut mit der doppelten Menge Wasser versetzt und nach Zufügen von Soda bis zur deutlich alkalischen Reaktion und von Toluol 3—4 Wochen bei 40° stehen gelassen. Man versetzt nun die filtrierte Flüssigkeit mit Kochsalz bis zu 1%, fügt Essigsäure hinzu, filtriert, macht mit Soda schwach alkalisch und fällt mit Uranylacetat. Der dickflockige Niederschlag, welcher die Vorstufen des Pepsins und Labs enthält, wird zentrifugiert und mit kleinen Mengen schwach sodahaltigen Wassers ausgezogen und Fällung und Extraktion wiederholt. Fügt man der so erhaltenen (durch Einengen bei 40° konzentrierten) Lösung Natriumphosphat und die entsprechende Menge Uranylacetat hinzu, so reißt der entstehende Niederschlag das Propepsin mit nieder, während das Prochymosin im Filtrat sich findet. Diese Trennung der Profermente scheint aber unsicher zu sein (Pekelharing<sup>8)</sup>). Die durch Ausziehen des Niederschlags mit schwach alkalischem Wasser erhaltene Lösung ist ganz unwirksam gegen Eiweißstoffe, wird aber auf Zusatz von verdünnter Salzsäure durch Umwandlung des Propepsins in Pepsin

<sup>1)</sup> Abderhalden: Handb. d. biochem. Arbeitsmeth. Bd. III, S. 24. 1910.

<sup>2)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 56, 1, S. 509. 1923. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 125, S. 1. 1923.

<sup>3)</sup> Literatur bei Abderhalden u. Kiesewetter: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 74, S. 412. 1911.

<sup>4)</sup> Literatur bei Hedin: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 112, S. 263. 1921.

<sup>5)</sup> Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 8, S. 122 u. 617. 1874.

<sup>6)</sup> Journ. of physiol. Bd. 3, S. 269. 1881. — Langley u. Edkins: Journ. of physiol. Bd. 7, S. 371. 1886.

<sup>7)</sup> Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 1, S. 1. 1902.

<sup>8)</sup> Arch. des sciences biol. Bd. 11, Suppl. S. 36. 1906.

wirksam. Gegen Soda bis zu 0,5% ist sie widerstandsfähig, während Pepsin in 0,5proz. Soda-lösung zerstört wird (Langley). Im übrigen stimmt eine Propepsinlösung in vieler Beziehung mit einer Pepsinlösung überein, s. darüber bei Glaessner.

Aus Flüssigkeiten, die Pepsin enthalten, läßt sich das Ferment in ver-schiedener Weise ausfällen und in Form hochwirksamer fester Präparate er-halten, jedoch weichen die Eigenschaften der erhaltenen Niederschläge noch soweit voneinander ab, je nach der Darstellungsmethode, daß man das Mit-ausfallen verschiedener Begleitstoffe anzunehmen hat. Sehr unrein ist sicher noch das Präparat nach dem alten Verfahren von Wittich<sup>1)</sup>, der die Magen-schleimhaut von Schwein oder Kaninchen mit Glycerin extrahierte, um das Filtrat mit Alkohol zu fällen. Die Methode führt sehr rasch zu einem jahre-lang haltbaren Trockenpräparat, das aber stark mit Eiweiß und vielleicht auch anderen Proteasen (Abderhalden<sup>2)</sup> verunreinigt ist. Meist hat man mit wässerigen Extrakten gearbeitet und diese fraktioniert durch Fällungsmittel, die das Pepsin mitrissen wie Cholesterin, Calciumphosphat (Brücke<sup>3)</sup>, Sundberg<sup>4)</sup>.

Darstellung von  
Pepsin aus  
Magenschleim-  
haut:

nach Wittich

nach Brücke,  
Sundberg

nach Hammarsten

Ein hochwirksames Präparat zu erhalten gelang Hammarsten<sup>5)</sup>, der durch Halbsättigung mit Kochsalz eine hyaline Substanz ausfällte, in der das Pepsin enthalten war. Nach Entfernung des Pylorusteils wird Magenschleim-haut von Rind, Schwein oder Hund, weniger gut vom Pferd 2—3 Tage mit der 10fachen Menge Salzsäure von 0,2% bei 10° stehen gelassen und das klare Filtrat bei Zimmertemperatur mit dem gleichen Volumen einer reinen, ge-sättigten Kochsalzlösung oder mit der entsprechenden zur Halbsättigung not-wendigen Menge von fein gepulvertem Kochsalz versetzt. Nach einigen Stunden hat sich die hyaline Substanz als ziemlich scharfbegrenzte Schicht angesammelt, so daß man den Hauptteil der Flüssigkeit durch Abhebern entfernen kann. Den Rest gießt man durch ein Filter, preßt dieses zwischen Fließpapier stark aus und kann nun den Niederschlag als zusammenhängende Schicht vom Filter abheben. Zur Reinigung wird 2 mal bei Zimmertemperatur in Salzsäure von 0,2% gelöst und durch Kochsalzlösung wieder ausgefällt, dann wieder in Salzsäure von 0,2% gelöst und durch Dialyse gegen Wasser die Hyalin-substanz wieder gefällt. Die voluminöse, tonerartige Fällung wird nach dem Filtrieren und Abpressen im Exsiccator getrocknet. Trocknen mit Alkohol-Äther vermindert ihre Wirksamkeit. Die Ausbeute beträgt im Höchsthalle an erster Fällung 0,5 g, an gereinigtem Material 0,2 g aus 100 g Schleimhaut. Aus der ersten Fällung kann man eine an sonstigen festen Stoffen sehr arme Fermentlösung gewinnen, wenn man erst je 1 g mit 100 ccm Wasser auswäscht und dann erst mit größeren Wassermengen extrahiert (Hammarsten<sup>6)</sup>). Die Substanz wird von Hammarsten nicht als einheitlich angesehen, sondern nur als ein Gemisch des vielleicht selbst eiweißartigen Ferments mit einer Proteinsubstanz.

Die genauere Untersuchung der Zusammensetzung dieses Präparates steht noch aus. Es unterscheidet sich von dem Pepsin nach Pekelharing (s. unten) durch seine voluminöse Ausfällung bei der Dialyse und die Löslichkeit schon in Salzsäure von 0,02%, die größere Haltbarkeit seiner fast neutralen, nur noch spurenweise sauren Lösung, gleicht ihm aber darin, daß es, neben seiner Pepsin-wirkung, eine starke Labwirkung (s. § 510) hat. Es wirkt in Salzsäure von 0,2% noch deutlich lösend auf Eiweiß bei der Anwendung von einem Teil hyaliner Sub-stanz auf 10 000 000 Gewichtsteile Eiweiß. Läßt man die Lösung der hyalinen

Eigenschaften des  
Präparats von  
Hammarsten.

<sup>1)</sup> Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 2, S. 196. 1869.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 44, S. 266. 1905.

<sup>3)</sup> Sitzungsber. d. Akad. Wien Bd. 43, S. 601. 1861.

<sup>4)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 9, S. 321. 1885. <sup>5)</sup> desgl. Bd. 108, S. 243. 1919.

<sup>6)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 121, S. 249. 1922.

Substanz in 0,2proz. Salzsäure 1 Stunde bei 37° stehen, so tritt, ohne Zerstörung der Fermentwirkung, Umwandlung der hyalinen Substanz ein, die teilweise dialysierbar wird, was zur Reinigung benutzt werden kann (Hammarsten<sup>1</sup>).

Darstellung von  
Pepsin aus  
Magensaft:

Außer durch Extraktion von Magenschleimhaut hat man auch versucht, zu einem reinen Pepsin zu kommen durch Verarbeitung von Magensaft, wie man ihn bei einem Hund mit Oesophagus- und Magenfistel durch die sog. Scheinfütterung gewinnen kann. Man hat eine bei der Abkühlung eines solchen Magensafts sich abscheidende körnige Masse als Pepsin angesprochen (Schoumow-Simanowsky<sup>2</sup>), Nencki und Sieber<sup>3</sup>), reiner und in seiner Wirksamkeit gleichmäßiger ist wohl ein nach Pekelharing<sup>4</sup>) gewonnenes Präparat.

nach Pekelharing.

Zur Darstellung von Pepsin nach Pekelharing wird der sofort filtrierte, farblose Magensaft etwa 20 Stunden lang bei einer wenig über 0° gelegenen Temperatur gegen destilliertes Wasser dialysiert, die trübe Innenflüssigkeit zentrifugiert, der Bodensatz nach Abgießen des größeren Teiles der überstehenden Flüssigkeit auf einem kleinen Filter gesammelt, mit wenig Wasser gewaschen und im Exsiccator getrocknet. Um aus dem Filtrat weitere Mengen zu erhalten, sättigt man dasselbe halb mit Ammonsulfat, befreit den entstandenen Niederschlag durch Dialyse von Salz, löst ihn bei 37° in möglichst wenig 0,2proz. Salzsäure, dialysiert die filtrierte Lösung und verfährt weiter wie oben angegeben. Das auf letztere Weise erhaltene Präparat stellt ein noch reineres dar, insofern es vollkommen frei von einer phosphorhaltigen Beimengung ist. Statt des Magensaftes wurde von Pekelharing zur Darstellung auch das durch 5tägige Digestion mit 0,5proz. Salzsäure bei 37° hergestellte und unter vermindertem Druck filtrierte Extrakt der zerkleinerten Fundusmucosa des Schweinemagens benutzt. Doch ist das auf diese Weise erhaltene Präparat weniger rein. Es läßt sich aber reinigen, wenn man es nach Ringer<sup>5</sup>) bei 37° in 0,05n-Salzsäure löst und abermalig gegen Wasser dialysiert. Man erhält so Präparate, die neben der Pepsinwirkung auch Labwirkung zeigen. Am schonendsten kann man die Fermente trennen, indem man mit gesättigter Kochsalzlösung extrahiert, die fast nur Pepsin löst (Hammarsten<sup>6</sup>). Auch durch tagelanges Erwärmen einer Lösung in 2proz. Salzsäure auf 40° kann man eine etwas abgeschwächte Pepsinlösung erhalten, die keine Labwirkung mehr zeigt (Hammarsten<sup>7</sup>).

Zusammensetzung.

Das nach Pekelharing erhaltene Präparat ist ein Proteinstoff besonderer Art von der Zusammensetzung C 51,99, H 7,07, N 14,44, S 1,63% (auf ascherefreie Substanz berechnet); es enthält ferner etwas Chlor, das sich durch Dialyse gegen Oxalsäure entfernen läßt (Ringer) und Eisen. Der Beweis, daß in dieser Substanz das reine Pepsin vorliegt, ist natürlich nicht erbracht und zur Zeit auch nicht zu erbringen.

Eigenschaften.

Das Pepsin nach Pekelharing ist ein farbloses Pulver, in Wasser nicht merklich löslich (frisch mittels Dialyse gefällt ist es in Wasser einigermaßen löslich), es löst sich aber in verdünnter Kochsalzlösung. In verdünnten Säuren, z. B. in 0,2proz. Salzsäure, wird es, am besten bei Körpertemperatur, zu einer wasserklaren Flüssigkeit gelöst; bei Verringerung des Säuregehaltes etwa durch Diffusion scheidet es sich zum Teil, und zwar in Form durchsichtiger Kügelchen,

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 121, S. 249. 1922.

<sup>2</sup>) Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 33, S. 336. 1894.

<sup>3</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 32, S. 291. 1901.

<sup>4</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 22, S. 233. 1897; Bd. 35, S. 8. 1902; Pekelharing u. Ringer: desgl. Bd. 75, S. 282. 1911; Geselschap: desgl. Bd. 94, S. 205. 1915; Ringer: desgl. Bd. 95, S. 195. 1915; Kolloid.-Zeitschr. Bd. 19, S. 253. 1916.

<sup>5</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 95, S. 195. 1915. <sup>6</sup>) desgl. Bd. 94, S. 104. 1915.

<sup>7</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 56, S. 18. 1908.

wieder ab. In Salzsäure löst es sich am wenigsten, wenn diese 0,02% HCl enthält, was  $p_H$  4—5 entspricht. Das Pepsin gibt nach den meisten Autoren Eiweißreaktionen, zeigt Linksdrehung und wird durch Halbsättigung mit Ammonsulfat aus seinen Lösungen abgeschieden. Es ist in Salzsäure von 0,2% recht beständig, jedoch sehr labil bei der Einwirkung von schwacher Alkali- oder Sodalösung, auch durch Waschen mit Alkohol und sehr allmählich auch in salzsaurer Lösung verliert es seine fermentativen Eigenschaften. Unter Ammonsulfatlösung aufbewahrt hält es sich lange unverändert. Durch den elektrischen Strom wandert es, wenn frei von Albumosen, ausschließlich anodisch (Pekelharing und Ringer<sup>1</sup>), Ringer).

Beim schnellen Erhitzen seiner sauren Lösung findet Gerinnung statt, bei 60° beginnt die Lösung sich zu trüben. Diese Reaktion von Pekelharing tritt noch bei einer Verdünnung 1:50 000 ein. Beim langsamen Erhitzen selbst bis zur Siedetemperatur kann sie völlig klar bleiben, und zwar um so leichter, je weniger Säure sie enthält, aber die Fähigkeit, fermentativ zu wirken, geht auch in diesem Falle beim längeren (viertelstündigen) Erwärmen auf 60° verloren. Über die Untersuchung des Gerinnungsproduktes, welches in Säure unlöslich und in Alkali leicht löslich ist, s. bei Pekelharing.

Das nach Hammarsten oder Pekelharing gewonnene Pepsin ist sehr wirksam: 0,001 mg in 6 ccm 0,2proz. Salzsäure gelöst bringt in 20 Stunden eine Fibrinflocke in Lösung, 0,5 mg, gelöst in 10 ccm Salzsäure von 0,2%, verdaut bei der Probe nach Mett (s. unten) innerhalb 24 Stunden 5—6 mm. Pepsin wirkt spaltend auf alle einfachen und zusammengesetzten Eiweißstoffe, mit Ausnahme der Protamine; von Albuminoiden werden Elastin und die ihm nächststehenden Stoffe gespalten, Keratine dagegen nicht. Durch Pepsinsalzsäure entstehen aus Eiweiß Acidalbumin, Albumosen und Peptone. Die Fähigkeit zu einer weitergehenden Spaltung scheint dem Pepsin nicht zuzukommen. Das bei einer lange Zeit fortgesetzten Pepsinverdauung beobachtete Auftreten von Aminosäuren usw. dürfte auf die Anwesenheit anderer aus der Magenschleimhaut extrahierter Fermente oder auch der vorhandenen Salzsäure<sup>2</sup> zu beziehen sein. Über die Produkte der Pepsineinwirkung auf Eiweiß im einzelnen vgl. die Abschnitte Acidalbumine, Albumosen und Peptone (§§ 392—401). Über die synthetischen Eigenschaften des Pepsins vgl. unter Plasteinen (§ 403). Die mit dem Pepsin verknüpfte Labwirkung vgl. unter Lab (§ 510).

Die Pepsinwirkung tritt nur ein bei saurer Reaktion, mit einem Optimum bei  $p_H$  1,8—1,4 (Sörensen<sup>3</sup>), Michaelis<sup>4</sup>). Die Natur der Säure übt gleichfalls einen Einfluß aus, am günstigsten wirkt Salz- und Milchsäure, ungünstig Schwefelsäure. Es besteht hier vielleicht Parallelität mit dem Einfluß auf den Quellungsstand der Eiweißkörper (Ringer<sup>5</sup>). Weiteres über die Bedingungen der Wirksamkeit bei Northrop<sup>6</sup>). Pepsin wird durch Erhöhung der Temperatur bald zerstört, meist gilt als Tötungstemperatur schon 65° in einer Lösung von optimaler (H). Gegen stärkere Säuren ist Pepsin empfindlich, rascher zerstören jedoch alkalische Flüssigkeiten, schon bei ganz geringen Alkalitätsgraden. Das Pepsinogen ist dagegen noch gegen Sodalösungen von 0,5—1%

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 75, S. 282. 1911; Bd. 95, S. 205. 1915.

<sup>2</sup>) Bergman: Skandinav. Arch. f. Physiol. Bd. 18, S. 144. 1906. — Henriques u. Gjaldbaek: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 75, S. 376. 1911.

<sup>3</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 21, S. 288. 1909.

<sup>4</sup>) Zeitschr. f. exp. Pathol. u. Therap. Bd. 8, S. 2. 1910. Biochem. Zeitschr. Bd. 65, S. 1. 1914.

<sup>5</sup>) Kolloid-Zeitschr. Bd. 19, S. 253. 1916; vgl. aber Gyemant: Biochem. Zeitschr. Bd. 105, S. 155. 1920.

<sup>6</sup>) Journ. of gen. physiol. Bd. 2, S. 465 u. 595. 1920; Bd. 3, S. 211. 1921.

ziemlich beständig. Hemmend wirken die meisten Salze (Schütz<sup>1</sup>), verhältnismäßig schwach Sublimat (Hata<sup>2</sup>). Aus der großen Zahl hemmender organischer Stoffe (Zusammenstellung bei Oppenheimer<sup>3</sup>) seien nur einige mehr spezifische Hemmstoffe hervorgehoben. Dazu gehören die Verdauungsprodukte selbst, deren Anhäufung wohl zu Fermentabsorption führt, ferner ein in der Magenwand und in Eingeweidewürmern beobachteter Stoff unbekannter Natur, das Antipepsin (Weinland<sup>4</sup>). Ein Antikörper im Sinn der Immunitätslehre, der Pepsin schwach hemmt, läßt sich durch Pepsingaben im Blut von Gänsen hervorrufen (Sachs<sup>5</sup>); ein Hemmstoff anscheinend viel allgemeinerer Natur, der auf alle Proteasen wirkt, findet sich aber schon im nicht vorbehandelten Serum (Jakoby<sup>6</sup>), Jochmann u. a.<sup>7</sup>), Hedin<sup>8</sup>).

**Pepsin, Nachweis.** 504. **Nachweis und Bestimmung von Pepsin.** Der Nachweis des Pepsins beruht auf der Fähigkeit des Ferments, bei stark saurer Reaktion geronnenes Eiweiß zu lösen. Man arbeitet meist in salzsaurer Lösung von 0,1—0,2%, wobei andere proteolytische Fermente unwirksam werden, auch solche, die noch bei schwach saurer Reaktion wirksam sind. Als Substrat muß jedoch eine Eiweißart gewählt werden, die durch die benutzte Säurekonzentration nur quillt, jedoch auch bei längerer Einwirkung nicht gelöst wird. Am sichersten arbeitet man mit Scheiben von hartgesottenem Hühnereiweiß oder gekochtem Rinderfibrin bei Körpertemperatur, empfindlicher ist die Probe mit nichtgekochtem Fibrin, das schon bei Zimmertemperatur von Pepsin gelöst wird. Es ist empfehlenswert, hierzu Rinderfibrin und nicht das oft schon durch Säuren allein in Lösung gehende Schweinefibrin anzuwenden und bei schwacher Wirkung immer eine Kontrollprobe mit Salzsäure allein anzusetzen (Hammarsten<sup>9</sup>).

Als Fermentlösung benutzt man entweder die Lösung eines Trockenpräparats in Salzsäure von 0,2%, oder man arbeitet mit dem sauren Infus der Schleimhaut des zu prüfenden Organs. Handelt es sich um die Prüfung sehr verdünnter Lösungen, so kann man eine Anreicherung durch Absorption erzielen. Man legt in die zu prüfende angesäuerte Flüssigkeit einige Fibrinflocken (Grützner<sup>10</sup>) oder Elastin, das mit  $\frac{1}{10}$ -Salzsäure vorbehandelt ist (Abderhalden und O. Meyer<sup>11</sup>). Nachdem man das Eiweiß einige Zeit bei Zimmertemperatur in der Flüssigkeit leicht hin- und herbewegt hat, spült man es mit Wasser ab, führt es in Salzsäure von 0,2% über und prüft, ob nach einigen Stunden bei Bruttemperatur Auflösung erzielt ist. Die vom Ungelösten abfiltrierte Flüssigkeit muß Biuretreaktion zeigen. Bei der Prüfung auf Pepsinwirkung im Harn empfiehlt es sich, zuerst die Hauptmenge der Harnbestandteile durch 3—4 tägige Dialyse zu entfernen und dann erst die mit Salzsäure versetzte Innenflüssigkeit zu prüfen (Hedin).

**Bestimmung:** Zur quantitativen Bestimmung von Pepsin hat Geselschap<sup>12</sup>) vorge-  
**nach Geselschap** schlagen, sich nach dem Verfahren von Pekelharing ein Standardpepsin herzustellen und von diesem 0,5 mg aufzulösen in 10 ccm Salzsäure von 0,2%.

1) Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 5, S. 406. 1904.

2) Biochem. Zeitschr. Bd. 17, S. 156. 1909.

3) Fermente. 4. Aufl. S. 534. Leipzig 1913.

4) Zeitschr. f. Biol. Bd. 44, S. 81 u. 435. 1903.

5) Fortschr. d. Med. Bd. 20, S. 425. 1902.

6) Biochem. Zeitschr. Bd. 2, S. 247. 1906.

7) Zeitschr. f. klin. Med. Bd. 66, S. 1/2. 1908.

8) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 60, S. 85. 1909.

9) Lehrb. d. physiol. Chem. 9. Aufl. S. 367. München-Wiesbaden 1921/22.

10) Breslauer ärztl. Zeitschr. 1882, S. 17.

11) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 74, S. 67. 1911.

12) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 94, S. 205. 1915.



Man vergleicht dann die unbekannte Lösung, nachdem man sie auf den gleichen Säuregrad gebracht hat, bezüglich ihrer eiweißlösenden Kraft mit der Standardlösung nach einem der älteren Verfahren zur Bestimmung der relativen Verdauungskraft nach Mett oder Grützner (s. unten).

Meist begnügt man sich — und für viele Untersuchungen und Fragestellungen nach Mett genügt dies — mit dem Vergleich der relativen Stärke zweier Fermentlösungen. Die am häufigsten benutzte Methode beruht auf dem von E. Schütz<sup>1)</sup> gefundenen Gesetz, daß die Mengen der in einer bestimmten Zeit gebildeten Verdauungsprodukte im ersten Drittel der Reaktion innerhalb bestimmter Grenzen den Quadratwurzeln aus den relativen Pepsinmengen proportional sind. Die Ausführung geschieht am einfachsten mit Hilfe des Verfahrens von Mett<sup>2)</sup>. Mit Hühnereiweiß vollgesogene Glasröhrchen von 1—2 mm lichter Weite werden auf 95° erhitzt und nach erfolgter Koagulation des Eiweißes in Stückchen von 1—2 cm Länge zerschnitten. Man bringt solche Stückchen in die zu prüfende Flüssigkeit und hält die Proben etwa 10 Stunden bei Bruttemperatur. Nach dieser Zeit wird mit Hilfe einer Lupe die Länge der gelösten Eiweißsäule in Millimetern und deren Bruchteilen gemessen. Die in den zu vergleichenden Flüssigkeiten vorhandenen Pepsinmengen verhalten sich wie die Quadrate der Millimeter Eiweißsäule, die in gleicher Zeit gelöst sind (Borissow<sup>4)</sup>). Man erfährt also die relativen Pepsinmengen durch Quadrierung der Länge der verdauten Eiweißsäulen. Ist die Länge der verdauten Säule an jeder Seite mehr als 4 mm, so erhält man zu niedrige Werte. Längen über 6—7 mm dürfen überhaupt nicht mehr verwertet werden.

Für sehr verdünnte Pepsinlösungen (z. B. sehr verdünnten Magensaft, wie man ihn bei klinischen Untersuchungen bekommt) eignet sich das Verfahren nach den Untersuchungen von J. Schütz<sup>3)</sup> nicht. S. auch die Kritik des Mettschen Verfahrens von E. Schütz und Huppert<sup>4)</sup>, ferner von Grützner<sup>5)</sup>. Genauere, aber weniger einfache Methoden sind von E. Schütz<sup>1 u. 3)</sup> und J. Schütz<sup>3)</sup> angegeben.

Grützner<sup>5)</sup> empfiehlt, fein zerschnittenes Fibrin mit Carmin zu färben, nach Grützner indem man 1 g Carmin in 400 ccm Wasser auflöst, dem man 1 ccm konzentriertes Ammoniak zugesetzt hat, und das Fibrin 24 Stunden in der Farblösung läßt. Dies gibt an Salzsäure seinen Farbstoff nicht wieder ab, sondern quillt nur auf, dagegen geht bei Gegenwart von Pepsin der verdauten Fibrinmenge entsprechend Carmin in Lösung. Durch colorimetrischen Vergleich mit Lösungen von bekanntem Fermentgehalt läßt sich leicht der Grad der Verdauung bestimmen. Das Verfahren wird noch klinisch angewandt.

Es sind noch eine ganze Reihe weiterer Methoden der Pepsinbestimmung angegeben worden, die nicht so allgemein angewendet werden, obgleich unter ihnen verschiedene wohl wesentlich genauere Zahlen geben als etwa das Verfahren nach Mett. Es können hier nur einzelne davon kurz geschildert werden. Gemeinsam ist ihnen, daß man von einer Eiweißlösung ausgeht und nun in wechselnder Weise bestimmt, welcher Bruchteil des Eiweißes nach Einwirkung von Pepsin noch ungespalten ausfällbar ist oder nach welcher Zeit völlige Aufspaltung zu löslichen Produkten erfolgt ist.

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 9, S. 577. 1885. Siehe auch Arrhenius: Meddel. fran Vet. Ak. Nobelinst. Bd. 1, Nr. 9, u. Euler: Chemie der Enzyme. 2. Aufl. Bd. 1, S. 124. München-Wiesbaden 1920.

<sup>2)</sup> Siehe bei Pawlow: Die Arbeit der Verdauungsdrüsen. Wiesbaden: Bergmann 1898, S. 31.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 30, S. 1. 1900.

<sup>4)</sup> Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 80, S. 470. 1900.

<sup>5)</sup> Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 106, S. 463. 1905. — Vernon: Journ. of physiol. Bd. 26, S. 405. 1901.

nach Volhard-  
Löhlein

Das Verfahren von Volhard<sup>1)</sup> und Löhlein<sup>2)</sup> benutzt eine Caseinlösung: 100 g Casein werden gelöst in 80 ccm n-Natronlauge, die zu 2 l mit Wasser aufgefüllt ist, durch langsames Erhitzen bis zuletzt 85—90°. Man gibt nun in einen Meßkolben von 300 ccm Inhalt 11 ccm n-Salzsäure, die man mit etwa 140 ccm Wasser verdünnt, dann unter Umschütteln 100 ccm der Caseinlösung, zuletzt eine gemessene Menge Pepsinlösung, füllt auf 300 ccm mit Wasser auf und läßt längere Zeit bei 40° einwirken, dann unterbricht man durch Zusatz von 100 ccm einer 20 proz. Natriumsulfatlösung. Der noch nicht verdaute Teil der Caseosen wird dadurch als Säureverbindung ausgefällt, der gespaltene Teil bleibt in Lösung. Je größer die Spaltung ist, desto größer ist auch der in Lösung bleibende Anteil an Säure. Durch Titration eines aliquoten Teils des Filtrats, am besten mit Alizarin<sup>3)</sup> als Indicator, bestimmt man die Gesamtacidität der Lösung. Hat man im Beginn der Verdauung eine entsprechende Titration im Filtrat der Natriumsulfatfällung ausgeführt, so ergibt die Zunahme der Acidität ein Maß für die Spaltung und damit der Fermentwirkung. Innerhalb gewisser Grenzen ist die Aciditätszunahme proportional den Quadratwurzeln der Fermentmengen. Die Methode ist auch für Trypsinbestimmungen brauchbar, nur setzt man dann die Säure erst kurz vor der Titration hinzu und titriert wieder nach Zusatz von Natriumsulfat.

nach Fuld-Levison

Das Verfahren von Fuld und Levison<sup>4)</sup> benutzt eine Lösung von Edestan, hergestellt durch Lösung von 1 g Edestin in 1 l 0,3 n-Salzsäure. Zu je 2 ccm der Edestanlösung setzt man wechselnde Volumina der zu prüfenden Pepsinlösung und ermittelt das Minimum an Pepsinlösung, das ausreicht, um innerhalb 1/2 Stunde bei Zimmertemperatur das Edestan vollständig in Albumosen überzuführen. Zur Prüfung versetzt man mit Kochsalz in Substanz und schüttelt um. Die Gegenwart von ungespaltenem, durch Kochsalz aussalzbarem Edestan verrät sich durch eintretende Trübung oder Fällung.

nach Jacoby

Sehr empfindlich scheint die Probe von Jakob<sup>5)</sup> zu sein, der von einer trüben Ricinlösung ausgeht, die durch Pepsin aufgehellt wird. Zur Gewinnung der Ricinlösung löst man 1 g Ricin der Vereinigten Chem. Werke Charlottenburg in 100 ccm Kochsalzlösung von 1,5%.

nach Michaelis.

Michaelis und Rothstein<sup>6)</sup> benutzen die Aufhellung eines durch Sulfosalicylsäure getrüben Serums. Serum wird auf das 12fache verdünnt und mit soviel 10 proz. Sulfosalicylsäurelösung versetzt, daß Kongopapier gerade eben schwach violett gefärbt wird ( $p_H = 2-1,8$ ). Zu der trüben Lösung setzt man 1/5 Vol. der Pepsinlösung, die in den einzelnen Proben verschieden stark verdünnt ist. Man beobachtet, wo bei 38—40° gerade noch Aufhellung erfolgt.

qualitativ.

505. Untersuchung eines peptischen Verdauungsgemisches. Eine scharfe Isolierung der einzelnen Verdauungsprodukte ist noch nicht möglich. Es soll hier nur angegeben werden, wie man die 3 Hauptgruppen der peptischen Verdauungsprodukte, das Acidalbumin, die Albumosen und die Peptone voneinander trennt und nachweist. Obgleich die Begriffsbestimmung der Albumosen und Peptone heute schwankender denn je geworden ist, kann man vorläufig diese Namen in der Praxis noch nicht entbehren. Anschließend sind die quantitativen Methoden besprochen.

<sup>1)</sup> Münch. med. Wochenschr. 1903, S. 2129 u. 2238. 1904, S. 157.

<sup>2)</sup> Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 7, S. 120. 1905. — Küttner: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 52, S. 63. 1907.

<sup>3)</sup> Münch. med. Wochenschr. 1903, S. 2185.

<sup>4)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 6, S. 473. 1907.

<sup>5)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 1, S. 59. 1906. — Solm: Zeitschr. f. klin. Med. Bd. 64, S. 159. 1907.

<sup>6)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 105, S. 82. 1920.

Man stellt sich zunächst eine gut wirksame Pepsinlösung her, nach einer der Methoden, wie sie im vorigen Paragraphen geschildert sind, also, wenn man nicht den Magensaft nach Pawlow oder ein Extrakt der Magenschleimhaut verwenden will, aus einem festen Pepsinpräparat nach Pekelharing oder Hammarsten oder, für die meisten Zwecke ausreichend, aus einem guten käuflichen Pepsinpräparat. Von letzterem braucht man etwa 0,2 g, die man in 500 ccm Salzsäure von 0,2—0,3% löst, von den anderen Präparaten 0,02—0,03 g. Die Konzentration der Salzsäure liegt höher als der optimalen Wasserstoffionenkonzentration für die Pepsinwirkung entspricht, da schon eine 0,1proz. Salzsäure einem  $p_H$  von 1,56 entspräche, jedoch ist die tatsächliche Konzentration der Wasserstoffionen in der Verdauungsflüssigkeit geringer, da teilweise Bindung der Säure an das Eiweiß und dessen Spaltprodukte erfolgt.

Eiweiß, z. B. etwa 100 g von Blutfarbstoff durch Waschen mit Wasser befreites und stark ausgepreßtes Fibrin, wird in einem Kolben mit 500 ccm dieser Pepsinlösung übergossen und nach Umschütteln in den Brutschrank gestellt. Das Fibrin quillt auf und geht allmählich in Lösung. Nach etwa 2 Tagen wird ein Teil der Flüssigkeit filtriert und das klare Filtrat mit Sodalösung neutralisiert. Der entstehende Niederschlag besteht aus Acidalbumin Acidalbumin. und wird nach § 392 als solches identifiziert. (Dasselbe wird in weit reichlicherer Menge erhalten, wenn die Verdauung bald nach eingetretener Lösung, bei Fibrin nach 1—2 Stunden, unterbrochen wird. Bei weit vorgeschrittener Verdauung tritt kein Niederschlag mehr ein.) Die Hauptmenge der Flüssigkeit wird koliert, das Filtrat mit Sodalösung neutralisiert und wieder filtriert. Man säuert jetzt mit Essigsäure schwach an, erhitzt zum Kochen, filtriert, dampft auf etwa 100 ccm ein und sättigt, nachdem etwa erfolgte Ausscheidungen durch Filtration entfernt worden sind, mit Ammonsulfat. Der dabei entstehende Niederschlag (*a*) besteht aus Albumosen, das Filtrat (*b*) enthält Pepton. Den Niederschlag (*a*) wäscht man durch Zerreiben mit gesättigter Ammonsulfatlösung aus, filtriert, löst ihn dann in Wasser und kocht die Lösung mit überschüssigem Bariumcarbonat unter Ersatz des verdampfenden Wassers, bis sich kein Ammoniak mehr entwickelt und sich in einer filtrierten Probe keine Schwefelsäure mehr nachweisen läßt. Nun wird filtriert und etwa vorhandenes Barium durch Zusatz von Ammoniak und Ammoniumcarbonat (Salkowski) ausgefällt. Das Filtrat, das also weder mit Chlorbarium noch mit Schwefelsäure eine Trübung geben darf, wird eingedampft und mit Alkohol gefällt. Der Niederschlag, durch Alkohol von Wasser, durch Äther von Alkohol befreit, stellt ein Gemenge verschiedener Albumosen dar. Seine Lösung gibt die sog. Albumosereaktionen: Albumosen.

1. Keine Fällung beim Kochen.
2. Auf Zusatz des gleichen Volumens gesättigter Kochsalzlösung + Essigsäure Niederschlag, der beim Erwärmen verschwindet, um beim Erkalten wiederzukehren.
3. Auf Zusatz von etwas Kochsalzlösung und konzentrierter Salpetersäure Niederschlag, der auf weiteren Salpetersäurezusatz und ebenso beim Erwärmen verschwindet.
4. Auf Zusatz von Kupferacetat und ebenso von Ferrocyankalium + Essigsäure Niederschläge, die beim Erwärmen mehr oder weniger vollständig verschwinden.
5. Biuretreaktion mit rotvioletter Farbe (§ 325, 8).

Von dem Filtrat (*b*) wird eine Probe nach Zusatz von viel starker Natronlauge auf Biuretreaktion geprüft. Fällt sie nur schwach aus, so kann sich nur wenig Pepton gebildet haben und man untersucht nicht weiter. Fällt sie stark aus, so sucht man zunächst noch vorhandene Albumosen zu entfernen, indem

man nach Kühne<sup>1)</sup> nacheinander bei neutraler, ammoniakalischer und essigsaurer Reaktion in der Hitze mit Ammonsulfat sättigt, nach jeder Sättigung erkalten läßt und von den Ausscheidungen abfiltriert. Die saure Flüssigkeit wird dann unter Umrühren eingedampft, von den ausgeschiedenen Krystallen abgesaugt und durch Versetzen mit Alkohol und Einsetzen in eine Kältemischung weiter von Salzen befreit. Schließlich entfernt man den Alkohol durch Kochen, die Schwefelsäure durch Erhitzen mit Bariumcarbonat, das in Lösung gegangene Barium durch Schwefelsäure und dampft ein. Es hinterbleibt ein Gemenge von Substanzen, das man als Peptone bezeichnet. Seine wässerige Lösung zeigt von den oben angeführten Reaktionen nur die Reaktion 5, und diese mit rosen- bis purpurroter Farbe.

quantitativ. Um den Umfang einer peptischen Eiweißspaltung zu bestimmen, benutzt man die Formoltitration in Stadien nach Sørensen (§ 491), die von Henriques und Gjaldbaek<sup>2)</sup> speziell für solche Fermentversuche ausgearbeitet wurde. Man entnimmt der Verdauungsflüssigkeit 3 Proben, in deren erster man den Gesamtstickstoff nach Kjeldahl bestimmt, während die zweite zur Ammoniakbestimmung dient. In der dritten Probe wird die Formoltitration ausgeführt, nachdem man das Ammoniak entfernt hat. Handelt es sich nicht um ein sehr viel Ammoniak lieferndes Proteid wie etwa Gliadin, so kann man auch die Formoltitration ohne Entfernung des Ammoniaks durchführen. Dann ergibt Subtraktion des Stickstoffs der Probe 2 von dem Stickstoff der Probe 3 den Aminostickstoff. Will man schließlich noch feststellen, welcher Prozentsatz des Totalaminostickstoffs durch das Pepsin in Freiheit gesetzt ist, so führt man in einer 4. Probe eine totale Hydrolyse durch, durch 1½stündiges Erhitzen in 3fach normaler salzsaurer Lösung auf 150° im Autoklaven, und macht im Hydrolysat abermals eine Ammoniakbestimmung und eine Formoltitration.

Noch einfacher ist die alkalimetrische Bestimmung der bei der Fermenteinwirkung neu gebildeten Carboxylgruppen nach Willstätter und Waldschmidt-Leitz (§ 489) durch Titration in 50proz. äthylalkoholischer Lösung. In der alkoholischen Lösung bilden die vorhandenen Aminogruppen keine Hydroxylgruppen, wirken daher nicht störend. Man titriert bei Beginn und nach der gewünschten Einwirkungsdauer des Ferments gleiche Proben, die kurz vor der Titration mit Alkohol auf 50% Gehalt gebracht sind, mit Phenolphthalein als Indicator mit alkoholischer  $\frac{1}{10}$ -Kalilauge. Die gemessene Aciditätszunahme ist ein direktes Maß des Umfangs der Spaltung.

### Trypsin.

Vorkommen. 506. Als Trypsin wurde von Kühne<sup>3)</sup> das Ferment der Pankreasdrüse<sup>4)</sup> der höheren Tiere bezeichnet, das charakterisiert ist durch seine spaltende Wirkung auf Eiweiß, die am besten bei alkalischer Reaktion eintritt (näheres s. unter Fermentwirkung). Als erster hat wohl Pappenheim 1836 auf die eiweißspaltende Wirkung des Pankreas aufmerksam gemacht, exaktere Angaben stammen von Corsivart<sup>5)</sup>. Es ist noch unsicher, wieweit die Trypsinwirkung auf Eiweiß nur durch ein Ferment verursacht ist, ob nicht die Beimengung anderer Gewebsproteasen anzunehmen ist. Sicher ist daneben noch ein

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. Biol. Bd. 29, S. 1. 1892.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 67, S. 8. 1910; Bd. 75, S. 363. 1911.

<sup>3)</sup> Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. Bd. 39, S. 130. 1867.

<sup>4)</sup> Ausführliche Literatur über Pankreatin, Trypsin und Erepsin in E. Merck: Wissenschaftl. Abhandl. Nr. 39. Darmstadt 1922.

<sup>5)</sup> Sur une fonction peu connue du Pancréas: La digestion des aliments azotés. Paris 1857 bis 1858.

erepsinähnliches Ferment vorhanden. Das Fermentgemisch wird, technisch dargestellt, als Pankreatin bezeichnet. Infolge dieser Unsicherheit über die Natur des Trypsins ist noch nicht mit Sicherheit zu entscheiden, wieweit weitere Proteasen mit dem Pankreastrypsin identisch sind, die in anderen Organen, dem Harn, dem Blut und Eiter vorkommen, sie werden deshalb gesondert behandelt (§ 509). Trypsinähnliche Fermente finden sich auch in vielen Pflanzen. Im Saft der Pankreasdrüse ist, worauf zuerst R. Heidenhain<sup>1)</sup> hinwies, Trypsin als Proferment, Trypsinogen, enthalten, das erst in Trypsin übergeht unter dem Einfluß einer in der Darmwand zuerst von Pawlow<sup>2)</sup> entdeckten Substanz, der Enterokinase, deren Wirksamkeit von vielen Forschern bestätigt wurde<sup>3)</sup>. Eine Aktivierung erfolgt noch durch viele andere Stoffe<sup>3, 4)</sup>, Salze, besonders des Calciums (Delezenne<sup>5)</sup>, Magnesiums (Zunz<sup>6)</sup>), Leberpreßsaft (Wohlgemut<sup>4)</sup>), auch durch Stoffe, die sich in der Pankreasdrüse selber beim Liegen an der Luft oder unter dem Einfluß von Alkohol bilden können. Bei den gewöhnlichen Darstellungen gewinnt man daher eine Trypsinlösung; nur aus richtig angelegten Fisteln gelingt es, ein Trypsinogen enthaltendes Sekret zu sammeln. Dasselbe trifft auf den Pankreasfistelsaft des Menschen zu (Glaessner<sup>7)</sup>), Wohlgemut, Ellinger und Cohn<sup>8)</sup>.

Eine auch nur angenäherte Reindarstellung des Trypsins in fester Form ist bisher noch nicht gelungen. Zur Herstellung gut wirksamer Lösungen kann man entweder den aktivierten Pankreassaft, wie man ihn aus einer Fistel erhält, verwenden, oder nach einer der üblichen Methoden sich ein Extrakt der Drüse herstellen, wobei man aber in möglichst neutraler oder schwach alkalischer Lösung arbeiten muß, da wenigstens stärkere Säuren Trypsin rasch unwirksam machen. Zusatz von Desinfektionsmitteln ist erforderlich. Man erhält dabei aber stets ein Gemisch der meisten Fermente der Pankreasdrüse, verunreinigt durch große Mengen an Ballaststoffen nichtfermentativer Natur. Sehr wirksame Lösungen erhält man durch Glycerinextraktion der mechanisch zerkleinerten Drüse, Lösungen, die nach den Erfahrungen von Hammarsten<sup>9)</sup> bis zu 20 Jahren haltbar sind. Aus solchen Lösungen ist dann weiter ein Trockenpräparat durch Alkohol auszufällen. Eine gleichfalls gut wirksame Lösung erhält man auch bei 3—4 Tage langer Maceration der Drüse mit Chloroformwasser bei Zimmertemperatur (Salkowski<sup>10)</sup>). Die gewöhnlich schwach sauer gewordene Lösung wird mit Natriumcarbonat neutralisiert und mit weiterer Sodalösung bis auf einen Gehalt von 0,2—0,3% an Soda gebracht. Man kann ferner die Drüse direkt oder nach vorhergehender Trocknung mit Natriumcarbonatlösung oder auch, nach Hammarsten<sup>11)</sup>, mit Ammoniak von 0,03% extrahieren. Die ammoniakalische Lösung läßt auf vorsichtigen Zusatz

<sup>1)</sup> Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 10, S. 604. 1875.

<sup>2)</sup> Schepowalnikow: Diss. St. Petersburg 1899. Malys Jahresber. d. Tierchem. Bd. 29, S. 378. 1900.

<sup>3)</sup> Literatur bei Cohnheim: Biochem. Zentralbl. Bd. 1, S. 170. 1903 und Oppenheimer: Fermente. 4. Aufl. S. 458. Leipzig 1913.

<sup>4)</sup> Literatur bei Wohlgemuth: Biochem. Zeitschr. Bd. 2, S. 264. 1907; Bd. 39, S. 302. 1911.

<sup>5)</sup> Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 134, S. 26. 1902. Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. Bd. 59, S. 476, 523 u. 614. 1903; Bd. 60, S. 1070. 1904; Bd. 63, S. 274. 1907.

<sup>6)</sup> Ann. et bull. de la soc. roy. des sciences méd. et natur. de Bruxelles 1906.

<sup>7)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 40, S. 464. 1903/04.

<sup>8)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 45, S. 28. 1905.

<sup>9)</sup> Lehrb. d. physiol. Chem. 9. Aufl. S. 393. München-Wiesbaden 1921/22.

<sup>10)</sup> Deutsch. med. Wochenschr. Jahrg. 1888, Nr. 16.

<sup>11)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 19, S. 33. 1894.

von Essigsäure einen Niederschlag eines Nucleoproteids entstehen, der das Trypsin mitreißt. Er ist nach Lösen in Sodalösung fermentativ gut wirksam.

**Reinigung.** Die Versuche, derartige Fermentlösungen zu reinigen, haben lange Zeit zu keinem entscheidenden Erfolg geführt. Kühne<sup>1)</sup> und May<sup>2)</sup> haben dadurch versucht, zu reineren Präparaten zu kommen, daß sie ein Extrakt, das sie mit Hilfe von wässriger 0,1proz. Salicylsäure oder sodaalkalischer Thymollösung hergestellt hatten, mit Kochsalz, Magnesiumsulfat und Ammonsulfat in verschiedenen Kombinationen fraktioniert fällen. Die Resultate waren wechselnde.

Von käuflichem Trypsin ausgehend, sind Michaelis und Davidsohn<sup>3)</sup> dadurch zu einem reineren Präparat gekommen, daß sie die Lösung bis zu einem  $[H^+]$  von  $2 \times 10^{-4}$  brachten, dem isoelektrischen Punkt des  $\alpha$ -Nucleoproteids des Pankreas (§ 439), das ausfallend den größten Teil des Trypsins mitausfallen ließ. Eine andere Fällung hat Holzberg<sup>4)</sup> angewandt, der eine Trypsinlösung mit  $\frac{3}{8}$  ihres Volumens an einer 0,8proz. Safraninlösung versetzte, wodurch ein roter Niederschlag auftrat, der starke Trypsinwirkung zeigte, während die Lösung unwirksam geworden war. Es gelang jedoch eine weitere Trennung nicht.

Ganz neuerdings ist Willstätter die Trennung des Pankreastrypsins von der es begleitenden Lipase und Amylase gelungen<sup>5)</sup>. Das Verfahren ist bei Amylase (S. 632) geschildert. Eine genauere Beschreibung dieses fermentativ einheitlichen Trypsins steht noch aus.

**Fermentwirkung:** Über die Eigenschaften des Trypsins läßt sich bei der mangelnden Reinheit der Präparate kaum etwas aussagen. Charakterisiert ist es ausschließlich durch seine Wirkung, wobei es jedoch offen bleiben muß, ob man es nur mit einem proteolytischen Ferment oder einem Gemisch zu tun hat und wie weit bei der Wirkung noch das Erepsin des Pankreas ergänzend eingreift. Begnügt man sich, unter Trypsinwirkung die Wirkung eines solchen Komplexes von Fermenten des Pankreassaftes zu verstehen, wie ihn etwa das Sekret einer Pankreasfistel nach Pawlow darstellt, so kann man die Trypsinwirkung auf Grund der Untersuchungen von E. Fischer<sup>6)</sup>, Abderhalden<sup>7)</sup> und Mitarbeitern folgendermaßen zusammenfassen: Trypsin vermag am besten bei alkalischer, aber auch noch bei neutraler und sogar noch schwach saurer Reaktion Eiweiß zu hydrolysieren. Es wirkt auf alle untersuchten einfachen und zusammengesetzten Eiweißarten mit Ausnahme einzelner Gerüsteiweißarten und der Keratine; Leim wird davon hydrolysiert. Dabei bilden sich zunächst Albumosen und Peptone, daneben werden aber auch einzelne Aminosäuren schon im Anfang der Reaktion abgespalten. Die Abspaltbarkeit der Aminosäuren scheint von der Natur der Aminosäuren, aber auch von der Art ihrer Verkettung abhängig zu sein. Bei länger andauernder Verdauung können die Albumosen so weit hydrolysiert werden, daß nur noch abiurete Produkte vorhanden sind; es können auch in diesen späteren Stadien Aminosäuren auftreten, die anfangs nicht frei zu beobachten waren, niemals jedoch erfolgt gänzliche Zerlegung des Eiweißes bis zu den Aminosäuren. Es gibt trypsinbeständige Komplexe von Aminosäuren

auf Eiweiß

<sup>1)</sup> Verhandl. d. naturhistor.-med. Vereins Heidelberg Bd. 1, S. 194. 1876; Bd. III, S. 463. 1886. Kühns Lehrbuch S. 117.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 38, S. 428. 1903; Bd. 49, S. 124. 1906.

<sup>3)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 30, S. 481. 1911.

<sup>4)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 14, S. 335. 1913.

<sup>5)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 55, S. 3616. 1922. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 126, S. 124. 1923.

<sup>6)</sup> E. Fischer u. Abderhalden: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 39, S. 81. 1903; Bd. 40, S. 215. 1903.

<sup>7)</sup> Abderhalden mit Reinbold, Gignon, Pettibone: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 44, S. 284. 1905; Bd. 46, S. 159. 1905; Bd. 53, S. 119. 1907; Bd. 81, S. 485. 1912.

(Kühne, Siegfried, Fischer und Abderhalden<sup>1</sup>). Zu den leicht abspaltbaren Aminosäuren rechnet man Tyrosin und Tryptophan, zu den schwerer abspaltbaren Alanin, Leucin, Asparagin- und Glutaminsäure, während Prolin, Phenylalanin und Glykokoll zu den nichtabspaltbaren Aminosäuren zu gehören scheinen. Es kommt aber ferner auf die Verkettung der Aminosäuren an, da in den widerstandsfähigen Komplexen auch Alanin, Leucin, Asparagin- und Glutaminsäure aufgefunden werden (E. Fischer und Abderhalden). Hierzu stimmt das Verhalten des Trypsins zu synthetischen Polypeptiden. Trypsin auf Polypeptide. vermag gewisse Polypeptide zu spalten, jedoch nur solche, die aus den natürlich vorkommenden Aminosäuren aufgebaut sind. Von Racemkörpern wird, wenn überhaupt, nur die eine Komponente gespalten, das Trypsin ist streng spezifisch. Jedoch auch bei Polypeptiden mit natürlich vorkommenden Komponenten sind Unterschiede zu beobachten, die aber vorläufig noch unter keinen gemeinsamen Gesichtspunkt haben gebracht werden können. Manche Aminosäuren werden überhaupt nicht abgelöst, andere nur in bestimmten Kombinationen, schließlich spielt auch die Molekulargröße des fraglichen Polypeptids eine Rolle (Fischer<sup>2</sup>) und Abderhalden<sup>3</sup>).

Neben der hydrolysierenden kann das Trypsin auch synthetische Wirkung Synthetische Wirkung. ausüben (Näheres bei Plasteinen, § 403).

Die Wirkung des Trypsins ist abhängig zunächst von der Wasserstoffionenkonzentration. Trypsin ist sehr empfindlich gegen Säuren, schon bei einer (H<sup>+</sup>) von  $10^{-4}$  ist es unwirksam, hat ein Optimum bei etwa  $2 \cdot 10^{-8}$ , also im schwach alkalischen Gebiet, und ist bei  $10^{-11}$  wieder unwirksam (Michaelis und Davidsohn<sup>4</sup>). Nach Ringer<sup>5</sup>) ist Trypsin um so wirksamer, je stärker alkalisch die Reaktion ist, selbst bei  $4 \cdot 10^{-12}$  ist noch Trypsinwirkung festzustellen, allerdings nur bei sehr kurzen Zeiträumen, da die bessere Spaltwirkung durch schnellere Zerstörung des Ferments wieder ausgeglichen wird. In der Praxis wird man also etwa in dem von Michaelis und Davidsohn ermittelten Gebiet arbeiten. Man nimmt meist eine 0,2—0,3proz. Sodalösung, was zwar einem erheblich höheren Alkaligrad entspricht, jedoch wird der schädliche Teil des Alkalis bald durch das Eiweiß und seine Spaltprodukte gebunden. Die letzteren üben außerdem noch eine gewisse Schutzwirkung auf das Ferment aus. Exakter ist der Gebrauch von Pufferlösungen, etwa 5 ccm  $\frac{n}{2}$ -K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 ccm n-KOH und 4 ccm Wasser, was  $p_H$  7,7 ergibt. Von fremden Stoffen scheinen kleinere Mengen von Alkalisalzen zu fördern, hohe Konzentrationen schädigen, Schwermetallsalze sind schädlich. Hemmend wirken Stoffe, die zu Absorptionen Anlaß geben können wie Tierkohle (Hedin<sup>6</sup>), aber auch Talkum, Tonerde, Kaolin (Michaelis und Ehrenreich<sup>7</sup>), Serumalbumin (Hedin<sup>8</sup>), Eiereiweiß (Sugimoto<sup>9</sup>), Serum,

<sup>1</sup>) Literatur bei Siegfried: Über partielle Eiweißhydrolyse. Berlin 1916.

<sup>2</sup>) E. Fischer u. Abderhalden: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 46, S. 52. 1905; Bd. 51, S. 264. 1907.

<sup>3</sup>) Abderhalden mit Kölker, London u. Voegtlin, Schittenhelm, Fodor: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 51, S. 294. 1907; Bd. 53, S. 334. 1907; Bd. 54, S. 363. 1908; Bd. 57, S. 342. 1909; Bd. 81, S. 1. 1912.

<sup>4</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 36, S. 280. 1911; vgl. aber Palitzsch u. Walbum: Biochem. Zeitschr. Bd. 47, S. 1. 1902; Long u. Hull: Journ. of the Americ. chem. soc. Bd. 39, S. 1051. 1917; ref. Chem. Zentralbl. 1917, II, S. 633.

<sup>5</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 116, S. 107. 1921; Bd. 124, S. 171. 1922.

<sup>6</sup>) Biochem. Journ. Bd. 1, S. 484. 1906. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 60, S. 368. 1909. Ergebn. d. Physiol. Bd. 9, S. 433. 1910.

<sup>7</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 10, S. 283. 1908.

<sup>8</sup>) Journ. of physiol. Bd. 32, S. 390. 1905. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 52, S. 412. 1907.

<sup>9</sup>) Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 74, S. 14. 1913.

wofür man im letzteren Fall ein Antitrypsin<sup>1)</sup> verantwortlich gemacht hat. Die Fällbarkeit<sup>2)</sup> durch Tonerde ist allerdings bei stärker gereinigten Präparaten in schwach saurer Lösung nicht mehr zu beobachten (Willstätter<sup>3)</sup>). Selbst die meistens gebrauchten Desinfektionsmittel Chloroform, Thymol oder Toluol sind etwas schädlich, je nach der Konzentration allerdings in verschiedener Weise (Kaufmann<sup>4)</sup>).

**Nachweis:** 507. **Nachweis und Bestimmung von Trypsin.** Entsprechend der ungenügenden Charakterisierung des Trypsins als chemisches Individuum ist auch sein Nachweis noch nicht genügend sicher. Es ist zwar leicht, eine proteolytische Wirkung einer Lösung nachzuweisen, dagegen bisher unmöglich ein exakter Nachweis, daß man es gerade mit Trypsin zu tun hat. Vor allem muß man feststellen, bei welchem (H<sup>+</sup>) das fragliche Ferment wirkt. So ist das im sauren Gebiet wirkende Pepsin leicht auszuschließen. Erepsin (§ 508), das auf einen ähnlichen Wirkungsbereich eingestellt ist, wirkt nicht auf Eiweißkörper, mit Ausnahme wahrscheinlich des Caseins, das schwach angegriffen wird. Eine Verwechslung ist dagegen möglich mit den proteolytisch wirkenden Fermenten anderer Gewebe (§ 509), die allerdings andererseits auch als ein Gemisch von Fermenten, darunter auch Trypsin, angesprochen worden sind. Vielfach begnügt man sich als Trypsinnachweis mit der Feststellung, daß in Sodalösung von 0,2% ein koagulierter Eiweißstoff, gekochtes Fibrin oder Hühnereiweiß gelöst wird. Nicht gekochtes Fibrin ist unsicher, da es selbst etwas proteasehaltig sein kann. Bei sehr fermentarmen Lösungen kann man dadurch eine Anreicherung erzielen, daß man die Fibrinflocken einige Zeit in der zu prüfenden etwa neutralen Flüssigkeit liegen läßt. Bei gelegentlichem Schütteln wird Absorption des Trypsins aus Fibrin erzielt. Die gut abgespülte Fibrinflocke wird dann in 0,2proz. Sodalösung überführt und untersucht, ob Lösung eintritt. Eine Kontrollprobe ist unbedingt erforderlich. Zusatz von Desinfektionsmitteln wie Toluol ist notwendig. Sehr empfindlich sind Proben, bei denen von einer trüben Eiweißlösung ausgegangen wird, die durch das proteolytische Ferment aufgehellt wird, eine Aufschwemmung von 1 g Ricin in 100 ccm Kochsalzlösung von 1,5 % oder gekochtes Rinderserum (Jakoby<sup>5)</sup>). Auch die Aufhellung von Milch ist als Probe vorgeschlagen worden (Bierry und Henri<sup>6)</sup>, Mandelbaum<sup>7)</sup>). Auf anderem Prinzip beruhen die verschiedenen Variationen der Plattenmethode, von denen die nach Müller-Jochmann<sup>8)</sup> angeführt sei.

**mit Fibrin** Man stellt sich eine Löffler-serumplatte her, indem man in einer Petrischale Rinder-, Hammel- oder Pferdeserum in 1/2 cm hoher Schicht bei 70° hält bis zum Erstarren, worauf man mit der fraglichen Fermentlösung animpft und 24 Stunden bei 50° stehen läßt. Auftreten von Dellen an den geimpften Stellen zeigt Proteolyse an. Ein Bakteriumwachstum ist bei der hohen Temperatur nicht zu befürchten. Ähnlich kann man auch Milch-Agarplatten benutzen (Mandelbaum). Abderhalden<sup>9)</sup> hat zum Nachweis Peptone oder

**mit trüber Lösung**

**mit Serumplatte**

<sup>1)</sup> Literatur bei Sugimoto (siehe <sup>9)</sup> S. 617) und bei E. Merck: Wissensch. Abhandl. Nr. 39, S. 53—57. Darmstadt 1923.

<sup>2)</sup> Über Absorption des Trypsin durch weitere Stoffe vgl. auch S. 605, Anm. 2—4.

<sup>3)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 55, S. 3614. 1922. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 125, S. 139. 1923.

<sup>4)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 39, S. 434. 1903; dort ältere Literatur.

<sup>5)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 10, S. 229. 1908.

<sup>6)</sup> Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. Bd. 54, S. 667. 1902.

<sup>7)</sup> Münch. med. Wochenschr. 1909, S. 2215.

<sup>8)</sup> Münch. med. Wochenschr. 1906, S. 1393, 1507, 2012.

<sup>9)</sup> Zusammenfassung im Handbuch d. Biochem. Arbeitsmeth. (Abderhalden) Bd. V, S. 575. Berlin-Wien 1911.



synthetische Polypeptide vorgeschlagen. Verwendet man ein stark tyrosin- mit Peptiden. haltiges Pepton — Pepton Witte, Pepton La Roche oder am besten Seidenpeptone, hergestellt durch Hydrolyse von Seide mit Schwefelsäure von 70% bei Zimmertemperatur —, so kann man die eintretende Spaltung an dem beginnenden Ausfallen von Tyrosin erkennen (Abderhalden und Schittenhelm<sup>1</sup>). Geht man von dem synthetischen Glycyl-l-tyrosin aus, so kann man ebenso peptolytische Wirkung erkennen, nimmt man d-Alanyl-glycin, wobei kein Ausfall einer Aminosäure eintritt, so kann man die Spaltung sehr bequem auch messend verfolgen, indem man die Änderung der optischen Drehung abliest (Abderhalden und Koelker<sup>2</sup>) oder eine Formoltitration (§ 490) ausführt (Abderhalden und Fodor<sup>3</sup>). Allerdings wirkt Pankreas-saft, im Gegensatz zu den Gewebsproteasen, nur langsam ein.

Zur Bestimmung der relativen Stärke zweier Trypsinlösungen kann man verschiedene der schon beim Pepsin (S. 611) geschilderten Verfahren benutzen, das nach Mett, Volhard-Löhlein, Grützner und nach Jakoby. Man arbeitet nur, zum Unterschied von den Pepsinproben, in sodaalkalischer Lösung und setzt, wenn bei der eigentlichen Bestimmung Säure erforderlich ist, wie bei der Probe nach Volhard-Löhlein, diese erst kurz vor der Titration hinzu. Bei dem Verfahren nach Mett ist zu berücksichtigen, daß Trypsin nicht der Schütz-Borissowschen Regel folgt (Hedin<sup>4</sup>), sondern hier die Größe der Verdauung der Fermentmenge und der Einwirkungszeit einfach proportional ist. Bei der Probe in Anlehnung an Grützner muß das Fibrin mit Spritblau gefärbt sein (Palladin<sup>5</sup>), Waldschmidt<sup>6</sup>). Viel benutzt wird zur Bestimmung auch Casein, indem man feststellt, nach welcher Zeit kein unverändertes Casein mehr vorhanden ist, kenntlich an dem Ausbleiben einer Fällung auf vorsichtigen Zusatz einer Säure (Gross<sup>7</sup>), Fuld<sup>8</sup>), Michaelis<sup>9</sup>). Man löst 0,1 g Casein nach Hammarsten in 1000 ccm Sodalösung von 0,1% und setzt zu je 10 ccm steigende Mengen Fermentlösung. Man erwärmt auf 40°, läßt 15 Minuten bei 30—40° stehen und bestimmt, bei welchem Mischungsverhältnis keine Fällung durch Zusatz von Essigsäure von 0,1% erfolgt. Ein ungefähres Maß für den Umfang der Spaltung gibt auch die Bestimmung, welcher Prozentsatz des Stickstoffs einer Eiweißlösung nach Fermenteinwirkung durch Gerbsäure nicht mehr fällbar ist (Hedin<sup>10</sup>). Man braucht nur in der ursprünglichen Lösung und in dem Gerbsäurefiltrat einen Kjeldahl auszuführen. Schließlich kann man auch die Formoltitration nach Sörensen heranziehen, die zahlenmäßige Verwertung für die Stärke der Trypsinwirkung ist aber schwieriger als beim Pepsin (S. 614) wegen des Auftretens von hoch- und niedermolekularen Abbauprodukten nebeneinander. Aufschlußreicher ist hier die gleichfalls beim Pepsin erwähnte Titration der gebildeten Carboxylgruppen nach Willstätter und Waldschmidt-Leitz (§ 489). Man titriert die Verdauungsflüssigkeit, die aber statt mit Soda mit Phosphatpuffer (S. 617) angesetzt sein muß, a) in 50 proz., b) in 97 proz. alkoholischer Lösung. Der verbrauchte Alkalianteil verteilt sich auf gebildete Aminosäuren und Polypeptide. Da in 50 proz. alkoholischer Lösung die Polypeptide voll als Carbonsäuren reagieren, die Aminosäuren jedoch nur

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 59, S. 230. 1909; Bd. 61, S. 421. 1909.

<sup>2</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 51, S. 294. 1907.

<sup>3</sup>) Fermentforschung Bd. 1, S. 533. 1916.

<sup>4</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 64, S. 82. 1910.

<sup>5</sup>) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 134, S. 337. 1910. <sup>6</sup>) desgl. Bd. 143, S. 189. 1911.

<sup>7</sup>) Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 58, S. 157. 1908. <sup>8</sup>) desgl. Bd. 58, S. 468. 1908.

<sup>9</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 10, S. 290. 1908.

<sup>10</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 52, S. 415. 1907.

zu etwa 28%, während in 97proz. alkoholischer Lösung beide voll reagieren, so läßt sich der Alkalianteil  $x$  der Aminosäure berechnen nach der Formel

$$x = \frac{100(b-a)}{72}.$$

Klinische Bestimmung.

Für klinische Zwecke als Pankreasfunktionsprüfung kann man eine der oben geschilderten Methoden anwenden. Bevorzugt werden für den Nachweis die Plattenmethode, für Bestimmung die Caseinmethode wegen ihrer raschen Ausführung. Um den Pankreassaft zu gewinnen, geht man meist nach der von Boldyreff<sup>1)</sup> ausgebildeten Methode der Ölmahlzeit vor. Durch Eingabe von 100—200 g Olivenöl in den Magen erfolgt Übertritt von Pankreassaft in den Magen, der nach  $\frac{1}{2}$ —1 Stunde abgehebert werden kann. Um eine schädigende Wirkung der Magensäure auf das Trypsin zu vermeiden, ist gleichzeitige Gabe von Alkalien notwendig, am besten wohl Magnesia usta (Lewinsky<sup>2)</sup>).

Albumosen und Peptone.

507 a. **Untersuchung eines tryptischen Verdauungsgemisches.** Will man die bei einer tryptischen Verdauung entstehenden Produkte trennen und in Substanz isolieren, so übergießt man in einem Kolben befindliches Eiweiß (etwa 100 g gut ausgewaschenes und ausgepreßtes Fibrin) mit 500 ccm 0,2proz. Soda-lösung, in der 0,2 g käufliches Pankreatin gelöst sind, fügt reichlich Chloroform oder Toluol zur Verhinderung der Fäulnis hinzu, schüttelt gut um und stellt den Kolben wohl verschlossen in den Brutschrank. Es erfolgt bald Lösung des Fibrins ohne voraufgegangene Quellung. Bald nach eingetretener Lösung wird die eine Hälfte mit Essigsäure ganz schwach angesäuert, aufgeköcht, filtriert, eingengt und weiter in der § 395 beschriebenen Weise auf Albumosen und Peptone untersucht. Die andere Hälfte bleibt mindestens 2—3 Tage unter häufigem Umschütteln im Brutschrank, jedenfalls solange, bis eine herausgenommene Probe eine sehr intensive Reaktion auf Tryptophan (S. 316) (Violett-färbung auf Zusatz von Bromwasser) gibt. Man erhitzt dann nach Zufügen von Essigsäure bis zur schwach sauren Reaktion zum Kochen, filtriert, fällt mit basischem Bleiacetat, befreit das Filtrat durch Schwefelwasserstoff vom Blei, filtriert wieder und dampft ein. Es scheidet sich Tyrosin krystallinisch aus. Um noch andere Aminosäuren und Diaminosäuren zu isolieren, verwendet man größere Mengen Fibrin, setzt zweckmäßig die Verdauung lange (3—4 Wochen) fort, bis die Biuretreaktion ganz oder fast ganz verschwunden ist, und verfährt dann nach den Angaben von Kutscher<sup>3)</sup> oder von Abderhalden und Reinbold<sup>4)</sup>.

Tyrosin.

#### Erepsin.

Vorkommen.

508. Das Ferment der Darmschleimhaut, welches Peptone leicht und schnell in Amino- und Diaminosäuren bis zum Verschwinden der Biuretreaktion zerlegt. Es wurde von O. Cohnheim<sup>5)</sup> aufgefunden und näher untersucht. Es ist auch im Darmsaft enthalten (Kutscher<sup>6)</sup>, Salaskin<sup>7)</sup>, Hamburger<sup>8)</sup>.

<sup>1)</sup> Zentralbl. f. Physiol. Bd. 18, S. 457. 1904. Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 121, S. 13. 1907; Bd. 140, S. 436. 1911. Vgl. auch Abderhalden: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 57, S. 317. 1908; Bd. 59, S. 230. 1909.

<sup>2)</sup> Dtsch. med. Wochenschr. 1908, S. 1582.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 25, S. 195. 1898; Bd. 26, S. 110. 1899; Bd. 28, S. 88. 1899.

<sup>4)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 46, S. 159. 1905.

<sup>5)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 33, S. 451. 1901; Bd. 35, S. 134. 1902; Bd. 36, S. 13. 1902; Bd. 47, S. 286. 1906; Bd. 49, S. 64. 1906; Bd. 51, S. 415. 1907.

<sup>6)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 34, S. 530; Bd. 35, S. 432. 1902.

<sup>7)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 35, S. 419. 1902.

<sup>8)</sup> Journ. de physiol. et de pathol. gén. Bd. 4, S. 805. 1902.

Cohnheim stellte eine Lösung dieses Fermentes dar durch Versetzen von 2 Teilen des wässerigen Auszuges der Schleimhaut des Hundedarms mit 3 Teilen gesättigter Ammonsulfatlösung, Dialysieren des abfiltrierten und in Wasser suspendierten Niederschlages und Filtrieren. Man kann sich auch nach dem Verfahren von Wiechowski (S. 603) ein Trockenpräparat der Schleimhaut herstellen (Rautitschek<sup>1</sup>). Isolierung.

Es wirkt in schwach alkalischer und neutraler, nicht in schwach saurer Lösung, am besten in einer mit Kohlensäure gesättigten Lösung von Natriumcarbonat bei einem  $p_H$  von 7,8 (Rona und Arnheim<sup>2</sup>) bis 8,6 (Euler<sup>3</sup>). Es spaltet Peptone, Albumosen und Protamine vollständig bis zum Verschwinden der Biuretreaktion, desgleichen langsam Casein, die übrigen nativen Eiweißstoffe aber gar nicht, ebensowenig Globin und den Bence-Jonesschen Eiweißkörper. Es vermag auch synthetische Polypeptide zu spalten, die aus natürlich vorkommenden Aminosäuren aufgebaut sind, darunter auch die, die der Einwirkung von Trypsin widerstehen, wie das Diglycyl-, Leucyl- und Glycylglycin (Abderhalden und Mitarbeiter<sup>4</sup>), Franke und Schittenhelm<sup>5</sup>). Der Abbau durch Erepsin führt zu den Aminosäuren. Hippursäure wird nicht angegriffen. Fermentwirkung.

Erepsin ist sehr empfindlich gegen Erwärmen, schon bei 59° wird es in neutraler, wässriger Lösung unwirksam (White<sup>6</sup>). Von Desinfektionsmitteln schädigen bei längerer Einwirkung 1proz. Fluornatrium und Chloroform. Das Erepsin wird von Fibrin und Elastin kaum absorbiert, wodurch es sich vom Trypsin unterscheidet (Amantea<sup>7</sup>). Einfluß äußerer Faktoren.

Zum Nachweis dient die Wirksamkeit gegen Albumosen und Peptone bei  $p_H$  von etwa 8, zusammen mit der Unwirksamkeit gegen Eiweiß, außer Casein. Man prüft zunächst, ob die Biuretreaktion schwächer wird und schließlich verschwindet. Besser benutzt man noch die erwähnten Polypeptide, deren Spaltung man, wie beim Trypsin geschildert (S. 619), beweist. Nachweis.

#### *Proteolytische und peptolytische Fermente der Gewebe.*

509. Es handelt sich um einen Komplex von Fermenten, die dem Trypsin und Erepsin in ihrer Wirksamkeit ähneln, indem sie bei neutraler oder schwach alkalischer Reaktion Eiweiß sehr energisch bis zu den Aminosäuren abbauen, die dann teilweise, durch das Eingreifen anderer Fermente wie der Arginase (§ 518), noch sekundäre Veränderungen erleiden können. Entdeckt wurden sie von Salkowski beim Studium der Autodigestion von Organen, der sog. Autolyse, die von ihm und seinen Schülern<sup>8</sup>), dann weiter durch viele andere — besonders Jakoby<sup>9</sup>), Kutscher<sup>10</sup>), Hedin<sup>11</sup>),

<sup>1</sup>) Zeitschr. f. exp. Pathol. u. Therapie Bd. 3, S. 822. 1907.

<sup>2</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 57, S. 84. 1913.

<sup>3</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 51, S. 213. 1907.

<sup>4</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 49, S. 1. 1906; Bd. 53, S. 334. 1907; Bd. 57, S. 342. 1908; Bd. 61, S. 421. 1909. Vgl. auch die Literatur in § 506.

<sup>5</sup>) Zeitschr. f. exp. Pathol. u. Therapie Bd. 8, S. 237. 1910.

<sup>6</sup>) Journ. of the Americ. chem. soc. Bd. 33, S. 2042. 1911.

<sup>7</sup>) Zentralbl. f. Biochem. Bd. 14, S. 299. 1912.

<sup>8</sup>) Salkowski: Zeitschr. f. klin. Med. Bd. 17, Supplbd., S. 77. 1890. — Schwiening: Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. Bd. 136, S. 444. 1893. — Biondi: desgl. Bd. 144, S. 373. 1896. — Yoshimoto: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 58, S. 341. 1908/09. — Kikkoji: desgl. Bd. 63, S. 109. 1909. — Salkowski: desgl. Bd. 63, S. 136. 1909.

<sup>9</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 30, S. 149 u. 174. 1900; Bd. 33, S. 126. 1901. Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 3, S. 446. 1903. Biochem. Zeitschr. Bd. 26, S. 336. 1910.

<sup>10</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 34, S. 114. 1901.

<sup>11</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 122, S. 307. 1922; Bd. 125, S. 289. 1922; Bd. 130, S. 45. 1923. Journ. of biol. chem. Bd. 54, S. 177. 1922. Ältere Arbeiten von Hedin s. unten bei „Darstellung“.

Bradley<sup>1)</sup>, Dernby<sup>2)</sup> sind hier zu nennen — näher untersucht wurden. Es handelt sich um typische Endoenzyme, die entsprechend zu gewinnen sind, und zwar um einen Komplex von mehreren Enzymen. Über die beste Art der Bezeichnung dieser Fermente wie der eiweißspaltenden Fermente überhaupt ist eine völlige Einigung noch nicht erzielt. Oppenheimer<sup>3)</sup> hat vorgeschlagen, zu unterscheiden: A. Eigentliche Proteasen; spalten Eiweiß bis zur Peptidstufe, greifen Peptide nicht an. Dazu gehören: 1. Pepsinasen, wirksam bei saurer Reaktion; 2. Tryptasen, wirksam bei etwa neutraler Reaktion ( $p_H$  6—8). B. Peptidasen oder Ereptasen; greifen Eiweiß nicht an, spalten Peptide resp. Peptone. Voraussetzung für diese Definition ist, daß man die noch strittige Frage, ob Trypsin aus Eiweiß Aminosäuren abspalten kann, und andererseits, ob Erepsin von Eiweißarten das Casein angreifen kann, durchaus verneint. Dernby<sup>4)</sup>, der die gleichen Namen wählt oder auch von primären (A 1), sekundären (A 2) und tertiären (B) Proteasen spricht, definiert die Tryptasen als Fermente, die denaturiertes Eiweiß und Peptone bei alkalischer oder neutraler Reaktion angreifen können. Vermieden ist von beiden Autoren der Name Peptase, mit dem einerseits — korrekt — ein auf Peptone wirksames Ferment, also die Ereptase bezeichnet wird, andererseits aber — besonders von botanischer Seite — auch eine Pepsinase.

**Nomenklatur.** Sie finden sich in der Leber, in Muskeln, Milz, Nebenniere, Niere, Lymphdrüse, Lunge, Thymusdrüse, Gehirn, malignen Tumoren, Ovarien, Placenta, Blutkörperchen. Sehr ähnlich scheinen auch die Fermente zu sein, die im Harn ausgeschieden werden (Hedin<sup>5)</sup>, auf die zuerst Sahli<sup>6)</sup> aufmerksam machte. Über das Fibrinferment des Blutplasmas vgl. bei Gerinnung des Bluts (§ 668).

**Vorkommen.** Noch nicht voll geklärt ist die Frage nach den Proteasen des Serums. Soviel ist sicher, daß im normalen Serum kleine Fermentmengen auftreten, wie neuerdings, von älteren Arbeiten abgesehen, durch Hedin<sup>7)</sup> sichergestellt ist, und daß deren Menge bei manchen Erkrankungen — Pneumonie u. a. — deutlich vermehrt sein kann. Ihre Wirkung auf verschiedene Eiweißarten ist der der Gewebs- und Leukocythenproteasen so ähnlich, daß man die Abgabe dieser Proteasen an das Plasma vermutet. Durch Abderhalden<sup>8)</sup> ist dann aber mit zahlreichen Mitarbeitern die Frage einer näheren Untersuchung unterzogen worden, wieweit im Blut in der Norm nicht vorhandene ganz spezifische Proteasen auftreten, die eine bestimmte Eiweißart oder daraus gewonnene Peptone abbauen, die sog. Abwehrfermente. Ihr Vorkommen wird in Zusammenhang gebracht mit dem Auftreten körperfremder oder zwar körpereigener, aber blutfremder Eiweißstoffe im Blut. Ausgedehnt ist die Untersuchung hauptsächlich auf die Fälle der Schwangerschaft — Abbau von Placenta —, des Carcinoms — Abbau von Carcinomgewebe — und manche Geisteskrankheiten — Abbau von Gehirnweiß —, wobei die Abderhaldensche Reaktion, der Abbau des betreffenden Eiweißkörpers, zum klinischen Nachweis der Schwangerschaft oder jener Erkrankungen benutzt worden ist. Während von Abderhalden und

<sup>1)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 29, S. 281. 1917; Bd. 44, S. 553. 1920; Bd. 47, S. 333. 1921; Bd. 50, S. 14. 1922; Bd. 52, S. 467. 1922.

<sup>2)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 35, S. 179. 1918.

<sup>3)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 136, S. 140. 1923.      <sup>4)</sup> desgl. Bd. 133, S. 432. 1922.

<sup>5)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 112, S. 252. 1921; Bd. 119, S. 264. 1922.

<sup>6)</sup> Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 36, S. 209. 1888.

<sup>7)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 104, S. 11. 1920.

<sup>8)</sup> Zusammenfassung in Abderhalden: Die Abderhaldensche Reaktion. 5. Aufl. Berlin 1922. Vgl. besonders Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 77, S. 249. 1912; Bd. 81, S. 90. 1912; Bd. 91, S. 96. 1914 und Fermentforschung Bd. 4—7. 1921—1923. Fortgesetzte Studien über das Wesen der sog. Abderhaldenschen Reaktion I—XII.

einer großen Zahl von Nachprüfern<sup>1)</sup> die Spezifität solcher Fermente konstatiert wurde, haben auch viele Untersucher<sup>2)</sup> unsichere oder sogar völlig negative Resultate erhalten. Die Frage ist offenbar noch nicht geklärt, jedenfalls ist die Stellungnahme dazu sehr abhängig von der Versuchstechnik (s. unten Nachweis).

Ein weiteres, in vielen Geweben enthaltenes Ferment, das aber von den erwähnten Peptasen verschieden ist, ist das zuerst von Schmiedeberg<sup>3)</sup> aufgefundene Histozy<sup>m</sup>. Es spaltet Hippursäure hydrolytisch und einzelne andere Acylaminosäuren.

Die Isolierung der Gewebsproteasen ist die für Endoenzyme typische (S. 603). Man arbeitet mit Organpreßsäften oder Macerationssäften. Jakob<sup>4)</sup> beispielsweise macerierete Lebergewebe 14 Tage lang mit Toluolwasser und fällte dann aus dem filtrierten Saft das Fermentgemisch mit Ammonsulfat. Verbessern läßt sich das Verfahren, wenn man Leberbrei mit dem gleichen Volumen einer  $\frac{1}{20}$ -Salzsäure, die 0,85% Kochsalz enthält, 7 Tage bei Zimmertemperatur stehen läßt und das Filtrat mit Soda neutralisiert. Man kann reinigen durch eine Vorfällung durch Zusatz von Ammonsulfat bis zu 33% Sättigung, um dann das Ferment bei 70% zu fällen (Hata<sup>5)</sup>. Hedin und Rowland<sup>6)</sup> zerrieben Milz oder andere Organe sehr fein mit Hilfe eines von Rowland<sup>7)</sup> konstruierten Apparats und preßten unter hohem Druck aus. Es handelt sich um ein Gemisch von Fermenten, in denen regelmäßig nachzuweisen ist eine bei  $p_H$  7,8—8 wirksame Ereptase und eine bei schwach saurer Reaktion ( $p_H$  4,3—5,6) wirksame Protease. In der Milz findet sich noch eine dritte bei  $p_H$  9—10 wirksame Protease (Hedin<sup>8)</sup>. Eine Trennung ist durch Kieselgur oder sukzessive Extraktion mit alkalischer Caseinlösung und Kochsalzlösung versucht worden (Hedin<sup>8,9)</sup>. Auch aus Leukocyten ist das Proteasengemisch dargestellt (Jochmann und Lockemann<sup>10)</sup>.

Die Spaltung, welche das Eiweiß durch diese Proteasen erfährt, ist eine sehr weitgehende. Schon Salkowski und seine Schüler hatten reichliche Bildung von Aminosäuren beobachtet, sowie das Verschwinden aller Peptone. Auch Nucleinbasen bilden sich, ferner reichlich Ammoniak (Jakob). Unter den Produkten, welche die Milzproteasen aus Eiweiß bilden, ließen sich fast alle Amino- und Diaminosäuren nachweisen (Hedin mit Leathes<sup>11)</sup>, Dakin<sup>12)</sup>, Cathcart<sup>13)</sup>. Die Gewebsproteasen spalten auch die Polypeptide

<sup>1)</sup> Zusammenfassung in Abderhalden: Die Abderhaldensche Reaktion. 5. Aufl. Berlin 1922. Vgl. besonders Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 77, S. 249. 1912; Bd. 81, S. 90. 1912; Bd. 91, S. 96. 1914 und Fermentforschung Bd. 4—7. 1921—1923. Fortgesetzte Studien über das Wesen der sog. Abderhaldenschen Reaktion I—XII.

<sup>2)</sup> Die Literatur findet sich zerstreut in den klinischen, besonders gynäkologischen Zeitschriften. Vgl. besonders den Unterabschnitt „Abwehrfermente“ unter Fermenten in Malys Jahresber. d. Tierchem. Bd. 44. 1914 und folgende Bände.

<sup>3)</sup> Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 14, S. 382. 1881. — Ausführliche Literatur bei Smorodinzew: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 124, S. 123. 1923.

<sup>4)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 30, S. 166. 1900.

<sup>5)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 16, S. 383. 1909.

<sup>6)</sup> Proc. of the physiol. soc., Journ. of physiol. Bd. 26, S. 48. 1901. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 32, S. 341 u. 531. 1901.

<sup>7)</sup> Journ. of physiol. Bd. 27, S. 53. 1901.

<sup>8)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 125, S. 289. 1923.

<sup>9)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 50, S. 497. 1907.

<sup>10)</sup> Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 11, S. 449. 1908.

<sup>11)</sup> Journ. of physiol. Bd. 28, S. 360. 1902.

<sup>12)</sup> Journ. of physiol. Bd. 30, S. 84, 155 u. 159. 1903.

<sup>13)</sup> Journ. of physiol. Bd. 32, S. 299. 1905.

(Abderhalden und Mitarbeiter<sup>1</sup>). Ähnlich energisch wirken auch die Leukocytenproteasen (Jochmann und Lockemann). Bei der Wirkung auf Peptone ist der Macerationssaft von Leber und Lunge streng spezifisch, indem er nur Peptone aus Leber resp. Lunge abbaut (Abderhalden<sup>2</sup>), während Nierenpreßsaft unspezifisch ist.

Einfluß äußerer  
Faktoren.

Entsprechend den etwas wechselnden Mischungsverhältnissen dieser Fermente bei den einzelnen Organen sind die Angaben für die günstigste Reaktion bei der Autolyse etwas schwankend<sup>3</sup>). Für ein lebhaftes Einsetzen der Autolyse scheint die Gegenwart von etwas Säure ( $p_H$  5,5) notwendig zu sein, die entweder das Organ selbst produziert, oder die absichtlich zugesetzt wird. Stärkere Säure ( $p_H$  3,25) wirkt zerstörend auf die Fermente. Die günstige Wirkung beruht vielleicht auf der Beseitigung eines Hemmkörpers (Hedin<sup>4</sup>), Rhodin<sup>5</sup>). Im späteren Stadium kann dann schwach alkalische Reaktion besser wirken. Hemmend wirken Stoffe, die im normalen Serum enthalten sind (Hedin). Deutlich fördernd wirkt Radiumstrahlung und -emanation (Wohlgemut<sup>6</sup>), Neuberg<sup>7</sup>), Löwenthal und Edelstein<sup>8</sup>). Schwermetall-Salze mit Ausnahme von Cd-, Ni-, Zn-Salzen pflegen in ganz kleinen Dosen zu fördern, in größeren zu hemmen<sup>9</sup>).

Nachweis.

Der Nachweis der Gewebsproteasen erfolgt ganz analog wie der des Trypsins (§ 507) und Erepsins. Wegen Einzelheiten vgl. besonders die letzten Arbeiten von Hedin sowie die ausführliche Arbeit von Dernby<sup>10</sup>) über die Proteasen der Hefe. Für den Nachweis der Serumproteasen bei der Abderhaldenschen Reaktion sind eine Reihe von Methoden ausgearbeitet worden, die jedoch außerordentlich subtil sind, so daß monatelange Einarbeitung erforderlich ist (Abderhalden<sup>11</sup>). Deshalb muß hier von einer Wiedergabe abgesehen und auf die Originalliteratur verwiesen werden. Zuerst benutzt wurde die schon beim Trypsin erwähnte optische Methode<sup>12</sup>), die die Drehungsänderung eines Peptons verfolgt, das aus dem betreffenden Eiweißstoff, so der Placenta, durch Hydrolyse mit 70 proz. Schwefelsäure bei Zimmertemperatur gewonnen ist. Später wurde<sup>13</sup>) Placenta- (usw.) Eiweiß selbst verwandt, dessen Spaltung durch das Auftreten dialysierbarer Produkte, die sich

<sup>1</sup>) Abderhalden mit Teruuchi, Hunter, Rona, Deetgen, Oppler, Mc Lester, Manwaring, Lussana, Heise, Koelker, Medigreceanu: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 47, S. 466. 1906; Bd. 48, S. 537. 1906; Bd. 49, S. 1 u. 31. 1906; Bd. 51, S. 334. 1907; Bd. 53, S. 280, 294, 308. 1907; Bd. 55, S. 371, 377, 390. 1908; Bd. 60, S. 415. 1909; Bd. 62, S. 136 u. 145. 1910; Bd. 66, S. 265 u. 267. 1910; Bd. 74, S. 409. 1911.

<sup>2</sup>) Abderhalden mit Fodor, Schiff, Ewald, Ishiguro, Watanabe: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 87, S. 220 u. 231. 1913; Bd. 91, S. 96. 1914. — Tscherikowski: desgl. Bd. 111, S. 76. 1920. — Vgl. aber gegenteilige Befunde von Ferrin: Chem. Zentralbl. 1913, II, S. 1931.

<sup>3</sup>) Zusammenstellung bei Kaschiwabara: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 80, S. 45. 1912; vgl. auch Rona u. Mislowitz: Biochem. Zeitschr. Bd. 140, S. 517. 1923.

<sup>4</sup>) Hammarsten-Festschrift VI. Upsala u. Wiesbaden 1906.

<sup>5</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 75, S. 197. 1911.

<sup>6</sup>) Berlin. klin. Wochenschr. Jg. 26, S. 704. 1904.

<sup>7</sup>) Zeitschr. f. Krebsforsch. Bd. 2, S. 171. 1904.

<sup>8</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 14, S. 484. 1908.

<sup>9</sup>) Literatur bei Truffi: Biochem. Zeitschr. Bd. 23, S. 270. 1909.

<sup>10</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 81, S. 107. 1917.

<sup>11</sup>) Fermentforschung Bd. 5, S. 163. 1922. Auch in der neuesten 5. Aufl. des Buches von Abderhalden über „Die Abderhaldensche Reaktion, Berlin 1922“, ist die Methodik aus diesem Grunde nicht eingehend berücksichtigt.

<sup>12</sup>) Abderhalden, Freund u. Pincussohn: Prakt. Ergebn. d. Geburtsh. u. Gynäkol. Jg. 2, II. Abt., S. 367. 1910. Vgl. auch die Darstellung von Abderhalden im Handb. d. biochem. Arbeitsmeth. Bd. 5, S. 575. Berlin-Wien 1911.

<sup>13</sup>) Abderhalden u. Kiutsi: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 77, S. 249. 1912.

im Dialysat mit der Ninhydrinprobe dokumentierten, nachgewiesen wurde. Voraussetzung für diese Dialysiermethode ist, daß weder das Serum selbst, noch das Placentastück solche Stoffe abspaltet und die Dialysierschläuche einwandfrei sind. Wegen der technischen Ausführung muß besonders auf die Arbeiten von Pregl<sup>1)</sup> und Dekrinis<sup>2)</sup> verwiesen werden. Schließlich hat man auch mit dem Interferometer die Änderung in der Zusammensetzung der Lösung verfolgt (P. Hirsch<sup>3)</sup>. Weitere direkte und indirekte Methoden sind in den letzten Arbeiten von Abderhalden<sup>4)</sup> zu finden.

#### *Die Labfermente, Chymosin und Parachymosin.*

510. Als Chymosin bezeichnet man mit Hammarsten<sup>5)</sup> das Labferment, Vorkommen. das sich in der Schleimhaut des Magens von Kalb und Schaf findet, das bei neutraler oder schwach alkalischer Reaktion Milch oder kalkhaltige Caseinlösungen zur Gerinnung zu bringen vermag. Es findet sich vielleicht auch in dem Magen anderer junger Säugetiere. Als Parachymosin bezeichnet man mit Bang<sup>6)</sup> Fermente, die im Magensaft und der Schleimhaut besonders des Fundusteils der Mägen von vielen erwachsenen Tieren (Rind, Hund, Schwein) und dem Menschen vorkommen und im schwach sauren Gebiet eine ähnliche Wirkung hervorrufen, aber vom Chymosin deutlich verschieden sind. Sie kommen als Proenzyme vor. Während für das Chymosin seine gesonderte Existenz als Ferment gut gestützt ist (Hammarsten<sup>7)</sup>, ist die Labwirkung des Parachymosins vielfach nur als eine modifizierte Pepsinwirkung erklärt worden (Pawlow u. a.<sup>8)</sup>, Rakoczy<sup>9)</sup>, Michaelis<sup>10)</sup>, Hammarsten) oder wenigstens das Vorhandensein zweier aktiver Seitenketten, einer peptischen und einer labenden, innerhalb eines großen Fermentmoleküls angenommen worden, von denen die eine nur bei starker saurer, die andere bei fast neutraler wirksam wäre (Nencki und Sieber<sup>11)</sup>, Pekelharing<sup>12)</sup>. Eine Entscheidung ist noch nicht zu treffen. Es scheint außerdem mehrere Parachymosine je nach der Tierart zu geben, da in der Magenschleimhaut für die betreffende Tierart spezifische Hemmungskörper des Parachymosins gefunden worden sind (Hedin<sup>13)</sup>. Das Proenzym des Parachymosins soll eine Verbindung mit diesen Hemmungskörpern sein (Hedin).

Zur Darstellung von Chymosin geht man nach Hammarsten<sup>14)</sup> vom Labmagen der Saugkälber aus, von dem zweckmäßig nur der Fundusteil verarbeitet wird. Die gut abgespülte und dann abgeschabte Drüsenschicht eines Magens wird mit der 10fachen Menge an 0,1proz. Salzsäure 24 Stunden bei 0° extrahiert.

Darstellung von  
Chymosin.

<sup>1)</sup> Fermentforschung Bd. 1, S. 7. 1916.    <sup>2)</sup> desgl. Bd. 1, S. 13. 1919.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 91, S. 440. 1914. Fermentforschung Bd. 4, S. 64. 1921; dort weitere Literatur.

<sup>4)</sup> Fermentforschung Bd. 5, 6 u. 7. Fortgesetzte Studien über das Wesen der sog. Abderhaldenschen Reaktion. 1922 u. 1923.

<sup>5)</sup> Malys Jahresber. d. Tierchem. 1872, S. 118; 1874, S. 135; 1877, S. 158.

<sup>6)</sup> Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 79, S. 425. 1900.

<sup>7)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 68, S. 119. 1910; Bd. 94, S. 291. 1915; Bd. 108, S. 243. 1919/20; Bd. 121, S. 261. 1922; Bd. 130, S. 55. 1923.

<sup>8)</sup> Pawlow u. Parastschuk: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 42, S. 415. 1904. — Sawjalow: desgl. Bd. 46, S. 307. 1905. — Gewin: desgl. Bd. 54, S. 32. 1907.

<sup>9)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 68, S. 421. 1910; Bd. 73, S. 453. 1911; Bd. 84, S. 329. 1913.

<sup>10)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 17, S. 231. 1909; Bd. 105, S. 60. 1920.

<sup>11)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 32, S. 302. 1901.    <sup>12)</sup> desgl. Bd. 35, S. 8. 1902.

<sup>13)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 72, S. 187. 1911; Bd. 74, S. 242. 1911; Bd. 76, S. 355. 1911.

<sup>14)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 94, S. 300. 1915.

Das filtrierte Extrakt gibt nach dem vorsichtigen Neutralisieren mit Natriumcarbonat kräftige Labwirkung. Zur Darstellung reinerer Lösungen kann man das Neutralisationsverfahren anwenden. Man setzt zu dem ersten sauren Extrakt etwas Lackmoid und dann wegen der Alkaliempfindlichkeit des Labs sehr vorsichtig so lange Natronlauge, anfänglich normale, zuletzt tropfenweise  $\frac{n}{10}$ -Lauge, bis der Neutralpunkt fast erreicht ist. Es fällt ein Niederschlag, der nach 24stündigem Stehen abzentrifugiert wird. Er zeigt starke Labwirkung, aber wesentlich schwächere Pepsinwirkung. Zur Herstellung von Lösungen, die an festen Stoffen sehr arm sind, löst man diesen Niederschlag in 400 ccm Wasser und filtriert. Über andere Methoden zur Darstellung von Lösungen mit starker Labwirkung, aber schwacher oder gar keiner Pepsinwirkung s. bei Hammarsten<sup>1)</sup>.

Darstellung von Parachymosin.

Zur Darstellung von Parachymosin aus der Magenschleimhaut erwachsener Tiere ist dies Neutralisationsverfahren nicht brauchbar, man muß die Alkaliwirkung völlig vermeiden. Man verfährt nach einem der beim Pepsin geschilderten Verfahren zur Darstellung des Pepsins nach Pekelharing oder Hammarsten (§ 503). Diese Pepsinpräparate zeigen deutliche Labwirkung. Handelt es sich nur um die Darstellung einer Lösung, so nimmt man eine der dort erwähnten Pepsinlösungen, etwa von einem käuflichen Pepsin ausgehend. Eine jahrelang haltbare Lösung erhält man, wenn man ein käufliches Präparat mit der 10fachen Menge einer 10proz. Kochsalzlösung etwa 1 Woche bei Zimmertemperatur stehen läßt, filtriert und das Filtrat, mit dem gleichen Volumen Glycerin versetzt, im Eisschrank aufhebt (Morgenroth<sup>2)</sup>, Michaelis und Rothstein<sup>3)</sup>.

Darstellung von Zymogen.

Die Darstellung des von Hammarsten<sup>4)</sup> zuerst beobachteten Zymogens des Parachymosins aus Schweinemagen erfolgt in der beim Pepsinogen geschilderten Weise (S. 606). Bei der Darstellung ist Säureeinwirkung vermieden, da dadurch das Parachymosin aus seiner Vorstufe in Freiheit gesetzt wird.

Labfermente, Unterschiede.

Der Unterschied zwischen den einzelnen Labfermenten, auf dem die Annahme mehrerer Labfermente beruht, ist hauptsächlich ihr Verhalten gegen Alkali<sup>5)</sup>. Alle Labfermente sind gegen Alkali recht empfindlich und werden dadurch rasch zerstört, jedoch das Parachymosin durch wesentlich geringere Konzentration der OH-Ionen. Für das Parachymosin genügen schon die Hydroxylionen der Milch bei etwas höherer Temperatur (van Dam<sup>6)</sup>), während das eigentliche Chymosin dadurch kaum geschädigt wird. Versetzt man von gleich wirksamen Lösungen von Chymosin und Parachymosin je 100 ccm mit 2 ccm  $\frac{n}{10}$ -Natronlauge, so ist beim Parachymosin die Wirkung innerhalb von 2 Minuten auf  $\frac{1}{4000}$  gesunken, beim Chymosin dagegen in 8 Minuten nur auf  $\frac{1}{2}$  (Hammarsten<sup>7)</sup>). Beim Parachymosin verläuft die Zerstörung durch Alkali genau parallel mit der Zerstörung der Pepsinwirkung (Michaelis und Rothstein).

Fermentwirkung.

Die Wirkung der Labfermente ist eine proteolytische (Hammarsten<sup>8)</sup>. Sie ist noch nachweisbar bei einem Verhältnis von Lab zu Milch wie 1: 24 000 000.

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 56, S. 18. 1908; Bd. 74, S. 142. 1911; Bd. 121, S. 269. 1922.

<sup>2)</sup> Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh. Bd. 26, S. 354. 1899.

<sup>3)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 105, S. 60. 1920.

<sup>4)</sup> Malys Jahresber. d. Tierchem. 1872, S. 118. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 22, S. 103. 1896.

<sup>5)</sup> Vgl. S. 625, Anm. 6 bis 9).

<sup>6)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 64, S. 316. 1910; Bd. 86, S. 77. 1913.

<sup>7)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 121, S. 261. 1922.

<sup>8)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 102, S. 33. 1918.



Casein wird dabei in Paracasein verwandelt, das als Kalkverbindung ausfällt (§ 445). Die Wirkung erstreckt sich aber auch auf Legumin und Muskelsyntonin (Hammarsten<sup>1</sup>). Lab hat auch synthetische Eigenschaften (vgl. Plasteine, § 403). Die spaltende Wirkung tritt ein beim Chymosin etwa bei neutraler Reaktion, beim Parachymosin bei schwach saurer Reaktion, bei  $p_H$  6—6,4 (Michaelis und Mendelsohn<sup>2</sup>), also in einem Gebiet, wo eine Pepsinwirkung nicht mehr eintritt. Die Wirkung erfolgt rasch bei etwa 45°, jedoch ist auch bei Zimmertemperatur noch gute Wirkung zu konstatieren, selbst bei 0° ist die Wirkung nicht aufgehoben (Fuld<sup>3</sup>). Bei höherer Temperatur erfolgt Zerstörung des Ferments, am frühesten bei alkalischer Reaktion (Näheres bei Bang<sup>4</sup>) und bei Madsen und Walbum<sup>5</sup>). Günstig wirkt Gegenwart von Kalksalzen, die zwar auf den eigentlichen Fermentprozeß ohne Einfluß sind, aber das Ausflocken des Paracaseincalciums beschleunigen (Hammarsten, Bang<sup>6</sup>). Zusatz der meisten Desinfektionsmittel schädigt etwas, am unschädlichsten soll Senföl sein (Fuld). Die Gerinnungszeit ist umgekehrt proportional der Fermentmenge, wenigstens in ziemlicher Annäherung beim Chymosin, während beim Parachymosin das Gesetz verwischt ist durch die Zerstörbarkeit durch Alkalien, sobald man bei höherer Temperatur arbeitet. Die Labgerinnung ist zu hemmen durch normales Serum (Hammarsten und Röden<sup>7</sup>), Eiereiweiß (Hedin<sup>8</sup>) und durch die oben S. 625 erwähnten spezifischen Stoffe, die sich mit  $NH_3$  aus der Magenschleimhaut isolieren lassen (Hedin).

**511. Nachweis und Bestimmung von Labfermenten.** Zum Nachweis benutzt man ausschließlich den Eintritt einer Gerinnung von Milch auf Zusatz der fraglichen Fermentlösung bei Zimmer- oder Bruttemperatur. Um die Reaktion zu einer empfindlichen zu machen, setzt man der Milch  $\frac{1}{10}$  ihres Volumens an Calciumchloridlösung (10 g krystallisiertes Salz in 100 ccm Wasser) hinzu und arbeitet bei dem optimalen  $p_H$ . Um dies zu erreichen, ist es aber, wenigstens bei Parachymosinlösungen, nicht empfehlenswert, die Fermentlösung, falls sie mit 0,1% Salzsäure hergestellt sein sollte, vorher zu neutralisieren, wegen der Gefahr einer teilweisen Zerstörung des Ferments durch das Alkali. Bei nicht zu großen Fermentmengen genügen die Salze der Milch als Puffer (Michaelis und Rothstein<sup>9</sup>). Die meist angewandten Methoden zur quantitativen Bestimmung der relativen Stärke von Lablösungen verfahren so, daß sie zu einer Milchemischung Fermentlösungen von immer stärkerer Verdünnung hinzusetzen und bestimmen, wo gerade noch Gerinnung eintritt. Man vergleicht mit irgendeinem Standardpräparat. (Näheres in den in den vorigen Paragraphen zitierten Arbeiten von Hammarsten.) Blum und Fuld<sup>10</sup>) empfehlen, um sich von der wechselnden Zusammensetzung der Milch unabhängig zu machen von einem Milchpulver auszugehen, Michaelis und Rothstein arbeiten mit obiger Milchemischung. Sie setzen von der entsprechend progressiv verdünnten Fermentlösung das doppelte Volumen zu und lassen stehen. Die Resultate stimmen bis auf 5% untereinander überein.

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 102, S. 105. 1918.

<sup>2</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 58, S. 315. 1913.

<sup>3</sup>) Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 2, S. 170. 1902. — Biochem. Zeitschr. Bd. 4, S. 54. 1907.

<sup>4</sup>) Skandinav. Arch. f. Physiol. Bd. 25, S. 105. 1911.

<sup>5</sup>) Hammarsten-Festschrift X. Upsala u. Wiesbaden 1906.

<sup>6</sup>) Literaturzusammenstellung bei Rona u. Gabbe: Biochem. Zeitschr. Bd. 134, S. 75. 1922.

<sup>7</sup>) Upsala läkareförenings förhandl. Bd. 22, S. 546. 1887; zit. nach Hammarsten: Lehrbuch. 9. Aufl. S. 49. München-Wiesbaden 1922.

<sup>8</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 60, S. 85 u. 364. 1909; Bd. 63, S. 143. 1909.

<sup>9</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 105, S. 60. 1920. <sup>10</sup>) desgl. Bd. 4, S. 62. 1907.

**Lipase.**

512. Das Fett hydrolysierende Ferment, die Lipase\*), ist zuerst im Pankreas und dessen Sekret nachgewiesen worden. Es findet sich aber auch in der Magenschleimhaut und dem Magensaft (Volhard<sup>1</sup>), im Darmsaft (Boldyreff<sup>2</sup>) und Darmschleimhaut, im Blut<sup>3</sup>) und zahlreichen Organen<sup>4</sup>), so in der Leber und im Fettgewebe (Loevenhart<sup>5</sup>), im Harn (Hedin und Massai<sup>6</sup>). Wieweit diese Lipasen untereinander identisch sind, ist noch unbestimmt. In älteren Arbeiten scheinbar festgestellte Unterschiede in der Abhängigkeit von äußeren Faktoren (s. unter Fermentwirkung) haben durch die neueste, grundlegende Arbeit von Willstätter und Waldschmidt-Leitz<sup>7</sup>) über die Pankreaslipase an Wert verloren, da die Lipase sich als ganz besonders abhängig in ihrer Wirkung erwiesen hat von aktivierenden und hemmenden Begleitstoffen. Ein Unterschied ist nach Volhard, Davidsohn mit einiger Sicherheit nur anzunehmen zwischen der nur im sauren Gebiet ( $p_H$  5—3) wirksamen Magenlipase von Mensch und Hund und der Gesamtheit der übrigen bis in das alkalische Gebiet hinein wirkenden Organlipasen, als deren Typ die Pankreaslipase anzusehen ist. Für die Lipase des Schweinemagens gelten diese Unterschiede nicht (Willstätter und Memmen<sup>8</sup>).

Darstellung:  
von Magenlipase

Beim Studium der Magenlipase hat man meist mit dem Magensaft nach Pawlow gearbeitet (London<sup>9</sup>), doch sind auch Glycerinextrakte der Magenschleimhaut wirksam. Man läßt die Lösung dann bei der erwähnten sauren Reaktion auf emulgierte Fette, Milchfett oder Eigelb einwirken (Volhard, Stade, P. Mayer<sup>10</sup>), Davidsohn<sup>11</sup>), Hull und Kelton<sup>12</sup>).

von Blutlipase  
von Pankreaslipase.

Bei Untersuchung von Blutlipasen benutzt man meist das Serum direkt. Zur Darstellung von wirksamen Lipaselösungen aus Pankreas ist auf die außerordentlich rasche Zerstörbarkeit in wässrigen Lösungen Rücksicht zu nehmen. Man hat daher vielfach<sup>13</sup>), nach dem Vorgang von Grützner<sup>14</sup>) die frische, zerkleinerte Drüse mit Glycerin extrahiert und den Glycerinextrakt verwendet. Um ein Trockenpräparat zu gewinnen, wird nach Willstätter und Waldschmidt-Leitz Schweinepankreas, freipräpariert und durch eine Fleischhackmaschine getrieben, mit der 24fachen Menge an Aceton verrieben und durchgeschüttelt. Nach 24stündigem Stehen wird erst mit einem Gemisch von Aceton und Äther, dann mit Äther allein gewaschen und an der Luft getrocknet. Der trockene Rückstand kann nach feiner Pulverung und Siebung

\*) Auch als Steapsin bezeichnet.

<sup>1</sup>) Volhard: Zeitschr. f. klin. Med. Bd. 42, S. 414; Bd. 43, S. 397. 1901. — Stade: Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 3, S. 291. 1903.

<sup>2</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 50, S. 394. 1906/07. — Jansen: desgl. Bd. 68, S. 400. 1906.

<sup>3</sup>) Henriot: Cpt. rend. Bd. 123, S. 753 u. 833. 1896; Bd. 124, S. 235 u. 778. 1897. — Rona u. Michaelis: Biochem. Zeitschr. Bd. 31, S. 345. 1911. — Abderhalden u. Rona: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 75, S. 30. 1911. — Abderhalden u. Lampé: desgl. Bd. 78, S. 396. 1912. — Rona u. Ebner: Biochem. Zeitschr. Bd. 39, S. 21. 1912. — Rona u. Bien: desgl. Bd. 59, S. 100. 1914; Bd. 64, S. 13. 1914.

<sup>4</sup>) Literatur bei Oppenheimer: Fermente. 4. Aufl. S. 165. Leipzig 1913. — Bach: Fermentforschung Bd. 1, S. 151. 1915. — Euler: Chemie der Enzyme. 2. Aufl. Bd. 2, S. 30. 1922.

<sup>5</sup>) Americ. Journ. of physiol. Bd. 6, S. 331. 1902.

<sup>6</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 100, S. 263. 1917. Literatur.

<sup>7</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 125, S. 132. 1923.

<sup>8</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 133, S. 247. 1924.

<sup>9</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 50, S. 125. 1906; Bd. 56, S. 545. 1908.

<sup>10</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 1, S. 81. 1906. <sup>11</sup>) Desgl. Bd. 49, S. 249. 1913.

<sup>12</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 32, S. 127. 1917.

<sup>13</sup>) Literatur bei Willstätter: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 125, S. 147. 1923.

<sup>14</sup>) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 12, S. 285. 1876.

direkt zu Lipaseversuchen dienen. Das Aceton als Trockenmittel ist nicht durch Alkohol ersetzbar, der früher vielfach benutzt wurde, da dieser das Ferment stark schädigt. Um aus diesem Trockenpräparat eine wirksame und monatelang haltbare Lipaselösung zu erhalten, wird, wieder nach Willstätter und Waldschmidt-Leitz, mit der 16fachen Menge von 87proz. Glycerin 4 Stunden bei 30° extrahiert und unter geringem Saugen durch ein doppeltes Filter, unten Koliertuch, oben Papier filtriert oder besser noch durch Zentrifugieren getrennt. Dieser noch etwas trübe Glycerinauszug enthält den größten Teil der Lipase, der Amylase und etwa die Hälfte des Trypsins des Trockenmaterials.

Um eine enzymatisch einheitliche Fermentlösung zu gewinnen, wird der Glycerinauszug mit dem 5fachen Volumen Wasser verdünnt, bei hoher Tourenzahl zentrifugiert und die klare Lösung durch Absorption und Elution gereinigt. Von den vielen ausgearbeiteten Möglichkeiten sei nur ein Beispiel angeführt, bei der 2 mal durch Aluminiumhydroxyd in schwach saurer Lösung absorbiert wird, wobei die Amylase und das Trypsin in der Mutterlauge bleiben, und dann noch 1 mal durch Kaolin, wodurch nichtenzymatische Beimengungen in Lösung bleiben. Man macht durch Zusatz von  $\frac{1}{1}$ -Essigsäure den Säuregrad der Lösung 0,01 normal, schüttelt je 3000 ccm mit einer Suspension von Tonerde in 750 Wasser (enthaltend 7 g  $Al_2O_3$ , dargestellt aus Aluminiumsulfat durch Ammoniakfällung und kurzes Aufkochen) und zentrifugiert kurz. Der Niederschlag wird 2 mal mit Glycerin von 20% gewaschen und darauf 2 mal mit 600 ccm Phosphatlösung (hergestellt durch Mischen von 57 Vol. 1proz. Diammonphosphatlösung, 3 Tl. normalem Ammoniak, 40 Tl. Glycerin von 87%) die Lipase eluiert. Zur Stabilisierung der Elution wird der Glyceringehalt auf 50% gebracht. Die Elution enthält nur noch  $3\frac{1}{2}$ % der ursprünglich vorhandenen Amylase. Zur Entfernung der Phosphorsäure verdünnt man je 1550 ccm Elution mit 2820 ccm Wasser, versetzt mit 54 ccm n-Ammonchlorid und ebensoviel n-Ammoniak und fällt unter kräftigem Umschütteln mit 116 ccm 10proz. Magnesiumacetatlösung. Eine weitere Reinigung erzielt man durch abermalige Absorption mit Tonerde, der sich eine weitere mit elektroosmotisch gereinigtem Kaolin und mit Stearin anschließt. Einzelheiten im Original. Man kann so zu Präparaten kommen, die 300 mal wirksamer sind als die ursprüngliche Drüse.

Die Eigenschaften dieser Lipaselösungen sind wesentlich verschieden von Eigenschaften. denen der älteren Präparate, die offenbar durch die Gegenwart großer Mengen von Begleitstoffen, Koabsorbentien, beeinflusst waren. Die Lipase zeigt sowohl basische wie saure Eigenschaften (Absorption durch Kaolin und durch Tonerde). Sie zeigt keinerlei chemische Reaktionen, mit deren Hilfe sie einer bestimmten Gruppe organischer Körper zuzurechnen wäre. Sie löst sich leicht und vollständig in Wasser, ist aber in Wasser sehr unbeständig, wodurch sich ältere Angaben über Unlöslichkeit in Wasser erklären. Sehr gut löst Glycerin, ebenso Glycerin-Wassermischungen. Aus diesen Mischungen ist sie durch Tonerde, Kaolin, Tristearin, Stearinsäure, Cholesterin absorbierbar. Phosphate verhindern die Absorption. Sie ist verschieden von der pflanzlichen Lipase.

Die Wirkung der Lipase ist eine Hydrolyse von Fetten und niederen Fermentwirkung. aliphatischen Monoestern (Buttersäureester). Die früher geübte Unterscheidung zwischen Lipasen und eigentlichen Esterasen erscheint wenigstens für das Tierreich unnötig (Terroine<sup>1</sup>), Abderhalden<sup>2</sup>). Unter geeigneten Bedingungen

<sup>1</sup>) Journ. de physiol. et de pathol. gén. Bd. 13, S. 857. 1911; Bd. 14, S. 58. 1912.

<sup>2</sup>) Fermentforschung Bd. 4, S. 76. 1921.

kann die Lipase auch synthetisch wirken<sup>1</sup>). Die Hydrolyse erfolgt außer bei der Magenlipase (s. oben) gut sowohl im sauren Gebiet ( $p_H$  4,7) bis zu einem alkalischen von  $p_H$  8,9. Die Wirkung ist stark beeinflusst von der Gegenwart anderer Stoffe<sup>2</sup>). Es fördern die Pankreaslipase bei alkalischer Reaktion Gallensalze, Erdalkalisalze, besonders Calciumsalze, ebenso Glycerin in hohen Konzentrationen, Seifen, Albumin. Besonders fördernd sind einzelne Kombinationen obiger Aktivatoren, so Albumin + Calciumchlorid, Albumin + glykocholsaures Natrium, Glycerin + ölsaures Calcium. Im sauren Gebiet ist keine Aktivierung durch obige Stoffe festzustellen, es hemmen Gallensäuren, Albumin und Ölsäure. Stark hemmend sind auch absorbierende Stoffe, besonders stark Cholesterin und Tristearin. Irreversible Schädigung erfolgt durch Alkohol bei längerer Einwirkung, rasch durch Glykol (Willstätter). Die Blutlipase scheint sich einzelnen schädigenden Einflüssen gegenüber, besonders gewissen Salzen und Chinin gegenüber, anders zu verhalten als die Pankreaslipase (Rona<sup>3</sup>). Ob man daraus auf die Verschiedenheit der Fermente schließen darf, ist noch an nach Willstätter gereinigten Präparaten nachzuprüfen.

**Nachweis.** 513. **Nachweis und Bestimmung von Lipase.** Der Nachweis der Lipase beruht auf dem Nachweis einer Fettspaltung durch das Freiwerden von Säuren. Man geht von einem ganz neutralen Fett aus und prüft auf das Auftreten von Säuren in der bei den quantitativen Bestimmungen geschilderten Weise. Ein sehr einfaches von R. Heidenhain angegebene Verfahren verwendet Milch, deren fein verteiltes Fett gut angegriffen wird. Es genügt dazu, Milch in einem Reagensglas mit der auf Lipase zu prüfenden Flüssigkeit zu versetzen, etwas Lackmustinktur, Sodalösung bis zur schwachen Blaufärbung und etwas Chloroform hinzuzufügen, die Mischung in 2 Reagensgläser zu verteilen, den einen Teil zum Kochen zu erhitzen und dann beide mehrere Stunden bei 40° stehen zu lassen. Bei Anwesenheit von Lipase wird infolge der Fettspaltung in dem nichtgekochten Teil Rotfärbung eintreten, während in dem gekochten Teil die blaue Farbe erhalten bleibt.

**Bestimmung:** Zur quantitativen Bestimmung sind eine ganze Reihe von Methoden<sup>4</sup>) angegeben, meistens auf maßanalytischer Messung der gebildeten Säure beruhend, daneben auch die auf der Änderung der Oberflächenspannung beruhenden sehr bequemen stalagmometrischen Methoden (Rona und Michaelis<sup>5</sup>) u. a.<sup>4</sup>).

**nach Rona und Michaelis** Die stalagmometrische Methode beruht auf der Beobachtung, daß Tributyrin trotz seiner geringen Löslichkeit in Wasser die Oberflächenspannung von Wasser stark erniedrigt und deshalb die Zahl der Tropfen, die in der Minute aus einem Stalagmometer nach Traube, einer Glasröhre mit capillarer Spitze, ausfließen, gegenüber reinem Wasser stark, teilweise über 50% erhöht ist. Andererseits sind die Spaltstücke (Glycerin und buttersaures Alkali) ebenso wie Eiweißlösungen — das ist wichtig für Versuche, bei denen als Lipaselösung Serum dient — fast ohne Einfluß auf die Oberflächenspannung. Die Tropfenzahl ist also ein

<sup>1</sup>) Kastle u. Loevenhart: *Americ. chem. journ.* Bd. 24, S. 491. 1900. — Hauriot: *Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences* Bd. 132, S. 212. 1901. — Dietz: *Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem.* Bd. 52, S. 279. 1907. — Pottevin: *Bull. de la soc. chim.* Bd. 35, S. 693. 1906. — Welter: *Zeitschr. f. angew. Chem.* Bd. 24, S. 385. 1911. — Hamsik: *Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem.* Bd. 90, S. 489. 1911.

<sup>2</sup>) Zusammenstellung älterer Literatur bei Willstätter u. Waldschmidt-Leitz: *Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem.* Bd. 125, S. 106. 1923.

<sup>3</sup>) Rona u. Mitarbeiter: *Biochem. Zeitschr.* Bd. 111, S. 111—160. 1920; Bd. 118, S. 185—232. 1921; Bd. 134, S. 108—125. 1922.

<sup>4</sup>) Zusammenstellung bei Willstätter, Waldschmidt-Leitz u. Memmen: *Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem.* Bd. 125, S. 95—97. 1923.

<sup>5</sup>) *Biochem. Zeitschr.* Bd. 31, S. 345. 1911.

direktes Maß für die in einer Lösung vorhandene Menge an ungespaltenem Tributyrin. Man aicht zunächst das zum Fermentversuch dienende Stalagmometer mit wässrigen Tributyrinlösungen von bekanntem Gehalt. Temperatur  $18^{\circ}$ . Dann versetzt man eine gesättigte Tributyrinlösung mit der Fermentlösung von variierter Konzentration, läßt eine gemessene Zeit bei  $18^{\circ}$  stehen und mißt wieder die Tropfenzahl. Aus der noch vorhandenen Menge an Tributyrin bestimmt man den Prozentsatz der Spaltung. Bedenklich ist nur, daß die Tropfenzahl nur dann einen Schluß zuläßt, wenn das angegriffene Tributyrin sofort völlig zu Glycerin und Buttersäure aufgespalten ist. Entsteht dabei auch Monobutyryl, so sind die Schlüsse hinfällig, da dieses gleichfalls die Oberflächenspannung des Wassers erniedrigt. Insofern erscheint die Messung sicherer, wenn man als zu spaltendes Substrat Monobutyryl wählt, jedoch benutzt man damit einen Stoff, der sich in seinem Bau von den eigentlichen Fetten weiter entfernt als das Tributyrin.

Der Vergleichswert dieser Methode ist gut, solange es sich um Fermente nach Willstätter. gleicher Herkunft und gleicher Beladung mit Ballaststoffen handelt; sie versagen aber, sobald Präparate von wesentlich verschiedenem Reinheitsgrad vorliegen, wegen des starken Einflusses von aktivierenden und hemmenden Stoffen auf die Lipasewirkung. Immer anwendbar sind die Methoden von Willstätter, Waldschmidt-Leitz und Memmen<sup>1)</sup>, die unter Zusatz von bestimmten Aktivatoren oder Hemmstoffen arbeiten, deren Wirkung die der zufälligen Begleitstoffe weit überwiegt. Es sei hier die Verseifung bei wechselnder Wasserstoffzahl geschildert, unter Zusatz von Calciumchlorid und Albumin als Aktivatoren. Wegen der anderen Methoden im konstant alkalischen ( $p_H$  8,9) und sauren Gebiet ( $p_H$  4,7) muß auf das Original verwiesen werden.

Als Substrat der Spaltung wird Olivenöl verwandt, das durch vorsichtiges Schütteln mit Sodalösung ganz säurefrei gewaschen ist. Zu 2,5 g Öl setzt man das Fermentmaterial, das mit Wasser auf 10 ccm gebracht ist, 2 ccm einer Pufferlösung nach Michaelis (0,66 ccm n-Ammoniaklösung + 1,34 ccm n-Ammoniumchloridlösung), dann 0,5 ccm 2proz. Calciumchloridlösung und, nach kurzem Durchschütteln, zum Schluß 0,5 ccm 3proz. Albuminlösung. Durch gleichmäßiges und kräftiges, 3 Minuten dauerndes Schütteln mit der Hand wird die anfangs träge Verseifung eingeleitet und eine rahmartige Emulsion erreicht. Man läßt jetzt 57 Minuten bei  $30^{\circ}$  stehen, spült dann mit 96proz. Alkohol in einen Erlenmeyer, so daß das Gesamtvolumen 125 ccm wird, setzt 20 ccm Äther zu, dann 12 Tropfen einer 1proz. alkoholischen Thymolphthaleinlösung und titriert mit  $\frac{n}{10}$ — $\frac{n}{1}$  alkoholischer Kalilauge auf einen deutlich blauen Farbton. Durch einen blinden Versuch erfährt man die von dem Puffer und dem Fermentmaterial verbrauchte Lauge, die man in Abzug bringt. Die Fermentmenge ist so zu bemessen, daß zwischen 10—24% des Öls gespalten wird. Als Lipaseeinheit (L.-E.) wird die Menge Lipase bezeichnet, die in 1 Stunde bei obigen Mengenverhältnissen 24% von 2,5 g Olivenöl (Verseifungszahl 185,5) spaltet. Unter Lipasewert (L.-W.) wird die Anzahl Lipaseeinheiten in 1 cg des angewandten Fermentmaterials verstanden.

#### *Diastatisches Ferment (Amylase).*

514. Dieses Ferment, welches Stärke und Glykogen spaltet, findet sich Vorkommen. regelmäßig im Pankreassaft und in der Pankreasdrüse, beim Menschen und manchen Tieren (nicht bei typischen Carnivoren) im Speichel und in den Speicheldrüsen (Ptyalin). In geringerer Menge wurde es in Harn, Blut und Lymphe,

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 125, S. 93. 1923; Bd. 129, S. 1. 1923.

Leber und Galle, Magen- und Darmschleimhaut (auch Dünndarmsaft) nachgewiesen, es scheint überhaupt in fast allen Organen und Flüssigkeiten vorzukommen<sup>1)</sup>. Das Ferment des Pankreas und Speichels sind wohl identisch<sup>2)</sup>.

**Isolierung:** Um das Ferment aus Speichel einigermaßen zu isolieren, fügt man nach aus Speichel J. Cohnheim<sup>3)</sup> zu Speichel etwas verdünnte Phosphorsäure und darauf Kalkwasser bis zur neutralen oder schwach alkalischen Reaktion. Der entstehende Niederschlag von Calciumphosphat reißt das Ferment teilweise mit und gibt es nach dem Abfiltrieren beim Auswaschen mit wenig Wasser an dieses ab. Durch Fällen mit Alkohol wird es abgeschieden und durch abermaliges Lösen in Wasser und Fällen mit Alkohol gereinigt.

aus Pankreas Zur Darstellung der Amylase aus Pankreas gingen Sherman und Schlesinger<sup>4)</sup> von käuflichem Pankreatin aus, von dem 20 g mit der 10fachen Menge an 50proz. Alkohol extrahiert wurden. Das Filtrat fällt man mit dem 7fachen Volumen einer Alkohol-Äthermischung (1 : 4), löst die ölige Fällung in wenig Wasser und fällt wieder durch Alkohol. Die ausgefallenen Flocken werden abfiltriert, dann gelöst in etwa 200 ccm 50proz. Alkohol, der 5 g Maltose enthält. Die Lösung wird, eingeschlossen in ein Kollodiumsäckchen, 3 mal je 48 Stunden gegen 2000 ccm Alkohol von 50% dialysiert. Man fällt den filtrierten Inhalt des Dialysierschlauches mit Alkohol-Äther (1 : 1). Man erhält so eine hochwirksame Amylase in einer Ausbeute von nur 5% der Gesamtamylase (Sherman, Garard und La Mer<sup>5)</sup>). Das Präparat zeigt Trypsin- und schwache Maltasewirkung.

nach Willstätter. Vorzuziehen ist wohl das Verfahren von Willstätter, Waldschmidt-Leitz und Hesse<sup>6)</sup>, das in seinen ersten Phasen identisch ist mit dem zur Darstellung der Lipase des Pankreas (§ 512). Man extrahiert zunächst die mit Aceton getrocknete Drüse (Einzelheiten S. 628) mit der 12fachen Menge Glycerin 4—8 Stunden bei 30°, wodurch man ein Extrakt erhält, das den größten Teil der Lipase, Amylase und des Trypsins der Drüse enthält. Für viele Versuche wird man dieses sehr wirksame und haltbare Extrakt ohne weitere Reinigung verwenden können. Um die Amylase in reinerer Lösung zu gewinnen, wird mit dem 5fachen Volumen Wasser verdünnt, durch Zentrifugieren geklärt und in schwach essigsaurer Lösung durch zweimaligen Zusatz von Tonerde (für 100 ccm rohen Glycerinextrakt zuerst 1,4, dann 0,7 g) die Lipase absorbiert. Dabei wandert zwar ein kleinerer Teil der Amylase mit in das Absorbat, die Hauptmenge bleibt aber, zusammen mit dem Pankreastrypsin, in der Lösung. Durch zweimaliges Schütteln mit elektroosmotisch gereinigtem Kaolin wird das Trypsin absorbiert, während die Amylase zum größeren Prozentsatz in Lösung bleibt. (Aus dem Kaolin, besonders der zweiten Absorption, läßt sich das Trypsin mit Hilfe der bei der Lipase erwähnten ammoniakalischen Phosphatlösung (S. 629) eluieren). Man erhält als Endlösung eine enzymatisch reine Amylase, aus der sich noch ein reineres Präparat durch Absorption der Amylase an Tonerde in 50proz. alkoholischer Lösung und Elution mit Phosphat erzielen ließ. Einzelheiten im Original.

<sup>1)</sup> Zusammenstellung des Vorkommens: Euler: Chemie der Enzyme. 2. Aufl. Bd. 2, S. 104 bis 110. München 1922.

<sup>2)</sup> Vgl. Hahn u. Meyer: Zeitschr. f. Biol. Bd. 76, S. 227. 1922.

<sup>3)</sup> Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. Bd. 28, S. 241. 1863.

<sup>4)</sup> Journ. of the Americ. chem. soc. Bd. 33, S. 1195. 1911; Bd. 34, S. 1104. 1912; Bd. 35, S. 1784. 1913; Bd. 37, S. 1305. 1915. — Sherman u. Neun: desgl. Bd. 41, S. 1855. 1919.

<sup>5)</sup> Journ. of the Americ. chem. soc. Bd. 42, S. 1902. 1920.

<sup>6)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 126, S. 143. 1923.

Die Pankreasamylase ist leicht löslich in Wasser und Glycerin. Sie hat, Eigenschaften. im Vergleich mit der Pankreaslipase und dem Trypsin, die am wenigsten ausgeprägten basischen und sauren Eigenschaften, ist deshalb am schwierigsten zu absorbieren und am leichtesten aus der Drüse herauszulösen. Ihre Lösung in Wasser ist bei neutraler Reaktion tagelang haltbar und kann, ohne Fermentverlust, im Vakuum konzentriert werden (Willstätter).

Die Amylase spaltet Stärke und Glykogen unter Bildung dextrinartiger Fermentwirkung. Zwischenprodukte bis zur Maltose (§ 108). Die Entstehung von etwas Isomaltose (§ 109) ist strittig. Unentschieden ist weiter, ob hierbei das Ferment direkt die Maltose aus dem Stärkemolekül ablöst, oder ob zwei Komponenten, eine amyloplastische, depolymerisierende Kraft und eine zweite saccharifizierende, anzunehmen sind. Amylase spaltet rasch gekochte Stärke, Stärkekleister, jedoch auch rohe Stärke wird langsamer angegriffen. Ein Unterschied je nach der Herkunft der Stärke besteht nicht (Sherman, Walker und Caldwell<sup>1</sup>). Die Spaltung geht nur anfänglich rasch vor sich, bis etwa zu einem Betrage von 70% der möglichen Maltosemenge, von diesem Grenzbetrage an sinkt sie rasch. Genaueres über die Kinetik der Reaktion bei Sherman und Baker<sup>2</sup>) sowie bei Willstätter, Waldschmidt-Leitz und Hesse. Die Spaltung ist ab- beeinflusst durch hängig von der Temperatur<sup>3</sup>) — meist wird bei Bruttemperatur gearbeitet — äußere Faktoren. und der (H<sup>+</sup>). Amylase wirkt gut etwa beim Neutralpunkt und im schwach sauren Gebiet, ist aber auch noch im alkalischen Gebiet wirksam, etwa von  $p_H$  6—8. Die Angaben über das Optimum variieren etwas. Für Speichelamylase wird angegeben bei Gegenwart von Acetat- oder Phosphatpuffer  $p_H$  6,1—6,2, bei Gegenwart von Chlorionen  $p_H$  6,7, von Nitraten  $p_H$  6,9 (Michaelis und Pechstein<sup>4</sup>), während Ringer und van Trigt<sup>5</sup>) sowie Hahn und Michalik<sup>6</sup>) 6,4—6,5 als optimalen  $p_H$  angeben; Pankreasamylase hat bei Gegenwart von Natriumchlorid mit Phosphatpuffer ein Optimum bei  $p_H$  6,7—7,0 (Sherman, Thomas und Baldwin<sup>7</sup>), 6,8 (Willstätter, Waldschmidt-Leitz und Hesse). Die tierische Amylase ist, im Gegensatz zur Malzamylase, nur wirksam bei Gegenwart von Salzen (Nasse<sup>8</sup>), Bierry und Giaja<sup>9</sup>), Preti<sup>10</sup>), deren Anionen wirksam sind (Wohlgemuth<sup>11</sup>). Durch Dialyse wird deshalb eine Amylase-Lösung unwirksam. Besonders wirksam sind Chlorionen, während der Einfluß der Phosphationen bei konstantem  $p_H$  noch zweifelhaft ist (Willstätter, Waldschmidt-Leitz und Hesse). Gallensaure Salze sind in ihrer Wirkung verschieden angegeben<sup>12</sup>); die Pankreasamylase wird im schwach sauren Gebiet von glykocholsaurem Natrium stark gehemmt, im schwach alkalischen etwas aktiviert (Willstätter, Waldschmidt-Leitz und Hesse). Auch Asparagin soll aktivieren, ebenso gekochter Kartoffelsaft (Sherman und Walker<sup>13</sup>). Schwermetallsalze wirken vergiftend, davon Quecksilberchlorid in reversibler Weise (Hata<sup>14</sup>).

<sup>1</sup>) Journ. of the Americ. chem. soc. Bd. 41, S. 1123. 1919.

<sup>2</sup>) Journ. of the Americ. chem. soc. Bd. 38, S. 1896. 1916.

<sup>3</sup>) Vgl. bei Ernström: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 119, S. 190. 1922.

<sup>4</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 59, S. 77. 1914.

<sup>5</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 82, S. 484. 1912.

<sup>6</sup>) Zeitschr. f. Biol. Bd. 73, S. 10. 1921.

<sup>7</sup>) Journ. of Americ. chem. soc. Bd. 41, S. 231. 1918/19.

<sup>8</sup>) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 11, S. 138. 1875.

<sup>9</sup>) Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 143, S. 300. 1906. Biochem. Zeitschr. Bd. 40, S. 357. 1912.

<sup>10</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 4, S. 1. 1907.

<sup>11</sup>) desgl. Bd. 9, S. 10. 1908.

<sup>12</sup>) Literatur bei Willstätter, a. a. O. S. 148.

<sup>13</sup>) Journ. of the Americ. chem. soc. Bd. 41, S. 1866. 1919.

<sup>14</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 17, S. 156. 1909.

**Nachweis.** 515. **Nachweis und Bestimmung der Amylasewirkung.** Um Amylasewirkung zu demonstrieren, kann man von menschlichem Speichel, von Pankreassaft oder einem Glycerinextrakt aus Pankreas ausgehen. Als Substrat nimmt man einen 1proz. Stärkekleister, den man bei Speichel etwa mit dem 10. Teil an Speichel vermischt. Man kann dann in vielen Fällen fast sofort das Auftreten von reduzierenden Spaltprodukten mit der Trommerschen Zuckerprobe nachweisen. Mit der stärker werdenden Reduktion geht eine Abnahme und schließlich völliges Verschwinden der unveränderten Stärke ungefähr parallel, zu messen durch die Blaufärbung der Stärke mit einer Jodlösung. Die Reaktion geht rascher bei Bruttotemperatur.

**Bestimmung.** Zur quantitativen Bestimmung der Amylasewirkung sind eine ganze Reihe von Methoden angegeben, deren Genauigkeitsgrad ein sehr verschiedener ist. Am genauesten sind die, die die entstehenden Polyosen durch die Vergrößerung der Reduktionskraft bestimmen, mit Hilfe einer Zuckertitration. Euler und Svanberg<sup>1)</sup> titrieren nach Bertrand (§ 653). Willstätter, Waldschmidt-Leitz und Hesse<sup>2)</sup> titrieren die Maltose mit Jod nach Willstätter und Schudel<sup>3)</sup>. Die letztere Methode wird genauer geschildert, da sie speziell für tierische Amylasen ausgearbeitet ist. Von anderen Methoden<sup>4)</sup> wird häufig benutzt eine von Wohlgemuth<sup>5)</sup> angegebene mit ihren zahlreichen Variationen, die den Moment festhält, wo durch die Jodreaktion keine unveränderte Stärke mehr nachweisbar ist. Sie gestattet nur eine ungefähre Schätzung der Größe des Abbaus, da amyloklastische und verzuckernde Wirkung durchaus nicht immer parallel zu gehen scheinen (Sherman und Schlesinger).

**Bestimmung nach Willstätter.** Nach Willstätter werden in einer zylindrischen Standflasche von 50 ccm Inhalt 25 ccm frisch bereitete 1proz. Lösung von Kahlbaumscher löslicher Stärke, 10 ccm 0,2 n-Phosphatpuffer (bestehend aus 5,1 ccm 0,2 n-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> und 4,9 ccm 0,2 n-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 2 H<sub>2</sub>O) sowie 1 ccm 0,2 n-NaCl vermischt und im Thermostaten auf 37,0° gebracht. Das Enzym fügt man unter Umschütteln hinzu, Trockenpräparate aus dem Wägegglas, von einer Enzymlösung z. B. 1,00 ccm aus der Meßpipette. Nach Ablauf von gewöhnlich 10 Minuten wird die Reaktion durch Zusatz von 2 ccm n-Salzsäure unterbrochen. Man spült das Reaktionsgemisch mit wenig Wasser in einen Erlenmeyerkolben und versetzt es mit Jod, für je 1 mg erwarteter Maltose mit 0,6 ccm 0,1 n-Lösung, sodann tropfenweise unter Umschütteln mit 0,1 n-Natronlauge. Deren Menge ist so zu bemessen, daß nach Neutralisieren der zugefügten Salzsäure und Umwandlung des sauren Pufferphosphats in sekundäres (zusammen 30 ccm) noch das 1½fache vom Volumen der Jodlösung angewandt wird. Nach 15 Minuten Stehen wird mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert und das überschüssige Jod mit 0,1 n-Thio-sulfatlösung zurücktitriert. Für den Eigenverbrauch der Stärke sowie der Enzymlösung an Jod ist ein entsprechender Betrag abzuziehen. Nach Abzug des Leerverbrauchs wird die gefundene Jodmenge nach dem Verhältnis 17,15 mg C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub> = 1 ccm <sup>n</sup>/<sub>10</sub>-Jodlösung als Maltose berechnet. Über die Berechnung des Amylasewerts aus der gefundenen Maltosemenge liegen verschiedene Vorschläge vor von Willstätter, Euler und Svanberg, Sherman, Kendall und

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 112, S. 193. 1920/21.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 126, S. 143. 1923.

<sup>3)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 51, S. 780. 1918.

<sup>4)</sup> Zusammenstellung bei Willstätter, Waldschmidt-Leitz u. Hesse: a. a. O. S. 144.

<sup>5)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 9, S. 1. 1910. Vgl. auch Wohlgemuth in Abderhaldens Handb. d. biochem. Arbeitsmeth. Bd. 6, S. 231. Berlin-Wien 1912. — Michaelis u. Pechstein: Biochem. Zeitschr. Bd. 59. S. 77. 1914.



Clark<sup>1)</sup>. Über die Umrechnung der verschiedenen Einheiten vgl. bei Euler und Svanberg<sup>2)</sup> sowie bei Willstätter<sup>3)</sup>.

*Fermente der übrigen Polysaccharide.*

516. Während die Diastase (§ 514) im Tierreich weit verbreitet ist, sind Fermente, die auf andere höhere Polysaccharide als Glykogen und Stärke eingestellt sind, nur gelegentlich, und zwar nur bei niederen Tieren gefunden worden. Die Fähigkeit, die eigentliche Cellulose fermentativ zu spalten, scheint dem Tierkörper ganz zu fehlen. Dagegen findet sich, was anfänglich nicht streng getrennt wurde, ein auf Hemicellulosen eingestelltes Ferment, eine Hemicellulase, Hemicellulase. bei gewissen Avertebraten, bei Gastropoden, Crustaceen und Insekten. Sie findet sich unter anderm im Hepato-Pankreassaft der Weinbergschnecke, *Helix pomatia* (Biedermann und Moritz<sup>4)</sup>, Bierry und Giaja<sup>5)</sup>. Durch dieses Sekret von *Helix* werden Hemicellulosen gespalten, die aus Traubenzucker aufgebaut sind, ferner Mannane und Galaktane, und zwar bis zur Monosaccharidstufe.

Gleichfalls bei *Helix* ist auch ein auf Inulin eingestelltes Ferment gefunden Inulinase. worden, das bis zur Lävulose spaltet (Bierry<sup>6)</sup>.

Schließlich ist bei Avertebraten auch ein auf das Polysaccharid des isländischen Moses, das Lichenin, eingestelltes Ferment gefunden worden Lichenase. (Jewell und Lewis<sup>7)</sup>. Es ist durch Karrer<sup>8)</sup> genauer untersucht worden.

Der Nachweis erfolgt bei all diesen Fermenten analog wie bei der Diastase Nachweis. durch Feststellung des Auftretens von reduzierenden Zuckern aus den nicht-reduzierenden Polysacchariden mit Hilfe der Trommerschen Probe, evtl. auch Isolierung in Substanz des in Lösung gegangenen Monosaccharids als solchem oder als Osazon.

*Fermente der Disaccharide.*

517. Gut studiert sind in neuerer Zeit die in der Hefe vorkommenden, Disaccharide spaltenden Fermente, die entsprechenden Fermente der Tiere dagegen in wesentlich geringerem Maße, vor allem sind noch keine weitgehend gereinigten Fermentpräparate hergestellt worden. Man hat ausschließlich mit den natürlichen Sekreten oder dem Gesamtextrakt einer Schleimhaut, einer Drüse gearbeitet. Von den Angaben über diese Fermente sind es daher nur wenige, die hier wiedergegeben werden müssen. Unter den älteren Untersuchungen ist die von E. Fischer und Niebel<sup>9)</sup> über das Vorkommen solcher Disaccharasen im Tierkörper hervorzuheben. Weitere Literatur bei H. Euler<sup>10)</sup>.

**Saccharase oder Invertin**, das Ferment, das Rohrzucker in Glucose und Saccharase Fructose zerlegt, findet sich, wie zuerst 1871 Paschutin<sup>11)</sup> und nicht, wie oft Vorkommen. angegeben, Bernard<sup>12)</sup> feststellte, vor allem in der Dünndarmschleimhaut, vielleicht auch im Dünndarmsaft des Menschen und vieler Tiere<sup>13)</sup>, es fehlt beim

<sup>1)</sup> Journ. of the Americ. chem. soc. Bd. 32, S. 1073. 1910.

<sup>2)</sup> a. a. O. S. 219. <sup>3)</sup> a. a. O. S. 157 u. 167.

<sup>4)</sup> Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 73, S. 291. 1898.

<sup>5)</sup> Cpt. rend. Bd. 148, S. 507. 1917. Biochem. Zeitschr. Bd. 40, S. 370. 1912.

<sup>6)</sup> Cpt. rend. Bd. 150, S. 116. 1910. Biochem. Zeitschr. Bd. 44, S. 402. 1912.

<sup>7)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 38, S. 161. 1918.

<sup>8)</sup> Helv. chim. acta Bd. 6, S. 800 1923; Bd. 7, S. 144. 1924.

<sup>9)</sup> Sitzungsber. d. preuß. Akad. d. Wiss. 1896, V, S. 73; Abdruck in E. Fischer: Untersuchungen über Kohlenhydrate und Fermente. Teil I, S. 868. Berlin 1909.

<sup>10)</sup> Chemie der Enzyme. II. Aufl. Bd. 2, S. 151 ff. 1922.

<sup>11)</sup> Arch. f. Anat. u. Physiol. 1871, S. 305.

<sup>12)</sup> Leç. sur le diabète S. 259. Paris 1887; zit. nach Oppenheimer: Fermente. S. 211.

<sup>13)</sup> Historische Zusammenstellung über Darmsaccharase bei v. Euler u. Svanberg: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 115, S. 57. 1921.

Rind. Im Blutplasma ist in der Norm keine Saccharase nachweisbar, sie kann jedoch bei ganz jungen Tieren darin auftreten nach Injektion von Rohrzuckerlösungen in das Blut (Weinland<sup>1</sup>), Abderhalden mit Brahm, Kapfbeger und Rathsmann, Wildermuth, Grigorescu<sup>2</sup>), Röhmann<sup>3</sup>). Ihr Auftreten im Blut hängt jedoch von vorläufig nicht übersehbaren Bedingungen ab, sie wird oft ganz vermißt<sup>4</sup>).

Fermentwirkung und ihre Beeinflussung durch äußere Faktoren.

Die Wirkung der Darmsaccharase hat ein Optimum im schwach sauren Gebiet, beim Schwein bei  $p_{\text{H}}$  4,75 liegend, beim Menschen ist das Optimum mehr in das alkalische Gebiet verschoben, es liegt bei 5—7, beim Arbeiten mit einem Phosphatpuffer. Sie wird durch Alkohol stark geschädigt (v. Euler und Svanberg<sup>5</sup>). Die Darmsaccharase ist bedeutend empfindlicher gegen Temperaturerhöhung als die Hefesaccharase (v. Euler und Myrbäck<sup>6</sup>).

Nachweis.

Der Nachweis einer eingetretenen Rohrzuckerspaltung ist mit den üblichen Methoden zu führen durch Prüfung auf das Auftreten einer Reduktion oder einer Inversion der optischen Drehung, nachdem man eine etwa 5proz. Rohrzuckerlösung mit dem Serum oder dem wässerigen oder Glycerinauszug der fraglichen Schleimhaut bei Gegenwart von Toluol bei Bruttemperatur 24 Stunden hat stehen lassen. Stärkere Spaltung beobachtet man, wenn man den fein zerschnittenen Dünndarm selber verwendet, besonders von menschlichem Darm (v. Euler und Svanberg), oder überlebende Darmschlingen benutzt (Knafl-Lenz<sup>7</sup>).

Maltase, Vorkommen.

**Maltase**, das Ferment, welches Maltose in 2 Mol. Glucose spaltet, findet sich im tierischen Organismus an vielen Stellen, meist vergesellschaftet mit der Amylase, besonders reichlich in der Dünndarmschleimhaut und im Serum, jedoch auch Speichel, Pankreas und viele andere Organe führen es in wechselnden Mengen.

Nachweis.

Zum Nachweis der Maltase stellt man sich einen wässerigen Auszug der zu prüfenden Schleimhaut, des zu prüfenden Organs her und läßt, unter Toluolzusatz, mit 5proz. Maltoselösung 24 Stunden bei Bruttemperatur stehen. Man prüft auf das Vorhandensein von Glucose mit der Phenylhydrazinprobe (S. 109) oder prüft, ob eine Erhöhung der Reduktionskraft gegenüber Kupferoxyd (nach Bertrand, § 653) oder gegenüber Jod (nach Willstätter und Schudel, S. 634) festzustellen ist. Hat man mit Serum gearbeitet, so wird vor der Ausführung der Zuckerbestimmung das Eiweiß entfernt durch kurzes Aufkochen bei schwach essigsaurer Reaktion.

Lactase, Vorkommen.

**Lactase**, das Ferment, welches Milchzucker in Glucose und Galaktose spaltet, wurde gefunden in der Dünndarmschleimhaut und dem Dünndarmsaft von neugeborenen Menschen und jungen Tieren. Bei älteren Tieren nimmt der Lactasegehalt ab, kann auch ganz verschwinden. Lactase soll auch im Darmsaft des Menschen regelmäßig vorkommen, was Hamburger und Hekma<sup>8</sup>) aber bestreiten. Sie fehlt im Blutserum, in der Schilddrüse, in den Hoden, soweit

<sup>1</sup>) Zeitschr. f. Biol. Bd. 47, S. 279. 1906.

<sup>2</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 64, S. 429. 1910; Bd. 69, S. 23. 1910; Bd. 71, S. 367. 1911; Bd. 90, S. 386 u. 419. 1914.

<sup>3</sup>) Kumagai: Biochem. Zeitschr. Bd. 57, S. 380. 1913. — Röhmann: desgl. Bd. 72, S. 26. 1915.

<sup>4</sup>) Vgl. dazu Isaak u. Adler: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 115, S. 105. 1921 — Herzfeld u. Klinger: Biochem. Zeitschr. Bd. 114, S. 27. 1921. — Knafl-Lenz: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 120, S. 110. 1922. — Abderhalden: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 121, S. 283. 1922; dort auch weitere Literatur.

<sup>5</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 115, S. 43. 1921.

<sup>6</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 115, S. 68. 1921.

<sup>7</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 119, S. 60. 1922.

<sup>8</sup>) Journ. de physiol. et de pathol. gén. Bd. 4, S. 805. 1902.

die Untersuchungen reichen. Im Pankreas saugender junger Hunde fand Weinland<sup>1)</sup> sie. Durch Fütterung erwachsener Hunde mit Milchzucker konnte er das Pankreas von neuem zur Produktion von Lactase veranlassen. Diese Beobachtung ist zwar von Bainbridge<sup>2)</sup> bestätigt worden, aber von Bierry<sup>3)</sup> und Plimmer<sup>4)</sup> wieder bestritten worden. Die Lactase wird durch Glucose in ihrer Wirksamkeit gehemmt (Stephenson<sup>5)</sup>. Eine gut wirksame Lactase findet sich im Darm von *Helix pomatia* (Bierry und Giaja<sup>6)</sup>). Dieser Saft vermag auch eine Reihe seltener vorkommender Di- und Polysaccharide zu spalten (Bierry<sup>7)</sup>).

Die Prüfung auf Lactase erfolgt analog wie die auf Maltase.

Nachweis.

#### *Arginase.*

518. Das Ferment, welches d-Arginin an der Guanidogruppe angreift und es zu Harnstoff und Ornithin (§ 182) hydrolysiert. Es wurde von Kossel und Dakin<sup>8)</sup> entdeckt. Es kommt vor allem in der Leber der Säugetiere vor, sein Vorkommen in anderen Organen ist zweifelhaft. Es fehlt in der Leber von Huhn und Taube, von Reptilien, in der Froschleber findet es sich (Edlbacher<sup>9)</sup>, Gross<sup>10)</sup>, Fuchs<sup>11)</sup>).

Die Arginasewirkung erhält man, wenn Leber mit Quarzsand fein verrieben, der Leberbrei in die 5fache Menge Wasser eingetragen und, nach 10 Minuten Stehen im Reagensglas, die überstehende feine Suspension geprüft wird. Eine reinere Lösung erhält man, wenn man sich aus Leberbrei einen Preßsaft bei 300 Atm. Druck herstellt, den Saft mit Aceton fällt, die Fällung trocknet und von dieser Fällung sich einen Wasserextrakt herstellt. Das Trockenpräparat ist mindestens einige Monate haltbar (Edlbacher).

Die Wirkung der Arginase auf Arginin erfolgt bei etwa neutraler Reaktion, bei einem  $p_H$  von 6,6. Fördernd wirken Phosphate, hemmend Erdalkalien und Ornithin (Edlbacher). Der Verlauf der Reaktion ist nicht streng monomolekular (Gross).

Fermentwirkung und ihre Beeinflussung durch äußere Faktoren.

Zur Prüfung auf Arginase gibt man die zu prüfende Lösung oder Suspension zu einer gegen Azolithmin neutralen Argininlösung, läßt unter Toluolzusatz bei Bruttemperatur, bei wirksamen Präparaten etwa 1 Tag stehen und prüft am zweckmäßigsten auf das Auftreten von Ornithin mit einer Formoltitration nach Sörensen (§ 491). Während im Arginin nur 1 Stickstoffatom, d. h. 25% des Gesamtstickstoffs, formoltitrierbar sind, sind es im Ornithin 2 Atome, d. h. 50% (Edlbacher).

#### *Phosphatasen.*

519. Phosphatasen sind hydrolysierende Fermente, die esterartige Verbindungen der Phosphorsäure mit Alkoholgruppen unter Abspaltung von Phosphorsäure zerlegen. Entsprechend den verschiedenen Gruppen von natürlich vorkommenden Phosphorverbindungen gibt es auch eine große Zahl

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. Biol. Bd. 38, S. 607. 1899; Bd. 40, S. 386. 1900.

<sup>2)</sup> Journ. of physiol. Bd. 31, S. 98. 1904.

<sup>3)</sup> Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. Bd. 58, S. 701. 1905.

<sup>4)</sup> Journ. of physiol. Bd. 34, S. 93. 1906.

<sup>5)</sup> Biochem. journ. Bd. 5, S. 250. 1912.

<sup>6)</sup> Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. Bd. 60, S. 1038. 1906.

<sup>7)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 44, S. 415—471. 1912.

<sup>8)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 41, S. 321. 1904; Bd. 42, S. 181. 1904. Münch. med. Wochenschr. 1904, S. 543.

<sup>9)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 95, S. 81. 1915; Bd. 100, S. 111. 1917.

<sup>10)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 112, S. 236. 1921.

<sup>11)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 114, S. 101. 1921.

darauf spezifisch eingestellter Fermente. Eine Zusammenstellung über ihr Vorkommen bei Plimmer<sup>1)</sup> und Tomita<sup>2)</sup>. Aus den Phosphorproteiden wie dem Casein wird zwar anscheinend durch die Proteasen selbst wenigstens ein Teil des Phosphors abgespalten, bei den Phosphatiden wie dem Lecithin dagegen wird, nachdem die Lipase die Fettsäuren abgelöst hat, die gebildete Glycerinphosphorsäure (§ 260) durch eine besondere Glycerophosphatase weiter gespalten. Die Nucleinsäuren werden durch einen als Nuclease (§ 520) bezeichneten Fermentkomplex zerlegt, in dem wahrscheinlich auch eine besondere Phosphatase anzunehmen ist, deren Abtrennung jedoch noch nicht gelungen ist. Näheres bei Nuclease. Schließlich gibt es ein besonderes Ferment oder richtiger wohl eine zusammen vorkommende Kombination von Fermenten, die Hexosephosphorsäuren, wie das Lactacidogen, in Phosphorsäure und Milchsäure zerlegt. Auch andere Kohlenhydratphosphorsäuren sind durch Phosphatasen unter Abspaltung von Phosphorsäure hydrolysierbar.

**Glycerophosphatase**, ein von Grosser und Husler<sup>3)</sup> entdecktes Ferment, welches aus optisch inaktiver, synthetischer und der aus Lecithin gebildeten l-Glycerin-Phosphorsäure Phosphorsäure abspaltet. Es findet sich besonders reichlich in dem Darm und der Niere der Katze, ist auch in der Lunge und Leber schwächer vertreten, fehlt im Pankreas, Milz, Muskel und Blut. Beim Menschen und beim Rind ist die Verteilung analog, nur die Wirkung überhaupt schwächer.

**Nachweis.** Zum Nachweis der Glycerophosphatase stellt man sich einen wässrigen Extrakt der Schleimhaut, des Organs her oder arbeitet mit einer wässrigen Suspension des Organpulvers. Man versetzt mit einer 1proz. Lösung von glycerinphosphorsaurem Natrium, läßt 24 Stunden unter Toluolzusatz bei Brutttemperatur stehen und filtriert durch etwas Kaolin. Man prüft durch Fällung mit ammoniakalischer Magnesiamischung auf Phosphorsäure. Ungespaltene Glycerinphosphorsäure bleibt im Filtrat. Durch Wägung des Magnesianiederschlags als Pyrophosphat und Bestimmung der Phosphorsäure im Filtrat nach der Veraschung nach Neumann (§ 553) hat man eine Doppelbestimmung für den Umfang der Spaltung.

**Das Ferment des Lactacidogens** (§ 259), welches dieses und die Hexosephosphorsäure aus Hefe in äquimolekulare Mengen Milchsäure und Phosphorsäure zerlegt, wurde von Embden, Griesbach und Schmitz<sup>4)</sup> im Muskel aufgefunden. Es findet sich besonders im quergestreiften Muskel verschiedener Tiere<sup>5)</sup>, jedoch auch in der glatten Muskulatur wie dem Uterus. Beim Rind ist auch ein Extrakt aus Niere und Hoden wirksam<sup>6)</sup>.

**Nachweis.** Zum Nachweis kann man meistens mit einem Preßsaft arbeiten, nur aus der Muskulatur des Karpfens war das Ferment nicht extrahierbar, es mußte mit dem Muskelbrei gearbeitet werden. Zur Darstellung des Preßsafts wird der möglichst frische Muskel mit der gleichen Gewichtsmenge an Sand rasch, aber sehr gründlich zerrieben und, nach Zusatz der halben Menge an Kieselgur, bei 400 Atm. ausgepreßt. Zum Eintreten der Spaltung läßt man einen Lactacidogen enthaltenden Saft allein, sonst unter Zusatz von Lactacidogen oder nach Harden und Jung dargestelltem hexosephosphorsauren Natrium bei 40° einige Stunden stehen. Man setzt soviel Natriumbicarbonat hinzu, daß die gesamte zu erwartende

1) Biochem. Journ. Bd 7, S. 43. 1913.      2) Biochem. Zeitschr. Bd. 131, S. 161. 1922.

3) Biochem. Zeitschr. Bd. 39, S. 1. 1912. — Forrai: desgl. Bd. 142, S. 282. 1923.

4) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 93, S. 1. 1914/15.

5) Cohn u. Meyer: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 93, S. 46. 1914/15. — Hagemann: desgl. S. 54. — Laquer: desgl. S. 60. — Cohn: desgl. S. 84.

6) Embden, Griesbach u. Laquer: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 93, S. 124. 1914/15.

Milchsäure davon sicher gebunden wird. Will man unterbrechen, so versetzt man mit dem gleichen Volumen an 2proz. Salzsäure und fällt mit 5proz. Sublimatlösung. Im Filtrat entfernt man das Quecksilber mit Schwefelwasserstoff, filtriert abermals und bestimmt nun in der Restlösung in je 100 ccm den Gehalt an anorganischer Phosphorsäure durch Fällung mit ammoniakalischer Magnesiämischung und den Gehalt an Milchsäure durch erschöpfende Ätherextraktion. Auch Mikromethoden zur Phosphorbestimmung (§ 697) sind brauchbar (Kleinmann<sup>1)</sup>, Embden<sup>2)</sup>.

**Weitere Phosphatasen**, welche die Hexosediphosphorsäure der Hefe unter Hydrolyse spalten können, sind auch sonst im Tierkörper anzunehmen, da verfütterte Hexophosphorsäure eine starke Vermehrung der anorganischen Phosphorsäure im Harn bewirkt. Nachzuweisen war sie im Glycerinauszug der Darmschleimhaut von Schwein und Kaninchen, der Niere vom Pferd (Euler<sup>3)</sup>, Plimmer<sup>4)</sup>, besonders reichlich aber in den sich verknöchernden Knorpeln junger Kaninchen und Ratten (Robison<sup>5)</sup>). Synthetische Saccharose-Phosphorsäure und Glucose-Monophosphorsäure wird gespalten durch den Organbrei von Niere, Leber, Milz, Pankreas, Gehirn und Muskulatur, wobei die angegebene Reihenfolge zugleich die Stärke des Spaltvermögens angibt (Tomita<sup>6)</sup>). Untersucht wurden die Organe von Rind, Schwein und Kaninchen. Bei Niere und Leber wurde festgestellt, daß man auch mit wässerigen Auszügen positive Reaktion erhält. Der Nachweis kann analog wie bei anderen Phosphatasen erfolgen. Andere Kohlenhydrat-phosphatasen.  
Vorkommen.  
Nachweis.

#### *Die Fermente der Nucleinsäuren<sup>7)</sup>.*

520. Nuclease hat man einen Komplex von Fermenten genannt, die sich vergesellschaftet in Bakterien und vielen tierischen Organen finden und die Nucleinsäuren (§ 271) abbauen (Ivanoff<sup>8)</sup>, Araki<sup>9)</sup>, Sachs<sup>10)</sup>, Abderhalden und Schittenhelm<sup>11)</sup>). Es entstehen dabei freie Phosphorsäure, Zucker und eine Reihe von Pyrimidin- und Purinderivaten. Während man ursprünglich ein Ferment annahm, unterscheidet man jetzt mehrere Fermente, die die Nucleinsäuren an verschiedenen Stellen angreifen können, von der Phosphorsäure-Zuckerbindung aus — Phosphonuclease — oder von der Purin-Zuckerbindung aus — Nucleosidasen (Jones<sup>12)</sup>, Amberg und Jones<sup>13)</sup>). Levene und Medigreceanu<sup>14)</sup> unterscheiden sogar drei Gruppen von Fermenten: 1. Nucleinasen, welche die komplizierteren Nucleinsäuren in einfachere aufspalten, in die sog. Mononucleotide, 2. Nucleotidasen, die diese einfacheren Nucleinsäuren unter Abspaltung von Phosphorsäure zerlegen zu Nucleosiden, 3. Nucleosidasen, welche diese Nucleoside in Zucker und Purin- und Pyrimidinderivate zerlegen. Daß man berechtigt ist, wenigstens Phosphonuclease (Nucleotidase) und Nucleosidase zu unterscheiden, geht daraus hervor, daß Bezeichnung.

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 99, S. 19. 1919.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 113, S. 138. 1921.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 79, S. 375. 1912.

<sup>4)</sup> Biochem. Journ. Bd. 7, S. 43. 1913.

<sup>5)</sup> Biochem. Journ. Bd. 17, S. 286. 1923.

<sup>6)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 131, S. 161 u. 170. 1922.

<sup>7)</sup> Ausführliche Literatur bei Feulgen: Chemie und Physiologie der Nucleinsäuren. S. 357. Berlin 1923.

<sup>8)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 39, S. 31. 1903. <sup>9)</sup> desgl. Bd. 38, S. 84. 1903.

<sup>10)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 46, S. 337. 1905.

<sup>11)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 47, S. 452. 1906.

<sup>12)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 9, S. 129 u. 169. 1911; Bd. 10, S. 81. 1911; Bd. 12, S. 31. 1912.

<sup>13)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 73, S. 407. 1911.

<sup>14)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 9, S. 65 u. 389. 1911; Bd. 13, S. 507. 1913.

die Spaltung der Nucleinsäuren je nach dem verwendeten Organextrakt in ganz verschiedenen Phasen stehen bleiben kann (s. unten). Kompliziert werden die Verhältnisse nur noch dadurch, daß auch die Purinbasen durch besondere Fermente noch weiter verändert werden können, durch die im folgenden Paragraphen zu besprechenden Purindesamidasen und -oxydasen. Es ist sogar durch Jones, Schittenhelm und Wiener<sup>1)</sup> sowie durch Thannhauser und Ottenstein<sup>2)</sup> wahrscheinlich gemacht, daß in manchen Fällen diese Desamidasen und Oxydasen zuerst die Nucleoside angreifen, die dadurch erst der fermentativen Hydrolyse in Zucker- und Purinderivate zugänglich werden. Abgesehen hiervon weiß man über die Reihenfolge, in der die verschiedenen Fermente die Nucleinsäuren angreifen, noch wenig, man hat nur die Endprodukte der kombinierten Fermentwirkung isolieren können und ist im übrigen auf die unsichere Deutung von Änderungen der physikalischen Eigenschaften des Substrats, Änderung in der Löslichkeit und der optischen Drehung angewiesen, so daß vorläufig aus praktischen Gründen der Begriff Nuclease nicht zu entbehren ist. Kompliziert werden die Verhältnisse ferner noch durch die hohe Empfindlichkeit besonders der Hefenucleinsäure gegen Alkali (Steudel<sup>3)</sup>). In keinem Falle ist es bisher gelungen, eine fermentativ einheitliche Substanz zu isolieren, die eine der obigen vermutlichen Teilprozesse allein auslöst.

**Vorkommen.** Nucleasen hat man aufgefunden im Blut und im Verdauungstraktus; und zwar im Darmsaft und der Schleimhaut besonders des Duodenums ein Ferment, das zuerst die komplizierteren Nucleinsäuren in einfachere zerlegt (Thannhauser und Dorf Müller<sup>4)</sup>), aber auch aus einfacheren Nucleinsäuren Phosphorsäure abspaltet, während die Nucleosidbindung im wesentlichen erhalten bleibt (London und Schittenhelm<sup>5)</sup>, Levene und Medigreceanu<sup>6)</sup>). Nucleasen, in denen auch Nucleosidasen mitwirken, sind dann in fast allen Organen, so in der Pankreasdrüse, der Milz, Niere, Leber, Thymusdrüse, Schilddrüse, Brustdrüse, dem Hoden, den Leukocyten aufgefunden worden. In der Wirkung können, was die Natur der als Endprodukt auftretenden Purinkörper betrifft, erhebliche Unterschiede bestehen je nach der verwendeten Organ- und Tierart (vgl. hierzu besonders Jones, Amberg und Jones, Schittenhelm im folgenden Paragraphen).

**Isolierung.** Eine nucleasehaltige Lösung erhält man, wenn man frischen Pankreasbrei mit Sand zerreibt, mit der Handpresse auspreßt, den Saft mit Wasser verdünnt und filtriert. Die Reaktion der Lösung ist dann schwach sauer. Zur Gewinnung eines Trockenpräparates wird frisches Pankreas mit Sand und Kieselerde verrieben und mit der Buchnerschen Presse ausgepreßt. Der gewonnene Saft wird mit Ammonsulfat ausgesalzen, der Niederschlag abfiltriert und mit Alkohol und Äther getrocknet.

**Nachweis.** Zum Nachweis einer Nuclease versetzt man die zu prüfende Lösung mit einer Lösung von nucleinsaurem Natrium (Guanyl-, Hefe- und Thymusnucleinsäure sind angewandt) und läßt, unter Toluolzusatz, bei Bruttemperatur stehen. Die Reaktion hält man etwa auf dem Neutralpunkt. Man hat sich damit begnügt, die abgespaltene Phosphorsäure durch Magnesiamischung zu fällen und

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 77, S. 77. 1912.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 114, S. 17. 1921.

<sup>3)</sup> Vgl. S. 385, Anm. <sup>2)</sup>.

<sup>4)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 91, S. 329. 1914; Bd. 95, S. 259. 1915; Bd. 100, S. 121. 1917.

<sup>5)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 70, S. 10. 1910.

<sup>6)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 9, S. 375. 1911.

zu bestimmen (Tschernoruzki<sup>1)</sup>, man hat die Änderung der optischen Drehung von Hefenucleinsäure verfolgt (Levene, M. Pighini<sup>2)</sup>, Neuberg<sup>3)</sup>, man hat schließlich nach den üblichen Methoden (§ 741) die abgespaltenen und die noch gebundenen erst durch Säuren abspaltbaren Purinderivate bestimmt (Jones). Da es sich bei jeder Methode um die Bestimmung einer anderen Komponente des Ferments handelt, sind die Resultate nicht übereinstimmend. Von einer genaueren Schilderung der Methoden wird daher abgesehen.

### Fermente der Purinkörper.

521. Auf die Purinbasen wirkt eine Reihe von Fermenten ein, von denen nach Schittenhelm<sup>4)</sup> eine Purindesamidase das Guanin in Xanthin und das Adenin in Hypoxanthin umwandeln, während nach Jones<sup>5)</sup> diese Wirkung 2 Fermenten, der Guanase und Adenase, zukommen soll. Ferner wird eine Xanthinoxydase, die bei Luftzutritt das Hypoxanthin zu Xanthin und das Xanthin zu Harnsäure oxydiert, angenommen. Die Versuche werden dadurch kompliziert, daß in denselben Geweben, die diese Fermente enthalten, durch andere Fermente, z. B. das uricolytische Ferment, die eben gebildete Harnsäure zerstört werden kann (Wiener<sup>6)</sup>, Schittenhelm<sup>7)</sup>, Wiechowski<sup>8)</sup>. Außer den freien Basen werden aber auch ihre Glucoside, die Nucleoside angegriffen. Guanosin, Adenosin und Xanthosin (§ 280) werden durch Desamidierung und Oxydation unter Abspaltung des Zuckerrestes gleichfalls in Xanthin und Hypoxanthin verwandelt und diese wie oben weiter verändert<sup>9)</sup>. Es scheint sogar, daß dieser letzte Weg der im Tierkörper wirklich eingeschlagene ist, da viele Organe Adenosin noch angreifen, die auf freies Adenin ohne Wirkung sind, während andererseits aus den Ergebnissen von Autolysenversuchen zu folgern ist, daß alle Organe die Purinderivate ihrer eigenen Kernsubstanz abbauen können bis zu freien Purinbasen, wie schon früher durch Horbaczewski<sup>10)</sup>, Spitzer<sup>11)</sup> und Wiener<sup>12)</sup> festgestellt wurde.

Das Vorkommen der Purindesamidasen und -oxydasen deckt sich weitgehend mit dem der Nucleosidasen (s. oben § 520). Vor allem die Nucleosid-desamidasen und -oxydasen finden sich in fast allen untersuchten Organen. Die Angaben über das Vorkommen der eigentlichen Adenase und Guanase sind nicht ganz übereinstimmend, sie fehlen, je nach der Tierart wechselnd, in einzelnen

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 75, S. 227. 1911. Biochem. Zeitschr. Bd. 44, S. 353. 1912.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 70, S. 85. 1910. Biochem. Zeitschr. Bd. 33, S. 190. 1911.

<sup>3)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 30, S. 505. 1910.

<sup>4)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 42, S. 251. 1904; Bd. 43, S. 228 u. 365. 1904/05; Bd. 45, S. 121, 152 u. 161. 1905; Bd. 46, S. 354. 1905; Bd. 48, S. 571. 1906; Bd. 50, S. 30. 1906/07; Bd. 57, S. 21. 1908; Bd. 63, S. 248. 1909; Bd. 66, S. 53. 1910; Bd. 77, S. 77. 1912. Zusammenfassung: Der Nucleinstoffwechsel usw. Jena 1910.

<sup>5)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 41, S. 101. 1904; Bd. 42, S. 35 u. 343. 1904; Bd. 44, S. 1. 1905; Bd. 44, S. 345. 1905; Bd. 48, S. 110. 1906; Bd. 60, S. 180. 1909; Bd. 61, S. 395. 1909; Bd. 73, S. 407. 1911.

<sup>6)</sup> Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 42, S. 373. 1899.

<sup>7)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 45, S. 161. 1905.

<sup>8)</sup> Hofmeisters Beiträge Bd. 9, S. 247 u. 295. 1907; Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 60, S. 185. 1909.

<sup>9)</sup> Literatur s. Jones, Levene, Schittenhelm u. Thannhauser in § 520 bei Nuclease.

<sup>10)</sup> Monatshefte f. Chem. Bd. 10, S. 624. 1889; Bd. 12, S. 221. 1891.

<sup>11)</sup> Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 76, S. 192. 1899.

<sup>12)</sup> Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 42, S. 373. 1899.

Organen. Wegen Einzelheiten vgl. man besonders die zitierten Arbeiten von Jones und Schittenhelm.

Sehr einfache Verhältnisse bietet der wässrige Auszug von Rindermilz, der sehr gut Harnsäure zu bilden, aber nicht zu zerstören vermag.

Darstellung. Zur Darstellung eines gut auf Purinbasen wirkenden Extraktes<sup>1)</sup> wird ein Teil in der Fleischhackmaschine zerkleinerte Rindermilz, der vorher die Kapsel abgezogen ist, mit 1½—2 Tl. Wasser tüchtig gerührt, etwa 12 Stunden unter Zugabe von Chloroform und Toluol stehen gelassen, koliert und nun das Kolat durch Watte und aufgeschwemmtes Filtrierpapier mit Hilfe der Saugpumpe filtriert. Zu einer abgemessenen Menge Extrakt wird z. B. Guanin in natron-alkalischer Lösung, unter Vermeidung eines Überschusses von Natronlauge, hinzugegeben. Dann wird das Gemisch im Wasserbad bei 35—37° unter Luftdurchleitung einige Stunden lang gehalten. Nun wird die Flüssigkeit durch Aufkochen bei schwach essigsaurer Reaktion entweißt und die Isolierung der Purinkörper resp. der Harnsäure nach bekannten Methoden vorgenommen (Schittenhelm).

Um ein auf Nucleoside sehr wirksames Extrakt zu erhalten, geht man nach Thannhauser und Ottenstein<sup>2)</sup> so vor, daß man menschliche Leber, der Leiche kurz nach dem Tode entnommen, fein zerkleinert, den Leberbrei mit der doppelten Menge Wasser aufschwemmt und 16 Stunden turbiniert. Man filtriert durch ein Koliertuch und benutzt das etwas trübe Filtrat. Setzt man hierzu eine wässrige Lösung eines Nucleosids, etwa Guanosin, und leitet bei 39° ¼ Stunde Luft hindurch, wobei man Chloroform und zum Vermeiden des Schäumens etwas Octylalkohol zusetzt, so ist das zugesetzte Nucleosid fast vollständig in Xanthin und Harnsäure übergegangen. Der Nachweis ist wie oben zu führen, nur daß man nach der Eiweißkoagulation noch eine kalte Fällung mit Uranylacetat zwischenschaltet. Die Purinderivate sind im Filtrat.

Um schließlich eine Lösung des urikolytischen Ferments zu erhalten, durch das Harnsäure in Allantoin übergeführt wird, gingen Wiechowski und Wiener<sup>3)</sup> so vor, daß zunächst aus Hundeleber nach dem Verfahren von Wiechowski (vgl. S. 603) ein Trockenpräparat gemacht wurde, das mit Toluol kalt extrahiert und ganz fein zerrieben wurde. Eine wässrige Aufschwemmung dieses Pulvers war gut wirksam. Man brauchte es nur mit einer schwach sodaalkalischen Lösung von Harnsäure einige Stunden bei Zimmertemperatur mit Luft zu schütteln, um in üblicher Weise Allantoin (§ 127) nachweisen zu können. Reinere Fermentlösungen erhält man durch Dialyse des Organpulvers gegen 0,05 proz. Sodalösung. Die dialysierte Emulsion filtriert man, fällt das Filtrat mit dem halben Volumen gesättigter Kaliumacetatlösung und löst die Fällung in Sodalösung.

#### *Oxydations- und Reduktionsfermente<sup>4)</sup>.*

Bezeichnung. 522. In der Bezeichnung der Fermente, die im Tier<sup>5)</sup>- und Pflanzenkörper die zahlreichen Oxydationen und Reduktionen ausführen, ist leider eine Einigung

<sup>1)</sup> Schittenhelm: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 57, S. 21. 1908.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 114, S. 20. 1921.

<sup>3)</sup> Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 9, S. 247 u. 296. 1907. Vgl. auch Galeotti: Biochem. Zeitschr. Bd. 30, S. 374. 1911.

<sup>4)</sup> Zusammenfassende Darstellung bei Wieland: Ergebn. d. Physiol. Bd. 20, S. 477. 1922 und Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 55, S. 3639. 1922 und bei Thunberg in Hammarsten: Lehrbuch d. physiol. Chem. 9. Aufl. S. 699. München-Wiesbaden 1922. Literatur bis 1912 bei Batelli u. Stern: Ergebn. d. Physiol. Bd. 12. 1912 und bei Bach: Oppenheimers Handb. d. Biochem. Erg.-Bd. 1913.

<sup>5)</sup> Vgl. Dakin: Oxydations and reductions in the animal body. 2. Aufl. London 1922.



nicht zu erzielen gewesen, da, je nach der Theorie, von der ausgegangen wurde, besondere Gruppennamen gewählt wurden. Im Einzelfall hat man die sonst für hydrolysierende Fermente übliche Nomenklatur angewandt, an das veränderte Substrat die Endung „ase“ angehängt, um auszudrücken, daß das betreffende Ferment im Endeffekt eine Oxydation der fraglichen Substanz bewirkt. Man spricht so von einer Tyrosinase, von einer Salicylase, Polyphenolase, um das Ferment zu bezeichnen, durch das Tyrosin, Salicylaldehyd, Polyphenole oxydiert werden. In anderen Fällen wählt man den Namen Oxydase, so Purin-, Oxydase. Alkohol-, Dopaoxydase. Als ältester Gruppennamen ist Oxydase im Gebrauch, der auf die Anschauung zurückführt, daß die schon in der Reaktionsgleichung zum Ausdruck kommende Sauerstoffanreicherung des betreffenden Substrats dadurch bewirkt ist, daß das Ferment den Luftsauerstoff aktiviert hat, so daß er auf die Substanz einwirken kann. Von Engler<sup>1)</sup> und Bach<sup>2)</sup> ist dann bei dieser Oxydation noch eine Zwischenreaktion angenommen worden, daß nämlich der Sauerstoff zunächst an eine nichtfermentative Substanz superoxydartig angelagert wird, an die Oxygenase in der Nomenklatur von Bach, und daß nun eine Peroxydase, das eigentliche Ferment, diesen Superoxydsauerstoff auf das Substrat überträgt. Der Name Peroxydase wird aber nun auch — und in diesem Sinne wird er allgemeiner angewandt — für ein Ferment gebraucht, das Sauerstoff aus Wasserstoffsuperoxyd auf leicht oxydable Substanzen, meist Phenole, überträgt, die dadurch in Farbstoffe übergehen. Die entgegengesetzte Wirkung hat dann die Katalase, die Wasserstoffsuperoxyd in molekularen, unwirksamen Sauerstoff und Wasser zerlegt ( $2\text{H}_2\text{O}_2 = 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ ). Neben den Oxydationsvorgängen laufen in der Zelle auch Reduktionsprozesse, die man sich zunächst durch besondere Reduktasen oder Redukasen erklärte. Als man dann darauf aufmerksam wurde, daß Oxydation und Reduktion oft nebeneinander verliefen — Beispiel die Schardingersche Reaktion (s. unten) —, sprach man von gekoppelten Reaktionen, von einer hydroklastischen Reaktion und nannte das Ferment Hydroxydase (Oppenheimer<sup>3)</sup>), wobei man annahm, daß die Verknüpfung durch Spaltung des Wassers bedingt sei, dessen Sauerstoff die Oxydation, dessen Wasserstoff die gleichzeitige Reduktion bewirken sollte. Das gleiche Ferment bezeichnet man auch als Oxydoreduktase, so noch ganz neuerdings Battelli und Stern<sup>4)</sup>. War die veränderte Substanz ein Aldehyd, der teilweise zur Säure oxydiert, zum anderen Teil zum Alkohol reduziert wurde, so sprach man auch von einer Aldehydmutase. Die einzige Theorie, die es gestattet, eine Zusammenfassung dieser ganzen hypothetischen Gruppen von Fermenten unter einem Gesichtspunkt vorzunehmen, ist die von Wieland<sup>5)</sup>, nach der die Mehrzahl der fermentativen Reduktions- und Oxydationsprozesse bewirkt sind durch Substanzen, die in der ersten Phase eine Aktivierung und Abspaltung von Wasserstoff, eine Dehydrierung, bewirken. Dieser Wasserstoff kann nun, je nach der Natur des Ferments wechselnd, auf anwesende Wasserstoffacceptoren übertragen werden, und zwar auf Luftsauerstoff — Oxydasewirkung —, er kann von Wasserstoffsuperoxyd aufgenommen werden — Peroxydasewirkung —, er kann schließlich auf andere organische Stoffe übertragen werden — Reduktase-

<sup>1)</sup> Zusammenfassung in Engler u. Weißberg: Krit. Studien über den Vorgang der Autoxydation. Braunschweig 1904.

<sup>2)</sup> Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 124, S. 951. 1897.

<sup>3)</sup> Oppenheimer: Fermente. 4. Aufl. S. 759. Leipzig 1913.

<sup>4)</sup> Arch. intern. de physiol. Bd. 18, S. 403. 1921; ref. Ber. d. ges. Physiol. Bd. 11, S. 431. 1922.

<sup>5)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 45, 1, S. 484 u. 679. 1912; Bd. 46, 3, S. 3327. 1913; Bd. 47, 2, S. 2085. 1914; Bd. 54, S. 2359. 1921.

wirkung. Wird der Wasserstoff nicht einer organischen Substanz entnommen, sondern einem Molekül Wasserstoffsperoxyd unter Übertragung auf ein zweites Molekül, so hat man Katalasewirkung. So erklärt sich einerseits ausgezeichnet das Eintreten von gekoppelten Reaktionen, andererseits auch die sonst unverständliche Tatsache, daß die Oxydationsfermente bei Gegenwart von leicht reduzierbaren Substanzen wie Methylenblau Oxydationen bei gänzlicher Abwesenheit von Sauerstoff bewirken können, wie von Wieland und von Thunberg<sup>1)</sup> gezeigt werden konnte. So erklärt sich auch der Übergang von gesättigten Verbindungen in ungesättigte: Bernsteinsäure → Fumarsäure.

**Dehydrase.** Wieland nennt das Ferment kurz Dehydrase. Thunberg spricht entsprechend dieser Anschauung von einer Dehydrogenase, so der Succinodehydrogenase, oder **Dehydrogenase.** auch von einer Hydrogenotransportase. Der Wasserstoffabspaltung vorangehend oder ihr folgend kann dann auch eine Wasseranlagerung erfolgen, wodurch dann von neuem abspaltbarer Wasserstoff in das Molekül eingeführt wird. So geht **Fumarase.** Fumarsäure durch eine in den Geweben enthaltene Fumarase in Apfelsäure über (Einbeck<sup>2)</sup>, Battelli und Stern<sup>3)</sup>. Näheres darüber bei Wieland und Thunberg.

Die Wasserstoffübertragung kann auch innerhalb eines Moleküls erfolgen. **Glyoxalase.** So geht in Berührung mit dem Gewebe durch die sog. Glyoxalase Methylglyoxal in Milchsäure über (Dakin und Dudley<sup>4)</sup>.

**Vorkommen.** Entsprechend der weitgehenden Dissimilation im Tierkörper sind die Oxydasen oder Dehydrasen im Tierkörper weit verbreitet. Man findet sie in allen Zellen und Säften. Zum Studium herausgegriffen hat man bisher nur wenige besonders augenfällige Vorkommnisse, von denen nur einige Beispiele angeführt seien.

**Dehydrase der Milch.** Auf ihrer Gegenwart in der Milch beruht die Schardingersche<sup>5)</sup> Reaktion. Ungekochte Milch, mit Methylenblau und Formaldehyd oder einem anderen Aldehyd versetzt, entfärbt bei 70° den Farbstoff sehr rasch durch Reduktion. Der dazu nötige Wasserstoff stammt aus dem Aldehyd, der zur Säure oxydiert wird. Das dabei wirksame Ferment — eine Bakterienwirkung ist ausschließbar (Trommsdorf<sup>6)</sup> — ist auch imstande, bei Abwesenheit von Luftsauerstoff Salicylaldehyd in Salicylsäure und Salicylalkohol zu gleichen Teilen umzuwandeln. Daß für diese Oxydase-, Reduktase- und Mutasewirkung ein und dasselbe Ferment verantwortlich zu machen ist, beweist Wieland. Milch vermag auch als Purinoxidase zu wirken (Morgan und Hopkins<sup>7)</sup>).

Zur Isolierung des Ferments wird Milch mit Kochsalz gesättigt, wodurch das Casein ausfällt. Das Filtrat, mit Ammonsulfat bis zur Halbsättigung versetzt, läßt einen Niederschlag ausfallen, der sich wie ein Phosphorprotein verhält und das Ferment einschließt (Aloy und Valdiguie<sup>8)</sup>).

**Blutfermente.** Im Blut hat man zunächst Katalasewirkung, und zwar fast ausschließlich an die Erythrocyten gebunden. Man braucht nur Blut mit einigen Tropfen

<sup>1)</sup> Zentralbl. f. Physiol. Bd. 31, S. 91. 1916. Skandinav. Arch. f. Physiol. Bd. 35, S. 163. 1917; Bd. 40, S. 1. 1920.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 87, S. 143. 1913; Bd. 90, S. 301. 1914.

<sup>3)</sup> Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. Bd. 84, S. 305. 1921.

<sup>4)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 14, S. 423. 1913; Bd. 15, S. 463. 1913; Bd. 16, S. 127. 1913.

<sup>5)</sup> Zeitschr. f. Untersuch. d. Nahrungs- u. Genußmittel Bd. 5, S. 22. 1902. Chemiker-Ztg. Bd. 28, S. 1113. 1908.

<sup>6)</sup> Zentralbl. f. Bakteriologie, Parasitenk. u. Infektionskrankh. Bd. 49, S. 291. 1909.

<sup>7)</sup> Proc. of the roy. soc. of London (B) Bd. 94, S. 109. 1922; ref. Ber. d. ges. Physiol. Bd. 16, S. 18. 1923.

<sup>8)</sup> Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. Bd. 85, S. 333. 1921; ref. Ber. üb. d. ges. Physiol. Bd. 9, S. 446. 1922.

Wasserstoffsperoxyd zu versetzen, um starke Sauerstoffentwicklung infolge Spaltung des Peroxyds zu beobachten. Um die Blutkatalase in reinerer Lösung zu erhalten, geht man nach Tsuchihashi<sup>1)</sup> am besten von Blutkörperchenbrei aus. Man zentrifugiert 15 ccm defibriniertes Kaninchenblut, wäscht die Blutkörperchen 3mal mit physiologischer Kochsalzlösung, hämolysiert mit 150 ccm Wasser, schüttelt in einem Scheidetrichter von 360 ccm Inhalt 10 Minuten lang mit 30 ccm Chloroform, wodurch der Blutfarbstoff ausfällt, und benutzt die überstehende wässrige, schwach gelbliche Schicht als Katalaselösung. Eine weitere Reinigung läßt sich erzielen durch Absorption an tertiäres Calciumphosphat und Elution mit sekundärem Natriumphosphat. Über die Kinetik der Katalase-Reaktion des Blutferments vgl. Senter<sup>2)</sup>, Waentig und Steche<sup>3)</sup>, Tsuchihashi. Man bestimmt die aus dem Wasserstoffsperoxyd entwickelte Sauerstoffmenge oder titriert das unveränderte Superoxyd.

Das Blut, und zwar der Blutfarbstoff, gibt auch die Peroxydase-Peroxydase.reaktion: Blaufärbung von Guajaconsäure bei Gegenwart von Wasserstoffsperoxyd oder von organischen Superoxyden wie altem Terpentinöl. Über die Ausführung vgl. Nachweis von Blut im Harn (§ 621). Oxydasen und Peroxydasen sind aber auch in den Formelementen des Bluts enthalten, so besonders in den Leukocyten. Sie scheinen sich nicht wesentlich von den Fermenten der Gewebe zu unterscheiden und werden wie diese nachgewiesen (s. unten).

**Die Fermente der Gewebe.** In den Geweben findet sich neben den zwar Gewebsfermente.sicherlich wichtigen, aber vorläufig vereinzelt dastehenden Fermenten wie der Fumarase und Methylglyoxalase (S. 644) zunächst regelmäßig eine Katalase, Katalase deren Wirkung von der der Blutkatalase nicht wesentlich abweicht. Am meisten untersucht ist die Katalase der Leber. Um sie zu reinigen, extrahiert man nach Morgulis<sup>4)</sup> feinen Leberbrei 24 Stunden mit Chloroformwasser, kühlt, fällt das Kolat mit dem gleichen Volumen Alkohol und benutzt die Fällung. Rona und Damboviceanu<sup>5)</sup> verrühren 500 g fein zerriebene Kalbsleber 2mal mit 300 ccm Alkohol von 93%, pressen scharf ab und vereinigen die beiden Extrakte. Der Preßsaft, mit Toluol gesättigt, ist, im Eisschrank aufbewahrt, monatelang brauchbar. Über die Kinetik der Reaktion der Leberkatalase mit Wasserstoffsperoxyd vgl. Sörensen<sup>6)</sup>, Michaelis und Pechstein<sup>7)</sup>, Morgulis, Rona und Damboviceanu. Nachweis wie bei Blutkatalase.

Die Oxydationen in den Geweben scheinen durch eine ganze Reihe von Fer-Purinoxidasen.menten bewirkt zu werden. Schon erwähnt wurden Purinoxidasen und das uricolytische Ferment, die in vielen Organen vorkommen. Daß man es hier mit einer Dehydrierung zu tun hat, haben Morgan und Hopkins gezeigt, die mit Methylenblau als H-Acceptor mit Organbrei glatte Oxydation von Purinbasen erreichten. Man hat im allgemeinen 2 Gruppen von Oxydasen unterschieden, solche, die sich durch Wasser dem Gewebe entziehen lassen, wozu die Purinfermente gehören, und solche, die fester an das Gewebe verankert, aber

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 140, S. 63. 1923. Dort Literatur über ältere Reinigungsversuche.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. physikal. Chem. Bd. 44, S. 257. 1903.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 72, S. 226. 1911; Bd. 76, S. 177. 1911/12; Bd. 79, S. 446. 1912.

<sup>4)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 47, S. 341. 1921.

<sup>5)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 134, S. 20. 1922. <sup>6)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 21, S. 289. 1909.

<sup>7)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 53, S. 320. 1913.

trotzdem viel labiler sind. Battelli und Stern<sup>1)</sup> unterscheiden diese letzteren als Oxydone von den löslichen Oxydasen. Die Oxydone sind offenbar nicht ganz unlöslich, sie sollen durch schwach alkalische Flüssigkeiten und auch durch energische Zertrümmerung der Zellstruktur wenigstens teilweise extrahierbar sein, sie werden aber mindestens von den Zellbestandteilen viel fester absorbiert als die lösliche Oxydase. Die Unterscheidung ist vor allem berechtigt, weil die Zellfermente, die mit dieser Reserve als die „unlöslichen“ bezeichnet werden sollen, auf ganz andere Stoffe eingestellt sind als die löslichen. Außerdem ist der Umfang der Oxydation viel größer durch die Oxydone, sie sind die Fermente der sog. Hauptatmung (Battelli und Stern).

**Lösl. Oxydasen.** Die löslichen Fermente führen Äthylalkohol über Acetaldehyd in Essigsäure über, sie oxydieren Methyl- und Propylalkohol, Glykol, Benzylalkohol, Saligenin, Salicylaldehyd, nicht Glycerin.

**Nachweis.** Ein geeignetes Material zur Gewinnung eines sehr wirksamen Extrakts ist die Pferdeleber. Zum Nachweis der löslichen Gewebsoxydasen kann man so verfahren, wie schon bei den Purinfermenten (S. 642) geschildert ist. Vielfach hat man sich auch mit gasanalytischen Methoden begnügt: man bringt das Extrakt mit der auf ihre Oxydierbarkeit zu prüfenden Substanz zusammen in ein Schüttelgefäß, in das eine gemessene Menge Sauerstoff eingeführt wird und bestimmt den Sauerstoffverbrauch. Man muß stets einen Kontrollversuch machen wegen des Sauerstoffverbrauchs des Extraktes allein.

**Unlösl. Gewebsoxydasen.** Die unlöslichen, eigentlichen Gewebsoxydasen, die neben einer Reihe anderer Forscher, vor allem von Thunberg<sup>2)</sup>, Battelli und Stern<sup>3)</sup> und Vernon<sup>4)</sup> eingehender studiert worden sind, sind durch Thunberg als Dehydrasen aufgeklärt. Sie kommen anscheinend in allen Zellen vor, an Protoplasmabestandteile verankert, und wirken auf viele organische Säuren, deren Wasserstoff sie im Sinne der Wieland'schen Theorie aktivieren, so daß er durch Luftsauerstoff in Wasser übergeführt werden kann. Angegriffen werden Bernsteinsäure — die zunächst in Fumarsäure übergeht —, Citronensäure, Äpfelsäure, Milchsäure, Oxybuttersäure, Fumarsäure — die vorher durch Wasseranlagerung in Äpfelsäure übergeht — und Glutaminsäure. Man muß mehrere derartige Fermente annehmen, da die Gewebe nicht alle diese Stoffe gleichmäßig angreifen, sondern nur eine gewisse Auswahl. Man hat auch besondere Namen geprägt, man spricht von einer Succinodehydrogenase (Thunberg) oder einem Succinoxydon (Battelli und Stern). Die Wirkung ist aber nicht auf die angeführten Substanzen beschränkt, die fraglichen Fermente können auch als Phenolasen wirken, sie können p-Phenylendiamin allein (Battelli und Stern) oder ein Gemisch von  $\alpha$ -Naphthol und p-Phenylendiamin zu Farbstoffen dehydrieren, im letzteren Falle zu einem Indophenolfarbstoff (Reagens von Röhm ann und Spitzer<sup>5)</sup>). Die Indophenolreaktion geht schon bis auf P. Ehrlich<sup>6)</sup> zurück.

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 52, S. 226. 1913.

<sup>2)</sup> Lit. S. 642, Anm. 4) und S. 644, Anm. 1).

<sup>3)</sup> L. Stern: Mechanismus der Oxydationsvorgänge. Jena 1914. — Battelli u. Stern: Biochem. Zeitschr. Bd. 52, S. 226. 1913; Bd. 67, S. 443. 1914. Arch. internat. de physiol. Bd. 18, S. 403. 1921; ref. Ber. d. ges. Physiol. Bd. 11, S. 431. 1922. Dort ältere Arbeiten von Battelli u. Stern.

<sup>4)</sup> Journ. of physiol. Bd. 42, S. 402. 1911; Bd. 43, S. 96. 1911; Bd. 44, S. 150. 1912; Bd. 45, S. 197. 1912. Biochem. Zeitschr. Bd. 47, S. 374. 1912; Bd. 51, S. 1. 1913; Bd. 60, S. 202. 1914.

<sup>5)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 28, 1, S. 567. 1895.

<sup>6)</sup> Das Sauerstoffbedürfnis des Organismus. Berlin 1885.

Zum Nachweis kann man sinngemäß die Methoden benutzen, die unten Nachweis. als quantitative Bestimmung angeführt sind. Man arbeitet entweder mit einem Organbrei oder zur Demonstration der Wirkung geeigneter mit zerkleinerter, gut ausgewaschener Muskulatur, etwa des Pferdes. Man hat beim Muskel den Vorteil, daß man die löslichen Oxydasen gut entfernen kann. Zur Konservierung hebt man den Muskel in 5proz. Borsäure auf, die man vor dem Versuch wieder gut auswaschen muß. Man untersucht dann bei neutraler Reaktion. Zugefügte Säuren werden vorher mit KOH neutralisiert (Thunberg).

Um zu zeigen, daß es sich um eine typische Dehydrierung handelt, kann man nach Thunberg so verfahren, daß man den gewaschenen, zerkleinerten Muskel mit der doppelten Menge an 0,2proz. Methylenblaulösung versetzt, und nun auf je 0,5 g 7 ccm 1proz. Lösung von bernsteinsaurem Kalium zusetzt. Man bringt in ein Schüttelgefäß, evakuiert und schüttelt dann bei 40°. Die Dehydrasewirkung wird durch die Entfärbung des Methylenblaus angezeigt. Nach Lipschitz<sup>1)</sup> ist auch Dinitrobenzol ein ausgezeichneter Wasserstoffakzeptor.

Zur quantitativen Bestimmung sind mehrere Methoden angewandt worden. Bestimmung. Zunächst hat man die Gasanalyse benutzt. Es wurde der respiratorische Gasaustausch des Gewebes studiert, wofür von Thunberg<sup>2)</sup> ein besonderes Mikrorespirometer konstruiert wurde. Wegen Einzelheiten muß auf das Original verwiesen werden. Man bestimmt darin den Sauerstoffverbrauch mit und ohne Zusatz von Bernsteinsäure usw. (Thunberg, Battelli und Stern).

Brauchbar ist auch die Bildung von Indophenolfarbstoff aus dem Reagens von Röhmann und Spitzer, was von Vernon zu einer colorimetrischen Methode ausgearbeitet wurde. 0,5 g Organbrei werden mit 5 ccm des Reagens ( $\frac{1}{150}$  m an  $\alpha$ -Naphthol und Paraphenyldiamin, 0,17% an Natriumcarbonat) versetzt und 1 Stunde in dünner Schicht bei 17° in einer Petrischale stehen gelassen. Man unterbricht durch Zusatz von 10 ccm Alkohol, der den gebildeten blauvioletten Farbstoff gleichzeitig aufnimmt. Man bestimmt den Farbstoffgehalt colorimetrisch und kann so die Oxydationskraft verschiedener Organe vergleichen (Vernon). Battelli und Stern bevorzugen p-Phenyldiamin allein, ohne Zusatz von  $\alpha$ -Naphthol.

### *Fermente der Melaninbildung*<sup>3)</sup>.

523. Dunkelfärbungen der Haut und Haare hat man schon früh auf die Melaninfermente. Wirkung von Fermenten zurückgeführt, die farblose Vorstufen durch Oxydation in dunkelgefärbte Substanzen, in Melanine (§ 308), umwandeln können. Zuerst aufgeklärt ist ein entsprechendes Ferment des Pflanzenreichs, die Tyrosinase, Tyrosinase. die das Tyrosin so zu oxydieren vermag. Besonders bei niederen Tieren, beim Tintenfisch im Tintenbeutel und bei manchen Schmetterlingen in der Hämolymphe, hat man eine Tyrosinase nachweisen können (v. Fürth u. a.<sup>3)</sup>). Es handelt sich offenbar um eine besonders bei Insekten weit verbreitete<sup>4)</sup>, nicht übermäßig spezifische Phenolase, die sich auch bei höheren Tieren und beim Menschen in den Leukocyten und im Schweiß findet. Sie ist in Wasser

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 109, S. 189. 1920; Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 191, S. 1. 1921.

<sup>2)</sup> Skand. Arch. f. Physiol. Bd. 17, S. 74. 1905. — Vgl. auch Fr. Müller in Abderhaldens Handb. der biochem. Arbeitsmeth. Bd. III, S. 664. 1910.

<sup>3)</sup> Literatur vgl. bei Melaninen S. 434 ff. und bei Bloch: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 98, S. 248—250. 1916/17.

<sup>4)</sup> Battelli und Stern: Biochem. Zeitschr. Bd. 56, S. 59. 1913.

löslich und läßt sich einfach nachweisen, indem man den wässerigen Auszug mit einer Tyrosinlösung zusammenbringt und beobachtet, ob Dunkelfärbung auftritt. Für die Dunkelfärbung der Haut und Haare der Säugetiere wird aber ein anderes unlösliches Ferment verantwortlich gemacht, das wesentlich Dopaoxydase. spezifischer ist und besonders 3-4-Dioxyphenylalanin, abgekürzt Dopa, in ein Melanin überführen kann. Bloch<sup>1)</sup>, dem wir die Aufklärung der Verhältnisse verdanken, spricht von einer Dopaoxydase. Sie läßt sich nur nachweisen, indem man überlebende Gefrierschnitte der Haut von Menschen oder Tieren mit einer 1—2proz. Lösung von Dopa 24 Stunden in Berührung läßt und mikroskopisch auf Schwarzfärbung prüft. Die Dopaoxydase ist auch bei Schmetterlingen nachgewiesen (Hasebroek<sup>2)</sup>). Die Dopaoxydase wirkt nur<sup>3)</sup> auf Dioxyphenylalanin, nicht auf Tyrosin oder Adrenalin (Bloch). Adrenalin wird aber in ein Melanin verwandelt durch Extrakte aus melanotischen Tumoren und aus den Beuteln der Tintenfische (Neuberg<sup>4)</sup>, Jaeger<sup>5)</sup>.

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 98, S. 226. 1916/17.

<sup>2)</sup> Fermentforschung Bd. 5, S. 1 u. 297. 1922; Bd 7, S. 1. 1923.

<sup>3)</sup> Vgl. aber Przibram: Arch. f. Entwicklungsmech. d. Organismen Bd. 48, S. 1. 1921; zit. nach Hasebroek.

<sup>4)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 8, S. 383. 1908. Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. Bd. 192, S. 514. 1908.

<sup>5)</sup> Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. Bd. 198, S. 62. 1909.

### Dritte Abteilung.

## Untersuchung tierischer Flüssigkeiten, Gewebe und Konkretionen.

### Untersuchung der Aschen.

#### Herstellung der Aschen.

524. Hat eine Probe bei der Prüfung auf Platinblech (S. 49) einen an-<sup>Vorprüfung.</sup>organischen Rückstand hinterlassen, so kann man sich durch Prüfung seiner Löslichkeit in Wasser, der Reaktion seiner wässerigen Lösung gegen Lackmuspapier, seines Verhaltens gegen Säure (Aufbrausen) meist bei sehr kleinen Aschenrückständen zu manchen Zwecken hinreichend orientieren, zu jeder genaueren Untersuchung ist jedoch die Anfertigung größerer Aschenquantitäten erforderlich. Die Veraschung kann in allen Fällen auf trockenem Wege (§ 525) geschehen; für manche Zwecke ist die Veraschung auf nassem Wege (§ 528) bei weitem vorzuziehen.

#### *Veraschung auf trockenem Wege.*

525. Man trocknet die Substanzen zunächst möglichst vollständig, Organe <sup>Veraschung auf trockenem Wege.</sup>nach dem Zerkleinern in dünner Schicht auf einer Glasplatte unter dem Ventilator, und bringt sie dann in eine Platinschale\*), welche mindestens das 6fache Volumen der zu veraschenden Substanz faßt. Sind große Mengen zu veraschen, so bringt man sie nach und nach in kleinen Portionen in die Schale, indem man die neue Portion erst zufügt, wenn die vorangehende verbrannt ist. Flüssigkeiten (Harn, Milch) werden gleich in der Platinschale eingedampft, der Rückstand bei etwas über 100° getrocknet. Ist die Substanz spröde, knistert und zerspringt sie beim Erhitzen (Eiweißstücke u. dgl.), so bedeckt man zunächst die Schale und erhitzt bedeckt so lange, als man das Knistern hört, dann entfernt man den Deckel. Jedenfalls ist das Erhitzen nur langsam zu steigern, um dem Wasser, gasförmigen und öligen Destillationsprodukten hinreichend Zeit zum ruhigen Entweichen zu lassen; zu stürmisches Entweichen der Gase kann Verlust an Substanz durch Fortreißen zur Folge haben und somit erheblichen Verlust an Asche\*\*). Tritt zu heftiges Aufschäumen ein, so kann man durch Umrühren und Hinabdrücken mit einem Platinspatel oder starkem Platindraht das Überschäumen meist verhindern; ist dies jedoch nicht zu fürchten, so ist es zweckmäßiger, die verkohlende Masse nicht zu berühren.

\*) Bei kleinen Mengen kann auch eine Porzellanschale dienen.

\*\*\*) Trotz der oben angegebenen Vorsichtsmaßregeln treten beim Verkohlen und Veraschen leicht Verluste an Alkalisalzen, besonders Chlorverbindungen und kohlensauren Salzen ein, wenn beim Verkohlen sich aufblähende organische Substanzen (wie Proteinstoffe) in reichlicher Menge zugegen sind. Es ist deswegen zur Anfertigung von Aschen aus Blut und anderen eiweißreichen Körpern zweckmäßig, die getrockneten und pulverisierten Substanzen mit kochendem Wasser auszulaugen und diese Extrakte gesondert von den wieder zu trocknenden, in Wasser nicht löslichen Stoffen der Veraschung in obiger Weise zu unterwerfen.

Man steigert die Temperatur allmählich und erhitzt höchstens bis zur beginnenden Rotglut und erhält bei dieser Temperatur, bis keine Dämpfe oder Nebel mehr entweichen und die Kohle fest und unbeweglich geworden ist. Nun läßt man erkalten. Die erkaltete Kohle wird mit ein wenig Wasser übergossen, unter demselben möglichst fein zerrieben, nach Zusatz von mehr Wasser zum Sieden erhitzt, durch ein aschefreies Filter filtriert und nach dem Abfließen der Flüssigkeit mit heißem Wasser genügend ausgewaschen. Schale, Filter und Kohle werden jetzt im Luftbade getrocknet, die trockenen Substanzen mit dem Filter in der Schale abermals bei schwacher Rotglut erhitzt, nach dem Erkalten wieder mit Wasser zerrieben und in der beschriebenen Weise behandelt. Das Filtrat wird mit dem ersten vereinigt. Schale, Filter und Kohle werden wieder getrocknet, allmählich bis zum heftigen Glühen erhitzt und so lange im Glühen erhalten, bis die Kohle völlig oder bis auf geringe Spuren verschwunden ist. Letzte Reste kohligter Substanz lassen sich zum Verschwinden bringen, indem man sie mit etwas Wasser befeuchtet, zerdrückt, trocknet und wieder glüht, oder indem man einige Tropfen einer gesättigten Lösung von chemisch reinem Ammoniumnitrat zufügt, trocknet und glüht. Da die Kohle stets noch Spuren löslicher Salze zurückhält, ist auch die Asche noch mit Wasser zu extrahieren. Das Filtrat wird mit den anderen vereinigt und die ganze Flüssigkeitsmenge durch Eindampfen konzentriert. Die in Wasser unlöslichen Aschebestandteile werden mit verdünnter Salzsäure erwärmt (Aufbrausen beim Übergießen mit Salzsäure zeigt Kohlensäure an, Schwefelwasserstoff gibt sich durch den Geruch zu erkennen) und wenn hierbei Eisenoxyd zurückbleiben sollte, bis zur völligen Lösung mit konzentrierter Salzsäure auf dem Wasserbade digeriert; etwaige Spuren von Kohle werden durch Filtration entfernt. Man erhält auf diese Weise einen wässerigen und einen salzsauren Auszug der Asche, deren qualitative Untersuchung in den §§ 531 und 532 beschrieben ist.

Wässeriger und  
salzsaurer Aschen-  
auszug.

Die mehrmalige Extraktion der Kohle mit Wasser vor ihrer völligen Zerstörung durch heftiges Glühen hat einerseits den Zweck, die Verflüchtigung der Alkalisalze zu vermeiden, andererseits die Reduktion von schwefelsauren Salzen oder Phosphorsäure zu hindern. Ist eine Kohle reich an Alkalisalzen, so tritt außerdem der Übelstand ein, daß dieselben in starker Hitze schmelzen, die Kohle als Schmelze überziehen und den Zutritt des Sauerstoffs zur Kohle verhindern.

Sind die zu veraschenden Quantitäten der Substanz nicht zu bedeutend, so dient zur Heizung die Bunsenflamme, die aber nur mit ihrem äußeren Mantel die Platinschale berühren darf, um Reduktionen durch den das Metall durchdringenden Wasserstoff des Leuchtgases zu vermeiden. Sicherer vermeidet man diese dadurch, daß man die Platinschale in eine Porzellanschale einstellt und diese letztere erhitzt oder durch elektrische Heizung. Größere Quantitäten verascht man zweckmäßiger in der Muffel, in welche man die Substanz in Platin- oder Porzellanschalen einschiebt.

Die bei der Verbrennung als Asche hinterbleibenden Bestandteile sind wohl im allgemeinen in den Geweben und Flüssigkeiten schon als anorganische Verbindungen oder, wie z. B. ein Teil der Phosphorsäure, der Schwefelsäure, in Verbindung mit organischen Atomkomplexen enthalten, aber das gilt doch nicht durchweg. So entsteht ein Teil der in der Asche vorhandenen Schwefelsäure erst durch Oxydation aus dem Schwefel der Proteine.

Veraschung unter  
Sodazusatz.

526. Da die tierischen Gewebe und Flüssigkeiten organisch gebundenen Phosphor und Schwefel enthalten, welche bei der Veraschung als Phosphorsäure und Schwefelsäure erscheinen, diese Säuren aber wegen Mangels an genügenden Basen sich teilweise verflüchtigen (indem sie durch den glühenden Kohlenstoff reduziert werden), auch Kohlensäure und Salzsäure aus ihren Verbindungen austreiben können, so ist es für die quantitative Bestimmung mancher Aschebestandteile, z. B. der Chloride, in den meisten Fällen nötig, die zu



veraschende Substanz mit halogenfreier Soda zu mengen oder Flüssigkeiten schon vor dem Eindampfen mit Soda zu versetzen. Bei der Veraschung des Harns ist ein Zusatz von Soda nicht erforderlich.

Was die anorganisch gebundene Schwefelsäure und Phosphorsäure betrifft, so können sie auf dem Wege der Veraschung nicht bestimmt werden, da auch die ursprünglich organisch gebundene Phosphorsäure und die aus dem Schwefel der Proteine entstehende Schwefelsäure sich hinzugesellen.

Die Trennung der an Metalle gebundenen Schwefelsäure und Phosphorsäure der Gewebe von phosphorsäure- und schwefelhaltigen organischen Verbindungen und deren Bestimmung ist z. B. von Schulze und Castoro<sup>1)</sup>, Siegfried und Singewald<sup>2)</sup>, Stutzer<sup>3)</sup>, Adler<sup>4)</sup>, Embden<sup>5)</sup> u. v. a. ausgeführt worden. Siehe dazu auch Dennstedt und Rumpf<sup>6)</sup>, welche aber nur die wasserlöslichen Sulfate und Phosphate abtrennten. Eine Trennung der anorganischen Jodverbindungen von dem organisch gebundenen Jod haben Blum und Grützner<sup>7)</sup> ausgeführt.

Methoden zur Bestimmung von Kalium, Natrium, Calcium, Magnesium, Salzsäure, Phosphorsäure im Blut und Serum ohne Veraschung nach vorangegangener Entfernung des Eiweiß sind von verschiedenen Seiten angegeben worden. Über einige dieser Verfahren wird an anderer Stelle (siehe besonders § 688 ff., ferner § 534) berichtet.

527. Statt des § 525 beschriebenen Verfahrens, das wegen des mehrfachen Extrahierens mit Wasser und Eindampfens umständlich ist, empfiehlt Stolte<sup>8)</sup>, in folgender Weise vorzugehen: Eine Platinschale von 5 cm Durchmesser mit flachem Boden wird mit der getrockneten Substanz in eine Porzellanschale von 2—4 cm größerem Durchmesser, auf deren Boden sich ein umgekehrter Deckel eines kleinen Porzellantiegels oder auch einige Tonscherben befinden, gesetzt. Die Erhitzung geschieht, wie oben angegeben, allmählich und erst mit voller Flamme eines Bunsendreibrenners oder Teklubrenners, dessen Flamme allseitig bis zum Rande der Porzellanschale in die Höhe schlägt, wenn keine Dampfentwicklung mehr erfolgt und die Kohle fest und unbeweglich geworden ist. Nach weiteren 15—30 Minuten kann zur Beschleunigung der Veraschung ein Porzellandeckel über die Platinschale gelegt und bis zur Weißfärbung der Asche erhitzt werden. Sollte, was gelegentlich der Fall ist, auch bei längerem Glühen die Asche sich nicht entfärben, so kann man mit dem Platindraht die Masse etwas verteilen, den Draht mit einem Stückchen aschefreies Filtrierpapiers abwischen und dieses mit verbrennen. Führt das nicht zum Ziel, so unterbricht man das Erhitzen, nimmt die Platinschale heraus, bringt nach dem Abkühlen 2—3 Tropfen Wasser auf die Masse, dampft bei schräggestellter Schale auf dem Wasserbade zur Trockne und glüht weiter. Die Veraschung ist meist in 1—2 Stunden nach dem Auflegen des Deckels vollendet. Stolte hat dieses Verfahren auf Muskelpulver, Blutpulver, getrockneten Kot, Harn, Milch angewendet. Für die quantitative Bestimmung mancher Aschebestandteile ist es natürlich auch bei diesem Verfahren nötig, die zu veraschende Substanz mit etwas Soda zu mischen.

Für die Untersuchung der Asche behandelt man den Rückstand mit Wasser in der Wärme, filtriert durch aschefreies Filter, wäscht mit heißem Wasser aus und löst den in Wasser unlöslichen Teil mit Salzsäure. Man erhält so auch

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 41, S. 479. 1904.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. Untersuch. d. Nahrungs- u. Genußmittel Bd. 10, S. 521. 1905.

<sup>3)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 7, S. 471. 1908. <sup>4)</sup> desgl. Bd. 70, S. 1. 1915.

<sup>5)</sup> Embden, Griesbach u. Schmitz: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 93, S. 1. 1914/15. — Embden: desgl. Bd. 113, S. 138. 1921.

<sup>6)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 41, S. 42. 1904.

<sup>7)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 85, S. 461. 1913; Bd. 92, S. 364. 1914.

<sup>8)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 35, S. 104. 1911.

hier einen wässerigen und einen salzsauren Auszug der Asche, deren Untersuchung nach den §§ 531 und 532 erfolgt. Für die quantitative Bestimmung einzelner Aschebestandteile löst man direkt in Wasser unter Zusatz von etwas Salzsäure.

*Veraschung auf nassem Wege nach A. Neumann<sup>1)</sup>.*

Veraschung auf  
nassem Wege  
nach A. Neu-  
mann.

528. Bei dieser Methode entweichen alle flüchtigen Säuren wie Salzsäure, Kohlensäure. Sie kann also nur zum Nachweis und zur Bestimmung der nichtflüchtigen Säuren\*) und der Metalle dienen. Für die quantitative Bestimmung dieser Bestandteile ist sie aber im allgemeinen der alten Methode vorzuziehen, da die Veraschung, besonders wenn es sich um größere Mengen Substanz handelt, bequemer auszuführen und ein Verlust durch Verspritzen und Fortfliegen von Substanz und durch Verflüchtigung z. B. von Alkalisalzen ausgeschlossen ist. Auch braucht das zu veraschende Material nicht getrocknet zu werden.

Prinzip. Bei diesem Verfahren werden die Stoffe nicht in gewöhnlicher Weise verascht, sondern durch ein kräftig wirkendes Oxydationsgemisch aus Salpeter- und Schwefelsäure zerstört. Die Verkohlung wird vermieden durch langsames, beständiges Zufügen dieses Oxydationsmittels.

Erforderliche Lösungen und Apparate. Als Oxydationsmittel dient ein Säuregemisch, das aus gleichen Volumteilen konzentrierter Schwefelsäure und konzentrierter Salpetersäure (spez. Gew. 1,4) besteht.

Die Operation wird vorgenommen in einem schief liegenden Rundkolben von  $\frac{1}{2}$ — $\frac{3}{4}$  l Inhalt aus Jenaer Glas, in dessen Hals das Ablaufrohr eines Hahnmeßzylinders\*\*) eben hineinragt. Das Ablaufrohr ist zweckmäßig zunächst seitlich und dann erst nach unten gebogen, damit man den Hahn regulieren kann, ohne von den ausströmenden Dämpfen belästigt zu werden. Der Hahnmeßzylinder wird von einem an einem Stativ befestigten Glas- oder Porzellanring getragen.

Vorbereitung.

529. Vorbereitung der Substanz. Man kann trockene oder feuchte Substanzen verwenden, selbst Flüssigkeiten können in den meisten Fällen ohne weiteres, in anderen nach dem Eindampfen im Rundkolben (z. B. Blut) in Arbeit genommen werden. Sollte ein Stoßen oder Schäumen eintreten, wie es bei fett- oder kohlenhydrathaltigen Stoffen (z. B. Milch) zuweilen der Fall ist, so empfiehlt es sich, vorher mit 1proz. reiner Kalilauge (z. B. 15 ccm auf 25 ccm Milch) bis zur Sirupdicke einzudampfen. Milch versetzt man auch zweckmäßig, besonders wenn es sich um größere Mengen handelt, mit dem 4. Teil konzentrierter Salpetersäure und dampft auf dem Baboblech mit starker Flamme ein.

Konzentrieren  
größerer Harn-  
mengen.

Um größere Mengen Harn<sup>2)</sup> (z. B. 500 ccm zur Eisenbestimmung § 542) für die Veraschung ohne Stoßen schnell und quantitativ zu konzentrieren, läßt man beständig kleine Mengen des mit Salpetersäure versetzten Harnes zu konzentrierter siedender Salpetersäure fließen.

Zu diesem Zwecke wird der abgemessene Harn in einem Kolben mit konzentrierter Salpetersäure ( $\frac{1}{10}$  des Harnvolumens) gemischt und durch den Hahnzylinder tropfenweise in den Rundkolben gegeben, in dem bei Beginn der Operation 30 ccm konzentrierter Salpetersäure zum Sieden erhitzt werden. Man reguliert nun das Zutropfen des Harnes so, daß bei starkem Sieden der Flüssigkeit, das man am besten durch ein Baboblech erreicht, keine zu große Volumvermehrung (höchstens bis zu etwa 100 ccm) eintritt. Kolben und Hahntrichter werden mit wenig verdünnter Salpetersäure nachgespült. Gegen den Schluß der Verdampfung wird die Flamme, wenn nötig, verkleinert. Hat man die Flüssigkeit bis auf etwa 50 ccm konzentriert, so gibt man durch den Hahntrichter gemessene Mengen Säuregemisch hinzu und verascht weiter nach der im folgenden beschriebenen Methode, mit der Maßgabe, daß man im Falle einer daran zu knüpfenden Eisenbestimmung ganz zuletzt, wenn das Veraschungsprodukt schon ganz hell und klar geworden ist, noch  $\frac{1}{2}$ — $\frac{3}{4}$  Stunden weiter erhitzt.

\*) Eine Bestimmung der Salzsäure läßt sich übrigens auch mit dieser Methode verbinden s. § 547.

\*\*) Dieser von Lockemann (Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 107, S. 211. 1919) empfohlene Zylinder soll etwa eine Höhe von 12 cm, eine lichte Weite von 2,5 cm haben. Das durch Glashahn abschließbare Ablaufrohr ist 25 cm lang, hat eine lichte Weite von 0,5 cm und läuft in eine Spitze aus.

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 37, S. 115. 1902/03; Bd. 43, S. 32. 1904/05.

<sup>2)</sup> A. Neumann: Arch. f. Anat. u. Physiol., Physiol. Abt. 1902, S. 362.

530. Ausführung der Veraschung. Die Veraschung mit dem Säuregemisch wird in einem gut ziehenden Abzuge ausgeführt. Die Substanz, welche evtl. in der oben beschriebenen Weise vorbereitet worden ist, wird in dem Rundkolben mit annähernd gemessener Menge Säuregemisch (etwa 5—10 ccm) übergossen und mit kleiner Flamme\*) erwärmt. (Sind große Mengen organischer Substanz zu zerstören, wie z. B. in sehr zuckerreichen Harnen, so läßt man nach dem Hinzufügen des Säuregemisches evtl. unter Abkühlung erst die Hauptreaktion vorübergehen, ehe man erwärmt.) Sobald die Entwicklung der braunen Nitrosodämpfe geringer wird, gibt man aus dem Hahnzylinder tropfenweise weiteres Gemisch hinzu und fährt damit fort, bis ein Nachlassen der Reaktion eintritt und die Intensität der braunen Dämpfe abgeschwächt erscheint. Um zu entscheiden, ob die Substanzerstörung beendet ist, unterbricht man das Hinzufießen des Gemisches für kurze Zeit, erhitzt aber weiter, bis die braunen Dämpfe verschwunden sind und beobachtet, ob sich die Flüssigkeit im Kolben dunkler färbt oder gar noch schwärzt. Ist dieses der Fall, so läßt man wieder Gemisch zufließen, und wiederholt nach einigen Minuten die obige Probe. Wenn nach dem Abstellen des Gemisches und dem Verjagen der braunen Dämpfe die hellgelbe oder farblose Flüssigkeit sich bei weiterem Erhitzen nicht mehr dunkler färbt und auch keine Gasentwicklung mehr zeigt, dann ist die Veraschung beendet. Ist die Flüssigkeit schwach gelb gefärbt, so wird sie beim Erkalten völlig wasserhell. Nun fügt man etwa 3 mal so viel Wasser hinzu, wie Säuregemisch verbraucht wurde, erhitzt und kocht etwa 5—10 Minuten. Dabei entweichen braune Dämpfe, welche von der Zersetzung der entstandenen Nitrosylschwefelsäure herrühren.

Die so erhaltene wasserhelle Lösung der Aschenbestandteile kann zur qualitativen und quantitativen Untersuchung auf alle Basen (mit Ausnahme von Ammoniak) und (abgesehen von den Komponenten des Gemisches) auf nichtflüchtige Säuren benutzt werden.

Unter Umständen ist für die spätere Verwendung der Aschenlösung die Benutzung von viel Säuregemisch von Nachteil, z. B. dann, wenn sich an die Veraschung eine Phosphorsäurebestimmung (§ 553) anschließen soll. In solchen Fällen gibt man nur 20 oder 10 ccm Säuregemisch hinzu und beendet die Veraschung durch langsames Zufließenlassen von konzentrierter Salpetersäure (Gressen<sup>1</sup>), E. Wörner<sup>2</sup>).

### Qualitative Untersuchung der nach § 525 oder 527 hergestellten Asche.

531. Untersuchung des wässerigen Aschenauszugs. Derselbe ist zunächst auf seine Reaktion gegen Lackmus zu prüfen. In den bei weitem meisten Fällen wird sie alkalisch gefunden und ist dann durch kohlen-saure oder phosphorsäure Alkalien bedingt.

Ist kohlen-saures Alkali zugegen, so gibt eine durch Abdampfen etwas konzentrierte Probe Aufbrausen auf Zusatz von Salzsäure, rührte dagegen die alkalische Reaktion von phosphorsäurem Alkali her, so tritt auch beim Erhitzen mit Salzsäure keine Gasentwicklung vor dem Sieden ein, dagegen erhält man die weiter unten angegebenen Reaktionen der Phosphorsäure.

Außer diesen Verbindungen können die Wasserauszüge der Aschen schwefelsäure und salzsaure Alkalien enthalten, auch schwefelsaurer Kalk kann in seltenen Fällen in tierischen Aschen gefunden werden. Man prüft gesonderte Proben der Flüssigkeit auf folgende Weise:

\*) Man führt die Veraschung mit kleiner Flamme durch. Erst am Schluß ist es zweckmäßig, die Hitze zu steigern.

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 53, S. 453. 1907.

<sup>2</sup>) Zeitschr. f. Untersuch. d. Nahrungs- u. Genußmittel Bd. 15, S. 732. 1908.

- Schwefelsäure. 1. Man säuert mit Salzsäure an und versetzt mit Chlorbarium. Ein feinpulveriger, in Salzsäure und Wasser unlöslicher Niederschlag zeigt Schwefelsäure an (§ 48).
- Salzsäure. 2. Man säuert mit Salpetersäure an und versetzt mit salpetersaurem Silber. Ein in Salpetersäure unlöslicher, in Ammoniak dagegen löslicher Niederschlag zeigt Salzsäure an (§ 45).
- Wenn bei der Verkohlung kohlen-saures Alkali zugesetzt oder dieses bereits reichlich in der verkohlten Substanz vorhanden war, kann die Kohle Cyanmetall enthalten. Der Nachweis des Cyanmetalls geschieht in der § 52, b angegebenen Weise. Um in diesem Falle auf Salzsäure zu prüfen, säuert man die Probe mit Salpetersäure gut an, erhitzt in der Abdampfschale zum Kochen und prüft dann erst mit salpetersaurem Silber.
- Phosphorsäure. 3. Man versetzt mit Chlorammoniumlösung, dann mit Ammoniak, schüttelt um und fügt tropfenweise Lösung von schwefelsaurer Magnesia hinzu. Ein entweder sofort oder allmählich beim Reiben mit einem Glasstab entstehender krystallinischer Niederschlag zeigt Phosphorsäure an. Zur Bestätigung kann man eine Probe mit Salpetersäure und Molybdänsäurelösung (Anh.) versetzen und erwärmen. Ist Phosphorsäure zugegen, so bildet sich allmählich ein gelber, feinkörniger Niederschlag (§ 49).
- Calcium. 4. Man prüft mit Ammoniak und oxalsaurem Ammoniak auf Kalk (§ 39); derselbe kann höchstens in Spuren in der wässrigen Lösung sein, wenn diese Phosphorsäure oder Kohlensäure enthält und nicht sauer reagiert.
- Kalium. 5. Eine Probe wird durch Eindampfen konzentriert, mit Alkohol versetzt und nach Zufügen eines Tropfens Salzsäure mit einigen Tropfen Platinchlorid versetzt. Ein sofort oder nach dem Reiben mit dem Glasstab entstehender gelber, krystallinischer Niederschlag zeigt Kali an. Weitere Proben s. § 37.
- Natrium. 6. Eine Probe wird durch Eindampfen konzentriert und mit einer Lösung von pyroantimonsaurem Kali versetzt. Ein in der neutralen oder schwach alkalischen Lösung sofort oder nach dem Reiben mit einem Glasstab entstehender weißer, krystallinischer Niederschlag zeigt Natron an\*) (§ 38).

Proben des Verdampfungsrückstandes können auch zur spektralanalytischen Prüfung auf Spuren von Lithion (S. 36), Kali (S. 35) und von Kalk (S. 37 nach Befeuchten des Rückstandes mit Salzsäure) benutzt werden.

- Kieselsäure. 7. Um auf evtl. vorhandene Kieselsäure zu prüfen, säuert man eine Probe mit Salzsäure an, verdampft zur Trockne und löst den Rückstand in Salzsäure. Kieselsäure bleibt ungelöst zurück (§ 50).

Hat man wenig Asche und auf alle Bestandteile zu prüfen, so kann man die durch Salzsäurezusatz auf Kohlensäure untersuchte Probe auch zu den übrigen Reaktionen außer auf Salzsäure benutzen.

**532. Untersuchung des salzsauren Aschenauszugs.** Die klare salzsaure Lösung\*\*) wird mit kohlen-säurefreiem Ammoniak stark alkalisch gemacht und verschlossen einige Zeit stehen gelassen, dann schnell filtriert und Filter sowie Flüssigkeit dabei möglichst bedeckt gehalten\*\*\*).

Calcium und  
Magnesium  
als Carbonate.

Das Filtrat†) prüft man mit Ammoniumoxalat auf Kalk (§ 39) und nach völligem Ausfällen des oxalsauren Kalks die abfiltrierte Flüssigkeit mit Natrium-

\*) Diese Probe ist natürlich nur bei einer Veraschung ohne Sodazusatz anzustellen.

\*\*) Über den Nachweis der Kieselsäure, welcher nur bei großer Aschenquantität und auch dann nur, wenn in Plattingefäßen verascht war, ausgeführt werden kann, s. § 50. Die von der Kieselsäure abfiltrierte salzsaure Lösung kann dann für die weitere Untersuchung benutzt werden.

\*\*\*) Diese Vorsichtsmaßregeln beziehen sich auf den Nachweis von nicht an Phosphorsäure gebundenem Kalk, welcher durch Ammoncarbonat gefällt werden würde.

†) Ist das Filtrat blau gefärbt, so enthält es Kupfer, man säuert dann die Flüssigkeit mit Salzsäure schwach an, fällt das Kupfer durch einen Strom Schwefelwasserstoff, filtriert, löst das Schwefelkupfer in wenig heißer Salpetersäure und prüft nach § 43. Die vom Schwefelkupfer abfiltrierte Flüssigkeit wird mit Ammoniak alkalisch gemacht und mit ihrer Untersuchung wie oben angegeben fortgefahren.

phosphat auf Magnesia (§ 40). Diese beiden alkalischen Erden waren in der Asche als Carbonate vorhanden.

Der durch Ammoniak erzeugte Niederschlag kann Calcium, Magnesium und Eisen als Phosphate und außerdem Ferrihydroxyd enthalten.

Calcium, Magnesium und Eisen als Phosphate.

Zum Nachweis der Phosphorsäure löst man einen kleinen Teil in Salpetersäure und fügt Ammoniummolybdat hinzu (§ 49).

Der durch Ammoniak hervorgerufene Niederschlag hat entweder weiße, oder gelbliche bis rötliche Farbe. Wenn er weiß oder gelblichweiß erscheint, untersucht man ihn nach 1; ist er rötlich gefärbt (wie z. B. in der Blutäsche), so enthält er mehr Eisenoxyd als die Phosphorsäure zu sättigen vermag und wird nach 2 behandelt.

1. Man erwärmt den Niederschlag mit Essigsäure. Ungelöst bleibende, gelblichweiße Flocken bestehen aus Ferriphosphat, welches man nach dem Lösen in Salzsäure mit Rhodan- oder Ferrocyankalium auf Eisen (§ 42) prüft. Das Filtrat vom Ferriphosphat wird mit Ammoniumoxalat auf Kalk geprüft, vorhandener Kalk unter Erwärmen völlig ausgefällt und das Filtrat mit Ammoniak versetzt. Ist Magnesia vorhanden, so bildet sich sogleich oder nach einiger Zeit ein krystallinischer Niederschlag.

2. Ist der durch Ammoniak erhaltene Niederschlag rötlich und sonach reich an Eisen, so löst man ihn in wenig Salzsäure, stumpft die Säure durch Natrium- oder Ammoniumcarbonat so weit ab, daß die Lösung rötlich erscheint, aber noch klar ist und sauer reagiert, fügt dann eine genügende, aber nicht zu große Quantität einer Lösung von essigsauerm Natron hinzu und erhitzt zum Sieden, entfernt dann die Flamme und läßt den Niederschlag sich absetzen. Die Flüssigkeit über dem braunen Niederschlag soll ganz farblos sein. Der Niederschlag wird dann abfiltriert und mit siedendem Wasser unter Zusatz von etwas Natrium- oder Ammoniumacetat schnell ausgewaschen. Der Niederschlag enthält alles Eisen und die ganze Phosphorsäure (Prüfung wie oben). Die abfiltrierte Flüssigkeit wird mit Ammoniak\*) und Ammoniumoxalat versetzt, ein entstandener Niederschlag von Calciumoxalat abfiltriert und das Filtrat durch Zusatz von Natriumphosphat auf Magnesia geprüft.

### Quantitative Bestimmungen einzelner Aschebestandteile\*\*).

Bei allen diesen Bestimmungen ist das Ausgangsmaterial genau abzuwägen und jede einzelne Operation nach den Regeln der quantitativen Analyse (§ 11ff.) auszuführen.

#### *Natrium und Kalium.*

533. **Kalium und Natrium.** Man benutzt entweder den nach § 525 oder 527 hergestellten wässerigen Auszug der Asche (Veraschung ohne Sodazusatz!) oder die nach A. Neumann hergestellte Aschelösung (§ 530), welche zunächst durch Abrauchen in einer Platinschale auf einem Baboblech über kleiner Flamme von dem größten Teile der Schwefelsäure zu befreien ist.

Bestimmung von Kalium und Natrium.

Die Lösung wird in einem Becherglas mit heißer Chlorbariumlösung versetzt, solange ein Niederschlag entsteht, dann Barytwasser bis zur stark alkalischen Reaktion hinzugefügt, nach dem Absitzen filtriert und der Niederschlag ausgewaschen. Das Filtrat wird heiß mit Ammoniak und kohlen-saurem Ammoniak gefällt, wieder filtriert und gewaschen, das gesammelte Filtrat in einer Platinschale zur Trockne verdunstet, der Rückstand zur vollständigen Entfernung der Ammonsalze bis zum schwachen Glühen erhitzt, in wenig Wasser

\*) Etwa vorhandenes Mangan (§ 43), welches sich durch das Auftreten eines gelblichen bis fleischroten Niederschlages auf Zusatz von Schwefelammonium zum ammoniakalisch gemachten Filtrat zu erkennen gibt, ist zunächst durch Schwefelammonium auszufällen. Man läßt nun bedeckt an einem warmen Orte stehen, filtriert bedeckt, wäscht sogleich mit schwefelammoniumhaltigem Wasser aus und prüft dann das Filtrat auf Calcium und Magnesium.

\*\*) Wegen Mikromethoden siehe § 688 ff.

aufgenommen, die Flüssigkeit nochmals\*) mit Ammoniak und Ammoniumcarbonat behandelt und filtriert. Das Filter wird ausgewaschen, das Filtrat nach Zufügen einiger Tropfen Salzsäure abermals zur Trockne verdunstet, der Rückstand schwach gegläht und gewogen. Man erfährt so die Menge von Natriumchlorid + Kaliumchlorid und verfährt weiter nach a (Bestimmung des Kaliums als Kaliumplatinchlorid) oder nach b (Bestimmung des Kaliums als Kaliumperchlorat):

a) Man löst den gewogenen Rückstand in wenig Wasser, fügt 10 proz. Platinchlorwasserstoffsäure hinzu (auf je 0,1 g des gewogenen Rückstandes etwa 3,6 ccm), dampft auf dem Wasserbad bis fast zur Trockne, gibt einige Kubikzentimeter 80 proz. Alkohol hinzu, verteilt ihn mit einem Glasstab, so daß eine feinpulverige Masse entsteht, läßt einige Stunden stehen, dekantiert mit 80 proz. Alkohol durch einen gewogenen Goochtiiegel, bis der Alkohol farblos abläuft, bringt dann auch den Niederschlag darauf und wägt nach dem Trocknen bei 100°. Aus dem Gewicht des Kaliumplatinchlorids wird das Gewicht des Chlorkaliums berechnet ( $1 \text{ g K}_2\text{PtCl}_6 = 0,307272 \text{ g KCl}$ ) und durch Subtraktion desselben von dem vorher gefundenen Gewicht der Summe der Chloralkalimetalle das Gewicht des Chlornatriums gefunden.  $1 \text{ NaCl} = 0,3934 \text{ Na}$ ;  $1 \text{ KCl} = 0,5244 \text{ K}$ .

b) Man löst den gewogenen Rückstand in einer Porzellanschale in 20 ccm heißem Wasser, fügt 30 ccm einer 20 proz. Perchlorsäure (Proanalyse-Präparat von Merck oder Kahlbaum) hinzu, verdampft unter Umrühren zum Sirup, fügt heißes Wasser hinzu, verdampft wieder unter Umrühren bis alle Salzsäure verjagt ist und schwere Dämpfe der Überchlorsäure auftreten. Jetzt wird wieder etwas heißes Wasser zugesetzt und unter häufigem Umrühren verdampft unter wiederholtem Ersatz der sich verflüchtigenden Überchlorsäure. Nach dem Erkalten versetzt man den dickflüssigen Rückstand mit etwa 20 ccm 96 proz. Alkohols, dem man etwa 4 Tropfen Überchlorsäure zugefügt hat, und rührt um, indessen mit der Vorsicht, daß der Niederschlag nicht zu feinpulverig wird. Nach Absitzen gießt man den Alkohol auf einen gewogenen Goochtiiegel, behandelt den Rückstand nochmals mit Alkohol, der nach Absitzen wieder durch den Goochtiiegel gegossen wird, vertreibt den Rest des Alkohols auf dem Wasserbad, löst den Rückstand in 10 ccm heißem Wasser, dem einige Tropfen Überchlorsäure zugefügt sind und verdampft wieder unter Umrühren, bis Dämpfe von Überchlorsäure auftreten. Jetzt bringt man den Rückstand unter Benutzung von möglichst wenig 96 proz. Alkohol mit Hilfe einer Gummifahne in den Tiegel, wäscht mit wenigen Kubikzentimetern Alkohol, trocknet bei 130° und wägt. Die Gewichtszunahme ergibt das erhaltene Kaliumchlorat. Durch Multiplikation mit 0,5381 erfährt man die entsprechende Kaliumchloridmenge und durch Subtraktion dieses Wertes von dem vorher gefundenen Gewichte der Summe der Alkalimetalle das Gewicht des Natriumchlorids.  $1 \text{ NaCl} = 0,3934 \text{ Na}$ ;  $1 \text{ KCl} = 0,5244 \text{ K}$ .

Bestimmung von Natrium in kleinen Mengen Blut oder Serum ohne Veraschung.

534. **Natrium.** Für die direkte Bestimmung in Blut und Serum ist ein wie es scheint sehr brauchbares Verfahren von Richter-Quittnier<sup>1)</sup>, das keine Veraschung erfordert, angegeben. Blut, Plasma oder Serum (5 ccm) wird ultrafiltriert (§ 7) und das Filtrat (nach Entfernung von Phosphorsäure und Calcium durch Ausfällung und Filtration, von den Ammoniumsalzen durch Glühen) mit Kaliumpyroantimoniat gefällt. Das Nähere s. in der Originalarbeit.

\*) Diese zweite Behandlung mit Ammoniak und Ammoniumcarbonat kann man unterlassen, wenn die filtrierte Flüssigkeit auf Zusatz von 1 Tropfen Ammoniumcarbonat auch nicht die geringste Trübung zeigt.

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 133, S. 420. 1922. Siehe dazu auch die Arbeit von H. Müller Helv. chim. acta Bd. 6, S. 1152. 1923, in der auf einen Druckfehler aufmerksam gemacht wird.

**535. Kalium.** Bestimmung sehr kleiner Mengen nach Hamburger<sup>1)</sup>.Bestimmung sehr  
kleiner Mengen  
von Kalium nach  
Hamburger.

Prinzip. Sie beruht auf der Volumbestimmung des durch Fällung mit Kobaltlösung und Zentrifugieren erhaltenen Kaliumnatriumkobaltnitrit  $\text{Co}(\text{NO}_2)_2 \cdot (3 \text{K}/\text{NaNO}_2) + n \text{H}_2\text{O}$ .

Man kann auf diese Weise das Kalium z. B. in 1 ccm Blut oder 5 ccm Serum bestimmen. Bei einer Lösung, die nur 0,0074 g Kalium enthält, ist die Genauigkeit 1%.

Es soll hier nur eine Übersicht der Methode gegeben werden; wegen der Einzelheiten s. die Originalarbeit, deren betreffende Seitenzahlen angegeben werden.

Erfordernisse\*). 1. Verschießbares trichterförmiges Röhrechen (Chonohämatokrit) (S. 451) mit Graduierung, in dem der Niederschlag bis zu konstantem Volumen zentrifugiert wird. Jedem Teilstrich entspricht 0,000074 g Kalium. Reinigung des Röhrechens (S. 451). 2. Verschießbare Zentrifugenröhrechen (S. 452). 3. Zentrifuge mit 3000 Umdrehungen in der Minute und für Aufnahme der unter 1 und 2 genannten Gefäße geeignet (S. 453). 4. Kobaltreagens (S. 453). Man löst 50 g krystallisiertes Kobaltnitrat in 100 ccm Wasser und fügt 25 ccm Eisessig hinzu (Lösung A). Man löst 50 g Natriumnitrit (kaliumfrei) in 100 ccm Wasser (Lösung B). Für den Gebrauch mischt man 6 Tl. A mit 10 Tl. B und läßt 5 Stunden stehen.

Ausführung (S. 447—449). Die Asche (von z. B. 1 ccm Blut oder 5 ccm Serum) wird mit 10 ccm Wasser und 0,9 ccm Salzsäure (1 : 1) im Zentrifugenröhrechen in Lösung gebracht, mit Ammoniak bis zur deutlich alkalischen Reaktion und etwa 1 ccm Magnesiamischung (Anh.) versetzt, verschlossen, 24 Stunden an einem kalten Orte stehen gelassen und zentrifugiert. Die Flüssigkeit bringt man möglichst vollständig in ein Porzellanschälchen, vermischt den Rückstand gründlich mit 3 ccm etwa 10proz. Ammoniak, zentrifugiert, bringt die Flüssigkeit wieder in die Porzellanschale und wiederholt das noch 2 mal. Der Inhalt der Schale wird dann verdampft, der Rückstand vorsichtig geglüht, bis keine Dämpfe mehr entweichen, in 4 ccm Wasser gelöst und mit Hilfe von 1 ccm Wasser in das Zentrifugenröhrechen gebracht, die Lösung mit 0,02 ccm 10proz. Essigsäure (nicht mehr!) versetzt und (S. 432) bei Zimmertemperatur unter sehr sanfter Bewegung mit 1,5 ccm Kobaltreagens\*\*) gemischt. Man läßt verschlossen bei 37° 16 Stunden lang stehen, während dessen man nach der ersten, zweiten, dritten und vierten halben Stunde ein wenig umschüttelt (S. 455). Jetzt wird zentrifugiert und dann in das trichterförmige Röhrechen überführt, zentrifugiert und abgelesen. Über diese Manipulationen s. S. 455—457. 1 Teilstrich = 0,000074 Kalium.

*Calcium und Magnesium.***A. Im Anschluß an die Veraschung auf trockenem Wege.**

**536. Calcium.** Der nach § 525 erhaltene wässerige und salzsaure Ascheauszug (oder, wenn die Veraschung nach Stolte (§ 527) geschehen ist, die salzsaure Aschelösung) werden zur Entfernung der Kieselsäure mehrmals mit verdünnter Salzsäure auf dem Wasserbad zur Trockne gebracht, der Rückstand bei 110—120° getrocknet und mit verdünnter Salzsäure in der Wärme behandelt, die Lösung von der ungelöst bleibenden Kieselsäure abfiltriert. Das Filtrat wird zur Entfernung der Phosphorsäure und des Eisens in einem Becherglas mit Ammoniak bis zur ganz schwach sauren Reaktion versetzt und nach Zufügen von Ferrichlorid und Ammonacetat zum Sieden erhitzt, der rotbraune Niederschlag von basisch-phosphorsaurem und basisch-essigsäurem Eisen nach dem Absitzen schnell abfiltriert und mit heißem Wasser, dem einige Tropfen Ammonacetat zugesetzt sind, gewaschen.

Bestimmung von  
Calcium.

\*) Apparatur zu beziehen von J. J. Boom, Mechaniker am physiol. Institut Groningen.

\*\*) Diese vermögen 0,02 g Kalium zu fällen. Ist mehr Kalium vorhanden, so ist mit einer verdünnten Lösung zu arbeiten. Jedenfalls muß das Verhältnis der zu untersuchenden Flüssigkeit zum Reagens wie 5 : 1,5 sein.

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 71, S. 415. 1915; Bd. 74, S. 414. 1916. Hier Berichtigung.

Da dieser Niederschlag noch Calcium einschließen kann, ist es zweckmäßig, ihn mit heißer Salzsäure vom Filter weg in das benutzte Becherglas zurückzubringen, mit Wasser zu verdünnen, mit Ammoniak zu neutralisieren, mit Essigsäure schwach anzusäuern und nach Zusatz von Ammonacetat aufzukochen, nach Absitzen zu filtrieren und auszuwaschen.

Die vereinigten Filtrate werden etwas eingeengt, mit Ammoniak schwach alkalisch gemacht und heiß mit heißem Ammonoxalat im Überschuß gefällt, der Niederschlag auf dem Wasserbad sich absetzen lassen.

a) Bestimmung als Calciumoxalat. Der Niederschlag wird durch gewogenen Goochtiiegel filtriert, 3—4 mal mit wenig heißem Wasser nachgewaschen, wobei jedesmal gut abgesaugt wird, bei 100—105° (nicht höher) bis zum konstanten Gewicht getrocknet. Die Gewichtszunahme ( $C_2O_4Ca + H_2O$ ) ergibt mit 0,3838 multipliziert die entsprechende Menge CaO und mit 0,2743 multipliziert die entsprechende Menge Ca.

b) Titrimetrische Bestimmung mit Permanganat. Man dekantiert durch ein kleines Filter, indem man so wenig wie möglich von dem Niederschlag auf das Filter bringt, und wäscht den Niederschlag wiederholt mit ammoniakhaltigem Wasser unter Dekantieren so lange aus, bis eine Probe des Filtrats nach dem Ansäuern mit Schwefelsäure und Erwärmen einen Tropfen der zur Titration dienenden Permanganatlösung nicht mehr entfärbt (völlige Entfernung der Oxalsäure). Nun spült man den Niederschlag vom Filter in den Kolben zu der Hauptmenge zurück, fügt Schwefelsäure hinzu, erwärmt, bis gerade Blasen springen, und titriert je nach der Kalkmenge mit  $\frac{n}{10}$ - oder  $\frac{n}{100}$ -Permanganatlösung\*), deren Gehalt jedesmal durch Titration mit einer  $\frac{n}{10}$ - oder  $\frac{n}{100}$ -Oxalsäure ermittelt worden ist (§ 19). Es empfiehlt sich, bei der Titration etwa die gleiche Flüssigkeitsmenge zu benutzen wie bei der Titerstellung. Die zur Oxydation von 10 ccm  $\frac{n}{10}$ -Oxalsäure nötigen Kubikzentimeter Kaliumpermanganat entsprechen 0,020035 g Ca.

Alkalimetrische  
Bestimmung sehr  
kleiner Mengen  
von Calcium nach  
Jansen.

537. Calcium. Bestimmung sehr kleiner Mengen Calcium (bis zu 0,62 mg CaO) durch Alkalimetrie nach Jansen<sup>1)</sup>.

Die in einer Platinschale hergestellte Asche von z. B. 10—12 ccm Blut, nicht unter 10 g Organ<sup>2)</sup> wird mit verdünnter Salzsäure (1 : 1) aufgenommen, die Lösung im Becherglas auf dem Wasserbad bis auf etwa 5 ccm eingedampft und mit Ammoniak bis zur schwach sauren Reaktion versetzt (ein etwa entstehender Niederschlag wird durch etwas Salzsäure wieder in Lösung gebracht). Zu der also schwach sauren Lösung setzt man 3—4 ccm einer 5 proz. Ferrichloridlösung und 3—5 ccm einer 50 proz. Ammonacetatlösung, kocht kurz auf, filtriert den Eisenphosphatniederschlag heiß durch ein aschefreies 9-cm-Filter in ein Becherglas von 100 ccm und wäscht mit ammonacetathaltigem Wasser gründlich aus. Das Filtrat wird mit Ammoniak im Überschuß versetzt und auf etwa 10 ccm eingedampft. Sollte sich hierbei noch Ferriphosphat abscheiden, so muß abfiltriert und gewaschen werden.

Um den Eisenphosphatniederschlag auf etwa in ihm enthaltenes Calcium zu grüßen, löst man ihn in Salzsäure, fügt überschüssiges Ammoniak hinzu und löst die entstandene rotbraune Fällung in konzentrierter Oxalsäure. Ist die grünlichgelbe, opaleszierende Lösung nicht völlig klar und blank, so ist Calcium zugegen und die Analyse zu verwerfen.

Das eingeengte Filtrat bringt man in eine Krystallisierschale von 50 ccm, fügt 10 ccm 10 proz. Salmiaklösung und Ammoniak hinzu, läßt letzteres auf

\*) Die Titration mit  $\frac{n}{100}$ -Permanganat ist wegen der Unsicherheit im Erkennen des Farbenschlages nicht sehr scharf. Bei kleinen Kalkmengen empfiehlt sich deswegen die alkalimetrische Bestimmung (s. § 537).

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 101, S. 176. 1918.

<sup>2)</sup> Heubner u. Rona: Biochem. Zeitschr. Bd. 135, S. 248. 1923.



dem Wasserbad bis zur Neutralisation der Lösung verdampfen und gibt zur heißen Lösung 20 ccm kochende, kalt gesättigte Ammonoxalatlösung, läßt 4—6 Stunden in der Hitze stehen, filtriert durch ein aschefreies 7-cm-Filter und wäscht mit ammonoxalathaltigem Wasser aus.

Man verbrennt das Filter mit Niederschlag feucht im Platintiegel, glüht im Gebläse, bringt das schneeweiße Pulver von CaO in ein Becherglas, in dem sich 15—30 ccm  $\frac{n}{100}$ -Salzsäure befinden, läßt 1—2 Stunden auf dem Wasserbad stehen bis der Kalk gelöst ist und titriert mit  $\frac{n}{100}$ -Natronlauge. Beide  $\frac{n}{100}$ -Lösungen enthalten auf je 500 ccm 5 Tropfen alkalisch gesättigte Methylrotlösung. Der Farbenumschlag erfolgt von Rot in Gelb. 1 ccm  $\frac{n}{100}$ -Salzsäure = 0,28 mg CaO = 0,20 mg Ca.

538. **Magnesium.** Das Filtrat der Kalkfällung (§ 536) wird hinreichend eingeeengt\*), mit Ammoniak stark übersättigt und unter Umrühren, ohne die Glaswandung zu berühren, durch tropfenweisen Zusatz von Natriumphosphatlösung ausgefällt. Nach 12stündigem Stehen filtriert man das Magnesiumammoniumphosphat durch einen Goochtiegel, wäscht mit 2,5proz. Ammoniak aus, befeuchtet nach dem Absaugen mit einigen Tropfen konzentrierter Ammoniumnitratlösung, trocknet im Trockenschrank und erhitzt den in einen Schutztiegel gestellten Goochtiegel zuerst vorsichtig, dann stark bis zum konstanten Gewicht. Die gefundene Menge Magnesiumpyrophosphat ( $Mg_2P_2O_7$ ) ergibt mit 0,3622 multipliziert die entsprechende Menge MgO und mit 0,2185 multipliziert die entsprechende Menge Mg.

Bestimmung von  
Magnesium.

#### B. Im Anschluß an die Veraschung nach Neumann (§ 528ff).

539. **Calcium** nach Aron<sup>1)</sup> und v. d. Heide<sup>2)</sup>. Die Lösung wird nach dem Erkalten vorsichtig mit Wasser verdünnt, in ein großes Becherglas gegossen, der Kolben\*\*) mit Wasser nachgespült, die Flüssigkeit im Kochen erhalten, bis keine Stickoxyddämpfe mehr entweichen, nach dem Abkühlen mit dem 4- bis 5fachen Volumen Alkohol versetzt und auf dem Wasserbad erwärmt, bis sich der Niederschlag flockig abgesetzt hat. Nach 4—5stündigem Stehen sammelt man den Niederschlag in einem Goochtiegel und wäscht 2mal mit 70proz. Alkohol aus. Nun setzt man den Tiegel mittels Vorstoßes auf eine kleine Saugflasche, behandelt den Niederschlag mit heißer konzentrierter Salzsäure und wäscht das Ungelöste (Kieselsäure) mit Wasser gründlich aus. Scheidet sich in dem Waschwasser nochmals Kieselsäure ab, so muß wieder filtriert werden. Die salzsaure Lösung wird nun in ein hohes Becherglas überführt, nach Zusatz einiger Tropfen Methylorange mit Ammoniak neutralisiert, nach Ansäuern mit Essigsäure mit höchstens 2—3 Tropfen 10proz. Eisenchloridlösung und etwas Ammonacetatlösung versetzt und aufgeköcht. Man filtriert ab, wäscht mit ammonacetathaltigem Wasser aus, macht das Filtrat ammoniakalisch, fällt in der Hitze mit heißer Ammonoxalatlösung und läßt den Niederschlag auf dem Wasserbad sich absetzen. Man verfährt nun weiter gravi- oder titrimetrisch, wie § 536 beschrieben.

Bestimmung von  
Calcium.

\*) Ist es stark ammonsalzhaltig, so verdampft man es zunächst zur Trockne und entfernt die Hauptmenge der Ammonsalze durch schwaches Glühen, löst den Rückstand in wenig verdünnter Salzsäure und verfährt weiter wie oben beschrieben.

\*\*) Etwa am Kjeldahlkolben festhaftendes Calciumsulfat wird durch  $\frac{1}{2}$ stündiges Kochen mit 10proz. Sodalösung in Calciumcarbonat übergeführt, dieses mit Essigsäure gelöst und die Lösung nach Entfernung der Kohlensäure durch Kochen der Hauptlösung vor der Fällung mit Eisenchlorid zugefügt (Gutman<sup>3)</sup>).

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 4, S. 268. 1907.

<sup>2)</sup> desgl. Bd. 65, S. 377. 1914.

<sup>3)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 58, S. 470. 1914.

C. Alkalimetrische Bestimmung nach Willstätter und Waldschmidt-Leitz<sup>1)</sup>.

Alkalimetrische Bestimmung von Calcium und Magnesium nach Willstätter.

540. Sie erfordert neutrale Reaktion der Lösung\*).

Prinzip. Sie beruht auf der Schwerlöslichkeit des Magnesiumhydroxyds in Alkohol (in dem Calciumhydroxyd in genügendem Maße löslich ist) und in Aceton, sowie der Schwerlöslichkeit des Calciumhydroxyds in Aceton.

Erforderliche Lösungen.  $n/_{10}$  und n-Lauge und  $n/_{10}$  und n-Salzsäure und Thymolphthalein\*\*) in 0,5proz. alkoholischer Lösung.

Ausführung. a) Bestimmung von Calcium + Magnesium. Man fällt die wässrige Lösung der Salze unter Umschütteln mit  $n/_{10}$  n-Lauge, die man tropfenweise und im Überschuß zufügt und setzt nun so viel neutral reagierendes Aceton hinzu, daß der Acetongehalt 90% beträgt. Nach 15 Minuten wird nach Zusatz von Thymolphthaleinlösung (10 Tropfen auf 200 ccm) bis zum dauernden Verschwinden der Blaufärbung unter ständigem Umschütteln zurücktitriert. Gegen Ende der Titration verschwindet die Farbe auf Säurezusatz vorübergehend, kehrt aber beim Umschütteln wieder zurück, indem etwas ausgefälltes Alkali in Reaktion tritt. Der im Aceton klumpig gewordene Niederschlag nimmt wieder seine feinpulverige Beschaffenheit an.

Berechnung. Die Differenz zwischen der verbrauchten Lauge- und Säuremenge gibt die Laugemenge, welche Calcium + Magnesium äquivalent ist.

b) Bestimmung von Magnesium. Man verfährt zunächst wie oben angegeben, setzt aber statt des Acetons Alkohol hinzu, und zwar so viel, daß die Alkoholkonzentration 66% beträgt. Nach 10—15 Minuten wird nach Zusatz von Thymolphthaleinlösung (10 Tropfen auf 100 ccm) zurücktitriert. Sind die Calciummengen im Verhältnis zum Magnesium gering, so benutzt man Äthylalkohol, und der Umschlag bei der Titration ist scharf. Ist aber ebensoviel oder mehr Calcium als Magnesium vorhanden, so muß man der größeren Genauigkeit wegen Methylalkohol verwenden. Hierbei ist der Umschlag weniger scharf. Den Endpunkt der Titration zeigt das erstmalige völlige Verschwinden der Blaufärbung an, ohne daß der allmählich in der Magnesia auftretende blaviolette Farbenton zu berücksichtigen ist.

Berechnung. Die Differenz zwischen der verbrauchten Lauge und Säure gibt die Laugemenge, welche dem Magnesium äquivalent ist.

*Eisen\*\*\*).*

541. Für die Bestimmung des Eisens ist von A. Neumann eine jodometrische Methode angegeben worden, welche sich an seine § 528ff beschriebene Veraschungsmethode anschließt. Sie ist wegen der Einfachheit und Schnelligkeit der Ausführung und weil sie nur geringe Mengen Ausgangsmaterial (z. B. von Blut 5 ccm) erfordert, den älteren Methoden vorzuziehen, bei welchen die umständliche Veraschung auf trockenem Wege vorangehen muß. Treadwell, Abderhalden und Hanslian u. a. haben nachgewiesen, daß die Methode in ihrer ursprünglichen Form nicht ganz zuverlässig ist und haben sie verbessert. Im folgenden wird sie in der verbesserten Form geschildert.

\*) Eisen ist zunächst durch Ausfällen mit Ammoniak zu entfernen und das Ammoniumsalz zu verjagen.

\*\*) Eine Vorschrift zur Herstellung von Thymolphthalein findet sich in der Originalarbeit.

\*\*\*) D. h. das in anorganischer und organischer Bindung vorhandene. Enthält die Substanz keine Eisensalze, so ist das Resultat auf organisch gebundenes Eisen zu beziehen.

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 56, 1, S. 488. 1923.

**542. Jodometrische Bestimmung des Eisens nach A. Neumann<sup>1)</sup>.**

Prinzip. Wenn man eine schwefelsaure Lösung von Zinksulfat und viel phosphorsaurem Natron schwach ammoniakalisch macht und dann erhitzt, so scheidet sich alles Zink in Form von Zinkammoniumphosphat krystallinisch ab; enthält die Lösung nicht zu große Mengen von Eisenoxyd, so wird auch dieses quantitativ mitgefällt. Durch das so abgetrennte Eisenoxyd werden nach dem Lösen in Salzsäure aus Jodkalium äquivalente Mengen Jod frei gemacht ( $2 \text{ FeCl}_2 + 2 \text{ KJ} = 2 \text{ FeCl}_3 + 2 \text{ KCl} + \text{J}_2$ ), welche nach Zusatz von Stärkelösung noch mit einer etwa  $\frac{n}{250}$ -Thiosulfatlösung gemessen werden können (§ 20).

Jodometrische  
Eisenbestimmung nach  
A. Neumann.

Erforderliche Lösungen. 1. Eisenchloridlösung, enthaltend 2 mg Fe in 10 ccm. Dieselbe wird hergestellt, indem man genau 20 ccm der Freseniuschen Eisenchloridlösung<sup>2)</sup>, welche 10 g Fe im Liter enthält und von der Firma Kahlbaum bezogen werden kann, in einen Litermaßkolben fließen läßt, mit etwa 2 ccm konzentrierter Salzsäure versetzt und dann genau zum Liter auffüllt. Diese Lösung ist lange unverändert haltbar; man verwahrt sie zweckmäßig in einer braunen Flasche.

2. Etwa  $\frac{n}{250}$ -Thiosulfatlösung. Man löst 40 g Natriumthiosulfat (annähernd abgewogen) in etwa 1 l Wasser. Aufbewahrung in brauner Flasche. Diese sehr haltbare Lösung verdünnt man für den Gebrauch einer Woche um das 40fache, z. B. 5 ccm auf 200 ccm annähernd.

3. Stärkelösung. Man löst in  $\frac{1}{2}$  l kochenden Wassers 1 g lösliche Stärke (Schering) und kocht noch weitere 10 Minuten.

4. Zinkreagens. Etwa 25 g Zinksulfat und etwa 100 g Natriumphosphat werden jedes für sich in Wasser gelöst und die Lösungen in einem Litermaßkolben vereinigt. Der entstandene Niederschlag von Zinkphosphat wird durch Zusatz von verdünnter Schwefelsäure gerade gelöst und die Lösung sodann zum Liter aufgefüllt.

Alle zur Eisenbestimmung benutzten Reagenzien müssen frei von Eisen sein. Die Spuren, welche in der als reinste Säure gelieferten enthalten sind, können im allgemeinen vernachlässigt werden. Siehe dazu Jahn: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 75, S. 310. 1911.

Ausführung. Die mit der 3fachen Menge Wasser verdünnte und etwa 10 Minuten gekochte Aschenlösung\*) (§ 530) wird nach dem Abkühlen und eventueller Zugabe von genau abgemessenen 10 ccm Eisenchloridlösung (s. „Bemerkungen“ S. 663) mit 20 ccm Zinkreagens und dann mit Ammoniak (unter Abkühlung) so lange versetzt, bis der weiße Niederschlag von Zinkphosphat gerade bestehen bleibt. (Bis zur annähernden Neutralisation nimmt man konzentriertes, dann verdünntes Ammoniak.) Nun gibt man etwas Ammoniak im Überschuß zu, bis der weiße Niederschlag gerade eben verschwunden\*\*) ist, und erhitzt auf dem Baboblech zum Sieden. Wenn krystallinische Trübung eingetreten ist, erhitzt man noch etwa 10 Minuten; hierbei ist Vorsicht nötig, da die Flüssigkeit zuweilen hochgeschleudert wird. (Man verhindert das Stoßen am besten, wenn man die Flüssigkeit in starkem Sieden erhält.) Der krystallinisch abgeschiedene Niederschlag setzt sich schnell ab und kann leicht durch Dekantieren von der Flüssigkeit getrennt werden. Man setzt den Rundkolben auf einen Stativring, gießt die heiße Flüssigkeit durch ein kleines, aschefreies, anliegendes Filter (von 6 cm Durchmesser, nicht über 7 cm) und prüft eine kleine Probe des Filtrates mit Salzsäure und Rhodankalium auf Eisen; es darf keine oder nur eine äußerst schwache Rötung eintreten.

\*) Will man die Bestimmung in rein anorganischer, schwach eisenhaltiger Lösung ausführen, so ist es nötig, vor dem Zusatz das Zinkreagens mit 5 ccm konzentrierter Schwefelsäure anzusäuern, damit bei der Neutralisierung durch Ammoniak genügende Menge Ammonsalz, welche für eine vollständige Abscheidung des Niederschlages notwendig ist, entsteht.

\*\*) Enthält die Aschenlösung Erdalkaliphosphate (z. B. bei Faeces) in größeren Mengen, so bleibt natürlich der weiße Niederschlag bestehen und der schöne Indicator, welcher durch das Zinkphosphat gegeben wird, fällt weg. In diesem Falle muß man unter Prüfung mit Lackmuspapier gerade schwach ammoniakalisch machen. In den meisten Fällen ist aber der flockige Zinkniederschlag von der Erdalkaliphosphatfällung leicht zu unterscheiden.

<sup>1)</sup> Arch. f. Anat. u. Physiol., Physiol. Abt. 1902, S. 362. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 37, S. 120. 1902/03; Bd. 43, S. 33. 1904/05. — Hanslian: Biochem. Arbeitsmeth. Bd. 6, S. 376. 1912.

<sup>2)</sup> Fresenius: Quantitative Analyse. Bd. I, S. 288. 1875.

(War die Färbung deutlich rot, so muß man das schon Filtrierte zurückgießen, nochmals auf dem Baboblech erhitzen und wieder prüfen\*.) Der Niederschlag im Rundkolben wird nun etwa 3 mal durch Dekantieren mit heißem Wasser ausgewaschen; das letzte Waschwasser darf dann, wenn man etwa 5 ccm davon mit einigen Krystallen Jodkalium, Stärkelösung und 1 Tropfen Salzsäure versetzt, keine oder nur äußerst schwache Violettfärbung zeigen (Prüfung auf Jod freimachende Substanzen, z. B. salpetrige Säure). Jetzt bringt man in den Kolben mit der Pipette 20 ccm 25 proz. Salzsäure, löst den Niederschlag durch vorsichtiges Schwenken und gießt die Lösung in eine mit Ausguß versehene Porzellanschale, in die man vorher das Filter aus dem Trichter gelegt hat. Man erwärmt die Schale 10 Minuten lang auf dem Wasserbad und bringt dabei durch Behandeln mit einem Glasstab den Niederschlag in Lösung, verdünnt mit 20 ccm Wasser, mit dem man vorher den Rundkolben ausgespült hat und filtriert nun durch ein kleines Filter in einen 250-ccm-Maßkolben mit eingeschliffenem Stopfen. Kolben, Schale und Filter wäscht man so lange mit heißem destillierten Wasser, bis das Filtrat mit Rhodankalium und Salzsäure keine Rötung mehr gibt. Das ist der Fall, wenn das Filtrat etwa 200 ccm beträgt. Man setzt nun so viel Natronlauge zu, bis die ersten Spuren einer Trübung durch den ausfallenden Zinkphosphatniederschlag auftreten, bringt durch 2 bis 3 Tropfen verdünnter Salzsäure diese Spuren wieder in Lösung und füllt bei Zimmertemperatur auf 250 ccm auf.

In aliquoten Teilen der so erhaltenen Eisenlösung bestimmt man das Eisen. Man bringt mit einer Pipette 50 ccm in einen mit eingeschliffenem Stopfen versehenen 100-ccm-Kolben, gibt 5 ccm Stärkelösung hinzu, verdrängt durch längeres Einleiten von Kohlensäure die Luft völlig, fügt 3 g Jodkalium hinzu, verschließt, schüttelt und titriert nach 20 Minuten das ausgeschiedene Jod mit der Thiosulfatlösung zurück. Sobald die Blaufärbung über rotviolett verschwunden ist, leitet man wieder, kürzere Zeit, Kohlensäure ein, verschließt und beobachtet, ob nach 2—3 Minuten eine Nachbläuung eintritt. Ist das der Fall, so entfärbt man durch weiteren Zusatz von Thiosulfat. Tritt nach der Entfärbung wieder Blaufärbung ein, so wiederholt man die Titration mit neuen 50 ccm unter Zusatz von 5 g Jodkalium. In den meisten Fällen werden 3 g Jodkalium genügen und ist die Reaktion nach 20 Minuten beendet. Man macht mehrere Titrations und nimmt das Mittel. Der Durchschnittswert ist mit 5 zu multiplizieren.

**Titerstellung.** Titerstellung der Thiosulfatlösung. Da die sehr verdünnte Thiosulfatlösung nicht unverändert haltbar ist, so muß bei jeder Bestimmung der Titer festgestellt werden. Da Titerstellung und Titration unter möglichst denselben Konzentrationsverhältnissen vorgenommen werden sollen, so verfährt man so: In einen 100-ccm-Maßkolben mit eingeschliffenem Stopfen bringt man 20 ccm der verdünnten Eisenchloridlösung, 30 ccm Wasser und 1,7 g Kochsalz\*\*), fügt 5 ccm Stärkelösung hinzu, leitet Kohlensäure ein, gibt 3 g Jodkalium zu und verfährt genau wie bei der Analyse.

**Berechnung.** Berechnung. Sie ist äußerst einfach. Ergab die Titerstellung, daß 20 ccm Eisenlösung (= 4 mg Fe) 18,4 ccm Thiosulfatlösung erforderten, und wurden bei der Haupttitration 12,5 ccm Thiosulfat verbraucht, so berechnet sich aus der Proportion  $18,4 : 4 = 12,5 : x$   $x = 2,72$  mg Fe .

\*) Zeigt das Filtrat auch jetzt noch ungefälltes Eisen, so ist die Bestimmung in verdünnter Aschelösung auszuführen, da es nicht zulässig ist, mehr als 20 ccm Zinkreagens zu verwenden.

\*\*) Diese NaCl-Menge ist auch in 50 ccm der zu titrierenden Eisenlösung enthalten, hier entstanden durch Neutralisation der 25 proz. Salzsäure mit Natronlauge.

**Bemerkungen.** 20 ccm Zinkreagens sind ausreichend für 5—6 mg Fe. Bemerkungen.  
 Man wählt die Substanzmenge für eine Bestimmung zweckmäßig so, daß darin 2—3 mg Fe vorhanden sind, z. B. bei Blut 5—10 g, bei trockenen Faeces 3—5 g. Hat man selbst in großen Mengen Substanz, z. B. in 300 ccm Harn, sehr wenig Eisen, so muß man genau abgemessene 10 ccm Eisenchloridlösung vor dem Hinzufügen des Zinkreagens zugeben, um eine vollständige der Eisenmenge entsprechende Jodabscheidung zu erhalten. Man zieht in diesem Falle von den Kubikzentimetern Thiosulfatlösung, welche bei der Haupttitration verbraucht wurden, die Anzahl Kubikzentimeter Thiosulfatlösung ab, welche bei der Titerstellung von 10 ccm Eisenchloridlösung beansprucht wurden.

#### 543. Oxydimetrische Bestimmung des Eisens mit Permanganat.

Dieses Verfahren ist besonders wegen der vorangehenden Veraschung auf trockenem Wege umständlicher und reicher an Fehlerquellen als das im vorigen Paragraphen beschriebene und kann eigentlich nur bei eisenreichen Substanzen, z. B. Blut verwendet werden, obgleich auch hier das jodometrische bei weitem vorzuziehen ist. Oxydimetrische Eisenbestimmung.

**Prinzip.** Das in der Asche als Oxyd vorhandene Eisen wird durch schweflige Säure reduziert und das so gebildete Eisenoxydul durch Permanganat oxydiert.

**Erforderliche Lösungen.** 1. Eine gesättigte wässrige Lösung von schwefliger Säure (in einer braunen Flasche mit Glasstopfen aufzubewahren).

2. Eine auf  $\frac{1}{100}$  Oxalsäure eingestellte Lösung von Kaliumpermanganat (§ 19).

**Ausführung.** Man verdampft den salzsauren Auszug der nach § 525 oder 527 hergestellten Asche in einer Platinschale mit überschüssiger reiner Schwefelsäure über kleiner Flamme ohne Sieden, erhitzt bis zum Beginn der Nebelbildung durch verdampfende Schwefelsäure, löst den Rückstand in Wasser, bringt die Lösung unter mehrmaligem Nachspülen mit Wasser in einen Kolben, fügt ungefähr 20 ccm der gesättigten wässrigen Lösung von schwefliger Säure hinzu, erhitzt zum Sieden und hält so lange im schwachen Sieden, bis die schweflige Säure völlig verschwunden ist. Nachdem das Volumen der Flüssigkeit durch Zufügen von Wasser oder Eindampfen auf das Volumen gebracht ist, welches die zur Titerstellung benutzte Oxalsäurelösung gehabt hatte, fügt man von der Kaliumpermanganatlösung hinzu, bis die Rotfärbung der Flüssigkeit beim Stehen in 10—20 Minuten nicht wieder verschwindet. Die für die Oxydation von 10 ccm  $\frac{1}{100}$ -Oxalsäure erforderliche Kubikzentimeteranzahl der Permanganatlösung entspricht 0,005585 g Fe.

Für diese Bestimmung sind von Blut mindestens 50 ccm erforderlich, von Harn, Galle, Milch und anderen Flüssigkeiten und Organen müßte man schon die 4—10fache Menge nehmen.

#### 544. Colorimetrische Bestimmung kleiner Eisenmengen nach Willstätter<sup>1)</sup>.

**Prinzip.** Die Methode beruht auf der Rotfärbung, welche Ferrisalzlösungen durch Rhodanid erfahren. Colorimetrische Eisenbestimmung nach Willstätter.

**Erforderliche Lösungen.** 1. Eisenvergleichslösung. Man geht zu ihrer Herstellung von der Freseniuschen Eisenchloridlösung aus (s. S. 661). 2. 40 proz. Rhodanammoniumlösung. Die Methode ist noch brauchbar bei Lösungen, die in 1 ccm 0,025 mg Eisen enthalten.

**Ausführung.** Die Substanz (z. B. 0,2—0,6 g Blutfarbstoff oder 1,5 ccm Blut) wird nach A. Neumann (§ 528 ff) verascht und die eingedampfte und nach dem Erkalten mit Wasser verdünnte Flüssigkeit durch Erwärmen und Versetzen mit 50 mg Harnstoff von salpetriger Säure völlig befreit. Man vergleicht die Lösung colorimetrisch mit einer Standardlösung von bestimmtem Eisengehalt, indem beide (0,5—1 ccm) mit 0,5 ccm konzentrierter Salzsäure versetzt und frisch mit 40 proz. Rhodanammoniumlösung auf 50 ccm gebracht werden.

<sup>1)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 53, 2, S. 1152. 1920; Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 130, S. 288. 1923.

Zu beachten ist die Unbeständigkeit des Ferrirhodanats, indem die Farbe seiner Lösung allmählich zurückgeht, und der Eisengehalt auch der reinsten Rhodanidpräparate des Handels. Die konzentrierten Lösungen sind rötlich. Diese Störung wird durch kurzes Aufkochen beseitigt. Die Lösung bleibt dann auch beim Abkühlen farblos.

#### Salzsäure.

Die Bestimmung der Salzsäure kann entweder in dem wässerigen Auszug (§ 525 oder 527) einer unter Zusatz von halogenfreier Soda (§ 526) hergestellten Asche oder nach einem von A. Neumann angegebenen Verfahren vorgenommen werden. Für die Bestimmung in kleinen Mengen Substanz sind die Methoden von Pringsheim (§ 548) und v. Slyke (§ 548a) zu empfehlen.

Bestimmung  
der Salzsäure:  
als Chlorsilber

#### 545. Bestimmung im wässerigen Aschenauszug durch Wägung als Chlorsilber.

Man fällt die mit Salpetersäure angesäuerte Lösung durch Silbernitrat, solange ein Niederschlag entsteht, erwärmt auf dem Wasserbade, sammelt den Niederschlag auf einem Filterchen, wäscht aus, bis das ablaufende Waschwasser durch Salzsäure nicht mehr getrübt wird, trocknet dann Filter und Niederschlag im Luftbade, schüttet das Chlorsilber (wenn soviel vorhanden ist) auf ein Stückchen Glanzpapier aus, faltet das Filter zusammen und verbrennt es zunächst durch Glühen im gewogenen Porzellantiegel. Nach dem Erkalten des Tiegels wird der Rückstand des Filters, der metallisches Silber enthält, mit einigen Tropfen Salpetersäure übergossen, erwärmt und durch ein paar Tropfen Salzsäure völlig in Chlorsilber übergeführt. Man dampft vorsichtig zur Trockne ab, schüttelt vom Glanzpapier das noch nicht geglühte Chlorsilber in den Tiegel, erhitzt gerade bis zum beginnenden Schmelzen des Chlorsilbers, läßt dann erkalten und wägt. Das Verhältnis von  $\text{AgCl} : \text{Cl} = 1 : 0,247383$ .

Viel bequemer ist es, die ganze Operation (Filtrieren, Auswaschen) in einem gewogenen Goochtiegel (§ 11) vorzunehmen. Dieser wird dann zunächst bei  $100^\circ$ , dann bei  $130^\circ$  getrocknet.

titrimetrisch  
nach Mohr

#### 546. Bestimmung im wässerigen Aschenauszug durch Titration nach Mohr.

Prinzip. Fügt man zu einer Lösung, welche Chlormetall und Kaliumchromat enthält, Silbernitrat, so entsteht zunächst weißes Chlorsilber und erst, wenn alles Chlor ausgefällt ist, bildet sich rotes chromsaurer Silber (Endreaktion).

Erforderliche Lösungen. 1. Silberlösung, enthaltend in 11 29,050 g reines geschmolzenes Silbernitrat (in dunkler Flasche aufzubewahren).

1 ccm dieser Lösung = 0,01 g NaCl oder 0,00606 g Cl.

2. Konzentrierte wässrige Lösung von neutralem Kaliumchromat.

Ausführung. Man fügt zu der neutralen Lösung (reagiert sie alkalisch, so säuert man zunächst mit Salpetersäure an und neutralisiert durch eine Messerspitze reines Calciumcarbonat) einige Tropfen Kaliumchromatlösung und dann aus der Bürette unter Umrühren in kleinen Portionen, zuletzt tropfenweise, so lange Silberlösung, bis der Niederschlag eine nicht wieder verschwindende Rotfärbung zeigt (Endreaktion). Die Anzahl der bis zum Eintritt der Endreaktion verbrauchten Kubikzentimeter Silberlösung ergeben mit 10 multipliziert die Menge NaCl oder mit 6,06 multipliziert die Menge Cl in Milligrammen, welche in der Lösung enthalten waren.

Um die Silberlösung auf ihre Richtigkeit zu prüfen (sie kann sich bei längerer Aufbewahrung zersetzen), dient eine Lösung, welche in 11 10 g reines, schwach geglühtes, von Chlorkalium freies Chlornatrium enthält. 20 ccm dieser Lösung müssen bis zum Eintritt der Rotfärbung genau 20 ccm der Silberlösung verbrauchen.

nach A. Neumann.

#### 547. Bestimmung nach A. Neumann<sup>1)</sup> im Anschluß an seine Veraschungsmethode.

Prinzip. Bei der in § 528 ff. beschriebenen Veraschung entweicht alles Chlor (aus Chloriden) in Form von Salzsäure. Läßt man nun diese Dämpfe über eine Silbernitratlösung

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 37, S. 135. 1902/03; Bd. 43, S. 36. 1903/04. — Symes (Journ. of physiol. Bd. 32, S. 221. 1905) empfiehlt einige unwesentliche Modifikationen.

gehen, so wird die Salzsäure quantitativ als Chlorsilber gefällt. Nach Entfernung der mitübergegangenen salpetrigen Säure durch Kochen und durch Kaliumpermanganat sowie nach Zersetzung des letzteren durch Eisenoxydulsalz wird die überschüssige Silbermenge nach der Volhard'schen Methode (§ 574, 2) mittels Rhodankalium zurücktitriert. Man verwendet wässriges Säuregemisch, da bei Anwendung des konzentrierten leicht etwas Chlor als solches entweicht.

Angewendete Lösungen. 1. Wässriges Säuregemisch, bestehend aus gleichen Volumteilen Wasser, konzentrierter Salpetersäure (spez. Gew. 1,4) und konzentrierter Schwefelsäure.

2. 5 proz. Kaliumpermanganatlösung.

3. 5 proz. Ferroammonsulfatlösung (mit Schwefelsäure bis zur Klärung versetzt).

4. Eisenoxydammoniakalaun. Kalt gesättigte Lösung.

5. Silbernitratlösung von bekanntem Gehalt. Man benutzt in den meisten Fällen zweckmäßig eine solche, von der 1 ccm 0,002 g NaCl entspricht; dieselbe ist 5 mal so schwach wie die im § 546 beschriebene.

6. Rhodankaliumlösung, gegen die Silberlösung genau (1 : 1) eingestellt (§ 574, 2).

Apparatur. In den Tubus einer Retorte von etwa  $\frac{1}{2}$  l Inhalt ist ein Tropftrichter luftdicht eingeschliffen. Das möglichst lange Rohr der Retorte verjüngt sich so, daß es leicht durch den Hals eines Kolbens von  $\frac{1}{2}$  l Volumen hindurchgeht. Dieser als Vorlage dienende Kolben liegt in einer Schale, welche zur Kühlung mit Wasser gefüllt wird.

Ausführung der Bestimmung. Feste Substanzen werden feucht oder trocken in die Retorte gebracht; Flüssigkeiten müssen vorher bei schwacher Sodaalkalescenz konzentriert werden. Nachdem man in den Vorlagekolben überschüssige, genau abgemessene Mengen Silberlösung gegeben hat, fügt man soviel Wasser hinzu, daß  $\frac{1}{4}$  des Kolbens mit Flüssigkeit gefüllt ist. Sodann legt man ihn in die mit Wasser gefüllte Schale und schiebt das Retortenrohr so hinein, daß sein Ende sich etwa 1 cm über der Flüssigkeit befindet. Nunmehr setzt man in den Tubus den Tropftrichter luftdicht ein und läßt aus demselben das verdünnte Säuregemisch langsam unter Erwärmen eintropfen. Das übergehende Destillat erzeugt alsbald in der Silberlösung weiße Trübung oder Niederschlag von Chlorsilber. Nach Verlauf von  $\frac{1}{2}$  Stunde prüft man, ob noch Salzsäure übergeht. Dazu läßt man aus derselben Bürette, aus welcher man die Silberlösung für die Vorlage abgemessen hat, 1—2 ccm in ein weites Reagensglas fließen und läßt das zu prüfende Destillat in dieses tropfen. Wenn kein Chlorsilber mehr ausfällt, ist die Destillation beendet. Die zu den Proben benutzten Silbermengen werden quantitativ mit der Hauptmenge in der Vorlage vereinigt; außerdem notiert man die Gesamtsilbermenge nach dem Stande in der Bürette.

Da die mitübergegangene salpetrige Säure die Titration mit Rhodanlösungen stört, so muß sie vorher entfernt werden. Zu dem Zwecke kocht man 5 bis 10 Minuten\*) (am besten, um Stoßen zu vermeiden, auf einem Baboblech), bis alle braunen Dämpfe entwichen sind. Der Rest der salpetrigen Säure wird durch Zufügen von Kaliumpermanganat bis zur beginnenden Rötung wegoxydiert und dann der Überschuß an Permanganat durch einige Tropfen Ferroammonsulfat entfernt.

Nach völligem Erkalten wird unter Hinzufügen von 5 ccm Eisenoxydammoniakalaun mit der Rhodankaliumlösung zurücktitriert. Man gibt letztere schnell unter starkem Umschütteln hinzu, bis gerade eine rötlich-bräunliche Färbung eintritt, welche bei ruhigem Stehen 5—10 Minuten erhalten bleibt, dann aber allmählich durch Zersetzung des Chlorsilbers verschwindet.

Berechnung. Durch Subtraktion der Rhodankaliummenge von der notierten Gesamtsilbermenge erhält man die Kubikzentimeter Silberlösung, welche der in der untersuchten Substanz erhaltenen Chlormenge entsprechen.

\*) Bei der Analyse von stickstoffhaltigen Substanzen, besonders Proteinen, muß man etwa  $\frac{1}{2}$  Stunde kochen, um die entstandene Blausäure völlig zu entfernen (Plimmer<sup>1</sup>).

<sup>1</sup>) Journ. of physiol. Bd. 31, S. 65. 1904.

als Chlorsilber nach  
Pringsheim.

**548. Bestimmung in kleinen Mengen (etwa 0,2—0,4 g) organischer Substanz als Chlorsilber nach Pringsheim<sup>1)</sup>,**

Die Zerstörung der organischen Substanz geschieht mit Natriumsuperoxyd. **Verbrennung.** In einem Eisentiegel\*) von bestimmter Größe und Form, dessen Deckel ein Loch hat, bringt man die abgewogene Substanz und Natriumsuperoxyd, und zwar nimmt man für Substanzen mit 75 und mehr Prozent C + H + S die 18fache, für Substanzen mit 50—75% C + H + S die 16fache Menge des Gewichts der Substanz. Substanzen mit 25—50% C + H + S versetzt man mit dem halben, solche mit weniger C + H + S mit dem gleichen Gewicht der Substanz an Zucker und verwendet dann für erstere die 16fache, für letztere die 18fache Menge von dem Peroxyd. Nachdem mit einem Eisennagel (der durch das Loch des Deckels hindurchgeht) gemischt ist, setzt man den Tiegel in eine Schale, füllt diese bis zu  $\frac{3}{4}$  seiner Höhe mit Wasser, setzt den Deckel auf und führt den mit einer Zange gefaßten Nagel in glühendem Zustande durch das Loch des Deckels in die Reaktionsmasse. Diese entzündet sich sofort und schmilzt unter völliger Verbrennung zusammen. (War zuviel Peroxyd vorhanden, so findet keine durch die ganze Masse gehende Entzündung statt, war zu wenig vorhanden, so verläuft die Reaktion zu stark.) Bei phosphor- und arsenhaltigen Substanzen wendet man die halbe Menge der nach obigen Angaben berechneten Menge Peroxyd an.

**Vorbereitung zur Fällung.** Nachdem der Tiegel wenige Minuten erkaltet ist, legt man ihn um, so daß das Wasser eintritt, und bedeckt schnell mit einem Uhrglas. Unter Entweichen von Sauerstoff erfolgt Lösung. Man entfernt Tiegel und Nagel unter Waschen mit Wasser, versetzt die durch Eisenhydroxyd und Kohlepartikelchen getrübe Flüssigkeit mit 3 ccm einer gesättigten Lösung von Natriumsulfit oder Bisulfit (halogenfrei!) (zur Überführung der bei der Oxydation gebildeten sauerstoffhaltigen Halogensäure in Halogenwasserstoff) und so viel verdünnter Schwefelsäure, bis der Eisenniederschlag verschwunden ist. Jetzt erwärmt man im bedeckten Becherglas bis zum Verschwinden der schwefligen Säure, gibt 3 ccm konzentrierte Salpetersäure hinzu. Fällung mit Silbernitrat und weitere Behandlung geschieht nach § 545.

titrimetrisch nach  
v. Slyke.

**548a. Bestimmung in Serum, Blut und Organen nach v. Slyke<sup>2)</sup>.**

**Prinzip.** Die organische Substanz wird zerstört und das Chlorid gefällt durch konzentrierte Salpetersäure bei Gegenwart einer bekannten Menge von Silbernitrat, das überschüssige Silber mit Rhodankalium titriert. Das ganze Verfahren, „offenes Cariusverfahren“, geschieht in einem Kolben.

**Erforderliche Lösungen und Gefäße.**  $\frac{5}{100}$ n-Silbernitrat in konzentrierter Salpetersäure (spez. Gew. 1,4) und  $\frac{5}{100}$ n-Rhodankalium für Blut und Serum und  $\frac{2}{100}$ n-Lösungen für Gewebe. Ferner Eisenammoniakalaun, Erlenmeyerkolben von Jenaglas von 100 ccm.

**Bestimmung in Blut oder Serum.** Man bringt 3 (oder 5) g in dem Kolben mit 10 (oder 15) ccm obiger Silberlösung zusammen, bedeckt mit einem Uhrglas und erhitzt auf dem Wasserbad, bis die Flüssigkeit über dem Chlorsilberniederschlag klar und leicht gelb ist, was bei Serum nach 1—2 Stunden, bei Blut nach etwa 12 Stunden der Fall ist. Man fügt für jeden Kubikzentimeter Silberlösung 2 ccm Wasser (also 20 oder 30 ccm) hinzu, ferner ungefähr 1 oder 1,5 g gepulverten Eisenammoniakalaun und titriert nach Abkühlen auf Zimmertemperatur mit obiger Rhodankaliumlösung. Von den verbrauchten Kubikzentimetern wird für die Rechnung 0,04 ccm abgezogen.

\*) Zu beziehen von P. Köhler, Leipzig, Josephinenstr. 35.

<sup>1)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 41, 3, S. 4267. 1908.

<sup>2)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 58, S. 523. 1924.



Bestimmung in Geweben. Man verfährt ebenso, aber unter Benutzung der  $\frac{2}{100}$ n-Lösungen, auch empfiehlt es sich, zur Verhinderung des Schäumens 1 oder 2 Tropfen Octylalkohol zuzufügen.

Kontrolle der Rhodankaliumlösung. Von der Richtigkeit der Lösung überzeugt man sich, indem man sie gegen 15 ccm der Silberlösung, die mit 35 ccm Wasser und 1,5 g Eisenammoniakalaun versetzt sind, titriert.

Berechnung. Man erhält die in 1 l oder 1 kg enthaltene Natriumchloridmenge in Gramm nach der Formel

$$\frac{2,925 \text{ (ccm } \frac{5}{100}\text{n-Silberlösung — ccm } \frac{5}{100}\text{n-Rhodanlösung)}}{\text{ccm oder Gramm Substanz}}.$$

Die Methode ist auch für kleinere Mengen (1 g Blut oder 1—1,5 g Organ) zu benutzen. S. dazu die Originalarbeit.

### Jod.

549. Für die Bestimmung des Gesamtjods\*) (des anorganisch und organisch gebundenen) dient das Verfahren von Blum und Grützner<sup>1)</sup>. Bestimmung  
des Jods.

Prinzip. Das nach der Veraschung als Jodid vorliegende Jod wird durch Oxydation mit Permanganat in alkalischer Lösung in Jodsäure übergeführt, die dabei entstehende salpetrige Säure durch Kochen in saurer Lösung entfernt und während dessen die Jodsäure durch ständigen Überschuß an Permanganat geschützt. Das überschüssige Permanganat wird durch Alkohol in alkalischer Lösung reduziert. Schließlich läßt man die Jodsäure in saurer Lösung mit Jodkali reagieren und bestimmt das dabei freiwerdende Jod titrimetrisch mit Natriumthiosulfat. Über eingehende Begründung der Methode s. die Originalarbeit.

Erfordernisse. Reinste Präparate von Ätznatron, Ätzbaryt, Bariumperoxyd, Natriumsulfat, calcinierter Soda, Salpeter, Ammonsulfat, Jodkali, Kohle. Ferner Schwefelsäure (1 : 4), Phosphorsäure (1 : 4), Permanganat,  $\frac{2}{10}$ - bzw.  $\frac{2}{100}$ -Natriumthiosulfat (§ 20), Stärkelösung. Eiserner Tiegel mit Deckel.

Veraschung. Große Mengen jodarmer eiweißreicher Substanz (Organe, Blut) werden nach a, kleine Mengen jodreicher (Schilddrüse, Jodeiweißstoffe) nach b verascht.

a) Das zu veraschende Material wird in einem geräumigen Eisentiegel, der später zur Veraschung dienen soll, mit kleinen Mengen reiner Natronlauge (aus metallischem Natrium) oder (um später möglichst wenig Salze in der Lösung zu haben) mit reinstem Barytwasser völlig durchfeuchtet, dann wieder einigermäßen getrocknet und nun in einer Schale mit reinstem Bariumsuperoxyd (halogen-, jedenfalls jodfrei) gut gemischt. Die Menge richtet sich nach der Menge der zu verbrennenden Substanz (für eine Organmenge von der Größe einer Schilddrüse etwa 1 Messerspitze, für das aus 100 ccm Blut durch Zusatz von 400 ccm Aceton erhaltene Koagulum etwa 50 g). Die Substanz wird portionsweise verbrannt. Die Erhitzung erfolgt ganz allmählich und vorsichtig. Nach Entweichen der letzten Feuchtigkeit beginnt die Verbrennung unter Glimmerscheinung an einigen Stellen. Man läßt sie nicht zu heftig werden (eine Überhitzung einzelner Stellen ist zu vermeiden) und setzt immer wieder neue Mengen des Gemisches hinzu. Wenn kein Rauch mehr entweicht, bestreut man die Oberfläche mit neuem Superoxyd und fährt damit fort, bis keine Feuererscheinung mehr auftritt. Man kann auch die Masse mit einem Glasstab durchrühren. Ein Überschuß des Superoxyds wird durch Zusatz reiner Kohle zerstört. Es soll schließlich unveränderte Kohle vorhanden sein. Die

\*) Eine Trennung von anorganischem und organischem (an Eiweiß gebunden) geschieht durch Acetonfällung (Blum u. Grützner: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 85, S. 463. 1913; Bd. 92, S. 364. 1914.

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 85, S. 446. 1913; Bd. 91, S. 392. 1914.

Erhitzung soll nicht zu lange fortgesetzt werden, so daß größere Mengen Substanz, z. B. das Koagulum aus 100 ccm Blut, besser in mehreren Tiegeln verbrannt werden. Alle Operationen geschehen in bedecktem Tiegel.

Die erkaltete grauschwarze Masse wird mit heißem Wasser behandelt und in ein geräumiges Becherglas überführt, durch Auskochen des Tiegels und mit Hilfe des Glasstabes der ganze Tiegelinhalt herübergespült. Festhaftende Schmelzen läßt man durch Stehenlassen mit warmem Wasser sich lösen. In die Aufschwemmung der Schmelze leitet man jetzt unter häufigem Umrühren Kohlensäure ein, kann auch etwas Natriumsulfat zufügen. Man filtriert nun in einen geräumigen (2-l-) Jenakolben und wäscht mit heißem etwas soda- oder natriumsulfathaltigem Wasser nach. Tritt in dem klaren bei Verarbeitung von Blut meist etwas grünlich gefärbtem Filtrat allmählich eine Trübung ein, so fügt man noch etwas Natriumsulfat zu und filtriert wieder.

b<sup>1)</sup> Die Substanz (z. B. 0,1—0,5 g Jodeiweiß) wird in den Eisentiegel so eingebracht, daß sie auf eine Stelle des Bodens zu liegen kommt, und mit einer dünnen Schicht von calcinierter Soda bedeckt. Gegenüber schichtet man Stückchen reines Ätznatron (aus metallischem Natrium) (3—5 g) auf, befeuchtet jetzt die Substanz mit einigen Tropfen Natronlauge oder besser alkoholischer Natronlauge, erhitzt nun den Tiegel vorsichtig unter der Ätznatronschiicht, bis sie geschmolzen ist, und läßt durch Neigung des Tiegels die Schmelze sich mit der Substanz mischen. Nun erhitzt man unter drehender Bewegung des Tiegels vorsichtig 1—2 Minuten, bis die Schmelze gleichmäßig fließt, fügt 1 Messerspitze Salpeter rasch hinzu, bedeckt den Tiegel und führt die Verbrennung in etwa 1 Minute zu Ende. Die Schmelze soll klar sein. Der Tiegel wird durch Einsenken in Wasser abgekühlt, die erstarrte Masse mit heißem Wasser aufgeweicht und ohne weitere Filtration in den 2-l-Kolben übergeführt.

Oxydation zu Jodsäure. Das Filtrat, welches den 2-l-Kolben höchstens zur Hälfte füllen darf, wird mit Permanganatlösung (die Menge richtet sich nach der Menge vorhandener reduzierender Substanz, es muß immer bis zum späteren Zusatz des Alkohols ein Überschuß vorhanden sein) und wenig Talk versetzt und 5—10 Minuten (bei viel organischer Substanz bis zu 30 Minuten) gekocht. Man entfernt die Flamme, macht durch vorsichtiges langsames Zutropfen von Schwefelsäure (1 : 4) (Schäumen besonders gegen Schluß!) deutlich sauer und kocht weiter 5—15 Minuten, wobei sorgfältig auf genügende Menge Permanganat zu achten ist. Die Lösung wird abgekühlt und unter Wasserkühlung mit reiner calcinierter Soda wieder alkalisch gemacht. Es wird nun sofort Alkohol (2—5 ccm, aber so wenig wie eben möglich) und eine Spur Talkum zugefügt, 10—12 Minuten gekocht, bis das Permanganat völlig reduziert und der Alkoholgeruch des entweichenden Dampfes verschwunden ist, sofort durch ein gut anliegendes Filter filtriert, und zwar so, daß das Filter immer mit der Lösung bedeckt ist, und mit heißem Wasser, dem einige Tropfen Alkohol zugesetzt werden, 3—4 mal gewaschen. Das Filtrat muß klar sein, eine gleichmäßige Gelbfärbung schadet nichts. (Dagegen ist eine bräunlich-gelbliche Trübung [Manganoxyd] störend und durch nochmaliges kurzes Kochen, evtl. unter weiterem Alkoholzusatz, und Abfiltrieren zu beseitigen.) Die Lösung wird nach Zusatz einer kleinen Menge Talk zur völligen Entfernung des Alkohols 5 Minuten gekocht, vorsichtig mit einem Gemisch von 3 Vol. Phosphorsäure (1 : 4) und 2 Vol. Schwefelsäure (1 : 4), das durch Erwärmen mit einigen Kubikzentimetern Permanganatlösung (sehr schwache Rosafärbung schadet nichts)

<sup>1)</sup> Siehe Strauß: Handb. d. biol. Arbeitsmethoden, herausgeg. von Abderhalden, Abt. I, Teil 3, S. 836. 1921.

reduktionsfrei gemacht ist, angesäuert, und nach Zufügen von etwa 2 g reinstem Ammonsulfat 5—7 Minuten gekocht. Die Lösung enthält jetzt keine anderen oxydierenden Substanzen als Jodsäure.

**Titration.** Die abgekühlte Lösung wird mit Schwefelsäure bis zur deutlichen Bläuung von Kongopapier und hierauf mit reinstem Jodkali versetzt ( $\text{HJO}_3 + 5 \text{HJ} = 3 \text{H}_2\text{O} + 6 \text{J}$ ). Tritt hierbei Braunfärbung auf (viel Jod), so fügt man noch etwas Schwefelsäure hinzu und titriert mit  $\frac{n}{10}$ -Thiosulfatlösung gegen Schluß unter Zusatz von Stärkelösung. Tritt keine Gelb- oder Braunfärbung auf (wenig Jod), so fügt man gleich Stärke und etwas starke Schwefelsäure (1 : 4) hinzu und titriert mit  $\frac{n}{100}$ -Thiosulfatlösung bis zum Verschwinden der Blaufärbung (§ 20).

**Berechnung.** Multipliziert man die Anzahl der verbrauchten Kubikzentimeter Thiosulfatlösung mit 12,69 (oder bei Benutzung von  $\frac{n}{100}$ -Thiosulfatlösung mit 1,269) und dividiert diesen Wert durch 6, so erhält man die Menge des Jods in Milligrammen.

Ein anderes Verfahren ist von Kendall<sup>1)</sup> angegeben worden.

#### *Gesamtschwefel* \*).

550. a) Nach Hoehnel - Glaser (-von Asbóth<sup>2)</sup> in der Modifikation von Neumann - Meinert<sup>3)</sup>.

Bestimmung des  
Gesamtschwefels:  
nach Hoehnel-  
Glaser.

**Prinzip.** Zerstörung und Oxydation der Substanz mit Natriumsuperoxyd und Bestimmung der Schwefelsäure als Bariumsulfat.

Die getrocknete Substanz, z. B. 1—2 g Casein, wird in einem Nickeltiegel von etwa 100 oder besser 200 ccm Inhalt mit 5 g Kaliumnatriumcarbonat und 2,5 g Natriumperoxyd innig vermengt und über einer kleinen Gasflamme ungefähr 1 Stunde lang erhitzt, bis die Mischung völlig zusammengesintert ist. Nach kurzer Abkühlung (etwa 5 Minuten) werden wieder 2,5 g Peroxyd zugesetzt und mit kleiner Flamme noch etwa 1 Stunde erhitzt, bis die Hauptmenge sich verflüssigt hat. Jetzt entfernt man den Brenner, fügt noch 2 g Peroxyd hinzu und glüht etwa  $\frac{1}{4}$  Stunde, indem man die Flamme allmählich bis zur vollen Stärke vergrößert. Jetzt ist völlige Verflüssigung eingetreten. Der Tiegel bleibt dauernd bedeckt. Bei Einhaltung der Vorschriften findet keine Verpuffung und Entzündung statt, so daß eine Beaufsichtigung unnötig ist. Die erkaltete (durch Nickeloxydbeimengung grünlich gefärbte) Schmelze wird im Tiegel mit Wasser übergossen, bedeckt (wegen der Gasentwicklung) mit kleiner Flamme bis zur Lösung erhitzt und die Lösung in ein Becherglas übergeführt, mit bromhaltiger Salzsäure vorsichtig (Bedecken mit einem Uhrglas) sauer gemacht und auf dem Wasserbad einige Zeit erhitzt, wobei eine klare, grünliche Lösung entsteht. Da die Substanz völlig verbrennt, ist Filtrieren unnötig. Die Lösung wird auf etwa 400 ccm verdünnt, im kochenden Wasserbad erhitzt, mit 5 Tropfen konzentrierter Salzsäure und allmählich mit einer heißen etwa 1 proz. Chlorbariumlösung versetzt, bis kein weiterer Niederschlag mehr entsteht (man prüft, nachdem Absetzen erfolgt ist). Man erhitzt jetzt auf kochendem Wasserbad mehrere Stunden unter Ersatz des verdunstenden Wassers, bis der Niederschlag sich zu Boden gesetzt und die überstehende Flüssigkeit ganz klar geworden ist, dekantiert durch aschefreies Filter, bringt in das Becherglas Wasser,

\*) D. h. der in anorganischer und organischer Bindung vorhandene. Enthält die Substanz keine Sulfate, so ist das Resultat auf organisch gebundenen Schwefel zu beziehen.

<sup>1)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 19, S. 251. 1914, Bd. 43, S. 149; ref. Chem. Zentralbl. 1920, IV, S. 598; Kendall u. Richardson: Journ. of biol. chem. Bd. 43, S. 161; ref. Chem. Zentralbl. 1920, IV, S. 599.

<sup>2)</sup> Chemiker-Zeit. Bd. 19, 2, S. 2040. 1895.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 43, S. 37. 1904/05.

erhitzt wieder im Wasserbad einige Minuten und filtriert. (Da das zweite Filtrat zuweilen zunächst trübe durchläuft, ist es zweckmäßig, es in einem neuen Becherglas aufzufangen.) Der Niederschlag wird auf das Filter gebracht und mit heißem Wasser ausgewaschen, bis eine Probe mit Schwefelsäure keine Spur einer Trübung gibt. Das Filter wird nun vorsichtig aus dem Trichter genommen, zusammengefaltet in einen gewogenen Platintiegel gebracht und in feuchtem Zustande verascht.

Statt dessen kann man auch durch gewogenen Goochtiiegel filtrieren. Nach Auswaschen und Trocknen wird er in einen Schutztiegel gestellt, etwa 10 Minuten gegläht und gewogen.

$1 \text{ g BaSO}_4 = 0,420176 \text{ g H}_2\text{SO}_4 = 0,137380 \text{ g S.}$

nach Wolf u.  
Oesterberg.

b) Nach Wolf und Oesterberg<sup>1)</sup>.

Prinzip. Zerstörung und Oxydation der Substanz mit Salpetersäure und der Lösung von Benedict<sup>2)</sup> (enthaltend im Liter 200 g sulfatfreies krystallisiertes Kupferniträt  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 + 6 \text{ H}_2\text{O}$  und 50 g reines Natrium- oder Kaliumchlorat) und Bestimmung der Schwefelsäure als Bariumsulfat.

Man bringt die Substanz (z. B. 3 g Plasma) in einen 300-ccm-Kjeldahlkolben mit langem Hals, fügt 20 ccm rauchende Salpetersäure hinzu, erhitzt, zunächst mit kleiner Flamme, bis alles gelöst und keine Dämpfe mehr sich entwickeln. Erfolgt keine völlige Lösung, so ist noch mehr Salpetersäure zuzugeben. Man bringt den Kolbeninhalt in eine Porzellanschale oder einen Porzellantiegel mit abnehmbarem Deckel (150 ccm), fügt 20 ccm der Benedictschen Lösung hinzu, verdampft auf dem Sandbad zur Trockne und erhitzt nun auf offener Flamme allmählich bis zur Rotglut des Bodens. Nachdem diese Temperatur 20 Minuten eingewirkt hat, läßt man erkalten, fügt 25 ccm Salzsäure (1 : 4) hinzu und erwärmt, bis der ganze schwarze Bodensatz gelöst ist. Die Lösung wird nun in einen 500-ccm-Erlenmeyerkolben gebracht, mit etwa 150 ccm Wasser versetzt und 15 Minuten gekocht. Nach Stehen über Nacht filtriert man. Die weitere Behandlung (Fällung mit Bariumchlorid) geschieht, wie oben unter a) beschrieben.

c) In vielen Fällen läßt sich die Zerstörung der organischen Substanz und Oxydation des S zu Schwefelsäure auch mit Hilfe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  bei Gegenwart von Eisensalz erreichen; s. darüber Mandel und Neuberg<sup>3)</sup>.

nach Pringsheim.

d) Nach Pringsheim<sup>4)</sup>.

Dieses Verfahren eignet sich nur für kleine Mengen (0,2—0,4 g). Man zerstört die organische Substanz mit Natriumperoxyd und verfährt zu dem Zwecke zunächst wie § 548 beschrieben. Nach Behandeln der Schmelze mit Wasser und Entfernung von Tiegel und Nagel säuert man mit Salzsäure an, wobei das Ferrihydroxyd in Lösung geht, filtriert von den Kohlenpartikelchen ab und bestimmt die gebildete Schwefelsäure als Bariumsulfat, wie oben unter a) beschrieben.

#### Schwefelsäure.

Bestimmung sehr  
kleiner Mengen  
von Schwefel-  
säure.

551. Bestimmung sehr kleiner Mengen von Schwefelsäure nach Hamburger<sup>5)</sup>.

Prinzip. Die Methode beruht auf der Volumbestimmung des durch Fällen mit acetonhaltiger Bariumchloridlösung aus salzsaurer Lösung gefällten und zentrifugierten Bariumsulfats.

Ausführung. Zu 5 ccm der zu untersuchenden Flüssigkeit fügt man 2,5 ccm Salzsäure (1 : 1) und darauf 5 ccm einer 2,44 proz. Lösung von krystallisiertem Bariumchlorid, auf deren Oberfläche vorher 6 Tropfen Aceton (ohne

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 29, S. 429. 1910.

<sup>2)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 6, S. 363. 1909.

<sup>3)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 71, S. 196. 1915.

<sup>4)</sup> Ber. d. Dtsch. chem. Gesellsch. Bd. 41, 3, S. 4267. 1908.

<sup>5)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 77, S. 168. 1916 u. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 100, S. 221. 1917. (Vereinfachungen.)

daß Mischung erfolgt) gebracht worden sind. Dieses Zusammenbringen der beiden reagierenden Lösungen geschieht in einem besonderen im Original abgebildeten Apparat. Siehe Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 100, S. 223. Hier ist auch die weitere Behandlung, Überführung in den Chonohämatokrit, Zentrifugieren beschrieben. 1 Teilstrich = 0,000294 g SO<sub>4</sub>. Die Anwesenheit von K, Na, Ca, Mg, HCl, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> schadet nichts.

Die Bestimmung kann auch im Harn (5 ccm) ausgeführt werden und nach Entfernung des Eiweißes durch Ultrafiltration auch im Blutserum.

#### *Bleischwärender Schwefel.*

552. Nach K. A. H. Mörner<sup>1)</sup>. Die Substanz wird mit 50 g Ätznatron, 10 g Bleiacetat und 200 ccm Wasser nach Zusatz von einem ganz kleinen Stückchen Zink (um ein ruhiges Kochen zu erzielen) auf dem Drahtnetz in einem Kolben aus Jenaglas 8—8½ Stunden gekocht. Das ausgeschiedene Schwefelblei wird auf einem Asbestfilter gesammelt, mit reiner sehr verdünnter Natronlauge möglichst schnell und so lange ausgewaschen, bis das Filtrat schwefelsäurefrei und die Mutterlauge entfernt ist, und nun nach Zusatz von Salpetersäure mit Bromwasser oxydiert. Das Zinkstückchen wird für sich in Salpetersäure gelöst und mit der übrigen Lösung vereinigt. Den nach Eindampfen auf dem Wasserbade hinterbleibenden Rückstand nimmt man mit reinem Natriumcarbonat und etwas Wasser auf, führt ihn in einen Silber- oder Nickeltiegel über, trocknet ein und erhitzt über der Weingeistflamme. Jetzt wird mit Wasser ausgelaugt, das Ungelöste noch einmal mit Sodalösung erwärmt und mit Wasser ausgewaschen. Das Filtrat versetzt man mit Bromwasser, übersättigt mit reiner Salzsäure und trocknet auf dem Wasserbade ein. Den Rückstand nimmt man mit nicht zu wenig Salzsäure und Wasser auf, filtriert und verfährt weiter unter Innehaltung der § 550a gemachten Angaben. Es ist darauf zu achten, daß das Bariumsalz weiß ist; bei Gegenwart von Blei ist es gelblich. Das Blei muß in diesem Fall durch Umschmelzen mit Soda entfernt werden.

Bestimmung des bleischwärenden Schwefels.

#### *Phosphorsäure\*).*

553. Alkalimetrische Bestimmung nach A. Neumann<sup>2)</sup>. Prinzip: Der nach bestimmter Vorschrift erzeugte und völlig ausgewachsene gelbe Niederschlag von phosphormolybdänsäurem Ammoniak hat die Zusammensetzung 2 (NH<sub>4</sub>)<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> · 24 MoO<sub>3</sub> · 4 HNO<sub>3</sub> und wird durch Natronlauge nach der Gleichung 2 (NH<sub>4</sub>)<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> · 24 MoO<sub>3</sub> · 4 HNO<sub>3</sub> + 56 NaOH = 2 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 24 Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> + 4 NaNO<sub>3</sub> + 32 H<sub>2</sub>O + 6 NH<sub>3</sub> zerlegt. Entfernt man das Ammoniak nach Zusatz von überschüssiger Natronlauge durch Kochen, so kann man mittels Phenolphthalein als Indicator, gegen das Dinatriumphosphat neutral reagiert, durch Säure zurücktitrieren und so genau ermitteln, wieviel Natronlauge zur völligen Neutralisation des gelben Niederschlages erforderlich ist. Verwendet man zweckmäßig zur Titration  $\frac{1}{2}$ -Lösungen, so entspricht jedem Kubikzentimeter verbrauchter  $\frac{1}{2}$ -Natronlauge 1,268 mg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, wie aus folgender Betrachtung sich ergibt: Nach obiger Gleichung entsprechen 56 Mol. Natronlauge 1 Mol. P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>; mithin 56 l n-Natronlauge 142 g P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> oder 1 ccm  $\frac{1}{2}$ -Natronlauge 1,268 mg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.

Alkalimetrische Phosphorsäurebestimmung.

Erforderliche Lösungen. 1. 50proz. Ammonnitratlösung. 2. 10proz. in der Kälte hergestellte und filtrierte Ammonmolybdatlösung. 3.  $\frac{1}{2}$ -Natronlauge und  $\frac{1}{2}$ -Schwefelsäure (§ 16). 4. 1proz. alkoholische Phenolphthaleinlösung.

Substanzmenge. Es ist zweckmäßig die Menge so zu wählen, daß sie nicht mehr als 50 mg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (= etwa 22 mg P) enthält, weil man sonst unnötig viel von den Normallösungen gebraucht und die Bestimmungen selbst bei 15 mg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (= 6—7 mg P) noch sehr zuverlässige Resultate geben. Nach Gregersen lassen sich noch kleinere Mengen bestimmen\*\*).

Ausführung). Die Veraschung\*\*\*) wird nach § 528 ff. vorgenommen, aber zweckmäßig so, daß man gleich im Anfang 20 ccm Säuregemisch zusetzt, dann

\*) D. h. die in anorganischer und organischer Bindung vorhandene. Enthält die Substanz keine Phosphate, so ist das Resultat auf organisch gebundene Phosphorsäure zu beziehen.

\*\*) Über die Bestimmung siehe Kleinmann, Biochem. Zeitschr. Bd. 99, S. 99. 1919.

\*\*\*) Soll die Bestimmung in rein anorganischer Lösung vorgenommen werden, so fügt man 20 ccm Säuregemisch hinzu und verfährt wie oben. Die Gesamtmenge der Flüssigkeit soll auch hier 250 ccm betragen und 10 ccm konzentrierte Schwefelsäure und 15% Ammonnitrat enthalten.

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 34, S. 207. 1902.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 37, S. 129. 1902/03; Bd. 43, S. 35. 1904/05.

Um die Verbesserung der Methode hat sich Gregersen (Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 53, S. 453. 1907) sehr verdient gemacht. Seine Ermittlungen sind bei der Beschreibung berücksichtigt. Vgl. auch Iversen: Biochem. Zeitschr. Bd. 104, S. 15. 1920.

nur noch konzentrierte Salpetersäure tropfenweise zugibt und nach Beendigung der Veraschung den Überschuß an Salpetersäure durch Kochen entfernt. Nach Abkühlung fügt man etwa 140 ccm Wasser hinzu, 75 ccm Ammonnitrat und dann so viel Wasser, daß die Gesamtmenge 250 ccm beträgt. (Die Flüssigkeit enthält nun 10 ccm konzentrierte Schwefelsäure und 15 % Ammonnitrat.) Man erwärmt jetzt auf 70—80°, d. h. bis gerade Blasen aufsteigen, und fügt Ammonmolybdat\*) hinzu, und zwar bei einem Phosphorgehalt von 10 bis 20 mg 40 ccm, bei einem Phosphorgehalt von 4—10 mg 20 ccm.

Handelt es sich darum, noch weniger Phosphor zu bestimmen (ein paar Milligramm und noch weniger), so verwendet man zur Veraschung nur 10 ccm Säuregemisch und unternimmt die Fällung (mit 20 ccm Ammoniummolybdat) in einem Volum Flüssigkeit von 50 ccm, welche 15 ccm Ammonnitratlösung, also 15% Ammonnitrat enthalten.

Würden bei der Veraschung mehr als 40 ccm Säuregemisch verwendet, so ist die Verdünnung mit Wasser in demselben Verhältnis zu steigern und so viel Ammonnitratlösung zuzufügen, daß in jedem Fall der fünfte Teil der Gesamtflüssigkeit aus 50proz. Ammonnitratlösung besteht.

Man schüttelt den entstandenen Niederschlag von phosphormolybdänsaurem Ammoniak etwa  $\frac{1}{2}$  Minute gründlich durcheinander, wodurch er sich körniger abscheidet, und läßt 15 Minuten in einem Stativring stehen.

Das Filtrieren und Auswaschen geschieht durch Dekantieren. (Man verwendet Faltenfilter mit einem Durchmesser von 10—12 cm aus dünnem, am besten aschefreiem Filtrierpapier, welches beim späteren Auflösen des Niederschlags in verdünnter Natronlauge leicht zerreißt und sich durch die ganze Flüssigkeit verteilt.) Vor dem Filtrieren wird das Filter mit eiskaltem Wasser gefüllt, um die Filterporen zusammenzuziehen und so zu verhindern, daß die noch warme Lösung infolge des äußerst feinen Niederschlags nicht ganz klar filtriert. Um bequem zu dekantieren, legt man den Kolben auf einen Stativring etwas höher als das Filter und läßt durch Neigen des Kolbenhalses die klare Flüssigkeit ohne Unterbrechung durch das Filter fließen, indem man den Zufluß nach dem Abfluß reguliert. Auf diese Weise kann man erreichen, daß nur sehr wenig Niederschlag auf das Filter kommt, welches stets nur bis zu  $\frac{2}{3}$  seines Volumens gefüllt wird. Das Auswaschen geschieht in der Weise, daß man zu dem im Kolben zurückgebliebenen Niederschlage unter vollständiger Bepflügelung der Kolbenwandungen etwa 150 ccm eiskaltes Wasser setzt, heftig durchschüttelt und in dem Stativringe absitzen läßt. Währenddessen wird auch das Filter 1—2 mal mit eiskaltem Wasser\*\*) gefüllt. Man dekantiert dann wieder, wie oben beschrieben, und wiederholt das Auswaschen mit eiskaltem Wasser etwa 3—4 mal, bis das Waschwasser und das Filter (besonders auch der Filterrand) gerade nicht mehr gegen Lackmuspapier sauer reagiert. Nunmehr gibt man das ausgewaschene Filter in den Kolben hinein zu der Hauptmenge der Fällung, fügt etwa 150 ccm Wasser hinzu, zerteilt durch heftiges Schütteln das Filter durch die ganze Flüssigkeit und löst den gelben Niederschlag durch  $\frac{1}{2}$ -Natronlauge, die man aus einer Bürette unter beständigem Umschütteln und ohne Erwärmen in kleinen gemessenen Portionen hinzufügt, und zwar nur gerade so viel, als gerade für die Lösung nötig ist. Sodann wird noch ein Überschuß von 4,0 ccm zugefügt und die Flüssigkeit so lange (etwa 15 Minuten) gekocht, bis mit den Wasserdämpfen kein Ammoniak\*\*\*) mehr

\*) 40 ccm Ammonmolybdat reichen aus für 60 mg  $P_2O_5$  (= 26,25 mg P).

\*\*) Nach Kleinmann soll man zum Auswaschen eiskalten 50proz. Alkohol verwenden. Biochem. Zeitschr. Bd. 99, S. 95. 1919.

\*\*\*) Bang (Biochem. Zeitschr. Bd. 32, S. 443. 1911) empfiehlt, das Ammoniak durch Zusatz von Formol zu beseitigen. Ob das ohne Einfluß auf die Genauigkeit der Methode ist, ist noch festzustellen.

entweicht (Prüfung mit feinstem Lackmuspapier). Nach völligem Abkühlen unter der Wasserleitung, Ergänzung der Flüssigkeitsmenge auf etwa 150 ccm und Zufügen von 6—8 Tropfen Phenolphthalein titriert man mit  $\frac{1}{2}$ -Säure zurück, setzt, nachdem gerade Entfärbung eingetreten ist, noch höchstens 0,5—1 ccm Säure hinzu, kocht auf (um Kohlensäure zu entfernen) und führt die Titrierung zu Ende.

**Berechnung.** Die Anzahl der zugefügten Kubikzentimeter  $\frac{1}{2}$ -Natronlauge abzüglich der verbrauchten Kubikzentimeter  $\frac{1}{2}$ -Säure ergeben mit 1,268 multipliziert die Menge  $P_2O_5$  in Milligrammen oder mit 0,554 multipliziert die Menge P in Milligrammen.

554. **Durch Wägung als Magnesiumpyrophosphat\*).** Die Substanz wird mit Soda-Salpetermischung (2—3 Tl. Salpeter, 1 Tl. reinster trockener Soda) verbrannt, und zwar nimmt man z. B. auf 1 g trockenes und pulverisiertes Fleisch oder 1 g trockene Faeces 20 g. Das gut gemischte Material wird in einer Platinschale vorsichtig verbrannt, wobei es zweckmäßig ist, gegen Ende der Operation die Schale mit der Zange in die Flamme zu halten. Man löst die Schmelze in Wasser, bringt die Lösung in einen Kolben, fügt 20—25 ccm Salpetersäure (spez. Gew. 1,2) bis zur stark sauren Reaktion hinzu, erhitzt bei aufgesetztem Trichter auf dem Sandbad so lange, bis die Gasentwicklung völlig aufgehört hat, führt die Flüssigkeit in eine Porzellanschale über, dampft bis auf etwa 100 ccm ein, fügt 10 g Ammonnitrat und 50 ccm Molybdänlösung (s. Anh.) hinzu, läßt bis zum nächsten Tage bei Zimmertemperatur stehen, filtriert durch ein kleines Filter, wobei der gelbe Niederschlag (phosphormolybdänsaures Ammoniak) möglichst in der Schale bleibt, und wäscht Schale und Filter einige Male mit einer Lösung nach, welche in 1 l 150 g Ammonnitrat und 10 ccm Salpetersäure (spez. Gew. 1,2) enthält. Man löst den Rückstand in der Schale mit verdünntem Ammoniak (1 : 6) unter Erwärmen, filtriert die Lösung durch dasselbe Filter in ein Becherglas und wäscht Schale und Filter mit Ammoniak nach. Jetzt bringt man zu der Lösung, die höchstens 100 ccm, besser weniger, betragen soll, so lange Salzsäure, bis sich wieder der gelbe Niederschlag auszuscheiden beginnt, dann etwa  $\frac{1}{4}$  des Volumens konzentriertes Ammoniak und 10 ccm Magnesiummischung (Anh.). Man filtriert am nächsten Tage, bringt den Niederschlag (Magnesiumammoniumphosphat) mit Hilfe des Filtrats völlig auf ein aschefreies Filter, wäscht so lange mit verdünntem Ammoniak (1 : 6) aus, bis eine Probe von Salpetersäure + Silbernitrat nicht mehr oder nur ganz leicht getrübt wird, trocknet und glüht in einem gewogenen Tiegel stark. Das Magnesiumpyrophosphat muß weiß oder ganz leicht grau aussehen. Gelingt es durch Glühen allein nicht das zu erreichen, so bringt man ein wenig Salpetersäure (spez. Gew. 1,2) darauf, trocknet und glüht nochmals.

1 Tl.  $Mg_2P_2O_7$  entspricht 0,6379 1 Tl.  $P_2O_5$  oder 0,2787 P.

**Mikromethoden.** Über die gravimetrische Methode von Embden, mit der ein Phosphorgehalt von 0,5—1,5 mg genau bestimmt werden kann, s. § 697. Für noch kleinere Mengen bis zu 0,03 mg P sind von Willstätter<sup>1)</sup> Verfahren angegeben worden.

#### *Kieselsäure.*

555. Die Substanz ist in einer Platinschale zu veraschen und die Kohle durch Glühen möglichst vollständig zu entfernen. Man übergießt den Rückstand mit Salzsäure, dampft auf dem Wasserbade ein bis keine sauren Dämpfe mehr entweichen, wiederholt diese Behandlung zweimal, erhitzt dann den Trockenrückstand einige Stunden auf 100°, versetzt nun mit salzsäurehaltigem

\*) Die Darstellung schließt sich der von Salkowski (Praktikum der physiol. und pathol. Chemie. Berlin: Hirschwald 1912, S. 287) gegebenen an.

<sup>1)</sup> Kuhn: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 129, S. 64. 1923.

Wasser und bringt die ungelöst bleibende Kieselsäure auf ein kleines Filter, wäscht gut aus und trocknet.

Man verascht Filter mit Inhalt in einem Platintiegel, raucht mit Schwefelsäure ab, wägt, bringt in den Tiegel Schwefelsäure und Ammoniumfluorid, raucht ab, glüht wieder und wägt. Das Abrauchen mit Schwefelsäure und Ammoniumfluorid wird wiederholt, bis keine Gewichtsabnahme mehr erfolgt. Die Differenz der Gewichte vor und nach dem Abrauchen mit Schwefelsäure und Ammoniumfluorid entspricht der Kieselsäure (Wrede<sup>1</sup>).

### Kohlensäure.

Bestimmung der Kohlensäure.

556. In den Aschen der Organe oder Flüssigkeiten höherer Tiere findet sich nur wenig kohlensaures Salz. Beim Veraschen (§ 525) kann Kohlensäure aus ihren Verbindungen durch Phosphorsäure ausgetrieben und beim Glühen Calciumcarbonat in Calciumoxyd umgewandelt werden. Aschen, in denen Kohlensäure bestimmt werden soll, sind deshalb mit besonderer Vorsicht darzustellen.

Zur Bestimmung der Kohlensäure kann der in Abb. 22 abgebildete Apparat dienen. Die Substanz, deren Kohlensäuregehalt bestimmt werden soll, wird in den Kolben *A* gebracht und etwas ausgekochtes destilliertes Wasser hinzugefügt, so daß nach Aufsetzen des Korkes die Einleitungsrohre mit der Öffnung *a* unter dem Niveau desselben steht. Die Glashähne *c* und *d*

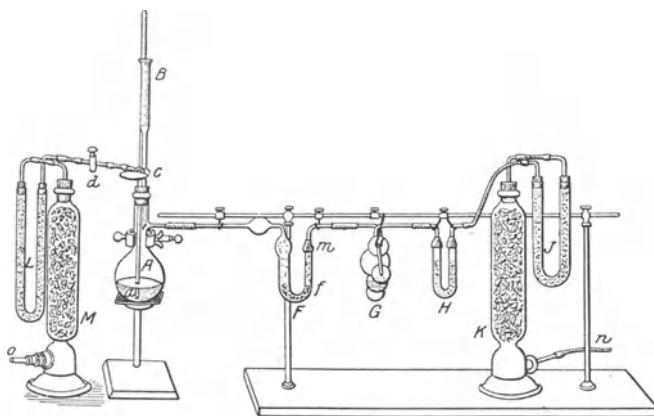


Abb. 22. Apparat zur Bestimmung der Kohlensäure.

Flaschen *K* und *M* enthalten Chlorcalciumstücke und die U-Röhren *J* und *L* feinkörnigen Natronkalk. Diese Apparate *ML* und *KJ* verhindern, daß Kohlensäure und Feuchtigkeit von außen in den Apparat gelangen können, wenn Luft in der einen oder anderen Richtung hineindringt.

Ausführung.

St nun die Substanz mit Wasser in *A* eingebracht und sind die Apparate durch Kautschukröhren miteinander verbunden, die Enden der Röhren *n* und *o* aber offen, so gießt man eine genügende Quantität reine starke Salzsäure in die Glashahnbürette *B*, deren Hahn geschlossen ist und deren verlängertes unteres Ende durch den Kautschukstopfen in den Hals des Kolbens *A* tief hineinragt. Man läßt dann tropfenweise durch vorsichtiges Öffnen des Hahns *c* Salzsäure in den Kolben *A* fallen, bewegt den Kolben etwas, wartet einige Zeit, wenn sich noch Gasblasen aus der Flüssigkeit entwickeln, und läßt dann von neuem einige Tropfen Salzsäure in den Kolben fließen, bis keine weitere Gasentwicklung mehr zu bemerken ist. Jetzt erhitzt man den Kolben *A* sehr langsam, allmählich aber bis zum Sieden der Flüssigkeit, öffnet dann schnell den Hahn *d*, während man die Flamme entfernt, verbindet den Kautschukschlauch *n* mit einem Aspirator und saugt langsam Luft durch die ganze Reihe der Apparate hindurch, bis das aus dem Aspirator abgelaufene Wasser ungefähr das 10—15fache Volumen des Kolbens *A* ausmacht. Dann werden die Kaliapparate *G* und *H* abgenommen und gewogen; ihre Gewichtszunahme ist das Gewicht der in der Substanz enthaltenen Kohlensäure.

Es ist besonders darauf zu achten, daß das Erhitzen der Flüssigkeit im Kolben *A* so langsam geschieht, daß der entweichende Luftstrom langsam durch die Kalilauge geht, daß man nur soweit das Sieden unterhält, bis sich etwas Wasser in der Kugel des Chlorcalciumrohrs *F* niederschlägt, und daß man dann schnell den Hahn *d* öffnet, während man die Flamme entfernt.

Der Apparat kann zu allen erforderlichen Kohlensäurebestimmungen dienen. Die Resultate sind genau und die Operation ist einfach und leicht ausführbar. Die Füllung der Apparate reicht meist für mehrere Bestimmungen aus.

<sup>1</sup>) Mündliche Mitteilung.



**Bestimmung der Gesamtasche.**

557. Wie schon oben (§ 525 u. 526) erwähnt, werden bei der Veraschung tierischer Gewebe und Flüssigkeiten anorganische Verbindungen neu gebildet, oder aus organischen Atomkomplexen frei und fügen sich zu den in den Geweben der Flüssigkeiten vorgebildeten anorganischen Verbindungen hinzu. Aus dem Schwefel der Proteine entsteht Schwefelsäure, aus ihrem Kohlenstoff Kohlensäure, aus dem Eisen der Proteide Eisenoxyd, aus Proteiden und Phosphatiden wird Phosphorsäure frei. Berücksichtigt man weiter, daß die sich so hinzugesellenden starken Säuren aus Mangel an Basen Salzsäure und Kohlensäure austreiben, so ist es klar, daß der Ascherückstand nicht den ursprünglich vorhandenen anorganischen Bestandteilen entspricht. Die Anwesenheit der Proteine und Phosphatide macht also nicht nur die Bestimmung der in den Geweben vorgebildeten Phosphate, Sulfate und Eisensalze unmöglich (indem man sie nur zusammen mit den bei der Veraschung erst entstehenden bestimmen kann), sondern auch die summarische Bestimmung der gesamten vorgebildeten Aschebestandteile. Der Ascherückstand wird um so mehr der richtige Ausdruck dieser vorgebildeten Aschebestandteile sein, je weniger von den genannten organischen Verbindungen in der zu veraschenden Substanz vorhanden ist.

Man verfährt in folgender Weise: Das abgewogene oder abgemessene Ausgangsmaterial wird in einer gewogenen Platinschale getrocknet bzw. eingedampft und in der § 525 angegebenen Weise behandelt, nur mit der Abweichung, daß die wässerigen Kohlenauszüge zu dem stark geglühten Veraschungsrückstand in die Platinschale gegossen und in dieser verdampft werden. Man erhitzt jetzt nochmals kaum bis zum schwachen Glühen, läßt erkalten und wägt. Der erhaltene Wert abzüglich des Gewichts der Platinschale ergibt die Menge der Asche. Man kann auch nach § 527 verfahren.

Will man den wasserunlöslichen und wasserlöslichen Teil der Asche getrennt bestimmen, so stellt man zunächst, wie es im § 525 angegeben ist, zwei Wasserauszüge der Kohle und einen Wasserauszug der Asche her und ermittelt nun einerseits, wie oben angegeben, das Gewicht der bei der Behandlung mit Wasser zurückgebliebenen und nochmals schwach geglühten Asche (wasserunlöslicher Teil), andererseits das Gewicht des beim Verdampfen der vereinigten Wasserauszüge hinterbleibenden und ganz schwach geglühten Rückstandes (wasserlöslicher Teil). Auch hier kann man nach § 527 vorgehen.

**Bestimmung des Gesamtstickstoffs nach Kjeldahl<sup>1)</sup>.**

558. Prinzip. Diese Methode, mit deren Hilfe der Stickstoff in allen Organen, Flüssigkeiten, Bestandteilen und Ausscheidungen des Körpers bestimmt werden kann, beruht auf der quantitativen Überführung des gesamten Stickstoffs in Ammoniak unter gleichzeitiger völliger Zerstörung der organischen Substanz durch Erhitzen mit konzentrierter Schwefelsäure und Bestimmung der Menge des gebildeten Ammoniaks durch Titration. Die zerstörende Wirkung der Schwefelsäure wird begünstigt durch die Anwesenheit von Kaliumsulfat (Gunning, Arnold und Wedemeyer) und von Metalloxyden, z. B. Kupfersulfat (Wilfarth).

Erforderliche Apparate und Lösungen. 1. Rundkolben aus Jenaglas von etwa 750 ccm Inhalt und etwa 15 cm Halslänge oder birnförmiger Jenakolben von 1000 ccm Inhalt und 18 cm Halslänge.

2. Eine Destillationsvorrichtung, wie sie in umstehender Zeichnung (Abb. 23) abgebildet ist: der unter 1 erwähnte Kolben (a) mit Kugelaufsatz (b) zur Verhinderung des Überspritzens, Liebig'scher Kühler, Vorlage (f).

- |  |  |
|--|--|
| 3. Konzentrierte stickstofffreie Schwefelsäure.        | 7. Krystallisiertes stickstofffreies Kaliumsulfat. |
| 4. 33 proz. Natronlauge.                               | 8. Talkum.   |
| 5. $n_{10}$ -Schwefelsäure und $n_{10}$ -Lauge (§ 17). | 9. Methylorangelösung (§ 15).                      |
| 6. Krystallisiertes Kupfersulfat.                      |  |

a) Ausführung im Harn. Man bringt genau abgemessene 5 ccm Harn in den Kjeldahlkolben, fügt etwa 10 ccm konzentrierte Schwefelsäure und ungefähr 0,2 g Kupfersulfat hinzu, erhitzt den in schräger Lage auf dem Drahtnetz unter dem Abzuge liegenden Kolben und gibt, wenn alles Wasser verdampft ist und weiße Schwefelsäuredämpfe sich entwickeln, etwa 5 g Kaliumsulfat hinzu. Man erhält die Flüssigkeit in lebhaftem Sieden, bis sie jede Spur eines gelblichen Farbtones verloren und grün geworden ist, und setzt das

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. analyt. Chem. Bd. 22, S. 366. 1883. Eine Verbesserung erfuhr diese Methode hauptsächlich durch Wilfarth: Zeitschr. f. analyt. Chem. Bd. 24, S. 455. 1885, Gunning, Zeitschr. f. analyt. Chem. Bd. 28, S. 188. 1889 und Arnold u. Wedemeyer: Ebenda Bd. 31, S. 525. 1892.

Kochen dann noch  $\frac{1}{4}$  Stunde fort. Bei Menschenharnen ist im ganzen ein halbstündiges Sieden nötig. Pflanzenfresserharnen erfordern längere Zeit. Nachdem die Flüssigkeit etwas abgekühlt ist, werden unter Bewegung des Kolbens etwa 200 ccm Wasser (zunächst vorsichtig) zugefügt. Jetzt setzt man einige Eßlöffel Talkum hinzu, wischt das am oberen Teil des Halses hängengebliebene Pulver mit einem Tuche heraus und versetzt nun ohne Umschütteln mit so viel starker Natronlauge, als zur Alkalisierung nötig ist. Man vermeide, daß die Natronlauge mit dem oberen Teile des Kolbenhalses in Berührung kommt, da sonst der Stopfen nicht fest sitzt. Die erforderliche Menge der Natronlauge muß bekannt sein; bei Benutzung einer 33proz. Lauge genügen 40—50 ccm. Sobald die Lauge zugefügt ist, verbindet man den Kolben schnell mit dem Kugelaufsatz (b), welcher dazu dient, ein Überspritzen alkalischer Flüssigkeit

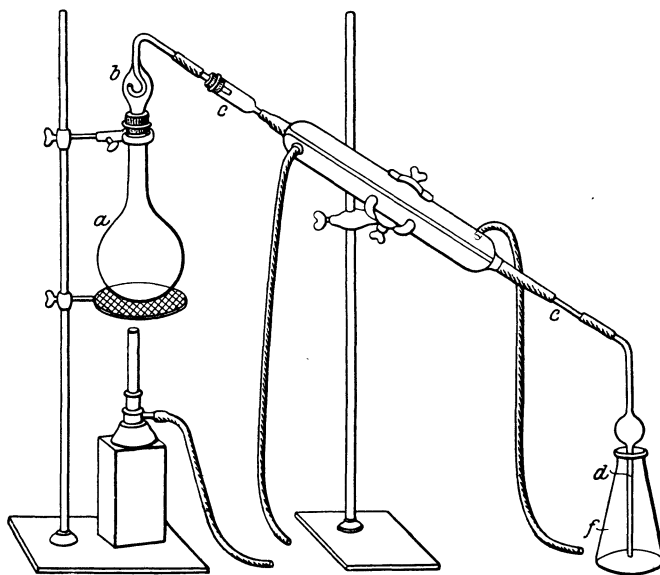


Abb. 23. Apparat zur Bestimmung des Stickstoffs nach Kjeldahl.

während des Destillierens zu verhindern und seinerseits an das vom Liebig'schen Kühler umgebene Destillationsrohr c angeschlossen ist, und zündet sofort den Brenner unter dem Kolben an. Das an das vordere Ende des Rohrs c mittels Gummischlauchs angefügte Glasrohr d, welches eine kugelförmige Erweiterung hat, führt in den Kolben f. In diesen Kolben („die Vorlage“) hat man schon vorher aus einer Bürette 45 ccm  $\frac{n}{10}$ -Schwefelsäure eingebracht. Das Rohr d soll in diese Flüssigkeit eben eintauchen oder wenigstens nahe der Oberfläche enden. Die Destillation geht (wegen

der Anwesenheit des Talkum) ohne Stoßen vor sich und wird unterbrochen, wenn alles Ammoniak übergegangen ist. Um sich davon zu überzeugen, löst man nach etwa 20 Minuten langem Kochen die Gummiverbindung zwischen c und d, fängt einen Tropfen des Destillats auf einem roten Lackmuspapier auf und stellt sofort die Gummiverbindung wieder her. Wird das Papier noch blau gefärbt, so prüft man nach einiger Zeit aufs neue. Zeigt sich keine Andeutung einer Blaufärbung mehr, so löst man die Gummiverbindung, spritzt die innen und außen am Rohre d hängende Flüssigkeit mit der Spritzflasche in den Kolben f, fügt einige Tropfen Methylorangelösung hinzu\*) und titriert mit  $\frac{n}{10}$ -Natronlauge zurück (§ 16). Zieht man die verbrauchten Kubikzentimeter Natronlauge von den verbrauchten Kubikzentimetern Schwefelsäure ab und multipliziert diese Zahl mit 1,401, so erhält man die Menge Stickstoff in Milligrammen, welche in 5 ccm Harn enthalten sind.

Ausführung der Bestimmung in eiweißhaltigen Substanzen, Faeces usw.

b) Ausführung bei eiweißhaltigen Substanzen (Milch, Fleisch, Organen, Brot), bei Faeces usw. Man nimmt von Milch 5 ccm, von frischem Fleisch, frischen Organen, trockenem Brot, getrockneten Faeces je 1 g. Über das Abwägen s. § 12. Zur Zerstörung dieser Substanzen werden etwa 15 ccm konzentrierte Schwefelsäure, 0,2 g Kupfersulfat und (nach Auftreten weißer

\*) Sollte sich hierbei alkalische Reaktion ergeben, so kann man mit  $\frac{n}{10}$ -Säure den Überschuß an Ammoniak ermitteln. Ein Verlust an Ammoniak hat nicht stattgefunden.

Schwefelsäuredämpfe) 7—8 g Kaliumsulfat verwandt. Bei kohlenhydrathaltigen Stoffen wie Milch, Brot ist es zur Verhinderung eines Überschäumens nötig, zunächst vorsichtig zu erwärmen und erst allmählich die Flamme zu vergrößern. Der Zerstörungsprozeß erfordert in diesen Fällen meist längere Zeit als beim Harn, auch empfiehlt es sich, nachdem jede Spur eines gelblichen Farbtones verschwunden ist, das Kochen noch  $\frac{1}{2}$  Stunde fortzusetzen. Zur Alkalisierung sind 60—70 ccm der 33proz. Natronlauge erforderlich. Die Menge der vorzulegenden  $\frac{n}{10}$ -Schwefelsäure richtet sich nach dem Stickstoffgehalt der zu untersuchenden Substanzen; bei Anwendung der oben genannten Mengen werden 45 ccm ausreichen. Im übrigen geschieht die Ausführung wie oben beschrieben.

Sind der zu untersuchenden Substanz größere Mengen von anorganischen Stoffen, z. B. Phosphorwolframsäure, Bariumsulfat beigemischt, so findet während des Kochens mit Schwefelsäure ein starkes Stoßen und infolgedessen leicht ein Zerspringen des Kolbens statt. Für solche Fälle empfiehlt Siegfried einen Apparat, bei dem der Kolben während des Aufschließens in ständiger Bewegung gehalten wird. Beschreibung und Abbildung s. bei Siegfried<sup>1)</sup>.

Mikrokjeldahlverfahren s. § 698.

Ausführung der Bestimmung bei starkem Stoßen der Flüssigkeit.

Mikrokjeldahlverfahren.

### Bestimmung des Kohlenstoffs nach Messinger<sup>2)</sup>.

559. Prinzip. Bei der Verbrennung organischer Substanzen mit Chromsäure-Schwefelsäuregemisch wird der Kohlenstoff zu Kohlensäure und Kohlenoxyd, der Stickstoff zu Ammoniak, der Schwefel zu Schwefelsäure; aus den etwa anwesenden Halogenverbindungen entsteht Halogen. Das Ammoniak wird durch die Schwefelsäure gebunden. Das aus Kohlensäure, Kohlenoxyd und Halogen bestehende Gasgemenge leitet man über glühendes Kupferoxyd, welches Kohlenoxyd zu Kohlensäure oxydiert, und über gekörntes Bleidioxid, welches Halogen bindet. Die Kohlensäure wird in einer gemessenen Menge titrierten Barytwassers aufgefangen und titrimetrisch bestimmt oder, nachdem sie vorher getrocknet ist, in einem gewogenen Kaliapparat aufgefangen und durch Wägung bestimmt. Aus der Menge der so gefundenen Kohlensäure berechnet man den Kohlenstoff.

Bestimmung des Kohlenstoffs nach Messinger.

Wegen der Ausführung dieses Verfahrens s. auch Tangl und Kereszty<sup>3)</sup> sowie besonders Mancini<sup>4)</sup> und Stepp<sup>5)</sup>, welche mit ihm den Restkohlenstoff des Blutes bestimmten, ferner Freund und Botstiber<sup>6)</sup>.

## Untersuchung des Harns.

(Bearbeitet\*) von K. Felix-Heidelberg und R. E. Groß-Heidelberg.)

### Allgemeines.

560. Bestandteile. Der Harn des Menschen und der Wirbeltiere mit Ausnahme der Vögel und beschuppten Amphibien stellt im wesentlichen eine wässrige Lösung von Harnstoff und anorganischen Salzen, hauptsächlich Chlornatrium, dar. Bei einer großen Anzahl von Pflanzenfressern, besonders pflanzenfressenden Säugetieren, finden sich neben Harnstoff noch reichliche Quantitäten von Hippursäure, die aber bei Menschen und Fleischfressern nur in geringer Menge vorhanden ist und auch ganz fehlen kann. Der Harn der Vögel und beschuppten Amphibien besteht aus einem Brei von Harnsäure und harnsauren Salzen, in dem meist nur Spuren von Harnstoff vorhanden sind. Außerdem enthält der Harn eine große Anzahl anderer Stoffe in geringer, zum Teil sehr geringer Menge.

\* \*) Die Bearbeitung von K. Felix umfaßt die §§ 568—596, die von R. E. Groß die §§ 560—567 und 597—629.

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 41, S. 1. 1904.

<sup>2)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 21, 2, S. 2910. 1888; Bd. 23, 2, S. 2756. 1900.

<sup>3)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 32, S. 266. 1911. <sup>4)</sup> desgl. Bd. 26, S. 149. 1910.

<sup>5)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 87, S. 135. 1918. <sup>6)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 136, S. 142. 1923.

Normale Harnbestandteile.

Im normalen Harn des Menschen und der Säugetiere sind bis jetzt nachgewiesen worden:

Von anorganischen Stoffen: Salzsäure, Phosphorsäure, Schwefelsäure, Spuren von Salpetersäure, gebunden an Natrium, Kalium, Calcium, Magnesium. Bei vegetabilischer Nahrung kann sich auch Calciumcarbonat finden.

Von organischen Stoffen: niedere und höhere Fettsäuren, Oxalsäure, Acetaldehyd, Aceton, Glycerinphosphorsäure, Glucose (Spuren), Milchzucker (bei Wöchnerinnen), Carbaminsäure, Harnstoff, Oxalursäure, Allantoin (reichlicher im Fötalzustande und einige Tage nach der Geburt), Methylguanidin, Dimethylguanidin, Vitiatin, Kreatinin (Kreatin), Harnsäure, Purinbasen, Rhodanwasserstoff, Cholin (?), Trimethylamin, Novain (wohl identisch mit Carnitin), Reductonovain, Gynesin, Mingin, Glykokoll, Taurocarbaminsäure (?), Cystin (?), Histidin, Imidazolaminoessigsäure, Methylpyridin, Inosit, Hippursäure, Phenacetursäure (?), p-Oxyphenylessigsäure, Hydro-p-cumarsäure, Indolessigsäure, gepaarte Schwefel- und gepaarte Glucuronsäuren, Chondroitinschwefelsäure, Harnfarbstoffe, organische Eisenverbindungen, Oxy-, Antoxy-, Alloxyproteinsäure, Uroferrinsäure, Harnmucoïd, Fermente (proteolytische, Diastase, Lipase).

Pathologische Harnbestandteile.

Unter pathologischen Verhältnissen sind im Harn außerdem gefunden worden: Milchsäure, Aceton, Acetessigsäure,  $\beta$ -Oxybuttersäure, Fette, Heptose, Glucose (große Mengen), Fructose, Arabinose, Lecithin, Putrescin, Cadaverin, Ptomaine, Leucin, Cystin, Oxyphenylmilchsäure, Tyrosin, Homogentisinsäure, Cholesterin, Cholsäure, Glyko- und Taurocholsäure, Hämatin, Hämatoporphyrin, Gallenfarbstoffe, Melanine, Eiweißstoffe, Blutfarbstoffe, Methämoglobin.

**Geruch.** Dehn und Hartmann<sup>1)</sup> haben aus dem normalen Harn ein hellgelbes Öl isoliert, das das Geruchsprinzip des Harnes ausmachen soll. Näheres siehe in der Originalarbeit. Auffallende Gerüche treten nach Zufuhr besonderer Stoffe auf (Spargel, Terpentinöl u. a.).

**561. Menge, spezifisches Gewicht und Gefrierpunkt.** Die 24stündige Harnmenge eines erwachsenen Mannes beträgt im Durchschnitt 1500 ccm und das spezifische Gewicht, welches am einfachsten mit dem Aräometer (§ 22) geprüft wird, im Durchschnitt 1017—1020. Die Harnmenge ist vermehrt bei reichlicher Flüssigkeitsaufnahme, verringert bei geringer Wasserzufuhr, beim Schwitzen und bei Diarrhöen. Das spezifische Gewicht, welches mit der Harnquantität fällt und steigt, kann zwischen 1000 und 1050 schwanken. Ein in reichlicher Menge ausgeschiedener Harn zeigt ein niedriges, ein in geringer Menge ausgeschiedener ein hohes spezifisches Gewicht. Eine Ausnahme findet beim Diabetes statt, bei dem viel Harn mit hohem spezifischen Gewicht sezerniert wird. Der Gefrierpunkt des Harns schwankt zwischen  $-0,075$  und  $-2,6^\circ$ , für gewöhnlich zwischen  $-1,3$  und  $-2,3^\circ$ . Der Harn ist also im allgemeinen gegenüber dem Blut hypertonisch.

**Konsistenz.** Die Konsistenz des Harns von Menschen und den meisten Säugetieren ist die einer gut tropfbaren Flüssigkeit; er besitzt weder Zähigkeit noch Klebrigkeit. Bei Blasenkatarrhen wird er zuweilen durch reichliche Beimengung von Schleim oder auch Eiweiß gallertig. Geschüttelt bildet der normale menschliche Harn weißen Schaum, der in der Ruhe alsbald wieder verschwindet; bei Anwesenheit von Eiweiß oder viel Schleim ist der Schaum feinblasig und beständig.

Eine eigentümlich zähe, schleimige Beschaffenheit zeigt häufig bei völliger Klarheit der Pferdeharn, so daß er beim Ausfließen aus einem Gefäß sich in langen Fäden hinabzieht. Beim Kochen wird dieser Harn unter Ausscheidung von Calciumcarbonat und Abnahme seiner Zähigkeit getrübt.

<sup>1)</sup> Journ. of the Americ. chem. soc. Bd. 36, S. 403. 1914.

562. **Klarheit.** Der frisch gelassene normale Harn von Menschen und fleischfressenden Säugetieren erscheint klar und durchsichtig, setzt aber nach kürzerem oder längerem Stehen ein Wölkchen (Nubecula) ab, welches aus Harnmucoid (S. 472) besteht, und in dem Epithelzellen und (beim Menschenharn meist) bald einzelne mikroskopische Oktaeder von Calciumoxalat nachzuweisen sind. Bei reichlicher Anwesenheit von Uraten trübt sich der klar gelassene menschliche Harn beim Abkühlen auf Zimmertemperatur und es kommt zur Abscheidung des Sedimentum lateritium (S. 172), das beim gelinden Erwärmen sofort wieder verschwindet. Ein trüber Harn kann nach vegetabilischer Nahrung ausgeschieden werden. Diese Trübung ist verursacht durch die Abscheidung von Carbonaten der alkalischen Erden und bedingt durch die alkalische Reaktion des Harns (s. § 565). Zusatz von Säuren macht den Harn wieder klar. Aus demselben Grunde ist der Harn der Pflanzenfresser meist mehr oder weniger trübe.

Der in reinem Gefäße aufgefangene und bei kühler Temperatur aufbewahrte Harn hält sich mehrere Tage ziemlich unverändert, allmählich aber wird er unter dem Einfluß von Mikroorganismen, welche Harnstoff in Kohlensäure und Ammoniak zerlegen, alkalisch und infolgedessen trübe. Das gebildete Ammoniak gibt sich durch den Geruch und dadurch zu erkennen, daß ein angefeuchtetes und über den Harn gehaltenes rotes Lackmuspapier blau wird, beim Trocknen aber seine blaue Farbe wieder verliert. Erfolgt diese ammoniakalische Harn gärung schon in der Blase (Blasenkatarrh), so wird ebenfalls ein trüber Harn gelassen, der sich aber durch den Geruch und das Verhalten zu Lackmuspapier ohne weiteres von einem Harne, dessen trübe Beschaffenheit durch fixes Alkali bedingt ist, unterscheiden läßt.

Über die Untersuchung der Sedimente, welche trübe gelassene oder trübe gewordene Harne bilden, s. § 625 ff.

563. **Linksdrehung, Fluorescenz.** Fast alle Harne von Menschen und Säugetieren zeigen Linksdrehung und die meisten eine merkliche, wahre, weißliche Fluorescenz, die noch nicht auf einen bestimmten Stoff hat zurückgeführt werden können.

Takayasu<sup>1)</sup> fand von 100 normalen (24 Stunden mit Hefe behandelten Harnen) 7 ohne Linksdrehung, 84 mit einer Linksdrehung bis zu 0,1% (auf Traubenzucker bezogen) und 9 mit einer Linksdrehung von 0,1—0,22%. Der Pferdeharn zeigt eine stärkere Linksdrehung als der menschliche (Porcher<sup>2)</sup>).

564. **Farbe.** Die Farbe des normalen Harns von Menschen und fast allen Tieren, soweit dieselben überhaupt flüssigen Harn liefern, ist ein mehr oder weniger gesättigtes Gelb. (Pferde- und Rinderharn ist fast immer dunkler, bräunlich, gefärbt.) Die Intensität der gelben Farbe geht im allgemeinen Hand in Hand mit der Konzentration. Ein konzentrierter Harn von hohem spezifischen Gewicht hat eine dunkler gelbe, ein verdünnter mit niedrigem spezifischen Gewicht eine heller gelbe Farbe. Eine Ausnahme macht der diabetische Harn, der trotz seines hohen spezifischen Gewichts hellgefärbt ist. Beim Eindampfen in der Hitze wird die Farbe meist dunkler, als der zunehmenden Konzentration entspricht; auch beim Stehen kann die gelbe Farbe dunkler bis hellbraun werden.

Eine dunkle, bräunliche bis fast schwarze Färbung zeigen alle Harne, welche reich an aromatischer Substanz (gepaarte Schwefel- und Glucuronsäuren) sind. Sie ist bedingt durch Zersetzungsprodukte dieser an sich farblosen aromatischen Stoffe. Solche Dunkelfärbung wird besonders beobachtet nach Einführung von Phenol, Kresol, Brenzcatechin, Gerbsäure, Indol. Einen dunklen

<sup>1)</sup> Zentralbl. f. inn. Med. 1908, S. 337.

<sup>2)</sup> Ref. Biochem. Zentralbl. Bd. 1, S. 101. 1903.

Harn können auch Kranke mit melanotischen Tumoren ausscheiden. Derartige Harne können auch hell gelassen werden und beim Stehen eine dunkle Farbe annehmen. Die Farbe kann aber auch hell bleiben. Ein Dunklerwerden beim Stehen an der Luft erfährt der Harn auch bei Alkaptonurie (§ 216).

Eine gelbgrüne, grüne oder braune Färbung zeigt der Harn bei Ikterus wegen seines Gehalts an Gallenfarbstoffen.

Eine rötliche, gelbrote, braunrote oder braune Färbung kann auch bedingt sein durch einen Gehalt an Hämoglobin, Methämoglobin oder Hämatoporphyrin; Rotfärbung auch durch Anwesenheit von Blut, das sich durch im Sediment vorhandene rote Blutkörperchen erkennen läßt, ferner durch vermehrten Gehalt an Urobilin, Urorosein, wie das bei fieberhaften Krankheiten und Digestionsstörungen vorkommt.

Auch nach Genuß von Chrysophansäure (Rhabarber, Sennesblätter) erscheint der Harn rot, aber nur wenn er alkalisch reagiert; auf Zusatz überschüssiger Säure wird er goldgelb.

Eine blaue Färbung oder auch ein blaues Häutchen mit rotem metallischen Glanz oder ein Sediment von dieser Farbe wird im Harn wohl nur durch Bildung von Indigo aus Indoxylschwefel- oder -glucuronsäure erzeugt. Der frische Harn zeigt nie diese Färbung.

**565. Reaktion.** Die Reaktion des Harns ist im ganzen abhängig von der Nahrung. Fleischfresser sondern einen gegen Lackmus sauren, Pflanzenfresser einen neutralen oder alkalischen Harn ab. Während des Hungerns reagiert der Harn in allen Fällen sauer. Der Harn des Menschen ist bei gemischter Kost sauer, der einige Stunden nach einer reichlichen Mahlzeit gelassene schwächer sauer oder alkalisch wegen der Sekretion des freien Salzsäure enthaltenden Magensaftes.

Beim Stehen des Harns an der Luft wird die Reaktion allmählich alkalisch durch Ammoniak, welches durch Einwirkung von Mikroorganismen aus dem Harnstoff entsteht. Diese bakterielle Ammoniakbildung kann unter pathologischen Verhältnissen (Blasenkatarrh) auch schon in der Blase erfolgen.

Ein ammoniakalischer Harn verliert beim Sieden Ammoniak und wird sauer. Kleine Mengen in flacher Schale werden oft schon an der Luft sauer. Ein durch Eintauchen in den Harn blaugewordenes Lackmuspapier nimmt beim Trocknen an der Luft seine rote Farbe wieder an.

Die saure Reaktion ist bedingt durch die Wasserstoffionen, welche von allen im Harn vorkommenden dissoziierenden anorganischen und organischen Säuren stammen, die alkalische durch die Hydroxylionen, welche von fixen Alkalien und auch von Ammoniak herrühren können.

Unter Acidität versteht man zweierlei: 1. Die Acidität im physikalisch-chemischen Sinne (Ionenacidität), welche durch die Menge der im Harn enthaltenen Wasserstoffionen bedingt ist (sie gibt sich durch die „saure Reaktion“ des Harns zu erkennen). Die aktuelle Reaktion des Harns schwankt zwischen etwa  $p_H = 5$  bis  $7$ ; unter  $p_H = 7$  sinkt sie sehr selten. Man bestimmt die Wasserstoffionenkonzentration am sichersten nach der Methode der Gasketten, wesentlich leichter und für die meisten Zwecke genügend genau nach der vereinfachten Indicatorenmethode von Michaelis<sup>1)</sup>.

2. Die Acidität im chemischen Sinne (Titrationsacidität), welche durch die Gesamtheit der durch Metall vertretbaren Wasserstoffatome bedingt ist. Zwischen beiden Größen brauchen keine einfachen Beziehungen zu existieren, denn je nach der Relation zwischen leichter und schwerer dissoziierenden Säurebestandteilen kann eine hohe Titrationsacidität mit einer relativ niedrigen Ionenacidität einhergehen und umgekehrt, und tatsächlich existiert häufig, vielleicht in den meisten Fällen, kein Parallelismus (Höber<sup>2)</sup>).

**Bestimmung der Titrationsacidität.** Für die Bestimmung gibt es keine ganz genaue Methode. Man benutzt am besten die Titration mit Phenolphthalein als Indicator (Naegeli<sup>3)</sup>, Vozarik<sup>4)</sup>, welche wenigstens untereinander

<sup>1)</sup> Dtsch. med. Wochenschr. Bd. 47, S. 465 u. 673. 1921.

<sup>2)</sup> Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 3, S. 525. 1903.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 30, S. 313. 1900.

<sup>4)</sup> Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 111, S. 473. 1906.

vergleichbare Werte liefert, und verfährt nach Vozarik so: man verdünnt eine gemessene Menge Harn (etwa 10 ccm) mit Wasser bis auf helles Weingelb, fügt von einer 1 proz. alkoholischen Phenolphthaleinlösung auf 10 ccm unverdünnten Harn 1 ccm hinzu und darauf  $\frac{1}{10}$ -Lauge, bis ein leichtes, aber deutlich erkennbares Rot während  $\frac{1}{2}$  Minute bestehen bleibt. Der Vergleich mit einer danebenstehenden, ebenso verdünnten und mit der gleichen Indicatormenge versetzten Portion desselben Harns erleichtert das Erkennen der Endreaktion.

**566. Diazoreaktionen.** Ehrlichsche Diazoreaktion. Reagens I: 5 g Sulfanilsäure und 50 ccm konzentrierte Salzsäure werden mit Wasser bis auf 1000 ccm aufgefüllt. Reagens II: 0,5 g Natriumnitrit werden mit Wasser auf 100 ccm aufgefüllt.

**Ausführung.** In einem Reagensglas gibt man zu 10 ccm von Reagens I 2—3 Tropfen Reagens II. Hierzu setzt man die gleiche Menge Harn und  $\frac{1}{4}$  Vol. Ammoniaklösung. Schütteln! Bei positivem Ausfall rein rote Farbe des Harnes und des gebildeten Schaumes. Eine gelbrote Färbung ist nicht charakteristisch.

Die Reaktion findet sich fast immer bei Typhus abdominalis, Masern und im Beginn der Trichinose, oft auch bei schweren, akut verlaufenden Tuberkulosen (und mehreren anderen Krankheiten).

Davon zu unterscheiden ist die

Paulysche Diazoreaktion. Rotfärbung des sodaalkalischen Harnes mit Diazobenzolsulfosäure. Über Herstellung der Lösung s. S. 450. Bei Ansäuerung geht die Farbe in Orange über. Diese Reaktion erhält man auch mit normalem Harn.

Über das Wesen der Diazoreaktionen herrscht noch keine völlige Einigkeit. Nach Weiß<sup>1)</sup> handelt es sich bei der Ehrlichschen Reaktion um den Nachweis von Urochromogen (§ 302), das im normalen Harn nicht vorkommt. Die Arbeiten von Hermanns und Sachs<sup>2)</sup> und Hermanns<sup>3)</sup> hingegen sprechen dafür, daß es sich bei der Ehrlichschen Reaktion nicht um eine einheitliche Substanz, sondern um verschiedene Ausscheidungsprodukte handelt, die mit dem Diazoniumsalz die charakteristischen Färbungen geben. Es gelang diesen Autoren, gut krystallisierende Azofarbstoffe zu isolieren, deren Analysen darauf hinweisen, daß die Ehrlichsche Reaktion auf der Ausscheidung phenolartiger Stoffwechselprodukte verschiedener Art beruht und als Ausdruck eines toxischen Eiweißzerfalles anzusehen ist. Bei der Paulyschen schon im normalen Harn positiven Diazoreaktion kommen nach Engeland<sup>4)</sup> und Fürth<sup>5)</sup> in erster Linie dem Histidin nahestehende durch Kondensationsvorgänge im intermediären Stoffwechsel hervorgegangene Imidazolderivate in Betracht.

**567. Entfernung von Eiweiß aus eiweißhaltigem Harn.** Man erhitzt 100 ccm Harn (neutralen oder alkalischen nach tropfenweisem Zusatz verdünnter Essigsäure bis zur schwach sauren Reaktion) in einer Schale zum Kochen. Erfolgt keine gute flockige Abscheidung des Eiweiß, so fügt man vorsichtig noch einen oder einige Tropfen Essigsäure hinzu. Man kocht noch ein wenig ein, filtriert durch ein kleines Filter in einen Maßzylinder und wäscht Schale und Filter mit kleinen Mengen Wasser so lange nach, bis das (erkaltete) Filtrat gerade 100 ccm beträgt.

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 112, S. 61. 1920.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 114, S. 79 u. 88. 1921.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 122, S. 98. 1922.

<sup>4)</sup> Münch. med. Wochenschr. Bd. 55, S. 1643. 1908; Journ. of the Americ. chem. soc. Bd. 30, S. 1760. 1908; Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 57, S. 49. 1908.

<sup>5)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 96, S. 269. 1919.

### Normale Bestandteile des Harns.

#### Qualitative Prüfung auf anorganische Stoffe im Harne.

568. Die qualitative Prüfung auf die meisten anorganischen Stoffe läßt sich direkt\*) im Harn führen, im eiweißhaltigen nach vorheriger Entfernung des Eiweiß\*\*) nach § 567.

**Natrium.** Natrium wird nachgewiesen durch Abdampfen des Harns und Prüfung einer Probe der auskrystallisierten Salze am Platindraht in der Flamme (§ 38).

**Kalium.** Kalium. Auf Kalium prüft man mit Kobaltnatriumnitrit (Autenrieth<sup>1</sup>), § 37, 3) oder mit Weinsäure, und zwar nach Salkowski<sup>2</sup>), indem man 100 bis 200 ccm Harn auf etwa 15 ccm eindampft, nach dem Erkalten von den harnsauren Salzen abfiltriert, das Filtrat mit 5 ccm konzentrierter Weinsäurelösung versetzt und an einem kühlen Orte stehen läßt (§ 37, 2). Ammoniumsalze geben den gleichen Niederschlag. Sie sind aber im normalen Harn nur in sehr geringer Menge vorhanden. Zur Sicherheit ist der Niederschlag noch spektroskopisch oder mit Hilfe der Flammenreaktion oder nach § 37 auf Kali zu prüfen.

**Calcium und Magnesium.** Calcium und Magnesium werden direkt im Harne nach §§ 39, 1 und 40, 1 nachgewiesen. Der Nachweis des Magnesiums geschieht im klaren Filtrat des Calciumoxalatniederschlags.

**Eisen.** Zum Nachweis des Eisens wird eine größere Menge Harn nach §§ 529 und 530 eingedampft und verascht und die Aschelösung nach dem Erhitzen mit dem 4—5fachen Volumen Wasser mit Rhodan- oder Ferrocyankalium geprüft (§ 42).

**Salzsäure und Schwefelsäure.** Salzsäure und Schwefelsäure werden direkt im Harne nach §§ 45 und 48 nachgewiesen.

**Gepaarte Schwefelsäure.** Gepaarte Schwefelsäure. Man versetzt den Harn mit dem gleichen Volumen einer Barytmischung (2 Vol. kaltgesättigtes Barytwasser und 1 Vol. kaltgesättigte Chlorbaryumlösung), filtriert, neutralisiert das klare Filtrat mit Salzsäure, fügt auf 100 ccm 6 ccm konzentrierte Salzsäure hinzu und kocht (Salkowski). Es scheidet sich ein Niederschlag von Bariumsulfat ab, dessen Schwefelsäure aus der gepaarten Schwefelsäure stammt.

**Phosphorsäure.** Phosphorsäure. Man fügt Essigsäure und Uranylacetatlösung direkt zum Harn hinzu. Es entsteht ein gelblichweißer Niederschlag. Die Phosphorsäure ist zum Teil an alkalische Erden, zum Teil an Alkalien gebunden. Zum getrennten Nachweis fällt man den Harn mit Ammoniak, filtriert den Niederschlag, welcher aus Calciumphosphat und Magnesiumammoniumphosphat besteht und dessen salpetersaure Lösung mit Ammonmolybdat auf Phosphorsäure geprüft werden kann, ab und versetzt das etwas eingedampfte Filtrat, welches die Alkaliphosphate enthält, mit Magnesiummischung (Anh.) (§ 49).

**Salpetersäure.** Salpetersäure. Zum Nachweis der Nitrate<sup>3</sup>), welche, aus der Nahrung (Wasser, Vegetabilien) stammend, in geringer Menge im normalen Harne vorkommen, bei Hunger, Milch- und Fleischnahrung aber fehlen (Röhm ann), destilliert man nach Weyl 200 ccm frischen Harn mit 30 bis 40 ccm konzentrierter Schwefelsäure oder Salzsäure auf dem Sandbade und prüft das Destillat mit den üblichen Reaktionen (Jodkaliumstärkekleister, m-Phenylendiamin oder Sulfanilsäure und

\*) Die meisten der dabei erhaltenen Niederschläge können organische Stoffe (Harnsäure, harnsaures Ammoniak, Hippursäure, Schleim) enthalten. Man prüft auf diese Beimengungen, indem man die Niederschläge auf dem Platinblech glüht.

\*\*) Hierbei bleibt ein Teil der phosphorsauren alkalischen Erden im Koagulum und kann erst nach der Veraschung aufgefunden werden.

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 37, S. 29. 1902/03.

<sup>2</sup>) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 6, S. 209. 1872.

<sup>3</sup>) Schönbein: Journ. f. prakt. Chem. Bd. 92, S. 152. 1864. — Röhm ann: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 5, S. 94 u. 233. 1881. — Weyl: Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. Bd. 96, S. 462. 1884; Bd. 101, S. 175. 1885. Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 36, S. 456. 1885.



$\alpha$ -Naphthylamin) auf salpetrige Säure, welche durch die reduzierend wirkenden organischen Harnbestandteile aus Salpetersäure entstanden ist.

**Salpetrige Säure.** Nitrite<sup>1)</sup> sind im frischen Harn nicht vorhanden, bei beginnender Zersetzung treten sie auf, bei fortschreitender verschwinden sie wieder. Sie entstehen ausschließlich aus den Nitraten, nicht aus Ammoniak (Röhmann). Zu ihrem Nachweis dient die Reaktion mit Jodkaliumstärkelester und Schwefelsäure oder besser die Probe mit Sulfanilsäure und  $\alpha$ -Naphthylamin in essigsaurer Lösung (Bildung eines roten Azofarbstoffes). Der frische Harn gibt, wie gesagt, diese Reaktionen nicht, sie fallen erst bei beginnender Zersetzung positiv aus. Harn, welche salpetrige Säure enthalten, geben nach Adler die Seliwanoffsche Reaktion, d. h. es tritt Rotfärbung auf, wenn man etwa 10 ccm mit einer Messerspitze Resorcin und etwa 3 ccm verdünnter Salzsäure versetzt und zum Sieden erhitzt.

**Kieselsäure** kann nach Salkowski<sup>2)</sup> im Harn auch ohne Veraschen nachgewiesen werden. 500 ccm Harn werden eingedampft und mit Alkohol gefällt. Am nächsten Tage wird der abgesetzte Niederschlag mit Alkohol durchgerührt, auf ein aschefreies Filter gegeben, mit Alkohol gewaschen und mit Äther getrocknet. Der Rückstand auf dem Filter wird in das erste Gefäß zurückgegeben, mit 50 ccm verdünnter Salzsäure verrührt und durch das gleiche Filter filtriert. Es wird mit Wasser so lange nachgewaschen, bis das Filtrat kaum noch sauer reagiert. Die Veraschung des Filters gibt fast reine Kieselsäure.

**Wasserstoffsperoxyd** findet sich im frischen Harn in Mengen, die aus unbekanntem Ursachen schwanken. Beim Stehen des Harns verschwindet es gänzlich, sobald die salpetrige Säure (s. oben) auftritt. Die besten Reagenzien für den Nachweis sind nach Schönbein<sup>3)</sup> verdünnte Indigolösung zusammen mit Eisenvitriollösung oder durch Wasserstoffsperoxydsulfid entfärbte Indigolösung\*), gleichfalls zusammen mit Eisenvitriollösung. 1. Tröpfelt man in 200 g frischen Harn soviel Indigolösung, daß das Gemisch eine deutlich grüne Färbung zeigt, teilt es in zwei gleiche Hälften und fügt zu einer derselben 15—20 Tropfen verdünnte Eisenvitriollösung, so erscheint diese letztere Harnportion infolge teilweiser oder gänzlicher Zerstörung des Indigos bald heller grün oder bräunlich gelb, während die eisensalzfreie Hälfte ihre anfängliche grüne Farbe noch immer zeigt. 2. Läßt man in 30—40 g frischen Harns 8—12 Tropfen der durch Wasserstoffsperoxydsulfid genau entfärbten Indigotinktur fallen, so wird das Gemisch anfangs sich nicht bläuen, dies aber beim Zufügen weniger Tropfen Eisenvitriollösung sofort tun (Schönbein).

#### *Bestimmung der Gesamtasche und des Trockenrückstandes im Harn.*

569. Bestimmung der Gesamtasche. Sie geschieht nach § 557 unter Benutzung von 10 ccm Harn und gibt wenigstens unter normalen Verhältnissen annähernd richtige Werte.

**Bestimmung des Trockenrückstandes.** Wenn man Harn auf dem Wasserbade verdunstet, so erhält man einen sirupartigen Rückstand, der nie völlig trocknet und fortdauernd Spuren von Ammoniak entwickelt. Die Ursache der Ammoniakentwicklung ist die Einwirkung des sauren Natriumphosphats auf den Harnstoff in sehr konzentrierter Lösung; der Harnstoff wird nämlich beim starken Eindampfen der wässrigen Lösung durch dieses Salz zerlegt zu Kohlensäure und Ammoniak, Ammoniak verbindet sich mit dem Phosphat zu  $\text{Na}(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ , aber diese Verbindung zerlegt sich fortwährend wieder bei 100° unter Entwicklung von Ammoniak.

Um nun trotz dieser unvermeidlichen Zersetzung eine Vorstellung vom Trockenrückstand des Harns zu erhalten, hat Neubauer folgende Methode angewendet: Durch ein zylindrisches, aus Blech gefertigtes Wasserbad geht in der Mitte senkrecht zur Achse des Zylinders ein Blechrohr von  $2\frac{1}{2}$ —3 cm Durchmesser, in welches ein Glasrohr eingeschoben werden kann, in dem sich wieder ein Porzellanschiffchen befindet. Das Porzellanschiffchen ist etwa 7—8 cm lang und 1,4 cm breit und zu  $\frac{2}{3}$  mit nicht zu kleinen Glassplittern gefüllt. Die Glasröhre, in der sich das Schiffchen befindet, ist an einem Ende zu einer feineren, längeren Röhre ausgezogen, die rechtwinklig nach abwärts umgebogen durch die eine Bohrung eines doppelt durchbohrten Korkes in einen Kolben führt. Dieser Kolben enthält ein abgemessenes Volumen titrierter Schwefelsäure. Das Rohr mündet unter dem Niveau der Säure; in der zweiten Bohrung des Korkes befindet sich ein Glasröhrchen.

\*) Zur Herstellung dieser Lösung tröpfelt man in durch Indigotinktur bis zur Undurchsichtigkeit tief gebläutes und mit etwas Schwefelsäure versetztes Wasser unter Umrühren vorsichtig eine Lösung von Mehrfachschwefelkalium, bis das Gemisch gerade völlig entbläut erscheint und filtriert. Die Flüssigkeit ist klar und farblos, fängt aber bald an, sich zu trüben und blau zu werden.

<sup>1)</sup> Schönbein: Journ. f. prakt. Chem. Bd. 92, S. 152. 1864. — Röhmann: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 5, S. 94 u. 233. 1881. — Weyl: Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. Bd. 96, S. 462. 1884; Bd. 101, S. 175. 1885. Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 36, S. 456. 1885.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 83, S. 147. 1913.

<sup>3)</sup> Journ. f. prakt. Chem. Bd. 92, S. 168. 1864.

welches den Luftraum im Kolben mit einem Aspirator verbindet. An das andere Ende der Glasröhre, welche das Porzellanschiffchen enthält, ist mittels eines Stopfens eine mit Chlorcalciumstücken gefüllte Röhre angefügt.

Ausführung der Bestimmung.

Man trocknet zunächst das Porzellanschiffchen mit den Glasstücken und wägt es in einer Röhre, die mit einem mit Stanniol überzogenen Korken verschlossen ist, läßt dann genau 2 ccm Harn aus einer feinen Pipette in das Schiffchen fließen, schiebt dies in die oben beschriebene, an einem Ende ausgezogene Röhre, verschließt letztere, heizt das Wasserbad und läßt einen mäßigen Luftstrom etwa 3 Stunden erst durch das Chlorcalciumrohr, dann über das Schiffchen mit Harn, von da durch das Kölbchen mit titrierter Säure hindurchgehen und wägt darauf wieder das Schiffchen mit dem Harnrückstand in demselben Glasrohre, in dem es vor der Einbringung des Harns gewogen war. Man spült nun das Glasrohr, in welchem das Schiffchen erhitzt wurde, mit Wasser aus und läßt dies Spülwasser in das Kölbchen mit Schwefelsäure einfließen, nimmt dann dies Kölbchen ab, bestimmt mit einer titrierten Natronlauge, wieviel Schwefelsäure während des Trocknens durch Ammoniak neutralisiert ist, und berechnet hieraus die Menge des zersetzten Harnstoffes. Der im Schiffchen gewogene feste Rückstand des Harns, addiert zur berechneten Quantität von Harnstoff, gibt dann den wirklichen Ausdruck für das Gewicht der in 2 ccm Harn gelösten Stoffe.

Näheres über diese Methode s. bei Neubauer-Huppert: Analyse des Harns. 11. Aufl. S. 65. 1910.

#### *Bestimmung von Natrium und Kalium im Harn.*

Bestimmung von Natrium und Kalium.

570. 1. Man verascht 20—100 ccm Harn nach §§ 529 und 530 und verfährt weiter nach § 533.

2. Nach Pribram und Gregor<sup>1)</sup>. 50 ccm Harn werden in einem Becherglas von 200—300 ccm Inhalt mit 10—20 ccm 10proz. Bariumpermanganatlösung (je nach Konzentration und Färbung des Harns) und 10 ccm 10proz. Schwefelsäure unter Umrühren bis zum Sieden erhitzt. Verschwindet die Rotfärbung rasch, so fügt man noch kubikzentimeterweise solange Bariumpermanganatlösung hinzu, bis die rote Farbe nach 10—15 Minuten währendem Sieden nur langsam verschwindet. Ein etwaiger Überschuß von Permanganat wird leicht durch einige Tropfen verdünnter Oxalsäurelösung entfernt. Man versetzt jetzt, ohne zu filtrieren, die noch heiße Flüssigkeit mit einer Chlorbariumlösung, macht ammoniakalisch und fällt das überschüssige Chlorbarium mit Ammoniumcarbonat. Die nötige Menge von Chlorbarium und von Ammoniumcarbonat ist leicht zu erkennen, da die Niederschläge sich rasch und schön absetzen. Nach dem Absetzen filtriert man die überstehende klare Flüssigkeit, bringt dann den Niederschlag mit heißem Wasser auch auf das Filter, wäscht mit heißem Wasser chlorfrei und dampft das Filtrat in gewogener Platinschale ein. Nach schwachem Glühen wird gewogen: Natrium + Kaliumchlorid. Das weitere Verfahren ist wie § 533 angegeben.

3. s. § 573.

Bestimmung von Kalium.

Bestimmung des Kaliums nach Autenrieth und Bernheim<sup>2)</sup>. Man versetzt 50 ccm des filtrierten Harns mit 6—10 ccm einer Natriumkobaltinitritlösung (welche man durch Vermischen einer Lösung von 30 g krystallisiertem Kobaltonitrat in 60 ccm Wasser mit 100 ccm einer konzentrierten Natriumnitritlösung und 10 ccm Eisessig und Filtration am nächsten Tage erhält und die mindestens 3 Wochen haltbar ist), schüttelt durch, läßt 6—8 Stunden, am besten bis zum nächsten Tage, stehen, filtriert den Niederschlag von „Kobaltgelb“ durch ein nicht zu kleines, aschefreies Filter, spült mit 40—60 ccm kaltem Wasser, das mit einigen Kubikzentimetern Kobaltreagens versetzt ist, aus (ein vollständiges Auswaschen ist nicht nötig) und trocknet bei 110—120°. Den trockenen Niederschlag löst man möglichst vollständig vom Filter, bringt ihn in eine flache Porzellanschale, verascht das Filter im Platintiegel, zieht die Asche mit heißem Wasser aus und bringt die filtrierte Lösung zum Niederschlag. Nun bringt man tropfenweise und unter gelindem Erwärmen auf dem Wasserbad (Vorsicht wegen Aufschäumens und Herausspritzen!) etwa 10 ccm einer 25proz. Salzsäure in die Schale, welche zweckmäßig mit einem Uhrglas bedeckt wird. Die erhaltene blaue salzsaure Lösung dampft man auf dem Wasserbade zur staubigen Trockne ein, übergießt den Rückstand mit etwas Wasser, dann mit 10 ccm einer 18proz. Überchlorsäure, rührt gut durch, dampft wieder auf dem Wasserbad ein und erhitzt noch so lange, bis reichliche weiße Nebel von Überchlorsäure entweichen und der Rückstand staubtrocken ist. Den Rückstand

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. analyt. Chem. Bd. 38, S. 401. 1899.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 37, S. 29. 1902/03.

rührt man mit etwa 10 ccm eines 96proz. Alkohols, welcher 0,2% Überchlorsäure enthält, gut durch, filtriert durch Goochtiigel (Asbest) und wäscht zunächst mit einigen Kubikzentimetern überchlorsäurehaltigen Alkohols, dann mit einer Mischung gleicher Teile Alkohol und Äther so lange aus, bis eine Probe des Filtrats kaum einen Rückstand hinterläßt. Trocknen bei 120—130° bis zum konstanten Gewicht. Durch Multiplikation mit 0,28247 erhält man die dem Kaliumperchlorat entsprechende Menge Kalium.

*Bestimmung von Calcium und Magnesium im Harn* \*).

571. Calcium.

1. gravimetrisch. Man mißt 200 ccm ab, macht mit Ammoniak alkalisch, bringt den entstandenen, am nächsten Tage abfiltrierten und mit 2—3% ammoniakhaltigem Wasser gewaschenen Niederschlag durch möglichst wenig Salzsäure wieder in Lösung, fügt essigsäures Natrium hinzu und fällt mit Ammonoxalat. Nach 12stündigem Stehen an einem warmen Orte wird der Niederschlag abfiltriert und weiter nach den § 536, a gegebenen Vor-schriften behandelt. Die Bestimmung mit Permanganat ist wegen der organi-schen Beimengungen unzulässig.

Bestimmung von  
Calcium:  
gravimetrisch

2. nephelometrisch nach Lyman<sup>1)</sup> \*\*).

Prinzip. Das Calcium wird zuerst als Oxalat ausgefällt, mit verdünnter Säure wieder aufgelöst, dann mit ricinusölsäurem Kalium gefällt und dieser Niederschlag im Duboscq'schen Colorimeter mit dem in einer bekannten Calciumlösung auf die gleiche Weise erzeugten verglichen.

nephelometrisch.

Erforderliche Lösungen und Apparate. 1. Lösung von ricinusölsäurem Kalium. 15 g Kaliumhydroxyd werden in einer Mischung von 25 ccm Wasser und 100 ccm 95proz. Alkohol aufgelöst, erwärmt und 100 ccm Ricinusöl zugesetzt und gut umgeschüttelt. Dann wird so lange (gewöhnlich 7 Stunden) am Rückflußkühler auf dem Wasserbade erhitzt, bis eine Probe sich vollkommen in Wasser ohne schwimmende Öltropfen löst. Von dieser Stammlösung werden für jeden Gebrauch 35 ccm mit 965 ccm einer Natronlauge, die 9 g Natriumhydroxyd enthalten, gemischt. Die Lösung muß klar und farblos sein. Sie hält nicht länger als eine Woche.

2. 2proz. Lösung von Oxalsäure.

3. Lösung von 10 g kristallisiertem Natriumacetat in 100 ccm Wasser.

4. 0,5proz. Lösung von Ammonoxalat.

5. Vergleichslösung von Calciumoxalat. 0,5475 g Calciumoxalat werden in 1 l 2,5proz. Salzsäure gelöst. 10 ccm enthalten 1,5 mg Ca.

6. 5proz. Salzsäure.

7. Nephelometer<sup>2)</sup>.

Ausführung. Der Harn muß schwach sauer reagieren und filtriert werden. Durch tropfenweises Zugeben von konzentriertem Ammoniak wird schwach alkalisch und dann mit konzentrierter Salzsäure (spez. Gew. 1,20) gerade wieder sauer gemacht. Nach dem Abkühlen werden für je 100 ccm Harn weitere 5 Tropfen Säure zugesetzt. Entsteht beim Alkalischemachen eine Trübung, so kann man diese als Indicator benutzen, sonst Lackmuspapier. Je nach der Stärke der Trübung nimmt man 5, 8 oder 10 ccm Harn, bei gesunden Erwachsenen am besten 8 ccm, und bringt sie in einen kleinen Erlenmeyerkolben, setzt 1 ccm der 2proz. Oxalsäure und 1 ccm der 10proz. Natriumacetatlösung zu, verschließt und schüttelt 10 Minuten. Der Stöpsel wird mit wenig 0,5proz. Ammonoxalatlösung abgespült. Der Inhalt wird in ein Zentrifugenglas gebracht und der Kolben mit 2 ccm Ammonoxalat nachgewaschen. Es wird solange zentrifugiert, bis die überstehende Flüssigkeit vollkommen klar ist (2—3 Minuten). Sorgfältig abgießen! Der Niederschlag wird mit 10 ccm Ammonoxalatlösung gewaschen, wieder zentrifugiert und abgegossen. Nun wird er unter Umrühren mit einem Glasstab in 5 ccm 5proz. Salzsäure gelöst, evtl. unter Erwärmen

\*) Bei Eiweißgehalt verascht man eine gemessene Menge (200 ccm) und verfährt nach § 536 oder man benutzt die Methode von Tisdall u. Kramer (§ 573).

\*\*\*) Siehe dazu die Bemerkungen im Anschluß an die Beschreibung dieser Methode.

<sup>1)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 21, S. 551. 1915.

<sup>2)</sup> Vgl. dazu Kleinmann, Biochem. Zeitschr. Bd. 137, S. 144. 1923.

auf dem Wasserbad und nachherigem Abkühlen. Der Inhalt wird in den ursprünglichen Kolben zurückgebracht, wobei Zentrifugenglas und Glasstab mit 5 ccm Wasser nachzuspülen sind. Der Wand des Kolbens noch anhaftende Teile des Niederschlags werden durch Umschwenken in Lösung gebracht. In einen anderen Kolben werden 5 ccm der Vergleichslösung von Calciumoxalat gegeben. In jeden Kolben gibt man, unter Umschütteln, mit einer Pipette, deren Spitze abgebrochen, 20 ccm der ricinusölsäuren Kaliumlösung; mischt, läßt 2 Minuten stehen und vergleicht im Colorimeter. Die Vergleichslösung wird gegen die zu untersuchende abgelesen. Wurden 10 ccm Harn genommen und auf 15 mm eingestellt, dann entspricht die Ablesung der Vergleichslösung der Anzahl Milligramm Calcium in 100 ccm Harn. Für jeden Fall, wo die zu untersuchende Lösung auf eine gegebene Höhe eingestellt und die Vergleichslösung nach ihr abgelesen wird, gilt für die Berechnung folgende Formel:

$$\frac{\text{Ablesung der Vergleichslösung} \times 1,5}{\text{Ablesung der zu untersuchenden Lösung} \times \text{ccm Harn}} = \text{mg Ca in 1 ccm Harn.}$$

Enthält der Harn weniger als 0,75 mg oder mehr als 2,5 mg, so sind die Ergebnisse nicht genau und man muß die Bestimmung mit einer Menge wiederholen, die Werte zwischen diesen beiden gibt.

Nach Rona und Kleinmann<sup>1)</sup> hat das Reagens von Lyman für die nephelometrische Bestimmung verschiedene Nachteile. Sie schlagen vor, das von der Firma Merck nach Berlioz und Heryng dargestellte Natrium sulfuricinicum, ein dicklich fließendes Öl, zur Fällung des Calciums zu benutzen. Es wird in folgender Form verwendet: Zu 10 ccm des Salzes — ist es zu schwerflüssig oder enthält es Krystalle, so ist es vor dem Abmessen auf dem Wasserbade zu erwärmen — gibt man 112 ccm faserfreie und optisch klare n-Natronlauge, füllt mit destilliertem Wasser auf 125 ccm auf und rührt mit einem Glasstab solange um, bis die Lösung klar und homogen ist. Sie ist in einer Flasche mit eingeschlifffnem Stöpsel unbegrenzt haltbar. Die gelbe Eigenfarbe stört nicht, da nur 0,4 ccm bei einer Verdünnung auf 25 ccm angewandt werden. Gewöhnliches destilliertes Wasser gibt mit dem Reagens eine Trübung, da es aus dem Glas immer Spuren von Ca gelöst enthält. Es ist daher bei den Bestimmungen stets aus Metallbehältern destilliertes und in paraffinierten Gefäßen aufbewahrtes Wasser zu benutzen. Bequemer ist die Anwendung von Leitfähigkeitswasser Kahlbaum. Aus demselben Grunde sollen alle Reagenzien nur in Mengen von Tropfen zugegeben werden.

Als Vergleichslösung dient eine Lösung von 0,4995 g CaCO<sub>3</sub> (reinstes Präparat von Kahlbaum pro analysi) in 100 ccm n-Salzsäure, die auf 1 Liter verdünnt wird; 1 ccm enthält 0,2 mg Ca.

Alle Trübungen sind in kleinen 75–100 ccm fassenden Bechergläsern, die stets nach Gebrauch mit Lauge, Salzsäure, Leitungswasser, destilliertem Wasser und Leitfähigkeitswasser zu spülen und in einem Trockenschrank zu trocknen sind, vorzunehmen. Das Auffüllen auf bestimmte Volumina geschieht mit Büretten. Zum Filtrieren der Lösungen können nur quantitative Filter benutzt werden, da gewöhnliche und gehärtete immer Calcium abgeben.

Innerhalb von 0,04 bis 0,4 mg Ca in 25 ccm ist die Trübung reproduzierbar. Hin und wieder treten grobe Ausfälle auf, weshalb immer mehrere Parallelversuche anzustellen sind. Trübung und Konzentration sind in diesen Grenzen einander proportional. Nach 3 Minuten ist die Trübung stabil und ungefähr 15 Minuten unverändert haltbar. Sie verträgt Zusätze bis zu 5 Tropfen Aceton, 16 Tropfen einer 5 n-Ammoniaklösung, 6 Tropfen einer n-Kochsalz- bzw. Ammoniumchloridlösung.

Zur Ausführung wird die Asche in 3 Tropfen n-Salzsäure gelöst und mit 5–6 Tropfen n-Ammoniumhydroxydlösung alkalisch gemacht. Die Fällung wird mit 0,4 ccm Reagens in einem Volum von 1–12 ccm Lösung, am zweckmäßigsten 5 ccm, vorgenommen, dann auf 25 ccm aufgefüllt. Die Verdünnungen dürfen nur mit Leitfähigkeitswasser ausgeführt werden. Die Standardlösung ist gleichzeitig mit der zu untersuchenden Lösung anzusetzen.

Der wahrscheinliche Fehler dieser Methode beträgt 1,0%.

3. Siehe § 573.

### 572. Magnesium.

Bestimmung von  
Magnesium.

1. Aus dem klaren Filtrat (+ Waschwasser) der Calciumoxalatfällung (s. § 571, 1) wird Magnesium durch Zusatz von Ammoniak als phosphorsaure Ammoniakmagnesia ausgefällt. Über das weitere s. § 538.

2. Siehe § 573.

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 137, S. 156. 1923.

**Bestimmung von Natrium, Kalium, Calcium und Magnesium\*) im Harn nach Tisdall und Kramer<sup>1)</sup>.**

573. Prinzip. Der Harn wird verascht und die Asche mit Salzsäure extrahiert. Aus einem Teil des Extrakts wird nach Entfernung des Ca und Mg das Natrium als pyroantimonsaures Na gefällt. Aus einer anderen Portion Extrakt wird das K als Kaliumkobaltinitrit isoliert und dieses mit Permanganat titriert. Das Ca wird als Oxalat gefällt und ebenfalls mit Permanganat titriert. Das Mg wird in Ammoniummagnesiumphosphat übergeführt und alkalimetrisch titriert. Die Fehler der Methode betragen für Na 3—4%, für K 2%, für Ca und Mg 3%.

Bestimmung von  
Natrium, Kalium,  
Calcium und  
Magnesium.

Erforderliche Lösungen. Es sind die § 688 angegebenen (außer der Ammoniummagnesiumphosphat- und der Eisenthiocyanatlösung).

**Ausführung.** 50—100 ccm Harn werden in einer Platinschale eingedampft und verascht. Dann wird ein aschefreies Filter vorbereitet und mit 20—30 ccm einer 0,5 n-Salzsäure gewaschen, die Asche auf dem Wasserbad mit 10 ccm 0,5 n-Salzsäure behandelt, die heiße Flüssigkeit mit einer Pipette auf das Filter gebracht und in einen 50- bzw. 100-ccm-Meßkolben filtriert, dieser Vorgang solange wiederholt, bis das ursprüngliche Volumen des Harns wieder erreicht ist.

**Natrium.** 5—10 ccm des Ascheauszugs werden in einer Platinschale zur Trockne eingedampft und die Asche mit 2,5 ccm 0,5 n-Salzsäure in ein graduiertes Zentrifugenglas gegeben. Nach Zufügen von 3 ccm einer gesättigten Lösung von Ammoniumoxalat läßt man die Mischung 10 Minuten lang stehen. Dabei fällt praktisch das ganze Calcium aus. Durch Zusatz von 7 ccm konzentrierter Ammoniaklösung, Mischen und Stehenlassen für 45 Minuten wird das Magnesium als Ammoniummagnesiumphosphat gefällt. Man zentrifugiert 5 Minuten, dampft 5 ccm der überstehenden Flüssigkeit in einer Platinschale zur Trockne ein, trocknet den Rückstand in einem Trockenschrank bei 100° einige Minuten lang vollständig und verascht 15—30 Minuten nach Stolte (§ 527), wobei sich die Ammoniumsalze verflüchtigen. Die kleine Menge zurückgebliebene Asche wird in 2 ccm 0,1 n-Salzsäure gelöst, 1 Tropfen Phenolphthalein zugegeben und durch 2 bis 3 Tropfen einer 10proz. Kalilauge gerade alkalisch gemacht. Zu der Lösung gibt man nun 10 ccm des Kaliumpyroantimoniatreagens und tropfenweise 3 ccm 95proz. Alkohol. Nach 30 Minuten wird der Niederschlag auf einen gewogenen Goochtiiegel gebracht und mit 5—10 ccm 30proz. Alkohol gewaschen. Der Tiegel wird bei 110° 1 Stunde getrocknet, wobei die Temperatur allmählich auf diese Höhe zu bringen ist. Nach dem Abkühlen wird gewogen. Das Gewicht dividiert durch 11,08 gibt die Menge Natrium in Milligramm.

**Kalium.** Man benutzt 0,2—0,5 ccm des Ascheauszugs. Ausführung und Berechnung s. § 688.

**Calcium.** 2 ccm des Auszugs werden in eine sorgfältig gereinigte graduierte Zentrifugenröhre gegeben und auf 3—4 ccm mit destilliertem Wasser verdünnt. Nach Zusatz eines Tropfens Phenolphthalein macht man mit 10proz. Ammoniaklösung (10 ccm konzentriertes und 90 ccm Wasser) alkalisch und durch n-Schwefelsäure eben wieder sauer, wobei die ausgefallenen Phosphate wieder in Lösung gehen. Dann wird 1 ccm der n-Oxalsäure und darauf tropfenweise 1 ccm der gesättigten Natriumacetatlösung zugesetzt und nach dem Mischen und 45 Minuten langem Stehen 10 Minuten zentrifugiert. Man verfährt weiter wie § 688 bei Calcium angegeben.

**Magnesium.** 25—50 ccm des Ascheauszugs werden in einem Becherglas gegen Phenolsulfophthalein mit 10proz. Ammoniaklösung alkalisch gemacht und die ausgefallenen Phosphate durch Zusatz von 4 n-Schwefelsäure bis zur sauren Reaktion wieder gelöst. Nach Zufügen von 5 ccm einer gesättigten Ammonium-

\*) Für die Bestimmungen sind nur kleine Mengen Harn nötig, auch lassen sie sich in verhältnismäßig kurzer Zeit ausführen.

<sup>1)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 48, S. 1. 1921.

oxalatlösung mischt man und läßt 15 Minuten stehen. Dadurch wird das ganze Calcium gefällt. Um sicher einen Überschuß von Phosphaten zu haben, werden 1 ccm einer 10 proz. Ammoniumphosphatlösung  $((\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4)$  und ferner 5 ccm konzentriertes Ammoniak zugefügt. Mischen und 1 Stunde stehen lassen. Der Niederschlag wird auf ein Filter gebracht, unter Benutzung von 10 proz. Ammoniak, und mit 30 proz. Alkohol gewaschen, bis alles Ammoniak vom Filter entfernt ist. Dann bringt man Filter und Niederschlag, der das Calcium enthält, in ein Becherglas von 100 ccm, übergießt mit 30 ccm warmem Wasser, mischt gut durch und setzt 3 Tropfen Cochenilletinktur und einen Überschuß (meist 5 ccm) von 0,1 n-Salzsäure zu. Nach 5 Minuten wird mit 0,1 n-Natronlauge aus einer Bürette mit 0,05-ccm-Einteilung titriert, bis die Farbe von Gelb in Purpur umschlägt. 1 ccm  $\frac{n}{10}$ -Salzsäure entspricht 1,21 mg Magnesium.

Berechnung. (Anzahl Kubikzentimeter 0,1 n-HCl — Anzahl Kubikzentimeter 0,1 n-NaOH)  $\times$  1,21 = Milligramm Mg.

*Bestimmung des Eisens im Harn.*

Bestimmung des Eisens. Konzentrierung, Veraschung und Bestimmung geschehen nach §§ 529, 530 und § 542 unter Benutzung von 500 ccm Harn.

*Bestimmung der Salzsäure im Harn.*

574. a) Im eiweißfreien Harn.

Titration der Salzsäure nach Mohr.

1. **Titration nach Mohr** (§ 546). Man benutzt 10 ccm Harn, fügt ungefähr 90 ccm Wasser und nicht zu wenig Kaliumchromatlösung hinzu. Dieses Verfahren liefert immer etwas zu hohe Werte, da der Harn neben dem Chlor noch mehr oder weniger andere Stoffe enthält, welche bei neutraler Reaktion durch Silbernitrat gefällt werden und eine größere Affinität zum Silber haben als die Chromsäure. Bei mittlerem Chlorgehalt kann man den Fehler in der Regel dadurch ausschalten, daß man von den verbrauchten Kubikzentimetern Silberlösung 1 ccm abzieht und aus dem Rest den Chlorgehalt berechnet. Der Fehler wird im ganzen um so größer sein, je weniger Chlor der Harn enthält.

Nach J. Bang liefert die Methode von Mohr gute Resultate, wenn der Harn vor der Bestimmung mit Blutkohle geschüttelt wird. Sie entfernt alle mit Silber reagierenden Substanzen, namentlich die Purinkörper, mit Ausnahme der Chloride. 20 ccm Harn, dessen spezifisches Gewicht nicht größer als 1025 sein soll, werden bei saurer Reaktion mit 1 g Blutkohle in einem Becherglas beschickt und 10 Minuten stehen gelassen, wobei von Zeit zu Zeit umzuschütteln ist. Durch ein trockenes Filter filtrieren. 10 ccm des Filtrats werden zur Bestimmung verwendet (Larsson<sup>1</sup>).

Titration der Salzsäure nach Volhard.

2. **Titration nach Volhard**. Dieses Verfahren, welches sehr genaue Resultate liefert, ist von Arnold und fast gleichzeitig von E. Salkowski für den Harn modifiziert worden.

Prinzip. Säuert man ein abgemessenes Volumen Harn mit Salpetersäure stark an, fügt eine bestimmte aber überschüssige Menge einer Silberlösung von bekanntem Gehalt hinzu, filtriert von dem entstandenen Chlorsilberniederschlag ab und ermittelt die in dem Filtrat vorhandene Silbermenge, so erfährt man durch Subtraktion die Menge Silber, welche von dem Chlor gebunden worden ist. Die Bestimmung des im Filtrat vorhandenen Silbers geschieht durch Titration mit einer Rhodankaliumlösung von bekanntem Gehalt unter Anwendung von einem Eisenoxydsalz als Indicator. Eine salpetersaure Lösung, die Silbernitrat und Eisenoxydsalz enthält, gibt auf Zusatz von Rhodankalium zunächst einen weißen Niederschlag von Rhodansilber und erst, wenn alles Silber ausgefällt ist, eine Rotfärbung von Rhodaneisen.

Erforderliche Lösungen. 1. Die § 546 beschriebene Lösung von Silbernitrat.

2. Reine Salpetersäure vom spez. Gew. 1,2.

3. Konzentrierte Lösung von chlorfreiem Eisenammoniakalaun, der käuflich rein zu haben ist.

4. Eine titrierte Lösung von Rhodankalium (s. folgenden Absatz).

Herstellung der titrierten Rhodankaliumlösung. Man löst etwa 9 g reines käufliches Rhodankalium in Wasser, verdünnt zu ungefähr 1000 ccm

<sup>1</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 49, S. 479. 1913.

und füllt mit der gut gemischten Lösung eine Bürette. Andererseits bringt man 10 ccm obiger Silberlösung in einen Kolben, fügt etwa 90 ccm Wasser, 4 ccm der Salpetersäure und 5 ccm der Eisenammoniakalaunlösung hinzu und läßt nun die Rhodankaliumlösung in kleinen Portionen unter gutem Umschütteln bis zur bleibenden schwachen Rotfärbung zufließen. Die Titrierung wird wiederholt und darauf die Rhodankaliumlösung mit so viel Wasser versetzt, daß 20 ccm von ihr 10 ccm der Silberlösung äquivalent werden.

**Ausführung.** In einen Maßkolben von 100 ccm Inhalt bringt man nacheinander 10 ccm Harn, ungefähr 50 ccm Wasser, 4 ccm Salpetersäure, 20 ccm Silberlösung und Wasser bis zur Marke, schüttelt gut um und filtriert durch ein trockenes Filter und unter Benutzung eines trockenen Trichters in ein trockenes Maßkölbchen von 50 ccm Inhalt genau bis zur Marke. Der Inhalt dieses Kölbchens wird in einen Kolben von ungefähr 250 ccm Inhalt gegossen, mit etwas Wasser nachgespült, 5 ccm Eisenammoniakalaunlösung zugefügt und mit Rhodankaliumlösung bis zum Eintritt einer schwachen bleibenden Rotfärbung titriert.

Die Berechnung ist nach dem oben Gesagten einfach. Da 20 ccm der Rhodankaliumlösung 10 ccm der Silberlösung entsprechen, so sind genau so viel Kubikzentimeter der Silberlösung der Fällung durch Chlor entgangen, als Kubikzentimeter Rhodankaliumlösung für 50 ccm (die Hälfte) des Filtrats erforderlich waren. Zieht man diese Zahl von 20 (die Menge der zugesetzten Silberlösung) ab, so erfährt man, wieviel Kubikzentimeter Silberlösung zur Ausfällung des in 10 ccm Harn enthaltenen Chlors verbraucht wurden. 1 ccm der Silberlösung entspricht 0,01 g NaCl oder 0,00606 g Cl. Waren z. B. bis zum Eintritt der Endreaktion 9,5 ccm Rhodankaliumlösung nötig, so enthalten 10 ccm Harn  $(20 - 9,5) \times 0,01 = 0,105$  g NaCl.

Um auch organisch gebundenes Chlor mitzubestimmen, empfiehlt Dehn<sup>1)</sup> vor der Titration 10 ccm Harn mit einem kleinen Löffel chlorfreiem Natriumsuperoxyd zu versetzen, gut umzurühren, auf dem Wasserbad zur Trockne zu verdampfen, in Wasser zu lösen und mit Salpetersäure ganz schwach anzusäuern. Bestimmung des Gesamtchlors.

Ist der Harn sehr dunkel gefärbt, so ist es zweckmäßig, neben dem Eisenoxydammoniakalaun schließlich bei der Titrierung einige Tropfen einer konzentrierten Lösung von übermangansaurem Kali zuzufügen, welche Entfärbung bewirken.

Um mit der Methode von Volhard im Hundeharne gute Resultate zu erhalten, muß man zunächst die unterschweflige Säure und den Rhodanwasserstoff durch Reduktion mit Zink und Schwefelsäure auf dem Wasserbade entfernen (Gruber<sup>2)</sup>, v. Mering<sup>3)</sup>).

b) Im eiweiß- (albumose-, mucin-) haltigen Harne.

1. Nach vorausgegangener Veraschung\*) durch Titration nach Mohr.

Man dampft 10 ccm Harn in einer Platinschale ab, versetzt den Rückstand mit ungefähr 1 g chlorfreier Soda und 2—4 g reinem Salpeter und erhitzt, von einer Seite her beginnend, zunächst vorsichtig, allmählich etwas stärker bis zum Schmelzen und zur Entfernung der Kohle. Die Schmelze wird nach dem Erkalten in Wasser unter mäßigem Erwärmen gelöst, die Lösung mit Salpetersäure angesäuert, mit einer Messerspitze Calciumcarbonat neutralisiert und ohne vorherige Filtration nach Mohr titriert (§ 546).

2. Nach den § 547 gegebenen Vorschriften, aber unter Benutzung der § 546 angegebenen Silberlösung.

\*) Diese Methode, welche im wesentlichen von Neubauer angegeben worden ist, wurde von Salkowski verbessert, indem er, um eine Verflüchtigung von Salzsäure beim starken Erhitzen zu vermeiden, den Sodazusatz empfahl. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 1, S. 16. 1878; Bd. 2, S. 397. 1879.

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 44, S. 11. 1905.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. Biol. Bd. 19, S. 569. 1883.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 8, S. 229. 1884.

**Bestimmung von Schwefelsäure und Gesamtschwefel im Harn.**

575. Eiweiß ist zunächst nach § 567 zu entfernen.

Nach Folin (gravimetrisch).

**1. Bestimmung nach Folin<sup>1)</sup>.**

Bestimmung der Sulfatschwefelsäure.

a) Schwefelsäure (Sulfatschwefelsäure). Man bringt in einen Erlenmeyerkolben von 200—250 ccm Inhalt ungefähr (aber mindestens) 100 ccm Wasser, 10 ccm verdünnte Salzsäure (1 Tl. konzentrierte vom spez. Gew. 1,2 und 4 Tl. Wasser) und 25 ccm Harn. Bei verdünntem Harn nimmt man 75 ccm Wasser, 50 ccm Harn und 10 ccm verdünnte Salzsäure. Jetzt werden tropfenweise (aus einer Tropfflasche) 10 ccm 5proz. Bariumchloridlösung ohne Schütteln und Rühren hinzugefügt. Nach 1 Stunde oder später schüttelt man um, filtriert durch einen Asbest enthaltenden Goochtiegel (§ 11), wäscht mit ungefähr 250 ccm kaltem Wasser, trocknet und glüht in der § 550 beschriebenen Weise.  $1 \text{ g BaSO}_4 = 0,420176 \text{ g H}_2\text{SO}_4$ .

Bestimmung der Gesamtschwefelsäure.

b) Gesamtschwefelsäure. Man bringt in einen Erlenmeyerkolben von 200—250 ccm Inhalt 25 ccm Harn und 20 ccm verdünnte Salzsäure (s. unter a) (bei verdünnten Harnen 50 ccm und 4 ccm konzentrierte Salzsäure) und kocht 20—30 Minuten, während der Kolben mit einem Uhrglas bedeckt ist, gelinde. Man kühlt jetzt unter der Wasserleitung 2—3 Minuten ab, fügt etwa 150 ccm kaltes Wasser hinzu, darauf tropfenweise (aus einer Tropfflasche) 10 ccm einer 5proz. Bariumchloridlösung ohne Schütteln und Rühren und verfährt weiter wie unter a) angegeben.

Bestimmung der gepaarten Schwefelsäure.

c) Gepaarte Schwefelsäure. Man erfährt ihre Menge durch Subtraktion der Sulfatschwefelsäure von der Gesamtschwefelsäure oder in folgender Weise: Man mischt 125 ccm Harn mit 75 ccm Wasser und 30 ccm verdünnter Salzsäure (s. unter a), fügt 20 ccm einer 5proz. Bariumchloridlösung tropfenweise (Tropfflasche) ohne Rühren und Schütteln hinzu und filtriert nach 1 Stunde durch ein trockenes Filter. 125 ccm des Filtrats werden 30 Minuten gelinde gekocht (s. unter b). Man läßt abkühlen, filtriert, wäscht aus und verascht wie unter a) beschrieben.

Bestimmung des Gesamtschwefels.

d) Gesamtschwefel. Man bringt 25 ccm Harn (von sehr verdünntem 50 ccm) in einen Nickeltiegel von 200—250 ccm Inhalt, fügt etwa 3 g Natriumhyperoxyd hinzu, dampft bis zur Sirupkonsistenz ein und erhitzt vorsichtig und langsam, so daß die Masse in ungefähr 15 Minuten fest wird. Jetzt läßt man den Tiegel abkühlen, befeuchtet den Inhalt mit 1—2 ccm Wasser, streut etwa 7 g Natriumhyperoxyd darauf und erhitzt ungefähr 10 Minuten bis zum vollständigen Schmelzen. Nachdem etwas abgekühlt ist, bringt man ungefähr 100 ccm Wasser hinein, erhitzt wenigstens  $\frac{1}{2}$  Stunde, um alles Hyperoxyd zu zersetzen, führt den Inhalt in einen Erlenmeyerkolben von 400—450 ccm Inhalt, mit heißem Wasser über und verdünnt mit Wasser bis etwa zu 250 ccm. Nun wird konzentrierte Salzsäure zu der fast kochenden Lösung langsam zugefügt, bis das Nickeloxyd sich gerade auflöst (für 8 g Peroxyd ungefähr 18 ccm). Nachdem einige Minuten gekocht, soll die Lösung klar sein (andernfalls muß nach dem Abkühlen filtriert werden). Zu der klaren Lösung fügt man 5 ccm verdünnten Alkohol (1:4 Wasser), kocht noch einige Minuten, fügt zu der heißen Lösung tropfenweise (Tropfflasche) 10 ccm 10proz. Bariumchloridlösung hinzu und filtriert nach 2 tägigem Stehen in der Kälte durch einen Goochtiegel. Das weitere wie unter a) beschrieben.

Benedict<sup>2)</sup> und Denis<sup>3)</sup> wenden für die Bestimmung des Gesamtschwefels folgendes Oxydationsgemisch an: 25 g krystallisiertes Cuprinitrat, 25 g NaCl, 10 g  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 100 ccm Wasser.

<sup>1)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 1, S. 131. 1906.

<sup>2)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 6, S. 363. 1909 u. Bd. 8, S. 499, 1910/11.

<sup>3)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 8, S. 401, 1910/11.



25 ccm Harn werden mit 5 ccm dieses Gemisches in einer Porzellanschale von 10 cm auf dem Wasserbad oder über einer kleinen Flamme zur Trockne eingeengt. Dann wird sorgfältig über freier Flamme unter langsamer Steigerung der Temperatur bis zur Rotglut erhitzt und 10 bis 15 Minuten auf dieser Temperatur erhalten. Nun läßt man abkühlen, löst in 10—20 ccm einer 10 proz. Salzsäure, erwärmt bis zur klaren Lösung, verdünnt auf ungefähr 150 ccm, filtriert, wenn nötig, und verfährt weiter wie unter a) beschrieben.

## 2. Bestimmung nach Rosenheim und Drummond<sup>1)</sup>.

Nach Rosenheim  
und Drummond  
(volumetrisch).

Prinzip. Sie beruht darauf, daß die Schwefelsäure mit Benzidinchlorhydrat gefällt wird. Das Benzidinsulfat ist schwer löslich und läßt sich als Salz einer schwachen Base mit einer starken Säure mit Kalilauge titrieren.

Erforderliche Lösungen. Die Benzidinlösung bereitet man sich, indem man 4 g Benzidin (p-Diamino-diphenyl; Kahlbaum) mit ungefähr 10 ccm Wasser zu einem feinen Brei verreibt und mit 500 ccm Wasser in einen 2-l-Kolben bringt, 5 ccm konzentrierte Salzsäure (spez. Gew. 1,19) zusetzt und mit Wasser auf 2 l auffüllt. Die Lösung ist lange haltbar. 150 ccm fällen 0,1 g Schwefelsäure. Gesättigte wässrige Benzidinsulfatlösung.

Ausführung. Sulfatschwefelsäure. In einem Erlenmeyerkolben von 250 ccm Inhalt werden 25 ccm Harn mit verdünnter (1 : 4) Salzsäure kongosauer gemacht (meist genügen 1—2 ccm) und mit 100 ccm Benzidinlösung versetzt. Nach 10 Minuten, nachdem der Niederschlag sich abgesetzt hat, saugt man ihn ab, wäscht mit 10—20 ccm einer gesättigten wässrigen Benzidinsulfatlösung nach (bis das Filtrat nicht mehr kongosauer ist) und bringt ihn mit dem Filter in den ersten Kolben zurück. Für die Filtration benutzt man eine Filterplatte von etwa 6 cm Durchmesser und sorgt dafür, daß während der Filtration und des Auswaschens das Filter niemals trocken gesaugt wird. Nach Zufügen von 50 ccm Wasser und feiner Verteilung des Niederschlags durch Schütteln wird heiß mit  $\frac{n}{10}$ -Kalilauge gegen einige Tropfen einer gesättigten alkoholischen Lösung von Phenolphthalein titriert. 1 ccm  $\frac{n}{10}$ -KOH entspricht 4,9 mg  $H_2SO_4$ .

Bestimmung der Sulfat-  
schwefelsäure.

Gesamtschwefelsäure. 25 ccm Harn werden in einem Erlenmeyerkolben von 250 ccm Inhalt mit 20 ccm verdünnter (1 : 4) Salzsäure 15—20 Minuten gekocht. Evtl. genügen zur Hydrolyse auch 2—5 ccm Säure. Darnach wird mit Kalilauge neutralisiert und mit Salzsäure wieder kongosauer gemacht. Abkühlen, mit der Benzidinlösung versetzen und wie oben weiter verfahren. Die Differenz zwischen der Sulfatschwefelsäure und der Gesamtschwefelsäure gibt die gepaarte Schwefelsäure.

Bestimmung der  
Gesamt- und  
der gepaarten  
Schwefelsäure.

Es genügen für die Hydrolyse auch 2—2,5 ccm Salzsäure und 15—20 Minuten langes gelindes Kochen. Die Benutzung der verdünnten Salzsäure hat den Vorteil, daß eine Neutralisation nicht nötig ist und daß weniger Farbstoff entsteht und deswegen das Ende der Titration besser zu erkennen ist.

Die Bestimmungen lassen sich auch mit weniger Harn (bis zu 2 ccm) ausführen, wenn man für die Titration  $\frac{n}{100}$ -Kalilauge verwendet.

Der Gesamtschwefel wird in der Weise bestimmt, daß man erst verascht, neutralisiert, kongosauer macht und nun mit Benzidin fällt.

Bestimmung des  
Gesamtschwefels.

Nach Hamburger<sup>2)</sup> gibt die Methode von Rosenheim und Drummond zwar für den Sulfatschwefel ausgezeichnete, für den Gesamtschwefel aber unbefriedigende Resultate, da in dem veraschten Harn die Schwefelsäure von dem Benzidin nur unvollkommen gefällt wird.

## 3. Nach Hamburger<sup>2)</sup>.

Nach Hamburger.

Prinzip. Die Schwefelsäure wird als  $BaSO_4$  gefällt und die Menge des Niederschlages aus seinem Volumen nach Zentrifugieren im Chonohämatokrit ermittelt.

Erforderliche Lösungen und Apparate. 1. Verdünnte Salzsäure (konzentrierte mit dem gleichen Volum Wasser verdünnt). 2. 2,44 proz. Lösung von  $BaCl_2 \cdot 2 H_2O$ . 3. Aceton. 4. Vergleichslösung von 2%  $Na_2SO_4 \cdot 10 H_2O$  in Wasser. 5. Veraschungsgemisch, das in 100 ccm Wasser

<sup>1)</sup> Biochem. Journ. Bd. 8, S. 143. 1914. — Drummond: desgl. Bd. 9, S. 492. 1916.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 100, S. 221. 1917.

13 g Kaliumnitrat und 4 g krystallisierte Soda, die beide frei von Schwefelsäure sind, enthält. 6. Chonohämatokrit, verschließbares trichterförmiges Röhrchen mit Graduierung (Abbildung im Original). 7. Dickwandiges Rohr mit kleinerem Röhrchen besonderer Form (Abbildung im Original).

Bestimmung der  
Sulfatschwefel-  
säure.

**Sulfatschwefelsäure.** Ausführung. In dem dickwandigen Glasrohr mischt man 5 ccm Harn und 2,5 ccm Salzsäure. In das kleine Röhrchen werden 5 ccm der Bariumchloridlösung pipettiert und darauf, ohne zu mischen, 6 Tropfen Aceton aus einer Tropfflasche getropft. Das kleine Röhrchen wird in das größere versenkt, dieses mit einem Kork verschlossen und geschüttelt. Unmittelbar nach der Vermischung von Harn und Reagens wird das große Röhrchen geöffnet, das kleinere herausgenommen, in das größere entleert und sorgfältig abgestrichen. Ein Nachspülen ist überflüssig. Wenn sich der Niederschlag noch nicht vollkommen ausgebildet hat, läßt man das Rohr noch 2 Stunden stehen. Dann wird kurze Zeit zentrifugiert und die Mutterlauge in ein Reagensglas abgegossen. Von dieser Mutterlauge wird mit einer Capillare etwas in den Chonohämatokrit gebracht. Der Niederschlag wird mit wenig Mutterlauge zu einer homogenen Suspension vermischt, indem man mit einer ausgezogenen Capillare die Flüssigkeit aufsaugt und wieder ausbläst. Darauf wird die Suspension in den Hämatokrit übergeführt und das Rohr mit Mutterlauge nachgespült. Dann wird 30 Minuten bei einer Tourenzahl von 3000 zentrifugiert. Es ist empfehlenswert, etwa 4 Proben Harn von 5 ccm anzusetzen und, wenn der Niederschlag zu gering erscheint, sie in einem größeren Zentrifugenglas zu vereinigen.

**Berechnung.** Eine Spur des krystallinischen Niederschlags ist unter dem Mikroskop zu untersuchen, da sein Volumen von der Größe der Kryställchen abhängt. Mittels vorrätiger Probepräparate kann man feststellen, welches Volumen der Größe der Kryställchen entspricht. Werden 4 ccm einer 2 proz. Lösung von  $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (= 0,02386 g  $\text{SO}_4$ ) mit 1 ccm Wasser und 2,5 ccm der Salzsäure gemischt und mit der acetonhaltigen Bariumchloridlösung behandelt, so bekommt man in dem Chonohämatokrit gewöhnlich ein Volumen von 81,5 Teilstrichen. Ein Teilstrich entspricht also in diesem Falle  $\frac{0,02386}{81,5}$  g  $\text{SO}_4$ . Meistens entstehen nun

auch aus dem Harn bei dem angegebenen Verfahren Kryställchen, deren Größe diesem Volumen entspricht. Zeigt aber das mikroskopische Bild eine andere Größe, z. B. eine solche, die gesehen wurde, als 4 ccm der 2 proz. Natriumsulfatlösung 84 Volumenteilen  $\text{BaSO}_4$  entsprachen, so entspricht ein Teilstrich  $\frac{0,02386}{84}$  g  $\text{SO}_4$ .

Bestimmung der  
Gesamtschwefel-  
säure.

**Gesamtschwefelsäure.** Ihre Bestimmung geschieht in entsprechender Weise, nachdem die Ätherschwefelsäure wie unter 1b durch Erhitzen mit Salzsäure in Sulfatschwefelsäure übergeführt ist. Vor der Zugabe der Bariumchloridlösung ist dann keine Salzsäure mehr zuzusetzen.

Bestimmung der ge-  
paarten Schwefel-  
säure.

Die Differenz zwischen Gesamt- und Sulfatschwefelsäure gibt die gepaarte Schwefelsäure.

Bestimmung des  
Gesamtschwefels.

**Gesamtschwefel.** Zu seiner Bestimmung werden 25 ccm Harn mit 10 ccm des Veraschungsgemisches im Kjeldahlkolben von 500 ccm auf offener Flamme eingedampft und der Rückstand erhitzt. Zunächst verkohlt die Masse, schmilzt dann und wird gelblichweiß. In den noch warmen Kolben wird vorsichtig Wasser gegeben und dann etwa 25 ccm konzentrierter Salzsäure wieder zur Trockne erhitzt und dies so oft wiederholt, bis die Salpetersäure vollkommen vertrieben ist, da sie das Volumen des Niederschlags erheblich beeinflusst. Der weiße Rückstand wird in wenig Wasser gelöst, mit 12,5 ccm Salzsäure versetzt,

in einen Meßzylinder gebracht und unter Ausspülen des Kolbens mit Wasser auf 37,5 ccm gebracht. Von der durch Kieselsäure bedingten Trübung wird abfiltriert. Von dieser Flüssigkeit werden je 7,5 ccm in das weite Glasrohr abgemessen und auf die beschriebene Weise gefällt.

*Bestimmung der Phosphorsäure im Harn.*

576. Die Bestimmung geschieht mit hinreichender Genauigkeit durch Titration mit Uranylacetat. Anwesenheit von Eiweiß stört nicht.

Im Pflanzenfresserharn ist die Menge der Phosphorsäure eine so geringe, daß dieses Verfahren nicht angewendet werden kann. Man benutzt dann zweckmäßig das Verfahren von A. Neumann (§ 553).

Prinzip. Uranylacetat gibt mit phosphorsauren Salzen in essigsaurer Lösung einen gelblich-weißen, flockigen, unlöslichen Niederschlag von der Zusammensetzung  $(\text{UrO}_2)\text{HPO}_4$ . Zur Erkennung eines Überschusses von Uranlösung benutzt man entweder Ferrocyaniumlösung, welche in sauren Uranlösungen einen selbst bei außerordentlicher Verdünnung der Flüssigkeiten noch deutlich wahrnehmbaren dunkelbraunen Niederschlag gibt, oder Cochenilletinktur, welche einen grünen Niederschlag gibt.

Erforderliche Lösungen. 1. Eine Lösung, die in 100 ccm 0,2 g  $\text{P}_2\text{O}_5$  enthält. Eine 1,0093proz. Lösung von Natriumphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + 12 \text{H}_2\text{O}$ ) entspricht dieser Anforderung. Da aber dieses Salz sehr leicht verwittert und deshalb nicht genau abgewogen werden kann, empfiehlt es sich, ungefähr 12 g abzuwägen und in 1 l Wasser zu lösen, von dieser Lösung 50 ccm einzudampfen, den Rückstand zu glühen und zu wägen (pyrophosphorsaures Natron) und nun mit Hilfe dieses Wertes und unter Berücksichtigung, daß 50 ccm einer 1,0093proz. Lösung von Natriumphosphat beim Eindampfen und Glühen 0,1875 g pyrophosphorsaures Natron liefern müssen, diejenige Menge Wasser zu berechnen, mit der die Lösung zu verdünnen ist.

2. Essigsäuremischung. Man löst 100 g kristallisiertes Natriumacetat in Wasser, fügt 100 ccm starke Essigsäure hinzu und verdünnt die Mischung im Literkolben auf 1 l.

3. Frisch hergestellte Ferrocyaniumlösung.

4. Cochenilletinktur (wässrig-alkoholischer Cochenilleauszug).

5. Titrierte Lösung von Uranylacetat (s. folgenden Absatz).

Herstellung der titrierten Uranylacetatlösung. Etwa 35 g Uranylacetat werden in etwa 1 l Wasser unter Erwärmen gelöst und filtriert. Man fügt zu 50 ccm der obigen Natriumphosphatlösung 5 ccm der Essigsäuremischung hinzu, erwärmt auf kochendem Wasserbade (oder auf freiem Feuer fast bis zum Sieden) und läßt nun in kleinen Portionen aus einer Bürette die Uranylacetatlösung zufließen, solange die Vermehrung des Niederschlages deutlich erkennbar ist. Dazwischen ist immer wieder für kurze Zeit zu erwärmen. Ist die Zunahme des Niederschlages nicht mehr deutlich, so nimmt man nach jedem neuen Zusatz von Uranylacetat und jedesmaligem kurzen Erwärmen einen Tropfen der Mischung heraus, läßt ihn mit einem auf einer weißen Porzellanplatte befindlichen Tropfen Ferrocyaniumlösung zusammenfließen und beobachtet, ob dabei eine leichte Braunfärbung (Uranylferrocyanid) auftritt. Die erste Andeutung einer schwachen Braunfärbung dient als Endreaktion, denn sie beweist, daß alle Phosphorsäure ausgefällt ist und sich ein geringer Überschuß von Uranylacetat in der Mischung befindet. Hat man auf diese Weise erfahren, wieviel Uranlösung erforderlich ist, um 0,1 g  $\text{P}_2\text{O}_5$  zu fällen, so verdünnt man sie soweit mit Wasser, daß 20 ccm gerade 0,1 g  $\text{P}_2\text{O}_5$  oder 1 ccm 0,005 g  $\text{P}_2\text{O}_5$  entsprechen.

Oder man kann auch, statt des Ferrocyaniums als Indicator Cochenilletinktur benutzend, zu der Mischung von 50 ccm obiger Natriumphosphatlösung und 5 ccm Essigsäuremischung einige Tropfen Cochenilletinktur hinzufügen, erwärmen und nun solange vorsichtig und unter Umschütteln und Erwärmen Uranylacetatlösung zufließen lassen, bis die rote Farbe in eine grüne umschlägt. Doch scheint die Titration mit Hilfe von Ferrocyanium genauer zu sein. Man kann auch gleichzeitig beide Indicatoren benutzen.

**Ausführung.** Man mißt in ein Becherglas 50 ccm oder von konzentrierten Harnen 20 ccm ab, fügt 5 bzw. 2 ccm der Essigsäuremischung hinzu, erwärmt und verfährt, ganz wie es zur Titerstellung der Uranlösung eben angegeben ist, unter Anwendung von Ferrocyankalium (oder Cochenilletinktur) als Indicator. Die Zahl der bis zur Endreaktion verbrauchten Kubikzentimeter Uranlösung ergeben mit 5 multipliziert die Menge  $P_2O_5$  in Milligrammen.

Mikromethode. Über eine Mikromethode zur Bestimmung der Phosphorsäure und der organisch gebundenen Phosphorsäure s. § 695.

#### Bestimmung der Salpetersäure im Harn.

577. Für die quantitative Bestimmung der Salpetersäure hat Röhmann<sup>1)</sup> die Methode von Franz Schulze (Reduktion der Salpetersäure zu Stickoxyd beim Kochen mit Salzsäure und Ferrochlorid und Messung des über Natronlauge aufgefangenen Stickoxyds) benutzt und sehr brauchbar gefunden.

#### Nachweis und Bestimmung des Ammoniaks im Harn.

Nachweis. 578. Zum Nachweis bringt man in einen kleinen Kolben mittels eines Trichters Harn und Kalkmilch und in den Kolbenhals ein angefeuchtetes rotes Lackmuspapier, welches durch den verschließenden Stopfen festgehalten wird. Nach kurzer Zeit bläut sich das Papier durch das in Freiheit gesetzte Ammoniak.

Kohlensaures Ammoniak, das nur bei Zersetzung des Harns innerhalb der Blase im frisch gelassenen Harn erscheint, gibt sich durch den Geruch zu erkennen. Ein solcher Harn reagiert alkalisch, ist trübe und entwickelt auf Säurezusatz Kohlensäure.

Zur quantitativen Bestimmung dienen folgende Verfahren:

Bestimmung des Ammoniaks nach Krüger-Reich.

1. **Bestimmung nach Krüger-Reich**<sup>2)</sup> (Modifikation des Verfahrens von Wurster<sup>3)</sup>). Eine im Prinzip gleiche Methode ist von Shaffer<sup>4)</sup> angegeben worden.

**Prinzip.** Das durch Kalkmilch in Freiheit gesetzte Ammoniak wird im Vakuum bei einer Temperatur unter  $43^\circ$  destilliert, in  $\frac{n}{10}$ -Säure aufgefangen und durch Zurücktiteren mit  $\frac{n}{10}$ -Lauge bestimmt. Zusatz von Alkohol erniedrigt den Siedepunkt. Zur Verhinderung des Schäumens setzt man dem Reaktionsgemisch zweckmäßig noch 3 Tropfen Octyl- oder Caprylalkohol zu.

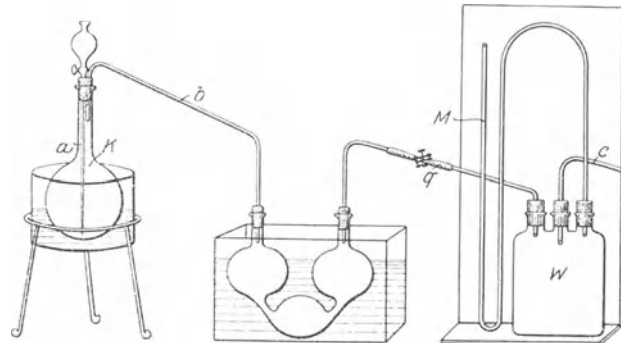


Abb. 24. Apparat zur Ammoniakbestimmung im Harn nach Krüger-Reich.

**Apparat.** Der Apparat ist aus Abb. 24 ersichtlich. *K* ist ein Literrundkolben aus Jenaer Glas, dessen Kugel zu etwa  $\frac{1}{3}$  in das Wasserbad eintaucht. Das Rohr *a* des Scheidetrichters ist unten zu einer Capillare ausgezogen. Die Peligotsche Röhre ist etwa 24 cm hoch, der Inhalt ihrer drei Kugeln beträgt etwa 340 ccm; sie ist in Eiswasser versenkt. *q* ist ein dickwandiger Gummischlauch, über dem sich eine Klemmschraube befindet. *M* ist ein mit der Woulfschen Flasche *W* verbundenes Manometer. Das Rohr *c* führt zur Wasserstrahlpumpe. Es empfiehlt sich, an das in den Kolben hineinragende Ende des Rohres *b* einen etwa 5 cm langen Gummischlauch anzufügen, welcher in der Mitte eine seitliche Öffnung besitzt. Statt der

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 5, S. 233. 1881.  
<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 39, S. 165. 1903.  
<sup>3)</sup> Zentralbl. f. Physiol. Bd. 1, S. 485. 1888.  
<sup>4)</sup> Americ. journ. of physiol. Bd. 8. S. 330. 1903

Peligotschen Röhre kann man auch zwei Waschflaschen benutzen und die erste in das Kühlbad geben.

**Ausführung.** Man bringt in den Scheidetrichter 12—15 ccm Alkohol, in die Peligotsche Röhre 25 ccm  $\frac{n}{10}$ -Säure, darauf in den Kolben 25 ccm eiweißfreien\*) filtrierten Harn, etwa 10 ccm Kalkmilch und etwa 15 ccm Alkohol, schließt nun sofort den Kolben, indem man dafür sorgt, daß das Rohr *a* fast den Boden berührt, schließt auch die Klemmschraube und setzt die Wasserstrahlpumpe in Tätigkeit. Darauf wird durch vorsichtiges Öffnen der Schraube Kolben und Peligotsche Röhre allmählich evakuiert und gleichzeitig mit der Erwärmung des Wasserbades begonnen. Die Temperatur des letzteren soll 43° nicht übersteigen. Von Beginn des lebhaften Siedens an gerechnet wird die Destillation 17 Minuten unter einem Druck von 30—40 mm Quecksilber fortgesetzt. Die Wassertropfen, welche sich nach Verjagung des Alkohols am Kolbenhals festsetzen und möglicherweise Ammoniak enthalten, werden durch Umwickeln des Kolbenhalses mit einem in heißes Wasser getauchten Tuch beseitigt. Zum Schluß läßt man aus dem Scheidetrichter 10 ccm Alkohol zufließen, welche den Kolbeninhalt wieder in lebhaftes Sieden bringen und die in dem Rohr *b* befindlichen Wassertropfen wegsülen. Ein Stoßen findet erst statt, wenn die Flüssigkeit stark konzentriert ist. Dabei kann in seltenen Fällen etwas an das Rohr *b* spritzen. Die oben (s. bei Beschreibung des Apparats) erwähnte Schlauchvorrichtung verhindert aber ein Übertreten in die Peligotsche Röhre. Nach Beendigung der Destillation schließt man zunächst die Klemmschraube, dreht die Wasserleitung ab und läßt durch Öffnen des Scheidetrichterhahnes Luft eintreten. Der Inhalt der Peligotschen Röhre wird in ein Becherglas übergeführt und unter Benutzung von Lackmoid oder Rosolsäure mit  $\frac{n}{10}$ -Lauge titriert. Zieht man die Anzahl der verbrauchten Kubikzentimeter von der Anzahl der Kubikzentimeter Säure ab und multipliziert diesen Wert mit 1,7034, so erhält man die Menge Ammoniak in Milligrammen.

Im eiweißhaltigen Harn läßt sich das Verfahren anwenden, wenn man statt Kalkmilch etwa 10 g Natriumchlorid und 1 g trockene Soda (Folin<sup>1)</sup>, Shaffer) zum Harn zufügt. Das Schäumen läßt sich durch öfteren Zusatz von 15—20 ccm Alkohol und, falls die Flüssigkeit zu sehr eingedampft war, von 10—15 ccm Wasser leicht vermeiden (Schittenhelm<sup>2</sup>).

Ausführung bei  
Eiweißgehalt.

## 2. Bestimmung nach Folin<sup>1</sup>).

Bestimmung des  
Ammoniaks nach  
Folin.

**Prinzip.** Das durch Soda in Freiheit gesetzte Ammoniak wird durch einen Luftstrom bei gewöhnlicher Temperatur ausgetrieben, in  $\frac{n}{10}$ -Säure aufgenommen und durch Zurücktitrieren mit  $\frac{n}{10}$ -Lauge bestimmt.

**Apparate.** 1. Ein mit doppelt durchbohrtem Gummistopfen versehener Cylinder von etwa 45 cm Höhe und 5 cm Durchmesser. Von den durch die Bohrungen gehenden beiden Glasröhren reicht die eine bis nahe an den Boden und ist andererseits unter Zwischenschaltung einer mit Watte gefüllten U-förmigen Röhre mit einer Schwefelsäure enthaltenden Waschflasche verbunden, welche den Zweck hat, die eintretende Luft ammoniakfrei zu machen. Die andere Glasröhre des Cylinders ist kurz unter dem Stopfen abgeschnitten und steht, ebenfalls unter Zwischenschaltung einer mit Watte gefüllten U-förmigen Röhre, in Verbindung mit zwei hintereinandergeschalteten Vorlagen (Waschflaschen).

2. Ein Wasserstrahlgebläse oder eine Wasserstrahlpumpe, welche in der Stunde 600—700 l Luft befördert.

\*) Zur Entfernung des Eiweiß empfehlen Krüger und Reich 100 ccm Harn mit 1 g gepulverter Citronensäure und 0,5 g Pikrinsäure zu schütteln, bis ein flockiger Niederschlag sich absetzt, und durch Faltenfilter zu filtrieren. Nachdem man sich von der völligen Entfernung des Eiweißes überzeugt hat, verfährt man in der oben beschriebenen Weise, nimmt aber zur Bindung der Citronen- und Pikrinsäure statt der Kalkmilch 0,5 g gepulverten Ätzbaryt. Siehe auch die Bemerkung am Schluß des § 578, 1.

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 37, S. 161. 1902/03.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 39, S. 73. 1903.

**Ausführung.** Man bringt in die erste Vorlage 25 ccm, in die zweite 10 ccm  $\frac{n}{10}$ -Säure und Wasser, in den Zylinder 25 ccm filtrierten Harn, 8—10 g Natriumchlorid, 5—10 ccm Petroleum oder Toluol\*) (um das Schäumen zu verhindern) und zuletzt etwa 1 g trockene Soda, verschließt sofort und läßt einen starken Luftstrom durch den Apparat gehen. Bei einer Temperatur von 20—25° und unter Anwendung von 600—700 l Luft in der Stunde ist nach 1—1½ Stunden alles Ammoniak in den Vorlagen. Das Weitere wie unter 1. Als Indicator empfiehlt Folin Alizarinrot (2 Tropfen einer 1 proz. Lösung für 200—300 ccm Flüssigkeit und Titration bis zur Rotfärbung, nicht bis zur Violettfärbung).

Dieses Verfahren kann auch auf eiweißhaltige Harn angewendet werden.

Nach Steel und Gies<sup>1)</sup> gibt es bei Anwesenheit von Ammoniak als Ammoniummagnesiumphosphat (nach Magnesiumsulfatzufuhr) zu niedrige Werte. In diesen Fällen setzt man das Ammoniak durch ein Gemisch von 0,5—1 g NaOH + 15 g NaCl in Freiheit<sup>2)</sup> oder man löst nach Folin<sup>3)</sup> den gebildeten Niederschlag durch Zusatz von Säure wieder auf und setzt, um seine Rückbildung zu verhindern, Kaliumoxalat im Überschuß zu. Menschliche Harn enthalten aber nur selten Ammoniummagnesiumphosphat.

Bestimmung des Ammoniaks nach Schlösing.

**3. Bestimmung nach Schlösing.** Dieses Verfahren ist einfacher auszuführen, gibt aber nicht so zuverlässige Werte, wie die unter 1. und 2. beschriebenen. Auch muß man mehrere Tage auf das Resultat warten.

**Prinzip.** Das durch Kalkmilch in Freiheit gesetzte Ammoniak wird in einem abgeschlossenen Raume innerhalb einiger Tage von  $\frac{n}{10}$ -Säure aufgenommen und durch Zurücktitrieren mit  $\frac{n}{10}$ -Lauge bestimmt.

**Ausführung.** Unter eine Glasglocke, die mit abgeschliffenem Rand auf eine Glasplatte mit etwas Fett luftdicht aufgesetzt wird, bringt man eine Schale mit 25 ccm  $\frac{n}{10}$ -Schwefelsäure, darüber legt man ein Dreieck von Glas und auf dieses eine Glasschale mit flachem Boden von 15—17 cm Durchmesser. In diese Schale kommen 25 ccm filtrierter eiweißfreier Harn, ein wenig Thymol und dazu, unmittelbar vor dem Aufsetzen der Glasglocke, 10—15 ccm Kalkmilch. Nach 3 tägigem Stehen (bei konzentrierten Harnen 5—8 tägigem Stehen) bei Zimmertemperatur öffnet man den Apparat und titriert direkt in der Schale nach Zusatz von etwas Lackmoid mit  $\frac{n}{10}$ -Lauge zurück. Berechnung wie unter 1. angegeben.

Bei eiweißhaltigem Harn scheint die Methode auch ohne vorherige Entfernung des Eiweißes anwendbar, wenn man statt Kalkmilch dem Harn etwa 10 g Kochsalz und etwa 0,5 g trockene Soda zufügt (Shaffer).

Mikrobestimmung des Ammoniaks nach Folin u. Macallum.

**4. Bestimmung nach Folin und Macallum<sup>4)</sup>** (Mikromethode).

**Prinzip.** Das Ammoniak wird durch einen Luftstrom aus dem Harn herausgetrieben und in  $\frac{n}{10}$ -Schwefelsäure aufgefangen. Die Menge des Ammoniaks wird colorimetrisch durch Nesslerisieren bestimmt. Über Apparat und Reagenzien s. bei der Mikrobestimmung des Gesamtstickstoffs nach Folin und Farmer (§ 579, 3).

**Ausführung.** In ein großes Reagensglas von 75 ccm werden 1—5 ccm Harn abgemessen. Das abgemessene Volumen soll ungefähr 0,75—1,5 mg Ammoniakstickstoff geben; bei normalen Harnen genügen meist 2 ccm, bei sehr verdünnten 5 ccm, und bei diabetischen mit viel Ammonsäuren ist 1 ccm vielleicht schon zuviel und muß verdünnt werden. In jedem Fall verdünnt man das abgemessene Volumen auf 5 ccm, fügt einige Tropfen 10 proz. Kaliumcarbonatlösung und 15 proz. Kaliumoxalatlösung und 3 Tropfen Octylalkohol hinzu. Das Gefäß wird mit der Vorlage verbunden und ein kräftiger Luftstrom solange durchgetrieben, bis alles Ammoniak übergegangen ist (gewöhnlich 10 Minuten). Das Ammoniak wird in 2 ccm  $\frac{n}{10}$ -Schwefelsäure aufgefangen, die mit 20 ccm Wasser verdünnt sind. Die Flüssigkeit in der Vorlage spült man in einen 100-ccm-Meßkolben über und verfährt weiter wie bei der Bestimmung des Gesamtstickstoffs beschrieben ist (§ 579, 3).

\*) Statt dessen wird von af Klercker Paraff. liq. empfohlen. Biochem. Zeitschr. Bd. 3, S. 55. 1907.

<sup>1)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 5, S. 71. 1908. — Steel: desgl. Bd. 5, S. 85. 1908.

<sup>2)</sup> Steel: Journ. of biol. chem. Bd. 8, S. 365. 1910/11.

<sup>3)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 8, S. 497. 1910/11. <sup>4)</sup> Desgl. Bd. 11, S. 523. 1912.

**Bestimmung des Gesamtstickstoffs im Harn.**

579. Diese Bestimmung wird jetzt allgemein nach Kjeldahl ausgeführt. Man verfährt nach § 558, a, für Mikrobestimmung nach § 698 und § 579, 4 oder benutzt das vereinfachte

**1. Verfahren nach Folin und Wright<sup>1)</sup>.**

Prinzip. Die Veraschung wird durch ein besonderes Säuregemisch bewirkt. Die Destillation des Ammoniaks geschieht rasch in einer einfachen Apparatur ohne Kühlung. Die ganze Ausführung dauert nur 20—25 Minuten.

Erforderliche Lösungen. 1. Veraschungsgemisch: Zu 50 ccm einer 5—6 proz. Kupfersulfatlösung werden 300 ccm 85 proz. Phosphorsäure (spez. Gew. 1,7) und 100 ccm konzentrierte Schwefelsäure gegeben. 2. 10 proz. Lösung von Ferrichlorid. 3. Gesättigte Lösung von Natriumhydroxyd. 4.  $\frac{n}{10}$ -Säure und -Lauge, Indicator Alizarinrot.

Die Apparatur für die Destillation ist aus der beistehenden Zeichnung, Abb. 25, ersichtlich. Das Veraschungsgemisch greift gewöhnliches und auch Jenaer Glas sehr stark an, es werden daher für die Veraschung Pyrex- oder Quarzgefäße empfohlen. Mikrobrenner.

Ausführung. 5 ccm Harn werden in einen Kjeldahlkolben von 300 ccm Inhalt mit 5 ccm der Phosphorsäure-Schwefelsäuremischung, 2 ccm 10 proz.  $\text{FeCl}_3$ -Lösung und einigen kleinen Siedesteinchen gebracht. Man erhitzt mit einem Mikrobrenner kräftig. Das Ende des Brenners darf nicht mehr als 1 cm von dem Boden des Kolbens entfernt sein. Nach 3—4 Minuten füllt sich der Kolben mit dichten weißen Dämpfen. Dann (nicht früher) bedeckt man ihn mit einem kleinen Uhrglas, kocht 2 Minuten energisch weiter, stellt nun die Flamme klein und läßt noch 2 Minuten mäßig weiter sieden (vom Auftreten der Dämpfe an also 4 Minuten). Nach Entfernung der Flamme läßt man 4—5 Minuten abkühlen. Nach 4, aber nicht mehr wie 5 Minuten fügt man 50 ccm Wasser zu, dann 15 ccm einer gesättigten Natronlauge, setzt den Gummistöpsel auf und verbindet rasch mit dem Einleitungsrohr in der Vorlage. In der Vorlage befinden sich 35—75 cm 0,1 n-Schwefelsäure, die mit Wasser auf 150 ccm aufgefüllt sind. Als Indicator wird 1 Tropfen Alizarinrotlösung benutzt. Sobald die Verbindung hergestellt ist, wird mit der ganzen Flamme erhitzt, aber nicht sofort unter der Mitte des Kolbens, erst dann, wenn sich Säure und Lauge gemischt haben. Nach 4—5 Minuten ist die Destillation beendet. Das Einleitungsrohr läßt man in der Vorlage, kühlt unter der Leitung und titriert mit 0,1 n-Natronlauge zurück. Während der Destillation erwärmt sich die Flüssigkeit der Vorlage nur auf 65—70°. Diese Methode läßt sich nicht auf Eiweiß, Milch usw. anwenden, wozu längeres Erhitzen nötig ist. Zuckerhaltige Urine müssen ungefähr 6 Minuten erhitzt werden.

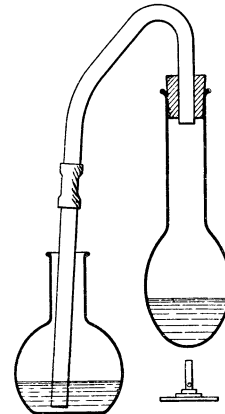


Abb. 25. Apparatur für die vereinfachte Kjeldahlbestimmung nach Folin und Wright.

**2. Verfahren nach Liebig-Pflüger (Harnstofftitrierung nach Liebig).** Durch diese Methode wird nicht, wie man früher annahm, der Harnstoff, sondern der Gesamtstickstoff bestimmt. Sie ist durch das Kjeldahl-Verfahren (§ 558), dem sie an Genauigkeit nachsteht, mit Recht ziemlich verdrängt worden, kann aber unter Umständen noch wertvolle Dienste leisten, da sie keinerlei Abzugsvorrichtung, welche bei der Ausführung der Kjeldahl-Bestimmung nicht zu entbehren ist, erfordert.

Prinzip. Fügt man zu einer verdünnten Harnstofflösung eine Lösung von Mercurinitrat in ziemlich kontinuierlichem Strome, solange noch ein Niederschlag entsteht und selbst in geringem Überschusse, so entsteht ein weißer Niederschlag von der Zusammensetzung  $2\text{CO}(\text{NH}_2)_2 \cdot \text{Hg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{HgO}$ . Eine Harnstofflösung, der Quecksilberlösung in einer zur Ausfällung des gesamten Harnstoffs unzureichenden Menge zugesetzt ist, gibt mit überschüssiger Sodalösung einen weißen Niederschlag, ist dagegen bereits ein geringer Überschuss an Mercurinitratlösung vorhanden, so ruft Soda einen gelben Niederschlag hervor. Das Auftreten dieses gelben Niederschlages dient als Endreaktion.

<sup>1)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 38, S. 461. 1919.

Vereinfachte Kjeldahlbestimmung des Gesamtstickstoffs nach Folin und Wright.

Bestimmung des Gesamtstickstoffs nach Liebig-Pflüger.

Im Harn tritt die Endreaktion erst auf, wenn auch die meisten anderen stickstoffhaltigen Bestandteile durch Quecksilberlösung gefällt sind.)

Enthält die zu titrierende Harnstofflösung Chlornatrium, so bildet sich zunächst beim Hinzufragen von Mercurinitratlösung Quecksilberchlorid und Natriumnitrat, und da das Quecksilberchlorid Harnstoff nicht fällt, entsteht erst dann ein Niederschlag, wenn alles Chlor an Quecksilber gebunden ist\*). Die hierdurch für die Harnstoffbestimmung im Harn bedingte Ungenauigkeit wird durch eine vorausgehende Ausfällung des Chlors durch Silberlösung vermieden. Da die Phosphate sich ebenfalls mit dem Mercurinitrat umsetzen, so sind auch diese vor der Titrierung zu entfernen.

Erforderliche Lösungen. 1. Harnstofflösung. Man löst 6 g (längere Zeit im Exsiccator bis zum konstanten Gewicht getrockneten) reinen Harnstoff in etwas Wasser und verdünnt die Lösung auf 300 ccm.

2. Barytmischung. Man mischt 2 Vol. kaltgesättigtes Barytwasser mit 1 Vol. kaltgesättigter Lösung von Bariumnitrat und bewahrt die Mischung in gut verschlossener Flasche auf.

3. Die für die Titrierung nach Mohr (§ 546) nötigen Reagenzien.

4. Natriumcarbonatlösung. 53 g reine gegläute Soda in 1 l Wasser.

5. Titrierte Quecksilberlösung (s. folgenden Absatz).

Herstellung der titrierten Quecksilberlösung. Reine konzentrierte Mercurinitratlösung (die mit Kochsalzlösung keine Trübung geben darf) wird mit Wasser ungefähr bis zum spez. Gew. 1,10 verdünnt und in eine Bürette gefüllt, in eine zweite Bürette kommt die Harnstofflösung und in eine dritte die Sodalösung. Man bringt nun einige Kubikzentimeter der letzteren in ein auf einer schwarzen Unterlage stehendes Uhrglas, in ein Becherglas genau 10 ccm der Harnstofflösung und dazu in einzelnen Portionen solange Quecksilberlösung, bis ein Tropfen der gut umgerührten Mischung, mit einem Glasstab vorsichtig in die Sodalösung im Uhrglase vom Rande her eingebracht, in wenigen Sekunden eine deutliche Gelbfärbung hervorruft. Man gießt dann die Sodalösung mit den einzelnen Proben aus dem Uhrglase in das Becherglas, fügt Sodalösung aus der Bürette bis zur ganz schwach sauren Reaktion der Mischung hinzu und prüft abermals, ob ein Tropfen in der Sodalösung den gelben Niederschlag hervorruft. Ist dies nicht der Fall, so fügt man noch weitere kleinere Portionen Quecksilberlösung bis zum Eintritt der Endreaktion hinzu, neutralisiert nahezu mit gemessener Menge Sodalösung und prüft abermals. Hat man auf diese Weise annähernd ermittelt: 1. wieviel Kubikzentimeter Quecksilberlösung und 2. wieviel Kubikzentimeter Sodalösung (zur annähernden Neutralisierung) erfordert werden, so wiederholt man die ganze Titrierung, indem man zu 10 ccm Harnstofflösung gleich auf einmal soviel Quecksilberlösung und unter fortwährendem Umrühren soviel Sodalösung zufließen läßt, als bei der ersten Titrierung gebraucht worden waren. Die Endreaktion wird jetzt ausbleiben und erst eintreten, wenn noch eine oder mehrere kleine Portionen Quecksilberlösung (nebst der erforderlichen Menge Sodalösung) zugefügt worden sind. Wiederholt man diese Titrierung abermals in derselben Weise, indem man nämlich sofort die ganze bei der zweiten Titrierung verbrauchte Quantität Quecksilberlösung zur Harnstofflösung hinzufügt, darauf sogleich die gleichfalls korrigierte Natriumcarbonatmenge unter stetem Umrühren einfließen läßt, so wird jetzt entweder sofort die Endreaktion bei Einbringung einer Probe der Mischung in ein paar Tropfen Sodalösung eintreten, oder nur ganz wenig Quecksilberlösung und Natriumcarbonat hinzuzumischen sein, um sie hervorzurufen.

Die Quecksilberlösung soll nun so weit verdünnt werden, daß 20 ccm derselben gerade 10 ccm Harnstofflösung entsprechen. Man fügt aber zweckmäßig nicht gleich die ganze Menge des berechneten Wassers hinzu, sondern etwas weniger, prüft die Lösung nochmals in der beschriebenen Weise mit 10 ccm Harnstofflösung, fügt wieder etwas weniger Wasser hinzu, als die Berechnung ergibt, prüft wieder, wiederholt die Prüfung mit 10 ccm Harnstofflösung usw., bis man gerade die richtige Verdünnung erreicht hat, d. h. bis gerade 20 ccm der Quecksilberlösung erforderlich sind, um in 10 ccm Harnstofflösung allen Harnstoff auszufällen und die Endreaktion hervorzurufen. Nähert man sich nicht sehr vorsichtig dem richtigen Verdünnungsgrade, so erhält man gewöhnlich gleich eine zu verdünnte Lösung.

1 ccm dieser Lösung entspricht 0,01 g Harnstoff.

Ausführung. Man füllt ein Probierringlas zweimal mit dem (eiweißfreien § 567) Harn, gießt in ein Becherglas aus, füllt dasselbe Probierringlas dann noch einmal mit der Barytmischung, gießt dieselbe zu dem abgemessenen Harnvolumen, schüttelt um, filtriert und prüft, ob ein Tropfen Barytmischung in dem Filtrate noch einen Niederschlag hervorruft. Ist das der Fall, so mischt man am besten eine neue Portion des Harns mit dem gleichen Volumen Barytmischung, filtriert und wiederholt die Prüfung. Phosphorsäurereiche Harn, z. B. Hundeharn, müssen oft mit dem doppelten Volumen Barytmischung versetzt werden, um völlig von Phosphorsäure befreit zu werden.

\*) Auf dieses Verhalten hat Liebig eine Titration des Chlornatriums im Harn gegründet, indem er den entstehenden Niederschlag als Endreaktion der Titrierung benutzte.



Bei (unter Essigsäurezusatz) entweißten Harnen ist darauf zu achten, daß durch die Barytmischung die Reaktion des Gemisches alkalisch wird.

Ist das Filtrat frei von Phosphorsäure, so mißt man davon eine Quantität ab, welche 10 ccm Harn enthält. Waren also 2 Volumina Harn mit 1 Volumen Barytmischung versetzt, so mißt man vom Filtrat 15 ccm ab; war der Harn mit dem gleichen Volumen Barytmischung versetzt, so benutzt man 20 ccm des Filtrats usw.

Jetzt fügt man soviel Kubikzentimeter Silberlösung hinzu, als durch eine besondere Bestimmung nach Mohr (§ 546) zur Ausfällung der Chloride in 10 ccm Harn ermittelt worden sind, und titriert, ohne das Chlorsilber abzufiltrieren, ganz ebenso wie oben bei der Herstellung der Quecksilberlösung angegeben. 4—5 ccm Quecksilberlösung kann man sofort ohne weitere Prüfung zusetzen, wenn der Harn nicht augenscheinlich sehr verdünnt ist. Die Titrierung wird um so genauer, je häufiger sie wiederholt und je schneller die Zumischung der ganzen Quecksilbermenge und der erforderlichen Sodalösung zur Harnstofflösung geschieht. Eine zweimalige Wiederholung ist jedenfalls nötig.

Korrektur. Es ist zu berücksichtigen, daß die Titrierung nur für 2 proz. Harnstofflösungen genaue Resultate gibt. Um den Fehler, der durch zu große Verdünnung (und bei der beschriebenen Ausführung wird die Flüssigkeit stets weniger wie 2% Harnstoff enthalten) bedingt ist, auszugleichen, zieht man nach Pflüger die Anzahl der bis zur Endreaktion verbrauchten Kubikzentimeter Quecksilberlösung ab von der Summe der verbrauchten Kubikzentimeter Harnbarytmischung + Silberlösung + Sodalösung und findet durch Multiplikation dieser Differenz mit 0,08 die Anzahl Kubikzentimeter, welche von der Anzahl der verbrauchten Kubikzentimeter abzuziehen sind. Sind z. B. für 15 ccm Harnbarytmischung 10 ccm Silberlösung, 16 ccm Quecksilberlösung und 11,5 ccm Sodalösung verbraucht, so sind nach Pflüger  $[(15 + 10 + 11,5) - 16] \cdot 0,08 = 1,64$  ccm von 16 ccm in Abzug zu bringen.

Berechnung. Hat man den Korrekturabzug gemacht, so gibt der Rest der bis zur Endreaktion verbrauchten Kubikzentimeter Quecksilberlösung in Zentigrammen die Menge Harnstoff in 10 ccm Harn an. Die durch Multiplikation mit 0,467 auf Stickstoff umgerechneten Harnstoffwerte stimmen mit den nach Kjeldahl (§ 558, a) gefundenen Stickstoffwerten annähernd überein.

### 3. Mikrobestimmung nach Folin und Farmer<sup>1)</sup>.

Prinzip. Der Harn wird nach Kjeldahl verascht und das im Luftstrom übergetriebene Ammoniak colorimetrisch durch Neblerisation bestimmt.

Mikrobestimmung des Gesamtstickstoffs nach Folin und Farmer.

Erforderliche Lösungen. Für die Neblerisation: 1. Standardlösung von Ammonsulfat. Die meisten Ammoniumsulfate enthalten Pyridin. Um reines Ammonsulfat zu erhalten, wird ein hochwertiges Ammonsulfat mit Ätznatron zersetzt und das Ammoniak in reine Schwefelsäure durch einen Luftstrom übergetrieben. Das Salz wird mit Alkohol gefällt, wieder in Wasser gelöst, noch einmal mit Alkohol gefällt und schließlich über Schwefelsäure im Exsiccator getrocknet. 9,4285 g dieses Salzes löst man in Wasser, füllt auf 1 l auf und verdünnt 100 ccm dieser Vorratslösung noch einmal auf 1 l. Dies ist die Standardlösung. 5 ccm enthalten 1 mg N. 2. Nebler's Reagens. Über die genaue Herstellung dieses Reagens s. den Abschnitt über die Mikrobestimmungen im Blut, § 698, 3. Ferner Kaliumphosphat, 5 proz. Kupfersulfatlösung, Quarzstückchen, konz. Natronlauge,  $\frac{1}{10}$ -Schwefelsäure.

Apparate. Verascht wird in einem großen Reagensglas aus Jenaer Glas (20—25 mal 200 mm). Von Folin ist noch eine Vorrichtung beschrieben worden, mit der die Dämpfe abgesaugt werden können und die gestattet, ohne Abzug zu arbeiten. S. darüber das Original. Für die Durchlüftung wird die in den Abb. 26 u. 27 dargestellte Apparatur verwendet, bei der Anwendung von Druckluft die der Abb. 26, beim Absaugen die in Abb. 27. Vor dem Eintritt in das Reaktionsgefäß geht die Luft durch eine Waschflasche mit verdünnter Schwefelsäure.

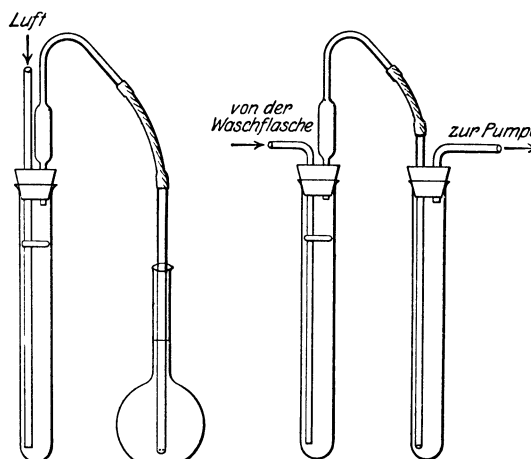


Abb. 26 und 27. Apparatur für die Mikrobestimmung des Gesamtstickstoffs im Harn nach Folin und Farmer.

Veraschung und Isolierung des Ammoniaks. 5 ccm Harn werden in einen 50-ccm-Meßkolben abgemessen, wenn das spezifische Gewicht über

<sup>1)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 11, S. 493. 1912.

1,018 ist, und in einen 25-ccm-Meßkolben, wenn das spezifische Gewicht unter 1,018 ist. Auffüllen zur Marke und mischen. Die Verdünnung soll so sein, daß 1 ccm 0,75—1,5 mg N enthält. 1 ccm wird dann in einem großen Reagensglas mit 1 ccm konzentrierter Schwefelsäure, 1 g Kaliumphosphat, 1 Tropfen einer 5proz. Kupfersulfatlösung und einigen Quarzstückchen verascht. Es wird im Ganzen ungefähr 6 Minuten über einem Mikrobrenner (nachdem die Lösung farblos geworden ist, noch 2 Minuten) erhitzt. Von dem Moment, wo die weißen Dämpfe entwickelt werden, erhält man nur mit kleiner Flamme im Sieden. 3 Minuten abkühlen lassen, bis die Flüssigkeit anfängt, zäh zu werden. Sie darf nicht fest werden. 6 ccm Wasser werden erst tropfenweise, dann rasch zugefügt, auch hierbei soll die Masse nicht fest werden. Zu der sauren Lösung setzt man einen Überschuß von Natriumhydroxyd (3 ccm einer gesättigten Lösung) und treibt das Ammoniak mit einem Luftstrom in die Vorlage, wo es in 2 ccm  $\frac{n}{10}$ -Schwefelsäure, die mit 20 ccm Wasser verdünnt sind, aufgefangen wird. In den ersten 2 Minuten schickt man einen mäßig starken, dann aber in den 8 weiteren Minuten einen kräftigen Luftstrom durch. Bei Anwendung von Druckluft kann ein 100-ccm-Meßkolben als Vorlage benutzt werden, bei Saugen ein großes Reagensglas; im letzteren Fall wird dann die Flüssigkeit in einen Meßkolben übergespült.

Neßlerisierung. Nach 10 Minuten wird der Apparat auseinandergenommen und der Inhalt der Vorlage auf 60 ccm verdünnt. In einen zweiten Meßkolben von 100 ccm gibt man 5 ccm (= 1 mg N) der Standardammoniumsulfatlösung und verdünnt auf die gleiche Weise. In beide Flüssigkeiten werden möglichst gleichzeitig 5 ccm des unmittelbar vorher verdünnten Neßlerschen Reagens gegeben. Das Maximum der Farbe tritt nach ungefähr  $\frac{1}{2}$  Stunde ein, aber die Zunahme ist geringfügig und unbedeutend, wenn beide Proben zu gleicher Zeit angesetzt werden. Beide Kolben werden bis zur Marke aufgefüllt und in einem Duboscq'schen Colorimeter verglichen. Die Standardlösung wird auf 20 mm eingestellt und die unbekannte mit ihr verglichen.

Berechnung. Ist die Schichtdicke der unbekanntten Lösung bei Farbengleichheit z. B. 14 mm, so beträgt die Menge Stickstoff in dem untersuchten Volumen Harn  $20/14 \times 1$  mg. In dem angenommenen Beispiel ist die Menge Stickstoff 1,43 mg. Wenn der Harn 10 mal verdünnt war, enthält jeder Kubikzentimeter des ursprünglichen Harns 14,3 mg bzw. 100 ccm 1,43 g N.

Mikrobestimmung  
des Gesamtstick-  
stoffs nach Pregl.

#### 4. Mikrobestimmung nach Pregl.

Diese Methode ist äußerst exakt und sehr zu empfehlen. S. auch § 698, 1. Näheres über die sehr gut bewährte Modifikation von Parnas und Wagner s. bei Pregl. Die quantitative organische Mikroanalyse. Berlin: Springer 1922.

Hier sei nur auf eine Neuerung Pregls hingewiesen: Die Zersetzung durch Schwefelsäure wird durch (evtl. mehrmalige) Zugabe weniger Tropfen reinsten Perhydrols wesentlich beschleunigt. Man darf dieses aber nicht zu früh hinzusetzen, sondern erst dann, wenn der Kölbcheninhalt zum erstenmal klar geworden ist. Man erhitzt dann noch kurz weiter. Die Zugabe von Alkohol erübrigt sich damit.

#### *Nachweis und Bestimmung des Harnstoffs im Harn.*

Nachweis. 580. Der Nachweis geschieht nach der Isolierung (S. 150) in der S. 153 angegebenen Weise.

Von den Bestimmungsmethoden beruht nur die mit Xanthidrol auf der direkten Isolierung des Harnstoffs. Die übrigen sind indirekte insofern, als der Harnstoff erst zersetzt wird und dann eines der Spaltungsprodukte quantitativ bestimmt wird. Bei der hydrolytischen Spaltung (Urease, Erhitzen mit

Wasser, Säuren, Alkalien) entstehen Kohlensäure und Ammoniak, bei der oxydativen (Einwirkung von salpetriger Säure, unterbromig- oder unterchlorigsaurem Natron) Stickstoff und Kohlensäure.

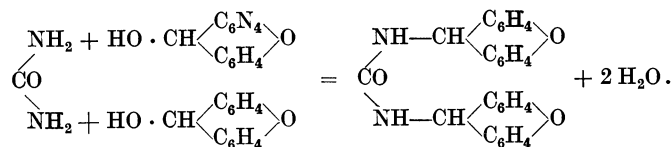
Die besten Resultate geben die Xanthydroly- und Urease-methode, unter denen wieder die letztere wegen ihrer einfachen und bequemen Ausführung in den meisten Fällen vorzuziehen ist.

Bei den übrigen Methoden liefern auch noch andere im Harn vorkommende Stoffe (Harnsäure, Kreatinin, Purinbasen u. a.) dieselben Zersetzungsprodukte. Ihre Resultate sind um so genauer, je mehr es gelingt, den Harnstoff vor der Spaltung zu isolieren. Ferner ist von Bedeutung, ein Spaltungsverfahren anzuwenden, welches zwar den Harnstoff völlig zerlegt, doch sonst so wenig wie möglich eingreift, damit dem Harnstoff noch beigemengte stickstoffhaltige Stoffe der Zersetzung entgehen. Unter diesen Verfahren liefert das von Henriques und Gammeltoft wohl die zuverlässigsten Werte, ist auch verhältnismäßig einfach.

### 1. Gravimetrische Bestimmung als Dixanthylnharnstoff<sup>1)</sup>.

Bestimmung des Harnstoffs mit Xanthydroly.

Prinzip. Harnstoff reagiert nach folgender Gleichung mit 2 Molekülen Xanthydroly unter Bildung von Dixanthylnharnstoff, einer in den gebräuchlichen Lösungsmitteln bei Zimmertemperatur schwer löslichen krystallinischen Substanz.



Ihr Zersetzungspunkt liegt bei 262—264°. Sie kann aus siedendem Eisessig oder siedendem Pyridin umkrystallisiert werden. Ihre Menge wird durch einfaches Wägen oder durch eine Stickstoffbestimmung ermittelt.

Mineralsäuren, Halogenide von Schwermetallen, Halogene, unterchlorige und unterbromige Säuren und ihre Salze, Wasserstoffsperoxyd, Peroxyde, Salze von Persäuren, Schwefelwasserstoff, Thioharnstoff, Phenylthioharnstoff, Phenylharnstoff, Dimethylanilin, Pyrrol, Indol und Skatol reagieren ebenfalls mit Xanthydroly und können die Bestimmung ev. stören. Die Eiweißkörper sind aus eiweißhaltigen Harnen vorher zu entfernen. Dazu darf nicht Phosphorwolframsäure benutzt werden, sondern die Koagulation mit Essigsäure und Kochen (§ 567) oder das Brückesche Reagens (Anh.).

Die besten Resultate werden bei einem Gehalt von 0,05% Harnstoff der zu untersuchenden Lösung erhalten.

Erforderliche Lösung. Xanthydrolylösung. Man verwendet eine 10proz. Lösung des käuflichen Xanthydrolys\*) in absolutem Methylalkohol (Fosse) oder eine 6proz. in Eisessig (Maestro). Die Lösungen sind etwa 2 Wochen haltbar.

Das käufliche Xanthydroly enthält oft Verunreinigungen an Oxydationsprodukten des Xanthydrolys oder des Xanthon und ist dann gelblich gefärbt. Diese Beimengungen sind in Methylalkohol nicht so leicht löslich.

Für die Fällung verwendet man ungefähr das Zehnfache der berechneten Menge.

Ausführung. In einen Erlenmeyerkolben werden mit einer genauen Pipette 10 ccm eines 10fach verdünnten Harns abgemessen, mit 35 ccm Eisessig versetzt und dann 5 ccm der methylalkoholischen Xanthydrolylösung in Portionen von 1 ccm mit Zwischenräumen von je 10 Minuten und jeweiligem Umschwenken zugegeben. Nach dem letzten Zusatz läßt man 1 Stunde stehen und sammelt den Niederschlag auf einem aschefreien Filter oder Goochtiiegel. Fosse hat einen kleinen, silbernen Trichter mit konkaver, ebenfalls silbernen

\*) Über Darstellung des Xanthydrolys aus Xanthon s. § 643, 3.

<sup>1)</sup> Fosse: Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 157, S. 948. 1913; Bd. 158, S. 1076, 1432, 1588. 1914. Ann. de l'inst. Pasteur Bd. 30, S. 525. 1916. — Maestro: Arch. di farmacol. sperim. e scienze aff. Bd. 19, S. 572; zit. nach Chem. Zentralbl. 1915, II, S. 984. — O. Winterstein: Diss. Zürich 1918.

Siebplatte angegeben. Der Niederschlag wird mit absolutem Methylalkohol gewaschen, einige Minuten im Trockenschrank getrocknet und gewogen. Oder er wird mitsamt dem Filter nach Kjeldahl verascht (Fosse).

Maestro trägt in eine Mischung von 1 ccm Urin, 9 ccm Wasser und 20 ccm Eisessig 5 ccm der Xanthydrollösung in Eisessig in 5 Portionen innerhalb von 50 Minuten ein. Die weitere Behandlung ist die gleiche.

Die abgewogene Menge Dixanthylharnstoff gibt mit 142,857 multipliziert den Gehalt des Harns an Harnstoff in 1 l an.

Bestimmung des Harnstoffs mit Urease.

## 2. Ureasemethode.

Prinzip. Durch ein Ferment der Sojabohnen, die Urease, wird der Harnstoff in Ammoniak und Kohlensäure zerlegt. Das gebildete Ammoniak wird bestimmt und von diesem Wert das Ammoniak abgezogen, welches der Harn schon an sich enthält. Die Urease ist spezifisch auf den Harnstoff eingestellt. Die anderen Bestandteile des Harns werden von ihr nicht angegriffen und brauchen deshalb auch vor der Bestimmung nicht abgetrennt zu werden.

Herstellung des Ureasepräparates. Am bequemsten ist die Verwendung der zu einem feinen Mehl zerriebenen Sojabohnen selbst. Man muß sich nur vergewissern, daß das Präparat kein Ammoniak enthält.

Präparat nach Folin und Wu.

Ureasepräparat nach Folin und Wu<sup>1)</sup>. In einen Kolben von 200 ccm gibt man 3 g Permutitpulver\*) (Natriumaluminiumsilicat) und wäscht es einmal mit 2 proz. Essigsäure und zweimal mit Wasser durch Dekantieren. 100 ccm 30 proz. Alkohol (35 ccm 95 proz. Alkohol mit 70 ccm Wasser gemischt) zufügen und 5 g Sojabohnenmehl, 10 Minuten schütteln. Filtrieren. Das Filtrat wird in 3—4 verschiedene kleine Gefäße von 25—50 ccm Inhalt verteilt. Eins davon wird für den sofortigen Gebrauch beiseite gestellt; die anderen verschlossen auf Eis aufbewahrt, wo sie sich 3 bis 4 Wochen halten. Das erste bleibt bei Zimmertemperatur ungefähr eine Woche wirksam, wenn es vor direktem Sonnenlicht geschützt ist. 1 ccm dieser Lösung macht aus 200 ccm, die 300 mg Harnstoffstickstoff enthalten, in 1 Stunde 22—37 mg bei 20° frei; nach 18 Stunden ist die Zersetzung vollendet.

Präparat nach v. Slyke.

Ein festes Ureasepräparat erhält man nach van Slyke<sup>2)</sup>, wenn man 1 Tl. Sojabohnenmehl mit 5 Tl. Wasser extrahiert, sofort filtriert oder zentrifugiert und die Lösung in die 10fache Menge Aceton eingießt. Die Fällung ist mehrmals zu wiederholen. Das Präparat wird im Vakuum von weniger als 1 mm über Schwefelsäure bei Zimmertemperatur getrocknet; es ist haltbar und in Wasser leicht löslich. Bei der Bestimmung wird 1 ccm einer 5- oder 10 proz. Lösung verwendet.

Präparat nach Jansen.

Jansen<sup>3)</sup> empfiehlt einen Extrakt mit Wasser und Glycerin. 1 Tl. Sojabohnenmehl wird mit 5 Tl. Wasser einige Stunden extrahiert, zentrifugiert oder filtriert und mit dem gleichen Volum Glycerin versetzt.

Empfindlichkeit der Urease.

Sonnenlicht schädigt die Urease, Säuren und Alkalien hemmen ihre Wirkung. Unter Umständen ist es deshalb notwendig, ein Puffergemisch zuzusetzen. Gegen Schwermetalle, auch geringe Spuren derselben, ist das Ferment außerordentlich empfindlich. Die Gefäße sind daher sorgfältig mit Salpetersäure und destilliertem Wasser zu reinigen. Alkoholbehandlung schädigt das Enzym. Das Temperaturoptimum liegt bei 42°\*\*).

Prüfung der Wirksamkeit der Urease.

Zur Bestimmung der Wirksamkeit eines Ureasepräparates stellt man fest, wieviel notwendig ist, eine gewisse Menge Harnstoff in 15—30 Minuten abzubauen. Daraus läßt sich dann leicht berechnen, wieviel Ferment einer Lösung zugesetzt werden muß, damit die Reaktion in der Versuchszeit zu Ende kommt.

Pufferlösungen. a) Pyrophosphatlösung. 140 g Natriumpyrophosphat und 20 g Phosphorsäure werden in 1 l Wasser aufgelöst<sup>4)</sup>. b) Phosphatlösungen nach Folin und Wu<sup>5)</sup>.  $\frac{1}{3}$  Mol. (46,03 g)  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  und  $\frac{2}{3}$  Mol. (238,8 g)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$  werden in 1 l Wasser aufgelöst. c) Phosphatlösung nach Sumner<sup>6)</sup>. In 500 ccm Wasser werden 111 g sekundäres Natriumphosphat und 85 g primäres Kaliumphosphat gelöst. Von den Lösungen a) und b) werden 2 bis 3 Tropfen verwendet, von der Lösung c) 1 ccm.

Makrobestimmung.

Ausführung. Bei der Makrobestimmung wendet man zur Destillation des gebildeten Ammoniaks am besten das Verfahren von Krüger und Reich (§ 578)

\*) Zu beziehen von der Permutit-Aktiengesellschaft Berlin NW 6, Luisenstr. 30.

\*\*) Eine eingehende Beschreibung der Eigenschaften und der Wirkungsweise der Urease gibt Lövgren, Biochem. Zeitschr. Bd. 119, S. 215. 1921; Bd. 137, S. 206. 1923.

<sup>1)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 38, S. 92. 1919. <sup>2)</sup> desgl. Bd. 15, S. 211. 1914.

<sup>3)</sup> Chem. Weekblad Bd. 12, S. 483; zit. nach Chem. Zentralbl. 1915, II, S. 203.

<sup>4)</sup> Aus Mathews: Physiol. Chem. New York 1921.

<sup>5)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 38, S. 81. 1919. <sup>6)</sup> desgl. Bd. 38, S. 57. 1919.

an. Zunächst wird der Apparat in Ordnung gebracht und die Vorlage mit der notwendigen Menge  $\frac{n}{10}$ -Säure beschickt. In den sorgfältig gereinigten Kjeldahlkolben von 500 ccm Inhalt gibt man 5 ccm mit verdünnter Sodalösung gegen Phenolphthalein neutralisierten Harn und 2 g Sojabohnenmehl oder die entsprechende Menge eines anderen Fermentpräparates, verschließt ihn wie bei der Ammoniakbestimmung, senkt ihn in ein Wasserbad von  $40^\circ$ , verbindet mit der Vorlage und diese mit der Pumpe. Nach  $\frac{1}{2}$  Stunde öffnet man, gibt 4–5 g (jedenfalls soviel, daß eine deutlich alkalische Reaktion eintritt) trockene Soda zu und 3 Tropfen Octylalkohol, verbindet wieder und destilliert  $\frac{1}{2}$  Stunde lang. Dann wird die Säure in den Vorlagen mit  $\frac{n}{10}$ -Lauge zurücktitriert. In derselben Menge Harn bestimmt man auf die gleiche Weise das Ammoniak allein.

Die Differenz in den verbrauchten Kubikzentimetern  $\frac{n}{10}$ -Säure entspricht der Menge Ammoniak, die durch die Zersetzung des Harnstoffs gebildet worden ist. Multipliziert man diese Anzahl Kubikzentimeter mit 0,001401, so erhält man die Menge Harnstoffstickstoff in Gramm in 5 ccm Harn und durch weitere Multiplikation mit 2,143 die entsprechende Menge Harnstoff in Gramm.

2. Für die Mikrobestimmung (Marshall, van Slyke und Cullen<sup>1)</sup> Mikrobestimmung. wird zur Destillation des Ammoniaks das Durchlüftungsverfahren bevorzugt. Die Apparatur ist die gleiche wie bei der Bestimmung des Gesamtstickstoffs nach Folin und Farmer (§ 579, 3); sie ist vor dem Versuch zusammenzustellen. Man benutzt weniger Harn: 0,5 ccm von unverdünntem oder 5 ccm eines 10fach verdünnten Harns. Sie werden in das Reaktionsgefäß, einen kleinen Kjeldahlkolben, oder ein großes Reagensglas von 100 ccm Inhalt abgemessen, dazu 2 Tropfen der Pufferlösungen *a* oder *b* oder 1 ccm der Pufferlösung *c*, 2–3 Tropfen Octyl- oder Caprylalkohol und 1 g Sojabohnenmehl oder ein anderes Präparat gegeben. Man verschließt und läßt stehen bis die Reaktion beendet ist: bei  $20^\circ$  15 Minuten,  $25^\circ$  10 Minuten,  $50^\circ$  3 Minuten. Gleichzeitig werden in die Vorlage 25 ccm  $\frac{n}{50}$ -Salzsäure gegeben und diese mit dem Reaktionsgefäß verbunden. Wenn die Reaktion beendet ist, wird kurz  $\frac{1}{2}$ –1 Minute Luft durchgesaugt, um Verluste an bereits frei gewordenem Ammoniak zu vermeiden. Man öffnet, setzt 4–5 g trockene Soda zu, schließt rasch wieder und saugt 15 Minuten Luft durch\*). Zum Schluß wird gegen Alizarinsulfonat (1 Tropfen einer 1proz. Lösung) mit  $\frac{n}{50}$ -Lauge zurücktitriert. Von der Anzahl Kubikzentimeter verbrauchter  $\frac{n}{50}$ -Säure werden die abgezogen, die bei der Bestimmung von Ammoniak allein in dem gleichen Volumen Harn verbraucht werden. Die Differenz ergibt mit 0,12 multipliziert den Gehalt des Harns an Harnstoff oder mit 0,056 multipliziert den Gehalt an Harnstoffstickstoff in Prozenten.

Bei der Mikrobestimmung kann das Ammoniak auch colorimetrisch durch Neblerisa- Colorimetrische Mikrobestimmung. tion bestimmt werden (Folin und Denis<sup>2)</sup>, Folin und Youngburg<sup>3)</sup>, Roman<sup>4)</sup>).

1 ccm eines auf das 10fache verdünnten Harns wird in einem Reagensglas mit 1 ccm der Ureaselösung nach Folin und Wu und 1 Tropfen Phosphatmischung *b*) (S. 702) 5 Minuten bei  $40$ – $55^\circ$  oder 15 Minuten bei Zimmertemperatur digeriert, dann der Inhalt in einen Meßkolben von 200 ccm gebracht, auf etwa 150 ccm verdünnt. In einen zweiten Meßkolben wird 1 mg Stickstoff in Form einer Ammonsulfatlösung gebracht, dazu 1 ccm der Ureaselösung und ebenfalls auf 150 ccm verdünnt. Zu beiden gibt man 20 ccm Neblers Reagens, wie es zur Bestimmung des Gesamtstickstoffs nach Folin und Farmer verwendet wird (§ 579, 3), füllt auf 200 ccm auf und vergleicht im Duboscqschen Colorimeter (Folin und Youngburg). Die Vorschrift von Roman weicht etwas von diesem Verfahren ab.

\*) Lövgren läßt die Apparatur während des ganzen Versuches geschlossen und gibt das Alkali (40 ccm einer gesättigten Lösung von Pottasche) durch einen Hahntrichter zu.

<sup>1)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 15, S. 495. 1913; Bd. 19, S. 211. 1914. Dtsch. med. Wochenschr. Jg. 40, S. 1219. 1914.

<sup>2)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 26, S. 501. 1916; <sup>3)</sup> Ebenda Bd. 38, S. 111. 1919.

<sup>4)</sup> Journ. of urol. Bd. 4, S. 531. 1921; zit. nach Ber. üb. d. ges. Physiol. Bd. 6. S. 533.

Bestimmung des  
Harnstoffs nach  
Pflüger-  
Bleibtreu.

### 3. Verfahren nach Pflüger-Bleibtreu<sup>1)</sup> mit Modifikationen von Gumlich<sup>2)</sup> und Schöndorff<sup>3)</sup>.

Prinzip. Ausfällung des größten Teiles der übrigen stickstoffhaltigen Bestandteile durch Phosphorwolframsäure, Spaltung des im Filtrat befindlichen Harnstoffs durch 4 $\frac{1}{2}$ stündiges Erhitzen des Filtrates mit Phosphorsäure auf 150° und Bestimmung des abgespaltenen Ammoniaks\*).

Einen kleinen prinzipiellen Fehler bei dieser Methode bedingt die Anwesenheit von Oxyproteinsäure im Harn, welche durch Phosphorwolframsäure nicht gefällt und deren Stickstoff durch Erhitzen mit Phosphorsäure auf 150° zum Teil als Ammoniak abgespalten wird (Schöndorff<sup>4)</sup>).

Erforderliche Reagenzien und Apparate. 1. Eine Mischung von 9 Tl. 10 proz. Phosphorwolframsäure und 1 Tl. Salzsäure (spez. Gew. 1,124). Diese Mischung darf in 2—4 proz. Harnstofflösungen auch bei längerem Stehen keine Trübung hervorrufen. 2. Kalkhydratpulver, hergestellt durch Vermischen von Calciumoxyd mit Wasser, Trocknen und Pulverisieren. 3. Krystallisierte Phosphorsäure. 4. Die § 558 unter 2, 4, 5, 8 und 9 aufgeführten Apparate und Reagenzien.

Ausführung. 50 ccm Harn\*\*) (bei einem spezifischen Gewicht über 1017 nach Verdünnung mit gemessener Menge Wasser) werden in einem verschließbaren Maßzylinder von 200 ccm mit genau derjenigen Menge obiger Phosphorwolframsäure, welche sich zur völligen Ausfällung nach Maßgabe einer Vorprobe als gerade nötig erwiesen hatte, versetzt.

Die Ausführung dieser Vorprobe geschieht so, daß zu 10 ccm Harn allmählich unter Umschütteln so lange aus einer Bürette Phosphorwolframsäure zugegeben wird, bis 1 ccm des klaren (ev. mehrfach zurückgegossenen) Filtrats auf Zusatz weniger Tropfen aus der Bürette sich nach 2 Minuten nicht trübt. Es genügt die Austitrierung bis auf 1 ccm.

Man füllt auf 150 bzw. 200 ccm mit 10fach verdünnter Salzsäure (spez. Gew. 1,124) auf, schüttelt um und filtriert nach 24stündigem Stehen. Dabei ist auf völlige Klarheit des Filtrats zu achten (doppeltes Filter am besten aus dichtem schwedischem Filtrierpapier J. H. Munktell Nr. 1 hergestellt, wiederholtes Zurückgießen). Das klare Filtrat wird mit Kalkhydratpulver bis zur alkalischen Reaktion verrieben und nach Verschwinden der blauen Farbe filtriert. Man mißt nun 15 bzw. 20 ccm (entsprechend 5 ccm Harn) in ein Erlenmeyerkölbchen, in das vorher ungefähr 10 g krystallisierte Phosphorsäure eingebracht sind, ab und erhitzt in einem Trockenschrank 4 $\frac{1}{2}$  Stunden (gerechnet von der Zeit an, wenn alles Wasser verdunstet ist) auf 150°. Nach dem Erkalten löst man die am Boden befindliche sirupartige Masse in warmem Wasser, führt sie in einen Destillationskolben über, bestimmt ihren Stickstoffgehalt wie bei der Kjeldahlbestimmung (§ 558) und erfährt durch Multiplikation des Stickstoffwertes mit 2,143 die in 5 ccm Harn enthaltene Harnstoffmenge.

Nach Pflüger und Bleibtreu soll man in einer anderen 5 ccm Harn enthaltenden Probe des Filtrats der mit dem Kalkpulver verriebenen Flüssigkeit eine Ammoniakbestimmung nach Schlösing (§ 578, 3) ausführen, den gefundenen Wert auf Stickstoff umrechnen und von dem Gesamtstickstoffwert vor der Umrechnung auf Harnstoff abziehen. Nach Gumlich ist bei Benutzung eines Merckschen Phosphorwolframsäurepräparates diese Bestimmung unnötig, da in diesem Falle alles Ammoniak im Phosphorwolframsäureniederschlag sich befindet, sofern man für eine völlige Klarheit des Filtrats sorgt. Will man die Ammoniakbestimmung doch ausführen,

\*) Die Zersetzung des Harnstoffs mit Säure wenden auch Benedict und Gephart an, s. darüber Journ. of Americ. chem. soc. Bd. 30, S. 1760. 1908; ferner Wolf u. Osterberg: desgl. Bd. 31, S. 421. 1909 und Levene u. Meyer: desgl. Bd. 31, S. 717. 1909.

\*\*) Auch für zuckerhaltigen Harn ist die Methode nach Schöndorff<sup>5)</sup> verwendbar, wenn man den Harn auf ungefähr 1% Zucker bringt und beim Neutralisieren des Filtrats vom Phosphorwolframsäureniederschlag mit Kalkhydratpulver für einen Überschuß an Kalk sorgt.

1) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 44, S. 78. 1889.

2) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 17, S. 10. 1893.

3) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 62, S. 1. 1896.

4) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 117, S. 275. 1907.

5) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 117, S. 275. 1907.

und das ist bei Benutzung einer Phosphorwolframsäure, welche Ammoniak nicht oder nicht vollständig fällt, durchaus nötig, so ist dafür zu sorgen, daß die Proben des alkalisch reagierenden Filtrats, welche einerseits zur Bestimmung des Ammoniaks, andererseits zum Erhitzen mit Phosphorsäure benutzt werden sollen, nicht ungleiche Mengen von Ammoniak verlieren. Man gießt am besten das Filtrat in gut verschließbare Büretten und läßt nun hintereinander abgemessene Proben in den Phosphorsäure enthaltenden Kolben, sowie in die Glasschale des Schlösingschen Apparates, in die eine zur Herstellung schwach saurer Reaktion nötige Menge Schwefelsäure eingebracht ist, fließen.

#### 4. Verfahren nach Henriques und Gammeltoft<sup>1)</sup>.

Prinzip. Ausfällung des mit viel  $\frac{n}{2}$ -H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> versetzten Harns mit Phosphorwolframsäure, Spaltung des im Filtrat befindlichen Harnstoffs durch 1½ständiges Erhitzen auf 150° im Autoklaven, Bestimmung des mittels Durchlüftung<sup>2)</sup> (oder Vakuumdestillation) isolierten Ammoniaks.

Erforderliche Reagenzien und Apparate. 10proz. Lösung von Phosphorwolframsäure in  $\frac{n}{2}$ -H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Sie ist auf ihr Verhalten zu Harnstofflösung zu prüfen, wie § 580, 3 angegeben.  $\frac{n}{2}$ -H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Autoklav. Apparatur zur Ammoniakisolierung nach Folin (§ 578, 2).

Ausführung. Nach Ermittlung, wieviel von der obigen Lösung nötig ist, um in 5 ccm Harn eine vollständige Fällung zu bewirken, bringt man in einen 100-ccm-Meßkolben 10 ccm Harn, setzt die entsprechende Menge der Lösung hinzu, füllt bis zur Marke mit  $\frac{n}{2}$ -H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> auf, mischt, läßt stehen, bis sich der Bodensatz gerade abgesetzt hat, und filtriert. 2 Portionen von je 10 ccm des Filtrats werden in Reagensgläsern aus Jenaglas nach Bedeckung mit Zinnfolie 1½ Stunden im Autoklaven bei 150° erhitzt. Die Bestimmung des Ammoniaks geschieht nach § 578, 2. Die Isolierung kann man auch durch Destillation im Vakuum (nach Zusatz von methylalkoholischer Barytlaug) bewirken. Aus der Menge des gefundenen Ammoniaks berechnet man die Harnstoffmenge durch Multiplikation mit 1,763.

5. Verfahren nach Hufner. Dieses zuerst von Davy und Leconte angegebene, dann von Knop<sup>3)</sup> und Hufner<sup>4)</sup> verbesserte Verfahren ist, da eine vorherige Isolierung nicht vorgenommen wird, weniger genau und um so unzuverlässiger, je mehr die Harnstoffmenge im Verhältnis zu den anderen stickstoffhaltigen Bestandteilen des Harns zurücktritt\*).

Prinzip. Zersetzung des Harnstoffs durch Bromlauge und gasometrische Bestimmung des entwickelten Stickstoffs.

Erforderliche Reagenzien und Apparate. 1. Frisch bereitete Bromlauge, hergestellt durch Auflösen von 100 g Ätznatron in 250 ccm Wasser und Zufügen von 25 ccm Brom zu der völlig erkalteten Flüssigkeit. 50 ccm dieser Lösung reichen hin, um aus einer Salmiaklösung 130 bis 150 ccm Stickstoff zu entwickeln. 2. Der in Abb. 28 dargestellte Apparat, dessen Gefäß A + zugehöriger (weiter) Hahnbohrung ungefähr 5 ccm fassen und genau kalibriert sein muß. Das Gefäß B soll ungefähr 100 ccm fassen.

Ausführung. Man versetzt den Harn, wenn er nicht schon an und für sich verdünnt ist, mit dem gleichen, evtl. mit dem doppelten Volumen Wasser (er soll ungefähr 1% Harnstoff enthalten), bringt ihn mittels eines langen Trichterohrs in das vollkommen trockene Gefäß A, füllt auch die Bohrung, schließt den Hahn und spült nun das Gefäß B sorgfältig mit Wasser aus, um den

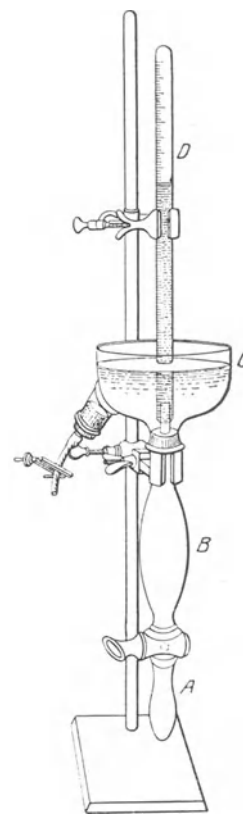


Abb. 28. Apparat zur Harnstoffbestimmung nach Hufner.

\*) Vgl. dazu M. Krogh: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 84, S. 379. 1913.

1) Skandinav. Arch. f. Physiol. Bd. 25, S. 153. 1911.

2) Gill, Allison u. Grindley: Journ. of the Americ. chem. soc. Bd. 31, S. 717. 1909.

3) Zeitschr. f. analyt. Chem. Bd. 9, S. 225. 1870.

4) Journ. f. prakt. Chem. N. F. Bd. 3, S. 1. 1871. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 1, S. 350. 1878.

Harn völlig zu entfernen. Jetzt füllt man das ganze Gefäß *B* und ebenso das Gefäß *C* größtenteils mit der Bromlauge, stülpt das gleichfalls mit dieser Lauge gefüllte graduierte und kalibrierte Glasrohr *D* über die Öffnung des Gefäßes *B* und beginnt nun die Bestimmung, indem man durch Öffnung des Hahns die Lauge zu dem Harn in *A* eintreten läßt. Die Bohrung des Hahns soll eine recht weite sein, damit die Lauge recht plötzlich sich mit dem Harn mengt. Es zeigt sich alsbald stürmische Gasentwicklung, die sich bald verlangsamt, aber schwächer einige Zeit fort dauert. Ist die Gasentwicklung zu Ende, nach 20—30 Minuten, so wird das Rohr *D* etwas in die Höhe gezogen, mit Hilfe eines Glaslöffels in ein mit destilliertem Wasser gefülltes Zylinderglas gebracht und hier senkrecht so aufgestellt, daß das innere Niveau mit dem äußeren zusammenfällt. Nach halbstündigem Stehen bei gleichmäßiger Temperatur liest man das Volumen des Gases ab, bestimmt die Temperatur der Luft über dem Wasser, notiert den Barometerstand und berechnet den Harnstoffgehalt des Harns nach folgenden Daten.

Berechnung. 1 g Harnstoff liefert nach seiner Formel 372 ccm Stickstoff von 0° und 760 mm Druck, aber nach Hüfners Untersuchungen entwickelt die obige Brom-Natronlauge aus 1 g Harnstoff nur 354.33 ccm N<sub>2</sub> von 0° und 760 mm Druck. Ist nun *p* das Gewicht des Harnstoffs für 100 ccm Harn, *a* die für die Bestimmung verwendete Quantität Harn, *b* der beobachtete Barometerstand, *t* die Temperatur bei der Ablesung des Volumens, *v* das Volumen des entwickelten Stickstoffs in Kubikzentimetern und *b'* die Tension des Wasserdampfes für diese Temperatur, so ist

$$p = \frac{100 v (b - b')}{760 \cdot 354,33 \cdot a (1 + 0,003665 \cdot t)}$$

Je konzentrierter die Bromlauge und je höher die Temperatur, desto schneller und vollständiger vollzieht sich die Zerlegung des Harnstoffs unter Stickstoffentwicklung, desto größer ist aber zugleich die Gefahr, daß neben Stickstoff auch Sauerstoff entwickelt wird. Harnsäure, Kreatinin, Ammoniak und mehrere andere Stoffe werden durch die Bromlauge unter allmählicher Entwicklung von Stickstoff zersetzt.

#### *Nachweis von Oxalursäure und Allantoin im Harn.*

Über den Nachweis von Oxalursäure s. § 126, über den Nachweis von Allantoin § 127.

#### *Nachweis und Bestimmung des Kreatinin im Harn.*

Nachweis. 581. Zum Nachweis des Kreatinins im Harn dienen die S. 163 angegebenen Reaktionen von Weyl oder Jaffe.

Für die Makro- und Mikrobestimmung dienen folgende Verfahren von Folin. Sie sind viel einfacher und zuverlässiger als das ältere, durch Salzkowski<sup>1)</sup> verbesserte Verfahren, von Neubauer<sup>2)</sup>, welches auf der Isolierung des Kreatinins als Kreatininchlorzink beruht.

Makrobestimmung  
des Kreatinin  
nach Folin.

##### 1. Makrobestimmung nach Folin<sup>3)</sup>.

Prinzip. Die Methode ist eine colorimetrische und beruht auf der Jaffeschen Reaktion mit alkalischer Pikrinsäurelösung (S. 163).

10 mg Kreatinin, in 10 ccm Wasser gelöst, geben die maximale Rotfärbung 5—10 Minuten nach Zusatz von 15 ccm 1,2proz. Pikrinsäurelösung und 4—8 ccm 10proz. Natronlauge. Nach dieser Zeit blaßt die Farbe allmählich ab. Durch Verdünnung der so erhaltenen roten Lösung mit Wasser auf 500 ccm erhält man eine Flüssigkeit, die in einer Dicke von 8,1 mm im

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 10, S. 119. 1886.

<sup>2)</sup> Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 119, S. 27. 1861.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 41, S. 223. 1904.



durchfallenden Licht genau dieselbe Farbe hat wie eine 8 mm dicke Schicht einer  $\frac{n}{2}$ -Kaliumbichromatlösung\*).

Erforderliche Lösungen und Apparate. 1. Ein Duboscq'sches Colorimeter oder eine der zahlreichen in neuerer Zeit hergestellten Modifikationen dieses Apparates. 2. Eine  $\frac{n}{2}$ -Kaliumbichromatlösung (24,54 g im Liter). Die Lösung ist jahrelang haltbar. 3. Eine annähernd gesättigte (1,2proz.) Pikrinsäurelösung. 4. Eine 10proz. Natronlauge.

Ausführung. Man bringt in das eine Rohr des Colorimeters  $\frac{n}{2}$ -Bichromatlösung, stellt genau auf 8 mm ein und übt sich zunächst nach Einbringen von der Bichromatlösung auch in das zweite Rohr in der Einstellung. Die Differenz zwischen je 2 Beobachtungen soll 0,3 mm nicht überschreiten und das Mittel aus 3 oder 4 Ablesungen darf nicht mehr als 0,1 mm vom richtigen Wert (8 mm) abweichen. Nunmehr bringt man in einen  $\frac{1}{2}$ -l-Meßkolben 10 ccm Harn, welcher frei von Aceton, Acetessigsäure und Schwefelwasserstoff sein muß, 15 ccm Pikrinsäurelösung und 5 ccm 10proz. Natronlauge, schüttelt ein paarmal, läßt 5 Minuten ruhig stehen, füllt mit Wasser von 15° bis zur Marke auf und mischt gut. Diese Lösung wird nun sofort in das zweite zuvor mit ihr ausgespülte Rohr eingebracht und auf die Bichromatlösung eingestellt. Man macht eine Reihe von Ablesungen, bei denen Schwankungen bis zu 0,3 mm wohl unvermeidlich sind, und nimmt das Mittel.

Berechnung. Beträgt der gefundene colorimetrische Mittelwert  $a$  mm, so enthalten 10 ccm Harn  $\frac{8,1}{a} \cdot 10$  mg Kreatinin.

Wird ein colorimetrischer Wert unter 5 mm oder über 13 mm gefunden, so muß die Bestimmung wiederholt werden, und zwar im ersten Falle unter Benutzung von 5 ccm und im zweiten Falle unter Benutzung von 20 ccm Harn, statt 10 ccm. Kreatinarme Harn von Säuglingen sind zunächst zu konzentrieren, am besten im Vakuum bei niedriger Temperatur, um ein Dunkelwerden zu vermeiden.

Bei pathologischen Harnen können Aceton und Acetessigester die Kreatininbestimmung stören. Acetonkonzentrationen bis zu 5% sind noch unschädlich. Dagegen nimmt die Acetessigsäure schon bei einem Gehalt von 0,02% einen Teil der Farbe weg. Diese muß auf jeden Fall entfernt werden durch 2 Stunden lange Extraktion mit Äther bei salzsaurer Reaktion und Durchlüftung während 1 Stunde oder nach folgendem Verfahren: 10 ccm Harn werden mit konzentrierter Salzsäure gegen Lackmus, aber nicht gegen Kongo sauer gemacht. Dann gibt man 5 Vol. Methylalkohol zu und kocht auf einer Asbestplatte 1—2 Minuten länger als für das Erhitzen zum Sieden auf 100° notwendig war. Nach dem Abkühlen kann die Lösung zur Bestimmung verwendet werden (Greenwald<sup>1</sup>), Blau<sup>2</sup>).

Auch die Temperatur, bei der die Ablesung vorgenommen wird, kann Fehler verursachen. Sie sollte immer ungefähr 20° betragen. Das liegt daran, daß der Dissoziationsgrad der beiden Farbstoffe, der Pikraminsäure und des Bichromats, bei Veränderungen der Temperatur sich nicht im gleichen Maße ändert. Man muß sich davon überzeugen, daß das Colorimeter den oben genannten Bedingungen genügt, d. h. daß tatsächlich 8 mm der Bichromatlösung dieselbe Farbenintensität haben wie 8,1 mm einer Lösung von 10 mg Kreatinin in 500 ccm Wasser. Der Temperaturfehler kann vermieden werden, wenn man an Stelle der Bichromatlösung die für die Mikrobestimmung angegebene Kreatinin-stamm-lösung benutzt (Folin<sup>3</sup>).

\*) Diese Werte sind von Hoogenhuyze und Verploegh<sup>4</sup>), Dorner<sup>5</sup>), af Klercker<sup>6</sup>) bestätigt worden.

<sup>1</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 14, S. 87. 1913.      <sup>2</sup>) desgl. Bd. 48, S. 105. 1921.

<sup>3</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 17, S. 463 u. 469. 1914.

<sup>4</sup>) Hoppe-Seyler's Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 46, S. 415. 1905.      <sup>5</sup>) desgl. Bd. 52, S. 225. 1907.

<sup>6</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 3, S. 45. 1907.

Mikrobestimmung  
des Kreatinin  
nach Folin.

## 2. Mikrobestimmung nach Folin<sup>1)</sup>.

Prinzip. Es ist das gleiche wie bei der Makromethode, nur daß hier als Vergleichslösung eine Lösung von reinem Kreatinin, die wie die zu untersuchende Lösung mit Pikrinsäure und Alkali versetzt wird, vorzuziehen ist.

Erforderliche Lösungen. Kreatininstammlösung. 1,6106 g Kreatininzinkchlorid oder 1 g reines Kreatinin\*) werden in 11<sup>n</sup>/<sub>10</sub>-Salzsäure gelöst. 1 ccm enthält 1 mg Kreatinin, die übrigen Lösungen sind die gleichen wie bei der Makrobestimmung.

Ausführung. Mit einer Ostwaldschen Pipette werden 1 oder 2 ccm Harn in einen Meßkolben von 100 ccm abgemessen. In einen zweiten, gleich großen Meßkolben gibt man 1 ccm der Kreatininstammlösung. In beide werden dann 20 ccm der gesättigten Pikrinsäurelösung und aus einer Bürette 1,5 ccm klare 10proz. Natronlauge eingetragen. Nach 10 Minuten auffüllen zur Marke und mischen. Erst wird die Vergleichslösung, welche sich 24 Stunden hält, mit sich selbst verglichen und dann bei einer Schichtdicke von 20 mm mit der zu untersuchenden Flüssigkeit.

Berechnung. 
$$\frac{20}{\text{mm der Harnlösung}} = \text{Milligramm Kreatinin in dem angewandten Volumen.}$$

Die Differenz der Schichtdicke zwischen der Stammlösung und der Harnlösung soll bei Farbgleichheit nicht mehr als 5 mm betragen, sonst muß die Bestimmung mit einer größeren oder kleineren Menge Harn wiederholt werden<sup>2)</sup>.

### *Bestimmung des Kreatin im Harn.*

Bestimmung des  
Kreatin nach  
Hahn und  
Barkan.

#### 582. 1. Nach Hahn und Barkan<sup>3)</sup>.

Prinzip. Die Bestimmung ist eine indirekte, indem einerseits die Menge des präformierten Kreatinins, andererseits die Menge des präformierten + des aus Kreatin entstandenen ermittelt wird. Die Umwandlung des Kreatins in Kreatinin erfolgt während 24stündiger Einwirkung von n-HCl bei 60—65°.

Erforderliche Lösungen. Eine Lösung, welche in 1000 ccm 0,2 g reines Kreatinin\*) und 5 ccm n-HCl enthält. Mit wenigen Tropfen Toluol versetzt ist sie wochenlang haltbar. Ferner gesättigte wässrige Pikrinsäurelösung, 10proz. Natronlauge, zweifach-n-HCl, n-KOH.

Für die entsprechenden Manipulationen bei beiden Bestimmungen benutzt man dieselben Meßkolben und Pipetten.

Ausführung. a) Bestimmung des vorgebildeten Kreatinins. Von dem mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnten Harn bringt man je nach dem Kreatiningehalt 1 ccm oder einen Bruchteil oder ein Mehrfaches von 1 ccm in einen 100-ccm-Meßkolben, fügt 15 ccm gesättigter Pikrinsäurelösung und 15 ccm 10proz. Natronlauge hinzu und füllt nach 5 Minuten mit Wasser zur Marke auf. Gleichzeitig behandelt man 10 ccm der obigen Kreatininlösung in einem zweiten 100-ccm-Meßkolben in der gleichen Weise, vergleicht colorimetrisch und erfährt so die Menge des Kreatinins.

b) Überführung des Kreatins in Kreatinin und Bestimmung des Gesamtkreatinins. Man bringt mit dem gleichen Volumen Doppelt-n-HCl versetzten Harn in den Thermostaten bei 60°, entnimmt nach 24 Stunden die zur Untersuchung nötige Menge, bringt sie in den 100-ccm-Meßkolben, neutralisiert durch Zusatz der entsprechenden Menge n-KOH und verfährt weiter wie oben beschrieben (Zusatz von Pikrinsäure, Natronlauge, Auffüllen bis zur Marke, Colorimetrie). Nach weiteren 24 Stunden wiederholt man die Bestimmung und überzeugt sich von der Vollständigkeit der Umwandlung.

\*) Über seine Gewinnung s. § 130. Das von den Farbenfabriken vorm. Friedr. Bayer & Co. früher unter dem Namen „Ilun“ in den Handel gebrachte reine Kreatinin wird nach einer Mitteilungs der Fabriken nicht mehr hergestellt.

<sup>1)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 17, S. 469. 1914.

<sup>2)</sup> Aus Mathews: Physiol. Chem. New York 1921.

<sup>3)</sup> Zeitschr. f. Biol. Bd. 72, S. 305 u. 325. 1920.

**2. Nach Benedict<sup>1)</sup>.**Bestimmung des  
Kreatin nach  
Benedict.

Prinzip. Es ist das gleiche wie bei der vorgenannten Methode. Das Kreatin wird indirekt bestimmt. Durch Eintrocknen mit dem ungefähr gleichen Volumen n-Salzsäure wird das Kreatin quantitativ in Kreatinin übergeführt. Außerdem wird gepulvertes oder gekörntes Blei zugesetzt, um die Pigmentbildung beim Eindampfen zu verhindern. Bei normalem Harn spielt die Pigmentbildung eine geringe Rolle, ist aber von großer Bedeutung bei Harnen, die wenig Kreatin enthalten, z. B. bei Harn von Kindern, weil da eine größere Menge eingedampft werden muß. Bei diabetischen Harnen ist diese Methode nicht anwendbar.

Erforderliche Lösungen. 1. n-Salzsäure. 2. Gepulvertes oder granuliertes Blei. Die § 581, 1 aufgeführten Lösungen.

Ausführung. Eine bestimmte Menge Harn, die zwischen 7 und 12 mg Gesamtkreatinin enthält, wird mit 10—20 ccm n-Salzsäure und einer Messerspitze Blei in ein kleines Becherglas gegeben. Die Mischung wird über kleiner Flamme bis nahe zur Trockne gekocht. Das vollständige Eindampfen zur Trockne wird auf dem Wasserbad vorgenommen und noch einige Zeit auf dem Wasserbad stehen gelassen, bis die meiste Salzsäure vertrieben ist. Der Rückstand wird in 10 ccm Wasser aufgelöst und quantitativ in einen Meßkolben von 500 ccm filtriert. Zusatz von 20—25 ccm gesättigter Pikrinsäure und 7—8 ccm 10proz. Natronlauge, welche zur Verhütung von Trübungen durch die letzten Spuren Blei 5% Seignettesalz enthält. Nach 5 Minuten wird zur Marke aufgefüllt und verglichen (§ 581, 1). In einer zweiten Probe des unveränderten Harns wird das ursprüngliche Kreatinin bestimmt. Die Differenz der beiden Werte gibt das in Kreatinin umgewandelte Kreatin.

**Nachweis und Bestimmung der Harnsäure im Harn.**

583. Der Nachweis der Harnsäure geschieht nach S. 173.

**Quantitative Bestimmung.**

Sedimente oder Trübungen von harnsauren Salzen bringt man zunächst durch Erwärmen, wenn nötig unter Zusatz von etwas Alkali, in Lösung; ausgeschiedene freie Harnsäure filtriert man ab und wägt sie für sich.

Von den nachfolgenden Methoden zur Bestimmung der Harnsäure brauchen die drei ersten größere Mengen Harn, sie sind eigentliche Makromethoden, die letzten drei sind Mikromethoden. Beide Gruppen geben unter sich annähernd übereinstimmende Resultate; die der Makroverfahren liegen meist etwas niedriger. Das Salkowski - Ludwigsche Verfahren, welches im allgemeinen sehr gute und zuverlässige Werte gibt (es ist die eigentliche Grundmethode, die zur Prüfung der Genauigkeit anderer Verfahren benutzt wird), ist etwas umständlich und bei Harnen, die Peptone oder ähnliche Körper enthalten, ungenau, weil die Ausfällung unter diesen Umständen nicht quantitativ ist<sup>2)</sup>. Auch die Methode von Lucien Morris liefert aus noch nicht erklärten Gründen bei pathologischen Harnen zu niedrige Resultate. Unter den Makroverfahren wird man im allgemeinen das von Folin und Shaffer (§ 583, 2), und unter den Mikroverfahren das von Folin und Wu (§ 583, 5) vorziehen.

**1. Verfahren nach Salkowski<sup>3)</sup> - Ludwig<sup>4)</sup>.**Bestimmung der  
Harnsäure nach  
Salkowski -  
Ludwig.

Prinzip. Die Harnsäure wird durch ammoniakalische Silberlösung bei Gegenwart von Magnesiumsalzen als harnsaure Silbermagnesia ausgefällt, diese Verbindung durch Schwefelwasserstoff zerlegt und die aus salzsaure Lösung abgeschiedene Harnsäure gewichtsanalytisch oder nach Kjeldahl oder durch Titration mit Schwefelsäure und Kaliumpermanganat bestimmt.

Erforderliche Lösungen. 1. Ammoniakalische Silberlösung. Man löst 26 g Silbernitrat in überschüssigem Ammoniak und füllt die Lösung mit destilliertem Wasser zu einem Liter auf.

2. Magnesiamischung. Man löst 100 g krystallisiertes Magnesiumchlorid und 200 g Ammoniumchlorid in Wasser, fügt Ammoniak bis zum starken Geruch hinzu und füllt mit destilliertem Wasser zu einem Liter auf.

3. 1proz. Kupfersulfatlösung.

Ausführung. Zu 200 ccm Harn, welcher keinen Zucker und höchstens Spuren von Eiweiß enthalten darf und dessen spezifisches Gewicht nicht höher

<sup>1)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 18. S. 191. 1914.

<sup>2)</sup> Brugsch - Schittenhelm: Technik der speziellen klinischen Untersuchungsmethoden. II. Teil. S. 713. 1914.

<sup>3)</sup> Salkowski u. Leube: Lehre vom Harn. 1882, S. 96. — Salkowski: Praktikum der physiol. und pathol. Chemie. 4. Aufl. Hirschwald 1912, S. 261.

<sup>4)</sup> Wien. med. Jahrb. 1884, S. 597.

als 1020 sein darf, fügt man unter Umrühren eine Mischung von 20 ccm der Silberlösung und 20 ccm Magnesiamischung, welche man vorher mit soviel Ammoniak versetzt hat, daß das ausfallende Chlorsilber sich wieder löst. Man läßt  $\frac{1}{2}$ —1 Stunde stehen, überzeugt sich von der Vollständigkeit der Fällung (eine Probe der überstehenden klaren Flüssigkeit muß sich nach Ansäuern mit Salpetersäure trüben), bringt den Niederschlag auf ein Filter aus gut filtrierendem Papier (z. B. Schleicher & Schüll Nr. 597) und wäscht ihn mit schwach ammoniakalischem Wasser aus, indem man gleichzeitig das Waschwasser benutzt, die im Becherglase noch befindlichen Reste des Niederschlags völlig auf das Filter zu bringen. Das Auswaschen ist beendet, wenn das letzte Waschwasser beim Ansäuern mit Salpetersäure keine Spur einer Trübung gibt und auch die auf nachträglichen Zusatz von Silberlösung entstehende Trübung nur ganz gering ist. Jetzt setzt man den Trichter auf einen Halbliterkolben, nimmt das Filter heraus, faltet es auseinander und bringt seinen Inhalt mit Hilfe von Spatel und Spritzflasche quantitativ durch den Trichter hindurch in den Kolben (die Menge des Wassers soll etwa 250 ccm betragen). Nach gehörigem Durchschütteln fügt man 5—10 ccm einer 1 proz. Kupfersulfatlösung\*) hinzu, säuert mit einigen Tropfen Salzsäure an, sättigt die Flüssigkeit unter häufigem Umschütteln mit Schwefelwasserstoff, erhitzt zum Sieden, erhält einige Minuten im Sieden, filtriert und wäscht mit heißem Wasser aus. Das Filtrat, welches vollständig klar sein muß, wird zunächst auf freiem Feuer, dann auf dem Wasserbad in kleiner Schale bis auf wenige Kubikzentimeter eingengt und nach Zufügen von einigen Tropfen Salzsäure bis zum nächsten Tage stehen gelassen. Nun sammelt man den ausgeschiedenen Niederschlag auf einem bei 110° getrockneten und gewogenen Filter, indem man das zuletzt ablaufende Filtrat zum vollständigen Aufbringen des Niederschlags auf das Filter benutzt. Erst wenn die Flüssigkeit vom Filter vollständig abgelaufen ist, wäscht man einige Male mit möglichst wenig destilliertem Wasser (Filtrat + Waschwasser soll womöglich nicht mehr als 50 bis 60 ccm betragen) so lange nach, bis keine Trübung mehr durch Salpetersäure + Silbernitrat entsteht, dann mit Alkohol, mehrfach mit Schwefelkohlenstoff und Äther, trocknet und wägt. Filtrat und Waschwasser werden gesammelt und gemessen; für je 10 ccm addiert man 0,00048 g Harnsäure hinzu. Diese Korrektur ist aber nur dann zulässig, wenn die Quantität der Harnsäure nicht abnorm gering ist und die Quantität von Filtrat + Waschwasser 60 ccm nicht überschreitet (Salkowski).

Statt die abfiltrierte Harnsäure zu wägen, kann man ihre Menge auch bestimmen, indem man ihren Stickstoffgehalt nach Kjeldahl (§ 558, 6) ermittelt (der erhaltene Wert mit 3 multipliziert gibt die Harnsäuremenge) oder indem man sie mit Kaliumpermanganat nach S. 711 titriert. In beiden Fällen ist es natürlich unnötig, die letzten Spuren Harnsäure auf das Filter zu bringen, man kann sie vielmehr direkt in den Kjeldahlkolben oder in das Becherglas, in dem die Titrierung vorgenommen wird, überführen. Bei der Titration mit Permanganat ist es auch nötig, die Harnsäure vor dem Schwefelsäurezusatz mit ein wenig Natronlauge (aber nicht mit Alkohol gereinigte!) in Lösung zu bringen (Folin<sup>1</sup>).

Bestimmung der  
Harnsäure nach  
Folin-Shaffer.

## 2. Verfahren nach Folin-Shaffer<sup>2</sup>).

Es gibt dieselben Werte wie die Methode von Salkowski-Ludwig bei einfacherer Ausführung.

\*) Diesen Zusatz empfiehlt Folin, um nach dem Einleiten von Schwefelwasserstoff schnell ein klares Filtrat zu erzielen (Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 32, S. 555. 1901).

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 32, S. 554. 1901.

<sup>2</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 24, S. 224. 1898; Bd. 32, S. 552. 1901.

Erforderliche Lösungen. 1. Eine Flüssigkeit, welche im Liter 500 g Ammonsulfat, 5 g Uranacetat und 60 ccm einer 10proz. Essigsäure enthält. 2. Eine 10proz. Ammonsulfatlösung. 3. Eine  $\frac{1}{20}$ -Kaliumpermanganatlösung, welche durch Auflösung von 1,5815 g  $\text{KMnO}_4$  in Wasser und Auffüllung der Lösung zu einem Liter hergestellt und deren Richtigkeit durch Titration mit  $\frac{1}{20}$ -Oxalsäure (§ 19) geprüft wird.

Ausführung. 300 ccm Harn, welcher Eiweiß nur in kleiner Menge enthalten darf, wird mit 75 ccm der Lösung 1 in einem Halbliterkolben gemischt und nach 5 Minuten langem Stehen durch Faltenfilter filtriert. Auf diese Weise wird eine biuretreaktiongebende Substanz, welche die Titration der Harnsäure stört, entfernt. Vom Filtrat versetzt man in 2 Bechergläsern (2 Kontrollanalysen) je 125 ccm mit 5 ccm konzentriertem Ammoniak, rührt um und läßt stehen. Am nächsten Tage wird die über dem ausgeschiedenen harnsauren Ammoniak stehende Flüssigkeit vorsichtig durch ein Filter (z. B. Schleicher & Schüll Nr. 597) gegossen, zuletzt die Ausscheidung mit 10proz. Ammonsulfatlösung auf das Filter gebracht und einige Male mit 10proz. Ammonsulfatlösung gewaschen. Spuren von Chloriden stören die Titration nicht, so daß das Filtrieren und Auswaschen in 20—30 Minuten beendet werden kann. Nun wird das Filter aus dem Trichter genommen, auseinandergefaltet und sein Inhalt mit Spatel und Spritzflasche quantitativ in das Becherglas zurückgebracht. Zu dem in ungefähr 100 ccm Wasser suspendierten Ammonurat fügt man 15 ccm konzentrierte Schwefelsäure, wobei eine Erwärmung auf 60—63° erfolgt, und titriert sofort mit Kaliumpermanganat, indem man zunächst immer 3, dann gegen Ende 1 Tropfen zufließen läßt, bis die erste schwache Rosafärbung durch die ganze Flüssigkeit zu sehen ist. Die Temperatur soll nicht unter 50° sinken. Jeder Kubikzentimeter der Permanganatlösung entspricht 3,75 mg Harnsäure. Wegen der Löslichkeit des Ammonurats addiert man zu dem erhaltenen Wert noch 3 mg für je 100 ccm des angewendeten Harns.

### 3. Verfahren nach Hopkins<sup>1)</sup> in der Ausführung von Wörner<sup>2)</sup>.

Prinzip. Hopkins fand, daß sich beim Sättigen des Harns mit Salmiak die Harnsäure als harnsaurer Ammoniak quantitativ abscheidet. Er gründete darauf eine Methode, indem er das abgeschiedene Ammonurat abfiltrierte, mit gesättigter Salmiaklösung auswusch, durch Erhitzen mit Wasser und Salzsäure in freie Harnsäure überführte und diese, nachdem sie sich abgeschieden, entweder durch Wägung oder durch Titration mit Kaliumpermanganatlösung bestimmte.

Bestimmung der  
Harnsäure nach  
Hopkins-  
Wörner.

Ausführung. 150 ccm filtrierter Harn, dessen Aciditätsgrenze 3 ccm n-Säure für 150 ccm nicht überschreiten darf\*), werden in einem Becherglase auf 40—50° erwärmt und darin 30 g Salmiak aufgelöst. Nach  $\frac{1}{2}$ —1 Stunde ist alle Harnsäure als Ammonsalz ausgefällt und der größte Teil des letzteren hat sich zu Boden gesenkt. Man gießt die über dem Niederschlag stehende trübe Flüssigkeit in ein anderes Becherglas ab, bringt den Niederschlag aufs Filter und filtriert dann erst die Mutterlauge durch das so dicht gemachte Filter. Man erhält so in allen Fällen ein klares Filtrat, während sonst der Niederschlag leicht durch das Filter geht. Beide Bechergläser werden mit Mutterlauge wiederholt nachgewaschen, bis alles Urat auf das Filter gebracht ist. Ist das erreicht und der Harn vollständig abgelaufen, so wird der Niederschlag mit 10proz. Ammonsulfatlösung gründlich ausgewaschen (bis er chlorfrei ist) und dann auf dem Filter in 1—2proz. heißer Natronlauge gelöst und das Filter mehrmals mit heißem Wasser nachgewaschen. Filtrat und Waschwasser werden in einer

\*) Ist das der Fall, so muß er neutralisiert werden. Lewandowsky, Zeitschr. f. klin. Med. Bd. 40, S. 199. 1900.

<sup>1)</sup> Proc. of the roy. soc. of London Bd. 52, S. 93. 1892 Ref. Chem. Zentralbl. 1892, II, S. 269.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 29, S. 70. 1900.

Schale auf dem Wasserbade solange erhitzt, bis kein Ammoniak mehr weggeht, dann in einen Kjeldahlkolben gespült und dem Kjeldahlverfahren nach § 558, b unterworfen. 1 ccm  $\frac{n}{10}$ -Schwefelsäure entspricht 0,0042 g Harnsäure.

Bestimmung der  
Harnsäure nach  
Morris.

#### 4. Verfahren nach Lucien Morris<sup>1)</sup>.

Prinzip. Die Harnsäure wird als Zinksalz gefällt und mit Permanganat titriert.

Erforderliche Lösungen. 1. Herstellung einer Standardlösung von Kaliumpermanganat. Eine  $\frac{n}{10}$ -Stammlösung, die in der üblichen Weise (3,166 g auf 1 l) bereitet und gut verschlossen aufbewahrt wurde, wird zu einer 0,002 n-Lösung verdünnt, indem 10 ccm der Stammlösung auf 500 ccm aufgefüllt werden. Diese Lösung wird dann gegen eine Harnsäurephosphat-Standardlösung (Benedict und Hitchcock, s. S. 713) titriert. Die verdünnte Permanganatlösung ist nur kurze Zeit haltbar. 2. Gesättigte Lösung von sekundärem Natriumphosphat. 3. 10proz. Lösung von Zinkchlorid. 4. 10proz. Calciumchloridlösung. 5. 10proz. Jodkaliumlösung. 6. 20proz. Natriumcarbonatlösung. 7. 0,5proz. Stärkelösung. 8. Festes Natriumbicarbonat. 9. 3proz. Uranacetatlösung.

Ausführung. Man versetzt 5 ccm Harn in einem Zentrifugenrohre von 50 oder 100 ccm mit 3 ccm der Zinkchloridlösung, gibt 25 ccm Wasser zu, mischt und fügt so viel Natriumcarbonatlösung unter Umrühren zu, bis ein kleines hineingeworfenes Lackmuspapierchen vollkommen blau ist. Ein Niederschlag von Zinkcarbonat, -phosphat und Zinkurat scheidet sich aus. 2 bis 3 Minuten zentrifugieren und dekantieren. Der Niederschlag wird in verdünnter Salzsäure aufgelöst. Zu der sauren Lösung gibt man 15 ccm der gesättigten Natriumphosphatlösung und wenn nötig einige Tropfen verdünnte Salzsäure, um den Niederschlag von Zinkphosphat zu lösen, setzt 2 ccm der 3proz. Uranacetatlösung zu und macht unter Umrühren mit Natriumcarbonat wieder alkalisch. 2—3 Minuten zentrifugieren und die Flüssigkeit sorgfältig in einen Erlenmeyerkolben spülen. Durch die Gegenwart eines großen Überschusses von Phosphaten bleibt die Harnsäure vollkommen gelöst, während andererseits durch Zink und Uran alle anderen Substanzen, welche noch mit Permanganat titriert werden können, niedergeschlagen werden. Die alkalische Lösung wird mit Salzsäure angesäuert und mit 25 ccm der Calciumchloridlösung versetzt. Dann wird ein Überschuß von festem Natriumbicarbonat zugegeben, zur Ausfällung des Calciumphosphats. Zu der schwach alkalischen Lösung gibt man 1 ccm Jodkaliumlösung, 3 ccm Stärkelösung und destilliertes Wasser bis zu 250 ccm. Jetzt wird mit der 0,002 n-Permanganatlösung titriert. Von der Anzahl Kubikzentimeter verbrauchter Permanganatlösung muß noch die Menge abgezogen werden, die nötig ist, um in einer wässrigen Lösung des gleichen Volumens aus 1 ccm Jodkaliumlösung und 3 ccm Stärkelösung die gleiche Farbenintensität zu erzeugen (ungefähr 0,8 ccm). Die Anzahl Kubikzentimeter verbrauchter Permanganatlösung multipliziert mit dem bei der Einstellung gefundenen Faktor gibt die Menge Harnsäure in 5 ccm Harn.

Bestimmung der  
Harnsäure nach  
Folin und Wu.

#### 5. Verfahren nach Folin und Wu<sup>2)</sup> (colorimetrisch).

Prinzip und erforderliche Lösungen s. § 704, 1.

Ausführung. 1—3 ccm Harn, je nach der Konzentration, werden mit einer genauen Pipette in eine Zentrifugenröhre abgemessen und mit Wasser auf ungefähr 6 ccm aufgefüllt. Dazu kommen 5 ccm der Silberlactatlösung; umrühren. Dabei wird die Harnsäure vollständig als Silbersalz gefällt, ohne mit anderen Substanzen verunreinigt zu sein, die ebenfalls mit Phosphorwolframsäure eine blaue Farbe geben. Es wird 2—3 Minuten zentrifugiert. Man prüft die überstehende klare Flüssigkeit mit 1 Tropfen Silberlösung, ob alles ausgefällt ist. Entsteht noch eine Trübung, so werden weitere 2 ccm der Lösung zugesetzt und wieder zentrifugiert. Wenn alles ausgefällt ist, wird dekantiert.

<sup>1)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 37, S. 231. 1919.

<sup>2)</sup> desgl. Bd. 38, S. 459. 1919.

Zur Auflösung des Niederschlags läßt man aus einer Bürette (wegen der Giftigkeit) 4 ccm der 5proz. Natriumcyanidlösung einfließen. Die klare Lösung gießt man quantitativ in einen 100-ccm-Kolben, wäscht 3 mal mit je 5 ccm Wasser nach, setzt 5 ccm Natriumsulfidlösung zu, zum Ausgleich gegenüber der Standardlösung, und füllt auf ungefähr 40 ccm auf. In einen zweiten 100-ccm-Meßkolben gibt man 5 ccm der Standard-Harnsäure-Sulfitmischung (= 0,5 mg Harnsäure), fügt 4 ccm Cyanidlösung und 35 ccm Wasser zu. In jeden Kolben kommen nun 20 ccm der 20proz. Sodalösung und schließlich unter Umschütteln 2 ccm des Harnsäurereagens. Es bildet sich eine blaue Farbe. Nach 3—5 Minuten wird zur Marke aufgefüllt und gemischt.

Zunächst wird die Standardlösung mit sich selbst verglichen und dann erst mit der zu untersuchenden Flüssigkeit, wobei die Standardlösung auf 20 mm einzustellen ist.

Berechnung.  $\frac{1}{2} \cdot \frac{\text{Standardablesung}}{\text{Harnablesung}} = \text{Milligramm Harnsäure in dem angewandten Volumen Harn.}$

Jackson und Palmer<sup>1)</sup> haben diese Methode etwas modifiziert. Es soll dadurch das rasche Ablassen und die Ausscheidung eines krystallinischen Niederschlags vermieden werden. Ein Teil des Harnsäurereagens wird eingedampft und ein anderer dialysiert und beide dann nachher in einem bestimmten Verhältnis gemischt.

#### 6. Verfahren nach Benedict und Franke<sup>2)</sup> (colorimetrisch).

Bestimmung der Harnsäure nach Benedict und Franke.

Prinzip. Die Bestimmung ist auch eine colorimetrische. Als Reagens dient Arsenphosphorwolframsäure, die mit der Harnsäure ebenfalls eine blaue Farbe bildet. Die Reaktion ist spezifisch für Harnsäure, es ist deswegen eine vorherige Isolierung der Harnsäure nicht notwendig. Die Fällung als Silbersalz wird also umgangen und die Bestimmung ist so einfach und rasch wie beim Kreatinin.

Erforderliche Lösungen. 1. Arsenphosphorwolframsäurereagens. 100 g reines Natriumwolframat (Merck) werden in einem 1-l-Jenaer-Kolben in ungefähr 600 ccm Wasser aufgelöst, 50 g reine Arsensäure (As<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) zugesetzt und darauf 25 ccm einer 85proz. Phosphorsäure und 20 ccm konzentrierter Salzsäure. Die Mischung wird 20 Minuten gekocht, abgekühlt, und auf 1 l aufgefüllt. Das Reagens ist unbegrenzt haltbar.

2. 5proz. Natriumcyanidlösung. Sie ist ungefähr alle 2 Monate frisch herzustellen.

3. Harnsäurestandardlösung. Zunächst ist die Phosphatlösung von Benedict und Hitchcock herzustellen. Dazu werden 9 g reines krystallisiertes sekundäres Natriumphosphat zusammen mit 1 g Mononatriumphosphat in 200—300 ccm heißem Wasser aufgelöst. Die Lösung wird, wenn nötig, filtriert, mit heißem Wasser auf ungefähr 500 ccm aufgefüllt und zu 200 mg Harnsäure, die in wenigen Kubikzentimetern destillierten Wassers in einem Litermeßkolben suspendiert sind, gegossen. Man bringe die Harnsäure durch vorsichtiges Umschütteln in Lösung. Abkühlen, genau 1,4 ccm Eisessig zusetzen, auf 1 l verdünnen und mischen. Als Antiseptikum werden noch 5 ccm Chloroform zugesetzt. Die Lösung hält sich ungefähr 2 Monate. 50 ccm dieser Lösung (= 10 mg Harnsäure) werden in einem 500-ccm-Meßkolben auf ungefähr 400 ccm mit destilliertem Wasser verdünnt. Dazu kommen 25 ccm verdünnter Salzsäure (1 Volum konzentrierter Salzsäure mit 9 Volum Wasser verdünnt), Auffüllen auf 500 ccm und mischen. Diese Lösung ist alle 10 bis 14 Tage frisch zu bereiten.

Ausführung. Der Harn wird so verdünnt (meist 1 : 20), daß 10 ccm ungefähr 0,15—0,30 mg Harnsäure enthalten. Man bringt 10 ccm des verdünnten Harns in einen 50-ccm-Meßkolben, setzt aus einer Bürette (wegen Giftigkeit) 5 ccm der Cyanidlösung zu und weiter 1 ccm des Arsenphosphorwolframsäurereagens. Man mischt durch sorgfältiges Schütteln, verdünnt nach 5 Minuten mit destilliertem Wasser bis zur Marke und mischt. Die blaue Lösung wird im Colorimeter mit einer gleichzeitig bereiteten Harnsäurelösung verglichen. Diese erhält man, indem man 10 ccm der Standardharnsäurelösung (= 0,2 mg Harnsäure) in einem 50-ccm-Meßkolben mit 5 ccm Cyanidlösung und 1 ccm

<sup>1)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 50, S. 89. 1922.

<sup>2)</sup> desgl. Bd. 52, S. 387. 1922.

Reagens mischt und nach 5 Minuten zur Marke auffüllt. Die Ablesung des Standards (15 oder 20 mm) dividiert durch die Ablesung der unbekanntem Lösung und das Resultat multipliziert mit 0,2 gibt die Milligramm Harnsäure, welche die 10 ccm des verdünnten Urins enthalten.

Zwischen 0,15 und 0,3 mg Harnsäure ändert sich die Intensität der Farbe genau mit der Konzentration, wenn 0,2 mg Harnsäure als Standard benutzt werden. Außerhalb dieser Grenzen sind die Resultate nicht so günstig. Wichtig ist auch, daß das Volumen der unbekanntem und der Standardlösung während der Reaktion das gleiche ist. Wenn für einen speziellen Fall 15 ccm statt 10 nötig sind, muß auch die Standardlösung erst auf das gleiche Volumen verdünnt werden, bevor man die Reagenzien zusetzt.

Hundeharn, der relativ reich an Phenolkörpern ist, aber (mit Ausnahme des dalmatinischen Hundes) wenig Harnsäure enthält, gibt mit der neuen Methode nur eine Spur von Farbe, die einer Ausscheidung von wenigen Milligrammen Harnsäure in 24 Stunden entspricht.

**Bestimmung der Harnsäure und Purinbasen im Harn nach M. Krüger und J. Schmid<sup>1)</sup>.**

584. Prinzip. Harnsäure und Purinbasen werden als Kupferoxydulverbindungen gemeinsam ausgefällt und diese durch Schwefelnatrium zerlegt. Aus der wässrigen Lösung fällt Salzsäure die Harnsäure, aus dem Filtrat werden die Purinbasen wieder als Kupferoxydul- oder Silberverbindungen abgeschieden. Schließlich wird der Stickstoff sowohl der Harnsäure als des Purinbasengemenges nach Kjeldahl ermittelt.

Erforderliche Lösungen. 1. Käufliche Natriumbisulfatlösung (Kahlbaum). 2. 10 proz. Kupfersulfatlösung. 3. Natriumsulfidlösung. Man stellt eine 1 proz. reine Natronlauge her, sättigt die eine Hälfte mit Schwefelwasserstoff und vereinigt sie mit der anderen. 4. Aufschwemmung von Braunstein in Wasser. Eine heiße 0,5 proz. Lösung von Kaliumpermanganat wird mit Alkohol bis zur Entfärbung versetzt. 5. 10 proz. Salzsäure. 6. 10 proz. Essigsäure. Außerdem für die Bestimmung der Purinbasen mit der Silberfällung: 7. Ammoniakalische Silberlösung (§ 583, 1). 8. Magnesiummischung (§ 583, 1). 9. 6 proz. Dinatriumphosphatlösung.

Ausführung. 400 ccm (evtl. nach § 567 entweißter) Harn\*) (der 4. oder 5. Teil der auf 1600 oder 2000 ccm gebrachten Tagesmenge) werden in einem Literrundkolben mit 24 g Natriumacetat und 40 ccm Natriumbisulfatlösung versetzt, zum Kochen erhitzt und nach Zusatz von 40—80 ccm Kupfersulfatlösung (je nachdem der Harn wenig oder viel Purinkörper enthält) mindestens 3 Minuten im Sieden erhalten\*\*). Der entstandene flockige Niederschlag wird sofort oder nach dem Abkühlen der Flüssigkeit durch ein Faltenfilter filtriert, mit heißem Wasser solange gewaschen bis das Filtrat farblos abläuft, und schließlich mit heißem Wasser in den Kolben, in dem die Fällung vorgenommen worden war, zurückgespritzt. Man fügt soviel Wasser hinzu, daß die Flüssigkeitsmenge etwa 200 ccm beträgt, erhitzt zum Sieden und zersetzt den Kupferoxydulniederschlag durch Hinzufügen von 30 ccm Natriumsulfidlösung. In den meisten Fällen wird diese Menge genügen, doch hat man sich jedesmal von der Vollständigkeit der Fällung zu überzeugen, indem man einen Tropfen der Flüssigkeit auf ein mit einem Tropfen Bleiacetatlösung befeuchtetes Stück Filtrierpapier bringt. Braunfärbung zeigt Überschuß an Natriumsulfid an. Nach völliger Zersetzung säuert man mit Essigsäure an, erhält noch solange im Sieden, bis der ausgeschiedene Schwefel sich zusammengeballt hat, filtriert siedend heiß mit Hilfe der Saug-

\*) Nimmt man eine andere Menge Harn, so sind auch die Mengen der Zusätze entsprechend zu verändern.

\*\*\*) Nach Benedict und Saiki liefert die Methode für Harnsäure zu niedrige Werte. Der Fehler läßt sich vermeiden, wenn man die erste Fällung nicht in annähernd neutralem, sondern in ausgesprochen saurem Medium vornimmt. Man setzt dazu vor der ersten Fällung auf 300 ccm Harn 20 ccm Eisessig oder eine entsprechende Menge verdünnter Essigsäure zu. (Journ. of biol. chem. Bd. 7, S. 27. 1909.)

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 45, S. 1. 1905.



vorrichtung und unter Benutzung einer Porzellanfilterplatte, wäscht mit heißem Wasser aus, fügt 10 ccm 10proz. Salzsäure hinzu und dampft das Filtrat in einer 300 ccm fassenden Porzellanschale bis auf etwa 10 ccm ein. Während des Einengens und darauffolgenden 2stündigen Stehens scheidet sich die Harnsäure ab, während die Purinbasen in Lösung bleiben. Die weitere Bearbeitung der Abscheidung geschieht nach 1, die der Lösung nach 2.

1. Die abgeschiedene Harnsäure wird durch ein kleines Filter abfiltriert, mit schwefelsäurehaltigem Wasser ausgewaschen, bis Filtrat und Waschflüssigkeit zusammen 75 ccm betragen und samt dem Filter nach Kjeldahl (§ 558, b) behandelt. Zu der aus dem gefundenen Stickstoffwert durch Multiplikation mit 3 berechneten Harnsäure sind noch 3,5 mg (für die in 75 ccm Filtrat gelöste Harnsäure) hinzuzuaddieren.

2. Im Filtrate von der Harnsäure können die Purinbasen sowohl durch Kupferfällung (nach a) als auch durch Silberfällung (nach b) bestimmt werden. Beide Verfahren geben übereinstimmende Werte.

a) Mit Hilfe der Kupferfällung. Die Flüssigkeit wird mit Natronlauge alkalisch, darauf mit Essigsäure schwach sauer gemacht, nach Erwärmen auf 70° oder einige Grade darüber mit  $\frac{1}{2}$ —1 ccm 10proz. Essigsäure und 10 ccm der Braunsteinaufschwemmung (zur Oxydation der geringen Mengen noch vorhandener Harnsäure) versetzt und 1 Minute geschüttelt. Man fügt jetzt 10 ccm der Natriumbisulfidlösung, welche gleichzeitig den überschüssigen Braunstein löst, und 5—10 ccm der 10proz. Kupfersulfatlösung hinzu, erhält die Flüssigkeit 3 Minuten im Sieden, filtriert den Niederschlag\*) sofort durch ein Faltenfilter (am besten aus schwedischem Papier J. H. Munktell Nr. 1), wäscht mit heißem Wasser aus und bestimmt den Stickstoff nach Kjeldahl (§ 558, b). Eine Umrechnung des gefundenen Stickstoffs auf die Basen selbst erscheint unzweckmäßig, da man dabei eine willkürlich angenommene Zusammensetzung des Basengemisches zugrunde legen muß.

b) Mit Hilfe der Silberfällung. Zunächst ist das Verfahren dasselbe wie bei a). Die essigsäure Lösung, welche den überschüssigen Braunstein suspendiert enthält, wird mit Ammoniak alkalisch gemacht, abgekühlt und mit 10 ccm der ammoniakalischen Silberlösung und Ammoniak bis zur Lösung des Chlorsilbers versetzt. Um das Absitzen zu begünstigen und die Filtration und das Auswaschen des voluminösen Silberniederschlags der Purinbasen zu erleichtern, erzeugt man gleichzeitig in der Flüssigkeit einen Niederschlag von phosphorsaurer Ammoniakmagnesia, indem man 10 ccm der Dinatriumphosphatlösung und 5 ccm der Magnesiamischung hinzufügt. Nach 2stündigem Stehen filtriert man den Niederschlag durch ein Faltenfilter ab, wäscht ihn mit destilliertem Wasser möglichst ammoniakfrei, spritzt ihn mit heißem Wasser in einen Rundkolben und vertreibt das Ammoniak durch Kochen unter Zusatz von Magnesia usta. Nunmehr erfolgt die Bestimmung des Stickstoffs nach Kjeldahl (§ 558, b).

#### *Bestimmung der Purinbasen im Harn.*

585. Verfahren nach Salkowski<sup>1)</sup>.

Prinzip. Aus dem Harn, welcher durch Magnesiamischung von der Phosphorsäure befreit ist, werden Harnsäure und Purinbasen durch ammoniakalische Silberlösung gefällt. Nach

Verfahren nach  
Salkowski.

\*) Steudel und Sung-Sheng Chou (Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 116, S. 223. 1921) fanden in diesem Niederschlag immer etwas Ammoniak. Um den dadurch entstehenden Fehler zu vermeiden, schlagen sie vor, den Niederschlag in essigsaurer Lösung mit Schwefelwasserstoff zu zersetzen, zu filtrieren, aus dem Filtrat durch Kochen mit überschüssigem Magnesiumoxyd das Ammoniak zu entfernen und nun erst die Kjeldahlbestimmung auszuführen.

<sup>1)</sup> Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 69, S. 280. 1898. Die kleinen unwesentlichen Abweichungen in der obigen Darstellung rühren von Huppert, Analyse des Harns, 1898, S. 829, her.

Zerlegung des Niederschlages durch Schwefelwasserstoff wird die Harnsäure von den Purinbasen durch Schwefelsäure getrennt und die die Purinbasen enthaltende schwefelsaure Lösung wieder durch ammoniakalische Silberlösung gefällt. In dem Niederschlag wird nach Veraschen das Silber nach Volhard bestimmt und aus dem gefundenen Silber die Menge der Purinbasen (auf Xanthin bezogen) berechnet.

Erforderliche Lösungen. 1. Magnesiamischung (§ 583, 1). 2. Silberlösung (§ 583, 1). 3. Verdünnte Schwefelsäure (550 ccm Wasser und 10 ccm konzentrierte Schwefelsäure). 4.  $n/_{50}$ -Schwefelcyankaliumlösung. Man stellt sie auf  $n/_{50}$ -Silberlösung (3,4 g  $\text{AgNO}_3$  im Liter) ein. 1 ccm = 1,521 mg Xanthin.

Ausführung. Man vermischt von eiweißfreiem Harn mittlerer Konzentration 500 ccm mit 50 ccm Magnesiamischung und 50 ccm starkem Ammoniak, filtriert nach einigen Minuten durch ein trockenes Faltenfilter in ein trockenes Gefäß, mißt vom Filtrat eine bestimmte Menge etwa 540 ccm (= 450 ccm Harn) ab und versetzt sie mit der Silberlösung, und zwar auf 100 ccm Harn 10 ccm. Der Niederschlag muß flockig und gelatinös aussehen; sieht er weiß aus, so enthält er noch Chlorsilber, welches durch weiteren Ammoniakzusatz in Lösung zu bringen ist. Einige weiße Punkte in dem Niederschlag schaden jedoch nicht. Nach einstündigem Stehen und nachdem man sich von der Vollständigkeit der Fällung überzeugt hat (eine abgegossene Probe der überstehenden klaren Flüssigkeit muß sich nach Ansäuern mit Salpetersäure trüben), filtriert man ihn durch ein glattes Filter, wäscht aus, bis Proben des Filtrats beim Ansäuern mit Salpetersäure klar bleiben und auch beim nachträglichen Zusatz von Silbernitrat nur noch ganz schwache Trübung zeigen und spritzt ihn in einen Kolben von etwa  $1\frac{1}{2}$  l Inhalt. Die Flüssigkeit, deren Volumen 500—600 ccm betragen soll, wird nun gut durchgeschüttelt, mit einigen Tropfen Salzsäure versetzt, mit Schwefelwasserstoff gesättigt und nach dem Erhitzen auf dem Wasserbad filtriert. Filtrat und Waschwasser werden zuerst auf freiem Feuer, dann auf dem Wasserbad zur Trockne verdunstet. Der trockene Rückstand wird mit 25—30 ccm der verdünnten Schwefelsäure bis zum beginnenden Sieden erhitzt, die Flüssigkeit 16—20 Stunden stehen gelassen, die Harnsäure, welche sich abgeschieden hat, mit Hilfe des Filtrats auf das Filter gebracht und dieses mit der verdünnten Schwefelsäure gewaschen. Ein 2—3 maliges Waschen genügt, so daß das gesamte Filtrat nicht mehr als 50 ccm zu betragen braucht. Man macht nun mit Ammoniak alkalisch, fällt wieder mit der Silberlösung, filtriert durch ein aschefreies Filter, wäscht den Niederschlag chlor-, silber- und schwefelsilberfrei, trocknet und verascht ihn in einem Porzellantiegel. Die Asche wird unter gelindem Erwärmen auf dem Wasserbad und unter Bedeckung des Tiegels mit einem Uhrglas in chlorfreier Salpetersäure gelöst, die Lösung (welche ganz klar sein sollte, aber in der Regel eine minimale Trübung von Chlorsilber zeigt) in ein Kölbchen gebracht und nach Volhard (§ 574, a, 2) mit der  $n/_{50}$ -Rhodanlösung titriert. 1 ccm = 1,52 mg Xanthin.

Eine kleine Ungenauigkeit dieser Methode ist — wie Salkowski selbst hervorhebt — bedingt 1. durch eine geringe Löslichkeit der Harnsäure in der Schwefelsäure, 2. durch die nicht ganz vollständige Fällbarkeit der Purinbasen aus der ammoniakalischen Lösung durch Silbernitrat und 3. durch das Vorhandensein einer minimalen Menge von Chlorsilber in der zu titrierenden Flüssigkeit. Diese Fehler kommen aber um so weniger in Betracht, als die unter 1 und 2 genannten Fehlerquellen in entgegengesetzter Richtung wirken.

Indirekte Verfahren.

Indirekte Verfahren. Weniger gut sind die Methoden, bei denen die Bestimmung der Purinbasen auf indirektem Wege erfolgt. Eine solche Methode ist die von Camerer angegebene, die man am besten nach den Vorschriften von Arnstein<sup>1)</sup> ausführt.

Prinzip. Man fällt den Harn mit Magnesiamischung und das Filtrat mit ammoniakalischer Silberlösung, kocht den abfiltrierten Niederschlag (samt Filter) mit Wasser und etwas Magnesia, um das Ammoniak zu entfernen und bestimmt dann seinen Stickstoffgehalt nach Kjeldahl. Von diesem Stickstoff (Harnsäure + Purinbasen) wird der Stickstoff der besonders bestimmten Harnsäure abgezogen. Die Differenz ist Purinbasenstickstoff.

### *Isolierung von organischen Basen aus Harn<sup>2)</sup>.*

Verfahren nach  
Kutscher.

586. Der durch mit Kieselgur bedeckte Filter gesaugte Harn (100 l) wurde mit Salzsäure stark angesäuert und mit Phosphorwolframsäure ausgefällt, die Fällung nach 24 Stunden abfiltriert, mit 5 proz. Schwefelsäure ausgewaschen und mit Baryt zerlegt, das Filtrat nach Entfernung des Baryts durch Kohlensäure stark eingeeengt. Nach einiger Zeit krystallisierte ein großer Teil des Kreatinins aus. Die abgesaugte Mutterlauge wurde mit Salzsäure angesäuert, von sich dabei abscheidenden dunkelbraunen Flocken abfiltriert und eingeeengt, der Sirup mit

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 23, S. 426. 1897. Zentralbl. f. med. Wiss. 1898, S. 257.

<sup>2)</sup> Kutscher u. Lohmann: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 49, S. 81. 1906. — Kutscher: desgl. Bd. 51, S. 457. 1907. S. a. Kutscher: Biochem. Arbeitsmeth., herausgeg. von Abderhalden: Bd. 3, S. 863. 1910.

absolutem Alkohol aufgenommen, das Filtrat verdunstet, der Rückstand wieder mit absolutem Alkohol aufgenommen und so fortgefahren, bis sich der Rückstand in absolutem Alkohol leicht löste. Diese Lösung wurde mit Platinchlorid völlig ausgefällt, der Niederschlag nach 48 Stunden abfiltriert, mit absolutem Alkohol ausgewaschen und in heißem Wasser gelöst, wobei etwas ungelöst blieb. Das Filtrat wurde mit Schwefelwasserstoff behandelt, filtriert, mit Tierkohle entfärbt, eingedampft, der Sirup mit absolutem Alkohol aufgenommen und die Lösung nochmals mit Platinchlorid gefällt (Platinate 1). Das Filtrat schied nach starkem Einengen noch einen krystallinischen Niederschlag ab (Platinate 2a), die Mutterlauge wurde eingedampft, der Rückstand mit Wasser aufgenommen, mit Schwefelwasserstoff zerlegt, das Filtrat eingedampft, der Rückstand mit absolutem Alkohol aufgenommen und die Lösung wieder mit Platinchlorid ausgefällt (Platinate 2b). Das Filtrat enthielt die löslichen Platinate (Platinate 3). Die Platinate 2a und 2b wurden nun vereinigt und ebenso wie die Platinate 1 und die Platinate 3 in die Chloride übergeführt, die Lösungen der Chloride zum Sirup eingeeengt und mit 30 proz. wässriger Goldchloridlösung gefällt (Aurate 1, 2, 3).

Aus den Auraten 1 ließen sich die in kaltem Wasser schwer löslichen Goldverbindungen des Methylpyridins und Gynesins gewinnen. Aus der Mutterlauge schieden sich ölige Goldverbindungen ab, welche mit den ebenfalls ölig ausfallenden Auraten 2 vereinigt wurden. Aus diesem Gemenge wurde Novain (wohl identisch mit Carnitin), Reduktonovain, Mingin und Vitiatin isoliert<sup>1)</sup>. Das Aurat 3 erwies sich als Methylguanidinaurat.

Ein anderes Verfahren zur Isolierung organischer Basen aus dem Harn, welches auf der Fällung mit Quecksilberchlorid und Natriumacetat beruht und zu interessanten Ergebnissen geführt hat, wird von Engeland<sup>2)</sup> mitgeteilt. Es ließen sich mit ihm Methylguanidin, Dimethylguanidin, Vitiatin (?), Histidin, Homologe des Histidins (Imidazolglykoll) und eine Substanz isolieren, deren Goldsalz der Formel  $C_{15}H_{36}N_8O_{13} \cdot HCl \cdot AuCl_3$  entsprach, und welche die Diazoreaktion, beim Erwärmen auch die Biuretreaktion, aber keine Millonsche Reaktion gibt, also jedenfalls ein Histidin enthaltendes Abbauprodukt der Proteinstoffe darstellt.

Verfahren nach  
Engeland.

#### *Nachweis und Bestimmung des Rhodanwasserstoffes im Harn.*

587. Zum Nachweis fällt man nach J. Munk<sup>3)</sup> etwa 200 ccm mit Salpetersäure angesäuerten Harnes mit Silbernitrat, zerteilt den abfiltrierten Niederschlag in Wasser, zersetzt ihn mit Schwefelwasserstoff, destilliert die filtrierte Flüssigkeit und prüft das Destillat auf Blausäure mit Hilfe der Berlinerblauprobe. Die Blausäure ist bei der Destillation aus Rhodanwasserstoff entstanden.

Nachweis.

Zur quantitativen Bestimmung dient das Verfahren von Rupp<sup>4)</sup>.

Bestimmung.

Prinzip. Rhodanid reagiert in bicarbonathaltiger Lösung mit Jod im Sinne der Gleichung  $KCNS + 8 J + 4 H_2O = H_2SO_4 + 6 HJ + KJ + JCN$ . Nach Zufügen von Salzsäure erfolgt die Reaktion  $JCN + HJ = HCN + 2 J$ , so daß also der Endzustand durch die in zwei Phasen verlaufende Reaktion  $KCNS + 6 J + 4 H_2O = H_2SO_4 + 5 HJ + KJ + HCN$  bedingt wird. Ein Molekül Kaliumrhodanid entspricht also 6 Atomen Jod oder 1 ccm  $\frac{1}{10}$ -Jodlösung = 0,0016203 g KCNS. Das unverbrauchte Jod wird mit Thiosulfat unter Anwendung von Stärke als Indicator zurücktitriert.

Erforderliche Lösungen. 1. Natrium bicarbon. pur., 2. Jodkali, 3. Salpetersäurehaltiges Wasser (1 : 100), 4. 3 proz. Silbernitratlösung, 5. 2 proz. Stärkelösung, 6. und 7.  $\frac{1}{10}$ -Jodlösung und  $\frac{1}{10}$ -Thiosulfatlösung (§ 20).

Ausführung (nach den Angaben von Edinger und Clemens<sup>5)</sup>). 50—100 ccm klar filtrierter eiweißfreier Harn werden mit stark verdünnter Salpetersäure angesäuert und mit einem Überschuß einer 3 proz. Silbernitratlösung (für 100 ccm Harn sind etwa 100 ccm nötig) versetzt. Nachdem der Niederschlag sich unter Erwärmen auf dem Wasserbad gut abgesetzt hat und auf Vollständigkeit der Fällung geprüft worden ist, saugt man den Niederschlag ab, wäscht mit salpetersäurehaltigem Wasser aus und bringt ihn mit dem Filter und etwas Wasser in eine etwa 1 l fassende weithalsige Glasstopfenflasche. Nun fügt man 3 g Natriumbicarbonat oder etwas mehr (jedenfalls bis zur alkalischen Reaktion der Flüssigkeit) und 3 g Jodkali (zur Überführung des Chlorsilbers in Jodsilber) hinzu, löst durch sanftes Umschwenken die beiden Salze, verteilt mit einem Glasstabe den Niederschlag und das Filter möglichst fein und läßt so lange  $\frac{1}{10}$ -Jodlösung in gemessener

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 51, S. 457. 1907.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 57, S. 49. 1908.

<sup>3)</sup> Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. Bd. 69, S. 350. 1877.

<sup>4)</sup> Rupp u. Schied: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 35, 2, S. 2191. 1902. — Thiel: desgl. Bd. 35, S. 2766. 1902.

<sup>5)</sup> Zeitschr. f. klin. Med. Bd. 59, S. 218. 1906.

Menge zufließen, bis die Flüssigkeit deutlich braun gefärbt bleibt, wozu im allgemeinen 20 ccm genügen. Nach 4stündigem Stehen der gut verschlossenen Flasche in einem dunklen Raum säuert man mit 10proz. Salzsäure vorsichtig an, fügt Stärkelösung hinzu und titriert mit  $\frac{1}{10}$ -Thio-sulfatlösung zurück.

#### *Nachweis und Bestimmung der Fettsäuren im Harn.*

588. Zur Isolierung der flüchtigen Fettsäuren wird eine größere Menge Harn mit Phosphorsäure versetzt und unter öfterem Zufügen von Wasser (das Volumen soll niemals weniger als 400 ccm betragen, um das Übergehen von Salzsäure zu verhindern) so lange destilliert, als das Destillat noch sauer reagiert. Das Destillat wird mit Barytwasser alkalisch gemacht und nach Entfernung des überschüssigen Baryts durch Kohlensäure eingedampft. Der Rückstand wird mit wenig Wasser aufgenommen, die Lösung in eine gewogene Platinschale filtriert, mit wenig Wasser nachgewaschen, eingedampft, getrocknet und gewogen: Barytsalze der Fettsäuren. Vgl. auch § 82.

Über die Methode zur Isolierung nicht flüchtiger höherer Fettsäuren siehe bei Hybbinette<sup>1)</sup>.

#### *Bestimmung der Ameisensäure im Harn<sup>2)</sup>.*

589. Prinzip. Reduktion von Sublimat durch die aus dem Harn isolierte Ameisensäure zu Mercurchlorid ( $\text{HCOOH} + 2 \text{HgCl}_2 = \text{CO}_2 + 2 \text{HCl} + 2 \text{HgCl}$ ) und Wägung des letzteren.

Ausführung. Um eine Bildung von Ameisensäure aus anderen Harnbestandteilen während der Destillation mit Sicherheit zu vermeiden, empfiehlt es sich, sie zunächst nach Dakin durch Äther zu isolieren. Dazu trägt man in den Harn festes Ammonsulfat ein (auf je 100 ccm etwa 20 g), filtriert und extrahiert von dem Filtrat 250 ccm nach Zusatz von 10 ccm 50proz. Phosphorsäure im Lindschen Apparat mit Äther unter lebhafter Drehung des Rührers 12 Stunden. Das Äthergefäß enthält etwa 20 ccm 5proz. Sodalösung. Diese wird im Scheidetrichter vom Äther getrennt, dieser nochmals mit wenig Wasser geschüttelt, das Waschwasser der Sodalösung zugefügt und diese nach Ansäuern mit Phosphorsäure im lebhaften Wasserdampfstrom destilliert, bis etwa 1000 ccm übergegangen sind. Das Destillat dampft man nach Zusatz eines Überschusses von Calciumcarbonat zur Trockne ein, nimmt den Rückstand mit Wasser auf, filtriert in einen Erlenmeyerkolben und wäscht mit Wasser aus. Das Filtrat (etwa 50 ccm) wird durch einige Tropfen verdünnter Salzsäure schwach angesäuert und mit 10 ccm einer Lösung versetzt, welche in 1 l 200 g Sublimat, 300 g Natriumacetat (ameisensäurefrei) und 80 g Natriumchlorid enthält. (Diese Lösung ist im Anfang nicht ganz klar, setzt aber während zweitägigen Stehens einen Niederschlag ab, von dem abgegossen wird.) Der Kolben wird mit Steigrohr versehen, in ein Wasserbad versenkt und wenigstens 2 Stunden gekocht. Das abgeschiedene Kalomel filtriert man durch einen gewogenen Goochtiegel, wäscht mit warmem Wasser, Alkohol und Äther, trocknet 1 Stunde bei 90–100° und wägt. 1 g = 0,0975 g Ameisensäure. Nach Riesser<sup>3)</sup> kann man die Menge des gebildeten Kalomels auch titrimetrisch ermitteln, indem man es durch Jod in Sublimat verwandelt ( $2 \text{HgCl} + \text{J}_2 + 2 \text{HCl} = 2 \text{HgCl}_2 + 2 \text{HJ}$ ) und das nicht verbrauchte Jod bestimmt.

#### *Nachweis und Bestimmung der Oxalsäure im Harn.*

Nachweis. 590. Zum Nachweis von oxalsaurem Kalk im Harn auch bei stark saurer Reaktion läßt man ihn einige Zeit stehen und bringt das vielleicht kaum erkennbare Sediment, oft nur eine schleimige Nubecula, unter das Mikroskop. Die Krystalle vergrößern und vermehren sich gewöhnlich beim Stehen des Harnes während einiger Tage. Die Form der Krystalle (Briefkuvertform\*), ihre Unlöslichkeit in Ammoniak, in Essigsäure, Löslichkeit in Salzsäure dienen dann zur Erkennung. Indessen kann die Krystallabscheidung auch bei Anwesenheit von oxalsaurem Kalk ausbleiben. In solchen Fällen wendet man das folgende Verfahren an.

\*) Gelegentlich sieht man auch quadratische Prismen mit pyramidalen Endflächen (den Krystallen von Ammoniummagnesiumphosphat ähnlich) und im Pferdeharn außerdem kugelige oder knollige Formen, Sanduhrformen, Hantelformen vgl. Feser u. Friedberger, ref. in Malys Jahresber. d. Tierchemie 1874, S. 231.

<sup>1)</sup> Skandinav. Arch. f. Physiol. Bd. 7, S. 380. 1897.

<sup>2)</sup> Fincke: Biochem. Zeitschr. Bd. 51, S. 253. 1913. — Franzen u. Greewe: Journ. f. prakt. Chem. Bd. 80, S. 368. 1909. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 64, S. 169. 1910. — Franzen u. Egger: Journ. f. prakt. Chem. Bd. 83, S. 323. 1911. — Dakin, Janney u. Wakeman: Journ. of biol. chem. Bd. 14, S. 341. 1913.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 96, S. 355. 1915/16 s. auch Biochem. Zeitschr. Bd. 142, S. 280. 1923.

Zur quantitativen Bestimmung dient die Methode von MacLean und Salkowski<sup>1)</sup>. Bestimmung.  
 Sie ist zwar etwas langwierig — Resultate werden nicht vor dem dritten Tag erhalten —, aber sie gibt genaue Werte (Wegrzynowski<sup>2)</sup>).

500 ccm nicht filtrierter Harn werden mit Ammoniak und Chlorcalcium gefällt, dann ohne zu filtrieren stark eingedampft, mit Alkohol gefällt, der Niederschlag größtenteils auf ein Filter gebracht, abfiltriert, mit Alkohol nachgewaschen, dann einmal mit Äther. Der in der Schale und auf dem Filter befindliche Niederschlag wird in verdünnter Salzsäure gelöst (etwa 100 ccm auf ein Viertel verdünnte Salzsäure), die Lösung mehrmals mit dem gleichen Volumen alkoholhaltigen Äthers (9 Vol. Äther, 1 Vol. Alkohol) in der Schüttelmaschine geschüttelt, der Ätherauszug sorgfältig abgetrennt und durch ein nicht angefeuchtetes Filter filtriert. Das Ausschütteln wird ebenso noch einmal wiederholt, die vereinigten Ätherauszüge werden in einem trockenen Kolben abdestilliert. Die im Kolben bleibende Flüssigkeit gießt man in eine Schale, spült den Kolben einmal mit Alkohol, dann mit Wasser nach und erhitzt so lange auf dem Wasserbad unter Zusatz von etwas Wasser, bis der Geruch nach Alkohol und Äther verschwunden ist. Die restierende wässrige Flüssigkeit, deren Volumen etwa 20 ccm betragen soll, läßt man erkalten, filtriert von etwa sich ausscheidenden harzigen Substanzen ab, macht das Filter mit Ammoniak alkalisch, setzt 1—2 ccm 10proz. Chlorcalciumlösung hinzu und säuert mit Essigsäure an. Der entweder sofort oder erst allmählich entstehende weiß oder etwas gelb gefärbte Niederschlag von oxalsaurem Kalk ist bei schneller Ausscheidung amorph, jedoch ganz homogen, bei langsamer Ausscheidung krystallinisch, und zwar zeigt er in letzterem Fall entweder Oktaeder oder die von Feser und Friedberger beschriebenen Formen\*). Man filtriert durch aschefreies Filter, glüht stark und wägt (CaO). 56,07 g CaO entsprechen 90,026 g wasserfreier Oxalsäure. Beim Lösen des Glührückstandes in Salpetersäure darf keine Kohlensäureentwicklung stattfinden, auch darf die Lösung mit Ammonmolybdat keine Fällung von phosphormolybdänsaurem Ammoniak geben.

**Nachweis und Bestimmung von Phenol-, Kresol-, Brenzcatechin-,  
 Indoxylschwefelsäure im Harn.**

591. Schwefelsäure. Über Nachweis und Bestimmung der in diesen Verbindungen enthaltenen Schwefelsäure s. S. 568 und 575.

**Phenol und Kresol.** In betreff des Nachweises s. § 200.

Bei reichlicher Anwesenheit empfiehlt sich nach Salkowski<sup>3)</sup> folgendes einfachere Verfahren: Man erhitzt den Harn im Reagensglas mit Salpetersäure zum Kochen (Geruch nach bitteren Mandeln durch das entstehende o-Nitrophenol), läßt erkalten und fügt Bromwasser hinzu. Es tritt mehr oder weniger starke Trübung oder Niederschlag auf, während eine Kontrollprobe mit normalem Harn höchstens leichte Trübung gibt. Eine zweite Probe macht man nach dem Erhitzen mit Salpetersäure mit Natronlauge alkalisch: orangefarbene Färbung durch Nitrophenolnatrium.

Nachweis des  
Phenol u. Kresol.

Zur quantitativen Bestimmung dient das Verfahren von Koßler und Penny<sup>4)</sup> in der Modifikation von Neuberg<sup>5)</sup>.

Bestimmung von  
Phenol und  
Kresol nach  
Koßler u. Penny.

Prinzip. Die Methode ist eine jodometrische und beruht darauf, daß unter bestimmten Bedingungen durch Hypojodit das Phenol in Trijodphenol und das Kresol in Trijodkresol übergeführt wird. Die Modifikation von Neuberg hat den Zweck, die bei der Destillation mit verdünnten Säuren aus Kohlenhydraten entstehenden jodbindenden Substanzen zu entfernen. Ihre Anwendung ist bei zuckerhaltigen Harnen durchaus notwendig, empfiehlt sich aber bei allen Harnen.

Erforderliche Lösungen. 1.  $\frac{1}{10}$ -Natronlauge (§ 17). 2.  $\frac{1}{10}$ -Jodlösung und  $\frac{1}{10}$ -Thio-sulfatlösung (§ 20).

Ausführung. 500 ccm Harn werden bei schwach alkalischer Reaktion auf etwa 100 ccm eingedampft (dabei entweicht das vorhandene Aceton), der konzentrierte Harn wird in einen Destillationskolben übergeführt, mit so viel

\*) Sternfußnote von voriger Seite.

1) MacLean: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 60, S. 20. 1909. — Salkowski: Praktikum der physiol. und pathol. Chemie. Berlin 1912, S. 174 u. 268.

2) Wegrzynowski: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 83, S. 112. 1913.

3) Praktikum der physiol. u. pathol. Chemie. 4. Aufl. 1912, S. 179.

4) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 17, S. 117. 1893.

5) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 27, S. 123. 1899.

Schwefelsäure\*) versetzt, daß die Flüssigkeit ungefähr 5% der ursprünglichen Harnmenge davon enthält und destilliert. Wenn der Kolbeninhalt soweit abdestilliert ist, daß die Flüssigkeit heftig zu stoßen beginnt, verdünnt man mit Wasser, destilliert weiter und wiederholt dies mindestens 5—6 mal\*\*). Das Destillat wird zur Bindung von Ameisensäure und salpetriger Säure mit Calciumcarbonat ordentlich durchgeschüttelt, abermals destilliert und die Destillation nach Zufügen von Wasser zum Rückstande mehrmals wiederholt. Um die bei der Destillation aus den Kohlenhydraten des Harns entstehenden jodbindenden Körper abzutrennen, werden die Destillate in einem großen Kolben vereinigt, mit einer Auflösung von 1 g Ätznatron und 6 g Bleizucker versetzt und etwa 15 Minuten auf lebhaft siedendem Wasserbade und dann am absteigenden Kühler auf freiem Feuer erhitzt, bis wenige Kubikzentimeter des Destillats ammoniakalische Silberlösung nicht mehr reduzieren, was gewöhnlich nach etwa 5 Minuten der Fall ist. Längeres Erhitzen ist zu vermeiden. Die Phenole bleiben als basische Bleiphenolate zurück, während die anderen jodbindenden Stoffe entweichen (Neuberg). Man säuert nun den Kolbeninhalt stark mit verdünnter Schwefelsäure an und destilliert die Phenole unter 2 maliger Ergänzung des Wassers ab. Ein aliquoter Teil des gemessenen Destillates wird in einer gut schließenden Stöpselflasche aus einer Bürette mit nitritfreier  $\frac{1}{10}$ -Natronlauge bis zur stark alkalischen Reaktion versetzt, durch Eintauchen in heißes Wasser erwärmt, nun  $\frac{1}{10}$ -Jodlösung, und zwar 15—25 ccm mehr als man  $\frac{1}{10}$ -Natronlauge genommen, zugefügt, verschlossen und geschüttelt\*\*\*). Nach dem Erkalten wird angesäuert und das frei gewordene Jod unter Benutzung von Stärkekleister als Indicator mit  $\frac{1}{10}$ -Natriumthiosulfatlösung bis zum Farbumschlag von Violett in Rot zurücktitriert (§ 20).

1 ccm  $\frac{1}{10}$ -Jodlösung entspricht 1,567 mg Phenol oder 1,8017 mg Kresol.

Mooser<sup>1)</sup> fand, daß bei der Anwendung von Schwefelsäure Verluste namentlich an Kresol infolge von Sulfurierung eintreten. Er schlägt vor, an Stelle der Schwefelsäure sirupöse Phosphorsäure zu verwenden und das oben angegebene Verfahren in folgender Weise abzuändern:

250—500 g schwach alkalisch gemachter Harn werden auf dem Wasserbad auf  $\frac{1}{5}$  eingedampft, in einen Destillationskolben gespült, der neben dem Kühler noch einen Hahntrichter trägt. Durch diesen läßt man unter zeitweiligem Umschütteln so viel sirupöse Phosphorsäure zufließen, als ungefähr 5% des ursprünglichen Harnvolumens entspricht. Unter guter Kühlung wird bis auf etwa 100 ccm abdestilliert und die Destillation unter Nachfüllen von 50 ccm Wasser so lange wiederholt, bis die Millonsche Reaktion im Destillat negativ ist. Das Destillat wird mit kohlen-saurem Kalk übersättigt, unter Einleiten eines Kohlensäurestromes erneut wie oben destilliert. Dieses Destillat wird in einem Literkolben aufgefangen und nach Kossler - Penny titriert. Dabei ist zu beachten, daß wegen der Kohlensäure im Destillat mehr Natronlauge zugesetzt werden muß.

Nachweis und Bestimmung des Brenzcatechin.

**Brenzcatechin** wird nach § 201 isoliert und nachgewiesen, zur quantitativen Bestimmung nach demselben Paragraphen in Substanz dargestellt, getrocknet und gewogen.

**Indoxyl.** Der Nachweis der Indoxylschwefelsäure (einschließlich etwa vorhandener Indoxylglucuronsäure) beruht auf der Spaltung derselben und

\*) Siehe dazu den Abänderungsvorschlag von Mooser auf dieser Seite.

\*\*) Mit Hilfe qualitativer Reaktionen kann man ihrer zu geringen Empfindlichkeit wegen nicht entscheiden, ob alles Phenol übergegangen ist. Es bleibt nichts anderes übrig, als nach 5—6 maligem Destillieren nochmals zu destillieren und dieses Destillat getrennt von der Hauptmenge, aber ebenso wie diese, weiter zu behandeln. Vermag es bei der Titration noch nennenswerte Mengen Jod zu binden, so ist die Destillation fortzusetzen.

\*\*\*) Die Menge der zuzusetzenden Natronlauge und Jodlösung richtet sich nach der Menge der Phenole, jedenfalls muß die Flüssigkeit nach Zusatz des Jods stark braun gefärbt sein; es empfiehlt sich zunächst, nur einen Teil des Destillates zur Titration zu nehmen, um die Titration wiederholen zu können.

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 63, S. 170. 1909.

Überführung des Indoxyls in Indigo. Der ursprünglich von Jaffe<sup>1)</sup> als Oxydationsmittel empfohlene Chlorkalk hat den Nachteil, daß die Menge, welche erforderlich ist, um sämtliches Indoxyl in Indigo zu verwandeln, nur durch Ausprobieren gefunden werden kann. Setzt man zu wenig zu, ist die Bildung des Indigos unvollständig, nimmt man zuviel, so wird Indigo oxydiert. Es ist deswegen ratsam, an Stelle des Chlorkalks das von Obermayer<sup>2)</sup> empfohlene Eisenchlorid zu verwenden (wenngleich auch dieses nach Ellinger<sup>3)</sup> eine geringe Oxydation zu Isatin bewirkt) und in folgender Weise zu verfahren: Der Harn wird mit Bleizuckerlösung unter Vermeidung eines Überschusses ausgefällt. Das Filtrat versetzt man mit dem gleichen Volumen reiner rauchender Salzsäure, welche in 500 Tl. 1—2 Tl. Eisenchlorid enthält, und schüttelt tüchtig 1 oder 2 Minuten durch. Der gebildete Indigo wird nun mit Chloroform aufgenommen. Dasselbe setzt sich rasch vollkommen klar und rein blau ab. Zuweilen beobachtet man durch einen anderen Farbstoff bedingte Violettfärbung.

Nachweis des Indoxyls nach Obermayer.

Jolles<sup>4)</sup> hat eine neue Reaktion für den Nachweis des Indoxyls angegeben: Wird Thymol mit Indoxyl zusammen oxydiert, so entsteht daraus 4-Cymol-2-indolindolignon, welches mit 1 Mol. Säure ein Salz von tief violetter Farbe gibt. 10 ccm Harn werden mit 1 ccm einer 5proz. alkoholischen Thymollösung versetzt und umgeschüttelt. Hierauf fügt man etwa 10 ccm einer rauchenden Salzsäure zu, welche 5 g Eisenchlorid im Liter enthält, schüttelt wieder sorgfältig um und läßt 15 Minuten stehen. Dann wird der Farbstoff mit 4 ccm Chloroform unter Schütteln extrahiert. Die Probe ist sehr empfindlich und weist in 10 ccm Harn noch 0,0032 mg Indican nach.  $\alpha$ -Naphthol gibt eine ähnliche Reaktion.

Nachweis des Indoxyls nach Jolles.

Die quantitative Bestimmung geschieht in folgender Weise:

Von Obermayer<sup>5)</sup> und gleichzeitig von Wang<sup>6)</sup> wurde ein Verfahren angegeben, welches auf der Oxydation zu Indigo (Indigoblau und etwas Indigorot) und Titration des Indigos als Indigosulfosäure mit Kaliumpermanganat beruht. An der Ausarbeitung haben sich Bouma<sup>7)</sup>, Ellinger<sup>8)</sup>, Maillard<sup>9)</sup>, Salkowski<sup>10)</sup> beteiligt. Eine völlige Einigung über die beste Art der Ausführung ist noch nicht erzielt worden. Die Beschreibung folgt im allgemeinen den Angaben von Ellinger. Eine wesentliche Abweichung betrifft nur die Art der Reinigung des Chloroformauszuges, welche nach dem Vorschlage von Maillard geschieht.

Bestimmung des Indoxyls nach Obermayer-Wang in der Ausführung von Ellinger.

Erforderliche Lösungen. 1. Bleiessig. 2. Obermayers Reagens (reine rauchende Salzsäure, welche in 1000 Tl. 2—4 Tl. Eisenchlorid enthält). 3. Reine konzentrierte Schwefelsäure, welche Permanganat nicht entfärben darf. 4. Chloroform. 5. 0,1proz. Natronlauge. 6. Kaliumpermanganatlösung, zu deren Herstellung für jedesmaligen Gebrauch 5 ccm einer Stammlösung (etwa 3 g in 1 l Wassers) auf 200 ccm mit Wasser verdünnt werden. Der Titer dieser Lösung, von der 1 ccm etwa 0,00015 g Indigo entspricht, muß mit reinem Indigo eingestellt werden.

<sup>1)</sup> Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 3, S. 448. 1870.

<sup>2)</sup> Wien. klin. Wochenschr. 1890, S. 176.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 38, S. 186. 1903.

<sup>4)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 94, S. 79. 1915; Bd. 95, S. 29. 1915.

<sup>5)</sup> Wien. klin. Rundschau 1898, Nr. 34. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 26, S. 427. 1899.

<sup>6)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 25, S. 406. 1898; Bd. 27, S. 135. 1899; Bd. 28, S. 576. 1899.

<sup>7)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 27, S. 348. 1899; Bd. 30, S. 117. 1900; Bd. 39, S. 356. 1903.

<sup>8)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 38, S. 178. 1903; Bd. 41, S. 20. 1904.

<sup>9)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 41, S. 437. 1904. Hier auch die früheren Arbeiten zitiert.

<sup>10)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 42, S. 236. 1904.

**Ausführung.** Der sauer reagierende oder mit Essigsäure schwach angesäuerte Harn (bei einem Gewicht über 1040 nach Verdünnung mit dem gleichen Volumen Wasser) wird mit  $\frac{1}{10}$  Vol. Bleiessig gefällt. Eine abgemessene Menge des Filtrats, z. B. 100 ccm\*), wird mit dem gleichen Volumen Obermayerschem Reagens im Scheidetrichter versetzt und sofort mit je etwa 30 ccm Chloroform mehrmals ausgeschüttelt, bis eine neue Portion Chloroform sich nicht mehr färbt. Nach  $\frac{1}{2}$  Stunde wird noch eine weitere Ausschüttelung vorgenommen. Man schüttelt sodann die vereinigten Chloroformlösungen in einem Scheidetrichter zunächst mit Wasser, dann mit 0,1proz. Natronlauge, dann wieder mit Wasser (Maillard). Da salzsäurehaltiges Chloroform mehr Indigo löst als reines, so kann bei diesen Waschungen durch Entziehung der Salzsäure sich aus konzentrierten Lösungen etwas Indigo abscheiden. Man fügt deshalb (nach einer persönlichen Mitteilung von Ellinger) zweckmäßig zu stark gefärbten Chloroformlösungen vor dem Waschen noch reichlich Chloroform hinzu. Die im Scheidetrichter abgetrennte Chloroformlösung wird durch ein trockenes Filter in einen sorgfältig gereinigten Kolben filtriert, mit Chloroform nachgewaschen und verdunstet. Auf den Rückstand bringt man nun etwa 10 ccm konzentrierte Schwefelsäure, erwärmt 5—10 Minuten zur vollständigen Lösung auf kochendem Wasserbad, gießt die Lösung vorsichtig in einen sorgfältig gereinigten Erlenmeyerkolben, in welchem sich etwa 100 ccm destilliertes Wasser befinden und spült mit destilliertem Wasser nach. Die blaue Lösung wird heiß mit der Kaliumpermanganatlösung titriert, bis der rötliche Ton verschwunden und die Flüssigkeit hellgelb oder fast farblos geworden ist.

Nach Ellinger findet man etwa 86% der theoretischen Menge, so daß zu dem gefundenen Werte noch etwa  $\frac{1}{6}$  hinzuzufügen ist.

Verfahren nach Bouma. Ein anderes Verfahren, welches auf der Überführung des gesamten Indoxyls in Indigorot durch Kochen des Harnes mit Isatinsalzsäure und Titration des Indigorots als Indigorotsulfosäure mit Permanganat beruht, ist von Bouma<sup>1)</sup> angegeben worden.

Colorimetrisches Verfahren. Colorimetrische Methode. Eine colorimetrische Methode hat Jolles<sup>2)</sup> auf Grund seiner Reaktion angegeben.

#### *Nachweis und Bestimmung der Hippursäure (und Benzoesäure) im Harn.*

592. Zum Nachweis der nach § 206 isolierten Hippursäure dienen die dort angegebenen Reaktionen.

Die Methoden für die Bestimmung bestehen in der Isolierung und Wägung entweder der Hippursäure selbst (Verfahren 1 und 2), oder der aus ihr durch Spaltung gewonnenen Benzoesäure (Verfahren 3 und 4). Letztere Verfahren sind einfacher, vor allem ist die Extraktion der Benzoesäure aus dem Urin leichter als die der Hippursäure. Aber sie enthalten insofern eine Fehlerquelle, als auch Benzoesäure, die nicht an Glykokoll gebunden ist, als Hippursäure berechnet wird. Ferner können auch kleine Fehler durch andere aromatische Fettsäuren bedingt werden.

Bestimmung der Hippursäure nach Bunge und Schmiedeberg. 1. **Verfahren nach Bunge und Schmiedeberg<sup>3)</sup>.** Die nicht zu kleine Quantität Harn, vom menschlichen Harn mindestens 300 ccm, wird mit Sodalösung alkalisch gemacht, filtriert und das Filtrat (wohl am besten nach Neutralisation) zum dicken Sirup eingedampft, der Rückstand wird wiederholt mit kaltem

\*) Über die im einzelnen Fall zu nehmende Menge lassen sich keine bestimmten Angaben machen. Sie richtet sich nach dem Indicangehalt des Harnes und soll so gewählt werden, daß 3—4 Ausschüttelungen mit je etwa 30 ccm Chloroform und von je etwa 2 Minuten Dauer genügen, um alles Indigo zu entfernen.

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 32, S. 82. 1901.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 94, S. 79. 1915.

<sup>3)</sup> Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 6, S. 233. 1877.



Alkohol ausgezogen und der alkoholische Auszug eingedampft, mit Salzsäure versetzt und wiederholt (wenigstens 5 mal) mit Essigäther ausgeschüttelt. Die klar abgossene Lösung der Hippursäure in Essigäther wird mit Wasser gewaschen und dann bei mäßiger Temperatur verdunstet. Den Rückstand zieht man, um Benzoesäure und andere Verunreinigungen zu entfernen, mehrmals mit frisch destilliertem Petroläther aus und löst ihn in wenig warmem Wasser. Die wässrige Lösung wird mit etwas Tierkohle digeriert, filtriert, das Filtrat bei höchstens 50—60° zur Krystallisation verdunstet und der Rückstand getrocknet und gewogen. Diese Methode gibt gute Resultate<sup>1)</sup> und ist auch zur Bestimmung der Benzoesäure geeignet, wenn man den Rückstand des Petrolätherauszugs in Wasser warm löst, filtriert, das Filtrat bei mäßiger Temperatur verdunstet, den Rückstand trocknet und wägt.

Jaarsveld und Stokvis<sup>2)</sup> verfahren gleichfalls nach obiger Methode, wandeln aber nachher die durch Petroläther gereinigte Hippursäure durch  $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{2}$  stündiges Kochen mit starker Natronlauge in Benzoesäure um, säuern dann mit Salzsäure an, schütteln mehrmals mit Petroläther, lassen diesen bei gewöhnlicher Temperatur verdunsten und berechnen aus dem getrockneten und gewogenen Rückstand die Hippursäure (Multiplikation des erhaltenen Wertes mit 1,468).

Zur besseren Reinigung empfiehlt Wiechowski<sup>3)</sup> die nach Jaarsveld und Stokvis gewonnene natronalkalische Lösung der Benzoesäure mit Phosphorsäure anzusäuern und der Dampfstromdestillation zu unterwerfen, das in Sodalösung aufgefangene Destillat bis fast zur Trockne einzudampfen, den Rückstand nach Ansäuern mit Salzsäure mit Petroläther wiederholt auszuschütteln usw. Es wird auf diese Weise rein weiße Benzoesäure erhalten.

**2. Verfahren nach Völker<sup>4)</sup>.** 200—300 ccm Harn werden in einem Hofmeisterschen Schälchen auf  $\frac{1}{3}$  eingeeengt, nach Zusatz von 4 g Natriumphosphat weiter zur Sirupkonsistenz eingedampft und nach Beimengung von gebranntem Gips solange erwärmt, bis sich die Masse zu Pulver zerdrücken läßt. Letzteres wird samt der zerschlagenen Schale im Soxhletschen Extraktionsapparat zuerst 4—6 Stunden mit Petroläther, dann nach Wechseln des Kolbens 6—10 Stunden mit trockenem Äther extrahiert. Der Ätherrückstand wird in Wasser gelöst, die Lösung mit Kohle entfärbt, auf 1—2 ccm bei 50—60° verdunstet und der Krystallisation überlassen. Die Krystalle sammelt man auf einem bei 110° getrockneten und gewogenen Filter, wäscht mit etwas Wasser und ein paar Tropfen Äther, trocknet und wägt. Als Korrektur kann für je 1 ccm Filtrat 0,0015 g Hippursäure in Rechnung gesetzt werden.

Bestimmung der Hippursäure nach Völker.

### 3. Verfahren nach Hryntschak<sup>5)</sup>.

Prinzip. Die Hippursäure wird mit Natronlauge hydrolysiert und nach vorangegangener energischer Oxydation mit Permanganat die Benzoesäure mit Äther extrahiert und nach Reinigung mit Chloroform zur Wägung gebracht.

Erforderliche Lösungen. 1. Natriumhydroxyd. 2. Kaliumpermanganat. 3. Natriumbisulfit. 4. 50 proz. Schwefelsäure. 5. Geglühtes Natriumsulfat. 6. Chloroform, das zweimal mit Wasser gewaschen und dann über Kupfersulfat getrocknet ist.

Ausführung. In einem Kjeldahlkolben von 1 l werden 100 ccm Harn mit etwa 10 g Natriumhydroxyd unter Rückfluß 2 $\frac{1}{2}$  Stunden über freier Flamme gekocht. Dann wird der Kühler gelüftet und Permanganat in Substanz (beim menschlichen Harn 10 g) in kleinen Dosen unter zeitweiligem Umschütteln zugefügt und 5—7 Minuten gelinde weiter gekocht. Nach dem Kochen muß die Flüssigkeit noch von unzersetztem Permanganat gefärbt sein. Nach dem Erkalten gibt man einige Eisstückchen und ungefähr 15 g Natriumbisulfit in Substanz zu, setzt den Kühler wieder auf, stellt den Kolben in kaltes Wasser

Bestimmung der Hippursäure nach Hryntschak.

<sup>1)</sup> v. Schröder: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 3, S. 323. 1879.

<sup>2)</sup> Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 10, S. 271. 1879. — van de Velde u. Stokvis: desgl. Bd. 17, S. 190. 1883.

<sup>3)</sup> Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 7, S. 264. 1906.

<sup>4)</sup> Malys Jahresber. d. Tierchém. 1887. S. 215.

<sup>5)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 43, S. 315. 1912.

und gießt durch den Kühler portionenweise 50proz. Schwefelsäure zu, bis der Braunstein gelöst ist. Nach einigen Stunden schüttelt man die wasserhelle Flüssigkeit in einem Schütteltrichter 5 mal mit Äther aus, spült Kühler und Kolben mit Äther nach, trocknet die ätherische Lösung in einem Becherglase mit geglühtem Natriumsulfat und bringt sie in eine runde Krystallisierschale. Die letzten Portionen des Äthers, mit denen das Becherglas ausgespült wird, werden durch ein kleines Filter, das mindestens 0,5 cm vom Trichterrande absteht, gegossen. Nach dem Verdunsten des Äthers wird die Benzoessäure mit kleinen Mengen Chloroform aufgenommen und durch das gleiche Filter in ein Wäggläschen, das nach oben konisch verjüngt ist, filtriert, das Filter gründlich mit Chloroform aus einem Tropfgläschen nachgespült. Zu große Chloroformmengen sind zu vermeiden. Das Gläschen wird mit Chlorcalcium unter eine Glasglocke gebracht und durch sie ein mit Schwefelsäure getrockneter lebhafter Luftstrom gesaugt. Nach dem Verdunsten des Chloroforms läßt man es 2 Stunden in einem Exsiccator mit Chlorcalcium und Wachs- oder Paraffinstückchen stehen. Dann wird gewogen. Die Menge Benzoessäure mit 1,468 multipliziert gibt die Hippursäure.

Bestimmung der  
Hippursäure nach  
Folin und  
Flanders.

#### 4. Verfahren nach Folin und Flanders<sup>1)</sup>.

Prinzip. Die Hippursäure wird durch Natronlauge und dann durch Kochen mit Salpetersäure und etwas Kupferniträt hydrolysiert, die Benzoessäure mit Chloroform ausgeschüttelt, die Chloroformlösung gewaschen und mit  $\frac{n}{10}$ -Natriumalkoholat gegen Phenolphthalein titriert.

Erforderliche Lösungen. 1. 5proz. Natronlauge. 2. Konzentrierte Salpetersäure. 3. Festes Kupferniträt. 4. Festes Ammonsulfat. 5. Gewaschenes Chloroform. 6. Gesättigte Lösung von reinem Natriumchlorid, die auf 1 l mit 0,5 ccm konzentrierter Salzsäure versetzt ist. 7.  $\frac{n}{10}$ -Natriumalkoholat. 2,3 g reines metallisches Natrium werden in 1 l absolutem Alkohol gelöst. Es ist besser, daß die Lösung eher etwas schwächer als stärker wie  $\frac{n}{10}$  ist. Zweckmäßig wird sie gegen reine Benzoessäure in Chloroform eingestellt. Sie kann auch gegen  $\frac{n}{20}$ -Salzsäure eingestellt werden, vorausgesetzt, daß das Alkoholat keine Kohlensäure enthält. In der Regel ist aber etwas Carbonat zugegen, und darum erscheint bei Titrationen in wässriger Lösung das Alkoholat stärker als in Chloroform.

Ausführung. In einer Schale werden 100 ccm Harn mit 10 ccm einer 5proz. Natronlauge auf dem Dampfbade zur Trockne eingengt. (Wenn die Schale am Abend auf das Bad gestellt wird, so ist der Inhalt am anderen Morgen trocken.) Den Rückstand spült man mit 25 ccm Wasser und 25 ccm konzentrierter Salpetersäure in einen Kjeldahlkolben von 500 ccm und setzt 0,2 g Kupferniträt zu. Den Kolbenhals verschließt man mit Hopkinsschen Kondensatoren (große Reagensgläser aus Jenaer Glas mit einem doppelt durchbohrten Gummistopfen verschlossen; durch eins der Löcher führt eine Glasröhre bis nahe an den Boden und durch das andere eine, die gleich unter dem Stopfen endet; mittels dieser Röhren läßt man kaltes Wasser durch das Reagensglas fließen). Dadurch wird ein Verlust an Benzoessäure und eine Veränderung der Konzentration der Salpetersäure vermieden. Nach Zusatz von Siedesteinen kocht man  $\frac{1}{2}$  Stunde mäßig über einem Mikrobrenner, spült nach dem Kühlen die Kondensatoren mit 25 ccm Wasser ab, gießt den Inhalt in einen Scheidetrichter von 500 ccm und spült mit weiteren 25 ccm Wasser nach. Das Gesamtvolum der Flüssigkeit beträgt nun 100 ccm. Nachdem die Lösung mit Ammoniumsulfat gerade gesättigt (ungefähr 55 g) ist, extrahiert man 4 mal mit je 50, 35, 25 und 25 ccm gewaschenem Chloroform. Die beiden ersten Portionen werden noch zum Nachspülen des Kjeldahlkolbens benutzt. Der Scheidetrichter kann kräftig geschüttelt werden, da keine Neigung zu Emulsionen besteht. Die Chloroformextrakte werden in einem anderen Scheidetrichter gesammelt und nach ihrer Vereinigung mit 100 ccm einer gesättigten Lösung von reinem Natriumchlorid versetzt, der auf 1 l 0,5 ccm konzentrierte Salzsäure zugefügt wurden. Nach dem Umschütteln gibt man das Chloroform in einen Erlenmeyerkolben von 500 ccm und titriert mit  $\frac{n}{10}$ -Natriumalkoholat gegen 5 Tropfen Phenolphthalein. Der erste Umschlag wird als Endpunkt genommen, wenn er auch nach kurzem Stehen wieder abbläßt.

#### *Nachweis der p-Oxyphenyllessigsäure und Hydro-p-cumarsäure im Harn.*

593. Zum Nachweis erwärmt man etwa 20 ccm Harn nach Baumann<sup>2)</sup> mit Salzsäure auf dem Wasserbade und schüttelt mit Äther aus. Die ätherische Lösung wird mit einer schwachen

<sup>1)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 11, S. 257 1912.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 4, S. 304. 1880.

Sodalösung geschüttelt und diese nach Ansäuern mit Schwefelsäure wieder mit Äther. Den beim Verdunsten des Äthers hinterbleibenden Rückstand löst man in Wasser und prüft die wässrige Lösung mit Millons Reagens (Anh.). Bei Anwesenheit der Säuren tritt Rotfärbung ein (§§ 211 u. 212).

#### *Nachweis des Inosit im Harn.*

594. Dem Nachweis, zu dem die § 203 angegebenen Reaktionen dienen, muß die Isolierung vorangehen. Diese geschieht nach den § 203 gemachten Angaben durch Bleifällung. Nur ist es zweckmäßig 1. den Harn vor der Fällung auf  $\frac{1}{4}$  einzuengen, 2. nach vorsichtiger Ausfällung mit Bleiessig noch etwas Ammoniak zuzufügen und 2 Tage stehen zu lassen, 3. das Filtrat vom Schwefelblei, nachdem es etwas eingengt ist, stehen zu lassen, von Ausscheidungen abzufiltrieren und dann weiter einzudampfen.

#### *Nachweis und Bestimmung der Kynurensäure im Hundeharn.*

595. Über Isolierung und Nachweis s. § 230. Die quantitative Bestimmung geschieht nach Jaffe<sup>1)</sup> oder nach Capaldi<sup>2)</sup>. Bestimmung der Kynurensäure: nach Jaffe

Verfahren nach Jaffe. Der Harn (100 ccm) wird zum dicken Sirup eingedampft, mit heißem Alkohol behandelt und 24 Stunden stehen gelassen; in dieser Zeit scheidet sich die Flüssigkeit klar ab. Man filtriert und wäscht den Niederschlag mit Alkohol aus. Das Filtrat wird eingedampft, der zurückbleibende Sirup in Wasser gelöst, mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert und mit Äther stark geschüttelt. Die Kynurensäure scheidet sich ziemlich rein aus.

Verfahren nach Capaldi. Der Harn (100 ccm) wird mit 50% einer 10proz. Chlorbariumlösung, die 5% konzentrierten Ammoniak enthält, vermischt, das Filtrat bis auf  $\frac{1}{3}$  der benutzten Harnmenge eingedampft und mit 4% konzentrierter Salzsäure versetzt. Der Niederschlag wird nach 16—24 Stunden abfiltriert, mit 1proz. Salzsäure ausgewaschen, in ein Becherglas gespritzt und in Ammoniak gelöst. Die Lösung wird auf dem Wasserbade bis zum Verschwinden des freien Ammoniaks erwärmt, filtriert und wieder mit 4% konzentrierter Salzsäure versetzt. Der entstandene weiße Niederschlag wird nach etwa 6 Stunden durch ein gewogenes Filter filtriert, mit 1proz. Salzsäure und zweimal mit Wasser gewaschen, bei 100° getrocknet und gewogen. nach Capaldi.

#### *Nachweis des Chondroitinschwefelsäure und Verhalten des Harns zu Essigsäure.*

596. Häufig beobachtet man, daß im normalen Harn auf Zusatz von Essigsäure Trübung oder Fällung eintritt. Nach K. Mörner<sup>3)</sup> ist dieselbe in der Regel nicht durch ein im Harn präformiertes Proteid (Mucin, Nucleoproteid) bedingt, sondern durch den Gehalt jedes Harnes an kleinen Mengen von Eiweiß einerseits und eiweißfällenden Mitteln (Chondroitinschwefelsäure, Nucleinsäure) andererseits, welche auf Zusatz von Essigsäure als unlösliche Verbindungen ausfallen. Die Salze des Harnes stören die Ausfällung. Unter günstigen Versuchsbedingungen erhält man aber in jedem normalen Harn diese Ausscheidungen, und zwar dann, wenn man die Salze durch Dialyse vermindert, Chloroform und Essigsäure zusetzt und schüttelt.

Zum Nachweis<sup>4)</sup> der Chondroitinschwefelsäure wird eine kleine Menge Harn filtriert, dialysiert — was bei Verwendung von Schilfschläuchen nur einige Stunden in Anspruch nimmt —, der Dialysenrückstand, falls er nicht ganz klar ist, mit Kieselgur geschüttelt und bis zur völligen Klarheit filtriert. Etwa 5—10 ccm vom Filtrat füllt man in ein Reagenzglas, versetzt mit 5 Tropfen 25proz. Essigsäure, schüttelt um und läßt stehen. Nimmt die Trübung, welche oft eintritt, nicht mehr zu, so teilt man die Probe und versetzt die eine Hälfte mit 2—3 Tropfen einer klaren, ebenfalls mit Essigsäure angesäuerten Gelatinelösung, die 0,2 g reine Gelatine und 10 ccm konzentrierte Essigsäure auf 200 ccm Wasser enthält. Eine deutliche Zunahme der Trübung läßt auf Anwesenheit von Chondroitinschwefelsäure schließen. Zur weiteren Sicherung kann man den Dialysenrückstand nach dem Kochen mit Salzsäure auf Schwefelsäure und reduzierendes Kohlenhydrat prüfen.

Über ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung s. bei Pons<sup>5)</sup>.

### **Vorwiegend pathologische Harnbestandteile.**

#### *Nachweis und Bestimmung des Traubenzuckers im Harn.*

597. Zum Nachweis dienen folgende Proben:

Trommersche Probe. Etwaiges Eiweiß ist zunächst nach § 567 zu entfernen.

Trommers  
Probe.

<sup>1)</sup> Bei August Schmidt: Diss. Königsberg 1884.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 23, S. 92. 1897.

<sup>3)</sup> Skandinav. Arch. f. Physiol. Bd. 6, S. 332. 1895. Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 5, S. 524. 1904.

<sup>4)</sup> K. A. H. Mörner: Skandinav. Arch. f. Physiol. Bd. 6, S. 332. 1895. — Pons: Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 9, S. 399. 1907.

<sup>5)</sup> Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 9, S. 399. 1907.

Man verfährt in der § 97 angegebenen Weise. Reichliches Lösungsvermögen für Kupfersulfat und das Auftreten eines deutlichen gelben oder roten Niederschlags beim Erwärmen sind für Zucker charakteristisch.

Über die Modifikationen von Salkowski<sup>1)</sup>, Haines, Poud und Webster<sup>2)</sup> und Benedict<sup>3)</sup> s. Originalarbeiten.

Ausführung bei  
geringem Zucker-  
gehalt nach  
Worm-Müller.

Da aber jeder normale Harn Stoffe enthält, welche Kupferoxyd in Lösung halten und reduzieren, und solche, welche das Kupferoxydul am Ausfallen verhindern, so kann die Probe in manchen Fällen besonders bei geringem Zuckergehalt zweifelhaft bleiben. Um sie nun auch bei solchen zweifelhaften Fällen möglichst empfindlich und für Zucker charakteristisch zu machen, wird sie nach den umfassenden Untersuchungen von Worm-Müller<sup>4)</sup> am besten in folgender Weise angestellt: In einem Reagensglas werden 5 ccm filtrierter Harn, in einem anderen 1 ccm 2,5proz. Kupfersulfatlösung und 2,5 ccm alkalische Seignettesalzlösung (auf 100 ccm 4proz. Natronlauge 10 g weinsaures Kalinatron) gleichzeitig erhitzt. 20—25 Sekunden nach Unterbrechung des Kochens gießt man die alkalische Kupferlösung in den Harn ohne zu schütteln und beobachtet nun, ob die Flüssigkeit blau bleibt oder sich nur mehr wenig verfärbt (negativer Ausfall), oder ob sofort oder während der nächsten 10 Minuten (nach Pflüger 12 Stunden) eine bei auffallendem Licht schmutzig gelbgrüne oder gelbrote Färbung entsteht, welche von fein verteiltem, sich häufig ganz langsam als gelbroter Niederschlag zu Boden senkendem Kupferoxydul herrührt (positiver Ausfall). Erhält man keine Ausscheidung mit 1 ccm, so muß man die Probe mit 2, 2,5 ccm usw. Kupfersulfatlösung (die Menge der Seignettesalzlösung und des Harns bleiben dieselben) wiederholen, bis entweder Ausscheidung erfolgt oder die Flüssigkeit nicht mehr entfärbt wird, d. h. ihre grüne Farbe behält. Bei nicht ganz geringem Zuckergehalt beobachtet man auch bei dieser Art der Ausführung eine deutliche gelb- oder ziegelrote Trübung von ausgeschiedenem Kupferoxydul.

In hochgestellten Harnen sind kleine Zuckermengen mit dieser Methode bisweilen nicht nachzuweisen. Andererseits ist die Methode so empfindlich, daß sie, wie Schöndorff<sup>5)</sup> gezeigt hat, in zahlreichen Fällen schon durch den physiologischen Zuckergehalt des Harnes positiv ausfällt.

Lävulose und Milchzucker geben auch die Trommersche Probe, ebenso die Pentosen, diese aber in etwas anderer Weise.

Boettgers  
Probe.

Boettgersche Probe. Etwaiges Eiweiß ist zunächst nach § 567 zu entfernen. Man versetzt den Harn mit dem 10. Teil des Almén-Nylanderschen Reagens (§ 97), erhitzt zum Kochen und setzt das Kochen bei schiefgehaltenem Reagensglas und unter leichtem Schütteln über kleiner Flamme 2 bis 3 Minuten oder höchstens 5 Minuten fort. Der Harn färbt sich dunkler, wird schwarzbraun oder fast schwarz und setzt beim Stehen einen ebenso gefärbten Phosphatniederschlag ab.

Da auch viele normale Harnen eine gleiche Reaktion zeigen (gepaarte Glucuronsäuren, Urochrom, Arzneimittel wie Rheum, Senna, Antipyrin, Salol, Terpentinöl u. a.), so hat diese Probe mehr einen negativen Wert, insofern ein Harn, welcher die Reaktion nicht gibt, als praktisch zuckerfrei (weniger als 0,05%) angesehen werden kann (Hammarsten<sup>6)</sup>).

1) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 79, S. 164. 1912.

2) Journ. of the Americ. med. assoc. Bd. 74, S. 301. 1920.

3) Journ. of biol. chem. Bd. 3, S. 101. 1907.

4) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 27, S. 112. 1882. — Pflüger, Schöndorff u. Wenzel: desgl. Bd. 105, S. 121. 1904. — Pflüger: desgl. Bd. 116, S. 265. 1907.

5) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 121, S. 572. 1908.

6) Lehrbuch der physiologischen Chemie. 9. Aufl. S. 638. 1921. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 50, S. 36. 1906/07. Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 116, S. 517. 1907.

Die Probe soll aber in der Ausführung von Bohmannson<sup>1)</sup> zuverlässig sein: 20 ccm Harn werden mit 5 ccm 25proz. HCl versetzt, 2 g Blutkohle zugefügt, 5 Minuten geschüttelt und filtriert. Das neutralisierte Filtrat wird zur Boettgerschen Probe verwandt. Die Tierkohle soll die störenden, reduzierenden Substanzen, nicht aber den Zucker absorbieren.

Nach Andersen<sup>2)</sup> verwendet man anstatt Salzsäure besser 5 ccm 50proz. Essigsäure, da bei Anwendung von Salzsäure doch etwas Zucker verloren gehen soll.

Lävulose und Milchzucker geben gleichfalls die Boettgersche Probe.

Phenylhydrazinprobe von E. Fischer. Für den Harn empfiehlt sich die Ausführung dieser Probe in folgender von A. Neumann<sup>3)</sup> angegebenen Modifikation, welche selbst bei sehr geringem Zuckergehalt in kurzer Zeit sehr reine und schön ausgebildete Krystalle liefert: 5 ccm Harn werden mit 2 ccm mit Natriumacetat gesättigter 50proz. Essigsäure und 2 Tropfen reinem Phenylhydrazin in einem Reagensglas\*) auf 3 ccm eingekocht, nach schnellem Abkühlen nochmals erwärmt und der langsamen Abkühlung überlassen. Noch bei Anwesenheit von 0,02% Traubenzucker scheiden sich in 5—10 Minuten schön ausgebildete Osazonkrystalle ohne Beimengung aus. Hat der Harn bei geringem Zuckergehalt hohes spezifisches Gewicht, so muß man etwas länger warten.

Über den Nachweis kleinster Zuckermengen in konzentrierten Harnen mit Hilfe von Phenylhydrazin s. Salkowski<sup>4)</sup>.

Lävulose, welche in seltenen Fällen im Harn vorkommt, gibt dasselbe Osazon.

Rubnersche Probe. Man fällt den Harn mit konzentrierter Bleizuckerlösung im Überschuß, versetzt das Filtrat vorsichtig mit Ammoniak, so daß ein flockiger Niederschlag entsteht und erwärmt auf 80°: Rotfärbung (E. Voit<sup>5)</sup>.

Konzentrierte Harnen müssen zunächst mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt werden.

G. Hoppe-Seylersche Probe<sup>6)</sup>. 5 ccm (1 Teelöffel) des Reagens (0,5proz. Lösung von o-Nitrophenylpropionsäure in Natronlauge und Wasser) werden mit etwa 10 Tropfen des zu untersuchenden Harns versetzt, dann etwa 1/4 Minute gekocht. Wird die Lösung dunkelblau (Indigo), so sind reduzierende Substanzen (mindestens = 0,5% Zucker) vorhanden. Normaler Harn gibt erst bei Zusatz von mindestens 1 ccm Grünfärbung, eine deutliche Blaufärbung ist auch bei größeren Mengen gewöhnlich nicht zu erzielen. Gehalt des Harns an Eiweiß schadet nicht.

Gärungsprobe. Man erhitzt den frischen und unzersetzten, von Blut, Eiweiß, Albumosen freien Harn in einem Kölbchen zum Kochen, erhält einige Minuten im Sieden (um Mikroorganismen zu vernichten), läßt abkühlen, fügt, falls er neutral oder alkalisch reagiert, Weinsäure bis zur schwach sauren Reaktion hinzu, kocht in diesem Falle nochmals auf, um Kohlensäure zu entfernen, verteilt ein Stückchen frischer Bierhefe (auf 10 ccm Harn etwa 1 g) in ihm und bringt ihn in ein gut gereinigtes Gärkölbchen, dessen langer Schenkel völlig mit ihm erfüllt wird. Durch Eingießen von etwas Quecksilber schließt man die Flüssigkeit in dem langen Schenkel ab. (Statt des Gärkölbchens kann man auch ein Reagensglas benutzen, welches völlig gefüllt und umgekehrt in einer Schale mit Quecksilber aufgestellt wird.) In einem anderen Gärkölbchen (oder Reagensglas) wird derselbe Versuch mit normalem Harn angesetzt. Beide Gefäße werden bei 34—36° aufgestellt. Bei irgend erheblichem Zuckergehalt beginnt nach einiger Zeit die Gasentwicklung; sie ist um so reichlicher, je zuckerreicher der Harn. Die Vergärung ist bei der genannten Temperatur nach 6 Stunden eine vollständige (Victorow<sup>7)</sup>). Wenn also nicht schon vorher eine deutliche Gasentwicklung eingetreten ist, so darf der Versuch nicht früher abgebrochen werden. Nach dieser Zeit wird auch in dem Kontrollversuch eine kleine Luftblase entstanden sein (Selbstgärung der Hefe) und der zu untersuchende Harn

\*) Neumann benutzt sog. Kugelreagensgläser, welche mit Marken für 3, 5 und 7 ccm versehen sind und oberhalb dieser Graduierung eine kugelförmige Erweiterung haben. Sie gestatten bei fast horizontaler Haltung ein sehr schnelles Eindampfen.

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 19, S. 281. 1909.    <sup>2)</sup> desgl. Bd. 37, S. 262. 1911.

<sup>3)</sup> Arch. f. Anat. u. Physiol. (Physiol. Abt.) 1899, Suppl.-Bd. S. 549. — Margulies: Berl. klin. Wochenschr. 1900, S. 881.

<sup>4)</sup> Arb. a. d. pathol. Inst. zu Berlin: Hirschwald 1906. S. 587.

<sup>5)</sup> Malys Jahresber. d. Tierchem. 1890, S. 186.

<sup>6)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 17, S. 83. 1893.

<sup>7)</sup> Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 118, S. 583. 1907.

ist nur dann als zuckerhaltig anzusehen, wenn in ihm mehr Gas entstanden ist. Um in zweifelhaften Fällen zu entscheiden, ob die Gasentwicklung erheblicher ist als in dem Kontrollversuche, erwärmt man beide Kölbchen einige Zeit auf 70°, wodurch eine etwa vorhandene Größendifferenz der beiden Gasblasen deutlicher hervortritt.

Am Schluß des Versuches ist die Flüssigkeit auf ihre Reaktion zu prüfen<sup>1)</sup>. Ist sie alkalisch, so beweist eine Gasentwicklung nichts für Zucker. Stellt man die Gärprobe in der beschriebenen Weise<sup>2)</sup> an, so zeigt ein positiver Ausfall die Anwesenheit von Zucker an. Über den Einwand, den Pflüger gegen die absolute Zuverlässigkeit dieser Probe bei kleinen Zuckermengen macht, siehe Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 111, S. 241. 1906.

Lävulose, welche in seltenen Fällen im Harn vorkommt, vergärt auch mit Hefe. Andere mit Bierhefe vergärbare Substanzen im Harn sind nicht bekannt.

Polarisations-  
probe.

**Polarisationsprobe.** Man untersucht den Harn im Polarisationsapparat auf Rechtsdrehung. Über die Ausführung etwa nötiger Klärung oder Entfärbung s. § 598. Vorhandenes Eiweiß ist nach § 567 zu entfernen.

Die quantitative Bestimmung kann durch Polarisation, durch Titration und mit Hilfe der Vergärung ausgeführt werden.

**598. Bestimmung durch Polarisation.** Diabetische Harnen können in vielen Fällen nach der Filtration ohne weitere Vorbereitung polarisiert werden. Sind sie trübe und durch einfache Filtration nicht zu klären, oder sind sie zu sehr gefärbt, so schüttelt man eine kleine Menge mit etwas fein gepulvertem Bleiacetat, filtriert und verwendet das klare Filtrat. Ein alkalisch reagierender Harn ist vor dem Zusatz des Bleizuckers mit Essigsäure bis zur deutlich sauren Reaktion zu versetzen. Als Polarimeter benutzt man am besten das § 34 abgebildete Saccharimeter von Schmidt und Haensch, bei dem sich der Prozentgehalt an Traubenzucker gleich an der Skala ablesen läßt. Verwendet man einen nicht für die speziellen Zwecke der Zuckerbestimmung konstruierten Apparat, so geschieht die Berechnung der Traubenzuckermenge nach S. 27 ( $[\alpha]_D = 52,74^\circ$ ).

Die Bestimmung gibt nur dann richtige Werte, wenn der Harn keine linksdrehenden Substanzen (Eiweiß,  $\beta$ -Oxybuttersäure, gepaarte Glucuronsäuren, Leoschen Zucker, Lävulose, Cystin) enthält. Etwa vorhandenes Eiweiß ist in der § 567 beschriebenen Weise vor der Polarisation zu entfernen. Um die Anwesenheit anderer linksdrehender Substanzen festzustellen, läßt man den Harn vergären und wiederholt dann die Polarisation. Ergibt sich hierbei eine Linksdrehung, so ist der gefundene Wert zu dem zuerst gefundenen hinzuzuaddieren.

$\beta$ -Oxybuttersäure\*), gepaarte Glucuronsäuren, Leoscher Zucker vergären nicht. Die äußerst selten vorkommende Lävulose vergärt allerdings auch, an sie wird aber erst zu denken sein, wenn die Polarisation im Verhältnis zur Titrierung zu geringe Werte gibt und alle anderen linksdrehenden Stoffe auszuschließen sind.

Es ist zu berücksichtigen, daß eine reine Zuckerlösung (Traubenzucker, Rohrzucker) nach der Vergärung eine geringe optische Aktivität zeigt, zuweilen Rechts-, zuweilen Linksdrehung (Neuberg<sup>3)</sup>).

Polarimetrische  
Bestimmung bei  
sehr geringem  
Zuckergehalt.

Ausführung bei sehr geringem Zuckergehalt. Man fällt eine größere (gemessene) Menge Harn mit Bleizucker, filtriert, fällt das Filtrat mit Bleiessig und etwas Ammoniak und zerlegt den in Alkohol zerteilten Niederschlag mit Schwefelwasserstoff. Das Filtrat wird, wenn

\*) Es ist zu berücksichtigen, daß die Linksdrehung der  $\beta$ -Oxybuttersäure durch Zusatz von Bleiacetat erheblich gesteigert wird.

<sup>1)</sup> Pflüger, Schöndorff u. Wenzel: Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 105, S. 139. 1904.

<sup>2)</sup> Salkowski: Berl. klin. Wochenschr. 1905, S. 48.

<sup>3)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 24, S. 423. 1910.

nötig, mit wenig Tierkohle entfärbt, bei mäßiger Temperatur auf ein kleines (zu messendes) Volumen eingeengt (wobei die Reaktion stets schwach essigsauer sein muß) und im Polarisationsapparat untersucht. Betrug das Volumen des benutzten Harns 1500 ccm, das Volumen der alkoholischen Lösung 21 ccm, die Länge des benutzten Rohres 2 dm und die am Saccharimeter von Schmidt und Haensch (§ 34) abgelesene Drehung 3 Teilstriche, so sind in 1500 ccm Harn  $\frac{3 \cdot 21}{100} = 0,63$  g Traubenzucker.

Eine Komplikation kann bei dieser Untersuchung entstehen durch etwaige Anwesenheit von Gallensäuren oder Milchzucker im Harn, welche, wenn auch nur in kleiner Menge vorhanden, gleichfalls durch basisches Bleiacetat und Ammoniak gefällt werden und nach rechts drehen. Man schützt sich vor dieser Fehlerquelle, indem man die alkoholische Lösung nach der Polarisierung durch Eindampfen vom Alkohol befreit, etwas Wasser zusetzt, zum Kochen erhitzt, Hefe zufügt, nach 6stündigem Stehen bei 34—36° filtriert, mit Alkohol nachwäscht, auf das ursprüngliche Volumen einengt und wieder polarisiert. Eine jetzt noch vorhandene Rechtsdrehung ist auf andere Stoffe (Gallensäuren, Milchzucker) zu beziehen.

**599. Bestimmung durch Titration.** Alle auf Reduktion beruhenden titrimetrischen Methoden müssen den Zuckergehalt etwas zu hoch erscheinen lassen, da der Harn noch andere reduzierende Stoffe (z. B. Harnsäure, Kreatinin) enthält. Je mehr Zucker und je weniger von den anderen reduzierenden Stoffen der Harn enthält, um so geringer wird der Fehler sein. Abwesenheit von Milchzucker, Fruchtzucker, Pentosen ist natürlich Voraussetzung. Etwa vorhandenes Eiweiß ist zu entfernen.

Die Titration mit Fehlingscher Lösung ist bei geringem Zuckergehalt in der Regel direkt im Harn nicht ausführbar, die anderen angegebenen Methoden sind in der Beziehung leistungsfähiger.

#### a) Mit Fehlingscher Lösung.

Prinzip. Die Methode beruht auf der Trommerschen Probe (§ 97).

Herstellung der Fehlingschen Lösung. Man löst 34,639 g reines krystallisiertes Kupfersulfat in Wasser auf und verdünnt die Lösung zu 500 ccm; man löst ferner 173 g krystallisiertes, völlig reines weinsaures Kali-Natron in wenig Wasser, fügt 100 ccm Natronlauge, welche 50 g Ätznatron enthält, hinzu und verdünnt gleichfalls zu 500 ccm. Zu jedesmaligem Gebrauch mischt man gleiche Volumina beider Lösungen. Die fertige Fehlingsche Lösung hält sich, auch beim Aufbewahren im Dunkeln, nicht lange; sie ist zu verwerfen, wenn eine kleine im Reagensglas gekochte Probe während etwa 1stündigen Stehens einen Niederschlag von Kupferoxydul abscheidet.

20 ccm der Fehlingschen Lösung entsprechen 0,1 g Traubenzucker.

Ausführung. Man bringt 20 ccm der Fehlingschen Lösung, mit einer Pipette oder Bürette abgemessen, in eine Porzellanschale und fügt 80 ccm Wasser hinzu. Ferner läßt man von dem (evtl. nach § 567 von Eiweiß befreiten) Harn, dessen Zuckergehalt bestimmt werden soll, 10 ccm in einen Maßkolben von 100 ccm fließen, fügt Wasser bis zur Marke hinzu (ist der Harn nur in geringem Grade zuckerhaltig, so verdünnt man wenig oder gar nicht), mischt gut und füllt mit der Mischung eine Bürette. Man erhitzt nun die verdünnte Kupferlösung zum beginnenden Kochen, gibt zunächst etwa 5 ccm von dem verdünnten Harn hinzu, läßt ein paar Sekunden kochen und beobachtet, ob die Flüssigkeit noch blau bleibt, fügt, wenn dies der Fall ist, weitere 5 ccm des verdünnten Harns hinzu, kocht, fügt wieder 5 ccm Harn hinzu usw., bis die Flüssigkeit über dem entstandenen roten Niederschlag von Kupferoxydul farblos, aber noch nicht gelb (Einwirkung der Natronlauge auf überschüssigen Zucker bei fehlendem Kupferoxydul) geworden ist. Man liest dann ab, wieviel von dem verdünnten Harn verbraucht ist.

Um die Endreaktion, d. h. die völlige Entfärbung, gut zu erkennen, empfiehlt es sich, die Schale etwas zu neigen und nun die Flüssigkeit gegen den weißen Untergrund der Schale zu betrachten. Kommt man so nicht schnell zu einem sicheren Urteil (längeres Warten ist unzulässig, da das Kupferoxydul durch den Sauerstoff der Luft allmählich wieder zu Kupferoxydul wird), so filtriert man schnell eine Probe der Flüssigkeit durch ein kleines Filter in ein Reagensglas,

Titration mit  
Fehlingscher  
Lösung.

hält dieses neben einem anderen Wasser enthaltenden Reagensglas vor ein weißes Papier und betrachtet beide im auffallenden Licht. Erscheint dabei das Filtrat noch blau gefärbt, so gießt man es in die Schale zurück und fährt mit der Titrierung fort. Es ist zweckmäßig, mehrere kleine Filterchen und Reagensgläser bereitzuhalten, um nach weiterem Harnzusatz und Kochen wiederholt zu prüfen (für jede Filtration ein neues Filter!); zeigt die filtrierte Probe Gelbfärbung, so ist bereits zuviel Harn zugesetzt. Bei einer Wiederholung der Titrierung läßt sich das Ende genauer feststellen, da jetzt die Grenzen des Zuviel und Zuwenig annähernd bekannt sind. Es empfiehlt sich, durch eine dritte Titrierung das Resultat der zweiten zu kontrollieren. Die früher empfohlenen Endproben mit Salzsäure und Ferrocyankalium, Prüfung mit Fehlingscher Lösung usw. sind für den Harn zu verwerfen.

Das Flüssigkeitsvolumen soll während der ganzen Titration annähernd dasselbe bleiben. Es ist deshalb zweckmäßig, sobald die Schale warm geworden ist, das Drahtnetz zu entfernen, damit die Flüssigkeit schneller ins Kochen kommt, und ferner den Brenner vorübergehend zu entfernen, sobald nach einem neuen Zusatz aus der Bürette die Flüssigkeit einige Sekunden gekocht hat. Da die Beurteilung der Farbe um so leichter gelingt, je besser das Kupferoxydul sich absetzt, so ist ein Umrühren mit dem Glasstab zu unterlassen.

Berechnung. Da 20 ccm Fehlingscher Lösung 0,1 g Traubenzucker entsprechen, so enthalten die bis zum Eintritt der Endreaktion verbrauchten Kubikzentimeter Flüssigkeit 0,1 g Traubenzucker. Die Berechnung des Prozentgehaltes unter Berücksichtigung der Verdünnung des Harns ist einfach.

Diese schnell auszuführende Methode, welche für klinische Zwecke vollständig ausreicht, kann ganz genaue Resultate nicht geben, da die der Berechnung zugrunde liegende Annahme, daß 1 Äquival. Glucose 10 Äquival. Kupferoxyd reduziere, bei Innehaltung der oben gegebenen Vorschriften nicht richtig ist<sup>1)</sup>. Das Reduktionsvermögen der Glucose ist verschieden, je nach der Konzentration der Zuckerlösung und je nach dem Verdünnungsgrad der Fehlingschen Lösung. Nach Soxhlet reduzieren 50 ccm unverdünnter Fehlingscher Flüssigkeit 23,75 ccm einer 1 proz. Glucoselösung während 2 Minuten dauernden Kochens, aber auch nur dann genau, wenn die Zuckerlösung nicht nach und nach, sondern mit einem Male zugesetzt wird. Hieraus ergibt sich folgende Vorschrift für die Ausführung einer genauen Titration:

Genauere Titration  
mit Fehlingscher  
Lösung.

50 ccm der Fehlingschen Lösung werden in einem Kolben zum Kochen erhitzt. Von dem unverdünnten Zuckerharn wird portionsweise so lange zugesetzt, bis die Flüssigkeit nach dem Kochen nicht mehr blau erscheint. Durch diese Vorprobe stellt man den Zuckergehalt der Lösung annähernd — etwa auf 10% der Gesamtmenge — fest. Man verdünnt nun den Harn so weit, daß er 1% Zucker enthält. Die wahre Konzentration wird dann 0,9—1,1% sein. Diese geringe Abweichung von der gewünschten hat auf das Resultat keinen Einfluß. Man erhitzt nun neuerdings 50 ccm Fehlingscher Lösung, ohne dieselbe mit Wasser zu verdünnen, in einem Kolben mit einer dem vorhergehenden Versuch entsprechenden Menge des verdünnten Zuckerharns 2 Minuten lang und sieht (evtl. nach dem Filtrieren), welche Farbe die Flüssigkeit hat. Ist sie blau, so nimmt man zu einem neuen Versuch 1 ccm von der Zuckerharnlösung mehr; ist sie gelb, so nimmt man 1 ccm weniger. In der Anstellung solcher Versuche fährt man so lange fort, bis 2 Versuche, in welchen nur um 0,1 ccm verschiedene Mengen Harnlösung angewendet wurden, Filtrate ergeben, von denen das eine bläulich, das andere gelblich befunden wird. Die zwischen diesen beiden Mengen liegende Quantität ist gerade nötig zur Reduktion von 50 ccm Fehlingscher Flüssigkeit, enthält also 0,2375 g Glucose. Unter Berücksichtigung der Verdünnung läßt sich leicht der Prozentgehalt des Harns an Zucker berechnen.

Titration mit  
Fehlingscher  
Lösung bei sehr  
geringem Zucker-  
gehalt.

Ausführung bei sehr geringem Zuckergehalt. Man verfährt zunächst wie in § 598 angegeben, verdunstet dann das alkoholische Filtrat des Schwefelbleiniederschlags auf dem Wasserbade bei schwach essigsaurer Reaktion zum Sirup, löst den Rückstand in Wasser, mißt das Volumen der Lösung und gießt sie in eine Bürette. Andererseits verdünnt man 10 ccm Fehlingscher Lösung mit 40 ccm Wasser, bringt von dieser Mischung 5 oder 10 ccm genau abgemessen in eine Schale oder einen Kolben und titriert, wie oben angegeben, bis zur völligen Entfärbung.

<sup>1)</sup> Soxhlet: Journ. f. prakt. Chem., N. F., Bd. 21, S. 227, 289. 1880.



Ein Verfahren zur Bestimmung kleinster Zuckermengen im Harn, welches auf Entfernung der stickstoffhaltigen Substanzen durch Fällung mit Mercurinitrat beruht, ist von Schönorff<sup>1)</sup> angegeben worden.

b) Nach Bertrand. Über dieses Verfahren, welches unter Benutzung von 20 ccm eiweißfreiem Harn, der nicht mehr als 0,1 g Zucker enthalten darf, ausgeführt wird, s. § 653. Es ist sehr gut. Titration nach Bertrand.

c) Nach Pavy. Dieses Verfahren in der von Kumagawa und Suto<sup>2)</sup> vorgeschlagenen Form ist sehr zu empfehlen und bei Harnen mit geringem Zuckergehalt dem Fehlingschen vorzuziehen, da es auch in diesen Fällen, in denen es bei der Titration nach Fehling oft zu keiner ordentlichen Abscheidung des Kupferoxyduls kommt, ein gutes Erkennen der Endreaktion gestattet. Titration nach Pavy.

**Prinzip.** Die Methode beruht ebenfalls auf der Trommerschen Probe. Ein Zusatz von Ammoniak zur Fehlingschen Flüssigkeit hält aber das gebildete Kupferoxydul dauernd in Lösung, so daß die Beurteilung der Endreaktion (Verschwinden der blauen Farbe) nicht gestört wird.

**Lösungen und Apparat.** 1. Eine Kupfersulfatlösung, welche in 1 l 4,278 g kristallisiertes Kupfersulfat enthält. 20 ccm dieser Lösung entsprechen 0,01 g wasserfreiem Traubenzucker.

2. Eine Lösung, welche in 1 l 21 g Seignettesalz, 21 g Ätzkali und 300 ccm konzentriertes Ammoniak (spez. Gew. 0,880) enthält.

3. Der in Abb. 29 dargestellte Apparat. Der Erlenmeyerkolben enthält etwa 50 ccm konzentrierte Schwefelsäure, 100 ccm Wasser und 1—2 ccm 10proz. Kupfersulfatlösung. Die Schwefelsäure soll das aus dem Titrationskolben entweichende Ammoniak festhalten, das Kupfersulfat durch den Farbenumschlag anzeigen, wenn die Schwefelsäure neutralisiert ist. Die Menge Schwefelsäure reicht für etwa 30 Bestimmungen aus. Das in die Flüssigkeit eintauchende Glasrohr ist unten mit einem Glasventil versehen, welches das Zurücktreten der Flüssigkeit in den Titrationskolben verhindert. Der Brenner, ein Mikrobrenner, ist mit seiner Öffnung  $1\frac{1}{2}$  ccm von dem Boden des Kolbens entfernt und mit einer Kappe aus grobmaschigem Drahtnetz versehen, um ein Zurückschlagen zu verhindern.

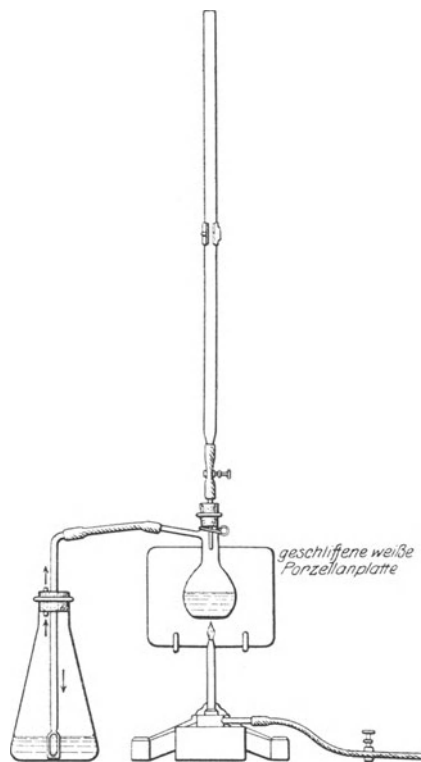


Abb. 29. Apparat zur Zuckerbestimmung nach Pavy.

**Ausführung.** In den Kolben bringt man je 20 ccm der beiden Lösungen, in die Bürette den durch Verdünnen mit Wasser auf etwa 0,2% Zuckergehalt gebrachten Harn\*). Man erhitzt jetzt, kocht einige Sekunden mit der vollen Flamme des Brenners, bis in der Schwefelsäure keine Blasen mehr aufsteigen, und erhält nun mit ganz kleiner (etwa bohngroßer) Flamme die Flüssigkeit in fortwährendem schwachen Sieden. Nun läßt man aus der Bürette den Zuckerharn zufließen, und zwar 2—3 ccm in der Minute, bis die blaue Farbe fast verschwindet, wartet etwa 2 Minuten, läßt 0,05—0,1 ccm zulaufen, wartet wieder 2 Minuten und so fort, bis eine grünliche Farbe eben verschwindet. Entfärbung bildet die Endreaktion, ein gelblicher Farbenton zeigt an, daß zu viel

\*) Die dazu nötige Wassermenge ermittelt man durch vorangehende orientierende Titrations mit dem unverdünnten oder mit gemessener Wassermenge verdünnten Harn. Bei einem Zuckergehalt von nur etwa 1% verdünnt man mit der 5—10fachen Menge Wasser. Bei noch geringerem Zuckergehalt ist es zweckmäßig, den Harn zunächst mit Bleiacetat zu entfärben.

<sup>1)</sup> Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 121, S. 602. 1908.

<sup>2)</sup> Salkowski-Festschrift. Berlin: Hirschwald 1904. S. 211. — Kinoshita: Biochem. Zeitschr. Bd. 9, S. 208. 1908.

Zuckerharn eingebracht ist. Eine rötlichgelbe Farbe, schon vor der Endreaktion, bedingt durch sich abscheidendes Kupferoxydul, tritt nur dann ein, wenn durch fehlerhaftes zu starkes Kochen zuviel Ammoniak entwichen ist. Bei Benutzung der vorgeschriebenen kleinen Flamme kann das Kochen ohne Befürchtung einer Kupferoxydulausscheidung bis zu 30 Minuten fortgesetzt werden.

Berechnung. 20 ccm der Kupferlösung entsprechen 0,01 g Traubenzucker. Bei der Berechnung des Prozentgehaltes ist natürlich die Verdünnung zu berücksichtigen.

Titration nach  
Bang.

d) Nach Bang<sup>1)</sup>.

Prinzip. Das durch Reduktion einer alkalischen Kupfersulfatlösung gebildete Kupferoxydul wird durch eine größere Menge Kaliumchlorid in Lösung erhalten und die Menge des Oxyduls durch Titration mit einer  $\frac{n}{25}$ -Jodlösung bestimmt. Reaktionsgleichung:  $\text{CuCl} + \text{KCl} + \text{I} = \text{CuCl}_2 + \text{KI}$ .

Erforderliche Lösungen. 1. In einem 2-l-Kolben werden in 1 l Wasser 2,65 g Kupfersulfat ( $\text{CuSO}_4 + 5 \text{H}_2\text{O}$ ) und 100 g  $\text{KHCO}_3$  gelöst. Hierzu setzt man 60 g  $\text{K}_2\text{CO}_3$  und 450 g KCl. Auffüllen bis zur Marke.

2.  $\frac{n}{25}$ -Jodlösung. Sie wird im Prinzip genau so bereitet wie die  $\frac{n}{100}$ -Jodlösung zur Bangschen Mikro Zuckerbestimmung (vgl. § 705). 3. Stärkelösung.

Ausführung. 55 ccm der Kupfersalzlösung bringt man in einen 100-ccm-Jenaer-Kolben, dessen Rand abgesprengt ist, damit ein etwa 5 cm langer Gummischlauch über denselben gezogen werden kann. Hierzu setzt man 2 ccm Harn, der nicht über 1% Zucker enthalten darf, und erwärmt auf dem Drahtnetz bis zum Sieden. Hierzu sollen etwa  $3\frac{1}{2}$  Minuten nötig sein. Sobald die Flüssigkeit genau 3 Minuten gekocht hat, greift man mit einer eigens dazu konstruierten Klemmzange über den Kolbenhals und den Gummischlauch, kneift diesen zu und kühlt sofort unter dem Wasserhahn ab. Nach der Abkühlung des Kolbens wird der Gummischlauch entfernt, 8 bis 10 Tropfen Stärkelösung und dann so viel Jodlösung zugesetzt, bis die Farbe in Tiefultramarinblau umschlägt. Die Flüssigkeit darf nicht geschüttelt, sondern nur leise umgerührt werden.

Ein dunkelgefärbter Harn muß unbedingt entfärbt werden, und da minimale Zuckermengen noch genauer als größere bestimmt werden können, so soll der diabetische Harn stets vorher 1 : 10 verdünnt werden. Zur Berechnung der Zuckermengen dient folgende Tabelle:

mg Zucker	ccm $\frac{n}{25}$ -Jodlösung	mg Zucker	ccm $\frac{n}{25}$ -Jodlösung
1	0,73	6	4,15
2	1,45	7	4,85
3	2,20	8	5,50
4	2,95	9	6,20
5	3,65	10	6,93

Titration nach  
Knapp.

e) Nach Knapp<sup>2)</sup>.

Prinzip. Die Methode beruht darauf, daß Cyanquecksilber in alkalischer Lösung durch Traubenzucker reduziert wird.

Herstellung der Knappschen Lösung. Man löst 10 g trockenes Cyanquecksilber in Wasser, fügt 100 ccm Natronlauge (1,145 spez. Gew.) hinzu und füllt mit Wasser auf 1 l auf. Unter den unten beschriebenen Bedingungen entsprechen 40 ccm dieser Lösung 0,1 g Traubenzucker.

Ausführung. Man mißt 40 ccm der Lösung in eine Porzellanschale, fügt das 3—4fache Volumen Wasser hinzu, erhitzt zum Sieden und läßt den eiweißfreien (§ 567) und in der unter a) angegebenen Weise verdünnten Harn aus einer Bürette sehr langsam, und indem man immer wieder zum Kochen erhitzt, zufließen bis zur Endreaktion. Diese besteht darin, daß ein Stückchen

<sup>1)</sup> Lehrbuch der Harnanalyse. Wiesbaden 1918.

<sup>2)</sup> Ann. d. Chem. Bd. 154, S. 252. 1870. — Worm - Müller: Journ. f. prakt. Chem. N. F. Bd. 26, S. 78, 87. 1882.

Filtrierpapier, auf das man mit einer Capillare einen kleinen Tropfen der Flüssigkeit gebracht hat, sich eben nicht mehr gelblich färbt, wenn man es zuerst über rauchende Salzsäure und dann über starkes Schwefelwasserstoffwasser hält. Die Berechnung ist einfach.

Nach Hoppe-Seylers Versuchen mit menschlichem Harn ist diese Titrierung weniger genau als die mit Fehlingscher Lösung. Auch Salkowski empfiehlt diese Methode nicht.

600. **Bestimmung durch Gärung.** a) Durch volumetrische Messung der Kohlensäure. Unter den für diesen Zweck empfohlenen Gärungssaccharimetern ist besonders der Lohnsteinsche Apparat<sup>1)</sup> in der verbesserten Form von Wagner<sup>2)</sup>, das sog. Gärungssaccharomanometer, zu nennen.

Bestimmung durch volumetrische Messung der Kohlensäure.

b) Durch die Abnahme des spezifischen Gewichts nach Roberts<sup>3)</sup>. Zur Bestimmung dienen sehr genaue Aräometer (4 Dezimalstellen), z. B. das von Lohnstein angegebene. Man kocht den eiweißfreien Harn einige Minuten, fügt, falls die Reaktion nicht sauer ist, Weinsäure bis zur schwach sauren Reaktion hinzu, kocht in diesem Falle nochmals auf, um Kohlensäure zu entfernen, zerreibt ihn nach Abkühlung auf Zimmertemperatur mit 10% reiner Hefe und mißt das spezifische Gewicht. Nach 6stündigem Stehen in einem mit Wattebausch verschlossenen Gefäß bei 34—36° ist nach Victorow<sup>4)</sup> die Gärung beendet. Jetzt bringt man die zu Boden gesunkene Hefe wieder in Suspension und mißt abermals das spezifische Gewicht bei annähernd derselben Temperatur, bei der die erste Bestimmung geschah. Die Differenz der spezifischen Gewichte multipliziert mit dem Faktor 234 gibt den Zuckergehalt des Harns in Prozenten an. Die Reaktion muß auch nach Beendigung der Gärung sauer sein. Ist sie alkalisch, so ist die Bestimmung unbrauchbar.

Bestimmung durch Abnahme des spezifischen Gewichts.

c) Durch Bestimmung der Kohlensäure als Gewichtsverlust. Hierfür eignet sich der von Will und Fresenius zur Kohlensäurebestimmung empfohlene, in Abb. 30 abgebildete Apparat. Die beiden Kolben müssen möglichst klein und leicht sein. Man bringt in den Kolben C, welcher gut gereinigt sein muß, mit einer Pipette 20 ccm frischen eiweißfreien (vorher einige Minuten gekochten und nach dem Abkühlen wieder auf das ursprüngliche Volumen gebrachten) Harn, fügt, falls er nicht sauer reagiert, Weinsäure bis zur schwach sauren Reaktion hinzu (kocht in diesem Fall nochmals auf, um Kohlensäure zu entfernen) und darauf nach dem Abkühlen etwa 10% frische, mit Wasser geschlemmte Hefe, in den Kolben D konzentrierte Schwefelsäure, setzt dann die Stopfen auf beide Kolben luftdicht auf, verschließt auch die Öffnung des Röhrchens a mit einem Stöpfchen b und wägt nun den ganzen so gefüllten Apparat. Nach kurzer Zeit wird sich beim Stehen bei gewöhnlicher Temperatur der Eintritt der Gärung dadurch bemerklich machen, daß einzelne Luftbläschen in dem Kolben C an die Oberfläche der Flüssigkeit steigen, dann werden auch größere Luftblasen bald durch die Schwefelsäure im Kolben D streichen; diese Entwicklung wird immer stürmischer im Verlaufe einiger Stunden, nach Victorow ist die Gärung bei 34—36° nach 6 Stunden beendet. Das Ende der Gärung erkennt man daran, daß die Flüssigkeit über der sich zu Boden setzenden Hefe klar wird und daß keine Gasblasen mehr entweichen. Man saugt dann, nachdem das Stöpfchen b entfernt ist, am Röhrchen d solange Luft durch den Apparat, bis man sicher ist, daß alle Kohlensäure, die sich noch in dem Kolben befand, durch atmosphärische Luft ausgetrieben ist, setzt das Stöpfchen b wieder auf und wägt den Apparat abermals. Zum Schluß ist der Harn auf seine Reaktion zu prüfen. Reagiert er alkalisch, so ist die Bestimmung unbrauchbar. Durch Subtraktion des gefundenen Gewichts von dem des Apparats vor der Gärung erhält man das Gewicht der entwichenen Kohlensäure, und dies multipliziert mit 2,046 gibt das Gewicht des in 20 ccm Harn enthaltenen Zuckers.

Bestimmung der Kohlensäure als Gewichtsverlust.

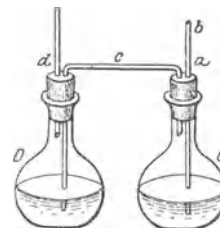


Abb. 30. Apparat zur Bestimmung des Zuckers durch Gärung.

**Bestimmung kleiner Zuckermengen.** Bei kleinen Zuckermengen (unter 0,5%) kombiniert man am besten eins der Reduktionsverfahren mit der

Bestimmung kleiner Zuckermengen durch ein kombiniertes Verfahren.

<sup>1)</sup> Allg. med. Zentral-Zeit. 1899, Nr. 101.

<sup>2)</sup> Münch. med. Wochenschr. 1905, S. 2327.

<sup>3)</sup> Edinburgh med. journ. 1861. — Lohnstein: Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 59, S. 479. 1895; Bd. 62, S. 82. 1896.

<sup>4)</sup> Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 118, S. 583. 1907.

Vergärung aus folgendem Grunde: Einerseits werden kleine Mengen gebildeter  $\text{CO}_2$  von der Flüssigkeit unter Umständen vollkommen absorbiert (Salkowski<sup>1</sup>), andererseits reduziert schon der normale, zuckerfreie Harn in geringem Maße.

Der wahre Zuckergehalt eines Harnes läßt sich in derartigen Fällen leicht aus der Differenz der Reduktionsfähigkeit vor und nach totaler Vergärung bestimmen. (Milchzucker und Pentosen, die nicht vergären, spielen hier keine Rolle. Nur Lävulose verhält sich in bezug auf Reduktion und Gärfähigkeit wie Glucose und ist deshalb gesondert nachzuweisen.)

Mikromethode. Eine Mikromethode zur Bestimmung des Zuckers im Harn hat Schöndorff<sup>2</sup>) angegeben.

Colorimetrische Methoden. 601. Bestimmung durch Colorimetrie. Über die Versuche von Autenrieth und Tesdorpf<sup>3</sup>) und neuerdings von Benedict und Osterberg<sup>4</sup>) sowie Summer und Graham<sup>5</sup>), die colorimetrische Bestimmung anzuwenden, s. die Originalarbeiten.

#### *Nachweis des Fruchtzuckers im Harn.*

602. Linksdrehung des Harns und Reduktionsvermögen, welche beide bei der Vergärung verschwinden, und positiver Ausfall der Probe von Seliwanoff (s. unten) lassen auf Fructosurie schließen. Sind die Polarisationswerte kleiner als die Titrationswerte und ist der Harn nach völliger Vergärung inaktiv, so wird man an gleichzeitige Anwesenheit von Frucht- und Traubenzucker denken müssen, welche natürlich auch dann nicht ausgeschlossen ist, wenn der Harn nach der Vergärung Linksdrehung zeigt, da diese z. B. von  $\beta$ -Oxybuttersäure herrühren kann. Zur Erkennung von Fruchtzucker neben Traubenzucker soll die Reaktion von Seliwanoff dienen, welche an ganz frischem und sauer entleertem Harn\*) nach Borchardt<sup>6</sup>) am besten in folgender Weise auszuführen ist:

Reaktion von Seliwanoff-Borchardt. Einige Kubikzentimeter Harn werden im Reagensglas mit der gleichen Menge 25proz. Salzsäure und einigen Körnchen Resorcin einmal kurz aufgeköcht. Tritt Rotfärbung ein, so kühlt man unter der Wasserleitung, gießt die Flüssigkeit in eine Schale oder ein Becherglas, macht mit Soda in Substanz alkalisch, gießt in das Reagensglas zurück und schüttelt mit Essigäther aus. Bei Anwesenheit von Fruchtzucker färbt sich der Essigäther gelb. Da bei gleichzeitiger Anwesenheit von Nitriten und Indican die Reaktion auch bei fehlendem Fruchtzucker positiv ausfällt, so muß man vor Anstellung der Probe etwa vorhandene salpetrige Säure durch Kochen (1 Minute lang) des mit Essigsäure angesäuerten Harns entfernen. Bei sehr reichlichem Indicangehalt geht zuweilen ein blauer Farbstoff in den Essigäther über, welcher die gelbe Farbe verdeckt. In diesem Falle entfernt man das Indican, indem man eine Mischung gleicher Teile von Harn und Obermayerschem Reagens (S. 721) mehrmals mit Chloroform ausschüttelt. Nach Abgießen des Chloroforms fügt man  $\frac{1}{3}$  Vol. Wasser hinzu, dann einige Körnchen Resorcin und verfährt weiter, wie oben angegeben.

Nach Ofner<sup>7</sup>) soll die Flüssigkeit nicht mehr als 12% HCl enthalten und nicht länger als 20 Sekunden kochen. Die Reaktion beruht auf der Bildung von Oxymethylfurfurol und fällt schließlich bei allen Hexosen positiv aus, jedoch reagieren die Ketosen viel leichter als die Aldosen (van Ekenstein und Blanksma<sup>8</sup>).

Anwesenheit von Urorosein stört ebenfalls, indem ein rotvioletter Farbstoff in den Essigäther übergeht, welcher das Erkennen der gelben Farbe hindert.

\*) Bei alkalischer Reaktion besteht die Gefahr einer Umwandlung von Traubenzucker in Fruchtzucker.

<sup>1</sup>) Berl. klin. Wochenschr. Bd. 42, Ewald-Festnummer S. 48, 1905.

<sup>2</sup>) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 121, S. 572. 1908.

<sup>3</sup>) Münch. med. Wochenschr. Bd. 37, S. 34, 1890.

<sup>4</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 34, S. 195. 1918. <sup>5</sup>) desgl. Bd. 47, S. 5. 1921.

<sup>6</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 55, S. 241. 1908; Bd. 60, S. 411. 1909.

<sup>7</sup>) Monatshefte f. Chem. Bd. 25, S. 611. 1904.

<sup>8</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 43, 2, S. 2358. 1910.

Malfatti<sup>1)</sup> empfiehlt zur Entfernung störender Farbstoffe Zusatz von Permanganat: Der Harn wird mit einigen Tropfen konzentrierter HCl angesäuert, tropfenweise mit starker Permanganatlösung versetzt, bis die auftretende Färbung nur mehr sehr langsam verschwindet.

Die Beweiskraft der Probe von Seliwanoff ist indessen von verschiedenen Seiten (Voit<sup>1)</sup>, Malfatti<sup>2)</sup> in Zweifel gezogen worden. Einen sicheren Nachweis erbringt die Darstellung des Methylphenylosazons (§ 106), die nach Neuberg und Strauß<sup>3)</sup> so geschieht:

Nachweis durch Darstellung des Methylphenylosazons

Der frische und sauer entleerte Harn wird evtl. nach Zusatz von ein wenig Essigsäure (und Entfernung von vorhandenem Eiweiß durch Aufkochen) im Vakuum bei unter 40° zum dünnen Sirup eingengt und mit halb so viel Alkohol von 98%, als das ursprüngliche Volumen betrug, auf dem Wasserbade etwa 5 Minuten aufgekocht. Das alkoholische, durch Knochenkohle entfärbte Filtrat wird (nachdem man in einer Probe durch Titration den Gehalt an reduzierender Substanz [als Fruchtzucker betrachtet] festgestellt hat) auf etwa 30 ccm eingedampft. Man fügt die berechnete Menge Methylphenylhydrazin (auf 1 Mol. Zucker 3 Mol.) hinzu, und (nach mehrstündigem Stehen in der Kälte und Filtration, falls sich ein Niederschlag gebildet hat) die dem angewendeten Phenylhydrazin gleiche Gewichtsmenge 50proz. Essigsäure und evtl. noch so viel Alkohol, daß eine klare Lösung entsteht. Diese wird drei Minuten auf kochendem Wasserbade erhitzt. Bei größeren Mengen von Fruchtzucker scheidet sich das Osazon direkt krystallinisch aus, evtl. nach Zusatz einiger Tropfen Wasser; bei geringeren Mengen entsteht zuerst ein Öl, das bei öfterem Reiben oder nach Impfung fest wird. Am besten ist starke Abkühlung durch ein Gemisch fester Kohlensäure und Äther.

#### *Nachweis des Milchzuckers im Harn.*

603. Ein milchzuckerhaltiger Harn verhält sich der Trommerschen und Boettgerschen Probe (§ 97) gegenüber wie ein traubenzuckerhaltiger und zeigt ebenfalls Rechtsdrehung. Zur Unterscheidung des Milchzuckers von Traubenzucker kann man nach Malfatti<sup>4)</sup> die Reaktion von Wöhlk<sup>5)</sup> (§ 108) anwenden: Man erwärmt 5 ccm Harn mit 2—5 ccm konzentriertem Ammoniak und 5 Tropfen Kalilauge im heißen, aber nicht siedenden Wasserbade. Nach 5 Minuten oder später Rotfärbung. Ferner verschwindet in einem Harn, welcher Milchzucker enthält, das Reduktionsvermögen nicht durch gewöhnliche Bierhefe. Es ist indessen nötig, für diesen Zweck eine Reinkultur von Hefe zu verwenden und den Harn vorher zu sterilisieren, damit nicht andere Mikroorganismen den Milchzucker zerstören. Man kann auch den Nachweis mit Hilfe des Osazons (S. 126) führen (Langstein und Steinitz<sup>6)</sup>, oder durch Überführung des Milchzuckers in Schleimsäure durch Salpetersäure (S. 127) (Bauer<sup>7)</sup>, Langstein und Steinitz<sup>6)</sup>. Im letzteren Falle muß man sich vor einer Verwechslung mit Galaktose hüten, welche im Harn von schwer magenkranken Säuglingen neben Milchzucker vorkommen kann.

Eine ganz sichere Feststellung des Milchzuckers im Harn gibt wohl nur seine Isolierung, welche nach Hofmeister<sup>8)</sup> geschieht.

#### *Nachweis der Pentosen im Harn.*

604. Ein Harn, welcher Pentose enthält, gibt die Trommersche und Boettgersche Probe (§ 97). Er gärt nicht und ist inaktiv, in anderen Fällen zeigte er nach dem Einengen Rechtsdrehung.

Zum Nachweis dient die Orcin-Salzsäurereaktion (§ 100), und zwar in einer der folgenden Ausführungen, von denen die von Bial und von Jolles angegebenen die größere Sicherheit vor Verwechslung mit gepaarter Glucuronsäure bieten.

Durch gleichzeitige Anwesenheit von Traubenzucker wird die Orcin-Salzsäurereaktion nur unerheblich gestört (Salkowski<sup>9)</sup>). Eine Entfernung des Traubenzuckers durch Hefegärung (wenigstens durch gewöhnliche

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 58, S. 122. 1908/09; Bd. 61, S. 92. 1909.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 58, S. 544. 1908/09.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 36, S. 227. 1902. — Neuberg: desgl. Bd. 45, S. 500. 1905.

<sup>4)</sup> Centrabl. f. Harn- und Sexualorgane Bd. 16, S. 68. 1905.

<sup>5)</sup> Zeitschr. f. analyt. Chem. Bd. 43, S. 676. 1904.

<sup>6)</sup> Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 7, S. 575. 1906.

<sup>7)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 51, S. 158. 1907.

<sup>8)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 1, S. 105. 1877/78. <sup>9)</sup> desgl. Bd. 27, S. 523. 1899.

nicht ganz reine Hefe) ist insofern unzweckmäßig, als hierbei wenigstens kleine Mengen der Pentose (offenbar durch der Hefe beigemengte Bakterien) verschwinden können. Bei Anwesenheit von Traubenzucker empfiehlt sich die Probe von Jolles.

a) Beim Erhitzen von etwa 5 ccm Harn mit dem gleichen Volumen konzentrierter Salzsäure und etwas Orcin tritt, nachdem vielleicht vorübergehend rötlichblaue Färbung aufgetreten ist, bald grünliche Färbung ein. Kühlt man nun, sobald beim Erhitzen Trübung eingetreten ist, bis zur Lauwärme ab und schüttelt alsbald gelinde mit Amylalkohol, so nimmt dieser eine gesättigte grüne Farbe an und zeigt den Spektralstreifen zwischen *C* und *D* nahe an *D*.

Nachweis nach Bial. b) Nach Bial<sup>1)</sup>. Man benutzt ein Reagens, welches aus 500 ccm 30proz. Salzsäure, 1 g Orcin und 25 Tropfen Liquor ferri sesquichlorati besteht und in dunkler Flasche aufzubewahren ist. Von diesem Reagens erhitzt man 4—5 ccm zum Sieden und läßt nach Entfernen der Flamme einige Tropfen, höchstens 1 ccm Harn zufließen. Es tritt sofort oder sehr rasch Grünfärbung auf.

Eine von A. Neumann<sup>2)</sup> angegebene Modifikation der Orcinprobe gestattet ebenfalls eine gute Unterscheidung der Pentose (Arabinose) von Traubenzucker und Glucuronsäure. Man führt sie in folgender Weise aus: 10 Tropfen der Lösung werden in einem Reagensglas mit 5 ccm 99proz. Eisessig und einigen Tropfen einer 5proz. alkoholischen Orcinlösung versetzt und nach Umschütteln bis zum völligen Sieden erhitzt. Während das Reagensglas im Halter gehalten wird, setzt man dann tropfenweise unter Umschütteln konzentrierte Schwefelsäure zu: es tritt Rotviolett färbung auf sowie im Spektrum ein Streifen violettwärts von *D*, welcher Gelb und Gelbgrün bedeckt. Die Färbung ändert sich nicht bei nachträglichem Wasserzusatz. S. dazu auch Sachs<sup>3)</sup>.

Nachweis nach Jolles. c) Nach A. Jolles<sup>4)</sup> (bei Glucosegehalt des Harnes). Bei Harnen mit bis zu 5% Glucosegehalt werden 100 ccm mit 4 g salzsaurem Phenylhydrazin und 8 g Natriumacetat 1 Stunde im siedenden Wasserbad erwärmt. Nach dem Abkühlen wird filtriert, der Niederschlag mit 15 ccm heißem Wasser versetzt, 5 Minuten in ein siedendes Wasserbad gesetzt, rasch filtriert und unter Zusatz von 6 ccm HCl (spez. Gew. 1,19) etwa 6 ccm überdestilliert. 3 ccm des Destillats geben mit 5 ccm des Bialschen Reagens kurze Zeit gekocht bei Gegenwart von nur 0,05% Pentosen noch sehr deutlich Grünfärbung.

Die Phloroglucin-Salzsäurereaktion (§ 100) ist zum Nachweis der Harnpentose ungeeignet, da auch gepaarte Glucuronsäuren sie geben. Zur Unterscheidung von Pentosen und Glucuronsäuren ist auch die Tollenssche Reaktion (S. 137) geeignet, welche von den Pentosen nicht gegeben wird. Man kann diese Reaktion auch auf das vorher isolierte Osazon anwenden (s. Neuberg<sup>5)</sup>). Nach Bernier<sup>6)</sup> kann Indoxyl, das störend wirkt, vorher durch Mercuriacetat entfernt werden.

Quantitative Bestimmung der Arabinose. Über eine quantitative Bestimmung der Arabinose, welche auf ihrer Abscheidung als Diphenylhydrazon beruht, s. Neuberg und Wohlgemuth<sup>7)</sup>.

#### *Nachweis und Bestimmung der gepaarten Glucuronsäuren im Harn.*

Nachweis nach Neuberg u. Schewket. 605. 1) Nach Neuberg und Schewket<sup>8)</sup>. Man versetzt in einem Scheidetrichter etwa 10 ccm Harn mit etwa 2 ccm verdünnter Schwefelsäure, 10 ccm Alkohol und 20 ccm Äther und schüttelt kräftig durch. Nach Trennung der

<sup>1)</sup> Dtsch. med. Wochenschr. 1903, S. 477.    <sup>2)</sup> Berl. klin. Wochenschr. 1904, S. 1073.

<sup>3)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 1, S. 393. 1906.

<sup>4)</sup> Zentralbl. f. inn. Med. Bd. 33, S. 693. 1912. Biochem. Zeitschr. Bd. 2, S. 243. 1907. Zeitschr. f. analyt. Chem. Bd. 46, S. 216. 1907.

<sup>5)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 43, S. 505. 1912.

<sup>6)</sup> Journ. de pharmacie et de chim. [7], Bd. 2, S. 401; ref. Chem. Zentralbl. 1910, II, S. 1954.

<sup>7)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 35, S. 37. 1902.

<sup>8)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 44, S. 502. 1912; Bd. 55, S. 4. 1913.

Schichten (evtl. nach Zusatz einiger Kubikzentimeter gesättigter Kochsalzlösung) läßt man die untere Schicht ab und schüttelt die Ätherschicht mit 2—3 ccm Wasser oder starker Kochsalzlösung durch. Die Ätherlösung wird durch trockenes Filter filtriert und nach Zusatz einiger Kubikzentimeter Wasser verdunstet, der Rückstand ohne Rücksicht auf etwaige Trübungen mit der Orcin- (S. 108) und Naphthoresorcinprobe (S. 137) geprüft.

2. Nach Goldschmiedt<sup>1)</sup>. Man versetzt  $\frac{1}{2}$ —1 ccm Harn oder auch weniger mit 2 Tropfen einer 15proz. alkoholischen  $\alpha$ -Naphthollösung und unterschichtet vorsichtig mit 3—4 ccm konzentrierter Schwefelsäure. An der Berührungsstelle erscheint ein violetter Ring, der beim ruhigen Stehen nach der Harnseite an Breite zunimmt, während infolge der Diffusion des Harns in die Schwefelsäure diese von der Grenzfläche aus nach unten sich grün färbt. Beim Mischen wird die Flüssigkeit dunkel. Nachweis nach  
Goldschmiedt.

Da auch Salpeter- und Salpetrigsäure Grünfärbung geben, so muß der Harn zunächst auf Abwesenheit dieser Säuren geprüft werden: er darf, mit einigen Tropfen einer alkoholischen Diphenylaminlösung versetzt und mit konzentrierter Schwefelsäure unterschichtet, keine Blaufärbung geben. Indessen ist, da die Diphenylaminreaktion ein sehr viel empfindlicheres Reagens auf Salpeter- und salpetrige Säure ist als  $\alpha$ -Naphthol, ein stark positiver Ausfall der Naphtholreaktion bei schwacher Diphenylaminreaktion für die Anwesenheit von Glucuronsäure zu verwerten.

3. Nach Mayer und Neuberg<sup>2)</sup>. Man fällt den Harn mit Bleiessig, zerlegt den Niederschlag mit Schwefelwasserstoff und dann die gepaarte Glucuronsäure durch Kochen mit verdünnter Schwefelsäure. Man neutralisiert mit Soda und erhält mit p-Bromphenylhydrazinchlorhydrat und Natriumacetat die charakteristische Bromphenylhydrazinverbindung, die sich durch Unlöslichkeit in absolutem Alkohol und außerordentlich starke Linksdrehung auszeichnet. Im Alkohol-Pyridingemisch (6 Tl. Alkohol : 4 Tl. Pyridin) ist  $[\alpha]_D^{20} = -369^\circ$ . Nachweis nach  
Mayer u. Neuberg.

Diese Probe eignet sich nur, wenn der Harn erhebliche Mengen gepaarter Säure enthält (z. B. nach Eingabe von Chloralhydrat) und erfordert größere Harnquantitäten. Siehe auch S. 136.

Über quantitative Bestimmung s. Neuberg und Neimann<sup>3)</sup> und C. Tollens<sup>4)</sup>. Quantitative Be-  
stimmung.

#### *Nachweis der Saccharose im Harn.*

Saccharose kommt im Harn nur nach parenteraler Einverleibung vor. Für Nachweis und quantitative Bestimmung neben allen anderen Zuckerarten hat A. Jolles<sup>5)</sup> ein Verfahren angegeben.

#### *Annähernde Bestimmung der Gesamtkohlenhydrate im Harn nach v. Udránszky<sup>6)</sup>.*

606. Diese Bestimmung beruht auf der § 97 beschriebenen  $\alpha$ -Naphtholreaktion von Molisch. Man stellt Traubenzuckerlösungen her von bekanntem Gehalt (0,1, 0,06, 0,05 usw. bis 0,01%), versetzt je 1 Tropfen dieser Lösungen in der a. a. O. angegebenen Weise mit 1 Tropfen  $\alpha$ -Naphthollösung,  $\frac{1}{2}$  ccm Wasser und 1 ccm konzentrierter Schwefelsäure und erhält so eine Farbenskala. Ferner bereitet man sich in derselben Weise Proben mit einem Tropfen des mit gemessener Menge Wassers verdünnten eiweißfreien Harns, vergleicht die entstehende Farbe mit der Farbenskala und setzt das Verdünnen mit Wasser so lange fort, bis man eine Harnprobe hat, deren Mischfarbe genau oder möglichst genau der Mischfarbe einer der Zuckerlösungsproben entspricht. Man hat nun den Prozentgehalt dieser Lösung mit der Zahl zu multiplizieren, welche angibt,

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 65, S. 389, 1910; Bd. 67, S. 194, 1910. Mayerhofer, ebenda Bd. 70, S. 391. 1910/11.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 29, S. 256. 1900.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 44, S. 127. 1905. <sup>4)</sup> desgl. Bd. 61, S. 95. 1909.

<sup>5)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 43, S. 56, 1912 und 57, S. 420. 1913.

<sup>6)</sup> Vgl. Treupel: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 16, S. 55. 1892.

auf das Wievielfache seines Volumens der Harn verdünnt war, um den Prozentgehalt des untersuchten Harns an Kohlenhydraten — bezogen auf Traubenzucker — zu finden.

Es ist darauf zu achten, daß die Reagensgläser vollständig rein und frei von Papier, Staub, Baumwollfasern sind, und ebenso, daß die Reagenzien ganz rein sind. Beim Zusammenbringen von 1 Tropfen  $\alpha$ -Naphthollösung,  $\frac{1}{2}$  ccm Wasser und 1 ccm der zu benutzenden konzentrierten Schwefelsäure darf nach dem Umschütteln die grüngelbe oder gelbe Farbe keinen rötlichen oder violetten Schimmer annehmen.

#### *Bestimmung der reduzierenden Substanzen im normalen Harn.*

Diese von Richet und Cardot<sup>1)</sup> angegebene Methode beruht auf der Entfärbung einer eingestellten  $\text{KMnO}_4$ -Lösung. Die „Manganzahl“ ist diejenige Anzahl Liter einer  $n/100$ - $\text{KMnO}_4$ -Lösung, die durch die Tagesmenge unverdünnten Harns reduziert wird. Sie schwankt bei Gesunden zwischen 50—250, meist zwischen 80—160, steht in keinem Verhältnis zu den neben Harnstoff ausgeschiedenen organischen Substanzen und scheint auch von der Ausscheidung von Mineralsubstanzen unabhängig zu sein.

#### *Nachweis und Bestimmung von Aceton und Acetessigsäure im Harn.*

##### 607. Nachweis von Aceton.

a) Bei Abwesenheit von Acetessigsäure.

1. Probe von Legal. Man versetzt den Harn mit etwas frischbereiteter Lösung von Nitroprussidnatrium und Natronlauge, wartet bis die dabei auftretende Rotfärbung abgeblaßt ist und übersättigt mit Essigsäure: Purpur- bis Carminfarbe zeigt Aceton an, während die Rotfärbung auf Zusatz von Nitroprussidnatrium und Natronlauge auch von Kreatinin gegeben wird und deshalb in jedem Harn auftritt.

2. Probe von Penzoldt. Man löst etwas o-Nitrobenzaldehyd in heißem Wasser, läßt erkalten und fügt den Harn und Natronlauge hinzu. Die Flüssigkeit wird gelb, grün, und dann scheidet sich Indigo ab, welcher sich mit blauer Farbe in Chloroform löst.

Beide Proben sind nicht sehr empfindlich. Zum Nachweis kleiner Mengen empfiehlt es sich, den Harn zunächst in der § 63 angegebenen Weise zu destillieren und das Destillat mit obigen Reaktionen oder nach § 63 zu prüfen.

b) Bei Anwesenheit von Acetessigsäure.

Man schüttelt den schwach alkalisch gemachten Harn vorsichtig mit reinem (alkohol- und acetonfreiem) Äther, die abgetrennte ätherische Lösung mit Wasser und stellt nun mit der wässrigen Lösung die Reaktionen auf Aceton (§ 63) an.

##### Nachweis von Acetessigsäure.

1. Probe von Gerhardt. Weinrote Färbung auf tropfenweisen Zusatz von Eisenchlorid. Deutlicher tritt die Färbung hervor, wenn man den auf Zusatz weniger Tropfen Eisenchlorid entstehenden Niederschlag von Eisenphosphat zunächst abfiltriert und das Filtrat für die Reaktion benutzt. Die Färbung verschwindet allmählich. 0,4—0,5 $\frac{0}{00}$  lassen sich im Harn noch nachweisen.

Eine ähnliche Färbung mit Eisenchlorid geben Phenol, Salicylsäure, Stoffwechselprodukte des Antipyrin (vgl. v. Jaksch: Über Acetonurie und Diaceturie. Berlin 1885). Vor Verwechslung mit diesen Körpern schützt die weinrote Färbung sowie der Umstand, daß bei Anwesenheit von Acetessigsäure die Färbung sofort auftritt und allmählich verblaßt, sowie daß die Acetessigsäurereaktion im gekochten Harn nicht mehr auftritt.

2. Probe von Arnold<sup>2)</sup> - Liplawsky<sup>3)</sup>. Sie ist sehr viel empfindlicher und wird nicht gestört durch Anwesenheit von Salicylsäure und anderen Medikamenten.

<sup>1)</sup> Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 165, S. 258; ref. Chem. Zentralbl. 1917, II, S. 496.

<sup>2)</sup> Wien. klin. Wochenschr. 1899, S. 541. Zentralbl. f. inn. Med. 1900, S. 417.

<sup>3)</sup> Dtsch. med. Wochenschr. 1901, S. 151. — Allard: Berl. klin. Wochenschr. 1901, S. 985.

Nachweis von  
Aceton.

Nachweis von  
Acetessigsäure.



Erforderliche Lösungen. 1. Eine frisch bereitete 1 proz. Lösung von p-Amidoacetophenon, der zur leichteren Lösung auf 100 ccm 2 ccm konzentrierte Salzsäure zugefügt sind. 2. Eine 1 proz. Kaliumnitritlösung.

6 ccm der 1. Lösung und 3 ccm der 2. Lösung werden mit dem gleichen Volumen Harn versetzt, 1 Tropfen konzentriertes Ammoniak wird hinzugefügt und stark geschüttelt, wobei eine ziegelrote Färbung entsteht. Von dieser Mischung nimmt man — je nach dem Gehalt des Harns an Acetessigsäure — 10 Tropfen bis 2 ccm, setzt etwa 15—20 ccm Salzsäure (spez. Gew. 1,19), 3 ccm Chloroform und 2—4 Tropfen Eisenchloridlösung hinzu und läßt nun die Mischung  $\frac{1}{2}$  bis 1 Minute oder noch länger langsam durcheinanderlaufen (nicht schütteln). Bei Anwesenheit von Acetessigsäure färbt sich das Chloroform violett bis marineblau (die Farbe ist lichtbeständig und dauernd haltbar), bei Abwesenheit nur gelblich oder schwach rötlich. 0,04<sup>0</sup>/<sub>100</sub> Acetessigsäure im Harn lassen sich noch nachweisen.

608. 1. Bestimmung von Aceton (+ Acetessigsäure). Bei gleichzeitiger Anwesenheit von Acetessigsäure wird diese ebenfalls als Aceton mitbestimmt.

Bestimmung  
von Aceton  
(+ Acetessig-  
säure):

a) Nach Huppert - Messinger<sup>1)</sup>.

Prinzip. Titrimetrische Bestimmung der Menge Jod, welche erforderlich ist, das durch Destillation aus dem Harn abgeschiedene Aceton in Jodoform überzuführen.

nach Huppert-  
Messinger

Alle sonstigen auf Jod wirkenden Körper (Phenole, Ammoniak, Ameisensäure, salpetrige Säure, evtl. Thymol, das zur Konservierung dem Harn beigelegt sein könnte) müssen sorgfältig entfernt werden. NH<sub>3</sub> kann durch dem Harn vor der Destillation zugefügte Säure zurückgehalten werden. Starke Säuren sind aber unbedingt zu vermeiden, da sonst flüchtiges Phenol aus der Phenolätherschwefelsäure frei wird. Auch stärkere Essigsäure besitzt diese Wirkung. Trotz der Ansäuerung geht etwas Ammoniak über, ebenso können sich im 1. Destillat Ameisensäure und salpetrige Säure finden. Die beiden letzteren entfernt man durch Schütteln mit Calciumcarbonat und nochmaliges Destillieren, die letzten Spuren Ammoniak entfernt man schließlich durch Ansäuern des 2. Destillates mit Schwefelsäure und eine 3. Destillation.

Erforderliche Lösungen. 1. 50 proz. Essigsäure. 2.  $\frac{n}{10}$ -Jodlösung und  $\frac{n}{10}$ -Thiosulfatlösung (§ 20).

Ausführung. 500 ccm normal saurer\*) Harn (von Fieberharn 100 ccm, von acetonreicherem Harn noch weniger) werden mit Essigsäure (auf 100 ccm Harn 2 ccm 50 proz. Essigsäure) versetzt und bis auf  $\frac{1}{10}$  des Volumens abdestilliert. Ein so starkes Einengen ist aber nur bei zuckerfreiem Harn zulässig. Bei zuckerhaltigem muß man durch Zutropfen von Wasser aus einem Scheidetrichter eine so starke Konzentration verhindern, da andernfalls aus dem Zucker jodoformbildende Substanz entsteht (Borchardt<sup>2)</sup>). Das Destillat wird in einer mit doppelt durchbohrtem Kork versehenen und mit Eis gekühlten Vorlage aufgefangen. Mittels der einen Bohrung ist die Vorlage am Kühler befestigt, mittels der anderen mit einem mit Wasser gefüllten Kugelapparat verbunden. Destillat und vorgelegtes Wasser werden vereinigt, zur Entfernung von salpetriger Säure und Ameisensäure mit Calciumcarbonat in einem Kolben ordentlich geschüttelt und in gleicher Weise wieder destilliert. Das nun erhaltene Destillat und vorgelegte Wasser werden mit 1 ccm achtfach verdünnter Schwefelsäure versetzt und abermals in gleicher Weise der Destillation unterworfen. Das neue Destillat bringt man in eine Flasche mit gut eingeriebenem Glasstöpsel, die so groß sein muß, daß sie vom Destillat, den Spülwässern und den hinzuzufügenden Reagenzien nur bis zu  $\frac{1}{3}$  gefüllt wird, fügt einen großen Überschuß abgemessener Menge  $\frac{n}{10}$ -Jodlösung hinzu, schwenkt um, tropft starke nitritfreie Alkalilauge im Überschuß zu, verschließt die Flasche, schüttelt  $\frac{1}{4}$  Minute und läßt noch 5 Minuten stehen. Jetzt wird der Stopfen in die Flasche abgespritzt, die Flüssigkeit mit konzentrierter Salzsäure angesäuert und das Jod zurücktitriert. Zu dem Zwecke läßt man  $\frac{n}{10}$ -Thiosulfatlösung aus der Burette zufließen, bis die Mischung nur noch schwach gelb ist, fügt einige Kubikzentimeter Stärkelösung

\*) Alkalischer Harn wird durch Zusatz von Essigsäure zunächst auf die normale Acidität gebracht.

<sup>1)</sup> Huppert: Analyse des Harns. 10. Aufl. 1898. S. 760 oder 11. Aufl. 1910. S. 254.

<sup>2)</sup> Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 8, S. 62. 1906.

zu und nun weiter Thiosulfatlösung bis zum Verschwinden der blauen Farbe. Ist die Grenze überschritten, so mißt man noch etwas Jodlösung in die Flüssigkeit und titriert aufs neue zurück. 1 ccm  $\frac{1}{10}$ -Jodlösung entspricht 0,968 mg Aceton.

b) Eine Vereinfachung der Methode von Huppert-Messinger, bei der die mehrfache Destillation vermieden wird, haben Embden und Schmitz<sup>1)</sup> angegeben. Gefahr, daß Ammoniak usw. (s. oben) in bemerkenswerter Menge mit übergeht, besteht nicht, wenn man nicht zu lange destilliert. Bei der Verwendung offener Gefäße, die erlaubt ist und das Verfahren wesentlich vereinfacht, unterlasse man starkes Schütteln, um Acetonverluste zu vermeiden. Man mischt das Destillat mit der Natronlauge nur durch leichtes Schwenken. Anwesenheit von Äthylalkohol selbst in erheblichen Mengen schadet bei Einhaltung der gegebenen Vorschriften nicht, da er in der Kälte nur sehr träge mit der alkalischen Jodlösung reagiert. Nur die praktisch allerdings kaum in Betracht kommende Anwesenheit von Acetaldehyd würde das Resultat trüben, man müßte diesen nach der Methode von Shaffer (vgl. § 609, 3) durch nochmalige Destillation unter Zusatz von etwas Natronlauge und 20 ccm einer 3proz. Wasserstoffsperoxydlösung beseitigen.

Ausführung. In den Destillationskolben — etwa einen Erlenmeyerkolben von  $\frac{3}{4}$  l — mißt man den zu untersuchenden Harn, bei reichlichem Acetongehalt 20 ccm, bei geringem Gehalt entsprechend mehr. Der Harn wird mit 150 ccm Wasser und 2 ccm 50proz. Essigsäure versetzt. Als Vorlage benutzt man bei der Destillation einen Erlenmeyerkolben von 500 ccm, der mit 150 ccm möglichst kalten Wassers beschickt ist. Unter ausgiebiger Kühlung wird die Flüssigkeit destilliert und während 25 Minuten im Sieden erhalten, wobei etwa 60 ccm Flüssigkeit übergehen sollen. Nach dem Unterbrechen der Destillation und der Spülung des Destillationsrohres wird direkt die Titration vorgenommen. Zu diesem Zwecke werden in die Vorlage 30 ccm 33proz. Natronlauge und aus einer Bürette ein reichlicher Überschuß von  $\frac{1}{10}$ n-Jodlösung unter leichtem Umschwenken gegeben. Man erkennt das Vorhandensein eines Überschusses an Jod daran, daß beim Einfallen eines Tropfens Salzsäure an der Berührungsstelle eine braune Färbung auftritt. Das Jodoform fällt zunächst als weißgelbe Trübung aus, die sich bald in intensiv gelb gefärbte Krystalle umwandelt. Nach 5 Minuten säuert man mit Salzsäure von 25% an, gibt einige Tropfen Stärkelösung zu und titriert mit  $\frac{1}{10}$ n-Thiosulfatlösung das unverbrauchte Jod zurück.

nach Scott-Wilson. Ein besonders zur Bestimmung sehr kleiner Mengen geeignetes Verfahren, das auf der Fällbarkeit des Acetons durch Quecksilbercyanid in alkalischer Lösung beruht und auch von Schmitz<sup>2)</sup> empfohlen wird, ist von Scott-Wilson<sup>3)</sup> angegeben worden.

Andere Verfahren. Für praktisch-klinische Zwecke geeignete Verfahren haben Adler<sup>4)</sup> und Engfeld<sup>5)</sup> beschrieben.

Getrennte Bestimmung von Aceton u. Acetessigsäure:  
nach Embden u. Schliep

## 2. Getrennte Bestimmung von Aceton und Acetessigsäure.

a) Nach Embden und Schliep<sup>6)</sup>. Man macht mit 20 ccm ganz frischem Harn (bei sehr hohem Gehalt mit 10 ccm, bei sehr niedrigem mit einer größeren

<sup>1)</sup> Zit. nach Biochem. Arbeitsmethoden (herausg. von Abderhalden): Bd. III, S. 913. 1910.

<sup>2)</sup> Biol. Arbeitsmethoden (herausg. von Abderhalden): Abt. 4, Teil 5, Heft 2, Liefg. 119, S. 200. 1924.

<sup>3)</sup> Journ. of physiol. Bd. 42, S. 444. 1911.

<sup>4)</sup> Münch. med. Wochenschr. Bd. 66, S. 722. 1916.

<sup>5)</sup> Berlin. klin. Wochenschr. Bd. 52, S. 796. 1915.

<sup>6)</sup> Zentralbl. f. d. ges. Physiol. und Pathol. d. Stoffw. N. F., Bd. 2, S. 250 u. 289. 1907.

Menge) eine Acetonbestimmung nach Huppert-Messinger (Gesamt-aceton). Eine gleich große Harnmenge wird in einem 2-l-Rundkolben nach Zufügen von 130—150 ccm Wasser unter möglichst niedrigem Druck und bei einer Wasserbadtemperatur von nicht über 34—35° unter Benutzung einer Capillare destilliert, so daß mindestens 55—60 ccm übergehen. Dazu sind 30 bis 35 Minuten erforderlich. Mit dem Destillationsrückstand wird nach Überführen in ein geeignetes Destillationsgefäß ebenfalls eine Acetonbestimmung nach Huppert-Messinger ausgeführt (Aceton aus Acetessigsäure). Da bei der Vakuumdestillation geringe Mengen von Acetessigsäure gespalten werden, so sind die für Aceton aus Acetessigsäure erhaltenen Werte als Minimal-, die für präformiertes Aceton erhaltenen als Maximalwerte anzusehen.

b) Nach Folin. Ein im Prinzip ähnliches Verfahren gibt Folin<sup>1)</sup> an. nach Folin Aceton und Acetessigsäure zusammen werden in einer Probe nach Huppert-Messinger bestimmt. In einer anderen Probe wird Aceton allein wie folgt bestimmt: Zur Benutzung gelangt derselbe Apparat, der für die Ammoniakbestimmung im Harn von Folin<sup>2)</sup> vorgeschlagen wurde (§ 578, 2). 20—25 ccm Harn werden mit 0,2—0,3 g Oxalsäure oder einigen Tropfen einer 10proz. Phosphorsäurelösung angesäuert, dazu fügt man 8—10 g NaCl (Aceton ist unlöslich in gesättigter NaCl-Lösung) und eine Spur Petroleum. In die Vorlage bringt man etwa 10 ccm 40proz. KOH-Lauge, 150 ccm Wasser und einen Überschuß einer  $\frac{n}{10}$ -Jodlösung. Sodann wird 20—25 Minuten lang mit einer Wasserstrahlpumpe bei Zimmertemperatur ein kräftiger Luftstrom hindurchgesaugt. Nach Verlauf dieser Zeit ist jede Spur Aceton in Jodoform umgewandelt. Nun wird mit 10 ccm konzentrierter HCl angesäuert und der Überschuß an Jod mit  $\frac{n}{10}$ -Thiosulfatlösung und Stärke zurücktitriert wie bei 1a. Etwas bedenklich bei dieser Methode ist die leichte Zersetzlichkeit der alkalischen Hypojoditlösung. Über die Verbindung der Acetonbestimmung mit der Ammoniakbestimmung in derselben Harnprobe s. Originalarbeit.

Für praktisch-klinische Zwecke hat H. Schall<sup>3)</sup> ein colorimetrisches nach Schall. Verfahren zur Bestimmung von Aceton und Acetessigsäure angegeben.

#### *Nachweis und Bestimmung der $\beta$ -Oxybuttersäure im Harn.*

609. Zum Nachweis dient folgendes Verfahren von E. Külz<sup>4)</sup>. Man prüft Nachweis. den Harn zunächst mit Eisenchlorid auf Acetessigsäure (§ 607). Fällt die Reaktion negativ aus, ist auch keine Oxybuttersäure vorhanden. Fällt sie positiv aus, wird der (evtl. vergorene) Harn mit Bleizuckerlösung geklärt und mit dem Polarisationsapparat geprüft. Zeigt sich Linksdrehung und wird dieselbe durch Bleiessig und Ammoniak nicht entfernt, so ist ein Gehalt von  $\beta$ -Oxybuttersäure wahrscheinlich. Man dampft dann eine größere Portion des evtl. vergorenen Harns zum Sirup ein, mischt mit dem gleichen Volumen konzentrierter Schwefelsäure und destilliert die Mischung ohne Kühler in ein Probierröhrchen als Vorlage unter starker Kühlung desselben. Unter Umständen scheidet sich bei starker Kühlung bereits eine Krystallisation von  $\alpha$ -Crotonsäure aus. Ist dies nicht der Fall, so schüttelt man das Destillat mit Äther aus, gießt die Ätherlösung ab, verdunstet, trennt im Rückstand nötigenfalls die  $\alpha$ -Crotonsäure von Benzoesäure durch Behandlung mit etwas Wasser, in dem sich die  $\alpha$ -Crotonsäure leichter auflöst, und charakterisiert sie durch den Schmelzpunkt (S. 90).

<sup>1)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 3, S. 177. 1907.

<sup>2)</sup> Vgl. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 37, S. 161. 1902.

<sup>3)</sup> Münch. med. Wochenschr. Bd. 66, S. 812. 1916.

<sup>4)</sup> Zeitschr. f. Biol. Bd. 23, S. 332. 1887. — Hart: Journ. of biol. chem. Bd. 4, S. 473 u. 477. 1908.

Dieser Nachweis gelingt meist schon bei 100 ccm Harn. Embden und Schmitz<sup>1)</sup> empfehlen, den Ätherauszug nach Verjagen der Hauptmenge des Äthers mit Petroläther zu fällen. Auf diese Weise lassen sich flüchtige Fettsäuren und Benzoesäure beseitigen.

**Bestimmung.** Von den zur Bestimmung der  $\beta$ -Oxybuttersäure angegebenen Verfahren ist die Methode von Magnus - Levy (1), welche auf der polarimetrischen Bestimmung der mit Äther extrahierten Säure beruht, nur bei hohem Oxybuttersäuregehalt des Harns anwendbar, da nur in diesem Falle der durch im Harn vorhandene andere linksdrehende und ätherlösliche Substanzen bedingte Fehler weniger zur Geltung kommt; aber auch unter diesen Umständen kann bis zu 10% zuviel gefunden werden (Embden und Schmitz<sup>2)</sup>). Die beste Methode ist wohl die von Pribram in der Ausführung von Schmitz (2). Sie beruht auf der Umwandlung der  $\beta$ -Oxybuttersäure in Crotonsäure und Bestimmung der Brommenge, welche diese ungesättigte Säure bindet. Nach Schmitz<sup>3)</sup> empfiehlt es sich, diese Methode mit der polarimetrischen zu verbinden, indem man zunächst den Ätherextrakt herstellt, diesen polarisiert und einen bestimmten aliquoten Teil, welcher 50—70 mg Oxybuttersäure enthalten soll, für das Verfahren nach Pribram verwendet. Die Methode von Shaffer-Marriott (3), die auf der Bestimmung des aus der Oxybuttersäure durch Oxydation entstehenden Acetons beruht, ergibt Resultate, die nach den Verfassern um etwa 10% zu niedrig sind. S. weiter § 610 und 610a.

**Bestimmung nach Magnus - Levy.**

#### 1. Bestimmung nach Magnus-Levy<sup>4)</sup>.

**Prinzip.** Die Säure wird dem Harn durch Extraktion mit Äther entzogen und polarimetrisch bestimmt.

**Ausführung\*).** 100 ccm an Oxybuttersäure reichen Harns werden nach Zusatz von 90 g Ammonsulfat und 5 ccm 25proz. Schwefelsäure im Lindschen Extraktionsapparat 7 Stunden mit Äther extrahiert. Um die Vollständigkeit der Extraktion festzustellen, extrahiert man mit neuem Äther nochmals 7 Stunden. Der zweite Ätherextrakt wird aber kaum noch eine merkliche Linksdrehung zeigen. Man filtriert den Extrakt unter öfterem Nachspülen mit Äther in einen Destillationskolben, fügt 5 ccm Wasser hinzu, destilliert den Äther unter sorgfältiger Vermeidung stärkerer Erwärmung ab, kühlt den Rückstand sofort unter der Wasserleitung ab, bringt ihn unter Nachspülen des Kolbens quantitativ in einen kleinen Maßzylinder und fügt so viel Wasser hinzu, daß das Gesamtvolumen etwas mehr beträgt, als das zu benutzende Polarisationsrohr faßt. Nach Feststellung des Volumens wird mit ganz wenig Tierkohle in der Kälte geschüttelt, filtriert und polarisiert.

Mit Hilfe der spezifischen Drehung der  $\beta$ -Oxybuttersäure ( $[\alpha]_D = -24,12^\circ$ ) läßt sich aus dem gefundenen Werte die Menge berechnen.

**Bestimmung nach Pribram - Schmitz.**

#### 2. Bestimmung nach Pribram<sup>5)</sup>-Schmitz<sup>3)</sup>.

**Prinzip.** Überführung der mit Äther extrahierten Säure in Crotonsäure durch Kochen mit Schwefelsäure und Bestimmung der von dieser ungesättigten Säure gebundenen Brommenge.

**Erforderliche Lösungen.**  $\frac{1}{10}$ -Natriumthiosulfatlösung.  $\frac{1}{10}$ -Bromlösung (hergestellt durch Lösen von 70 g Bromkalium in einem Litermeßkolben, Zufügen von 2,5 ccm Brom und Auffüllen zur Marke). Man kontrolliert sie für jede Bestimmung, indem man etwa 40 ccm nach

\*) Die Beschreibung folgt den Angaben von Embden und Schmitz<sup>2)</sup>.

<sup>1)</sup> Handbuch der biochem. Arbeitsmethoden, herausg. von Abderhalden, Bd. 3, S. 926. 1910.

<sup>2)</sup> Handbuch der biochem. Arbeitsmethoden, herausg. von Abderhalden, Bd. 3, S. 928. 1916.

<sup>3)</sup> Handbuch der biol. Arbeitsmethoden, herausg. von Abderhalden, Abt. 4, Teil 5, Liefg. 119, S. 227. 1924.

<sup>4)</sup> Ergebn. d. inn. Med. u. Kinderheilk. Bd. 1, S. 416. 1908.

<sup>5)</sup> Zeitschr. f. exp. Pathol. u. Therapie Bd. 10, S. 279. 1912.

Zugabe von 3 ccm Jodkaliumlösung, etwas 25 proz. Schwefelsäure und Stärkelösung auf die Thiosulfatlösung einstellt. 20 proz. Jodkaliumlösung. 25 proz. Schwefelsäure. Stärkelösung.

**Ausführung.** Die Ätherextraktlösung, die nach 1 hergestellt und deren Oxybuttersäuregehalt polarimetrisch festgestellt ist, wird so weit mit Wasser verdünnt, daß in 30 ccm 50—70 mg Oxybuttersäure enthalten sind. Man benutzt einen Rundkolben von 250 ccm Inhalt, der mit Tropftrichter und Schlangenkühler verbunden ist. Als Vorlage dient ein 50-ccm-Meßzylinder. In den Kolben bringt man 30 ccm der Lösung, unter Kühlung 15 ccm konzentrierte Schwefelsäure und ein Siedesteinchen, in den Tropftrichter 50 ccm Wasser. Man destilliert nun unter Zutropfen von Wasser, indem man dieses so reguliert, daß die Konzentration in dem Kolben die gleiche bleibt. Wenn 50 ccm überdestilliert sind, entleert man den Inhalt des Meßzylinders in einen Kolben, bringt wieder 50 ccm Wasser in den Tropftrichter, destilliert abermals und verfährt im ganzen 7 mal in gleicher Weise, bis 350 ccm überdestilliert sind. Das vereinigte Destillat wird mit einem reichlichen Überschuß der Bromlösung, etwa 25 ccm, versetzt. Nach 10 Minuten gibt man 3 ccm der Jodkaliumlösung etwas 25 proz. Schwefelsäure und Stärkelösung hinzu und titriert das dem überschüssigen Brom äquivalente Jod mit der Thiosulfatlösung zurück. 1 ccm der verbrauchten Bromlösung entsprechen 5,2 mg Oxybuttersäure.

### 3. Bestimmung nach Shaffer-Marriott<sup>1)</sup>.

Bestimmung nach  
Shaffer-  
Marriott.

**Prinzip.** Die  $\beta$ -Oxybuttersäure wird nach Entfernung des Acetons und der Acetessigsäure durch Destillation des mit Schwefelsäure angesäuerten Harns (wobei beide gleich bestimmt werden können) durch Kaliumbichromat und Schwefelsäure zu Aceton oxydiert und ihre Menge aus der Menge des gebildeten Acetons (Bestimmung nach Messinger-Huppert) ermittelt. 1 mg Aceton = 1,794 mg  $\beta$ -Oxybuttersäure. Gepaarte Glucuronsäure, Traubenzucker, aus welchen ebenfalls durch Chromsäure Aceton entsteht, sind vorher durch Bleiessig und Ammoniak auszufällen, andere bei der Oxydation auftretende jodbindende Substanzen (aus Traubenzucker) dadurch zu entfernen, daß das Destillat vor der Bestimmung einer zweiten Destillation mit Wasserstoffsuperoxyd und Natronlauge unterworfen wird, wobei die störenden jodbindenden Stoffe zerstört werden.

**Erforderliche Lösungen.** Bleiessig. Zu seiner Darstellung erhitzt man 180 g Bleiacetat, 110 g Bleioxyd und etwas Wasser im Wasserbad, bis das Bleioxyd umgesetzt ist und fügt Wasser (etwa 1000 ccm) hinzu, bis das spez. Gewicht 1,235 bei 25° beträgt. 1 proz. Kaliumbichromatlösung und 10 proz. Natronlauge. 3 proz. Wasserstoffsuperoxyd (aus 30 proz. Perhydrol Merck).  $\frac{n}{10}$ -Jodlösung und  $\frac{n}{10}$ -Thiosulfatlösung.

**Ausführung.** In einen 500-ccm-Meßkolben werden 25—100 ccm oder mehr (gewöhnlich 50 ccm) Harn mit der Pipette abgemessen, 200—300 ccm Wasser und Bleiessig in einer dem Harn gleichen Menge gebracht (bei geringem oder fehlendem Zuckergehalt nur die Hälfte oder weniger) und nach gutem Umschütteln weiter konzentriertes Ammoniak, halbsoviel wie Bleiessig, und Wasser bis zur Marke. Man schüttelt, filtriert nach wenigen Minuten durch ein Faltenfilter, bringt 200 ccm des Filtrats in einen Kjeldahlkolben von 800—1000 ccm, fügt etwa 400 ccm Wasser, 15 ccm konzentrierte Schwefelsäure und Talk hinzu und destilliert etwa 200 ccm ab, während aus einem Scheidetrichter ab und zu Wasser zugegeben wird, damit der Inhalt des Kolbens nicht unter 400—500 ccm sinkt. (Das Destillat, welches das präformierte und das aus Acetessigsäure stammende Aceton enthält und zweckmäßig gleich in einem zweiten Kjeldahlkolben aufgefangen wird, kann zur Bestimmung des „Gesamtacetons“ benutzt werden. Man destilliert es zu dem Zweck nach Zusatz von 10 ccm 10 proz. Natronlauge nochmals und macht die Bestimmung nach Huppert - Messinger.) Nachdem die Vorlage gewechselt (ein Literkolben, in dem sich etwas Wasser befindet, in das das Rohr des Kühlers eintaucht) und in den Scheidetrichter eine 1 proz. Kaliumbichromatlösung eingebracht ist, wird weiter destilliert,

<sup>1)</sup> Shaffer: Journ. of biol. chem. Bd. 5, S. 211. 1908. — Shaffer u. Marriott: desgl. Bd. 16, S. 265. 1913/14.

indem man zunächst langsam 20 ccm und dann in Zwischenräumen von 15 bis 20 Minuten je 10 ccm zufließen läßt, bis im ganzen höchstens 100 ccm verbraucht sind. Macht sich Grünfärbung bemerkbar, so läßt man in kürzeren Zwischenräumen zufließen. Eine leicht rote Farbe soll immer vorhanden sein. Mehr wie 100 ccm wird man gewöhnlich nicht brauchen. In seltenen Fällen, und zwar besonders dann, wenn der Zucker nicht ganz entfernt ist, können 200 oder 300 ccm nötig sein. Die Destillation dauert bei mäßigem Kochen 2—3 Stunden. Das Destillat wird nach Zusatz von 10 ccm 10 proz. Natronlauge und 25 ccm 3 proz. Wasserstoffsuperoxyd wieder destilliert, und zwar ungefähr 20 Minuten, wobei man zunächst vorsichtig erhitzt, bis das Peroxyd zersetzt ist. Jetzt wird nach Huppert - Messinger mit  $\frac{1}{10}$ -Jodlösung titriert. 1 ccm dieser Lösung = 1,736 mg Oxybuttersäure.

*Nephelometrische Bestimmung kleiner Mengen Aceton, Acetessigsäure und  $\beta$ -Oxybuttersäure nebeneinander nach Folin und Denis*<sup>1)</sup>.

610. Prinzip. Aceton gibt mit dem Scott-Wilsonschen Reagens (alkalische Lösung von  $\text{Hg}(\text{CN})_2$  und  $\text{AgNO}_3$ ) eine kolloidale Trübung, die sich nephelometrisch verwerten läßt. Die Acetessigsäure wird nach Überführung in Aceton, getrennt von dem präformierten Aceton, gemessen. Die  $\beta$ -Oxybuttersäure wird nach dem Prinzip von Shaffer (§ 609, 3) in Aceton übergeführt und als solches bestimmt. 1 mg Aceton entspricht 1,8 mg Acetessigsäure bzw. 1,78 mg  $\beta$ -Oxybuttersäure.

Erforderliche Lösungen. 1. Stammacetonlösung: 2 ccm reinsten Acetons (Kahlbaum) werden in 500 ccm Wasser gelöst und destilliert. Etwa 150 ccm des Destillats werden mit  $\frac{1}{4}$ - $\text{H}_2\text{SO}_4$  auf 1 l aufgefüllt und mit Jod und Thiosulfat der genaue Acetongehalt festgestellt. Hiervon stellt man sich durch Verdünnen mit  $\frac{1}{4}$ - $\text{H}_2\text{SO}_4$  eine Lösung her, die in 10 ccm genau 0,5 mg Aceton enthält. Eine solche Lösung hält sich mindestens einige Wochen. Die Destillation des Acetons ist nicht zu umgehen, da bei Herstellung der Lösung durch einfaches Verdünnen die nach dem Zusatz des Scott-Wilsonschen Reagens entstehende Trübung einen anderen Dispersitätsgrad erhält als bei der destillierten Versuchslösung selbst.

2. Scott-Wilsonsches Reagens: 10 g Mercuricyanid werden in 600 ccm Wasser gelöst, hierzu wird eine Lösung von 180 g Natronhydroxyd in 600 ccm Wasser gefügt. Evtl. kühlen! Dann gibt man vorsichtig unter ständigem Schütteln eine Lösung von 2,9 g Silbernitrat in 400 ccm Wasser hinzu. 3—4 Tage stehen lassen! Von dem geringen Bodensatz wird die gebrauchsfertige Lösung abgehebert.

Ferner 2 proz. Bisulfitlösung (nur 1 Woche haltbar), 2 proz. Kaliumbichromatlösung, 10- und 35 proz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , Natriumsuperoxyd.

Bestimmung des präformierten Acetons.

Ausführung. 1. Bestimmung des präformierten Acetons. 0,5 bis 5,0 ccm Harn (soviel als etwa 0,5 mg Aceton entspricht) werden nach Zusatz von 1 ccm 10 proz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  auf dem Wasserbade ( $35\text{—}40^\circ$ ) durchlüftet. Anordnung s. oben unter Folin (§ 608, 2b). Die Vorlage enthält 10 ccm der 2 proz. Bisulfitlösung. 10 Minuten genügen, um 2 mg Aceton überzuführen. Das Destillat wird quantitativ in ein 100 ccm fassendes Meßgefäß gebracht und auf  $50\text{—}60$  ccm aufgefüllt. Hierzu gibt man 15 ccm des Scott-Wilsonschen Reagens. Auffüllen auf 100 ccm und mischen! Das Bisulfit soll das Aceton festhalten, es hat aber den Nachteil, daß es den Dispersitätsgrad der entstandenen kolloidalen Trübung langsam vergrößert. Deswegen ist die Vergleichsflüssigkeit möglichst gleichzeitig mit der eigentlichen Probe fertigzustellen wie folgt: 10 ccm der Stammacetonlösung (0,5 mg Aceton) gibt man zu 10 ccm der obigen Bisulfitlösung und verfährt weiter genau wie bei der Probe selbst. Probe und Vergleichsflüssigkeit kommen in ein Duboscqsches Colorimeter, wo sie vor der Ablesung ruhig 12—15 Minuten stehen können. Vor der Füllung ist auf gleichmäßige Beleuchtung der beiden Tuben zu achten.

<sup>1)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 18, S. 263. 1914.

2. Bestimmung der Acetessigsäure. In einer zweiten Harnprobe bestimmt man in ähnlicher Weise Aceton + Acetessigsäure zusammen, indem man das Harngefäß während der sehr vorsichtigen Luftdurchführung in kochendem Wasser hält. Man wähle die Harnmenge so groß, daß die zu erwartende Acetonmenge 0,3—0,7 mg beträgt. Acetonurine enthalten 2—10 mal soviel Acetessigsäure als präformiertes Aceton. Man läßt die Luft 10 Minuten sehr langsam durchstreichen, verstärkt dann den Luftstrom und erhält das Gefäß noch 5 Minuten auf dem kochenden Wasserbad. Im übrigen verfährt man wie unter 1.

Bestimmung der  
Acetessigsäure.

3. Bestimmung der  $\beta$ -Oxybuttersäure. Da nur 2 mg  $\beta$ -Oxybuttersäure erforderlich sind und die meisten Acetonurine mehrere Milligramm im Kubikzentimeter enthalten, muß der Urin auf das 10—50fache verdünnt werden. Eine Harnmenge, die 2—4 mg  $\beta$ -Oxybuttersäure entspricht, wird in einen 500 ccm fassenden Kjeldahlkolben gemessen. Hinzu kommen 200 ccm Wasser und 5 ccm einer 10proz. Schwefelsäure. 10 Minuten langes, schwaches Kochen treibt das präformierte und aus der Acetessigsäure entstandene Aceton aus. Dann fügt man 25 ccm einer 35proz. Schwefelsäure, die 2% Kaliumbichromat enthält, hinzu. Der Kolben wird sofort mit dem Destillationsapparat verbunden. In die Vorlage kommen 75—100 ccm kaltes Wasser. Man bringe die Reaktionsflüssigkeit jetzt rasch zum Kochen, verkleinere aber die Flamme sofort, so daß 30 Minuten lang praktisch nichts überdestilliert; die nächsten 15 Minuten destilliere man wieder energischer. Das Destillat soll in dieser Zeit nicht mehr als 80—125 ccm betragen. Während der Destillation muß das Ende des Kühlers natürlich in das vorgelegte Wasser eintauchen. Das so gewonnene Destillat wird mit einigen Gramm Natriumsuperoxyd versetzt und die Destillation wiederholt, bis etwa 80 ccm überdestilliert sind. Von dem letzten Destillat, das auf 100 ccm aufgefüllt wird, werden 25—50 ccm zur nephelometrischen Bestimmung verwandt. Zu diesem Zwecke setzt man 15 ccm Scott-Wilsonsches Reagens zu und füllt auf 100 ccm auf. Die Vergleichsflüssigkeit mit 0,5 mg Aceton wird ganz ebenso angesetzt. Ein Zusatz von Bisulfit kann diesmal entbehrt werden.

Bestimmung der  
Oxybuttersäure.

Die Ausfällung von Glucuronsäure und Zucker durch basisches Bleiacetat und Ammoniak nach Shaffer (§ 609, 3) fällt hier weg, da die kleinen Mengen aus Glucuronsäure und Zucker entstandener störender Substanz, die evtl. in das erste Destillat übergehen könnten, durch die Einwirkung von  $\text{Na}_2\text{O}_2$  sicher zerstört werden.

Nach der nephelometrischen Methode fanden Folin und Denis 97—101% der zu Harn von bekanntem Zuckergehalt zugesetzten  $\beta$ -Oxybuttersäure wieder.

**Bestimmung von Aceton, Acetessigsäure und  $\beta$ -Oxybuttersäure nebeneinander nach v. Slyke<sup>1)</sup>.**

610a. Es beruht auf der Wägung des Niederschlags, welcher beim Kochen einer Acetonlösung mit Mercurisulfat und Schwefelsäure entsteht (Denigès, § 63). Man bestimmt einmal das präformierte und aus Acetessigsäure entstehende Aceton und dann das durch Oxydation aus Oxybuttersäure entstandene. Wegen der Einzelheiten des sehr sorgfältig ausgearbeiteten Verfahrens s. die Originalarbeit.

**Nachweis von Acetaldehyd im Harn.**

Über den Nachweis und die Isolierung aus diabetischem, sowie aus normalem Harn s. Stepp und Feulgen<sup>2)</sup>.

<sup>1)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 32, S. 455. 1917.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 114, S. 301. 1921 und Bd. 119, S. 72. 1922.

*Nachweis und Bestimmung der Milchsäure im Harn.*

611. Der eingedampfte Harn wird mit dem 10fachen Volumen Alkohol gemischt, nach 12 Stunden abfiltriert, das eingedampfte Filtrat mit Phosphorsäure angesäuert und mit großen Mengen Äther wiederholt geschüttelt. Der Ätherrückstand wird in wenig Wasser gelöst, evtl. filtriert,  $\frac{1}{2}$  Stunde auf dem Wasserbade mit reinem Bleicarbonat erhitzt, nach dem Erkalten filtriert, das mit Schwefelwasserstoff behandelte Filtrat stark eingeengt und abermals mit Äther ausgeschüttelt, der Ätherrückstand zur Darstellung des Zinksalzes benutzt und dieses untersucht (§ 82).

Eine wirklich exakte Bestimmungsmethode der Milchsäure im Harn existiert bisher nicht. Chemisch reine Lactate lassen sich nach der Methode von Fürth und Charnass<sup>1)</sup>, die auf folgendem Prinzip beruht, bestimmen: Das in 1proz. kochender Schwefelsäure gelöste Lactat wird durch tropfenweisen Zusatz von Kaliumpermanganat in Aldehyd übergeführt. Dieser wird überdestilliert und titrimetrisch, am besten nach Ripper<sup>2)</sup>, bestimmt: Einleiten in eine Kaliumhydrosulfitlösung von bestimmtem Gehalte, Bestimmung des Sulfitüberschusses auf jodometrischem Wege. Die Methode gibt ziemlich konstant um 11,8% (Mittelwert) zu kleine Werte. Bei der Konstanz des Fehlers läßt sie sich bei genauer Einhaltung der vorgeschriebenen Einzelheiten verwerten. Da aber die verschiedensten im Harn möglicherweise vorhandenen Stoffe die gleiche Reaktion geben, so muß die Milchsäure zuvor als Zinklactat isoliert werden.

Weitere Versuche, die Milchsäure im Harn zu bestimmen, s. bei Knoop und Jost<sup>3)</sup> und bei Clausen<sup>4)</sup>.

*Nachweis von Fett im Harn.*

612. Fett erscheint im Harn unter pathologischen Verhältnissen (gelegentlich auch unter normalen nach Aufnahme großer Fettmengen) entweder in feinsten Verteilung und ein milchiges Aussehen des Harns bewirkend (Chylurie) oder in größeren Tropfen, die sich an der Oberfläche ansammeln. Unter dem Mikroskop sieht man Fetttropfen, und beim Schütteln mit Äther klärt sich der Harn. Beim Verdunsten des abgegossenen Äthers hinterbleibt eine fettige Masse, in der sich Olein, Palmitin und Stearin nachweisen lassen.

*Nachweis und Bestimmung von Eiweiß im Harn.*

Das pathologischere im Harn auftretende Eiweiß ist fast regelmäßig ein Gemenge von Serumalbumin und Serumglobulin, aber in sehr verschiedenen Verhältnissen. Die Gesamtmenge beträgt meist weniger als 1%, selten steigt sie bis auf 4%; doch sind auch 8% beobachtet worden.

Nachweis des Eiweiß im Harn.

613. **Nachweis des Eiweiß.** Man stellt mit dem evtl. in der gleich zu beschreibenden Weise vorbehandelten Harn folgende Reaktionen\*) an, und zwar um ganz sicher zu gehen, mehrere:

Ein nicht ganz klarer Harn muß zunächst filtriert werden. Wird er auch bei mehrmaligem Filtrieren durch doppeltes Filter nicht klar, so schüttelt man ihn mit ein wenig Kieselgur und filtriert dann. Kieselgur ist indessen womöglich zu vermeiden, da er kleine Mengen von Eiweiß zurückhält.

Gibt der Harn mit Essigsäure in der Kälte Niederschlag (§ 596), so ist dieser zunächst zu entfernen. Man bringt zu diesem Zwecke 100 oder 200 ccm durch Verdünnen mit Wasser auf das spez. Gew. 1007—1008, fügt Essigsäure bis zur deutlich sauren Reaktion hinzu, läßt bei kühler Temperatur bis zum nächsten Tage stehen und gießt oder filtriert die klare überstehende Flüssigkeit ab. Erfolgt kein klares Absitzen, so zentrifugiert man oder man schüttelt mit ein wenig Kieselgur (Salkowski<sup>5)</sup>). Hat man den Harn mit Wasser verdünnt, so ist es zweckmäßig, bei Ausführung der Probe 4 und 5 wenige Tropfen gesättigte Kochsalzlösung zuzufügen.

\*) Die im normalen Harn vorhandenen geringen Eiweißmengen (§ 596) werden durch diese Reaktionen nicht angezeigt.

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 26, S. 199. 1910.

<sup>2)</sup> Monatshefte f. Chem. Bd. 21, S. 1079. 1900.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 130, S. 338. 1923.

<sup>4)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 52, S. 264. 1922.

<sup>5)</sup> Charité-Ann. Bd. 30, S. 385. 1906.



1. Eine Portion Harn (reagiert er alkalisch, so ist er zunächst zu neutralisieren) wird im Reagensglase erhitzt; entsteht Niederschlag oder Trübung, so können sie von Eiweiß oder phosphorsaurem Kalk (kohlen-saurem Kalk bei Pflanzenfressern) herrühren. Löst sich der Niederschlag nicht auf Zusatz von Salpetersäure oder entsteht ein Niederschlag erst nach Zusatz dieser Säure, so enthält der Harn Eiweiß.

Albumosen und Peptone geben diese Reaktion nicht.

Die Schätzung der Menge des Eiweiß aus der Höhe des flockigen Niederschlags, welcher sich nach der Koagulation eines bestimmten Volumens des Harns nach bestimmter Zeit im Reagensglase abgesetzt hat, ist eine so trügerische, daß sie kaum einen Anhaltspunkt gewähren kann.

2. 10 ccm Harn werden mit 1 ccm einer Lösung, welche in 1 l 56,5 ccm Essig und 118 g Natriumacetat enthält,  $\frac{1}{2}$  Minute gekocht. Bei Anwesenheit von Eiweiß entsteht eine feinflockige Fällung; eine Abscheidung von Phosphaten erfolgt nicht.

Diese von Bang<sup>1)</sup> angegebene Probe ist nach ihm besonders zuverlässig. Albumosen und Peptone geben die Reaktion nicht.

3. Beim Kochen des mit dem gleichen Volumen gesättigter Natriumsulfatlösung oder dem dritten Teil gesättigter Kochsalzlösung und etwas Essigsäure versetzten Harns entsteht bei Anwesenheit von Eiweiß Niederschlag.

Albumosen und Peptone geben diese Reaktion nicht.

4. Bringt man unter den Harn in einem Reagensglase mit einer feinen Pipette vorsichtig starke Salpetersäure, so entsteht bei Anwesenheit von Eiweiß an der Berührungsstelle eine schwach begrenzte, weiße, ringförmige Ausscheidung (Hellersche Eiweißprobe).

Albumosen geben dieselbe Reaktion.

Ein nicht an der Berührungsstelle beider Flüssigkeiten, sondern etwas über dieser entstehender trüber Ring entsteht in einem harnsäurereichen Harn durch Abscheidung von Harnsäure. Bei Wiederholung der Probe mit dem mit Wasser verdünnten Harn wird eine ringförmige Trübung nicht von Harnsäure herrühren.

5. Auf Zusatz von Essigsäure bis zu 2% und tropfenweises Zufügen von Ferrocyankaliumlösung (1 : 20) unter Vermeidung eines Überschusses entsteht bei Anwesenheit von Eiweiß Trübung oder Niederschlag (Hammarsten<sup>2)</sup>).

Albumosen geben dieselbe Reaktion.

Die Farbenreaktionen auf Eiweiß (§ 325 B) lassen sich nicht direkt im Harn anstellen, wohl aber mit den erhaltenen und abfiltrierten Niederschlägen.

Zum Nachweis von Globulin und Albumin nebeneinander neutralisiert man den Harn mit Ammoniak und versetzt ihn mit dem gleichen Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung: Das Globulin fällt aus, während das Albumin aus dem Filtrat durch weiteren Zusatz von Ammonsulfatlösung oder durch Erhitzen nach Zusatz von etwas Essigsäure abgeschieden wird.

Nachweis von  
Globulin und  
Albumin  
nebeneinander.

Zur besseren Charakterisierung des Eiweiß ist es von großem Wert, es qualitativ und womöglich quantitativ auf seine Spaltungsprodukte zu untersuchen. Glutaminsäure und Tyrosin lassen sich in verhältnismäßig einfacher Weise schon in 50—100 g, ja schon in 25 g aus dem Harn abgeschiedenem Eiweiß quantitativ bestimmen. Tryptophan, Cystin, Glykokoll können leicht qualitativ nachgewiesen werden. Die für diese Untersuchungen dienenden Methoden sind § 475 ff. beschrieben. Näheres darüber s. bei Abderhalden<sup>3)</sup>.

Über den Nachweis des Eiweißkörpers von Bence Jones s. § 343.

Über das Vorkommen und den Nachweis von Mucin und Nucleoalbumin s. K. Mörner<sup>4)</sup>, siehe dazu auch § 472 u. § 562.

<sup>1)</sup> J. Bang: Lehrbuch der Harnanalyse. Wiesbaden 1918.

<sup>2)</sup> O. Hammarsten: Lehrbuch der physiol. Chemie. 9. Aufl. S. 627. Wiesbaden 1921.

<sup>3)</sup> Zeitschr. f. exp. Therapie Bd. 2, S. 642. 1906.

<sup>4)</sup> Skandinav. Arch. f. Physiol. Bd. 6, S. 332. 1895.

614. **Bestimmung des Eiweiß.** Zur genauen Bestimmung des Eiweiß dient eine der folgenden Methoden:

Bestimmung des  
Eiweiß nach  
Scherer.

1. Bestimmung des Gesamteiweiß nach Scherer. Man mißt vom filtrierten Harn 50 oder 100 ccm in eine hinreichend geräumige Porzellschale ab, erhitzt unter gutem Umrühren über einer kleinen Flamme zum Kochen, fügt, falls keine gute flockige Gerinnung erfolgt, vorsichtig einige Tropfen sehr verdünnter Essigsäure hinzu, erhitzt wieder zum Sieden und prüft abermals, ob die Flüssigkeit über dem Koagulum klar erscheint. Ist dies erreicht, so filtriert man noch heiß durch ein kleines, aschefreies, bei 120° getrocknetes und gewogenes Filter, sammelt auf demselben das ganze Koagulum, wäscht gleich nach dem Abfließen der Flüssigkeit mit warmem Wasser, zuletzt mit Alkohol und Äther, sorgfältig aus und trocknet Filter und Koagulum im Luftbade bei 120° längere Zeit bis zum konstanten Gewicht. Man verascht dann Filter und Niederschlag in einem gewogenen Platintiegel, wägt wieder und zieht das so gefundene Gewicht der Asche von dem Gewicht der Trockensubstanz ab.

Bei dieser Bestimmung wird leicht etwas zu wenig gefunden, da auch beim vorsichtigsten Ansäuern mit Essigsäure oft etwas Eiweiß gelöst bleibt; man prüft zu diesem Zwecke das Filtrat mit Essigsäure und Ferrocyankalium. Ist der Harn sehr reich an Eiweiß, so verdünnt man ihn vor dem Kochen mit seinem doppelten Volumen oder noch mehr Wasser oder gießt ihn in kleinen Portionen in das bereits siedende Wasser unter Umrühren.

Bestimmung des  
Eiweiß nach  
Devoto.

2. Bestimmung des Gesamteiweiß nach Devoto<sup>1)</sup>. 100 ccm filtrierter, sauer reagierender, evtl. angesäuertes Harn werden in einem Becherglase mit 80 g Ammonsulfat versetzt, bis zur Lösung des Salzes im Wasserbade unter Umrühren erwärmt und dann noch 30—40 Minuten in einem Dampfbad erhitzt. Das entstandene Eiweißkoagulum wird durch ein aschefreies, gewogenes Filter abfiltriert und weiter verfahren wie bei der vorigen Methode. Diese Methode, welche den Vorteil hat, daß ein Überschuß von Säure nicht schadet, gibt in gewöhnlichen Fällen gute Resultate, ist aber bei harnsäurereichen, konzentrierten Harnen, besonders wenn sie gleichzeitig wenig Eiweiß enthalten, nicht zu brauchen, da andere Harnbestandteile, besonders harnsaures Ammoniak, mit in das Koagulum gehen (Redelius<sup>2)</sup>).

Bestimmung des  
Globulins und  
Albumins.

3. Bestimmung des Globulins und Albumins nach Hofmeister und Pohl<sup>3)</sup>. 50 oder 100 ccm des mit Ammoniak bis zum Verschwinden der sauren Reaktion versetzten Harns werden in einem Becherglase mit dem gleichen Volumen einer gesättigten, neutral reagierenden Ammonsulfatlösung vermischt. Der Niederschlag (Globulin) wird nach mindestens 1stündigem Stehen auf ein gewogenes, aschefreies Filter gebracht und mit halbgesättigter Ammonsulfatlösung bis zum Verschwinden der Reaktion mit Ferrocyankalium + Essigsäure im Filtrat ausgewaschen. Man erhitzt jetzt Filter und Niederschlag einige Zeit auf 110°, wäscht das koagulierte Globulin mit kochendem Wasser, Alkohol und Äther aus und verfährt weiter, wie unter 1 angegeben. Die Menge des Albumins erfährt man durch Subtraktion der Globulinmenge von der Gesamteiweißmenge.

Colorimetrische  
Bestimmung  
des Eiweiß.

Eine colorimetrische Bestimmung des Eiweiß im Harn, die nach Angabe des Autors den gewichtsanalytischen Methoden kaum nachsteht, ist von Autenrieth<sup>4)</sup> angegeben worden. Sie beruht auf der Verwertung der Biuretprobe.

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 15, S. 465. 1891.

<sup>2)</sup> Malys Jahresber. d. Tierchem. 1892, S. 241.

<sup>3)</sup> Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 20, S. 434. 1886.

<sup>4)</sup> Münch. med. Wochenschr. Bd. 64, S. 241. 1917.

Eine nephelometrische Methode zur Bestimmung der Eiweißkörper im Harn ist von Folin und Denis<sup>1)</sup> angegeben worden. Nephelometrische Bestimmung des Eiweiß.

**Annähernde Bestimmung des Eiweiß.** Von den vielen Methoden, welche in der Absicht, die Eiweißbestimmung für klinische Zwecke einfacher zu gestalten, angegeben worden sind, hat keine Anspruch auf unbedingte Zuverlässigkeit. Die beste von ihnen, die Methode von Záhör<sup>2)</sup>, mit der man den Eiweißgehalt aus dem Unterschied der spezifischen Gewichte des Harns vor und nach der Koagulation durch Erhitzen unter Säurezusatz ermittelt, erfordert große Sorgfalt in der Ausführung und ist kaum einfacher als eine der oben beschriebenen. Im folgenden sollen das Verfahren von Roberts-Stolnikow, welches von Brandberg<sup>3)</sup> weiter ausgearbeitet worden ist, und das Verfahren von Tsuschija<sup>4)</sup>, welches dem vielfach benutzten Esbachschen<sup>5)</sup> ähnlich ist, aber überlegen zu sein scheint, beschrieben werden. Sie sind leicht und schnell auszuführen und unter Umständen für klinische Zwecke verwendbar. Annähernde Bestimmung des Eiweiß:

1. Nach Roberts-Stolnikow. Die Methode beruht auf der Beobachtung, daß die Hellersche Eiweißprobe (§ 325, 3), d. h. das Auftreten einer ringförmigen Trübung an der Berührungsfläche zwischen Salpetersäure und eiweißhaltiger Flüssigkeit, nach 2—3 Minuten schwach, aber deutlich sichtbar wird, wenn die Lösung 0,0033% Eiweiß enthält. Nach Roberts-Stolnikow.

Zur Ausführung nach Brandberg verdünnt man den Harn mit 9 Vol. Wasser und bereitet sich von diesem Zehntelharn eine Reihe von Versuchsflüssigkeiten bekannter Verdünnung. Darauf gießt man in eine Anzahl Reagensgläser aus einer Pipette einige Kubikzentimeter konzentrierte Salpetersäure mit der Vorsicht, daß die Wandungen oberhalb nicht benetzt werden, verteilt in die einzelnen Gläser mit einer sehr fein ausgezogenen Pipette etwa gleiche Volumina der verschieden verdünnten Harnlösungen, so daß beide Flüssigkeiten sich nicht mischen, und notiert die Zeit, wann in jeder Probe ein eben sichtbarer bläulichweißer Ring auftritt. Diejenige Probe, in welcher das innerhalb 2—3 Minuten geschieht, enthält 0,0033% Eiweiß. Man erfährt den Eiweißgehalt des unverdünnten Harns durch folgende Gleichung:  $p = \frac{k+x}{k \cdot 30}$ , in der  $p$  die

Prozente Eiweiß im unverdünnten Harn,  $k$  die zu jeder Probe verwendete Menge Zehntelharn und  $x$  die zur Verdünnung verwendete Wassermenge sind.

2. Nach Tsuschija. Man gießt vorsichtig in ein für diesen Zweck besonders graduiertes Rohr\* (Albuminometer) bis zu einer mit  $U$  bezeichneten Marke den filtrierten Harn (dessen spez. Gew. 1006—1008 betragen soll), darauf bis zu einer zweiten mit  $R$  bezeichneten Marke das Reagens (1,0 g frische, gut krystallisierte Phosphorwolframsäure, 5,0 reine konzentrierte Salzsäure, 100 g 96proz. Alkohol), kehrt vorsichtig 10—15 mal um und läßt nun 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehen. Jetzt liest man ab, bis zu welchem Teilstrich der Niederschlag reicht, und erfährt so die Quantität Eiweiß in Grammen für 1000 ccm Harn. Nach Tsuschija.

Ein Harn, welcher mehr als 6‰ Eiweiß enthält, ist zuvor mit gemessener Menge Wasser zu verdünnen.

#### *Nachweis von Albumosen und Peptiden im Harn.*

615. Während Pepton im Harn bis jetzt nicht einwandfrei nachgewiesen ist, ist das Vorkommen von Albumosen unter pathologischen Verhältnissen festgestellt.

1. Verfahren nach Hofmeister<sup>6)</sup>. Es erfordert ziemlich viel Zeit, garantiert aber einerseits eine vollständige Enteiweißung und bietet andererseits die Sicherheit, daß keine Albumosen aus Eiweiß abgespalten werden. Verfahren nach Hofmeister.

Der Harn wird mit saurem, phosphorsaurem Kali schwach angesäuert und nach Zufügen des doppelten Volumens 96proz. Alkohols 5—6 Stunden im nicht siedenden Wasserbad am Rückflußkühler erhitzt bei einer Temperatur im Innern des Kolbens von nicht über 80—90°. Nach dem Erkalten wird filtriert, das klare Filtrat bei 50—60° bis fast auf die Hälfte der ursprünglichen Harnmenge eingengt und nach Zufügen von etwas Schwefelsäure bei gelinder Wärme mit Zinksulfat gesättigt. Der Niederschlag wird abfiltriert, durch 24stündige Behandlung mit wasserfreiem Alkohol, der nach Bedarf mehrmals gewechselt wird, von Urobilin befreit und in Wasser gelöst. Die Lösung dient für die Biuretreaktion.

Empfindlichkeitsgrenze 0,01—0,02% Albumose bei Benutzung von 500 ccm Harn.

\*) Zu beziehen von Rudolf Schoeps, Halle a. S.

<sup>1)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 18, S. 273. 1914.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 12, S. 484. 1888.

<sup>3)</sup> Malys Jahresber. d. Tierchem. 1880, S. 265. — Vgl. auch Hammarsten: desgl. 1883, S. 217.

<sup>4)</sup> Zentralbl. f. inn. Med. 1908, S. 105 u. 605.

<sup>5)</sup> Gaz. méd. de Paris 1874, S. 61. — Esbach: Dosage de l'albumine. Paris 1886.

<sup>6)</sup> Morawitz u. Dietschy: Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 54, S. 92. 1906.

Verfahren nach  
Devoto.

2. Verfahren nach Devoto<sup>1)</sup> in der Modifikation von Bang<sup>2)</sup>. 10 ccm Harn (die vorherige Entfernung von Eiweiß und mucinähnlicher Substanz ist nicht nötig) werden mit 8 g Ammoniumsulfat in einem Reagensglase bis zur Lösung erhitzt, einen Augenblick aufgeköcht und sofort  $\frac{1}{2}$ —1 Minute zentrifugiert. Die Flüssigkeit wird abgossen, der Bodensatz mit einem Glasstabe zerrieben und mehrmals mit Alkohol (zur Entfernung des Urobilins) extrahiert, dann in wenig Wasser aufgeschlemmt, zum Sieden erhitzt und filtriert. Das Filtrat wird mit einigen Tropfen Schwefelsäure angesäuert, mit Chloroform geschüttelt (um das Urobilin völlig zu entfernen) und nach Abpipettieren des Chloroforms zur Biuretreaktion benutzt. Empfindlichkeitsgrenze bei 0,05—0,02% Albumose.

Aus dem normalen Harn sind auch Peptide isoliert worden. Über die Methodik ihrer Isolierung sowie über Proteinsäuren s. bei Edlbacher<sup>3)</sup>, wo auch weitere Literaturangaben zu finden sind.

#### Nachweis von Aminosäuren im Harn.

616. Während in normalem Harn von Aminosäuren bisher nur Glykokoll und Histidin mit Sicherheit nachgewiesen worden sind, erscheinen unter pathologischen Verhältnissen auch andere (Tyrosin, Leucin, Cystin, Valin, Lysin).

Der Nachweis von Aminosäuren im Harn kann auch dann von Bedeutung sein, wenn es sich darum handelt, auf ihre Ausscheidung nach künstlicher Einführung zu prüfen.

Von den Aminosäuren sind die in Wasser schwer löslichen Tyrosin, Leucin, Cystin und evtl. Valin aus dem Harn direkt zu gewinnen.

Die direkte Isolierung kann dann auf Schwierigkeiten stoßen, wenn der Harn nicht ganz frisch oder von vornherein reich an Ammoniak ist. Es empfiehlt sich, in solchen Fällen den Harn unter vermindertem Druck zur Trockne zu verdampfen, den Rückstand in Wasser zu lösen und wie unten angegeben zu verfahren.

Isolierung von  
Tyrosin u. Leucin.

Isolierung von Tyrosin und Leucin. Der Harn wird mit neutralem, darauf mit basischem Bleiacetat gefällt, solange Niederschlag entsteht, der Niederschlag filtriert und gründlich ausgewaschen, das Filtrat mit Schwefelwasserstoff behandelt, wieder filtriert und nach Entfernung des Schwefelwasserstoffs eingeengt. (War der Harn nicht klar, so wird er zuerst filtriert und der Filtrerrückstand auf etwa vorhandene Aminosäuren untersucht.) Tyrosin und Leucin krystallisieren aus und lassen sich durch fraktionierte Krystallisation trennen, indem sich zunächst das Tyrosin ausscheidet. Es ist durch seine Krystallform und den positiven Ausfall der Millonschen Reaktion ausgezeichnet (§ 213). Das Leucin führt man zweckmäßig durch Kochen mit frisch gefälltem Kupferhydroxyd in das Kupfersalz über, welches aus dem heißen Filtrat in blaßblauen Schüppchen krystallisiert und durch eine Kupferbestimmung identifiziert werden kann (§ 172). Für die Trennung von Tyrosin und Leucin eignet sich auch Auskochen mit Eisessig, wobei das Leucin viel leichter in Lösung geht (Habermann und Ehrenfeld<sup>4)</sup>).

In sehr seltenen Fällen scheidet sich Tyrosin bei sehr reichlichem Gehalt in feinen Krystallnadeln als Sediment aus. Es löst sich nach dem Abfiltrieren leicht in Ammoniak und krystallisiert beim Verdunsten des Ammoniaks wieder in seiner charakteristischen Form aus. Die Krystalle zeigen starke Millonsche Reaktion.

Isolierung von  
Valin.

Isolierung von Valin. Man verfährt wie bei der Isolierung von Tyrosin und Leucin und gewinnt es als Kupfersalz. Valin ist zwar leichter löslich als Tyrosin und als Leucin, es läßt sich aber auch als Kupfersalz durch fraktionierte Krystallisation nicht von letzterem trennen. Das optische Verhalten der isolierten

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 15, S. 465. 1891.

<sup>2)</sup> Skandinav. Arch. f. Physiol. Bd. 8, S. 272. 1898.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 120, S. 71. 1922; Bd. 127, S. 186. 1923; Bd. 131, S. 177. 1923.

<sup>4)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 37, S. 18. 1902/03.

Substanz kann jedoch darüber Aufschluß geben, ob Leucin oder Valin vorliegt. Leucin zeigt in 20proz. Salzsäure gelöst eine spezifische Drehung von  $+15,6^\circ$ , Valin von  $+28,8^\circ$ . Siehe auch § 479.

Isolierung von Cystin. Bei Cystinurie kann Cystin im Harn in Form von Steinen oder Sedimenten vorkommen. Sie lösen sich in Ammoniak leicht auf und beim Verdunsten erscheinen die charakteristischen 6seitigen Tafeln. Isolierung von Cystin.

Um im Harn gelöstes Cystin zu isolieren, behandelt man ihn am besten in der oben beschriebenen Weise mit Bleiacetat, auch auf die Gefahr, daß kleine Mengen Cystin durch das basische Bleiacetat gefällt werden. Aus dem eingengten Filtrat von Schwefelblei scheidet sich das Cystin bei längerem Stehen in der Kälte direkt ab oder nach Übersättigung mit Eisessig. Zur Entfernung beigemengten Tyrosins löst man die abfiltrierte Ausscheidung in 10proz. Ammoniak<sup>1)</sup>, filtriert, fügt vorsichtig Eisessig bis zur schwach, aber noch deutlich alkalischen Reaktion hinzu, filtriert vom sich ausscheidenden Tyrosin ab und übersättigt das Filtrat mit Eisessig: Cystin scheidet sich ab und kann nochmals derselben Behandlung unterzogen werden. Der Nachweis geschieht nach S. 256.

Isolierung von Hexonbasen. Sie geschieht mit Vorteil durch Fällung mit Phosphorwolframsäure. Die weitere Verarbeitung geschieht nach § 483. Isolierung von Hexonbasen.

Isolierung von Histidin. Engeland<sup>2)</sup> hat aus normalem menschlichen Harn diese Base dargestellt. Über das Verfahren s. im Original. Isolierung von Histidin.

Isolierung von Lysin. Ackermann und Kutscher<sup>3)</sup> gelang es, aus 80 l Harn eines Cystinurikers 2,6 g Lysinmonochlorid zu gewinnen. Über den Gang der Untersuchung s. die Originalarbeit. Isolierung von Lysin.

Isolierung von Aminosäuren nach E. Fischer und Bergell<sup>4)</sup> in Form ihrer  $\beta$ -Naphthalinsulfoverbindungen. Isolierung von Aminosäuren als  $\beta$ -Naphthalinsulfoverbindungen.

a) Nach Ignatowski<sup>5)</sup>. Man fällt eine größere Harnmenge (500 ccm) mit Bleizucker, entbleit das Filtrat mit Schwefelwasserstoff, dampft im Vakuum bei einer Temperatur unter  $45^\circ$  auf die Hälfte ein und schüttelt nach Zufügen von Salzsäure einige Stunden mit Äther. Nach Abtrennung des Äthers wird  $\beta$ -Naphthalinsulfochlorid (und zwar auf 500 ccm ursprünglichen Harn 2 g in 10proz. ätherischer Lösung) und Kalilauge bis zur leicht alkalischen Reaktion zugefügt und 9 Stunden geschüttelt. Nach 3 und 6 Stunden fügt man je 1 g Naphthalinsulfochlorid in ätherischer Lösung hinzu, und unter Umständen auch noch etwas Kalilauge, so daß die alkalische Reaktion erhalten bleibt. Nach 9 Stunden wird die ätherische Lösung abgetrennt und die wässrige Lösung mit Salzsäure unter Vermeidung eines Überschusses versetzt. Dabei fallen die Naphthalinsulfoaminosäuren aus. Beim Schütteln mit Äther (3 Stunden oder mehr) gehen sie in diesen über. Der von der ätherischen Lösung abgetrennte Harn wird wieder alkalisch gemacht und nochmals derselben Behandlung unterworfen.

Die vereinigten ätherischen Lösungen wäscht man gut mit Wasser, verdunstet den Äther, übergießt den Rückstand mit etwas kaltem Wasser, fügt Ammoniak bis zur schwach alkalischen Reaktion hinzu und läßt auf Eis stehen. Nachdem das in Ammoniak unlösliche Amid der Naphthalinsulfosäure sich gut abgesetzt hat, filtriert man und versetzt das klare Filtrat mit Salzsäure. Dabei

<sup>1)</sup> Friedmann: Beitr. f. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 3, S. 15. 1903. — Abderhalden u. Schittenhelm: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 45, S. 468. 1905.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 57, S. 49. 1908.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 57, S. 355. 1911.

<sup>4)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 35, 2, S. 3779. 1902.

<sup>5)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 42, S. 371. 1904. — Forssner: desgl. Bd. 47, S. 15. 1906.

fallen die Naphthalinsulfoaminosäuren wieder aus. Durch Umkrystallisieren aus heißem Wasser kann man sie krystallinisch erhalten, indessen ist eine Abtrennung der einzelnen Individuen aus diesem Gemenge bisher wohl nur bei der Glykokollverbindung gelungen. Das Verfahren, welches auf der Unlöslichkeit des Bariumsalses des  $\beta$ -Naphthalinsulfoglycins in kaltem Wasser beruht, besteht darin, daß man das Gemenge mit der etwa 20fachen Menge Wasser übergießt, vorsichtig mit so viel Ammoniak versetzt, als zur Lösung erforderlich ist, das überschüssige Ammoniak wegkocht und nun mit Bariumchlorid versetzt. Aus der ausgefallenen und abgesaugten Bariumverbindung kann man durch Umsetzen mit Salzsäure in der Kälte die Glycinverbindung erhalten, deren Identifizierung nach § 167 erfolgt (Abderhalden und Bergell<sup>1)</sup>).

Über weitere Versuche, aus diesem Gemenge Aminosäuren zu erhalten, s. Ignatowski<sup>2)</sup>, Wohlgemuth<sup>3)</sup>, Embden und Reese<sup>4)</sup>.

b) Nach Embden und Reese<sup>5)</sup>. Sie verfahren insofern abweichend, als sie die Reaktion in stärker alkalischer Lösung (auf 100 ccm neutralisierten Harn noch 2—4 ccm Normalnatronlauge) vornehmen und 2 Tage lang unter öfterem Alkali- und Reagenszusatz (4—6 mal täglich) bei etwa 30° schütteln. Sie erhalten dabei auch aus normalem Harn, welcher bei dem oben geschilderten Verfahren in der Regel keine Aminosäuren liefert, reichliche Mengen von Reaktionsprodukten, unter denen die Glycinverbindung isoliert werden konnte.

Isolierung von  
Aminosäuren  
als Ester.

Isolierung von Aminosäuren mit Hilfe des Esterverfahrens von E. Fischer aus dem im Vakuum zur Trockne verdampften Harn. Über dieses Verfahren, mit Hilfe dessen eine Trennung von Aminosäuren jedenfalls am besten gelingen dürfte, s. Abderhalden<sup>6)</sup>.

Isolierung von  
Aminosäuren  
als Hydantoine.

Isolierung von Aminosäuren nach Lippich<sup>7)</sup> in Form ihrer Hydantoine. Mit diesem Verfahren können, soweit die Erfahrungen reichen, Leucin, Tyrosin, Phenylalanin, Valin, Alanin(?) und, falls sie vorkommen würde, Aminobuttersäure isoliert und nachgewiesen werden.

Prinzip. Beim längeren Kochen stark eingeeengten Harns, der freie Aminosäuren enthält, treten diese mit dem Harnstoff unter Ammoniakabspaltung und Bildung von Uraminosäuren in Reaktion. Diese können von den übrigen Harnbestandteilen durch Kochen mit Salz- oder Schwefelsäure, wobei sie in ihre Anhydride übergehen, und Ausäthern getrennt werden. Nach Vertreibung des Äthers werden die Hydantoine aus heißem Wasser umkrystallisiert und nach ihren physikalischen Konstanten oder evtl. durch Elementaranalyse identifiziert.

Ausführung. 100 ccm Harn, der von etwa vorhandenem Eiweiß vorher befreit worden ist (§ 567), werden auf dem Wasserbad stark eingeeengt. Der Rückstand wird mit wenig Wasser aufgenommen und am Rückflußkühler mehrere Stunden lang gekocht. Zur Entfernung des entstehenden Ammoniaks leitet man ständig einen Wasserstoffstrom durch. Noch einfacher ist die dauernde Durchleitung von Dampf, man muß dann aber dafür Sorge tragen, daß die Flüssigkeitsmenge nicht zu stark zunimmt, am besten durch eine Einrichtung wie bei der Wasserdampfdestillation. Ein evtl. entstandener Niederschlag wird abfiltriert und das Filtrat mit Salz- oder Schwefelsäure stark angesäuert und einige Minuten gekocht. Nach dem Abkühlen kann ein Teil der in kaltem Wasser schwer löslichen

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 39, S. 464. 1903.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 42, S. 387. 1904.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 44, S. 79. 1905.

<sup>4)</sup> Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 7, S. 420. 1906.

<sup>5)</sup> Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 7, S. 411. — Embden u. Marx: Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 2, S. 308. 1908.

<sup>6)</sup> Abderhalden u. Barker: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 42, S. 524. 1904. — Abderhalden u. Rona: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 44, S. 205. 1905.

<sup>7)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 90, S. 145. 1914.

Anhydride (besonders das des Leucin) gleich ausfallen und abfiltriert werden. Man extrahiert nun die Flüssigkeit am besten mit Hilfe eines Extraktionsapparates von kleineren Dimensionen (50—100 ccm Fassungsraum) möglichst ausgiebig mit Äther. Dieser wird abgedampft und der Rückstand aus heißem Wasser (evtl. nach Entfärben mit Tierkohle) umkrystallisiert.

Gelegentlich kocht Lippich, da größere Mengen Harnstoff die Bildung der Uraminosäuren erschweren, den stark eingeeengten Harn mit wenig Barytwasser. Ein Teil des überschüssigen Harnstoffes wird so zerstört. Man läuft dabei aber Gefahr, daß bei zu langem Kochen ein Verlust an Uraminosäure eintritt. Nimmt während des Kochens die Ammoniakentwicklung ab, so muß daher etwas Harnstoff zugefügt werden. Nach genügend langem Kochen wird aus der noch heißen Flüssigkeit das Barium durch Einleiten von Kohlensäure ausgefällt. Das Filtrat wird angesäuert und wie oben weiterbehandelt.

Die Methode eignet sich gut zum Nachweis kleiner Mengen der oben angegebenen Aminosäuren, besonders wenn diese einzeln im Harn vorhanden sind. Es lassen sich mit ihr nachweisen: 0,01—0,02 g Leucin in 100 ccm Harn, und nach Schumm und Papendieck<sup>1)</sup> 0,01 g Tyrosin in 100 ccm Harn. Größere Mengen Zucker stören den Nachweis.

#### *Bestimmung von Cystin im Harn.*

617. 1. Nach Gaskell<sup>2)</sup>. Der von Cystinsedimenten abfiltrierte Harn (z. B. 200 ccm) wird mit Ammoniak deutlich alkalisch gemacht und mit Calciumchlorid zur Entfernung der Oxal- und Phosphorsäure ausgefällt, das Filtrat (+ Waschwasser) in einem Becherglas mit dem gleichen Volumen Aceton versetzt und mit Essigsäure gerade sauer gemacht. Nach 3—4 tägigem Stehen wird der Niederschlag auf ein Filter gebracht, mit destilliertem Wasser gewaschen und dann auf dem Filter mit 2½proz. Ammoniak gelöst. Die ammoniakalische Lösung wird wieder mit dem gleichen Volum Aceton versetzt und mit Essigsäure angesäuert. Nach 12—24 Stunden sammelt man die entstandene Fällung auf gewogenem Filter, trocknet bei etwa 80° und wägt. Da das Cystin hygroskopisch ist, muß die Wägung im Wägegläschen geschehen. Bestimmung nach Gaskell.

Nach Kondo<sup>3)</sup> erhält man mit dieser Methode nur etwa 50—60% des im Harn vorhandenen Cystins. Als Verbesserung der Methode empfiehlt er, die Fällung statt mit 1 Vol. Aceton mit ½ Vol. Aceton + ½ Vol. Äthylalkohol + ⅓ Vol. Äther auszuführen.

2. Nach Looney<sup>4)</sup> (colorimetrisch). Bestimmung nach Looney.

Prinzip. Cystin gibt mit Phosphorwolframsäure bei Gegenwart von Na-Sulfit eine tiefblaue Farbe. Harnsäure und andere reduzierende Substanzen im Harn geben nach Zusatz von Phosphorwolframsäure ebenfalls eine Blaufärbung, einerlei, ob mit oder ohne Zusatz von Na-Sulfit. Der Gehalt an Cystin im Harn wird aus der Intensitätszunahme der Farbe nach Zusatz von Na-Sulfit bestimmt.

Erforderliche Lösungen. 1. Standardlösung: 5proz. Schwefelsäure, die in 1 ccm 2 mg reines Cystin enthält. Diese Lösung hält sich unbegrenzt. 2. Gesättigte Sodalösung. 3. 20proz. Na-Sulfitlösung. 4. 20proz. Lithiumsulfatlösung. 5. Harnsäurereagens nach Folin und Denis (§ 704, 1).

Ausführung. Man braucht 3 Meßkolben von je 100 ccm Inhalt. In den 1. Kolben gibt man 1 ccm der Standardlösung, 20 ccm der Sodalösung, 10 ccm

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 121, S. 1. 1922.

<sup>2)</sup> Journ. of physiol. Bd. 36, S. 142. 1907/08.

<sup>3)</sup> Kondo: Über Cystinbestimmung im Harn und Alkalitherapie bei Cystinurie. Dissert. München 1915.

<sup>4)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 54, S. 171. 1922.

der Sulfitlösung und 1 ccm der Lithiumsulfatlösung. Letztere hat den Zweck, die Mischung in Lösung zu erhalten. In den 2. Kolben gibt man anstatt der Standardlösung 1—10 ccm (meist 2 ccm) Harn und verfährt sonst genau wie bei Kolben 1. Den 3. Kolben behandelt man genau wie 2., nur läßt man die Sulfitlösung weg. Hierauf kommen in jeden Kolben 3 ccm des Harnsäure-reagens. Alle Kolben werden gut umgeschüttelt und 5 Minuten lang ruhig hingestellt. Dann wird rasch bis zur Marke aufgefüllt und gut gemischt. In einem Duboscq'schen Colorimeter werden die Lösungen 2. und 3. mit der Standardlösung, die auf 20,0 mm eingestellt ist, verglichen. Die Ablesung darf nicht später als 8 Minuten nach Zugabe des Harnsäurereagens erfolgen. Deswegen muß man zu jeder einzelnen Bestimmung auch den 1. Kolben neu füllen. Der Wert für das Cystin wird durch Subtraktion des Wertes des 3. Kolbens von dem Werte des 2. Kolbens erhalten. Man wähle die Harnmenge so, daß die Ablesung am Colorimeter zwischen 13,0 und 27,0 erfolgt. Enthält der Harn so viel Cystin, daß dieses als Niederschlag ausfällt, so ist der einer bestimmten Harnmenge entsprechende Niederschlag abzufiltrieren oder abzuzentrifugieren. Er wird dann in einer geringen Menge 5proz. Schwefelsäure gelöst, auf ein bestimmtes Volumen verdünnt und wie der Harn selbst nach obiger Methode behandelt. Der so gefundene Wert ist in entsprechender Weise zu dem Werte des vom Niederschlag abfiltrierten Harnes zu addieren. Enthält der Harn Eiweiß, so muß dieses zuerst entfernt werden, am besten durch eine 20proz. Lösung von Trichloressigsäure.

Looney fand bei Analysen, die er nach dieser Methode ausführte, für 500 mg Cystin, die er zu 370 ccm normalen Harnes unter längerem Schütteln hinzufügte, einen Wert, der 501,4 mg Cystin entsprach.

**Bestimmung des Aminosäurenstickstoffs im Harn nach Krüger und Schmid<sup>1)</sup>.**

618. Bei dieser Methode wird der Stickstoff der Hippursäure mit als Aminosäurestickstoff ermittelt. Sie gibt aber auch, abgesehen davon, zu hohe Werte, weil sie jedenfalls einen Teil des Stickstoffs der Oxyproteinsäure, des Kreatins und vielleicht auch anderer Harnbestandteile mitbestimmt.

Prinzip. Die Methode beruht darauf, daß die Aminosäuren durch Phosphorwolframsäure nicht gefällt werden und beim Erhitzen mit Schwefelsäure im geschlossenen Rohr auf 160—180° kein Ammoniak abspalten.

Ausführung. 50 ccm Harn werden genau, wie es S. 704 angegeben, mit Phosphorwolframsäure gefällt und nach 2 Minuten filtriert. In einer Probe des Filtrats, welche 5 ccm Harn entspricht, bestimmt man den Gesamtstickstoff nach Kjeldahl (§ 558, a). Eine zweite gleichgroße Probe wird im Rohr mit dem halben Volumen konzentrierter Schwefelsäure 3—4 Stunden (die Zeit des Anwärmens nicht mitgerechnet) auf 160—180° erhitzt. Den Rohrinhalt gießt man in einen Destillationskolben, spült das Rohr der Reihe nach mit Wasser, wenig Natronlauge (um den an den Wandungen sitzenden Niederschlag von phosphorwolframsaurem Ammoniak zu lösen) und wieder mit Wasser nach, macht mit Natronlauge\*) alkalisch unter Vermeidung eines großen Überschusses (für 5 ccm konzentrierte Schwefelsäure genügen 20—22 ccm 33proz. Natronlauge), destilliert, fängt das übergehende Ammoniak in 50 ccm  $\frac{n}{10}$ -Schwefelsäure auf und bestimmt die Stickstoffmenge durch Zurücktitrieren mit  $\frac{n}{10}$ -Lauge. Zieht man den erhaltenen Stickstoffwert von dem nach Kjeldahl gefundenen ab, so erfährt man die Menge Stickstoff, welche in Form von Aminosäuren (bzw. von Aminosäureverbindungen wie z. B. Hippursäure) in 5 ccm Harn enthalten ist.

Pfaundler<sup>2)</sup> bewirkt die Zerstörung der im Phosphorwolframsäurefiltrat neben den Aminosäuren vorhandenen stickstoffhaltigen Bestandteile durch 18—20ständiges Erhitzen mit kristallisierter Phosphorsäure auf 150°.

\*) Ist mit der Anwesenheit von Cystin zu rechnen, so macht man mit Natronlauge annähernd neutral und fügt einen großen Überschuß von Magnesia usta hinzu.

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 31, S. 556. 1901.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 30, S. 75. 1900.



**Bestimmung des Aminosäuren- und peptidgebundenen Stickstoffs im Harn.**

619. Von Bedeutung für die Bestimmung sind folgende Methoden:

1. **Formoltitration nach Sørensen-Henriques<sup>1)</sup>**. Prinzip und Technik der Titration s. § 490. Über die Einwände von Malfatti<sup>2)</sup> und Sørensens Entgegnungen s. Originalarbeiten. Formoltitration nach  
Sørensen-  
Henriques.

Für die Bestimmung im Harn ist nur folgendes hervorzuheben: Die Formoltitration wird durch Phosphate und Carbonate gestört, Phosphor- und Kohlensäure müssen daher immer vor der Titration entfernt werden.

a) Bestimmung des Aminosäurenstickstoffs. Zur Entfernung der Phosphate und Carbonate pipettiert man 50 ccm Harn in einen 100-ccm-Meßkolben, setzt 1 ccm Phenolphthaleinlösung und 2 g festes Chlorbarium zu. Nach der Lösung des letzteren wird eine gesättigte Barytlösung bis zur roten Farbe und daraufhin noch 5 ccm derselben Lösung zugegeben und der Kolben bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt. Nach gutem Umschütteln läßt man 15 Minuten stehen und filtriert dann durch ein trockenes Filter. Da auch das Ammoniak, das bei der Formoltitration mitbestimmt würde, besonders bei höherer Konzentration, wie de Jager<sup>3)</sup> gezeigt hat, die Titration der Aminosäuren beeinträchtigt, so wird dieses zuvor entfernt und gesondert, am besten nach Krüger-Reich (§ 578, 1), bestimmt. Zu diesem Zwecke werden 80 ccm des obigen Filtrates im Vakuum vom Ammoniak befreit. Den Destillationsrückstand löst man in einigen Kubikzentimetern etwa normaler Salzsäure und saugt zur Entfernung der letzten Spuren von Kohlensäure CO<sub>2</sub>-freie Luft im Vakuum durch. Die Lösung wird dann mittels sicher CO<sub>2</sub>-freien Wassers quantitativ in einen 100 ccm-Meßkolben gebracht, wie bei der Formoltitration vorgeschrieben, gegen Lackmus (Herstellung § 490) neutralisiert und bis zur Marke mit CO<sub>2</sub>-freiem Wasser aufgefüllt. Ein aliquoter Teil (z. B. 40 ccm = 16 ccm Harn) dient dann zur Titration.

Will man das Ammoniak nicht vorher entfernen (wie das bei normalem Harn mit seinem geringen Ammoniumgehalt zulässig ist), so bringt man das erste Filtrat gleich in einen 100-ccm-Meßkolben und verfährt wie oben beschrieben.

b) Bestimmung des peptidgebundenen Stickstoffs. Auch der peptidgebundene Stickstoff kann durch Formoltitration nach hydrolytischer Spaltung der Peptidbindungen bestimmt werden. Da hierbei aber auch die Hippursäure gespalten und Glykokoll gebildet wird, ist diese vorher zu entfernen.

50 ccm Harn werden mit 5 ccm  $\frac{1}{5}$ -HCl angesäuert und die Hippursäure 6 mal mit Essigäther ausgeschüttelt. Der Essigäther wird 1 mal mit Wasser ausgewaschen und das Waschwasser zu dem Harn gefügt. Der so von Hippursäure befreite Harn wird im Kjeldahlkolben mit 50 ccm konzentrierter HCl 3 Stunden lang gelinde gekocht und das Hydrolysat weiterhin auf dem Wasserbade eingengt. Man führt dann quantitativ in einen 50 ccm-Kolben über und entfernt die Phosphate wie unter a). Reichlicher Zusatz von NaOH und BaCl<sub>2</sub> ist nötig, da sich bei der Hydrolyse viel Ammoniak gebildet hat. 40 ccm des Filtrats (= 40 ccm Harn) kommen in einen 100 ccm-Meßkolben, werden mit HCl angesäuert und, falls Entfärbung nötig sein sollte, nach Sørensen und Jessen-Hansen<sup>4)</sup> durch Zutropfen von 20 ccm etwa  $\frac{1}{3}$ -AgNO<sub>3</sub>-Lösung entfärbt. Auffüllen bis zur Marke mit CO<sub>2</sub>-freiem Wasser und filtrieren! Aus 80 ccm des Filtrates entfernt man das Ammoniak wie oben angegeben. Der Destillationsrückstand wird weiterhin wie oben behandelt. Man füllt wieder auf 100 ccm auf und titriert 50 ccm, die 16 ccm Harn entsprechen. Die Differenz des unter a und b gefundenen Aminostickstoffs ergibt die in 16 ccm Harn enthaltene peptidgebundene Stickstoffmenge.

c) Bestimmung des Hippursäurestickstoffs. Auch die unter b entfernte Hippursäure kann durch die Formoltitration leicht bestimmt werden. Man destilliert den Essigäther ab und hydrolysiert den Rückstand 3 Stunden lang in einem Kjeldahlkolben mit 50 ccm 30 proz. HCl durch gelindes Kochen. Die gesamte Hippursäure wird dabei in Benzoesäure und Glykokoll gespalten. Letzteres läßt sich dann nach Abdampfen des größten Teils der Salzsäure und Neutralisieren ohne weiteres durch die übliche Formoltitration bestimmen.

2. **Gasometrische Bestimmung nach van Slyke<sup>5)</sup>**. Prinzip. Eine freie NH<sub>2</sub>-Gruppe gibt mit salpetriger Säure 2 N nach dem Schema  $R-NH_2 + ONOH \rightarrow R-OH + H_2O + N_2$ . Damit läßt sich jede freie Aminogruppe quantitativ erfassen; über die Ausführung und die Apparatur s. § 492 und die Originalarbeiten. Bestimmung nach  
van Slyke.

Für die Ausführung im Harn ist noch besonders auf folgende Punkte hinzuweisen:

a) Bestimmung des freien Aminosäurestickstoffs. Harnstoff gibt obige Reaktion auch, wenn auch viel langsamer als Aminosäuren. Man entfernt ihn deswegen am besten

<sup>1)</sup> Henriques: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 60, S. 1. 1909. — Henriques u. Sørensen: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 63, S. 27. 1909; Bd. 64, S. 120. 1910.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 61, S. 499. 1909; Bd. 66, S. 152. 1909.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 62, S. 333. 1909.

<sup>4)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 7, S. 415. 1907.

<sup>5)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 43, 3, S. 3170. 1910; Bd. 44, 2, S. 1684. 1911. Journ. of biol. chem. Bd. 16, S. 125. 1913. — Levene u. D. van Slyke: Journ. of biol. chem. Bd. 12, S. 301. 1912.

durch Einwirkung von Sojabohnenurease<sup>1</sup>). Das Ammoniak, das die obige Reaktion ebenfalls gibt, wird durch Destillation, Luftdurchströmen oder Eindampfen zur Trockne vertrieben. Ein aliquoter Teil des Rückstandes wird zur gasometrischen Bestimmung benutzt. Nach den letzten Angaben von van Slyke kann man auch unter Benutzung der Eigenschaft des Harnstoffs, nur langsam mit salpetriger Säure zu reagieren, auf seine vorherige Entfernung verzichten. Doch dürfte sich dieses Verfahren, das in Abderhaldens biolog. Arbeitsmethoden Abt. 1, Teil 7, S. 287 genauer beschrieben ist, kaum empfehlen.

b) Bestimmung des gebundenen Aminosäurestickstoffs. Hydrolyse des Harns mit konzentrierter Schwefelsäure (75 ccm Harn werden mit 25 ccm konzentrierter  $H_2SO_4$  1½ Stunde im Autoklaven auf 175° erhitzt, wobei auch der Harnstoff unter Bildung von Ammoniak gespalten wird), Entfernen des Ammoniaks. Gasometrische Bestimmung. Die Differenz zwischen den nach a) und b) gefundenen Werten ergibt den gebundenen Aminosäurestickstoff, wobei der in der Hippursäure und etwa vorhandenem Eiweiß enthaltene miteinbegriffen ist. Hippursäure läßt sich vorher nach 1b entfernen.

c) Bestimmung des Hippursäurestickstoffs. Nach Isolierung und Hydrolyse der Hippursäure nach 619, 1b) und c) läßt er sich ebenfalls gasometrisch bestimmen.

#### *Nachweis von Putrescin und Cadaverin im Harn.*

Für diese Zwecke dient die S. 203 angegebene Methode.

#### *Nachweis und Bestimmung von Fermenten im Harn.*

620. Schon im normalen Harn kommen wenigstens in Spuren proteolytische Fermente (Pepsin, Erepsin, meist auch Trypsin), Lab, Diastase und Lipase vor. Unter besonderen pathologischen Verhältnissen sind sie wesentlich vermehrt. Norgaard<sup>2</sup>) hat im normalen Harn entsprechend den wenigen Epithelien und Leukozyten, die darin vorkommen, auch Spuren einer Katalase nachgewiesen. Bei krankhafter Steigerung der zelligen Elemente steigt der Katalasegehalt entsprechend an. Die Menge des entwickelten Sauerstoffs gibt ein Maß für die Fermentmenge.

Nachweis der proteolytischen Fermente und annähernde Bestimmung ihrer Wirksamkeit nach Hedin<sup>3</sup>). Prinzip: 3 Tage lang gegen fließendes Leitungswasser dialysierter Harn kommt bei 37° zur Digestion: 1. mit Casein bei stark saurer Reaktion ( $p_H = 1,64$ ), 2. mit Casein bei alkalischer Reaktion ( $p_H = 8$ ) und 3. mit Wittes Pepton bei alkalischer Reaktion ( $p_H = 8$ ). Nach 4 Tagen wird das Eiweiß durch Gerbsäure gefällt und die proteolytische Wirkung der Fermente durch N-Analysen im Filtrat bestimmt. Einzelheiten der Methode, Ausschließung von Fehlerquellen (Verlust bei der Dialyse, Bakterienwirkung) s. bei Hedin. Bei eiweißhaltigem Harn lassen sich nach Hedin auch durch fraktionierte Fällung der Eiweißarten verschieden wirkende Fermente ziemlich weitgehend trennen. Mit der Globulinfraktion fällt in der Hauptsache eine primäre Protease, d. h. ein Ferment, das wie Pepsin die Eiweißspaltung einleitet. Die Albuminfraktion ist frei von primärer Protease und enthält nur Erepsin.

Nachweis und Bestimmung des diastatischen Fermentes. Vgl. hierzu § 515.

Nachweis und Bestimmung der Lipase nach Tanfani<sup>4</sup>). 1 ccm Harn wird unter Zusatz von 10 ccm einer 1proz. Lösung von Monobutyryn Merck und 2 Tropfen alkoholischen Phenolphthaleins nach sorgfältiger Neutralisation auf ½ Stunde in den Brutschrank gebracht und dann mit n/4-Natronlauge bis zur Neutralisation titriert.

#### *Nachweis von Farbstoffen im Harn.*

621. Urochrom s. § 301.

Urochromogen (§ 302). Ein urochromogenhaltiger Harn gibt die Ehrlich-

Nachweis von Urochromogen.

<sup>1</sup>) Marshall: Journ. of biol. chem. Bd. 14, S. 283. 1913.

<sup>2</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 38, S. 501. 1919.

<sup>3</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 112, S. 252. 1921.

<sup>4</sup>) Gazz. degli osped. e delle clin. Bd. 31, S. 1521. 1910; zit. nach Pribram u. Löwy: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 76, S. 489. 1912.

sche Diazoreaktion: Rotfärbung und Auftreten eines roten Schaumes bei Schütteln mit dem gleichen Volumen des Reagens und Zusatz von Ammoniak (S. 681).

**Uroerythrin** § 304, **Urorosein** § 305, **Nephrorosein** § 306.

**Urobilin.** 1. Man prüft nach Zusatz einiger Tropfen Schwefelsäure spektroskopisch (§ 303). Nachweis von Urobilin.

2. Man filtriert nach Zusatz von Ammoniak, setzt Chlorzinklösung hinzu und prüft auf grüne Fluoreszenz und Absorptionsstreifen (§ 303) (Jaffe).

3. Man säuert 10—20 ccm mit einigen Tropfen Salzsäure an und schüttelt mit 5—10 ccm Amylalkohol gelinde durch. Die klar abgegossene amylnalkoholische Lösung wird spektroskopisch untersucht. Nach Zusatz einiger Tropfen einer Lösung, die 1 g Chlorzink in 100 ccm ammoniakalischem Alkohol enthält, entsteht grüne Fluoreszenz (Nencki und Rotschy<sup>1</sup>).

4. Man versetzt den Harn (nach Aufschütteln eines etwaigen Bodensatzes) mit dem gleichen Volumen von vorher durchgeschütteltem, 10% Zinkacetat enthaltendem absoluten Alkohol, filtriert und prüft das Filtrat auf Fluoreszenz und Absorptionsstreifen (§ 303) (Schlesinger<sup>2</sup>).

**Urobilinogen** (§ 297). Ein Harn, welcher diesen Farbstoff enthält, gibt eine Reaktion mit dem Ehrlichschen Dimethylaminobenzylaldehydreaagens (Anhang): Rosa bis intensiv rote Farbe (je nach der Urobilinogenmenge) beim Zusammenbringen von 10 ccm Harn mit 1 ccm des Reagens. Der Farbstoff zeigt einen Streifen zwischen *D* und *E* und löst sich in Amylalkohol (s. § 297). Nachweis von Urobilinogen.

Über die Methoden zur Darstellung und quantitativen Bestimmung von Urobilinogen und Urobilin s. § 297 u. § 303.

**Gallenfarbstoffe.** Aus stark ikterischem Harn kann man oft ohne weiteres durch Schütteln mit Chloroform, Abgießen und Verdunsten desselben, nochmaliges Lösen des Rückstandes in wenig Chloroform und Verdunstenlassen auf dem Uhrglase rote rhombische Prismen von Bilirubin erhalten, welche mit Salpetersäure mikroskopisch sehr schön die Regenbogenfarben zeigen, in Alkalien sich leicht lösen und an der Luft bald eine grüne Färbung geben.

Von den vielen zum Nachweis angegebenen Reaktionen seien die folgenden angeführt. Für Harn, die nicht zuviel andere Farbstoffe enthalten, sind alle brauchbar; die unter 4 und 5 aufgeführten sind sehr viel empfindlicher als die anderen und gestatten noch 0,01—0,02 mg Gallenfarbstoff in 10 ccm Harn nachzuweisen. In dunklen, indicanreichen Harnen ist die Rosinsche Probe den beiden ersten vorzuziehen, und bei gleichzeitiger Anwesenheit von Blutfarbstoff, Methämoglobin, viel Urobilin usw. wendet man am besten die Probe 4 oder 5 an. Nachweis von Gallenfarbstoffen.

1. Gmelinsche Probe (§ 295) in der Modifikation von Rosenbach<sup>3</sup>). Der Harn wird durch ein kleines Filter, evtl. mehrmals, filtriert, das Filter ausgebreitet, oberflächlich mit trockenem Filtrierpapier abgetupft und mit einzelnen Tropfen Salpetersäure bespritzt: es bilden sich im Umkreis der Tropfen konzentrische Ringe, die von innen nach außen gelbrot, rot, violett, blau und grün gefärbt erscheinen.

2. Hammarstensche Probe<sup>4</sup>). Man vermischt 1 Tl. des S. 422, 2 beschriebenen Säuregemisches mit 4 Tl. Alkohol und verfährt unter Benutzung des Harns statt der Bilirubinlösung genau wie a. a. O. beschrieben.

3. Rosinsche Probe<sup>5</sup>). Man überschichtet den Harn (bei alkalischer Reaktion nach Ansäuern mit Essigsäure) in einem Reagensglase mit 2—3 ccm einer etwa 1proz. alkoholischen Jodlösung. Sofort oder nach 1 Minute tritt

<sup>1</sup>) Monatshefte f. Chem. Bd. 10, S. 568. 1889. <sup>2</sup>) Dtsch. med. Wochenschr. 1903, S. 561.

<sup>3</sup>) Zentralbl. f. med. Wissensch. 1876, S. 5.

<sup>4</sup>) Skandinav. Arch. f. Physiol. Bd. 9, S. 313. 1899.

<sup>5</sup>) Berl. klin. Wochenschr. 1893, S. 106.

an der Grenzschichte ein grasgrüner Ring auf, der sich längere Zeit, oft stundenlang, hält.

4. Huppertsche Probe<sup>1)</sup>. Dieselbe wird nach Salkowski<sup>2)</sup> und J. Munk<sup>3)</sup> am besten in folgender Weise ausgeführt: Man macht 10 ccm Harn mit Sodalösung alkalisch, setzt Calciumchloridlösung so lange zu, bis die über dem Niederschlag stehende Flüssigkeit nach dem Umschütteln die normale Harnfarbe zeigt, filtriert durch ein kleines Filter, wäscht mit Wasser aus, übergießt Filter und Niederschlag in kleiner Porzellanschale mit 10 ccm salzsäurehaltigem Alkohol (5 ccm konzentrierte Salzsäure auf 100 ccm Alkohol) und erhitzt die Lösung nach Zusatz einer Spur Ferrichlorid im Reagensglase: grüne bis blaue Färbung.

5. Modifizierte Hammarstense Probe<sup>4)</sup>. Man gießt 10 ccm Harn in ein etwa 15 ccm fassendes Rohr einer Zentrifuge, setzt einige Kubikzentimeter Chlorbariumlösung (bei Gegenwart reichlicher Mengen anderer Farbstoffe besser Chlorcalciumlösung) zu, mischt und zentrifugiert  $\frac{1}{2}$ —1 Minute. Jetzt gießt man die etwas trübe Flüssigkeit vom Bodensatz ab, bringt 1—2 ccm des Reagens\*) hinzu, schüttelt stark und zentrifugiert von neuem etwa  $\frac{1}{2}$  Minute (bei Verwendung von Chlorcalcium ist das zweite Zentrifugieren unnötig): grüne Lösung.

**Blut und Blutfarbstoffe.** Bei Blutungen in die Harnwege findet sich Blut im Harn und verleiht ihm, wenn die Menge nicht zu gering ist, eine braunrötliche Farbe. Man erkennt es, wenn man das Sediment, welches sich binnen einiger Stunden absetzt, auf Blutkörperchen untersucht.

Außerdem kann Blutfarbstoff in gelöstem Zustande in den Harn übergehen, und zwar handelt es sich nach Hoppe-Seyler in allen Fällen im frisch sezernierten Harn um Methämoglobin, das sich allerdings leicht durch Fäulnis, sei es schon in der Blase, sei es nach der Entleerung, in Hämoglobin umwandelt, aus dem weiter Oxyhämoglobin entsteht. Nach anderen kann auch der frisch sezernierte Harn Hämoglobin enthalten. Ein solcher Harn kann rot, braun bis schwarz aussehen.

Zum Nachweis dienen die Reaktionen 1—3, von denen die Probe 2 sehr empfindlich ist, die Probe 1 ebenfalls, wenn die Eigenfarbe des Harns gestattet, eine 10—20 cm dicke Schicht zu spektroskopieren. Die Probe 3 soll nach Schumm<sup>5)</sup> weniger empfindlich sein, auch gelegentlich von anderen Farbstoffen gegeben werden.

1. Spektroskopische Prüfung. Wegen des Spektrums des Oxyhämoglobins und Methämoglobins s. die Spektraltafel. Beim Zufügen von Schwefelammonium gehen beide Spektren in das Spektrum des Hämoglobins über, aus dem beim Schütteln mit Luft wieder das Spektrum des Oxyhämoglobins entsteht. Bei Harnen, welche sehr wenig Methämoglobin enthalten, können Absorptionsstreifen erst nach Zusatz von Schwefelammonium und Schütteln sichtbar werden, da Methämoglobin spektroskopisch weniger scharf nachweisbar ist als Oxyhämoglobin.

Sehr kleine Mengen von Blut oder Blutfarbstoff lassen sich noch in folgender Weise nachweisen: Eine größere Menge (100 ccm) Harn wird nach Zusatz von etwas Eiweißlösung (oder eiweißhaltigem Harn) zum Kochen erhitzt, das Koagulum abfiltriert, ausgewaschen, abgepreßt und mit schwefelsäurehaltigem Alkohol zerrieben. Die Mischung wird erwärmt, filtriert und das Filtrat nach Zusatz von Natronlauge und Schwefelammonium auf Hämochromogen (Spektraltafel) geprüft.

\*) S. oben unter 2; bei sehr geringem Gallenfarbstoffgehalt nimmt man das Säuregemenge im Verhältnis von 1 : 99 (statt 1 : 19).

<sup>1)</sup> Arch. f. Heilk. Bd. 8, S. 351 u. 476. 1867.

<sup>2)</sup> Praktikum der physiologischen und pathologischen Chemie. 4. Aufl. S. 193. 1912.

<sup>3)</sup> Arch. f. Anat. u. Physiol. (Physiol. Abt.) 1898, S. 361.

<sup>4)</sup> Skand. Arch. f. Physiol. Bd. 9, S. 313. 1899.

<sup>5)</sup> Nach den Angaben von Schumm: Zentralbl. f. d. ges. Physiol. u. Pathol. d. Stoffw., N. F., Bd. 3, S. 404. 1908.

2. Guajakharzprobe<sup>1)</sup>. Man fügt zu 6—8 ccm gekochtem\*) und wieder abgekühltem (aber nicht filtriertem) Harn von neutraler oder schwach saurer Reaktion (alkalischer ist mit Essigsäure schwach anzusäuern) etwa 10 Tropfen einer frischen alkoholischen Guajakharztinktur\*\*), schüttelt um (ohne das Glas mit dem Finger zu verschließen), setzt etwa 20 Tropfen verharztes Terpentinöl\*\*\*) zu, schüttelt mehrmals kräftig durch und läßt 2—3 Minuten stehen. Kommt es währenddessen zu keiner ausgesprochenen Blaufärbung, so fügt man noch wenige Kubikzentimeter Alkohol hinzu und schüttelt einmal sanft um. Bei geringem Blutgehalt wird oft erst jetzt die Blaufärbung deutlich.

Um geringste Mengen von Blut nachzuweisen, nehme man nur 3—5 Tropfen Guajakharztinktur. In jedem Fall soll gleichzeitig ein Kontrollversuch mit Wasser, Guajakharz und Terpentinöl angesetzt werden.

Carlson<sup>2)</sup> empfiehlt, das Terpentinöl durch Wasserstoffsperoxyd zu ersetzen, und, um die Probe möglichst empfindlich zu gestalten, so zu verfahren: Zu einer Mischung von 3 ccm Guajakharztinktur und 2 ccm 3proz. Wasserstoffsperoxydlösung läßt man vorsichtig und ohne Schütteln des Reagensglases aus einer Pipette 1 ccm Harn fließen. Der hinabrinnde und sich am Boden absetzende Harn zeigt Blaufärbung, welche, bei geringem Blutgehalt, nach dem Umschütteln nicht mehr deutlich zu erkennen ist.

3. Hellersche Probe. Man kocht mit Natronlauge auf und läßt stehen: der sich allmählich absetzende Phosphatniederschlag ist infolge von mitgerissem Hämatin rot gefärbt. Kontrollprobe mit normalem Harn.

4. Über Anwendung von Benzidin und von Leukomalachitgrün zum Blutnachweis im Urin s. bei O. und R. Adler<sup>3)</sup>.

Über weitere Blutfarbstoffnachweise im Harn s. bei Schumm.

**Harnporphyrine.** (§ 293). Eine kleine Menge Harn (30 ccm oder mehr) wird mit Barytmischung (Gemisch gleicher Volumina kaltgesättigter Barytlösung und 10proz. Bariumchloridlösung) vollständig ausgefällt, der Niederschlag abfiltriert, einigemal mit Wasser, dann einmal mit absolutem Alkohol gewaschen. Nach völligem Abtropfen zerreibt man den feuchten Niederschlag in einer Reibschale, fügt 6—8 Tropfen Salzsäure und, wenn nötig, noch so viel absoluten Alkohol hinzu, daß ein dünner Brei entsteht, verreibt und filtriert nach einigem Stehen oder gelindem Erwärmen auf dem Wasserbad durch ein trockenes Filter. Ist das Filtrat zu gering, so wäscht man noch mit etwas Alkohol nach, jedoch soll das Filtrat nicht mehr als 8—10 ccm betragen. Man prüft es spektroskopisch (s. Spektraltafel). Wegen des Nachweises von Uro- und Koproporphyrin im einzelnen s. §§ 293 u. 294.

Nachweis von Harnporphyrinen.

**Melanine, Melanogene.** In vereinzelt Fällen von Melanose und Melanosarkom wurden Farbstoffe im Urin nachgewiesen. Die Melanogene werden bei Zugabe von Oxydationsmitteln (konzentrierte Salpetersäure, Kaliumdichromat und Schwefelsäure, Eisenchlorid) schwarz. Siehe hierzu bei K. Mörner<sup>4)</sup>, v. Jaksch<sup>5)</sup>, H. Eppinger<sup>6)</sup> und O. Adler<sup>7)</sup>. Siehe ferner § 308.

Nachweis von Melaninen und Melanogenen.

\*) Dieses Kochen hat den Zweck, die Eigenschaft etwa vorhandener Eiterkörperchen, die Guajakharzprobe zu geben, zu vernichten.

\*\*) Zu ihrer Herstellung schüttelt man eine kleine Messerspitze gepulvertes Guajakharz (im Dunkeln aufzubewahren!) in einem Reagensglas mit 3—5 ccm Alkohol und gießt (oder filtriert) nach 1 Minute die klare Lösung ab.

\*\*\*) Das verharzte Terpentinöl muß genügendes Oxydationsvermögen besitzen, darf aber andererseits mit Guajakharz allein innerhalb 5—10 Minuten keine nennenswerte Färbung geben. Über Herstellung und Prüfung eines geeigneten Terpentinöls s. Schumm: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 50, S. 374. 1906/07.

<sup>1)</sup> Nach den Angaben von Schumm: Zentralbl. f. d. ges. Physiol. u. Pathol. d. Stoffw., N. F., Bd. 3, S. 404. 1908.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 48, S. 69. 1906. <sup>3)</sup> desgl. Bd. 41, S. 59. 1904.

<sup>4)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 11, S. 66. 1887. <sup>5)</sup> desgl. Bd. 13, S. 385. 1889.

<sup>6)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 8, S. 181. 1910.

<sup>7)</sup> Zeitschr. f. Krebsforsch. Bd. 11, S. 1. 1911/12.

*Nachweis und annähernde Bestimmung der Gallensäuren im Harn.*Nachweis der  
Gallensäuren.

622. Dem Nachweis der Gallensäuren, welche auch bei hochgradigem Ikterus in nur sehr geringer Menge vorkommen, muß eine Isolierung vorangehen. Man verfährt gewöhnlich unter Benutzung des von Hoppe - Seyler empfohlenen Verfahrens nach den Angaben von Neukomm<sup>1)</sup>. Man verdampft den Harn (500 ccm oder mehr) im Wasserbad bis fast zur Trockne und extrahiert den Rückstand mit Alkohol von 95—96%. Das Filtrat wird wieder eingetrocknet und der Rückstand mit absolutem Alkohol gelöst. Man filtriert, verdunstet den Alkohol, löst den Rückstand in Wasser und fällt mit schwach ammoniakalischem Bleiessig unter Vermeidung von einem Überschuß. Der Niederschlag wird nach 12—24 Stunden abfiltriert, gewaschen und zwischen Fließpapier mit dem Filter gepreßt. Dann kocht man die Bleifällung mit siedendem Alkohol aus, filtriert siedend heiß, setzt ein wenig Sodalösung hinzu, verdunstet zur Trockne und extrahiert mit absolutem Alkohol. Diese Lösung ist bisweilen so rein und so wenig gefärbt, daß ihr Rückstand zu der Pettenkoferschen Probe (S. 337) benutzt werden kann. Gewöhnlich und besonders bei Gegenwart von nur sehr wenig Gallensäure ist es jedoch notwendig, noch einmal mit Bleiessig zu fällen und wie oben zu verfahren. Nach dieser Methode kann man einen Teil Gallensäure in 10 000—20 000 Teilen Harn nachweisen.

Ein anderes Verfahren für den Nachweis empfiehlt Bang<sup>2)</sup>. Man versetzt 20—50 ccm Harn mit 2—3 Tropfen Blutserum, sättigt in der Wärme mit Magnesiumsulfat, säuert mit 1—2 Tropfen Salzsäure an und erhitzt zum Kochen. Die Fällung wird mit Alkohol ausgekocht und das Filtrat kochend mit festem Ätzbaryt entfärbt. Man filtriert, dampft ein und prüft den Rückstand nach Pettenkofer (S. 337) auf Gallensäure.

Annähernde Be-  
stimmung der  
Gallensäuren.

Für die annähernde quantitative Bestimmung ist eine Methode von Schmidt und Merrill<sup>3)</sup> angegeben. Sie beruht auf Aminostickstoffbestimmungen nach v. Slyke, die man mit der die Gallensäure enthaltenden Lösung vor und nach der Hydrolyse mit Natronlauge ausführt, nachdem eine Isolierung dieser Säuren, zu der auch ihre Ausfällbarkeit durch Sättigung mit Magnesiumsulfat benutzt wird, vorausgegangen ist. Die Differenz zwischen den beiden Aminostickstoffwerten, welche dem Taurin- und Glykokollgehalt der Gallensäuren entspricht, ist als Gallensäurestickstoff anzusehen.

*Nachweis und Bestimmung der Homogentisinsäure im Harn bei Alkaptonurie.*

623. Zeigt ein Harn die Eigenschaften, beim Stehen an der Luft, besonders auf Alkalizusatz, sich dunkler zu färben und alkalische Kupferlösung in der Wärme zu reduzieren, so ist die Anwesenheit von Homogentisinsäure wahrscheinlich. Zum Nachweis isoliert man die Säure nach S. 303.

Bestimmung von  
Homogentisin-  
säure.

Für die quantitative Bestimmung dient das Verfahren von Baumann<sup>4)</sup>. 10 ccm des Alkaptonharns werden in einem Kölbchen mit 10 ccm Ammoniak von 8%\*) versetzt. Zu dieser Mischung läßt man unverzüglich einige Kubikzentimeter  $\frac{1}{10}$ -Silberlösung hinzufließen, schüttelt einmal um und läßt 5 Minuten stehen. Alsdann werden der Mischung 5 Tropfen Chlorcalciumlösung

\*) Baumann schrieb 3% vor, doch ist bei diesem Ammoniakgehalt nach Garrod und Hurtle<sup>5)</sup> die Reduktion in 5 Minuten nicht vollständig.

<sup>1)</sup> Arch. f. Anat., Physiol. u. wiss. Med., Leipzig Jg. 1860, S. 364; zit. nach Hammarsten: Biolog. Arbeitsmethoden, herausg. v. Abderhalden, Abt. 1, Teil 6, Liefg. 53, S. 246. 1922.

<sup>2)</sup> Lehrbuch der Harnanalyse. Wiesbaden 1918.

<sup>3)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 58, S. 601. 1924.

<sup>4)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 16, S. 270. 1892.

<sup>5)</sup> Journ. of physiol. Bd. 33, S. 206. 1905/06.

(1 : 10) und 10 Tropfen Ammoniumcarbonatlösung hinzugefügt. Nach dem Umschütteln wird filtriert. Das bräunlich gefärbte, aber immer ganz klare Filtrat wird mit Silbernitrat geprüft. Tritt dabei sofort wieder eine starke Abscheidung von Silber ein, so wird bei dem zweiten Versuch gleich eine größere Menge (das doppelte bis dreifache)  $\frac{n}{10}$ -Silberlösung zu der Mischung von 10 ccm Harn und 10 ccm Ammoniak hinzugefügt. Kennt man schon annähernd die zur Oxydation erforderliche Menge der Silberlösung, so bedient man sich, um die Endreaktion zu erkennen, nur noch der Prüfung mit Salzsäure. Die Nähe der Endreaktion gibt sich dadurch zu erkennen, daß die tiefbraune Flüssigkeit auf Zusatz von Salzsäure eine lichtrote Farbe bekommt. Die Endreaktion ist erreicht, wenn das Filtrat vom Silberniederschlag beim Ansäuern mit verdünnter Salzsäure (kein Überschuß) eine eben noch sichtbare Trübung von Chlorsilber liefert. Man findet diesen Punkt sehr scharf durch 4—6 malige Wiederholung des Versuchs. Sind mehr als 8 ccm  $\frac{n}{10}$ -Silberlösung auf 10 ccm Harn und 10 ccm Ammoniak erforderlich, so sind bei der Wiederholung des Versuchs 20 ccm (statt 10 ccm) Ammoniak zu verwenden.

1 g wasserfreie Homogentisinsäure reduziert unter den angegebenen Bedingungen eine Quantität Silberlösung, welche 2,60—2,65 g Silber enthält, d. h. 240—245 ccm der  $\frac{n}{10}$ -Silberlösung; danach werden durch 1 ccm  $\frac{n}{10}$ -Silberlösung 0,004124 g Homogentisinsäure angezeigt. Von der Anzahl Kubikzentimeter der Silberlösung sind 0,3 abzuziehen, da 10 ccm normaler Harn nach C. Th. Mörner<sup>1)</sup> 0,3 ccm  $\frac{n}{10}$ -Silberlösung verbrauchen.

Ein colorimetrisches Verfahren ist von Briggs<sup>2)</sup> angegeben worden.

#### *Nachweis von Eiter im Harn.*

624. Er ist im frischen Harn mit dem Mikroskop festzustellen. Zum makroskopischen Nachweis von Eiter im Harn ist von Donné ein Verfahren angegeben, das nach Joh. Müller<sup>3)</sup> am besten in folgender Weise ausgeführt wird. Man fügt zu 5—10 ccm Harn tropfenweise n-Kalilauge und schüttelt nach jedem Tropfen kräftig durch. Dabei quellen die Eiterkörperchen auf und bilden eine gallertige Masse, infolgedessen die durch das Schütteln eingebrachten Luftblasen nur langsam aufsteigen können oder bei reichlicherem Eitergehalt sogar in der Flüssigkeit stehen bleiben. Ein Überschuß von Kalilauge ist zu vermeiden, auch ist die Reaktion nicht beständig. Es läßt sich so ein mit dem Auge kaum wahrnehmbarer Eitergehalt mit Sicherheit nachweisen. Die Reaktion fällt noch bei 1200 Leukocyten im Kubikmillimeter positiv aus.

Siehe auch § 620 bei Norgaard.

Über die Nachweise der übrigen § 560 aufgeführten Bestandteile des Harns s. die 2. Abteilung dieses Buches.

### **Harnsedimente, Harnsteine, Nierensteine.**

#### *Allgemeines.*

625. Harnsedimente, Harnsteine, Nierensteine können organisierte und nicht organisierte Körper enthalten. Auf die organisierten Teile derselben, Blutkörperchen, Eiterkörperchen, Zylinder, Mikroorganismen usw., die durch ihre mikroskopischen Formen zu erkennen sind, kann hier nicht Rücksicht genommen werden, aber auch die chemischen Ausscheidungen im Harn bieten schon große Mannigfaltigkeit. Von anorganischen Körpern sind besonders phosphorsaurer Kalk, phosphorsaure Ammoniak-Magnesia häufig; von organischen Oxalsäure, Harnsäure, erstere stets als Kalksalz, letztere frei oder an

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 16, S. 257. 1892.

<sup>2)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 51, S. 453. 1922.

<sup>3)</sup> Sitzungsber. d. physikal.-med. Ges. zu Würzburg 1903, S. 61. Münch. med. Wochenschr. 1903, S. 1360.

Kali, Natron, Ammoniak, Kalk gebunden; seltener erscheinen bei Menschen phosphorsaures Eisen, kohlsaurer Kalk, Xanthin, Cystin, Cholesterin, Fette. Schwefelsaurer Kalk<sup>1)</sup> wurde einmal, Tyrosin äußerst selten als Sediment im menschlichen Harne gefunden.

Bei Pflanzenfressern tritt kohlsaurer Kalk häufig als Harnsediment, auch in Blasensteinen auf; oxalsaurer Kalk ist im Pferdeharn sehr häufig als Sediment gefunden worden und bildet zuweilen große, krystallinische Konkreme bei Schweinen. Konkreme von phosphorsaurer Ammoniak-Magnesia und phosphorsauere Kalke sind bei Tieren nicht selten beobachtet worden, mehrmals bei Schafen auch kieselsäurereiche Steine.

**Harnsteine.** Nach dem Material, aus dem die Steine hauptsächlich oder ausschließlich zusammengesetzt sind, unterscheidet man Phosphatsteine, Oxalatsteine usw. Die Phosphatsteine besitzen eine weiße Farbe und rauhe Oberfläche und blättern leicht ab. Die Oxalatsteine sind hart, die kleinen glatt und weiß, die größeren höckerig (Maulbeersteine) und infolge von Blutungen häufig oberflächlich dunkelbraun gefärbt. Die Uratsteine besitzen gleichfalls große Härte, gelbliche bis rotbraune Farbe und glatte oder höckerige Oberfläche. Die Cystinsteine sind weiß bis gelblichweiß, wenig hart, auf der Bruchfläche krystallinisch. Die Xanthinsteine meist gelbbraun von amorpher Struktur, beim Reiben Wachsglanz annehmend. In der Regel bestehen indessen die Steine aus mehreren Substanzen, die oft schichtenweise übereinander gelagert sind (z. B. abwechselnd Phosphate und Urate). Nur die selten vorkommenden Cystin- und Xanthinsteine sind häufig frei von fremden Beimengungen; auch Steine, die fast ausschließlich aus Calciumoxalat bestehen, werden häufiger beobachtet. Desgleichen bestehen die sehr selten vorkommenden Cholesterin- und Fettkonkremente in der Hauptsache nur aus Cholesterin bzw. Fett und Fettsäuren.

#### *Mikroskopische Untersuchung der Harnsedimente.*

626. Man läßt den zu prüfenden trüben Harn in einem reinen Gefäße, am besten einem Spitzglase, einige Minuten bis Stunden an einem kühlen Orte stehen. Enthält er nur Fette, so kommt es nicht zur Bildung eines Niederschlags (ein durch Fett trüber Harn klärt sich beim Schütteln mit Äther), in allen anderen Fällen werden sich bald die Sedimente am Boden abgesetzt haben, so daß man den größten Teil der überstehenden Flüssigkeit klar abgießen kann. Von dem Rest der Flüssigkeit, welcher das Sediment enthält, nimmt man mit einer kleinen Pipette eine Probe heraus, bringt einen Tropfen auf den Objektträger und untersucht nach Auflegung eines Deckglases mit dem Mikroskope bei 200—300facher Vergrößerung.

#### **Mikroskopische Formen.**

a) Farblose Krystalle können bestehen aus phosphorsauere Kalk, schwefelsauere Kalk, phosphorsaurer Ammoniak-Magnesia, oxalsauere Kalk, Cystin, Xanthin, Tyrosin. Schwefelsaurer Kalk und Tyrosin bilden feine Nadeln, phosphorsaurer Kalk rhombische Prismen, Cystin 6seitige oder rhombische, Xanthin 6seitige Tafeln, oxalsaurer Kalk tetragonale Oktaeder (Briefkuvertform), phosphorsaure Ammoniak-Magnesia 3- oder 4- oder 6seitige große Prismen mit schrägen Endflächen. Wenn die Prismen kurz sind, ähneln diese sog. Tripelphosphatkrystalle den Oktaedern des oxalsaueren Kalks, meist erscheint das Salz in der sog. Sargdeckelform (3seitiges Prisma, auf dessen einer Kante eine Fläche in gleicher Zone aufgesetzt ist und mit zwei gegenüber stark geneigten, schrägen Endflächen).

<sup>1)</sup> Valentiner: Zentralbl. f. med. Wissensch. 1863, S. 913.



b) Farblose Kugeln, rundliche Knollen oder Hantelformen können aus kohlsaurem oder oxalsaurem Kalk bestehen.

c) Gelbe, rote oder braune Krystalle sind stets Harnsäure.

d) Gelbe oder rötlichbraune Kugeln, Knollen, Stechapfel- oder Morgensternformen bilden harnsaure Salze, doch ist ihre Färbung in alkalischen Harnen oft kaum bemerkbar.

e) Feine Körnchen von nicht bestimmbarer Form können aus phosphorsaurem Kalk, harnsauren Salzen, Xanthin bestehen.

**Verhalten gegen Reagenzien unter dem Mikroskop.**

a) Gegen Essigsäure. Gibt man 1 Tropfen starker Essigsäure unter das Deckglas, so werden gelöst: Phosphorsaurer Kalk, kohlsaurer Kalk (meist mit erkennbarer Gasentwicklung), phosphorsaure Ammoniak-Magnesia; nicht gelöst: schwefelsaurer Kalk, oxalsaurer Kalk, Harnsäure, Xanthin, Cystin. Harnsaure Salze wandeln sich unter vorausgehender teilweiser oder völliger Lösung durch die Essigsäure in Krystalle von Harnsäure um. Man läßt die Probe für diesen Zweck mehrere Stunden stehen und prüft dann, ob sich gefärbte Harnsäurekrystalle abgeschieden haben.

b) Gegen Salzsäure. Wurden die Krystalle durch Essigsäure nicht gelöst, so läßt man zu einer anderen Probe 1 Tropfen Salzsäure fließen. Ungelöst bleibt dann nur Harnsäure und schwefelsaurer Kalk.

c) Gegen Wasser. Schwefelsaurer Kalk löst sich in viel Wasser auf, aber auch Tyrosin, Xanthin, Harnsäure und harnsaure Salze, selbst phosphorsaure Ammoniak-Magnesia sind nicht völlig unlöslich in Wasser.

d) Gegen Ammoniak. Durch 1 Tropfen Ammoniak werden phosphorsaurer Kalk, schwefelsaurer Kalk, oxalsaurer Kalk, harnsaure Salze nicht verändert; Tyrosin, Cystin, Xanthin lösen sich leicht auf; Krystalle von freier Harnsäure werden allmählich oberflächlich arrodirt und mit Körnchen besetzt.

**Kurze Charakterisierung der in Sedimenten und Steinen gefundenen Verbindungen.**

627. Neutrales Calciumphosphat  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  kann im alkalischen, neutralen oder sehr schwach sauren Harne als Sediment auftreten, im alkalischen ist es stets als Sediment enthalten und im zersetzten Harne stets mit phosphorsaurer Ammoniak-Magnesia, oft auch mit harnsauren Salzen gemengt. Die Unlöslichkeit in Ammoniak unterscheidet es von Xanthin, die Löslichkeit in Säuren ohne nachherige Ausscheidung von Krystallen sowie die Unlöslichkeit in warmem Wasser von harnsauren Salzen.

Saures Calciumphosphat  $\text{CaHPO}_4 + 2 \text{H}_2\text{O}$  wird zuweilen als rhombische Tafeln in stark saurem Harne gefunden. Wegen seiner Krystallform könnte es nur mit Harnsäure oder phosphorsaurer Ammoniak-Magnesia verwechselt werden. Die Löslichkeit in Säuren unterscheidet es von Harnsäure und sein Vorkommen im scharf sauren Harne läßt keine Verwechslung mit dem Ammoniummagnesiumphosphat zu, da dies nur im alkalischen Harne erscheint.

Calciumcarbonat ist hinreichend charakterisiert, wenn sich ein körnig-kugeliges Sediment mit Aufbrausen in Säuren löst.

Calciumsulfat, dem Tyrosin in der Krystallform ähnlich, unterscheidet sich durch die Schwerlöslichkeit in Ammoniak sowie durch Feuerbeständigkeit von diesem.

Ammoniummagnesiumphosphat kommt nur im alkalischen Harne vor, ist stets gut krystallisiert, in Essigsäure leicht löslich und deshalb mit keinem anderen hier in Betracht kommenden Körper zu verwechseln. Die Krystalle sind stets farblos, auch im ikterischen Harne.

Magnesiumphosphat  $Mg_3(PO_4)_2 + 22 H_2O$  wurde in alkalischem konzentrierten Harne als cholesterinähnliche Tafeln gefunden. Zur Unterscheidung dieses Salzes, des Ammoniummagnesiumphosphats und Calciumphosphats empfehlen Tollens u. Stein<sup>1)</sup> eine 20proz. wässrige Lösung von käuflichem Ammoniumcarbonat. Die Ammoniummagnesiumverbindung bleibt darin unverändert, die Magnesiumphosphatkrystalle werden rau und zerfressen, Calciumphosphat verwandelt sich in Kügelchen, die am Glase haften.

Calciumoxalat, in seinen ausgebildeten Krystallen nur mit phosphorsaurer Ammoniak-Magnesia zu verwechseln, unterscheidet sich von diesem Salze durch die Unlöslichkeit in Essigsäure. Wenn es in Kugeln und Hantelformen den harnsauren Salzen und dem kohlensauren Kalke ähnlich erscheint, ist gleichfalls die Unveränderlichkeit in Essigsäure und Unlöslichkeit in warmem Wasser für dieses Salz charakteristisch.

Harnsäure bildet meist rhombische Tafeln; ihre gelbe bis braune Färbung, Unlöslichkeit in Salzsäure und in Ammoniak unterscheiden sie von allen anderen hier wichtigen Körpern. Über Reaktionen s. § 135.

Urate unterscheiden sich von den meisten anderen erwähnten Bestandteilen der Sedimente dadurch, daß sie sich beim Erwärmen mit dem Harne auf Bluttemperatur leicht auflösen, nur das Tyrosin löst sich auch und noch leichter in heißem Wasser, unterscheidet sich aber durch seine Krystallform. Nach Heintz enthalten die harnsauren Salze als Sedimente im Harne Kalk oder Kali, wenn sie feinkörnig erscheinen<sup>2)</sup>.

Xanthin ist in Ammoniak löslich, schwerer in Salzsäure, noch schwerer in heißem Wasser. Beim Verdunsten der ammoniakalischen Lösung krystallisiert es wieder aus. Über Reaktionen s. § 137.

Cystin, stets in den § 626 geschilderten Krystallen sich darstellend, ist unlöslich in heißem Wasser, löslich in Mineralsäuren, leicht löslich in Ammoniak und krystallisiert ebenfalls beim Verdunsten der ammoniakalischen Lösung wieder aus. Über Reaktionen s. § 181.

Tyrosin löst sich leicht in Säuren und Ammoniak und krystallisiert in Nadeln. Über Reaktionen s. § 213.

Cholesterin löst sich in Äther. Über Reaktionen s. § 232.

Enthalten die Sedimente mehrere Körper gemengt, deren Unterscheidung im Gemenge nicht mit Sicherheit gelingt, und ist genügend Material vorhanden, so untersucht man sie nach § 628.

#### *Qualitative Analyse der Sedimente \*) und Konkreme.*

628. **Vorprobe.** Man erhitzt eine kleine Probe der Substanz vorsichtig auf dem Platinblech. Tritt dabei keine Dunkelfärbung ein, so geschieht die Untersuchung nach 1; verbrennt die Substanz völlig unter Hinterlassung keines oder eines ganz geringen Rückstandes, so untersucht man nach 2; färbt sich die Substanz dunkler und hinterbleibt nach völligem Verbrennen der Kohle ein Ascherückstand, so verfährt man nach 3.

#### **Ausführung der Untersuchung.**

1. Die Substanz besteht nach der Vorprobe nur aus anorganischen Bestandteilen.

Man stellt zunächst einen wässrigen und darauf einen salzsauren Auszug einer größeren Menge des fein zerriebenen Materials her und untersucht diese beiden Auszüge nach den §§ 531 und 532.

\*) Das nach § 626 gewonnene Sediment wird abfiltriert und mit verdünntem Alkohol ein wenig gewaschen.

<sup>1)</sup> Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 187, S. 79. 1877.

<sup>2)</sup> Bence Jones: Chem. Zentralbl. 1862, S. 316. — Heintz: desgl. 1863, S. 524.

2. Die Substanz besteht nach der Vorprobe nur oder fast nur aus organischen Bestandteilen.

Es kann sich handeln um Cystin, Xanthin, Tyrosin, Cholesterin, Harnsäure oder harnsaurer Ammoniak. Wegen der Nachweise dieser Stoffe s. § 627, wegen des Nachweises des Ammoniaks s. unten (3 A a).

3. Die Substanz besteht nach der Vorprobe aus organischen und anorganischen Bestandteilen.

Eine größere Menge des Sediments oder Konkrements wird in einem kleinen Mörser möglichst fein zerrieben, mit kochendem Wasser einige Zeit digeriert, heiß filtriert und mit heißem Wasser ausgewaschen. Das Filtrat wird nach A, der Rückstand nach B untersucht.

A. Das Filtrat, welches harnsaurer Alkali und kleine Mengen von freier Harnsäure, phosphorsaurer Ammoniak-Magnesia, schwefelsaurem Kalk sowie auch Tyrosin\*) enthalten kann, wird in einer Porzellanschale auf dem Wasserbade bis zu kleinem Volumen eingedampft\*\*), mit Salzsäure versetzt (gleichgültig, ob sich Niederschläge gebildet haben oder nicht) und einige Stunden stehen gelassen\*\*\*). Die krystallinischen Abscheidungen bestehen aus Harnsäure†) (Prüfung mit der Murexidprobe, S. 173). Die filtrierte Flüssigkeit teilt man in zwei Teile und untersucht den einen nach a, den anderen nach b. Urate.

a) Der eine Teil wird auf Ammoniak geprüft. Man benutzt dazu einen kleinen Uhrglasapparat, bestehend aus zwei, ihre konkaven Seiten einander zuehrenden, aufeinander passenden Uhrgläsern, die durch eine übergeschobene Klemme fest zusammengehalten werden. In dem oberen Uhrglas breitet man mit Hilfe eines Tröpfchens Wasser einen roten Lackmuspapierstreifen aus, in das untere gießt man die zu untersuchende Flüssigkeit, fügt Natronlauge bis zur stark alkalischen Reaktion hinzu, legt das obere Uhrglas auf und schiebt die Klemme über. Eine nach einiger Zeit auftretende Blaufärbung des Lackmuspapiers zeigt die Anwesenheit von Ammoniak an. Ammoniak.

Statt dessen kann man auch die salzsaure Lösung mit Platinchlorid versetzen und den sofort oder nach einigem Stehen entstandenen gelben Niederschlag auf Platinsalmiak prüfen.

b) Der andere Teil der salzsauren Lösung wird im Wasserbade zur Trockne verdunstet und der Rückstand mit etwas Ammoniak extrahiert.

a) Die ammoniakalische Lösung, welche Chloralkalien und Tyrosin enthalten kann, wird verdunstet. Während sich etwa vorhandenes Tyrosin dabei krystallinisch abscheidet und nach § 213 erkannt werden kann, prüft man den Rückstand mit dem Spektralapparat auf Kalium (§ 37) und Natrium (§ 38). Tyrosin.  
Kalium. Natrium.

β) Der etwa von Ammoniak nicht gelöste Rückstand, welcher aus schwefelsaurem Kalk und phosphorsaurer Ammoniak-Magnesia bestehen kann, wird zur Hälfte in Salzsäure gelöst und mit Chlorbarium auf Schwefelsäure (§ 48) geprüft. Die andere Hälfte untersucht man in salpetersaurer Lösung mit molybdänsaurem Ammoniak auf Phosphorsäure (§ 49). Calciumsulfat.  
Magnesium-ammonium-phosphat.

\*) Tyrosin ist nie in Konkrementen und nur äußerst selten als weiches Sediment gefunden worden.

\*\*) Hat sich während des Abdampfens kein Niederschlag gebildet, so erhitzt man eine kleine Probe auf einem Platinblech und prüft, ob durch Verkohlung und Ascherückstand überhaupt gelöste Substanz nachweisbar ist. Wenn das nicht der Fall ist, fällt natürlich die Untersuchung des wässerigen Auszugs fort.

\*\*\*) Hier sowie in den weiterhin angegebenen Fällen ist es zweckmäßig, 24 Stunden stehen zu lassen; doch ist kürzere Zeit hinreichend, wenn es sich nicht um Spuren von Harnsäure handelt.

†) Findet sie sich reichlich, so ist das Sediment oder Konkrement reich an harnsauren Alkalien; denn die freie Harnsäure löst sich auch in heißem Wasser nur schwer.

B. Der in heißem Wasser unlösliche Rückstand wird in einem Becherglase mit verdünnter Salzsäure übergossen. Aufbrausen zeigt Kohlensäure an. Man läßt kurze Zeit stehen, filtriert, wäscht mit Wasser aus und untersucht die Lösung nach 1, den Rückstand nach 2.

1. Die salzsaure Lösung, welche Kalk, Magnesia, Eisen, Ammoniak, Phosphorsäure, Oxalsäure, Cystin, Spuren von Schleim und Albuminstoffen enthalten kann, wird in zwei ungleiche Teile a und b geteilt.

a) Der kleinere Teil wird im Wasserbade möglichst konzentriert, wenn nötig filtriert und das Filtrat, wie oben unter A a angegeben, auf Ammoniak geprüft (ursprünglich Ammonurat, Magnesiumammoniumphosphat).

b) Der größere Teil wird mit kohlenstofffreiem Ammoniak bis zur stark alkalischen Reaktion versetzt, kurze Zeit bedeckt stehen gelassen und ein entstandener Niederschlag schnell unter möglichstem Abschluß der Luft filtriert und mit ausgekochtem Wasser und etwas Ammoniak ausgewaschen.

Die Untersuchung des Filtrats geschieht nach  $\alpha$ , die des Niederschlags nach  $\beta$ .

a) Die Hauptmenge des Filtrats wird mit oxalsaurem Ammoniak auf Kalk (§ 39) und nach Abfiltrieren des Calciumoxalats mit Natriumphosphat auf Magnesia (§ 40) geprüft. Calcium und Magnesium waren im Sediment oder Konkrement an Kohlensäure gebunden. Den Rest der ammoniakalischen Lösung prüft man nach § 181 auf Cystin.

$\beta$ ) Der Niederschlag wird mit der Spritzflasche in ein Becherglas gespült, mit überschüssiger Essigsäure versetzt und erwärmt. Löst sich nicht alles auf, so filtriert man, wäscht mit Wasser und prüft den Filtrerrückstand nach  $\alpha\alpha$ , das Filtrat nach  $\beta\beta$ . Entsteht eine klare Lösung, so wird diese nach  $\beta\beta$  untersucht.

$\alpha\alpha$ ) Der Niederschlag wird in einen Porzellantiegel gespült, im Wasserbade getrocknet, geglüht und nach dem Erkalten mit Essigsäure übergossen. Findet völlige oder teilweise Lösung unter Aufbrausen statt und gibt die nötigenfalls filtrierte essigsaurer Lösung mit Ammonoxalat einen weißen Niederschlag, so war im Untersuchungsmaterial oxalsaurer Kalk enthalten. Den durch Essigsäure nicht gelösten Glührückstand löst man in wenig Salzsäure, verdünnt mit Wasser und prüft mit Ferrocyan- oder Rhodankalium auf Eisen (§ 42). Ein positiver Ausfall der Reaktion beweist die Anwesenheit von phosphorsaurem Eisenoxyd im Untersuchungsmaterial.

$\beta\beta$ ) Die essigsaurer Lösung wird mit Ammonoxalat versetzt. Ein entstehender Niederschlag zeigt die Gegenwart von phosphorsaurem Kalk an. Nach völliger Ausfällung der Lösung mit Ammonoxalat und Erhitzen filtriert man ab und macht das Filtrat mit Ammoniak alkalisch. Ein beim Stehen oder schneller beim Reiben der Glaswand mit einem Glasstabe entstehender Niederschlag zeigt an, daß das Untersuchungsmaterial Magnesia an Phosphorsäure gebunden enthielt.

Es bleibt unentschieden, ob phosphorsaurer Magnesia oder phosphorsaurer Ammoniak-Magnesia im Sediment oder Konkrement vorhanden war. Letztere Verbindung ist auszuschließen, wenn in B 1 a kein Ammoniak gefunden worden ist.

2. Die in Salzsäure unlöslichen Stoffe können nur aus Harnsäure, Xanthin, Schleim, Detritus von Epithelzellen und anderen organischen Stoffen sowie aus Kieselsäure bestehen. Harnsäure und Xanthin trennt man durch Ammoniak und prüft das Ungelöste mit der Murexidprobe (S. 173) auf Harnsäure, den Rückstand der ammoniakalischen Lösung nach S. 176 auf Xanthin. Beim Veraschen des durch Ammoniak nicht gelösten Rückstandes erhält man die Kieselsäure (§ 50).

Kleine Konkretionen in der Substanz der Niere, besonders in den Spitzen der Pyramiden, in den kleinen Gefäßen und disseminiert in den Schleimhäuten usw., werden mikroskopisch (vgl. § 626) auf ihr Verhalten gegen Essigsäure, Salzsäure, Natronlauge, Ammoniak, schwache Jodlösung und Schwefelsäure nebst Jodlösung geprüft. Die in den Spitzen der Pyramiden so häufigen Infarkte phosphorsaurer Erden lösen sich in Essigsäure sehr langsam, viel schneller in Salzsäure unter Hinterlassung von etwas meist unregelmäßig geformter organischer Substanz. Harnsaure Salze scheinen sich in Säuren zunächst meist völlig zu lösen, geben aber dann beim Stehen Krystalle von Harnsäure (Bestätigung durch Murexidprobe, Löslichkeit in Natronlauge, Unlöslichkeit in Ammoniak). Phosphorsaure Erden lösen sich nicht in Natronlauge oder Ammoniak, dagegen lösen sich abgelagerte Farbstoffe in diesen Flüssigkeiten. Amyloid gibt sich durch sein Verhalten zu Jod zu erkennen (§ 473).

*Quantitative Analyse der Sedimente und Konkreme.*

629. Dieselbe würde sehr mühsam sein, wenn wirklich alle Stoffe, auf welche bei der qualitativen Untersuchung (§ 628) Rücksicht genommen worden ist, jemals nebeneinander in demselben Sediment oder Konkremet vorkämen. Dieses scheint aber nie der Fall zu sein und die Analyse vereinfacht sich daher bedeutend. Calciumsulfat, Tyrosin, Xanthin, Cystin, Cholesterin und Fett kommen in Sedimenten und Steinen so selten vor und dann gewöhnlich so frei von anderen Beimengungen, daß auf ihre Bestimmung bei der folgenden Beschreibung nicht Rücksicht genommen zu werden braucht.

Von dem möglichst fein pulverisierten und bei 100° im Luftbade oder besser (um das Entweichen von Ammoniak aus etwa vorhandener phosphorsaurer Ammoniak-Magnesia zu vermeiden) in der § 569 beschriebenen Weise getrockneten Material werden 3 Portionen abgewogen und nach 1, 2 und 3 untersucht. Die Analyse der ersten Portion geschieht im wesentlichen nach dem im § 628 angegebenen Gange, aber ohne Berücksichtigung von Ammoniak und Kohlensäure, für deren Bestimmung die Portionen 2 und 3 dienen.

1. Das trockene, abgewogene Pulver (1—2 g) wird mit heißem Wasser übergossen, einige Zeit mit Wasser gekocht, heiß filtriert und mit Wasser nachgewaschen.

a) Das Filtrat (+ Waschwasser) wird eingeengt und mit Salzsäure stark sauer gemacht. Nach 12stündigem Stehen sammelt man die ausgeschiedene Harnsäure auf gewogenem Filter, wäscht mit kaltem Wasser nach, trocknet bei 120°, wägt wieder und erfährt so das Gewicht der Harnsäure. Das Filtrat wird stark eingeengt, in einem Becherglase mit Ammoniak stark alkalisch gemacht und die abgeschiedene phosphorsaure Ammoniak-Magnesia nach einigen Stunden auf kleinem, aschefreiem Filter gesammelt, mit verdünntem Ammoniak gewaschen und weiter nach § 538 behandelt. Durch Rechnung findet man die dem gefundenen Magnesiumpyrophosphat entsprechende Menge phosphorsaure Ammoniak-Magnesia. Das Filtrat wird wieder eingeengt, in einen gewogenen Porzellantiegel gebracht, zur Trockne verdunstet, bis zur Verjagung des Chlorammonium schwach geglüht und nach dem Erkalten gewogen. Man erfährt so die Quantität Alkali (als Chloralkali), welche an Harnsäure gebunden war. Über die Trennung von Kalium und Natrium s. § 533.

b) Die in kochendem Wasser unlöslichen Bestandteile werden in einem Becherglase mit verdünnter Salzsäure behandelt und 12 Stunden stehen gelassen.

a) Die ausgeschiedene Harnsäure wird auf gewogenem, aschefreiem Filter gesammelt, mit kaltem Wasser gewaschen und bei 120° getrocknet. Nachdem das Gewicht festgestellt ist, verascht man, zieht die gefundene Aschemenge ab und erfährt so das Gewicht der Harnsäure. Die Asche wird in Salzsäure gelöst und dem salzsauren Filtrat ( $\beta$ ) zugefügt.

$\beta$ ) Die Untersuchung des salzsauren Filtrats (evtl. + Aschelösung, s.  $\alpha$ ) geschieht in der § 628, B 1 beschriebenen Weise unter Benutzung der in §§ 533 ff.

gegebenen Einzelvorschriften. Enthält der in Essigsäure unlösliche Niederschlag *aa* (S. 766) Calciumoxalat und Ferriphosphat nebeneinander, so kann man zweckmäßig in folgender Weise verfahren: Der Niederschlag wird geglüht, mit etwas Ammoncarbonat versetzt, um beim Glühen ausgetriebene Kohlensäure zu ersetzen, wieder bis zur schwachen Rotglut erhitzt und gewogen. Man behandelt den Glührückstand, welcher jetzt statt des Calciumoxalats kohlen-sauren Kalk enthält, mit Essigsäure, filtriert durch ein aschefreies Filter, wäscht mit Wasser aus, glüht, wägt und erfährt so das Gewicht des Ferriphosphats. Durch Subtraktion dieses Wertes von dem vorher erhaltenen erfährt man die Menge Calciumcarbonat, aus der durch Rechnung die entsprechende Menge Calciumoxalat gefunden wird.

2. Die zweite Portion des trockenen Pulvers dient zur Bestimmung des Kohlensäuregehaltes nach § 556.

3. In einer dritten Portion ermittelt man die Menge des Ammoniak's. Das trockene, abgewogene Pulver wird mit verdünnter Salzsäure erwärmt und bei Anwesenheit von Harnsäure nach 12stündigem Stehen filtriert. Im Filtrat (+ Waschwasser) bestimmt man die Menge des Ammoniak's nach Schlösing oder einer der anderen § 578 angegebenen Methoden.

### Untersuchung von serösen Flüssigkeiten, Cystenflüssigkeiten, Synovia usw.

(Bearbeitet von K. Thomas - Leipzig.)

#### *Allgemeines.*

630. Das Blutplasma, das Blutserum, die Lymphe, die Transsudate (Perikardial-, Peritoneal-, Pleuraflüssigkeit, Hydroceleflüssigkeit usw.), die Exsudate (Transsudate, bei deren Bildung entzündliche Vorgänge beteiligt sind), die Amniosflüssigkeit, die Cystenflüssigkeiten, die Synovia können im allgemeinen nach denselben Verfahren untersucht werden.

Die Transsudate stimmen in ihrer Zusammensetzung qualitativ im wesentlichen mit dem Plasma, aus dem sie stammen, überein. Die Veränderungen, welche sie sekundär durch Beimengung von Produkten der Zelltätigkeit, von Blut, durch proteolytische Prozesse usw. erfahren können, kommen für den Gang der Untersuchung nicht in Betracht. Dasselbe gilt von den Exsudaten. Die Amniosflüssigkeit und die Flüssigkeiten der serösen Cysten schließen sich ebenfalls den Transsudaten an. Der Inhalt mancher anderer Cysten, z. B. vieler Ovarialcysten, sowie die Synovia, zeigen zwar größere Abweichungen in der Zusammensetzung, doch lassen sich in den meisten Fällen dieselben Untersuchungsmethoden auf sie anwenden.

**Bestandteile.** Alle diese Flüssigkeiten enthalten Proteinstoffe, und zwar mehrere, aber in sehr verschiedener Menge. Während sie im Blutserum 7—8% beträgt, schwankt sie in den Trans- und Exsudaten von 0,1% und noch weniger (in der Cerebrospinalflüssigkeit) bis zu 6% (wobei zu bemerken, daß im allgemeinen sich die höheren Werte in den Exsudaten finden), in der Synovia von 2—4%, in den Cystenflüssigkeiten (abgesehen von den serösen Cysten) von 5—10%. Alle enthalten kleine Mengen von sog. Extraktivstoffen, unter ihnen ist wohl regelmäßig Harnstoff (reichlicher bei Urämie) gefunden worden, meist auch Traubenzucker, vielleicht kleine Mengen Milchzucker<sup>1)</sup>, ferner Kreatin, Harnsäure, Hippursäure, Milchsäure, Ameisensäure, Acetaldehyd, Inosit, gepaarte Glucuronsäure (im Plasma), Glycerin (im Plasma), gelegentlich auch Bernsteinsäure, Allantoin. Auch sämtliche Eiweißbausteine sind im Blutserum

<sup>1)</sup> Best: Arch. néerland. de physiol. de l'homme et des anim. Bd. 3, S. 222. 1918.

nachgewiesen, manche wie Leucin, Tyrosin, Lysin (im Plasma bei akuter, gelber Leberatrophie, in Transsudaten durch proteolytische Fermente) schon seit langem, ferner deren Fäulnisprodukte, wie Phenol, Indican, sowie Gallensäuren und Gallenfarbstoffe (bei Ikterus), Blutfarbstoffe und deren Umwandlungsprodukte usw. Fette, Phosphatide, Cholesterin sind ebenfalls stets vorhanden, hier und da auch Cholesterinester. Im Blutserum sind auch Fermente nachgewiesen, welche Stärke (Bial<sup>1</sup>), Röhmann<sup>2</sup>) spalten, ferner solche, welche Polypeptide (Abderhalden<sup>3</sup>) spalten und solche, welche Milch zur Gerinnung bringen (Fuld und Spiro<sup>4</sup>), Bang<sup>5</sup>). Stets finden sich anorganische Salze, unter ihnen hauptsächlich Chlornatrium, ferner Natriumcarbonat, an Phosphorsäure gebundene alkalische Erden und Alkalien, auch Sulfate in kleiner Menge (Gürber, de Boer, Heubner und Meyer-Bisch<sup>6</sup>).

**Allgemeine Eigenschaften.** Das spezifische Gewicht, welches beim Blutserum im Mittel 1028 beträgt, kann bei den verschiedenen hier in Betracht kommenden Flüssigkeiten zwischen 1005 und 1030 schwanken und ist im wesentlichen von dem Eiweißgehalt abhängig. Über die Bestimmung s. § 22.

Drehungsvermögen. Das Blutplasma und -serum zeigt Linksdrehung<sup>7</sup>). Drehungsvermögen.

Die Reaktion ist gegen Lackmus meist schwach alkalisch. Reaktion.

Die Farbe ist, wenn kein Blut beigemischt ist, ein blasses oder gesättigtes Gelb oder gelbliches Grün. Beim Stehen an der Luft trüben sich die Flüssigkeiten und die Farbe nimmt einen mehr grünlichen Ton an. Hydroceleflüssigkeiten haben oft von vornherein eine dunklere, grünliche Färbung. Beimischung von Blut kann eine dunkle, schokoladenbraune Farbe verursachen. Farbe.

Die Konsistenz ist in den meisten Fällen eine dünnflüssige, in anderen infolge von Gehalt an Mucin oder Mucoiden eine zähe, so daß die Flüssigkeit beim Ausgießen lange Fäden zieht, oder auch eine derb gallertige. Manche der Flüssigkeiten gerinnen spontan, andere erst auf Zusatz von Blut oder Serum. Konsistenz.

Klarheit. Häufig sind die Flüssigkeiten ganz klar durchsichtig, zeigen aber fast stets sehr deutlich weißliche Fluorescenz. Oft findet man sie durch rote Blutkörperchen und deren Umwandlungsprodukte, durch Leukocyten, Epithelzellen, Fibrinausscheidungen, Cholesterinkristalle getrübt. Alle diese trübenden Beimengungen und Niederschläge, mit Ausnahme der Blutkörperchen, lassen sich mittels Filtration durch Papier entfernen. Die Blutkörperchen senken sich beim ruhigen Stehen während eines Tages und können so leicht abgetrennt werden, nur im detibrinierten Blut gelingt dies oft sehr schwer und unvollkommen, besser durch Zentrifugieren. Milchähnliches Aussehen der Flüssigkeiten ist in der Regel durch fein verteiltes Fett bedingt (Blutplasma und Serum zeigen normalerweise häufig während der Verdauung diese Beschaffenheit), kann aber auch durch Eiweiß (meist wohl eine Globulin-Phosphatidverbindung<sup>8</sup>), gelegentlich auch Globulin-Cholesterinölsäureesterbindung<sup>9</sup>) verursacht sein. Solche Flüssigkeiten lassen sich durch Filtration nicht klären. Handelt es sich um Fett, so bewirkt Schütteln mit Äther nach

<sup>1</sup>) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 52, S. 137. 1892; Bd. 53, S. 156. 1893.

<sup>2</sup>) Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 25, 3, S. 3654. 1892.

<sup>3</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 53, S. 294. 1904; Bd. 55, S. 371. 1908.

<sup>4</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 31, S. 132. 1900/01.

<sup>5</sup>) Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 5, S. 395. 1904.

<sup>6</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 122, S. 120. 1921.

<sup>7</sup>) Siehe dazu Abderhalden und Mitarbeiter: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 69, S. 1, 23, 50, 57. 1910.

<sup>8</sup>) S. besonders Bernert: Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 49, S. 32. 1903; ferner Joachim: Münch. med. Wochenschr. 1903, S. 1915.

<sup>9</sup>) Wolff: Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 5, S. 208. 1904.

vorausgegangenem Zusatz von etwas Natronlauge völlige Klärung. Eine nicht durch Fett bedingte milchige Beschaffenheit ist auf diese Weise nicht zu beseitigen. Die die Trübung verursachende Substanz fällt auf Zusatz des gleichen Volumens gesättigter Ammonsulfatlösung aus. Dem mit kaltem Alkohol und Äther behandelten Niederschlag kann durch heißen Alkohol Phosphatid (oder Cholesterinester) entzogen werden.

Die Echinokokkenflüssigkeit, welche keine Eiweißstoffe, aber Traubenzucker, Bernsteinsäure, Inosit und viel Chlornatrium enthält, wird ebenfalls wie eine seröse Flüssigkeit untersucht.

*Bestimmung des Trockenrückstandes in serösen Flüssigkeiten.*

631. In einem gewogenen, mit eingeriebenem Glasstopfen versehenen, flachen Gefäß oder in einer Schale, welche in einem verschließbaren Wägegglas Platz hat und mit diesem zusammen gewogen ist, mißt oder wägt man 10 bis 15 ccm ab, dampft auf dem Wasserbade ein und trocknet zunächst einige Tage im Vakuum über Schwefelsäure, dann bei 110—120° und zuletzt bei fast 120° bis zum konstanten Gewicht. Sind in der Flüssigkeit Harnstoff oder andere in der Hitze leicht zersetzliche Substanzen zu vermuten, so erhitzt man nicht viel über 110°.

Im Hochvakuum soll Eis verdampfen, ohne vorher in den flüssigen Zustand übergegangen zu sein. Da heute Hochvakuum pumpen leicht zugänglich, wird bei empfindlichen Substanzen die folgende Methode manchmal von Wert sein können. Das Eiweiß gerinnt dabei nicht, der Rückstand löst sich wieder. Natürlich sind die Zellen geplatzt.

Das Blut oder dergleichen wird im Wägeggläschen in Eis-Kochsalzgemisch (oder flüssiger Luft) rasch gefroren. Die durchgefrorene Masse kommt in einen gut schließenden Vakuumexsiccator, der mit konzentrierter  $H_2SO_4$  (oder besser  $P_2O_5$  + festem KOH) beschickt ist und sofort evakuiert wird. Es ist darauf zu achten, daß der Exsiccator dicht hält. Dichtungsmittel ein Gemisch von (gelbem) Wachs + Adeps lanae unter dem eben nötigen Zusatz von Vaseline für die Konsistenz („Sommer“- und „Winter“-fett) (Shackell<sup>1</sup>).

*Nachweis und Bestimmung der anorganischen Salze in serösen Flüssigkeiten.*

Nachweis. 632. Der direkte Nachweis wird durch die Eiweißstoffe gestört.

Im allgemeinen wird man dem Nachweis die Veraschung vorausgehen lassen. Diese würde nach §§ 525 oder 527, die Untersuchung des wässerigen und salzsauren Auszuges der Asche nach §§ 531 und 532 zu geschehen haben. Indessen ist zu berücksichtigen, daß jedenfalls ein Teil der hierbei nachgewiesenen Schwefelsäure und Phosphorsäure nicht als anorganisches Salz in den Flüssigkeiten vorhanden war, sondern erst während der Veraschung aus dem organisch gebundenen Schwefel der Proteinstoffe entstanden bzw. aus den Phosphorsäure enthaltenden Phosphatiden und phosphorhaltigen Proteiden abgespalten worden ist; ferner daß Kohlensäure und Salzsäure während der Veraschung durch Schwefelsäure und Phosphorsäure ausgetrieben sein können. Die hieraus für die Feststellung der in den Flüssigkeiten präformiert vorhandenen anorganischen Salze sich ergebenden Ungenauigkeiten lassen sich einigermaßen bei Benutzung folgender Methode vermeiden.

Man fällt die Flüssigkeiten mit überschüssigem Alkohol, filtriert durch ein aschefreies Filter und wäscht zunächst mit heißem Alkohol, dann mit heißem Wasser aus. Es werden auf diese Weise zwei Auszüge (ein alkoholischer und ein wässriger) und ein Filtrerrückstand erhalten.

<sup>1</sup>) Americ. journ. of physiol. Bd. 24, S. 324/40. 1909.



**Auszüge.** Um den alkoholischen Auszug von Phosphatiden zu befreien, verdunstet man ihn bei mäßiger Wärme (nicht über 60°) auf dem Wasserbade, extrahiert den Rückstand mit warmem absoluten Alkohol, dampft das Filtrat wieder bei mäßiger Wärme ein und nimmt den Rückstand mit wasser- und alkoholfreiem Äther auf. Derselbe löst Phosphatide, aber keine anorganischen Salze. Die in dem absoluten Alkohol und dem Äther unlöslichen Rückstände werden mit dem wässerigen Auszuge vereinigt. Die Flüssigkeit wird eingedampft, getrocknet und nach § 525 oder 527 verascht; die Untersuchung des wässerigen Aschenauszugs wird nach § 531 vorgenommen.

**Filtrerrückstand.** Derselbe enthält die Proteinstoffe und ihre Salzverbindungen sowie Phosphate der alkalischen Erden und evtl. Eisen. Er wird besonders verascht und der salzsaure Auszug nach § 532 untersucht. Sind in den Flüssigkeiten phosphorhaltige Proteide vorhanden, wie sie z. B. in Transsudaten von Paijkull<sup>1)</sup> nachgewiesen wurden, so wird ein Teil der in der Asche nachgewiesenen Phosphorsäure aus ihnen stammen; indessen ist diese Quantität in allen Fällen eine außerordentlich geringe, welche gegenüber der als Phosphat vorhandenen nicht in Betracht kommt.

Für die quantitative Bestimmung ergeben sich aus dem Gesagten die nötigen Anhaltspunkte. Quantitative Bestimmung.

Für die quantitativen Einzelbestimmungen kommen die §§ 533 ff. in Betracht.

Beim Ausfällen der Eiweißkörper werden Bestandteile des Plasmas leicht mitgerissen. Nur in Einzelfällen gelingt es dies zu vermeiden. Für die Bestimmung des Chlors im Blute, das nur in diffusibler Form vorhanden ist (Rona<sup>2)</sup> und schon bei Zusatz von Säure sich an die Eiweißkörper des Serums und der Blutkörperchen bindet (Hamburger<sup>3)</sup>, Rona und György<sup>4)</sup>, bewährt sich die Enteiweißung durch Ultrafiltration<sup>5)</sup>. Cushny<sup>6)</sup> zeigte das gleiche. Nur Calcium und vielleicht Magnesium scheinen zum Teil an die Kolloide des Serums gebunden zu sein, denn nur ein Teil von ihnen findet sich im Ultrafiltrat. Ebenso läßt sich Schwefelsäure im Ultrafiltrat und Dialysat nachweisen (Gürber, de Boer, Heubner und Meyer-Bisch<sup>7)</sup>). Filtriert wird durch Kollodiumhülsen bei 15 mm Hg. Nachweis und Bestimmung im Ultrafiltrat und Dialysat.

Sehr geeignet ist auch die elektrometrische Maßanalyse nach Erich Müller (Dresden und Leipzig, Verlag Steinkopf, 1921, 2. Aufl.), da hier nicht enteiweißt zu werden braucht. Die Methode ist für physiologische Objekte noch nicht durchgeprüft. Es lassen sich u. a. Mg neben Ca (S. 87\*), die Halogene (S. 66) auch nebeneinander (S. 74), Ammoniak mit seinen Salzen (S. 107), Phosphate (S. 108), Alkaloide (S. 109), Schwermetalle bestimmen. Elektrometrische Maßanalyse.

#### *Qualitative Prüfung auf Proteinstoffe in serösen Flüssigkeiten.*

633. Wohl in allen hierher gehörigen Flüssigkeiten sind Serumalbumin und Serumglobulin\*\*) vorhanden, in einzelnen (Blutplasma, manchen Transsudaten) auch Fibrinogen. Albumosen scheinen im Plasma und Serum nur in ganz geringer Menge vorzukommen. Peptone fehlen ganz. In Transsudaten usw. sind Albumosen (entstanden durch proteolytische Fermente) wiederholt in

\*) Die Seitenzahlen beziehen sich auf das Buch von Erich Müller.

\*\*) In manchen auch Fibrinoglobulin (§ 336).

<sup>1)</sup> Malys Jahresber. d. Tierchem. 1892, S. 558.    <sup>2)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 29, S. 501. 1910.

<sup>3)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 86, S. 309. 1918.    <sup>4)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 56, S. 416. 1913.

<sup>5)</sup> Rusznyak: Biochem. Zeitschr. Bd. 110, S. 60. 1920.

<sup>6)</sup> Journ. of physiol. Bd. 53, S. 391. 1920.

<sup>7)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 122, S. 120. 1921.

größerer Menge nachgewiesen. Glucoproteide und phosphorhaltige Proteide sind in denjenigen Flüssigkeiten gefunden worden, welche schleimige Beschaffenheit zeigen und beim Umgießen von einem Gefäße in das andere Fäden ziehen; aber auch in ganz dünnflüssigen Lösungen, in Trans- und Exsudaten hat man Glucoproteide und in Exsudaten phosphorhaltige Proteide nachgewiesen.

Vorbereitung. Enthält die zu untersuchende Flüssigkeit Trübungen oder Niederschläge, so ist sie zunächst, wenn ihre physikalische Beschaffenheit es zuläßt, zu filtrieren bzw. von Blutkörperchen durch Absitzenlassen oder von Fett durch Behandeln mit Äther zu befreien (§ 630). Den Filtrerrückstand oder Bodensatz prüft man mikroskopisch. Im Niederschlage enthaltene Flocken und Fetzen können nach Schlemmen und Waschen mit Wasser gereinigt und auf Fibrin (§ 344) geprüft werden. Glasiges Aufquellen in 0,1proz. Salzsäure und schnelle Lösung in künstlichem Magensaft (§ 505) sprechen für Fibrin.

**634. Glucoproteide, phosphorhaltige Proteide.** 1. Man versetzt eine größere Menge, z. B. 100 ccm (nötigenfalls nach Verdünnen mit Wasser), mit Essigsäure, filtriert, wäscht mit essigsäurehaltigem Wasser aus, löst in schwach alkalihaltigem Wasser, wiederholt die Fällung mit Essigsäure und prüft den Niederschlag.

a) Glucoproteide. Man kocht einen Teil des Niederschlags mit verdünnter Mineralsäure und stellt mit der Flüssigkeit die Trommersche Probe an.

b) Phosphorhaltige Proteide. Man kocht einen Teil des Niederschlags mit Alkohol und Äther aus und untersucht ihn nach § 56 auf organisch gebundenen Phosphor. Dabei ist indessen zu bemerken, daß ein ganz schwacher Ausfall der Phosphorsäurereaktion in der Schmelze nicht berücksichtigt werden darf, da die Entfernung von Phosphaten und Phosphatiden, welche dem Niederschlag stets beigemischt sind, meist nur unvollkommen gelingt (Salkowski).

War organisch gebundener Phosphor nachgewiesen, so löst man einen weiteren Teil des Niederschlags in Natronlauge, fügt Salzsäure hinzu, kocht bis zur klaren Lösung, übersättigt mit Ammoniak und versetzt mit Silbernitrat. Eine flockige Fällung (Silberverbindungen der Nucleinbasen) zeigt Nucleoproteid an. Bei negativem Ausfall dieser Reaktion gibt organisch gebundener Phosphor die Anwesenheit von Phosphorproteid zu erkennen.

2. Pseudomucin. Der Nachweis geschieht in der § 458 für die Darstellung des Pseudomucins angegebenen Weise.

3. Glucoproteide, die nach 1. und 2. nicht abgeschieden werden. Die Flüssigkeit wird durch Erhitzen zum Sieden unter vorsichtigem Essigsäurezusatz enteiweißt, Filtrat und Waschwasser werden genau neutralisiert, auf dem Wasserbade stark eingeeengt und mit Alkohol gefällt. Der Niederschlag wird in Wasser gelöst und durch Dialyse von Salzen befreit. Ein jetzt auf Zusatz von Essigsäure auftretender Niederschlag ist zu prüfen, ob er nach dem Kochen mit Mineralsäure reduziert (Hammarsten<sup>1</sup>).

**635. Serumalbumin, Serumglobulin, Fibrinogen.** Ein nicht zu kleiner Teil der Flüssigkeit\*), z. B. 100 ccm, wird entweder bei 30° vollständig mit pulveri-

\*) Enthält die Flüssigkeit durch Essigsäure fällbare Stoffe (§ 634, 1), so wird sie zunächst durch mäßigen Essigsäurezusatz und Filtration von diesen befreit, mit Natriumcarbonat neutralisiert und nun weiter, wie oben angegeben, behandelt. Durch Essigsäure nicht fällbare Glucoproteide (§ 634, 2 u. 3) können nur nach erfolgter Koagulation der Eiweißstoffe von diesen getrennt werden.

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 15, S. 202. 1891. — Paijkull: Malys Jahresber. d. Tierchem. 1892, S. 558.

siertem, kristallisiertem Magnesiumsulfat gesättigt oder mit dem gleichen Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt, filtriert, der Niederschlag mit gesättigter Magnesiumsulfatlösung resp. halbgesättigter Ammonsulfatlösung ausgewaschen und sowohl das Filtrat als auch der Niederschlag untersucht.

1. Das Filtrat wird zum Sieden erhitzt. Flockige Koagulation zeigt das Vorhandensein von Serumalbumin an.

2. Der Niederschlag wird zwischen Filtrierpapier ausgepreßt, dann in nicht viel Wasser gelöst.

a) In einem Teil dieser Lösung werden nach § 24 die Koagulationstemperaturen bestimmt. Fibrinogen gerinnt bei 52—55°, Serumglobulin über 70°.

Über Euglobulin und Pseudoglobulin siehe S. 463.

b) Ein anderer Teil der Lösung, ebenso wie ein Teil der ursprünglichen serösen Flüssigkeit werden mit etwas frisch gelassenem, vom ausgeschiedenen Fibringerinnsel abgepreßtem Blut versetzt und einige bis 24 Stunden bei 20 bis 30° stehen gelassen. Tritt Gerinnung der ganzen Flüssigkeit oder Abscheidung gallertiger Flocken von den Eigenschaften des Fibrins (§ 344) ein, so enthielt die Flüssigkeit Fibrinogen.

Das zur Reindarstellung von Fibrinogen von Hammarsten angegebene Verfahren (§ 335) ist zum Nachweis kleiner Mengen nicht geeignet. Zur Isolierung und Erkennung auch kleiner Fibrinogenmengen wird vermutlich das Verfahren von Reye (§ 335) brauchbar sein, doch ist seine Anwendbarkeit besonders auch im Hinblick auf die in den serösen Flüssigkeiten nachgewiesenen Proteide noch zu prüfen.

**636. Albumosen.** Der Prüfung auf Albumosen muß eine vollständige Entfernung des koagulierbaren Eiweißes vorausgehen. Man erreicht das mit folgender Methode (Hohlweg und Meyer<sup>1</sup>), von der außerdem festgestellt ist, daß sie zu keiner künstlichen Bildung von Albumosen aus Eiweiß führt. 50 ccm blutfarbstoffreies\*) Serum wird mit 50 ccm einer Mischung von gleichen Teilen 1 proz. Essigsäure und 5 proz. Monokaliumphosphatlösung versetzt und nach Verdünnung mit 300 ccm Wasser und Zusatz von 400 ccm gesättigter Kochsalzlösung durch Kochen koaguliert. Das Filtrat, welches keine Biuretreaktion gibt, zeigt eine solche erst, nachdem es nach genauer Neutralisation bis auf  $\frac{1}{10}$ — $\frac{1}{20}$  eingengt ist. Der Albumosengehalt des Blutserums kann also nur ein ganz geringer sein.

Die Prüfung anderer seröser Flüssigkeiten kann in derselben Weise erfolgen. Der Zusatz der Essigsäuremonokaliumphosphatlösung, dessen Menge sich nach der Alkaleszenz richtet, erfolgt bis zur sauren Reaktion gegen Lackmus, aber noch neutralen Reaktion gegen Kongo, der Grad der Verdünnung durch Wasserzusatz richtet sich nach dem Eiweißgehalt. Kochsalz wird bis zur Halbsättigung der Gesamtflüssigkeit zugesetzt.

Man kann auch die Entfernung des Eiweißes nach Michaelis und Rona<sup>2</sup>) in folgender Weise bewirken\*\*). 50 ccm Serum werden unverdünnt mit 500 ccm

\*) Bei Anwesenheit von Blutfarbstoff kann aus diesem stammende biuretgebende Substanz in die Flüssigkeit gelangen (s. besonders Morawitz u. Dietschy: Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmacol. Bd. 54, S. 88. 1906).

\*\*\*) Über die Widerlegung der von Freund<sup>3</sup>) gegen dieses Verfahren gemachten Einwände s. Michaelis u. Rona<sup>4</sup>) sowie Abderhalden<sup>5</sup>).

<sup>1</sup>) Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 11, S. 381. 1908.

<sup>2</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 5, S. 365. 1907; Bd. 3, S. 107. 1907; Bd. 4, S. 11. 1907.

<sup>3</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 7, S. 361. 1908.

<sup>4</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 8, S. 356. 1908.

<sup>5</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 8, S. 360. 1908.

einer milchigen Mastixsuspension\*) versetzt und mit Essigsäure (20 ccm einer 10proz. Essigsäure) schwach angesäuert. Nach einer halben Stunde fügt man die gleiche Menge Mastixsuspension portionsweise hinzu, säuert wieder mit 20—30 ccm der Essigsäure an, setzt in Portionen 20—30 ccm 10proz. Magnesiumsulfatlösung hinzu, bis eine deutliche Flockung auftritt, und filtriert nach kurzer Zeit, evtl. nach Digerieren in lauwarmem Wasser, ab. Da ein kleiner Teil der etwa vorhandenen Albumosen bei diesem Verfahren zusammen mit dem Eiweiß im Niederschlag sich befindet, so muß man diesen Niederschlag nach dem Trocknen und gründlichen Extrahieren mit Äther im Soxhlet-Apparat (bis der Äther keinen Rückstand von Mastix mehr hinterläßt) mit Wasser auskochen. Der so erhaltene Wasserauszug, welcher den Rest der Albumosen enthält, wird mit dem obigen Filtrat vereinigt, eingeengt und mit der Biuretreaktion geprüft. — Vorteilhaft läßt sich die Mastixmethode auch dann anwenden, wenn man vorher die Hauptmenge des Eiweißes mittels Alkohol oder durch Koagulation in der Siedehitze entfernt hat.

Läßt der Ausfall der Biuretreaktion im Filtrat auf eine reichliche Anwesenheit von Albumosen schließen, so kann man die Enteiweißung in der gewöhnlichen Weise (§ 637) vornehmen und das Filtrat nach § 397 oder § 398 untersuchen (s. ferner § 641 unter Reststickstoff).

Über die Darstellung der Mucinalbumose, die mit Albumosen im Serum leicht verwechselt wird<sup>1)</sup>, s. § 469.

*Bestimmung der gerinnbaren Eiweißstoffe in serösen Flüssigkeiten.*

**637. Albumin + Globuline.** Man erhitzt 50—100 ccm Wasser in einer Porzellanschale zum Kochen und trägt eine kleine gemessene oder gewogene Menge der zu untersuchenden Flüssigkeit (etwa 15—20 ccm) in das siedende Wasser ein. Man erhält noch einige Minuten im Sieden, während man mittels eines Glasstabes kleine Tropfen verdünnter Essigsäure hinzufügt, bis die Gerinnung großflockig und die Flüssigkeit klar erscheint, filtriert durch ein gewogenes, aschefreies Filter, wäscht mit Wasser, kochendem Alkohol und mit Äther aus, trocknet bei 120° bis zum konstanten Gewicht, verascht und bringt das Gewicht der Asche in Abzug. Die Resultate fallen gewöhnlich ein wenig zu niedrig aus, da etwas von den Eiweißstoffen in Lösung bleibt; man prüft das Filtrat mit etwas Ferrocyankalium + Essigsäure und wiederholt die Fällung in einer neuen Portion, wenn hierbei deutliche Trübung eintritt.

**638. Albumin, Globuline.** Man fügt zu einer gemessenen oder gewogenen Menge der Flüssigkeit (20—50 ccm) das gleiche Volumen gesättigter neutraler Ammonsulfatlösung, filtriert nach mindestens einstündigem Stehen durch ein gewogenes aschefreies Filter und wäscht mit halbgesättigter Ammonsulfatlösung aus, bis das Filtrat keine Reaktion mit Ferrocyankalium + Essigsäure mehr gibt.

a) Das Filtrat wird zum Kochen erhitzt, mit Essigsäure ganz schwach angesäuert, nochmals aufgekocht und durch ein gewogenes, aschefreies Filter filtriert. Der Niederschlag wird anhaltend mit heißem Wasser, zuletzt mit heißem Alkohol und mit Äther gewaschen und bei 120° bis zum konstanten Gewicht getrocknet. Die Substanz wird verascht und das Gewicht der Asche in Abzug gebracht: Albumin.

\*) Man stellt eine 10proz. alkoholische Lösung von Mastix her, läßt einige Tage stehen und gießt oder filtriert die überstehende klare Flüssigkeit ab. Von dieser haltbaren Lösung mischt man für jedesmaligen Gebrauch ein Volumen durch plötzliches Zusammengießen mit der doppelten Menge Wasser. Es entsteht eine milchige Suspension.

<sup>1)</sup> Bywaters: Biochem. Zeitschr. Bd. 15, S. 344. 1909.

b) Der Niederschlag wird einige Zeit bei 110° erhitzt, dann mit heißem Wasser, Alkohol und Äther ausgewaschen und in der gleichen Weise, wie unter a) angegeben, weiter behandelt: Serumglobulin + Fibrinogen.

Hat man in einer besonderen Portion der Flüssigkeit die Summe der gerinnbaren Eiweißstoffe bestimmt, so dient diese Globulinbestimmung als Kontrolle.

Zur getrennten Bestimmung des sog. Eu- und Pseudoglobulins hat man zunächst durch Zufügen des halben Volumens gesättigter Ammonsulfatlösung das Euglobin und aus dem Filtrat durch Zusatz von Ammonsulfatlösung bis zur Halbsättigung das Pseudoglobulin abzuscheiden. Wallerstein<sup>1)</sup> fällt in einer Portion die Gesamtmenge des Globulins durch das gleiche Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung, in einer anderen das Euglobin (+ Fibringlobulin) durch das gleiche Volumen gesättigter Kaliumacetatlösung und findet durch Subtraktion der so erhaltenen Werte die Menge des Pseudoglobulins. Er empfiehlt die Flüssigkeit mit Wasser (4fache Menge) vor der Fällung zu verdünnen.

Eine quantitative Trennung und Bestimmung von Albumin und Globulinen ist indessen auf diese Weise nicht zu erreichen.

**639. Fibrinogen.** Eine genaue Bestimmung des Fibrinogens ist noch nicht ausführbar. Ob sich das von Reye<sup>2)</sup> (§ 335) angegebene Isolierungsverfahren für diesen Zweck eignet, müssen weitere Untersuchungen lehren. Näherungswerte erhält man, wenn man eine abgemessene, nicht zu kleine Portion der Flüssigkeit (40—100 ccm) mit einer nicht zu geringen Menge des aus frisch geronnenem Blut ausgepreßten, durch Leinwand filtrierten Serums versetzt (ein mäßiger Gehalt des letzteren an roten Blutkörperchen schadet nicht weiter), 24 Stunden bei 20—30° stehen läßt, dann das gebildete Fibrin schlägt, auf einem gewogenen Filter sammelt, zuerst mit 1proz. Chlornatriumlösung, dann mit Wasser, endlich mit heißem Alkohol wäscht, bei 120° trocknet und wägt. Das Gewicht des gebildeten Fibrins kann man als ungefähren Ausdruck des Gewichts vom Fibrinogen in der untersuchten Flüssigkeit gelten lassen. (Will man den Zweifel ausschließen, ob auch das ganze Fibrinogen bei diesem Versuche zur Gerinnung gebracht sei, so stelle man zwei solche Bestimmungen an und setze vom frisch ausgepreßten Serum zur einen Portion des Transudats doppelt so viel als zur andern hinzu. Hat sich dann nach 24 Stunden in beiden Versuchen gleich viel Fibrin abgeschieden, so ist auch sicher das ganze Fibrinogen in Fibrin umgewandelt.)

Die Circumpolarisation kann zur Bestimmung der Eiweißstoffe nicht verwandt werden, da einerseits die Angaben über die spezifische Drehung der einzelnen Eiweißstoffe schwanken, andererseits diese Eiweißstoffe in wechselnden Mengenverhältnissen in den serösen Flüssigkeiten vorkommen.

Über die Bestimmung von Serumglobulin und Fibrinogen in kleinen Mengen Mikrobestimmung. Blut siehe § 701.

#### *Refraktometrische Bestimmung der Serumproteine.*

**640.** Mit Hilfe des Eintauchrefraktometers von Pulfrich (s. § 35) werden heute vielfach Proteinbestimmungen in Serum und anderen Körperflüssigkeiten durchgeführt. Wenn die Methode auch nicht zu absolut genauen Werten führt, so ist sie doch deshalb besonders wertvoll und durch andere Methoden nicht ersetzbar, weil sie allein gestattet, mit wenig Blut auszukommen. Die spezifische Refraktion eines Lösungsgemenges ist gleich der Summe der spezifischen Refraktionen der einzelnen gelösten Bestandteile\*). Im Serum befindet sich etwa 6—7 mal so viel Eiweiß gelöst als von allen übrigen Bestandteilen zusammen vorhanden ist. Letztere schwanken zudem in ihrem gegenseitigen Mengenverhältnis

\*) Die gegenteilige Ansicht von Schorer (Sahli-Festschr., Basel 1913, S. 221) ist nicht richtig.

<sup>1)</sup> Diss. Straßburg 1902.

<sup>2)</sup> Diss. Straßburg 1898; s. auch § 335. — Langstein u. Mayer: Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 5, S. 69. 1904. — S. auch Lewinski: Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 100, S. 611. 1903.

Bestimmung  
des gesamten  
Proteingehaltes.

kaum im normalen Blut gesunder Personen\*): Für solches läßt sich daher das refraktometrische Inkrement, das durch die Gesamtheit der nicht proteinartigen gelösten Bestandteile bedingt ist, als konstant voraussetzen und dann der Eiweißgehalt aus dem Refraktometerwert, von dem derjenige des destillierten Wassers (bei  $17,5^\circ = 1,33320$ ) und der nicht eiweißartigen Bestandteile (0,00277) abziehen ist, berechnen. Letzteren Wert bestimmten Neuhausen und Rioch<sup>1)</sup> für menschliches Serum zu 0,0026 bis 0,0020, im Mittel 0,0022, Rohrer<sup>2)</sup> zu 0,00189 bis 0,00229 für die dialysablen Stoffe des Serums, unter Mitberücksichtigung der Fette und Lipide. 1% Eiweiß erhöht  $n_D$  um 0,00172 nach Reiss<sup>3)</sup>, Robertson<sup>4)</sup>, um 0,00178 nach Rohrer, um 0,00194 nach Neuhausen und Rioch. Der Eiweißgehalt in 100 ccm Serum berechnet sich also  $F = \frac{n_D - (1,33320 + 0,00277)}{0,00172}$

bzw. dem Ansatz mit den entsprechenden Konstanten der anderen Forscher. Bei der Firma Zeiss ist eine Tabelle erhältlich, die nach Art der Logarithmentafeln benutzt wird und die Eiweißprocente unmittelbar zu entnehmen erlaubt.

Bestimmung des Verhältnisses  
Albumin - Globulin

nach Robertson

Das Inkrement für 1proz. amorphes Serumalbumin beträgt nach Reiss 0,00183, nach Robertson 0,00177, dasjenige für die Globuline des Serums nach Robertson im Mittel 0,00227. Aus dem Serum lassen sich die Globuline durch Halbsättigung mit Ammonsulfat entfernen, der Refraktometerwert des Filtrats erlaubt den Gehalt an Albuminen zu bestimmen. Kennt man noch das Inkrement, das durch die nicht eiweißartigen, durch Kochen bei essigsaurer Reaktion nicht entfernbaren Bestandteile des Serums bedingt ist, so läßt sich auch der Gehalt an Globulinen und damit das Mischungsverhältnis beider Proteine berechnen. Die Bestimmung ist nach Robertson<sup>5)</sup> mit 1,5 ccm Serum durchzuführen.

nach Naegeli-  
Rohrer.

Genauer und einfacher ist Naegelis<sup>6)</sup> Methode zur Bestimmung des Mischungsverhältnisses von Albumin und Globulin; sie beruht auf der Beobachtung, daß die Globuline die Viscosität des Serums stärker ändern als die Albumine. Die Viscosität ändert sich mit der Verdünnung für jeden Eiweißkörper in bestimmter Weise und anders als der Refraktometerwert. Letzterer gibt wiederum den Eiweißgehalt des Serums an, die Viscositätsbestimmung das Mischungsverhältnis. Rohrer<sup>7)</sup> hat beide Werte in sehr praktischer Weise als Funktionskurven der Albumine und Globuline in ein Koordinatensystem eingefügt<sup>8)</sup>.

Anwendung der Methode auf Blut gesunder und kranker Personen s. bei Alder<sup>9)</sup>, Bircher<sup>10)</sup> und Rohrer<sup>11)</sup>, auf pathologische Flüssigkeiten Rusznyak<sup>12)</sup>, Wanner<sup>13)</sup>, Kritik s. bei Rohrer<sup>14)</sup>.

\*) Bei Krankheiten s. Naegeli: Blutkrankheiten und Blutdiagnostik. 4. Aufl. Berlin: Julius Springer 1923, S. 48.

<sup>1)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 55, S. 354. 1923. <sup>2)</sup> Schweiz. med. Wochenschr. Bd. 52, S. 555. 1922.

<sup>3)</sup> Ergebn. d. inn. Med. und Kinderheilkunde Bd. 10, S. 531. 1903. Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 51 S. 19. 1904. Handb. d. biol. Arbeitsmeth., herausg. v. Abderhalden. Abt. IV, Teil 3, S. 310. Berlin: Urban & Schwarzenberg 1923. und die dem Apparat von der Firma Zeiss beigegebenen Tabellen.

<sup>4)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 8, S. 441. 1901/11; Bd. 11, S. 179. 1912; Bd. 13, S. 325. 1912/13; Bd. 22, S. 233. 1915.

<sup>5)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 22, S. 233. 1915.

<sup>6)</sup> Blutkrankheiten und Blutdiagnostik. 4. Aufl. 1923, S. 50.

<sup>7)</sup> Dtsch. Arch. f. klin. Med. Bd. 121, S. 221. 1917.

<sup>8)</sup> a. a. O. S. 234 abgebildet, sowie bei Reiss in Abderhaldens biol. Arbeitsmeth., S. 325. In Tabellenform zu beziehen durch H. H. Lauppische Buchhandlung, Tübingen.

<sup>9)</sup> Dtsch. Arch. f. klin. Med. Bd. 126, S. 61. 1918.

<sup>10)</sup> Journ. of laborat. a. clin. med. Bd. 7, S. 733. 1922. Ber. üb. d. ges. Physiol. u. Pharm. Bd. 17, S. 54. 1923.

<sup>11)</sup> Schweiz. med. Wochenschr. Bd. 52, S. 555. 1922.

<sup>12)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 133, S. 359. 1922.

<sup>13)</sup> Schweiz. med. Wochenschr. Bd. 52, S. 785. 1922.

<sup>14)</sup> desgl. Bd. 52, S. 789. 1922.

**Bestimmung des Gesamtstickstoffs und des Reststickstoffs in serösen Flüssigkeiten.**

641. Der Gesamtstickstoff wird nach Kjeldahl bestimmt (§ 558, b).

Unter Reststickstoff versteht man denjenigen Stickstoff seröser Flüssigkeiten, welcher in anderer Form als in Form koagulierbarer Proteine vorhanden ist.

Zu seiner Bestimmung behandelt man die Flüssigkeit nach § 636 und bestimmt in dem eingengten Filtrat den Stickstoff nach Kjeldahl (§ 558, 6).

Sollen die Albumosen ebenfalls entfernt werden, so verfährt man nach Folin und Wu (§ 652, 5). 5proz. Trichloressigsäure fällt die Albumosen nicht, bei anderen Methoden der Enteiweißung gehen wechselnde Teile des Reststickstoffs in den Niederschlag über<sup>1)</sup>.

Über eine Mikromethode s. § 700.

Mikrobestimmung.

Näheres über den Reststickstoff, der in der Regel zum allergrößten, aber wechselnden Teil aus Harnstoff besteht, s. bei Hohlweg und Meyer<sup>2)</sup> und Feigl<sup>3)</sup>.

**Nachweis und Bestimmung des Ammoniaks in Blut und serösen Flüssigkeiten.**

642. Der Nachweis des Ammoniaks geschieht nach § 51.

Für die Bestimmung in serösen Flüssigkeiten und ebenso im Blut benutzt man das Vakuumdestillationsverfahren (§ 578, 1) unter Zusatz von Natriumcarbonat, Kochsalz und Alkohol (Folin<sup>4)</sup>). Der Zusatz von Magnesiumoxyd, den Nencki<sup>5)</sup> und seine Mitarbeiter empfohlen haben, ist weniger empfehlenswert, da er, wenigstens unter Umständen, eine Abspaltung von Ammoniak aus leicht zersetzlichen stickstoffhaltigen Verbindungen bewirken kann (Folin<sup>6)</sup>, Grafe<sup>7)</sup>).

Man nimmt auf 50 ccm seröser Flüssigkeit oder Blut 16 g Natriumchlorid, 25 ccm Alkohol und 5 g krystallisierte Soda und verfährt im übrigen nach § 578, 1 unter Benutzung des dort beschriebenen Apparates.

Henriques und Christiansen<sup>8)</sup> empfehlen, das Blut (20 ccm) mit dem 4fachen Volumen Alkohol und  $\frac{1}{4}$  Volumen ausgekochter 10proz. Sodalösung zu versetzen und einen sehr kräftigen Strom von ammoniakfreier Luft durch das Gemisch etwa 3 Stunden lang zu saugen. Die Luft streicht durch 2 mit Schwefelsäure beschickte Waschflaschen. Aus der Waschflüssigkeit wird der mit übergegangene Alkohol abdestilliert und darauf das abgefangene Ammoniak im Kjeldahlkolben übergetrieben und jodometrisch titriert. Genaue Angaben finden sich in der Originalarbeit. Wenn während des Durchsaugens die Temperatur des Blutes unter 20° gehalten wird, so kann auch Kalkmilch oder Magnesia zum Austreiben des Ammoniaks benutzt werden; bei höherer Temperatur führt Soda am meisten zu Zersetzungen und vermehrter Abgabe von Ammoniak.

Über die Bestimmung in kleinen Mengen Blut s. § 699.

Mikrobestimmung.

**Nachweis und Bestimmung des Harnstoffs in serösen Flüssigkeiten, Blut und Organen.**

643. Um sehr geringe Mengen von Harnstoff aus serösen Flüssigkeiten oder Blut, Galle, Milch oder aus Organen zu isolieren und möglichst quantitativ zu bestimmen, verfährt man nach 1. oder 2. Seine Bestimmung kann durch Wägung als Dixanthylharnstoff nach 3. erfolgen oder auf indirektem Wege nach 4.

<sup>1)</sup> Van Slyke u. Hiller: Journ. of biol. chem. Bd. 53, S. 253. 1923.

<sup>2)</sup> Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 11, S. 381. 1908.

<sup>3)</sup> Zeitschr. f. d. ges. exp. Med. Bd. 12, S. 55. 1921.

<sup>4)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 37, S. 161. 1902/03. — Schittenhelm: desgl. Bd. 39, S. 73. 1903.

<sup>5)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 33, S. 193. 1901; Bd. 35, S. 246. 1902.

<sup>6)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 37, S. 166. 1902/03.

<sup>7)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 48, S. 312. 1906.

<sup>8)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 78, S. 172. 1917 u. Bd. 80, S. 310. 1917.

Verfahren nach  
Hoppe-Seyler.

**1. Verfahren nach Hoppe-Seyler.** Die Flüssigkeit oder das zu untersuchende frische, schnell\*) zerkleinerte Organ oder frisches Blut werden mit dem 3—4fachen Volumen starken Alkohols gut gemischt und 24 Stunden bei gewöhnlicher Temperatur stehen gelassen. Dann filtriert man ab, wäscht den Rückstand mehrmals mit Alkohol und engt die vereinigten Filtrate zur Entfernung der Hauptmenge des Alkohols bei mäßiger Temperatur (ungefähr 50°) oder im Vakuum ein.

Nach dem Erkalten säuert man mit Essigsäure stark an, fügt Chloroform hinzu, schüttelt gut und trennt im Scheidetrichter beide Flüssigkeiten. Die Chloroformlösung wird mit Wasser gewaschen und die Waschflüssigkeit mit der übrigen wässrig-alkoholischen Lösung vereinigt. (Durch das Chloroform werden den Filtrationen sehr hinderliche Phosphatide, ferner Seifen, Fette und Cholesterin aufgenommen und entfernt.) Die wässrig-alkoholische Lösung wird nun durch Abdampfen bei mäßiger Wärme von Alkohol befreit, mit Schwefelsäure nach dem Erkalten stark sauer gemacht und zur Entfernung von Pepton, Kreatinin und etwa vorhandenen Basen mit Phosphorwolframsäure gefällt, solange ein Niederschlag entsteht. Den Niederschlag wäscht man einige Male mit schwefelsäurehaltigem Wasser, übersättigt die vereinigten Filtrate mit Barytwasser, entfernt den Überschuß durch Einleiten von Kohlensäure, filtriert, dampft auf kleineres Volumen bei mäßiger Wärme ein und scheidet nun den Harnstoff mit salpetersaurem Quecksilberoxyd ab in der Weise der Harnstofftitrierung (§ 579, 2), indem aber statt Natriumcarbonat zum Neutralisieren der freiwerdenden Salpetersäure Barytwasser dient und die Flüssigkeit bis zum Ende schwach sauer erhalten wird. Schließlich wird mit ein paar Tropfen Barytwasser fast neutralisiert, aber nicht alkalisch gemacht, der Niederschlag abfiltriert, einige Male mit kleinen Mengen Wasser gewaschen, mit dem Filter in etwas Wasser zerteilt und mit Schwefelwasserstoff das Quecksilber abgetrennt. Die Lösung soll jetzt außer vielleicht etwas salpetersaurem Baryt nur salpetersauren Harnstoff enthalten. Sie wird zur Austreibung des Schwefelwasserstoffs auf dem Wasserbade erwärmt und nach Zusatz von Bariumcarbonat bei mäßiger Wärme zur Trockne verdampft, der Rückstand mit absolutem Alkohol extrahiert und filtriert. Um kleine Mengen von salpetersaurem Baryt, der sich möglicherweise im Alkohol gelöst hat, zu entfernen, fügt man das gleiche Volum Essigäther hinzu, filtriert vom Niederschlag ab und verdunstet zur Trockne. Wiederholt man diese Operation (Lösen in Alkohol und Fällen mit Essigäther) mehrmals, so ist der salpetersaure Baryt völlig entfernt und beim Verdunsten krystallisiert Harnstoff aus. Aus Blut erhält man auf diese Weise schöne Krystalle, deren Menge durch die Wage direkt ermittelt werden kann; der aus Organen gewonnene Harnstoff ist meist nicht völlig von sirupösen Beimengungen zu trennen.

In diesem Falle empfiehlt Gottlieb<sup>1)</sup>, die Masse in wenig trockenem Alkohol zu lösen, ätherische Oxalsäurelösung in einer etwas größeren Menge als zur Ausfällung nötig ist, hinzuzufügen, die Flüssigkeit zu verdunsten, den Rückstand auf gewogenem Filter mit alkohol- und wasserfreiem Äther zur Entfernung der überschüssigen Oxalsäure auszuwaschen und zu wägen. Zur Charakterisierung und weiteren Bestimmung dient der Oxalsäuregehalt des Rückstandes. Man löst ihn in Wasser und ermittelt in der wässrigen Lösung die an Harnstoff gebundene Oxalsäure durch Titration mit  $\frac{n}{20}$ -Barytlösung. 1 ccm dieser Barytlösung entspricht 3 mg Harnstoff. Da der oxalsäure Harnstoff in Äther etwas löslich ist, so ist dem erhaltenen Harnstoffwert für je 10 ccm Waschäther 0,1 mg zuzuaddieren.

Verfahren nach  
Salkowski.

**2. Verfahren nach Salkowski<sup>2)</sup>.** Der wie unter 1 angegeben hergestellte Alkoholauszug wird bei gelinder Wärme verdunstet, der Rückstand mit Alkohol

\*) Siehe dazu das § 737 über die nach dem Tode schnell erfolgende Umwandlung des Harnstoffes in Ammoniak Gesagte.

<sup>1)</sup> Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 42, S. 238. 1899.

<sup>2)</sup> Arb. a. d. pathol. Inst. zu Berlin, S. 581. Hirschwald 1906.



aufgenommen, das Filtrat wieder verdunstet und dies Verfahren wiederholt, bis der Rückstand sich klar in absolutem Alkohol löst. Der Verdunstungsrückstand wird nun stark abgekühlt und mit Salpetersäure (1,2 spez. Gew.) versetzt, der Niederschlag nach 24stündigem Stehen in der Kälte auf (über Schwefelsäure getrocknetem) aschefreiem und glattem Filter gesammelt und kurz mit eiskalter Salpetersäure gewaschen. Man befreit das Filter durch Ausbreiten auf Filtrierpapier von überschüssiger Salpetersäure, bringt es in den Trichter zurück, wäscht mit absolutem Alkohol und mit Äther, trocknet und wägt.

An dem gefundenen Wert (Harnstoffnitrat) ist eine Korrektur anzubringen, wenn die Prüfung eine Beimengung von Natriumnitrat und Hypoxanthinnitrat ergibt. Die Prüfungen geschehen in folgender Weise:

**Prüfung auf Hypoxanthinnitrat** (nur nötig bei Untersuchung von Organen). Man löst den gesamten Niederschlag in Wasser, macht mit Ammoniak alkalisch und fügt Silbernitrat hinzu. Bei Anwesenheit von Hypoxanthin entsteht ein gelatinöser Niederschlag. Er wird auf aschefreiem Filter gesammelt, ausgewaschen, in gewogenem Porzellantiegel getrocknet und geglüht. Man wägt und zieht das Gewicht (216 Tl. Silber entsprechen 217 Tl. Hypoxanthinnitrat) von dem Wert für Harnstoffnitrat ab.

**Prüfung auf Natriumnitrat.** Man befreit das Filtrat von Hypoxanthinsilber durch einige Tropfen Schwefelammonium und Filtration (evtl. unter wiederholtem Abdampfen, wenn die Trennung durch Filtration nicht direkt gelingt) vom Silber, dampft das Filtrat in einem gewogenen Platintiegel ein und erhitzt vorsichtig. (War die Prüfung auf Hypoxanthin unnötig, so bringt man das Filter mit Harnstoffnitrat direkt in einen gewogenen Platintiegel und erhitzt vorsichtig.) Bleibt ein merklicher Rückstand (salpetersaures Natron), so dampft man ihn mit konzentrierter Schwefelsäure ab, führt das zurückbleibende Mononatriumsulfat durch wiederholtes Erhitzen mit Ammoncarbonat in Dinatriumsulfat über und wägt. Das gefundene Natriumsulfat wird auf Natriumnitrat umgerechnet (71 Tl. Natriumsulfat entsprechen 85 Tl. Natriumnitrat) und dieser Wert von dem oben erhaltenen Wert für Harnstoffnitrat abgezogen.

### 3. Bestimmung mit XanthydroL nach Fosse<sup>1)</sup>.

Prinzip. In eiweißfreier, Essigsäure enthaltender wässriger Lösung fällt methylalkoholische

Bestimmung mit  
XanthydroL.

XanthydroLlösung schwer löslichen DixanthyLharnstoff  $\text{CO} \left( \text{NH} \cdot \text{CH} \begin{array}{c} \diagup \text{C}_6\text{H}_4 \diagdown \\ \diagdown \text{C}_6\text{H}_4 \diagup \end{array} \text{O} \right)_2$ . XanthydroL gibt mit anderen Blutbestandteilen kein Kondensationsprodukt von gleicher Unlöslichkeit.

**Erforderliche Lösungen.** 1. Zum Enteiweißen wird meist angewandt Quecksilberkaliumjodid nach Tanret (2,71 g  $\text{HgCl}_2$ , 7,2 g KJ, 66,6 g Eisessig auf 100 ccm mit Wasser verdünnen). Auch andere Enteiweißungsmethoden (Sublimat nach Schenk, Trichloressigsäure, Kochen) sind brauchbar.

2. 5—10proz. methylalkoholische Lösung von XanthydroL\*).

**Ausführung.** 10 ccm Serum oder weniger und entsprechend verdünnt, so daß 1 ccm etwa 0,5 mg Harnstoff enthält, werden mit der eben genügenden\*\*) Menge von Tanrets Reagens versetzt (etwa 10 ccm) und zentrifugiert. Zur klaren Lösung gibt man Eisessig bis zum Gehalt von etwa 70% und 5—10proz. klare,

\*) Zu einer Lösung von 15 g Xanthon und 50 g Natriumhydroxyd in 400 ccm Alkohol fügt man in Portionen 15 g Zinkstaub, so daß stets etwas Zink ungelöst bleibt. Nach mehrstündigem Stehen wird in viel Wasser hineinfltriert. Der entstandene Niederschlag wird abfltriert, mit Wasser gewaschen und kurze Zeit über Schwefelsäure getrocknet. Ausbeute bis 13 g. Schmelzp. 122—124°. (H. Meyer: Analyse und Konstitutionsbestimmung org. Verbind. 4. Aufl. 1922. S. 586). Das XanthydroL ist meist genügend rein; es soll frei von dem schwer löslichen DixanthyLäther (Schmelzp. um 200°) sein und sich in warmem, trockenem Methylalkohol klar lösen.

\*\*) Da DixanthyLharnstoff vom Reagens gelöst wird.

<sup>1)</sup> Ann. de l'inst. Pasteur Bd. 30, S. 526. 1916. — Feigl: Zeitschr. f. d. ges. exp. Med. Bd. 12, S. 103. 1921.

methylalkoholische Xanthydrolösung. Auf 1 g Harnstoff werden 150—300 ccm gebraucht. Nach 3stündigem Stehen wird in einem Goochtiegel abfiltriert, mit Methylalkohol gewaschen, getrocknet und gewogen. Schmelzp. 261°. Das Kondensationsprodukt ist meist rein. Es ist unlöslich in den üblichen organischen Lösungsmitteln, widerstandsfähig gegen Lauge. Zum Umkrystallisieren eignet sich trocknes Pyridin, das in der Siedehitze 1% löst. Beim Abkühlen erscheinen seidenglänzende farblose Nadelchen. 1 g Xanthydrolharnstoff = 0,142857 g Harnstoff.

Indirekte Bestimmungsverfahren:

4. **Indirekte Verfahren.** Sie verzichten auf eine Isolierung des Harnstoffs und begnügen sich mit einer möglichst weitgehenden Entfernung anderer stickstoffhaltiger Substanzen aus der harnstoffhaltigen Lösung. Dieser selbst wird dann in Ammoniak übergeführt und letzteres bestimmt. Alle Verfahren gestatten, zugesetzten Harnstoff quantitativ wiederzufinden; bei Normalblut geben sie brauchbare und ziemlich übereinstimmende Werte. Bei der Untersuchung von Blut abnormer Zusammensetzung und mancher Organe (z. B. Muskeln) geben die gasometrischen Verfahren (§§ 580, 5, 702, 3 u. 4) und dasjenige von Bang (§ 702, 2) leicht zu hohe Werte (Feigl<sup>1</sup>).

nach Pflüger-Bleibtreu

a) Bestimmung nach Pflüger-Bleibtreu<sup>2</sup>). Die Ausführung ist genau die gleiche, wie sie (§ 580, 3) für die Bestimmung des Harnstoffs im Harne beschrieben worden ist. Für die Zerstörung durch Phosphorsäure nimmt man von dem Filtrat der mit Kalkpulver verriebenen Flüssigkeit eine Quantität, welche 5 oder 10 ccm der serösen Flüssigkeit entspricht.

nach Schöndorff

Die Methode beruht ebenso wie im Harne darauf, daß nach den Ermittlungen von Schöndorff die Mengen Ammoniak und Kohlensäure, welche die mit Phosphorwolframsäure-Salzsäure ausgefallten Flüssigkeiten beim Erhitzen mit Phosphorsäure bzw. mit alkalischer Chlorbariumlösung auf 150° liefern, sich wie 2 : 1 verhalten und daß der Harnstoff der einzige bekannte Körperbestandteil ist, welcher Ammoniak und Kohlensäure in diesem Verhältnis liefert.

nach Henriques u. Gammeltoft.

b) Nach Henriques und Gammeltoft<sup>3</sup>). Es schließt sich eng an das vorige an, ist aber in der Ausführung einfacher. Von Blut, Serum werden etwa 10 ccm, von Organbrei entsprechende Mengen in  $\frac{1}{2}$ -Schwefelsäure gebracht und mit der eben zureichenden Menge  $\frac{1}{2}$ -Schwefelsäure, welche 10 proz. Phosphorwolframsäure enthält, ausgefällt. Mit  $\frac{1}{2}$ -Schwefelsäure wird im Meßkolben aufgefüllt, so daß etwa das 10fache Volumen des in Arbeit genommenen Organengewichts erhalten wird. Die Flüssigkeit wird gemischt, bleibt stehen, bis der Bodensatz sich gerade gesetzt, wird filtriert. Ein möglichst großer gemessener Teil des Filtrats wird  $1\frac{1}{2}$  Stunden bei 150° im Autoklaven erhitzt. Dann wird entweder mit Soda alkalisch gemacht und im Luftstrom das Ammoniak abgeblasen (§ 578, 2) oder Baryt im Überschuß zugesetzt und im Vakuum destilliert (§ 578, 1 am Schluß).

Mikroverfahren.

Methoden zur Bestimmung des Harnstoffs in kleinen Mengen Blut s. § 702.

#### *Isolierung von Allantoin aus Blut<sup>4</sup>).*

644. Frisches Oxalatblut wird mit dem doppelten Volumen Wasser verdünnt und in dünnem Strahl unter Rühren in das 3fache Volumen 3,3 proz. Sublimatlösung, die 1,3% Salzsäure enthält, einlaufen gelassen. Am nächsten Tag wird abgesaugt, das Filtrat mit starker Natronlauge vorsichtig neutralisiert und mit Soda bis zur beginnenden Rötung von Phenolphthalein

<sup>1</sup>) Zeitschr. f. d. ges. exp. Med. Bd. 12, S. 85, 103. 1921.

<sup>2</sup>) Schöndorff: Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 62, S. 1. 1896; Bd. 74, S. 307. 1899.

<sup>3</sup>) Skandinav. Arch. f. Physiol. Bd. 25, S. 168. 1911.

<sup>4</sup>) Hunter: Journ. of biol. chem. Bd. 28, S. 371. 1916/17.

versetzt. Die weiße Fällung wird nach 24stündigem Stehen isoliert\*) und mit Hilfe der Zentrifuge gewaschen, dann unter Zusatz von ein wenig Essigsäure in heißem Wasser zerteilt und mit Schwefelwasserstoff entquecksilbert. Das Filtrat wird im Vakuum stark eingeengt — bei Menschenblut krystallisiert Harnsäure aus — und mit 50proz. Phosphorwolframsäure ausgefällt. Man saugt — am besten über Kieselgur — ab und wäscht mit einer Lösung, die 2 $\frac{1}{2}$ % Phosphorwolframsäure und 3% Schwefelsäure enthält. Filtrate und Waschwässer werden vereinigt und mit Bleioxyd verrührt, bis sie Lackmus eben bläuen, und dann mit basischem Bleiacetat ausgefällt. Man kühlt gut, saugt ab und wäscht mit Eiswasser nach. Wenn nötig, werden jetzt Chloride mit Silberacetat (unter Zusatz von etwas Essigsäure) entfernt. Schwefelwasserstoff entfernt den Überschuß von Blei und Silber, das Filtrat wird im Vakuum eingeengt. Mit chlorfreier Natronlauge wird bis zur beginnenden Rötung von Phenolphthalein versetzt, Natriumacetat zu etwa 10% in der Flüssigkeit aufgelöst und mit Wiechowskis Reagens (§ 127) ausgefällt. Ein Überschuß davon schadet nichts. Am nächsten Tag wird über etwas Kieselgur abgesaugt und mit dem Reagens nachgewaschen. Der Niederschlag wird in heißem Wasser unter Zusatz von ein wenig Essigsäure aufgeschlemmt, mit Schwefelwasserstoff zersetzt, das Filtrat davon wiederum neutralisiert und mit Wiechowskis Reagens ausgefällt. Wenn nötig, wird zum drittenmal umgefällt. Beim Einengen der Lösung krystallisiert Allantoin aus. Das Verfahren läßt sich leicht zu einem quantitativen gestalten.

***Bestimmung des präformierten Kreatinins in serösen Flüssigkeiten und Blut<sup>1)</sup>.***

645. Die Methode arbeitet nach dem colorimetrischen Verfahren nach Folin (§ 581). Zum Vergleich dient eine Lösung von Kreatinin, die zur gleichen Zeit in gleicher Weise angesetzt wird. Die Stammlösung, in 0,1proz. Salzsäure bereitet, ist haltbar. Das Enteiweißen hat zu geschehen, ohne daß vorhandenes Kreatinin in Kreatin oder Kreatin in Kreatinin umgewandelt wird. Kochen unter Zusatz von Essigsäure ist ganz unbrauchbar, ebenso Metaphosphorsäure, Phosphorwolframsäure, Phosphormolybdänsäure. Für Serum, Vollblut und Organe eignet sich die Eisenhydroxydmethode von Michaelis und Rona<sup>2)</sup> (§ 652, 2a) mit nachfolgendem Eindampfen im Vakuum. Bei Trichloressigsäure (frisch bereitete 10proz. Lösung) unterbleibt die Vakuumdestillation des lästigen Schäumens wegen am besten. Wenn in 100 ccm der Lösung wenigstens 0,7 mg Kreatinin vorhanden sind, kommt man ohne Einengen aus. Trichloressigsäure enteiweißt am bequemsten Serum und Organauszüge; bei Vollblut erhält man weniger gute Werte.

Man nimmt z. B. 100 ccm Serum, verdünnt mit 200 ccm Wasser, setzt tropfenweise unter Umschütteln 100 ccm Lig. ferri oxyd. dialys. zu und verfährt weiter wie § 740 beschrieben (Hahn und Meyer). Blut verdünnt man stärker (Rona) § 652, 2a.

Über die Bestimmung in kleinen Blutmengen s. § 703.

Mikroverfahren.

***Bestimmung von Kreatin + Kreatinin (Gesamtkreatinin) in serösen Flüssigkeiten und Blut.***

646. Enteiweißt wird mit Trichloressigsäure oder Wolframsäure (§ 652, 5). Zur vollständigen Überführung des Kreatins in Kreatinin läßt man nach Hahn

\*) Das Filtrat wird mit Wiechowskis Reagens (§ 127) und Allantoinlösung auf Vollständigkeit der Fällung geprüft.

<sup>1)</sup> Hahn u. Barkan: Zeitschr. f. Biol. Bd. 72, S. 312. 1920. — Hahn u. Meyer: desgl. Bd. 76, S. 250. 1922.

<sup>2)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 27, S. 348. 1910.

in etwa  $\frac{1}{2}$ -salzsaure Lösung 24 Stunden im Thermostaten bei 60—65° stehen. Zu diesem Zweck versetzt man das enteiweißte saure Filtrat mit einigen Tropfen p-Nitrophenol (1 proz. alkoholische Lösung) und neutralisiert mit starker Natronlauge bis zum Umschlag in Gelb, dann fügt man die berechnete Menge starker Salzsäure zu und läßt stehen. Zum Schluß wird wieder mit starker Natronlauge die Salzsäure abgestumpft und ein aliquoter Teil zur colorimetrischen Bestimmung verwendet (§ 581).

Für die Bestimmung im Serum nimmt man nach Hahn und Meyer 50 ccm, verdünnt mit 25 ccm Wasser, setzt 50 ccm einer 10 proz. frisch hergestellten Lösung von Trichloressigsäure hinzu, filtriert nach  $\frac{1}{4}$  Stunde von dem Niederschlag ab und nimmt für die Bestimmung 100 ccm. S. auch § 739.

Mikroverfahren.

Über die Bestimmung in kleinen Blutmengen s. § 703.

#### *Nachweis der Harnsäure in serösen Flüssigkeiten und Blut.*

Verfahren nach  
v. Schröder.

647. a) Verfahren nach v. Schröder<sup>1)</sup>. Man verdünnt die Flüssigkeit mit Wasser (Blutserum auf sein 5faches Volumen), erhitzt unter Zusatz von Essigsäure zum Kochen, filtriert, dampft zur Trockne ein und nimmt den Rückstand mit heißem Wasser auf. In der trüben Flüssigkeit erzeugt man durch Zusatz von etwas Magnesiumsulfat und Natriumcarbonat einen Niederschlag und erzielt dadurch eine schnelle Filtration. Das klare Filtrat wird nach § 583, 1 mit Magnesiamischung und Silbernitrat gefällt, ausgeschiedenes Chlorsilber durch Ammoniak gelöst, der flockige Niederschlag filtiert, ausgewaschen und mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Man dampft jetzt, ohne zu filtrieren, nach Zusatz von etwas verdünnter Essigsäure ein, zerteilt den Rückstand in heißem Wasser, kocht die Flüssigkeit, versetzt sie mit ein paar Tropfen Natronlauge oder Sodaauslösung und filtriert sofort in ein etwas Essigsäure enthaltendes Becherglas. Die essigsäure Lösung wird auf ein kleines Volumen eingedampft und an einem kühlen Ort der Krystallisation überlassen. Die Krystalle werden mikroskopisch und mit Hilfe der Murexidreaktion (S. 173) auf Harnsäure geprüft.

Verfahren nach  
Brugsch und  
Schittenhelm.

b) Verfahren nach Brugsch und Schittenhelm<sup>2)</sup>. Man gießt die Flüssigkeit (Plasma, Blut) in eine heiße wässrige, etwa 2—5 proz. Kalilauge langsam ein, erhitzt zum Kochen und bewirkt die Koagulation durch allmähliches Zutropfen von Essigsäure. Folin<sup>3)</sup> vermeidet beim Enteiweißen die Wärme. Nachdem das abfiltrierte Coagulum nochmals derselben Behandlung (Eintragen in etwa 5 proz. Kalilauge usw.) unterworfen worden ist, engt man die vereinigten Filtrate ein und fällt die Harnsäure nach Krüger und Schmid (§ 584), wobei es sich aber empfiehlt, länger als 3 Minuten zu kochen. Ist der abgeschiedenen Harnsäure noch Eiweiß beigemischt, so behandelt man den Niederschlag in der Wärme mit Alkalilauge, filtriert und fällt nochmals mit Kupfersulfat-Bisulfid. Die ausgeschiedenen Krystalle werden mikroskopisch und mit der Murexidreaktion (S. 173) auf Harnsäure geprüft.

Verfahren nach  
Hopkins-  
Kowarsky.

c) Verfahren nach Hopkins-Kowarsky<sup>4)</sup>. 10 ccm Blut werden in ein Gemisch von 30 ccm 0,9 proz. Kochsalzlösung und 50 ccm 0,5 proz. Monokaliumphosphatlösung gebracht und das Ganze unter Umrühren zum Sieden erhitzt und 2 Minuten lang im Kochen erhalten. Dann wird in eine Porzellanschale filtriert, Filter samt Niederschlag mit etwa 100 ccm Wasser ausgekocht und erneut filtriert, die vereinigten Filtrate auf etwa 3—4 ccm eingengt. Die Flüssig-

<sup>1)</sup> Beitr. z. Physiol., C. Ludwig gewidmet, 1887, S. 89. — Abeles: Wien. med. Jahrb. 1887, S. 479.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. exp. Pathol. u. Therapie Bd. 4, S. 440. 1907.

<sup>3)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 54, S. 153. 1922.

<sup>4)</sup> Weber-Kowarsky: Pharmazeut. Zeit. Bd. 57, S. 252. 1912.

keit wird, am besten auf der Zentrifuge, von Eiweiß- und Phosphatniederschlägen befreit. Das Volumen soll jetzt 5 ccm nicht übersteigen. Man fügt 6—7 Tropfen einer 10proz. Natronlauge hinzu und sättigt mit Ammoniumchlorid (1,0—1,2 g). Am nächsten Tage wird das ausgeschiedene Ammoniumurat durch Abschleudern gewonnen, mittels Salzsäure die Harnsäure freigemacht und durch die Murexidprobe (S. 173) und die Fällungsreaktionen identifiziert.

Über quantitative Bestimmung s. § 742.

Über die Isolierung „gebundener Harnsäure“ (Harnsäureribosid), die nur in den roten Blutkörperchen vorzukommen scheint, siehe § 281, a.

***Bestimmung der freien Purine (einschl. Harnsäure) im Blutserum nach Thannhauser<sup>1)</sup>.***

648. Das aus der Cubitalvene entnommene Blut (100—150 ccm) wird im Eisschrank absitzen gelassen, wenn nötig, wird zur raschen Gewinnung des Serums zentrifugiert. 40 ccm Serum werden mit je 40 ccm destilliertem Wasser und 1,55proz. Uranylacetatlösung verdünnt und vom Niederschlag abfiltriert. Von dem wasserklaren, biuretfreien Filtrat, das keine Spuren von Eiweiß, jedoch die Purine quantitativ enthält, werden 60 ccm mit der Pipette in ein Becherglas abgemessen und auf etwa 15 ccm auf dem Wasserbad eingeeengt. Die Flüssigkeit bleibt dabei vollständig klar. Man fügt etwa 0,5 g Natriumacetat und 1 ccm 40proz. Natriumbisulfitlauge hinzu und kocht auf. Sobald die Mischung stark kocht (nicht eher, da sonst die Fällung leicht kolloidal bleibt), wird 1 ccm 10proz. Kupfersulfatlösung zugesetzt und die Mischung 3—4 Minuten in kräftigem Kochen gehalten. Die dunkelbraune Fällung besteht aus einem grünlichbraunen, feinkörnigen Niederschlag von CuO und der graubraunen, flockigen Purinfällung. Nach vollständiger Abkühlung wird in ein Zentrifugenglas übergespült, der Niederschlag abgeschleudert und auf der Zentrifuge 4—5 mal mit Wasser gewaschen. Kjeldahlbestimmung (§ 558, b) im Niederschlag unter Abrechnung der Stickstoffmengen des Leerversuchs.

***Bestimmung gebundener Purine (Nucleotide) im Blutserum nach Thannhauser<sup>2)</sup>.***

649. 30 ccm Serum werden mit 55 ccm Wasser verdünnt; im Augenblick des Aufkochens gibt man 5 ccm 20proz. Sulfosalicylsäurelösung zu. Durch einen aufgesetzten Trichter wird ein Verdampfen von Wasser hintangehalten. Die koagulierte Mischung wird in Eis vollständig abgekühlt und ist dann gut zu filtrieren. Das Filtrat ist wasserklar und eiweißfrei. 50 ccm des Filtrats werden in einem Becherglas auf dem Wasserbad bis auf etwa 15 ccm eingeeengt. Die dabei etwas trübe gewordene Flüssigkeit wird, wie § 648 angegeben, mit Kupfersulfat und Bisulfit gefällt. Der grobflockige, dunkelbraune Niederschlag soll sich rasch absetzen; er wird auf der Zentrifuge abgetrennt und gewaschen und dann sein Stickstoffgehalt bestimmt (s. § 648).

***Nachweis der Amino- und Diaminosäuren-in serösen Flüssigkeiten.***

650. Die Flüssigkeit wird nach § 637 von Eiweiß befreit und das Filtrat eingeeengt. Vorhandenes Tyrosin scheidet sich zunächst ab, aus der Mutterlauge Leucin und andere Aminosäuren. Neuberg und Richter<sup>3)</sup> konnten so aus dem Serum eines Kranken mit akuter gelber Leberatrophie Tyrosin, Leucin und aus der Mutterlauge nach Kossel und Kutscher (§ 483) Lysin

<sup>1)</sup> Thannhauser u. Czoniczer: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 110, S. 311. 920.

<sup>2)</sup> Thannhauser u. Czoniczer: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 110, S. 317. 1920; s. ferner Jackson: Proc. of the soc. exp. biol. a. med. Bd. 20, S. 178. 1922; ref. in Ber. d. ges. Physiol. u. Pharm. Bd. 19, S. 64. 1923.

<sup>3)</sup> Dtsch. med. Wochenschr. 1904, S. 499.

erhalten. Erfolgt die Krystallisation nicht, so kann man den Rückstand mit heißem Alkohol extrahieren und das alkoholische Filtrat einengen.

Über Versuche mit Hilfe von  $\alpha$ -Naphthylisocyanat oder  $\beta$ -Naphthalinsulfochlorid Aminosäuren zu isolieren s. Neuberg und Strauss<sup>1)</sup>, v. Bergmann<sup>2)</sup>, über die Gewinnung von Glykoll mit Hilfe von  $\beta$ -Naphthalinsulfochlorid aus normalem Blut s. Bingel<sup>3)</sup>.

Aus dem normalen Blut hat Abderhalden<sup>4)</sup> sämtliche im Eiweiß vorkommenden Aminosäuren isoliert. Enteiweißen mit chemischen Mitteln bringt die Gefahr einer Hydrolyse mit sich, Dialysieren (vielleicht Ultrafiltrieren) darf allein in Betracht kommen. Die Aufarbeitung erfolgt im allgemeinen nach den Angaben der §§ 475 ff.

#### **Bestimmung des Amino- und Peptidstickstoffs in Blut und serösen Flüssigkeiten.**

651. Prinzip. Im eiweißfreien Filtrat wird Ammoniak und Harnstoff entfernt und der Amino-stickstoff mit van Slykes Mikroapparatur bestimmt (S. 492). Der peptidgebundene Stickstoff wird durch Säurehydrolyse in Aminogruppen übergeführt und die van Slyke-Bestimmung wiederholt.

**Ausführung.** Zum Enteiweißen<sup>5)</sup> sind ungeeignet: Alkohol, kolloidales Eisenhydroxyd, Metaphosphorsäure, 2,5 proz. Trichloressigsäure, Sublimat. Wolframsäure und Pikrinsäure schlagen Eiweiß vollständig, aber auch die Albumosen und Peptone nieder, lassen dagegen allen Aminostickstoff im Filtrat. Sollen erstere mitbestimmt werden, so eignet sich am besten Trichloressigsäure bei einem Gehalt von 5- oder 10% in der Lösung\*). Hierzu wird das Blut, dessen Harnstoff mit Urease zerstört ist, mit dem 4fachen Volumen Wasser verdünnt und unter ständigem Schütteln mit 10- bzw. 20 proz. Trichloressigsäure Tropfen für Tropfen versetzt, bis das Gesamtvolumen das 10fache des in Arbeit genommenen Blutes beträgt. Nach 20 Minuten langem Stehen wird filtriert, das Filtrat auf einen Gehalt von 2,5% Trichloressigsäure gebracht und auf freier Flamme 15 Minuten bis zur Zersetzung der überschüssigen Säure gekocht. Mit einigen Tropfen Natronlauge wird dann gegen Phenolphthalein alkalisch gemacht und im Vakuum zur Entfernung des Ammoniaks eingengt, mit Essigsäure eben sauer gemacht und auf ein bestimmtes Volumen (etwa die Hälfte des in Arbeit genommenen Blutes) gebracht.

In einem Teil wird der Amino-N-Gehalt im Mikroapparat von van Slyke (§ 492) bestimmt. Ein anderer Teil wird mit dem gleichen Volumen konzentrierter Salzsäure versetzt, locker mit Glas verschlossen, 24 Stunden im kochenden Wasserbad gehalten, dann stark, aber nicht ganz bis zur Trockne in einer Glasschale eingengt, gegen Alizarin mit starker Natronlauge neutralisiert, auf ein bekanntes Volumen gebracht und ebenfalls der van Slyke-Bestimmung unterworfen. Normales menschliches Blut enthält etwa 8 mg Amino-N und 3 mg Peptid-N in 100 cem.

#### **Nachweis und Bestimmung des Traubenzuckers in serösen Flüssigkeiten und Blut.**

Entfernung  
von Eiweiß.

Dem Nachweis und der Bestimmung hat die Entfernung des Eiweißes vorauszugehen. Für diese sind eine ganze Anzahl von Methoden angegeben, von denen folgende zu empfehlen sind:

\*) Auch Kaolin (§ 652, b) in der Wärme soll gut enteiweißen, ohne daß vom Niederschlag Amino- und Peptid-N mitgerissen wird. Bei der van Slyke-Bestimmung tritt kein lästiges Schäumen auf (Okada<sup>6)</sup>).

<sup>1)</sup> Berlin. klin. Wochenschr. 1906, S. 258.

<sup>2)</sup> Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 6, S. 40. 1905.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 57, S. 382. 1908.

<sup>4)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 114, S. 250. 1921 u. Lehrbuch d. physiol. Chem., 5. Aufl. 1923. Bd. 1, S. 535 ff.

<sup>5)</sup> Van Slyke u. Hiller: Journ. of biol. chem. Bd. 53, S. 259. 1922.

<sup>6)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 33, S. 326, 328. 1918.

**652. Entfernung von Eiweiß\*).**

1. Nach Schenck<sup>1)</sup>. 50 ccm seröse Flüssigkeit (oder Blut) werden mit 50 ccm nach Schenck. Wasser vermischt und darauf mit 100 ccm 2proz. Salzsäure und 100 ccm 5proz. Sublimatlösung versetzt. Man filtriert am nächsten Tage, leitet Schwefelwasserstoff ein\*\*), filtriert wieder und stellt das Volumen des Filtrates fest. Nach Entfernung des Schwefelwasserstoffs mittels Durchleiten von Luft fügt man Natronlauge bis zur schwach sauren Reaktion hinzu, engt im Vakuum ein, bringt die Flüssigkeit quantitativ in einen 50-ccm-Meßkolben und füllt bis zur Marke mit Wasser auf.

2. Nach Michaelis und Rona.

a) Mit Eisenhydroxyd<sup>2)</sup>. 50 ccm Blutserum werden nach Verdünnen nach Michaelis und Rona: mit Eisenhydroxyd. mit der 10—14fachen Menge destillierten Wassers und genauer Feststellung des Volumens tropfenweise oder in dünnem Strahl und unter lebhaftem Umschütteln mit 40 ccm Liquor ferri oxyd. dialys. (nicht Liquor ferri oxychlorati. Pharm. Germ.) versetzt und filtriert. Das wasserklare, eiweiß- und eisenfreie Filtrat, dessen Volumen wieder genau festgestellt wird, wird schwach mit Essigsäure angesäuert, im Vakuum oder auf dem Wasserbade vorsichtig eingeengt, quantitativ in einen Maßkolben (z. B. für 50 ccm) überführt und bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt.

Für das Blut läßt sich die Methode wie folgt anwenden<sup>3)</sup>: Eine abgemessene oder abgewogene Blutmenge (30—40 ccm oder 30—40 g) wird mit destilliertem Wasser auf 1 l aufgefüllt und in dünnem Strahl unter Umschütteln mit der Eisenlösung versetzt. Auf je 1 g Hundeblut sind etwa 3 ccm, auf 1 g Kaninchenblut 2,5 ccm Eisenlösung zu verwenden. Ein Überschuß innerhalb gewisser Grenzen ist an sich unschädlich. Man kann auch mit Vorteil so verfahren, daß man das Blut nur 10fach mit Wasser verdünnt, mit dem Rest des Wassers die Eisenlösung verdünnt und mit der verdünnten Eisenlösung enteiweißt. Die Blut-Eisenmischung bleibt nun unter zeitweiligem häufigem Schütteln etwa 10 Minuten stehen; während dieser Zeit erfolgt bereits eine reichliche flockige Ausscheidung der Eiweiß-Eisenverbindung. Jetzt setzt man 1—1,5 g feingepulvertes Magnesiumsulfat auf einmal hinzu und schüttelt kräftig 1 bis 2 Minuten lang. Damit ist die Enteiweißung vollendet. Ist sie gut gelungen, so erfolgt die totale Ausscheidung schnell und die darüber stehende klare farblose Flüssigkeit ist zur Filtration fertig. — In den Fällen, in denen die mehr oder weniger ausgesprochene Färbung des Filtrates eine unvollständige Fällung des Hämoglobins anzeigt, kann zu jeder Zeit eine nachträgliche Korrektur stattfinden durch erneute Behandlung mit sehr kleinen Mengen (einige Tropfen bis einige Kubikzentimeter) der Eisenlösung. Ein weiterer Elektrolytzusatz ist unnötig und auch nicht vorteilhaft, da er beim nachfolgenden starken Einengen stören könnte. Als Elektrolyt kann man auch ein anderes Sulfat wählen und man wird natürlich überall, wo das Magnesium bei der nachträglichen Zuckerbestimmung stören könnte, statt des Magnesiumsalzes das Natrium- oder Kaliumsalz oder das Sulfat eines leicht entfernbaren Kations (Zn, Cu) benutzen.

b) Mit Kaolin<sup>4)</sup>. 50 ccm Blutserum werden mit der 15fachen Menge mit Kaolin. Wasser verdünnt und mit Essigsäure schwach angesäuert (bis die anfänglich

\*) Die Verfahren werden mit Rücksicht auf die sich anschließende quantitative Zuckerbestimmung beschrieben. Soll auf Zucker nur qualitativ geprüft werden, so fallen natürlich Feststellungen der Menge, schließliches Auffüllen auf ein bestimmtes Volumen usw. fort. Es empfiehlt sich in diesem Fall ein kleines Volumen.

\*\*) Neuberg entquecksilbert gelegentlich mit verkupferten Zink.

<sup>1)</sup> Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 55, S. 203. 1894.

<sup>2)</sup> Rona u. Michaelis: Biochem. Zeitschr. Bd. 7, S. 332. 1908; Bd. 14, S. 479. 1908.

<sup>3)</sup> Michaelis u. Rona: Biochem. Zeitschr. Bd. 8, S. 356. 1908. — Oppler u. Rona: desgl. Bd. 13, S. 122. 1908 und persönliche Mitteilung von Herrn Rona.

<sup>4)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 7, S. 330. 1908.

entstehende Trübung sich wieder aufzuhellen beginnt). Man stellt das Volumen fest, fügt auf je 100 ccm Flüssigkeit 20—25 g Kaolin in kleinen Portionen und unter beständigem Umschütteln hinzu und saugt alsbald ab. Die Flüssigkeit filtriert leicht und klar (vielleicht anfänglich durchgehende Spuren von Kaolin entfernt man durch Zurückgießen der ersten Portionen oder erst später nach dem Einengen durch Filtration). Man saugt möglichst vollständig ab, stellt das Volumen fest, engt im Vakuum oder auf dem Wasserbad ein, führt quantitativ in einen Maßkolben (z. B. für 50 ccm) über und füllt bis auf ein bestimmtes Volumen mit Wasser auf\*).

nach Abeles. 3. Nach Abeles<sup>1)</sup>. Man läßt zu 50 ccm absolutem Alkohol, in dem sich 2,5 g Zinkacetat (zum Teil gelöst, zum Teil suspendiert) befinden, 50 ccm seröse Flüssigkeit (oder Blut) fließen, mischt schnell, filtriert nach einigen Minuten (bei Blut, wenn der Niederschlag eine gleichmäßig schwarzgraue Farbe angenommen hat) durch ein mit Alkohol angefeuchtetes Faltenfilter, wäscht mit 90—95 proz. Alkohol nach, bringt den Rückstand auf Leinwand und preßt mit der Handpresse scharf aus. Der Rückstand wird mit Alkohol in der Reibschale zerrieben, auf ein Filter gebracht, mit Alkohol nachgewaschen und wieder ausgepreßt\*\*). Die vereinigten Flüssigkeiten werden mit einer 20 proz. Sodalösung so lange unter Umrühren versetzt, bis das Zink als Carbonat ausgefällt ist und die Mischung deutlich alkalische Reaktion gibt. Man filtriert, macht das Filtrat (welches bei 50 ccm Blut 250—300 ccm beträgt) mit Essigsäure schwach sauer und dampft auf etwa 20—30 ccm ein. Hierbei scheidet sich noch etwas Unlösliches ab. Man spült die Lösung in einen Maßkolben für 50 ccm, setzt neuerdings 3—4 Tropfen einer konzentrierten wässerigen Lösung von Zinkacetat oder Zinkchlorid hinzu, macht mit Natriumcarbonat eben alkalisch, füllt bis zur Marke auf und filtriert durch ein trockenes Filter. Wenn sich beim Stehen noch Zinkcarbonat abscheidet, filtriert man noch einmal.

nach Oppler, 4. Mit Phosphorwolframsäure nach Oppler<sup>2)</sup>. Das in Ammoniumoxalat aufgefangene Blut wird mit der 10—20fachen Menge destillierten Wassers verdünnt und unter beständigem, kräftigem Schütteln tropfenweise mit einer frischbereiteten, 10 proz. Lösung von Phosphorwolframsäure (Kahlbaum, chlorfrei) versetzt, bis deren Volumen der angewandten Blutmenge nahezu entspricht. Nun wird kräftig 2 Minuten lang geschüttelt, und falls sich dann noch größere Schaumblasen an der Oberfläche zeigen, mit dem Zusatz der Säure so lange fortgefahren, bis nach kräftigem Schütteln nur ein unterbrochener Kranz von makroskopisch noch erkennbaren Blasen an der Grenze zwischen Glas und Flüssigkeitsoberfläche sich zeigt. Nach einigen Minuten gibt sich die Vollendung der Enteiweißung an der Trennung in einen schokoladebraunen, langsam absetzenden Niederschlag und eine wasserklare Flüssigkeit zu erkennen. Bei Verwendung von 50 ccm Blut genügen meist 54—58 ccm Phosphorwolframsäurelösung; ein mäßiger Überschuß, im ganzen 70—80 ccm, hat sich als unschädlich erwiesen. Unter Lichtabschluß wird filtriert. Die ersten trüben Anteile werden zurückgegossen. Sobald das Filtrat vollständig klar abläuft, wird es mit 20 ccm (bei Verarbeitung von 25—150 ccm Blut) einer 10 proz. neutralen Bleiacetatlösung versetzt, um die Einwirkung der Phosphorwolframsäure auf den Blutzucker abzukürzen. Es wird dafür gesorgt, daß möglichst wenig Lösung im Niederschlag hängen bleibt. Vom phosphorwolframsauren Blei wird sehr sorgfältig abfiltriert, mit Schwefelwasserstoff unter Druck entbleit und filtriert. Die völlige Enteiweißung gibt sich durch die Abnahme der Viscosität zu erkennen. Fast

\*) Vgl. auch Bang: Biochem. Zeitschr. Bd. 7, S. 327. 1908.

\*\*\*) Bang empfiehlt, Fällung und Auswaschen im Zentrifugiergefäß vorzunehmen (Hammarsten-Festschrift Nr. 2. 1906).

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 15, S. 498. 1891. <sup>2)</sup> desgl. Bd. 64, S. 402. 1910.



momentan verschwindet die Schaumbildung und wird die Flüssigkeit beweglich. Die eiweiß- und biuretfreien Lösungen lassen sich im Vakuum bei einer Wasserbadtemperatur von 38—41° bis auf etwa  $\frac{1}{20}$  des ursprünglichen Blutvolumens einengen, ohne trüb zu werden und ohne daß Krystallisation erfolgt. Von den angewandten Reagenzien sind nur kleine Mengen Essigsäure übrig geblieben.

5. Nach Folin und Wu<sup>1)</sup>.

nach Folin  
und Wu.

Erforderliche Lösungen. 1. 10proz. Natriumwolframat,  $\text{Na}_2\text{WO}_4$ ,  $2\text{H}_2\text{O}$ . Das käufliche Salz enthält öfters zu viel Soda, 1 g soll nicht mehr als 0,4 ccm  $n/_{10}$ -Säure gegen Phenolphthalein verbrauchen. Salze, die gegen Phenolphthalein sauer, gegen Lackmus alkalisch reagieren, eine andere Zusammensetzung haben und schwer löslich sind, werden in der Wärme gelöst, nach dem Abkühlen mit so viel Lauge versetzt, daß Phenolphthalein eben gerötet wird und die Farbe wenigstens 3 Minuten lang bestehen bleibt (Folin<sup>2)</sup>). 2.  $\frac{2}{3}$ n-Schwefelsäure. 18,47 ccm konzentrierte Säure ( $d = 1,84$ ) auf 1000 ccm. 3.  $\frac{2}{1}$ n-Schwefelsäure.

Ausführung. Die abgemessene Blutmenge wird in einem Gefäße vom 15—20fachen Rauminhalt mit dem 7fachen Volumen destilliertem Wasser verdünnt — die Pipette wird dabei mit dem Wasser nachgespült —, mit 1 Volumen der Wolframatlösung, dann unter Schütteln mit 1 Volumen  $\frac{2}{3}$ n-Schwefelsäure versetzt. Nach Verschließen des Gefäßes mit einem Gummistopfen wird einige Male heftig geschüttelt, wobei die Fällung rot- bis dunkelbraun werden muß. Ist dies nicht der Fall, so ist zu viel Oxalat (20 mg sind schon reichlich für 10 ccm Blut) oder Citrat (ganz geringe Menge genügt) vorhanden; man setzt dann tropfenweise 2n-Schwefelsäure zu, schüttelt jedesmal kräftig, läßt einige Minuten absitzen und fährt fort, bis die Koagulation vollständig ist. Die Mischung ist annähernd neutral, 10 ccm verbrauchen 0,1—0,2 ccm  $n/_{10}$ -Lauge. Kongo soll nicht gebläut werden. Mehr als 10 Tropfen sollten nicht gebraucht werden. Gelingt die Enteiweißung nicht gleich, so verarbeite man lieber eine neue Blutmenge. Das Gemisch wird dann durch ein Faltenfilter klar filtriert. Dies erfordert Zeit. Verdunstung ist zu verhindern. Bequemer ist es, 2—3 Minuten im kochenden Wasserbad zu halten und dann zu zentrifugieren. Das Erwärmen hat zu unterbleiben, wenn Harnsäure und Kreatinin bestimmt werden sollen. Soll das Filtrat länger als 2—3 Tage aufbewahrt werden, so setzt man ihm für je 10 ccm Blut 1—2 Tropfen Toluol oder Xylol zu. Man braucht für 10 ccm Blut\*) weniger als 1 g Natriumwolframat. Die Fällung ist vollständiger als diejenige durch 10 g Trichloressigsäure; sie schließt weder Harnsäure noch Kreatinin, Harnstoff, Aminosäuren und Zucker ein.

653. Der **Nachweis** des Zuckers in der eiweißfreien Flüssigkeit geschieht mit Hilfe der §§ 97, 98, 101 aufgeführten Reaktionen. Nachweis des  
Zuckers.

Die **Bestimmung** des Zuckers erfolgt mittels Gärung, Polarisation oder Reduktion. Bestimmung des  
Zuckers.

Es empfiehlt sich, wenn irgend möglich, die beiden letztgenannten Methoden anzuwenden und außerdem die polarisierte Flüssigkeit zur Gärung durch Hefe anzusetzen und nachher abermals zu polarisieren. Es wird sich so die Anwesenheit etwa vorhandener linksdrehender Substanzen (z. B. gepaarte Glucuronsäuren,  $\beta$ -Oxybuttersäure, Aminosäuren bei Nierenerkrankungen) feststellen lassen.

1. **Bestimmung durch Gärung.** Sie läßt sich nur mit größeren Mengen (Diabetikerblut etwa 100 ccm) durchführen<sup>3)</sup>. Zum Ungerinnbarmachen dürfen dem Blut natürlich keine gärungshemmenden Substanzen zugesetzt worden sein. Es empfiehlt sich, die Enteiweißung nach 4. vorzunehmen. Es werden durch die Gärung unter Benutzung des Lohnsteinschen Gärungssaccharimeters die genauesten Werte für den Blutzucker erhalten. Bei den Polarisations- und Bestimmung durch  
Gärung.

\*) Diese Menge reicht für eine Bestimmung von Nichteiweißstickstoff, Harnstoff, Kreatin, Kreatinin, Harnsäure und Zucker in der gleichen Lösung.

<sup>1)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 38, S. 81. 1919. <sup>2)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 51, S. 419. 1922.

<sup>3)</sup> Stepp: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 107, S. 36. 1919. — Oppler: desgl. Bd. 64, S. 404. 1910.

Reduktionsmethoden werden noch andere im Blut vorhandene Stoffe mitbestimmt (Feigl<sup>1</sup>).

Polarimetrische  
Bestimmung.

2. Bestimmung durch Polarisation. Für sie ist ein Einengen der Lösung auf  $\frac{1}{6}$ — $\frac{1}{8}$  des ursprünglichen Blutvolumens zweckmäßig, da man mit einem Ablesungsfehler von  $\pm 0,02^\circ$  zu rechnen hat. Da das Filtrat der Eisenfällung (§ 652, 2a) sich bis auf 4—6 ccm konzentrieren läßt, ohne daß Trübung oder Dunkelfärbung eintritt, so ist für die polarimetrische Bestimmung die Entfernung des Eiweißes mit Hilfe von Eisenoxyd empfehlenswert. Im Filtrat hat man nur mit den angewandten Elektrolyten zu rechnen. Ebenfalls sehr geeignet ist Phosphorwolframsäure (§ 652, 4), die man mit Bleiacetat und dieses mit Schwefelwasserstoff wieder entfernt (Oppler, Stepp<sup>2</sup>). Man muß darauf achten, daß die eingeengte Flüssigkeit stets (schwach) saure Reaktion hat. Schon bei ganz geringer alkalischer Reaktion wird ein mehr oder weniger beträchtlicher Teil des Zuckers zerstört. Die Benutzung einer Mikroröhre gestattet das Arbeiten mit stark eingeengten Flüssigkeiten, wodurch die polarimetrische Zuckerbestimmung auch bei sehr geringem Zuckergehalt ermöglicht wird.

Bestimmung  
durch Titration.

3. Bestimmung durch Reduktion. Besonders geeignet ist die Methode von Bertrand<sup>3</sup>) (s. weiter unten), die von Ambard<sup>4</sup>) auch als Mikroverfahren ausgearbeitet worden ist. Auch das Makro- (§ 599, d) und das Mikroverfahren (§ 705, 2) von Bang sind brauchbar. Neuerdings wird das titrimetrische Mikroverfahren nach Hagedorn und Jensen<sup>5</sup>) empfohlen, das die gleichen Werte wie das von Bang gibt, dabei aber einfacher auszuführen ist (§ 705, 3). Die ebenfalls auf der Reduktionskraft beruhenden kolorimetrischen Mikroverfahren geben stets höhere Werte, z. B. das von Folin und Wu (§ 705, 1). Zugesetzter Zucker wird aber mit allen Verfahren quantitativ wiedergefunden; es werden also bei den kolorimetrischen Methoden sicher, bei den titrimetrischen vielleicht außerdem noch andere Blutbestandteile mitbestimmt (Stepp<sup>6</sup>).

Bestimmung nach  
Bertrand.

#### Verfahren von Bertrand<sup>3</sup>).

Prinzip. Das gebildete Kupferoxydul wird in einer Lösung von Ferrisulfat in Schwefelsäure gelöst. Das dabei nach der Gleichung  $\text{Cu}_2\text{O} + \text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 + \text{H}_2\text{SO}_4 = 2 \text{CuSO}_4 + 2 \text{FeSO}_4 + \text{H}_2\text{O}$  entstehende Ferrosulfat wird mit Kaliumpermanganat titriert.

Erforderliche Lösungen. 1. Eine Lösung, welche in 1 l 40 g reines Kupfersulfat enthält. 2. Eine Lösung, welche in 1 l 200 g Seignettesalz und 150 g Ätznatron enthält. 3. Eine Lösung, welche in 1 l 50 g Ferrisulfat (es muß frei von Ferrosulfat sein, darf also Kaliumpermanganatlösung nicht entfärben) und 200 g Schwefelsäure enthält. 4. Eine Lösung, welche in 1 l 5 g Kaliumpermanganat enthält und in folgender Weise auf ihren Wirkungswert geprüft wird: Man setzt zu 250 mg (oder einer naheliegenden, genau abgewogenen Menge) Ammonoxalat  $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4 + \text{H}_2\text{O}$  in einem Becherglas 50 ccm Wasser und 2 ccm konzentrierte Schwefelsäure, erwärmt auf  $60$ — $80^\circ$  und fügt zu der Lösung unter Umrühren von der Permanganatlösung bis zur eben erkennbar bleibenden Rosafärbung hinzu (es werden etwa 22 ccm verbraucht). Durch Multiplikation der für die Titration benutzten Milligramme Ammonoxalat mit 0,8951 erfährt man die Milligramme Kupfer, welche den für die Titration verbrauchten Kubikzentimetern Kaliumpermanganatlösung entsprechen.

Ausführung. In einem Erlenmeyerschen Kölbchen von 125—150 ccm Inhalt werden 20 ccm der Zuckerlösung (welche nicht mehr wie 100 mg, am besten 10—90 mg Zucker enthält) gebracht, dazu je 20 ccm der Lösungen 1 und 2. Man erwärmt bis zum Sieden und hält genau 3 Minuten in nicht zu heftigem Kochen, saugt die überstehende Flüssigkeit durch ein Asbestfilter\*) (es soll möglichst wenig Kupferoxydul auf das Filter kommen), übergießt den im Kolben zurück-

\*) Über die Herstellung der Asbestfilter s. bei der Glykogenbestimmung S. 751.

<sup>1</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 77, S. 189. 1916.

<sup>2</sup>) Oppler: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 64, S. 393. 1910; Bd. 75, S. 71. 1911. — Stepp: desgl. Bd. 107, S. 29. 1919.

<sup>3</sup>) Bull. de la soc. chim. de Paris (3) Bd. 35, S. 1285. 1906.

<sup>4</sup>) Bull. de la soc. de chim.-biol. 1920, Nr. 3.    <sup>5</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 135, S. 46. 1923.

<sup>6</sup>) Ergebn. d. Physiol. Bd. 20, S. 126. 1922.

gebliebenen Niederschlag mit etwas lauwarmem Wasser und filtriert nach dem Absetzen durch das Filter, worauf dabei zu achten ist, daß das Kupferoxydul stets vom Waschwasser bedeckt ist und mit der Luft möglichst wenig in Berührung kommt. Nachdem so bis zum Verschwinden der alkalischen Reaktion ausgewaschen ist, gießt man eine genügende Menge der Lösung 3 (5—20 ccm) in den Kolben und filtriert sie, nachdem sie den Niederschlag gelöst hat, durch das Filter, damit sich die geringen, auf diesem befindliche Mengen von Kupferoxydul ebenfalls lösen. Man wäscht bis zum Verschwinden der sauren Reaktion aus und titriert schnell mit Kaliumpermanganatlösung, bis die grüne Farbe in Rosa übergeht.

Berechnung. Man rechnet zunächst unter Benutzung des oben erhaltenen Wertes die Anzahl Kupfermilligramme aus, welche den verbrauchten Kubikzentimetern Permanganatlösung entsprechen, und erfährt weiter aus der Tabelle die entsprechende Menge Traubenzucker:

10 mg Glucose entsprechen	20,4 mg Cu	56 mg Glucose entsprechen	105,8 mg Cu
11 „ „ „	22,4 „ „	57 „ „ „	107,6 „ „
12 „ „ „	24,3 „ „	58 „ „ „	109,3 „ „
13 „ „ „	26,3 „ „	59 „ „ „	111,1 „ „
14 „ „ „	28,3 „ „	60 „ „ „	112,8 „ „
15 „ „ „	30,2 „ „	61 „ „ „	114,5 „ „
16 „ „ „	32,2 „ „	62 „ „ „	116,2 „ „
17 „ „ „	34,2 „ „	63 „ „ „	117,9 „ „
18 „ „ „	36,2 „ „	64 „ „ „	119,6 „ „
19 „ „ „	38,1 „ „	65 „ „ „	121,3 „ „
20 „ „ „	40,1 „ „	66 „ „ „	123,0 „ „
21 „ „ „	42,0 „ „	67 „ „ „	124,7 „ „
22 „ „ „	43,9 „ „	68 „ „ „	126,4 „ „
23 „ „ „	45,8 „ „	69 „ „ „	128,1 „ „
24 „ „ „	47,7 „ „	70 „ „ „	129,8 „ „
25 „ „ „	49,6 „ „	71 „ „ „	131,4 „ „
26 „ „ „	51,5 „ „	72 „ „ „	133,1 „ „
27 „ „ „	53,4 „ „	73 „ „ „	134,7 „ „
28 „ „ „	55,3 „ „	74 „ „ „	136,3 „ „
29 „ „ „	57,2 „ „	75 „ „ „	137,9 „ „
30 „ „ „	59,1 „ „	76 „ „ „	139,6 „ „
31 „ „ „	60,9 „ „	77 „ „ „	141,2 „ „
32 „ „ „	62,8 „ „	78 „ „ „	142,8 „ „
33 „ „ „	64,6 „ „	79 „ „ „	144,5 „ „
34 „ „ „	66,5 „ „	80 „ „ „	146,1 „ „
35 „ „ „	68,3 „ „	81 „ „ „	147,7 „ „
36 „ „ „	70,1 „ „	82 „ „ „	149,3 „ „
37 „ „ „	72,0 „ „	83 „ „ „	150,9 „ „
38 „ „ „	73,8 „ „	84 „ „ „	152,5 „ „
39 „ „ „	75,7 „ „	85 „ „ „	154,0 „ „
40 „ „ „	77,5 „ „	86 „ „ „	155,6 „ „
41 „ „ „	79,3 „ „	87 „ „ „	157,2 „ „
42 „ „ „	81,1 „ „	88 „ „ „	158,8 „ „
43 „ „ „	82,9 „ „	89 „ „ „	160,4 „ „
44 „ „ „	84,7 „ „	90 „ „ „	162,0 „ „
45 „ „ „	86,4 „ „	91 „ „ „	163,6 „ „
46 „ „ „	88,2 „ „	92 „ „ „	165,2 „ „
47 „ „ „	90,0 „ „	93 „ „ „	166,7 „ „
48 „ „ „	91,8 „ „	94 „ „ „	168,3 „ „
49 „ „ „	93,6 „ „	95 „ „ „	169,9 „ „
50 „ „ „	95,4 „ „	96 „ „ „	171,5 „ „
51 „ „ „	97,1 „ „	97 „ „ „	173,1 „ „
52 „ „ „	98,9 „ „	98 „ „ „	174,6 „ „
53 „ „ „	100,6 „ „	99 „ „ „	176,2 „ „
54 „ „ „	102,3 „ „	100 „ „ „	177,8 „ „
55 „ „ „	104,1 „ „		

Über Bestimmung in kleinen Mengen Blut s. § 705.

**Mikrobestimmung von Alkohol im Blut nach Widmark<sup>1)</sup>.**

654. In geschlossenem Gefäß, dessen Boden mit Bichromatschwefelsäure bedeckt ist, wird ein Schälchen aufgehängt, in dem sich wenige Tropfen Blut befinden. Bei Unterdruck und 60° destilliert der Alkohol ab und verbraucht Bichromat, dessen Überschuß jodometrisch zurücktitriert wird.

Über Nachweis s. S. 52, über Makroverfahren § 747.

**Bestimmung von Äthyläther im Blut<sup>2)</sup>.**

Durchsaugen von Luft durch das Blut, die den Ätherdampf mitnimmt; Jodpentoxyd oxydiert ihn vollständig unter Freiwerden von Jod,  $5(C_2H_5)_2O + 12J_2O_5 = 20CO_2 + 25H_2O + 24J$ , das titrimetrisch bestimmt wird.

**Nachweis von Acetaldehyd im Blut<sup>3)</sup>.**

655. Das Blut wird verdünnt, mit Phosphorwolframsäure (§ 652, 4) enteiweißt, das Filtrat in der § 62 angegebenen Weise destilliert, bis schließlich der gesamte Aldehyd in einer verhältnismäßig kleinen Menge enthalten ist. Abscheidung als Aldomedon nach § 62.

**Bestimmung des Glycerins in serösen Flüssigkeiten und Blut nach Tangl und Weiser<sup>4)</sup>.**

656. Sie beruht auf der Überführung des Glycerins durch kochende Jodwasserstoffsäure in Isopropyljodid, dessen Dampf, von begleitendem Jod und Jodwasserstoff durch Passieren einer Aufschwemmung von rotem Phosphor in 10proz. Natriumarsenitlösung befreit, in eine alkoholische Silbernitratlösung eingeleitet wird. Das dabei entstehende Jodsilber wird gewogen und aus seiner Menge die Menge des Glycerins berechnet (Jodidverfahren von Zeisel und Fanto). In betreff der Vorbereitung des Blutes, das zunächst von Eiweiß, Fett, Phosphatiden, Cholesterin, Sulfaten und Chloriden befreit und stark eingengt werden muß, sowie in betreff der Ausführung des Jodidverfahrens s. die Originalarbeit.

**Nachweis und Bestimmung von Ameisensäure im Blut.**

Der Nachweis der nach § 80 durch Destillation isolierten Säure wird nach § 65 geführt. Zur Bestimmung<sup>5)</sup> wird das nach § 652, 4 erhaltene Blutfiltrat bei sodaalkalischer Reaktion eingengt, mit Phosphorsäure versetzt und mit Äther erschöpft<sup>6)</sup>. Dem Äther im Kochkolben setzt man Sodalösung zur Bindung der extrahierten Säure zu. Die Sodalösung wird erneut angesäuert und destilliert<sup>7)</sup>, wobei sich überschüssige Sodalösung in der Vorlage befindet. Das ameisen-saure Salz wird dann mit Quecksilberchlorid und Natriumacetat<sup>8)</sup> in der Wärme behandelt, das gebildete Kalomel gewogen oder jodometrisch titriert<sup>8)</sup>. Einzelheiten s. im Original und § 589 unter Bestimmung im Harn.

**Bestimmung der Milchsäure in serösen Flüssigkeiten und Blut<sup>9)</sup>.**

657. Die Bestimmung geschieht nach § 748. Man benutzt für eine Bestimmung 200 ccm Blut oder Serum, enteiweißt nach Schenk (§ 652, 1) und verfährt weiter, wie § 748 angegeben. Steht erheblich weniger Blut zur Verfügung, so kommt die Mikromethode § 708 in Betracht.

\*) 200 g HgCl<sub>2</sub>, 300 g Natriumacetat, 80 g NaCl, Wasser ad 1000 ccm.

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 131, S. 473. 1922. — Miles: Americ. Journ. of physiol. Bd. 59. S. 477. 1922. — Olow: Biochem. Zeitschr. Bd. 134, S. 407. 1923.

<sup>2)</sup> Haggard: Journ. of biol. chem. Bd. 55, S. 131. 1923.

<sup>3)</sup> Stepp: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 107, S. 29. 1919.

<sup>4)</sup> Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 115, S. 152. 1906.

<sup>5)</sup> Stepp: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 109, S. 99. 1920. — Stepp u. Zumbusch: Dtsch. Arch. f. klin. Med. Bd. 134, S. 114. 1920.

<sup>6)</sup> Dakin, Janney u. Wakeman: Journ. of biol. chem. Bd. 14, S. 341. 1913.

<sup>7)</sup> Fincke: Biochem. Zeitschr. Bd. 51, S. 268. 1913.

<sup>8)</sup> Rießer: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 96, S. 355. 1916; Biochem. Zeitschr. Bd. 142, S. 280. 1923.

<sup>9)</sup> H. Fries (Embsen): Biochem. Zeitschr. Bd. 35, S. 368. 1911.

*Bestimmung von d-Milchsäure im Eiter nach Ito<sup>1)</sup>.*

658. Das Pleuraexsudat wird mit dem 5fachen Volumen Wasser verdünnt, bei essigsaurer Reaktion aufgeköcht und abgenutscht. Der Rückstand wird in 5proz. Natronlauge zerteilt und durch Kochen in Lösung gebracht<sup>2)</sup>. Dann wird mit Schwefelsäure neutralisiert und filtriert und mit dem vorigen Filtrat vereinigt. Beide Lösungen werden zum dünnen Sirup eingeengt und mit 95proz. Alkohol erschöpft. Der Rückstand vom Alkoholauszug wird in Wasser gelöst, Phosphorsäure zugesetzt und die Milchsäure mit Äther extrahiert, das Lithiumsalz zur Krystallisation gebracht und polarimetrisch sowie gravimetrisch nach Überführung in das Zinksalz bestimmt<sup>3)</sup>. Siehe auch § 748.

*Bestimmung von Aceton, Acetessigsäure,  $\beta$ -Oxybuttersäure im Blut.*

Siehe § 745 (Makroverfahren) und § 706 (Mikroverfahren).

*Bestimmung einiger Eiweißfäulnisprodukte im Blut.*

659. Es kommen in Betracht für:

Histamin: Colorimetrische Bestimmung auf Grund der Diazoreaktion von Koessler und Hanke<sup>4)</sup> im Anschluß an deren Histidinbestimmung s. § 498.

Phenole: Das gleiche Verfahren<sup>5)</sup>. Ferner eines, das auf der Bläuung des Folin-Denisschen Harnsäurereagens beruht und im Anschluß an die Harnsäurebestimmung von Folin-Wu (§ 583, 5) ausgeführt wird<sup>6)</sup>.

Indican<sup>7)</sup>: Die Bestimmung beruht auf der Reaktion von Jolles S. 721. Das Serum wird mit dem gleichen Volumen 20proz. Trichloressigsäure enteiweißt, filtriert; man verdünnt 2,5 ccm des Filtrats mit Wasser auf 10 ccm, setzt 1 ccm 5proz. Thymolspiritus und 10 ccm Obermeyers Reagens hinzu, schüttelt nach 20 Minuten mit Chloroform aus und liest nach  $\frac{1}{2}$  Stunde ab. Die Trichloressigsäure erhöht die Färbung auf das 1,6fache. Rosafärbung tritt eben auf, wenn die verwendeten 1,25 ccm Serum 0,0032 mg, 1 l also  $2,56 : 1,6 = 1,6$  mg Indican enthalten. Als Standardlösung verwendet man eine haltbare Auflösung von 0,01 g synthetischem 4-Cymol-2-indolindolignon in 100 ccm Chloroform, die entsprechend verdünnt wird.

*Nachweis und Bestimmung der ätherlöslichen Substanzen (Fett, Phosphatide, Cholesterin) in serösen Flüssigkeiten.*

660. Man mischt 20—50 g mit dem 3—4fachen Volumen absoluten Nachweis. Alkohols, läßt bis zum nächsten Tage unter wiederholtem Umrühren bedeckt stehen, filtriert den Niederschlag ab, wäscht mit absolutem Alkohol nach und bringt ihn in das Extraktionsgefäß eines Soxhletschen Apparates. Das alkoholische Filtrat wird bei einer Temperatur unter 60° und bei neutraler Reaktion eingedampft, der Rückstand mit einer Mischung von Alkohol und Äther aufgenommen, das Filtrat wieder verdunstet und der Rückstand mit Äther aufgenommen. Diese ätherische Lösung bringt man in den Kolben des Soxhlet-

<sup>1)</sup> Ito: Journ. of biol. chem. Bd. 26, S. 173. 1916.

<sup>2)</sup> Mondschein: Biochem. Zeitschr. Bd. 42, S. 118. 1912.

<sup>3)</sup> Joshikawa: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 87, S. 404. 1913.

<sup>4)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 50, S. 235. 1922.

<sup>5)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 50, S. 246. 1922.

<sup>6)</sup> Rakestraw: Journ. of biol. chem. Bd. 56, S. 109. 1923. — Pelkan: desgl. Bd. 50, S. 491. 1922.

<sup>7)</sup> Snapper, van Bommel u. van Vloten: Klin. Wochenschr. Jg. 1, S. 718. 1922; s. ferner Haas: Münch. med. Wochenschr. Bd. 64, S. 1363. 1917; Dtsch. Arch. f. klin. Med. Bd. 121, S. 304. 1917. — Jolles: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 94, S. 90. 1915.

schen Apparates, extrahiert nun stundenlang, verdunstet dann den Äther, nimmt den Rückstand mit wasserfreiem Äther auf, verdunstet die klare, evtl. filtrierte Lösung in einem Becherglase und trocknet im Vakuum über Schwefelsäure. Im Rückstand lassen sich Fett, Phosphatide, Cholesterin nach § 91 einzeln nachweisen. Siehe auch § 663 B 3 b.

Für den Nachweis der Cholesterinester, welche sich ebenfalls im Ätherrückstand finden, sind größere Mengen Blutserum erforderlich; derselbe geschieht nach S. 330. Zur Trennung von Cholesterin und seinen Estern benutzt man die Windaussche Digitoninmethode (S. 328), wobei die Cholesterinester nicht gefällt werden.

Für den Nachweis von feinverteiltem Fett, welches eine Trübung seröser Flüssigkeiten bewirkt, dient außer der mikroskopischen Prüfung die Behandlung mit Äther, indem beim Schütteln mit Äther (evtl. nach Zusatz von Kalilauge) eine Klärung eintritt. Im Ätherrückstand läßt sich das Fett nachweisen (§ 91).

Bestimmung des  
Cholesterins.

Bestimmung des Cholesterins. Zur vollständigen Isolierung des Cholesterins genügt nicht eine auch noch so energisch fortgesetzte Alkohol- und Ätherextraktion des trockenen Pulvers oder ein Fällen und Auskochen der Körperflüssigkeit mit Alkohol<sup>1)</sup>. Eine Lufttrocknung ist zu vermeiden. Es ist notwendig, die Proteine zuvor durch 2proz. wässrige Natronlauge in Lösung zu bringen. Cholesterinester werden dadurch nicht gespalten (Fex). Über die Einzelheiten der Bestimmung von Cholesterin und Cholesterinestern s. § 754.

Mikrobestimmung.

Über die Bestimmung in kleinen Mengen Blut s. § 707.

Für gravimetrische Mikrobestimmungen (maximal 4,5 mg Cholesterin) empfiehlt v. Szent-Györgyi<sup>2)</sup>, das Cholesterin in 2 ccm Aceton zu lösen, mit 1 ccm Digitoninlösung (1 g in 50 ccm 80proz. Alkohol) zu fällen und bei gelinder Wärme das Gemisch bis etwa auf die Hälfte einzuengen. Dann ist die Fällung schon in einer Viertelstunde beendet. Nun wird durch ein Preglsches Asbeströhrchen mit Kappe filtriert, wobei Wasser zur Überführung des Niederschlags benutzt wird. Dann wird 2 mal mit Aceton, 2 mal mit Äther, 3 mal mit warmem Chloroform, 1 mal mit Äther, 1 mal mit Aceton, 5 mal mit heißem Wasser gewaschen, wobei je 1—2 ccm Flüssigkeit zu verwenden sind. Daß das Digitonin vollständig entfernt ist, erkennt man daran, daß das Waschwasser nicht mehr schäumt. Nun wird getrocknet und gewogen. Der Niederschlag ist 1—3% zu leicht, statt des theoretischen Faktors benutzt man daher 0,25.

Bestimmung der  
Phosphatide.

Bestimmung der Phosphatide. Man verfährt in der oben für den qualitativen Nachweis angegebenen Weise und bestimmt in dem Ätherauszug die Phosphorsäure nach §§ 553 oder 554.

#### *Nachweis und Bestimmung von Farbstoffen in serösen Flüssigkeiten.*

661. Die gelbe Farbe des Blutserums und der meisten serösen Flüssigkeiten scheint stets durch einen in Fetten besonders leicht löslichen, durch Alkalien nicht zersetzbaren Stoff hervorgerufen zu werden, der wohl in die Gruppe der Carotinoide (Lipochrome, § 311) gehört. Carotin und Xanthophyll (§ 313) sind in wechselnden Mengen vorhanden, abhängig von der Nahrung<sup>3)</sup>.

<sup>1)</sup> Berczeller: Biochem. Zeitschr. Bd. 44, S. 193. 1912. — Thaysen: desgl. Bd. 62, S. 89. 1914. — Fex: desgl. Bd. 104, S. 82, 131. 1920.

<sup>2)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 136, S. 109. 1923.

<sup>3)</sup> Hymans van den Bergh, Muller u. Broekmeyer: Biochem. Zeitschr. Bd. 108, S. 282. 1920.

Außerdem findet sich Bilirubin (§ 295) normalerweise im Serum des Menschen, reichlich in dem des Neugeborenen und des Pferdes (Hammarsten), spärlich in dem des Rindes; im Hundeserum tritt es erst im Hunger auf<sup>1)</sup>. Die Ursache der Grünfärbung, welche Blutserum und seröse Transsudate beim Stehen an der Luft annehmen, ist noch nicht mit Sicherheit als Biliverdin erkannt.

Unter pathologischen Verhältnissen treten Gallenfarbstoffe in stark vermehrter Menge, Hämoglobin, Methämoglobin, Hämatin und Urobilinogen auf.

#### Gallenfarbstoffe. Nachweis:

a) Direkt mit der Gmelinschen Probe (S. 421). Hedenius<sup>2)</sup> empfiehlt 5 ccm mit der 2—3fachen Menge Alkohol und tropfenweise mit so viel (10- bis 25 proz.) Salzsäure zu versetzen, daß der durch den Alkohol entstandene Niederschlag sich eben wieder löst, darauf ein- oder zweimal zum Sieden zu erhitzen. Es tritt sogleich oder nach einiger Zeit eine blaugrüne Farbe auf. Bei eiweißreichen Flüssigkeiten fügt man zu je 3—4 ccm 15—20 ccm Alkohol, schüttelt stark, filtriert, säuert das Filtrat vorsichtig mit Salzsäure an (bei mäßig starker Färbung des Filtrats auf je 10 ccm Filtrat 5 Tropfen 25 proz. Salzsäure) und erhitzt zum Kochen.

Nachweis von  
Gallenfarbstoffen.

Bei Prüfung des Blutes auf Gallenfarbstoffe verfährt man in der zuletzt angegebenen Weise, fügt aber zu je 10 ccm Filtrat 5 Tropfen einer nur 10 proz. Salzsäure hinzu.

b) Mittels der Diazoreaktion von Ehrlich (S. 420). Die von Hymans van den Bergh auf das Serum übertragene Reaktion fällt manchmal erst nach mehrere Minuten langem Stehen positiv aus, sofort aber auch in diesen Fällen, wenn das Serum vorher mit dem gleichen (Serum des Menschen) oder doppeltem (Tiereserum) Volumen Alkohol gefällt wird (indirekte Reaktion). Heute dient die Probe in der Regel zur

colorimetrischen Bestimmung, für die Thannhauser<sup>3)</sup> folgende Anweisung gibt:

Bestimmung des  
Bilirubins.

Prinzip. Bilirubin kuppelt mit diazotierter Sulfanilsäure zu einem in saurer Lösung roten Farbstoff.

Erforderliche Lösungen. 1. Eine Lösung, welche in 1000 ccm 5,0 g Sulfanilsäure, 50 g Salzsäure (spez. Gew. 1,19) enthält. 2. 0,5 proz. Natriumnitritlösung. Zur Herstellung der Diazoniumlösung mischt man 25 ccm von 1. mit 0,5 ccm von 2. 3. Vergleichslösung: Von einer Bilirubinlösung in Chloroform (5 mg in 100 ccm) werden 2 ccm auf dem Wasserbad zur Trockne gebracht, der Rückstand in 11 ccm 96 proz. Alkohols gelöst und mit 5 ccm Diazoniumreagens versetzt. Erst nach völliger Kupplung werden 4 ccm konzentrierter Salzsäure hinzugesetzt. 4. Gesättigte Ammonsulfatlösung.

Ausführung. Im Serum bei Stauungsikterus: 2 ccm klares Serum im Zentrifugenglas mit 1 ccm Diazoniumlösung versetzen. Nach völliger Kupplung Zufügen von 5,8 ccm Alkohol (96 proz.) und 2 ccm Ammonsulfatlösung. Umschütteln. Zentrifugieren. Zu 0,9 ccm der überstehenden, klaren, rötlich gefärbten Flüssigkeit setzt man 0,1 ccm konzentrierter Salzsäure (spez. Gew. 1,19). Verdünnen mit salzsäurehaltigem Alkohol (0,1 ccm HCl auf 0,9 bzw. 1,9 ccm) bis ein Vergleich im Autenrieth-Colorimeter möglich ist. (Ablesungskurve enthält in der Abszisse die Werte für 0,1—1,0 mg Bilirubin.)

Im Normalserum, im Liquor und in Punktionsflüssigkeiten (indirekte Reaktion (s. oben): 2 ccm klares Serum mit 4 ccm Alkohol (96 proz.) vermischen. Zentrifugieren. Zu 1 ccm der Lösung 0,25 ccm Diazoniumlösung hinzufügen; nach völliger Kupplung 0,2 ccm Salzsäure und 0,55 ccm Alkohol zusetzen und im Colorimeter mit der Vergleichslösung vergleichen. Ist die Färbung zu stark, so wird, wie oben, mit salzsäurehaltigem Alkohol verdünnt.

<sup>1)</sup> Hymans van den Bergh u. Snapper: Dtsch. Arch. f. klin. Med. Bd. 110, S. 547. 1913.

<sup>2)</sup> Malys Jahresber. d. Tierchem. 1894, S. 385. <sup>3)</sup> Dtsch. Arch. f. klin. Med. Bd. 137, S. 184. 1921.

Nach Herzfeld<sup>1)</sup> stört Indol; er oxydiert zu Bilirubin und colorimetriert dieses (s. oben).

Urobilinogen wird nach § 297 nachgewiesen.

### Carotinoide.

Nachweis der Carotinoide.

Der Nachweis wird auf Grund der Willstätterschen Phasenreaktion geführt.

Carotin. Ein Volumen Serum wird mit dem gleichen Volumen Alkohol (96proz.) und dem 1½fachen Volumen Äther versetzt, dann ohne zu schütteln mit soviel Wasser, wie zur Entmischung nötig ist. Gewöhnlich reichen 1½ Volumina. Serum muß zuerst mit Alkohol behandelt werden (Hymans van den Bergh<sup>2)</sup>). Oder es wird das Blutserum mit dem 4fachen Gewicht Gips angerührt, mit dem gleichen Gewicht Alkohol zu einer Paste angerührt und mit Petroläther geschüttelt. Carotin wandert in die Petrolätherschicht. Zur Bindung von Gallenfarbstoff wäscht man mit ganz verdünnter Lauge oder setzt der Paste etwas Kalkmilch zu (Palmer<sup>3)</sup>). Die verschiedene Löslichkeit der Gallenfarbstoffe und Lipochrome in wässrigem Alkohol trennt jedoch beide bereits weitgehend. Carotin haftet ferner den kleinen Mengen Albumin an, die nach Entfernung der Globuline und des größten Teils der Albumine durch Halbsättigung mit Ammonsulfat und Erwärmen auf 79° aus dem Filtrat durch weiteres Erwärmen auf 86° oder völlige Sättigung mit Ammonsulfat noch ausfallen. Behandlung mit Alkohol und Extraktion mit Äther wie vorher. Rinderserum ist reich an Carotin.

Für Xanthophyll gilt das gleiche Extraktionsverfahren, wenn es allein vorhanden, Carotin fast oder ganz fehlt, wie oft in tierischem Material (Hühnerblut, Eidotter). Sind beide Lipochrome vorhanden, muß zuerst nach Willstätter (S. 439) getrennt werden. Enthält das Organ viel Fett, so wird mit Kaliumalkoholat\*) verseift (1—2 ccm einer 10—20proz. Lösung auf je 1 g Organ) und die Lipochrome aus der Seifenlösung wieder mit Äther extrahiert. Ihre Lösung wird von Alkali freigewaschen, getrocknet, auf ein möglichst kleines Volumen konzentriert, der Rückstand zwischen 85, 90, 92 und nochmals 92proz. Methylalkohol und Petroläther verteilt. Die petrolätherische Carotinlösung kann unmittelbar colorimetriert werden. Aus der unteren Xanthophylllösung wird der Farbstoff erst nach Willstätter wieder in Äther übergeführt.

Bestimmung der Carotinoide.

Bei der colorimetrischen Bestimmung dient an Stelle der nicht haltbaren Standardlösungen der Farbstoffe selbst eine 0,2proz. wässrige Lösung von Kaliumbichromat<sup>4)</sup>, wobei 100 mm Carotinlösung 101 mm der Bichromatlösung und 100 mm der Xanthophylllösung 72 mm der Bichromatlösung entsprechen.

**Andere Farbstoffe.** Hämoglobin wird nach § 426, Methämoglobin nach § 429, Hämatin nach § 286, Hämatoporphyrin nach § 288 nachgewiesen.

Bestimmung des Methämoglobins.

Ein colorimetrisches Verfahren zur Bestimmung von Methämoglobin als Cyanhämoglobin s. Stadie<sup>5)</sup>. Kombiniert mit einer Hämoglobinbestimmung (aus der Sauerstoffkapazität des Blutes § 679), dient es zur Bestimmung des Methämoglobins im nativen Blut.

\*) Aus reinstem Alkohol! Die sonst entstehenden Harze stören die colorimetrische Bestimmung.

<sup>1)</sup> Dtsch. Arch. f. klin. Med. Bd. 139, S. 306. 1922.

<sup>2)</sup> Hymans van den Bergh, Muller u. Broekmeyer: Biochem. Zeitschr. Bd. 108, S. 282. 1920.

<sup>3)</sup> Palmer u. Kennedy: Journ. of biol. chem. Bd. 46, S. 568. 1921.

<sup>4)</sup> Willstätter u. Stoll: Untersuchungen über Chlorophyll. S. 237, 243. Berlin: Julius Springer 1913 u. Willstätter in Abderhaldens Handb. d. biol. Arbeitsmethoden Abt. I, Teil 11, S. 13 (Lief. 117). 1924. — Palmer: Carotinoids and related Pigments. Chemical Catalog Company New York 1922, bes. Kap. 8—10.

<sup>5)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 41, S. 237. 1920.



*Nachweis von verschiedenen Stoffen in Blut und serösen Flüssigkeiten.*

662. Fettsäuren werden nach § 80, Bernsteinsäure nach § 89, Kreatin nach § 129, Inosit nach § 203 isoliert und nachgewiesen.

Zur Bestimmung von Benzoesäure und Hippursäure in Blut und Geweben entweißt Kingsbury<sup>1)</sup> mit Tannin und bestimmt die Säuren im Anschluß an das Verfahren von Folin (§ 592, 4).

Zum Nachweis von Gallensäuren verfährt man nach S. 246.

Über die Darstellung mehrerer hoch molekularer, noch näher zu untersuchender Säuren, welche Letsche<sup>2)</sup> zum Teil aus dem Gemenge der ätherlöslichen Substanzen (nach vorausgegangener Verseifung), zum Teil aus dem Gemenge der alkohollöslichen Substanzen des Blutserums gewonnen hat, s. die Originalarbeit.

*Quantitative Analyse seröser Flüssigkeiten.*

663. Die Bestimmung von Proteinstoffen, Extraktivstoffen, Fett, Phosphatiden, Cholesterin und Salzen geschieht am besten in folgender Weise:

Man mißt oder wägt eine Menge von 20—50 ccm der von körperlichen Elementen befreiten (S. 769) Flüssigkeit genau ab, mischt sie in einem Becherglase mit dem 3—4fachen Volumen Alkohol\*), läßt einige Stunden stehen, bringt den entstandenen Niederschlag auf ein gewogenes aschefreies Filter und wäscht mit Alkohol aus (1. Filtrat). Darauf wäscht man mit heißem Alkohol, Äther und wieder mit Alkohol (2. Filtrat) und zuletzt mit kochendem Wasser (3. Filtrat) sorgfältig aus. Die einzelnen Filtrate werden gesondert aufgefangen. Man erhält auf diese Weise einen Filterrückstand (A.) und drei Filtrate (B.) (ein wässrig-alkoholisches, ein alkoholisch-ätherisches und ein wässriges).

A. Filterrückstand. Er enthält die Proteinstoffe (bis auf einen sehr kleinen Teil, welcher in den wässrig-alkoholischen Auszug übergegangen ist und später abgeschieden wird) und die in Wasser unlöslichen Salze. Etwa vorhandene Farbstoffe gehen nur in sehr geringer Menge in den Niederschlag über mit Ausnahme des Blutfarbstoffs, welcher als Proteinstoff völlig gefällt wird.

Bestimmung der  
Proteinstoffe und  
unlöslichen Salze.

Der Filterrückstand wird zur Entfernung des Wassers noch einmal mit Alkohol gewaschen, im Luftbade (zuletzt bei 120°) bis zum konstanten Gewicht getrocknet und dann nach Vereinigung mit dem unten erwähnten Filterrückstand (B. 1.) in einer gewogenen kleinen Schale verascht; die Asche wird darauf gewogen.

B. Filtrate. Man verdunstet den wässrig-alkoholischen Auszug (1. Filtrat) auf dem Wasserbade bei niedriger Temperatur (nicht über 60°), übergießt den Rückstand mit dem alkoholisch-ätherischen Auszug (2. Filtrat), zerreibt ihn, filtriert die Lösung nach dem Absitzen durch ein kleines, gewogenes, aschefreies Filter und wäscht wiederholt durch Dekantieren mit absolutem Alkohol und dann mit Äther nach. Den in Alkohol und Äther unlöslichen, in der Schale verbliebenen Rückstand übergießt man nun mit dem wässrigen Auszug (3. Filtrat), zerreibt ihn, filtriert durch dasselbe Filter (aber in ein anderes Becherglas),

\*) Enthält eine seröse Flüssigkeit viel Alkali, so daß gar keine oder eine sehr unvollkommene Gerinnung beim Kochen eintritt, so ist es zweckmäßig, vor dem Zusatz des Alkohols mit Essigsäure zu neutralisieren, obwohl dadurch das Gewicht der in Alkohol löslichen Extraktivstoffe um die Differenz der Äquivalentgewichte der Essigsäure und der Kohlensäure zu hoch gefunden werden muß.

Nach Bunge soll man stets mit Essigsäure ansäuern und außerdem nach Zufügen des Alkohols einige Tage bei 60—70° stehen lassen, weil andernfalls der Niederschlag sich nicht filtrieren und auswaschen läßt. Zeitschr. f. Biol. Bd. 12, S. 213. 1876.

<sup>1)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 21, S. 289. 1915.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 53, S. 31. 1907

sammelt alles Ungelöste mit Hilfe von Wasser auf dem Filter und wäscht mit Wasser aus. Man erhält so einen Filtrerrückstand (1), einen wässrigen (2) und einen alkoholisch-ätherischen (3) Auszug.

Bestimmung  
des Restes der  
Proteinstoffe.

1. Der Filtrerrückstand, welcher aus dem Rest der Proteinstoffe besteht, gehört zu dem unter A. besprochenen. Er wird wie dieser getrocknet und gewogen und dann mit ihm gemeinsam verascht (s. oben unter A.).

Bestimmung der in  
Alkohol unlöslichen  
Extraktivstoffe u.  
der in Wasser löslichen  
Salze (1).

2. Der wässrige Auszug, welcher sämtliche in Wasser lösliche, in Alkohol und Äther unlösliche Bestandteile enthält, wird in kleiner, gewogener Porzellanschale auf dem Wasserbade verdunstet, der Rückstand bei 110 bis 115° getrocknet, gewogen, bei sehr mäßiger Glühhitze verascht und wieder gewogen.

Bestimmung der in  
Alkohol löslichen  
Extraktivstoffe, der  
in Äther löslichen  
Stoffe und der in  
Wasser löslichen  
Salze (2).

3. Der alkoholisch-ätherische Auszug, welcher neben Harnstoff, Zucker, Seifen, Chlornatrium auch Fette, Phosphatide, Cholesterin, Cholesterinester enthalten kann, wird bei mäßiger Temperatur (nicht über 60°) auf dem Wasserbade, zuletzt im Vakuum über Schwefelsäure verdunstet. Man behandelt den Rückstand mit Äther, filtriert durch ein kleines Filter in einen Kolben und wäscht wiederholt mit Äther nach.

a) Der Rückstand\*) wird mit Wasser aus dem Becherglase und vom Filter in eine kleine, gewogene Porzellanschale gespült, auf dem Wasserbade zur Trockne verdunstet, bei 100—110° getrocknet, gewogen, bei mäßiger Glühhitze verascht und wieder gewogen.

b) Das ätherische Filtrat wird bis auf ein kleines Volumen abdestilliert, dann in ein gewogenes Becherglas gegossen, mit Alkohol und Äther nachgespült, bei mäßiger Wärme auf dem Wasserbade verdunstet und der Rückstand im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet und gewogen. Man löst in Alkohol, fügt alkoholische Kalilauge hinzu, erhält die Mischung 1 Stunde lang auf dem Wasserbade in schwachem Sieden, verdunstet, löst den Rückstand, welcher aus Seifen, Glycerin, Cholesterin, Cholin, glycerinphosphorsaurem Kali und Ätzkali besteht, mit nicht zu wenig Wasser und schüttelt die alkalische Lösung mehrmals mit der ungefähr gleichen Menge Äther aus.

α) Der ätherische Auszug wird verdunstet, der Rückstand (zur Entfernung von Seifen) mit Petroläther aufgenommen und die filtrierte petrolätherische Lösung in einem kleinen, gewogenen Becherglase auf dem Wasserbade zur Trockne verdunstet: es bleibt Cholesterin zurück. Enthält es noch Seife, so geschieht deren Abtrennung am besten durch Behandlung der völlig getrockneten Masse mit mehreren, sehr kleinen Portionen kaltem Alkohol und 1 oder 2 Tropfen Salzsäure, da kalter Alkohol die Seifen leicht löst, Cholesterin dagegen ungelöst läßt. Das zurückbleibende Cholesterin wird bei 80° getrocknet und gewogen, die alkoholische Seifenlösung mit der wässrigen Lösung (β) vereinigt.

β) Die wässrige Lösung enthält die Gesamtmenge des Phosphatidphosphors in Form von glycerinphosphorsaurem Kali. Die Bestimmung des Phosphors geschieht am besten, indem man nach § 530 verascht und die Phosphorsäure nach § 553 alkalimetrisch ermittelt.

Will man gewichtsanalytisch verfahren, so wird die Lösung mit Salpeter im Überschuß versetzt und in einer Silber- oder Platinschale zur Trockne

Bestimmung  
der Seifen.

\*) Dieser Rückstand enthält außer anderen Extraktivstoffen auch die Seifen. Zu ihrer Isolierung und Bestimmung fällt man eine besondere Portion der serösen Flüssigkeit mit Alkohol, dampft das Filtrat (nicht über 60°) ein, nimmt den Rückstand mit absolutem Alkohol auf, verdunstet wieder bei niedriger Temperatur und extrahiert den Rückstand mit reinem, wasserfreiem Petroläther. Der ungelöste Teil wird in Wasser gelöst, die Lösung mit Salzsäure angesäuert und mit Äther ausgeschüttelt. Die (aus den Seifen) stammenden Fettsäuren gehen in den Äther über und bleiben beim Verdunsten desselben zurück.

verdunstet, der Rückstand gerade bis zur Entfernung der Kohle geschmolzen und die Schmelze nach dem Erkalten in heißem Wasser gelöst. Die Lösung wird im bedeckten Becherglase mit starker reiner Salpetersäure bis zur stark sauren Reaktion versetzt, einige Zeit im offenen Glase zur Entfernung der Untersalpetersäure auf dem Wasserbade digeriert und mit molybdänsaurem Ammoniak gefällt. Die weitere Behandlung geschieht nach § 554.

Berechnung. Aus A. und B. 1. ergibt sich die Menge der Proteinstoffe und die Menge der unlöslichen Salze\*). aus B. 2. die Menge der in Alkohol unlöslichen, aus B. 3. a) die Menge der in Alkohol löslichen Extraktivstoffe (unter ihnen befinden sich wohl immer Seifen), aus beiden zusammen außerdem die Menge der löslichen Salze\*\*). Aus B. 3. b) erfährt man zunächst die Summe der festen Bestandteile des Ätherauszuges, dann die Menge des Cholesterins und die Menge des in Phosphatiden enthaltenen Phosphors. Unter der willkürlichen Annahme, daß alles Phosphatid Lecithin, und zwar Distearyllecithin sei, erfährt man seine Menge durch Multiplikation des erhaltenen Wertes für  $P_2O_5$  mit 11,38. Zieht man die Summe der Gewichte des Cholesterins und des als Lecithin berechneten Phosphatides vom Gewicht des Ätherrückstandes ab, so erhält man die Menge der Fette, vorausgesetzt, daß, wie es gewöhnlich der Fall ist, weder freie fette Säuren noch Farbstoffe oder andere in Äther lösliche Stoffe in wesentlicher Quantität vorhanden waren. (Die kleinen Mengen Cholesterinester sind bei dieser Bestimmung nicht berücksichtigt; das in ihnen enthaltene Cholesterin ist als solches, die in ihm erhaltenen Fettsäuren sind als Fett mitbestimmt.) Die Unkenntnis über die Zusammensetzung des Phosphatidgemenges macht natürlich auch die Berechnung der Fettmenge ungenau.

Es ist nicht zulässig, den Gang der Untersuchung dahin abzuändern, daß die Flüssigkeit eingedampft und der Rückstand getrocknet, pulverisiert und nun nacheinander mit Äther, Alkohol und Wasser extrahiert wird. Die hierbei erhaltenen Rückstände sind, besonders wenn es sich um Blut handelt, kompakt und zähe und schwer zu trocknen, pulverisieren und extrahieren; außerdem werden dabei die Phosphatide zum größten Teil zersetzt und unbestimmbar.

## Untersuchung des Blutes.

(Bearbeitet von K. Thomas - Leipzig.)

### Allgemeines.

664. **Bestandteile.** Das Blut der Wirbeltiere besteht aus dem Plasma und den in diesem Plasma suspendierten morphologischen Elementen (rote und weiße Blutkörperchen, Blutplättchen).

**Spezifisches Gewicht.** Dasselbe beträgt beim erwachsenen Manne im Durchschnitt 1058, kann aber zwischen 1045 und 1075 schwanken. Zur Bestimmung benutzt man das Pyknometer (§ 23).

Steht nur sehr wenig Blut zur Verfügung, so verfährt man nach Hammerschlag<sup>1)</sup> und L. Zuntz<sup>2)</sup> in folgender Weise: Man füllt ein kleines Becherglas von 10 cm Höhe und 5 cm Weite mit einem Gemisch von Chloroform und Benzol, dessen spezifisches Gewicht mit dem vermuteten spezifischen Gewicht des Blutes möglichst übereinstimmt, und läßt einen Tropfen (z. B. direkt aus einem Stich in die Fingerbeere) hineinfallen. Steigt er an die Oberfläche, so versetzt man unter leichtem Umschwenken tropfenweise mit Benzol, fällt er zu Boden, so fügt man Chloroform hinzu, bis er gerade schwimmt. Jetzt wird die Mischung durch Leinwand in einen Zylinder filtriert und das spezifische Gewicht mit dem Aräometer ermittelt. Bis der Tropfen zum Schwimmen gebracht

Bestimmung  
des spezifischen  
Gewichts nach  
Hammer-  
schlag.

\*) Über kleine Fehler, welche die Anwesenheit phosphorhaltiger Proteide bedingt, s. S. 771.

\*\*) Genauer ist es freilich, die beiden Aschen nach Ausführung der Wägungen zu vereinigen, mit Wasser zu kochen, durch aschefreies Filter zu filtrieren, den ungelöst gebliebenen Teil mit dem Filter zu trocknen, zu glühen und zu wägen und sein Gewicht den unlöslichen Salzen zuzurechnen.

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. klin. Med. Bd. 20, S. 444. 1892.

<sup>2)</sup> Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 66, S. 539. 1897.

ist, dürfen nicht mehr wie 1—2 Minuten verstreichen, da er allmählich durch Diffusionsvorgänge leichter wird (Zuntz).

**Farbe.** Die Farbe des arteriellen Blutes ist hellrot, die des venösen dunkelblaurot. Da der rote Blutfarbstoff (Hämoglobin) ausschließlich den Körperchen angehört, zeigt das Blut die Eigenschaften der Deckfarben, d. h. es ist in dünnsten Schichten undurchsichtig.

**665. Verhalten zu Salzlösungen.** Salzlösungen, welche dieselbe osmotische Spannung wie das Plasma haben, sog. isotonische Lösungen, verändern das Volumen der roten Blutkörperchen nicht (z. B. eine 0,95proz. Kochsalzlösung für Menschen- und Säugetierblut). Stärkere, sog. hypertonische Salzlösungen rufen eine Schrumpfung hervor. Die Blutkörperchen werden zackig und die Farbe des Blutes erscheint im auffallenden Licht heller. Schwächere, sog. hypotonische Salzlösungen bewirken eine Quellung und noch schwächere (für verschiedene Säugetiere verschieden, beim Hund z. B. bei 0,46%, beim Hammel bei 0,73% Kochsalz) Austritt von Blutfarbstoff (Hämolyse).

Die Widerstandskraft der roten Blutkörperchen gegen hypotonische Lösung ist nicht immer ein und dieselbe; sie hängt<sup>1)</sup> aber nicht nur von den osmotischen Eigenschaften des Paraplasmas und seinem Volumen ab, sondern auch noch von der Protoplasmabegrenzung. Die Resistenzprüfung gegen osmotische Schädigung erfolgt heute in der Weise<sup>2)</sup>, daß man in eine Reihe von unten spitz zulaufenden Glasröhrchen mit Lösungen von steigendem Kochsalzgehalt je einen Tropfen Blut hineinfallen läßt, leicht aufschüttelt und dann sedimentieren läßt. Der Kochsalzgehalt der Lösungen steigt von 0,28% um je 0,02 bis zu 0,62%. Nach einigen Stunden erkennt man schon auf Entfernung, wo Hämolyse eingetreten (Minimumresistenz) ist und wo ein Sediment sich eben gebildet hat (Maximumresistenz). Auch gegen andere schädliche Einflüsse wird die Resistenz bestimmt.

**666. Hämolyse.** Auf Zusatz von Wasser (ebenso auf Zusatz von hypotonischen Salzlösungen § 665) quellen die roten Blutkörperchen unter Aufnahme von Wasser und werden kugelig. Blutfarbstoff geht in Lösung (Hämolyse). Infolgedessen wird das Blut im auffallenden Licht dunkler und zeigt die Eigenschaften der Lasurfarben, d. h. es wird in dünnen Schichten durchsichtig.

Eine Hämolyse erfolgt auch durch Einwirkung von Äther, Chloroform, Gallensäuren, Alkalien, beim Wiederauftauen des Blutes nach dem Gefrieren, beim Evakuieren, durch elektrische Schläge. (Ist das austretende Oxyhämoglobin leicht krystallisierbar, so kann es hierbei zur Krystallbildung kommen.)

Das Wiederauftauen nach dem Gefrieren wirkt wahrscheinlich nur dadurch, daß das krystallinisch sich ausscheidende Wasser beim Auftauen die Blutkörperchen in seiner Nähe löst; ebenso ist es beim Evakuieren der Gase unmöglich, zu vermeiden, daß im leeren Raum verdunstendes Wasser von den Wandungen in das Blut zurückkrinnt und am Ort des Einfließens Blutkörperchen löst.

Hämolytisch wirken auch Saponinsubstanzen, Stoffwechselprodukte von Bakterien (z. B. Tetanustoxin), von Tieren (z. B. Schlangengifte), ferner auch die Sera fremder Tierspezies. Die Begünstigung der Hämolyse durch Phosphatide wird durch Cholesterin (Windaus<sup>3)</sup>) aufgehoben.

Fetthaltige Organextrakte beschleunigen Hämolyse entsprechend Fettgehalt; entfettetes Plasma gerinnt nicht<sup>4)</sup>. Galle und gallensaure Salze beschleunigen<sup>5)</sup>.

<sup>1)</sup> Hamburger: Osmotischer Druck und Ionenlehre. Bd. I, S. 359. 1904.

<sup>2)</sup> Naegeli: Blutkrankheiten und Blutdiagnostik 4. Aufl., S. 61. 1923.

<sup>3)</sup> Brinkman u. van Dam: Biochem. Zeitschr. Bd. 108, S. 35. 1920. — Brinkman u. Wastl: Biochem. Zeitschr. Bd. 124, S. 25. 1921.

<sup>4)</sup> Schilling (Stuber): Biochem. Zeitschr. Bd. 95, S. 220. 1919.

<sup>5)</sup> Haessler u. Stebbius: Journ. of exp. med. Bd. 29, S. 445. 1919.

**Reaktion des Blutes.**

667. Das Blut ist im physikalisch-chemischen Sinne eine nahezu neutral reagierende Flüssigkeit (Friedenthal, Höber). Gegen manche Farbstoffe, z. B. gegen Lackmus und Lackmoid, reagiert es alkalisch (nicht gegen Phenolphthalein). Zum Nachweis zerreibt man Blut mit überschüssigem, gepulverten Ammonsulfat, hält ein rotes Lackmuspapier in den Brei und spritzt es mit Wasser ab. Es hinterbleibt ein blauer Fleck.

Die **Wasserstoffionenkonzentration** ändert sich mit der Kohlensäurespannung. Bei der Gewinnung des Blutes ist daher eine intensive Berührung mit der Luft zu vermeiden. Man bindet die Kanüle in die Vene und taucht ihr äußeres Ende unter die Oberfläche der sich ansammelnden Blutschicht. Die sicherste Methode ist die elektrometrische, die jetzt auch für Mikrobestimmungen durchgearbeitet ist<sup>1)</sup>. Bei Einhaltung bestimmter Vorsichtsmaßregeln gibt die Indikatorenmethode\*) gleiche Werte<sup>2)</sup>. Die Gegenwart von Eiweiß ändert die Umschlagszone mancher Indikatoren. Wenig beeinflusst wird Neutralrot<sup>3)</sup> und Phenolsulfonphthalein<sup>4)</sup>. Cullen und van Slyke<sup>5)</sup> verdünnen das Oxalatplasma auf das 20fache; dadurch wird  $p_{\text{H}}$  herabgesetzt, doch läßt sich dieser Fehler und die Änderung, die dadurch entsteht, daß nicht bei der Bluttemperatur colorimetriert wird (für je  $1^{\circ} + 0,01$ ), korrigieren. Für menschliches Plasma gilt  $p_{\text{H}38} = p_{\text{H}20}^{\circ} \text{colorim.} - 0,23$ . Die Methode von Cullen ist als Mikrobestimmung mit einem Verbrauch von 0,1 cem Plasma ausgestaltet worden von Myers, Schmitz und Booher<sup>6)</sup>. Für den Gedanken von Kühne<sup>7)</sup>, das Dialysat des Blutes zur Messung zu benutzen, ist eine bequeme Ausführungsform von Levy, Rowntree und Marriott<sup>8)</sup> gegeben worden. Scott<sup>9)</sup> sowie vor allem Dale und Evans<sup>10)</sup> haben sie verbessert, indem sie die natürliche Kohlensäurespannung wahren. Einen weiteren Fehler, der durch den Donnaneeffekt bedingt ist, ermöglichen van Slyke, Wu und McLean<sup>11)</sup> durch Rechnung auszuschalten. Das frisch entnommene Blut wird in einem Kollodiumschlauch, der neutrales Oxalat enthält\*\*), gegen 0,85 proz. Kochsalzlösung 10—15 Minuten lang dialysiert. Den Collodiumschlauch verfertigt man sich mit Hilfe eines Reagensglases selbst, prüft ihn auf Dichtigkeit\*\*\*) und Durchlässigkeit†) und bindet ihn auf einen Hartgummiring, mit dem man den Zylinder, der die äußere Salzlösung enthält, dicht verschließt. Im Collodiumschlauch wird über das Blut flüssiges Paraffin geschichtet und damit der Schlauch vollständig gefüllt und schließlich zugestopft, so daß CO<sub>2</sub>-Verluste vermieden werden. Als Vergleichsflüssigkeit dient Phosphatpuffer von  $p_{\text{H}} = 6,5, 7,5$  und  $10,5$ . Puffergemisch

Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentration.

\*) Die betr. Ausführung, Fehlerquellen, Herstellen der Puffergemische usw. s. Kolthoff: Der Gebrauch der Farbenindikatoren. Berlin: Julius Springer 1921. Indikatorenreihe bei Merck-Darmstadt.

\*\*) Eine 0,1 proz. Lösung, mit Neutralrot versetzt, muß denselben Farbton geben wie gleich stark gefärbtes Wasser.

\*\*\*) Die Salzlösung bleibt frei von Erythrocyten.

†) Mit Phosphatpuffer gefüllt, muß nach 5 Minuten langem Dialysieren außen und innen gleiche  $p_{\text{H}}$  eingetreten sein.

<sup>1)</sup> G. Lehmann: Biochem. Zeitschr. Bd. 139, S. 213. 1923 u. Spezialbücher der physikalischen Chemie.

<sup>2)</sup> Kramer u. Greene: Journ. of biol. chem. Bd. 46, Proc. S. 42. 1921.

<sup>3)</sup> Snapper: Biochem. Zeitschr. Bd. 51, S. 88. 1913. — Bayliss: Journ. of physiol. Bd. 53, S. 162. 1919.

<sup>4)</sup> A. Homer: Biochem. Journ. Bd. 11, S. 283. 1917.

<sup>5)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 52, S. 501. 1922.

<sup>6)</sup> Desgl. Bd. 57, S. 209. 1923.

<sup>7)</sup> Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. Bd. 33, S. 95. 1865.

<sup>8)</sup> Arch. internat. de med. Bd. 16, S. 389. 1915; Bd. 17, S. 840. 1916.

<sup>9)</sup> Americ. Journ. of physiol. Bd. 44, S. 196. 1917.

<sup>10)</sup> Journ. of physiol. Bd. 54, S. 169. 1920. <sup>11)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 56, S. 796. 1923.

von  $p_H = 7,5$  und die Außenflüssigkeit des Dialysators werden mit gleichen Mengen (meist 4 Tropfen einer 0,02proz. wässrigen Lösung) von Neutralrot versetzt. Farbgleichheit erzielt man durch Zuließenlassen gemessener Mengen einer der beiden anderen Pufferlösungen aus einer Bürette zum Vergleichspuffer. Die  $p_H$  dieser Mischungen hat man in Kurvenform festgelegt. Einzelheiten der Apparatur s. in der Arbeit von Dale und Evans.

Bestimmung  
der Titrations-  
alkalescenz.

Die **Bestimmung der Titrationsalkalescenz** geschieht am besten in lackfarbenem Blute (Loewy). Die Menge Säure, welche einer bestimmten Quantität Blut hinzugefügt werden muß, um eine (gegen Lackmus oder Lackmoid) neutrale Reaktion zu erzielen, ist verschieden, je nachdem die Eiweißstoffe zuvor entfernt sind oder nicht. Im letzteren Falle braucht man mehr Säure. Sie nimmt außerhalb des Körpers rasch ab und gibt der Hauptsache nach den Gehalt des Blutes an Soda, Natriumbicarbonat und zweibaschem Natriumphosphat an. Außerdem wird das Säurebindungsvermögen der Proteine mitbestimmt. Die Titrationsalkalescenz steht in naher Beziehung zur Alkalireserve des Blutes; letztere wird als Kohlensäurebindungsvermögen des Blutes nach van Slyke bestimmt (S. 815).

#### 1. Bestimmung ohne Entfernung der Eiweißstoffe

nach Loewy.

a) nach Loewy<sup>1)</sup>. Man läßt Blut direkt aus der Ader in ein 50 ccm fassendes Maßgefäß, dessen enger Hals zwischen 49,5 und 50,5 ccm in  $\frac{1}{10}$  ccm geteilt ist und in dem sich 45 ccm 0,1proz. Kaliumoxalatlösung befinden, bis zum kalibrierten Teil fließen und liest genau ab. Auf 9 Tl. Salzlösung kommt also ungefähr 1 Tl. Blut. Die Flüssigkeit wird gemischt, in ein Becherglas ausgegossen und mit  $\frac{1}{25}$ -Weinsäure titriert, bis ein Tropfen auf einem mit gesättigter Magnesiumsulfatlösung getränkten Lackmus- oder Lackmoidpapierstreifen eine eben deutlich erkennbare Rotfärbung hervorruft. Als Lackmuspapier verwendet man ein sehr empfindliches, mit Lackmustinktur gefärbtes, geleimtes Papier; den Tropfen läßt man stets gleich lange einwirken, tupft ihn dann mit Filtrierpapier ab und beobachtet die Färbung im Augenblick des Abhebens des Filtrierpapiers.

nach van Slyke.

b) nach van Slyke<sup>2)</sup>. 1 ccm Plasma wird mit 5 ccm 0,01 n-Salzsäure versetzt und durch Schütteln und Rühren die Kohlensäure entfernt. Dann wird mit 0,9proz. Kochsalzlösung in ein Reagensglas übergeführt und unter Zusatz von Phenolrot mit 0,01 n-Natronlauge zurücktitriert bis auf den Farbton der Kontrolle. Diese wird erhalten, indem man in einem gleichen Reagensglas 1 ccm Plasma unter Paraffin gemischt hat mit 20 ccm Kochsalzlösung, die Phenolrot enthält. Das Volumen der titrierten Lösung wird mit Kochsalzlösung ebenfalls auf 21 ccm aufgefüllt. Die verbrauchte Säuremenge entspricht dem Bicarbonatgehalt des Plasmas. Die Titration wird zweckmäßig kombiniert mit der Bestimmung der  $p_H$  nach Cullen, wozu die Kontrollösung gleich benutzt werden kann.

#### 2. Bestimmung nach Entfernung der Eiweißstoffe

nach Hamburger.

a) nach Hamburger (Bestimmung des sog. diffusiblen Alkalis\*). Kraus<sup>3)</sup> sowie Spiro und Pemsel<sup>4)</sup> entfernen die Eiweißstoffe mit Ammoniumsulfat; Hamburger<sup>5)</sup> benutzt Alkohol. Letzteres Verfahren scheint die gleichmäßigsten Werte zu liefern und wird in folgender Weise ausgeführt: Man

\*) Stark abhängig vom Kohlensäuregehalt des Blutes! Plasma also unter Paraffin zu gewinnen (Hamburger).

1) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 58, S. 462. 1894.

2) Journ. of biol. chem. Bd. 38, S. 167. 1919; Bd. 50, Proc. S. 16. 1922.

3) Über die Verteilung der Kohlensäure im Blute. Festschrift. Graz 1898.

4) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 26, S. 233. 1899.

5) Arch. f. Anat. u. Physiol., physiol. Abt. 1898, S. 1.

versetzt Blut mit dem doppelten Volumen 96 proz. Alkohols, filtriert, preßt den Niederschlag mit einem reinen Tuch aus, verteilt ihn in Alkohol, preßt wieder aus und verfährt noch 4 mal in derselben Weise. Die ausgepreßten trüben Filtrate werden durch ein mit Alkohol befeuchtetes Filter filtriert, die Filtrate zusammen mit dem ersten auf dem Wasserbade von Alkohol befreit und mit Wasser zum ursprünglichen Volumen aufgefüllt. Man titriert jetzt mit  $n/25$ -Weinsäure unter Benutzung von Lackmoidpapier als Indicator.

Jede Methode gibt bei einiger Übung in Kontrollbestimmungen genügend übereinstimmende Resultate. Diese sind nur als Ausdruck des Verhaltens gegenüber dem benutzten Farbstoff (Lackmus oder Lackmoid) anzusehen.

b) nach Greenwald<sup>1)</sup>.

nach Greenwald.

Prinzip. Die Eiweißkörper werden durch Pikrinsäure gefällt und im Filtrat die freie und die gesamte Pikrinsäure bestimmt. Der Unterschied entspricht der Menge, die vom titrierbaren Alkali gebunden worden war.

Erforderliche Lösungen. 1. Pikrinsäure, 1 proz. wässrige Lösung. 2. 0,01 n-Natronlauge, täglich frisch mit CO<sub>2</sub>-freiem Wasser durch Verdünnen herzustellen. 3. Methylrot 0,1 g in 7,4 ccm 0,05 n-Natronlauge lösen und auf 25 ccm auffüllen. Zum Gebrauch aufs 10fache mit Wasser verdünnen. 4. Phenolrot (Phenolsulfonphthalein) 0,1 g in 5,4 ccm 0,05 n-Natronlauge lösen und weiter wie unter 3. 5. Thymolphthalein, 1 proz. alkoholische Lösung, mit Natronlauge bis zur beginnenden Bläuung versetzen. 6. Nitron, 1 proz. filtrierte Lösung in 10 proz. Essigsäure.

Ausführung. 5 ccm Oxalatblut werden im 50 ccm-Meßkolben mit 10 ccm Wasser verdünnt und mit 30 ccm Pikrinsäurelösung versetzt; dann wird mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt, geschüttelt und filtriert. 30 ccm des Filtrats werden zum Sieden erhitzt und nach dem Abkühlen titriert unter Zusatz von 4 Tropfen Methylrot, und dann weiter unter Zusatz von 4 Tropfen Phenolrot. Darauf setzt man 8 Tropfen Thymolphthalein zu und titriert zu Ende.

Zur Bestimmung der gesamten Pikrinsäure wird die titrierte Flüssigkeit mit Essigsäure stark angesäuert, zum Sieden erhitzt und tropfenweise mit der Nitronlösung versetzt, bis kein Niederschlag mehr entsteht. Der Niederschlag wird abfiltriert, mit Wasser gewaschen, bei 110° eine Stunde getrocknet und gewogen. Bei Verwendung von Thymolphthalein ist für jeden Tropfen 0,1 mg abzuziehen. Das Gewicht des Niederschlags wird in Kubikzentimetern 0,01 n-Natronlauge, der gesamten Pikrinsäure äquivalent, umgerechnet. Es entspricht bei Verwendung von Methylrot 1,0 mg Nitronpikrat 0,1848 ccm 0,01 n-NaOH, von Phenolrot 0,1890 ccm und von Thymolphthalein 0,1958 ccm.

Berechnung. Von dem Alkaliwert des Nitronpikrats wird die zur Neutralisation der freien Säure mit dem entsprechenden Indicator verbrauchte Alkalimenge abgezogen; der Unterschied mit  $10/3$  multipliziert, gibt die Alkalimenge in 100 ccm Blut, die vorher an Eiweiß oder Kohlensäure gebunden war, ausgedrückt in Kubikzentimetern  $n/10$ -Lauge. Fehler +1% bei Methylrot, +2% bei den anderen Indicatoren. Bei Verwendung von Methylrot und der Zentrifuge lassen sich auch kleinere Blutmengen titrieren.

Anmerkung. Es empfiehlt sich, die Titration mit allen 3 Indicatoren durchzuführen; Thymolphthalein zeigt Acidose am deutlichsten an. Der mit Phenolrot (Umschlag bei  $p_H = 7,4$ ) erhaltene Wert stellt die Menge des vorher an CO<sub>2</sub> und Protein gebundenen Alkalis des Blutes dar; der Unterschied zwischen den Endpunkten mit Methylrot ( $p_H = 6,0$ ) und Thymolphthalein ( $p_H = 9,0$ ) entspricht dem Gehalt des Blutes an säurebindenden Puffern.

#### *Gerinnung des Blutes.*

668. Das aus der Ader gelassene Blut gerinnt, indem das im Plasma gelöste Fibrinogen in Fibrin umgewandelt wird. Das die Umwandlung bewirkende Ferment ist im Blut als Zymogen vorhanden, zu dessen Aktivierung außer

<sup>1)</sup> Greenwald u. Lewman: Journ. of biol. chem. Bd. 54, S. 263. 1922.

Kalksalzen aus den Leukocyten oder Blutplättchen stammende Substanzen nötig zu sein scheinen. Die Gerinnung erfolgt gewöhnlich wenige Minuten nach dem Verlassen des Blutgefäßes, bei manchen Tieren, z. B. Pferden, erheblich langsamer. Durch manche Maßnahme läßt sich der Eintritt der Gerinnung verzögern oder ganz verhindern, durch andere beschleunigen.

Verzögerung der Gerinnung.

Verzögert wird sie durch Abkühlung des Blutes, durch Auffangen des Blutes in einem Gefäß, dessen Wandungen innen mit Vaseline überzogen sind, durch Zusatz von Salzlösungen, besonders salpetersauren Salzen, auch Magnesiumsulfat, durch Zusatz von Wasser und Durchperlen eines indifferenten Gasstromes ( $N_2$ ,  $O_2$ ,  $H_2$ ,  $CO_2$ , Luft) (Brinkman und Van Dam<sup>1</sup>).

Aufhebung der Gerinnung.

Ganz aufgehoben wird die Gerinnung durch reichlichen Salzzusatz, z. B. 1 Volumen gesättigte Magnesiumsulfatlösung auf 3 Volumen Blut. (Sie tritt dann meistens ein, wenn man das Gemisch mit Wasser verdünnt; nach Zusatz von viel Magnesiumsulfat geschieht dies nicht.) Ferner wird sie verhindert durch Zufügen von kalkfällenden Mitteln, z. B. Kalium-, Natrium- oder Ammonoxalatlösung (und zwar so viel, daß das Blut 0,1% Oxalat enthält), oder Natriumcitrat (0,2proz.), oder Fluornatriumlösung (bis zu 0,3% Fluornatrium im Blut), durch Zufügen von Hirudin, eine von Jacobj<sup>2</sup>) aus Blutegeln isolierte albumoseartige Substanz (1 mg machen 20 ccm Kaninchenblut dauernd ungerinnbar), durch Injektion von Hirudin in das Gefäßsystem von Tieren vor der Blutentnahme, durch Zusatz von ein wenig Ätzkali oder von hinreichender Menge Essigsäure. Diese Zusätze verändern ebenso wie die Vorgänge bei der Gerinnung die Permeabilität der Blutzellen.

Beschleunigung der Gerinnung.

Beschleunigend wirkt Erhöhung der Temperatur, ferner Bewegung des Blutes durch Quirlen oder Schlagen, Einbringen von feingepulverter Kohle, Zufügen von Gewebsauszügen.

Zuweilen gerinnt das Blut in den Leichen binnen 12 Stunden nicht, gerinnt aber, sobald es aus der Ader gelassen wird; in anderen Fällen gerinnt es, aus der Ader gelassen, teilweise, kann filtriert werden, liefert dann nach einiger Zeit wieder eine Gerinnung usw. (Fibrin langsamer Gerinnung), in wieder anderen Fällen gerinnt es gar nicht, doch geschieht dies nur selten. Die Ursachen dieser Verschiedenheiten des Blutes bei verschiedenen Krankheiten sind noch nicht genügend untersucht, im ganzen kann man jedoch bis jetzt so viel als ausgemacht ansehen:

1. Das Blut gerinnt, alles übrige gleich gesetzt, um so schneller, je verdünnter, wässriger es ist, daher schnelle Gerinnung nach Blutverlusten und bei Hydrämischen.

2. Das arterielle Blut gerinnt im allgemeinen langsamer als das gleiche Blut im venösen Zustande.

Die Gerinnung des Blutes ist ferner um so fester, elastisch zäher, je wasserreicher und je ärmer an Blutkörperchen, roten und farblosen, das Blut ist. Ein wasserarmes (Cholera), an roten Blutkörperchen (Plethora) oder farblosen Blutzellen (Leukämie) reiches Blut gibt lockere, leicht zerdrückbare Gerinnung.

**669. Blutkuchen, Serum, defibriniertes Blut.** Gerinnt das Blut bei ruhigem Stehen, so wird es seiner ganzen Menge nach zu Gallerte; diese zieht sich alsbald zusammen und preßt eine klare Flüssigkeit aus und nach einigen Stunden sieht man eine ziemlich feste rote Masse von der verkleinerten Form des Gefäßes,

<sup>1</sup>) Arch. internat. de physiol. Bd. 15, S. 105. 1919.

<sup>2</sup>) Dtsch. med. Wochenschr. 1904, S. 1786. — Franz: Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 49, S. 342. 1903. — Bodong: desgl. Bd. 52, S. 242. 1905. — Schittenhelm u. Bodong: desgl. Bd. 54, S. 217. 1906.



in dem die Gerinnung stattgefunden, den Blutkuchen, in einer klaren, gelblichen Flüssigkeit, dem Serum. Der Blutkuchen besteht aus einem feinen Faser- und Maschenwerk von Fibrin, in dem die Blutkörperchen eingeschlossen sind. Blutkuchen.  
Serum.

Erfolgt die Gerinnung langsam, haben also die roten Blutkörperchen Zeit, sich zu senken, oder ist ihre Suspensionsstabilität<sup>1)</sup> so sehr verringert, daß sie sich schon vor Eintritt der zeitlich normalen Gerinnung gesenkt haben, so besteht der obere Teil des Blutkuchens nur aus Fibrin und weißen Blutkörperchen und erscheint weiß (Speckhaut, Crusta inflammatoria). Beim langsam gerinnenden Pferdeblut, das zudem durch eine große Suspensionsinstabilität ausgezeichnet ist, erhält man stets eine solche Speckhaut. Über das Verhalten des Blutes anderer Tiere s. de Haan<sup>2)</sup>. Speckhaut.

Wird das Blut während der Gerinnung in Bewegung erhalten, z. B. durch Schlagen mit einem Stäbchen, so scheidet sich das Fibrin als elastische, zusammenhängende Masse um den Stab ab und die Blutkörperchen bleiben im Serum (defibriniertes Blut). Defibriniertes Blut.

#### *Trennung und Untersuchung von Plasma (oder Serum) und Blutkörperchen.*

**670. Trennung.** Eine Trennung von Blutkörperchen und Plasma (z. B. im ungerinnbar gemachten Blut § 668) oder Serum (im defibrinierten Blut § 669) durch Filtration ist unausführbar, weil die große Weichheit und Elastizität der Blutkörperchen, vermöge derer sie durch Capillaren des Körpers, deren Durchmesser ein geringerer ist als ihr eigener, hindurchschlüpfen, sie auch die Poren des Filtrierpapiers passieren läßt. Zwar kann man die Starrheit der Körperchen sehr wesentlich durch Salzzusatz zum Blute erhöhen, aber auch dann geht noch ein Teil durchs Filter. Eine Trennung läßt sich nur durch freiwillige Senkung der Körperchen während ruhigen Stehens, am besten im Eisschrank, oder durch Zentrifugieren erreichen. Besonders leicht gelingt das bei Pferdeblut.

Soll die Verteilung einzelner Blutbestandteile (Ionen, Zucker) zwischen Plasma und Körperchen quantitativ bestimmt werden, so müssen beide im Einzelfall auf verschiedene Weise voneinander getrennt werden (§ 671). Im Prinzip besteht die Methode meist darin, daß die Bestimmung einmal im Gesamtblut ausgeführt wird, dann im Plasma oder Serum oder Ultrafiltrat, und gleichzeitig im Hämatokrit das Volumen der Blutzellen bestimmt wird (Hamburger<sup>3)</sup>), oder, indem man versucht, die Trennung rasch ohne Zusatz, aber bei niedriger Temperatur und im sorgfältig gesammelten Blut durchzuführen, ehe die Gerinnung erfolgt.

**Isolierung von Plasma.** Schwer gerinnbares Blut, z. B. Pferdeblut, wird in hohen Zylindern aufgefangen und bei 0° stehen gelassen. Nach einiger Zeit haben sich die Körperchen gesenkt, so daß sich klares Plasma abgießen läßt. Schneller gerinnendes Blut ist durch einen kleinen Zusatz von Oxalat (§ 668) ungerinnbar zu machen und dann derselben Behandlung zu unterwerfen. Auch durch stundenlanges Zentrifugieren von ungerinnbar gemachtem Blut kann man Plasma gewinnen, schneller, wenn das Blut mit einer isotonischen Salzlösung (1:10—20) verdünnt worden ist.

Die Untersuchung des Plasmas geschieht nach § 630 ff.

<sup>1)</sup> Fähræus: Acta med. scandinav. Bd. 55, S. 1. 1921 u. Handbuch d. biol. Arbeitsmethoden, herausg. von Abderhalden, Abt. IV, Teil 3, S. 373. Urban & Schwarzenberg 1923.

<sup>2)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 86, S. 298. 1918.

<sup>3)</sup> Hamburger u. Brinkman: Biochem. Zeitschr. Bd. 94, S. 131. 1919. — Brinkman u. van Dam: Biochem. Zeitschr. Bd. 108, S. 35. 1920. — van Creveld u. Brinkman: Biochem. Zeitschr. Bd. 119, S. 65. 1921.

**671. Isolierung von Serum.** Man läßt Blut gerinnen und gießt das nach einiger Zeit ausgepreßte Serum ab oder man zentrifugiert defibriniertes und koliertes Blut längere Zeit.

Die Untersuchung des Serums geschieht nach § 630ff.

Vorsichtsmaßregeln  
beim Auffangen  
des Blutes.

Bei der Gewinnung von Plasma und Serum ist auf die leichte Löslichkeit des Blutfarbstoffs in Wasser Rücksicht zu nehmen (§ 666). Fällt ein Tröpfchen Wasser in eine selbst größere Quantität Blut, so wird das ganze Plasma oder Serum rot gefärbt und die zerstörten Blutkörperchen sind verloren. Die Farbe von Plasma oder Serum kann also nur dann richtig beurteilt werden, eine isolierte Untersuchung von Blutflüssigkeit und Blutkörperchen ist nur dann ausführbar, wenn jeder Tropfen Wasser vermieden wird. Dieses bietet aber praktisch einige Schwierigkeiten. Fängt man nämlich warmes Blut in einem kalten Gefäße auf, so beschlägt sich die Wandung des Gefäßes mit Wassertröpfchen durch die Verdunstung aus dem Blute, das Wasser fließt in das Blut und löst an der Stelle des Einfließens Blutkörperchen auf. Um daher schon beim Auffangen des Blutes von Menschen oder warmblütigen Tieren eine Zerstörung einzelner Blutkörperchen zu vermeiden, muß man das Gefäß vorher auf Bluttemperatur erwärmen. Auch ist es nötig, das Gefäß völlig mit Blut zu füllen und zu schließen, damit nicht auf dem sich schneller abkühlenden Teil des Gefäßes über der Flüssigkeit eine Kondensation von Wasser stattfindet.

Ebenso ist zu berücksichtigen, daß die Permeabilität der Blutzellen leicht verändert wird und dann die vitale Verteilung der einzelnen Blutbestandteile zwischen Zellen und Plasma zerstört werden kann. Zur Bestimmung der Glucose verzögert man die Gerinnung, indem man das Blut in dem 20fachen Volumen Ringerlösung auffängt und während 15—20 Minuten einen indifferenten Gasstrom hindurchperlen läßt. Dann wird zentrifugiert<sup>1)</sup>. Kaliumoxalat ersetzt man bei der colorimetrischen Harnsäurebestimmung durch Lithiumoxalat<sup>2)</sup> usw. Um einen Übertritt von Innenflüssigkeit der Blutkörperchen in das Plasma und damit eine Verdünnung des Serums und einen Austausch der Ionen zwischen beiden zu vermeiden, ist es notwendig, das Blut in paraffinierten Gefäßen aufzufangen und sofort zu zentrifugieren, so daß das Plasma erst nach Abtrennung der Blutkörperchen gerinnt<sup>3)</sup>.

Isolierung von Serum  
aus kleinen Blut-  
mengen.

**Isolierung von Serum aus wenig Blut.** Man saugt das Blut in U-förmig gebogenen Glascapillaren auf und läßt es spontan gerinnen. Die Weite der Capillare, die man sich selber herstellt, richtet sich nach der Serummenge, die man benötigt; 0,1 g ist leicht zu erhalten. Mit einem ausgeglühten Draht löst man den Blutkuchen von der Glaswand ab und bettet die Capillare mit Hilfe von Watte fest in ein Zentrifugegefäß; nach genügend langem Schleudern wird an der Grenze von Körperchen und Serum die Capillare abgeschnitten. Man verschließt die Öffnung mit Paraffin und hebt im Eisschrank auf.

**672. Isolierung der roten Körperchen.** Will man die Körperchen völlig frei von Plasma oder Serum erhalten, so mischt man das (durch Zusatz von 0,1 proz. Kaliumoxalat) ungerinnbar gemachte oder das defibrinierte Blut (von Menschen oder Säugetieren) mit dem 10fachen Volumen einer 0,9 proz. Kochsalzlösung und zentrifugiert (oder läßt in Schalen mit flachem Boden und senkrechten Wandungen absitzen). Wird der von der überstehenden Flüssigkeit befreite, schlammige Bodensatz wiederum mit derselben verdünnten Kochsalzlösung vermischt und die Mischung ebenso behandelt, so erhält man als Bodensatz die von Plasma oder Serum so gut wie ganz befreiten, aber nicht ganz unveränderten Blutkörperchen. Eine Abtrennung der weißen Blutkörperchen und Blutplättchen gelingt wenigstens bis zu einem gewissen Grade, wenn man die obere Schicht des Bodensatzes des Zentrifugierglases, welche hauptsächlich aus diesen besteht, entfernt. Eine Entfernung noch beigemengter weißer Blutkörperchen und Blutplättchen gelingt nach Abderhalden und Deetjen<sup>4)</sup> vermittels (evtl. mehrmaligen) Durchsaugens durch eine längere, nicht zu fest gepreßte Watteschicht, welche weiße Blutkörperchen und Blutplättchen zurückhält.

<sup>1)</sup> Brinkman u. van Dam: Arch. internat. de physiol. Bd. 15, S. 105. 1909.

<sup>2)</sup> Folin: Journ. of biol. chem. Bd. 54, S. 164. 1922.

<sup>3)</sup> Lundertz: Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 94, S. 119. 1922.

<sup>4)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 53, S. 280. 1907.

**673. Untersuchung der roten Blutkörperchen.** Sie enthalten ungefähr 60% Bestandteile. Wasser. Die festen Bestandteile bestehen zum allergrößten Teil aus Blutfarbstoff, daneben finden sich in kleinen Mengen andere Proteinstoffe, Harnsäureribosid, Phosphatide, Cholesterin, ein sich wie ein Cerebiosid verhaltender Körper (Pascucci<sup>1</sup>), Polypeptide spaltende Fermente (Abderhalden<sup>2</sup>). Fette fehlen, ebenso Fettsäuren, Zucker, wenn Plasma und Blutzellen in richtiger Weise getrennt worden sind (Hamburger und Brinkman<sup>3</sup>), Cholesterinester (Hepner<sup>4</sup>). Glucosamin dringt ein (Kozawa<sup>5</sup>). Von anorganischen Stoffen sind vorhanden: Chlor- und Phosphat-Ionen, Alkalien, und zwar scheint im allgemeinen das Natrium zu überwiegen (bei Pferden, Schweinen und Kaninchen fehlt es auffallenderweise ganz), wenig Magnesium, kein Calcium (Abderhalden<sup>6</sup>).

Die Summe der festen Bestandteile mit Ausnahme von Blutfarbstoff und den anderen wasserlöslichen Stoffen nennt man Stroma.

Über die Darstellung des Blutfarbstoffs s. § 424.

Zur Darstellung des Stroma verfährt man nach Pascucci<sup>7</sup>) am besten in folgender Weise: Der aus defibriertem Pferdeblut abgeschiedene Blutkörperchenbrei wird mit dem 15—20fachen Volumen einer  $\frac{1}{5}$ -gesättigten Ammonsulfatlösung versetzt und zentrifugiert. Man läßt den Bodensatz möglichst rasch in ganz dünner Schicht auf flachen Porzellantellern bei Zimmertemperatur eintrocknen, verteilt ihn in kaltem Wasser und läßt bei 0° stehen. Nach 24 Stunden wird die überstehende Flüssigkeit abgossen und der Bodensatz durch wiederholtes Dekantieren gewaschen, dann abfiltriert und auf dem Filter ausgewaschen.

Ein anderes, weniger einfaches Verfahren ist von Wooldridge<sup>8</sup>) angegeben worden.

Das Stroma löst sich, frisch dargestellt, in 0,2 proz. Salzsäure; nach längerem Stehen unter Wasser ist es nur noch teilweise löslich. Durch verdünnte Salzlösung läßt sich ihm ein globulinartiger Eiweißstoff entziehen, durch Äther Cholesterin, durch Alkohol Phosphatid (Wooldridge). Nach Pascucci enthält das Stroma etwa 30% in Äther, Chloroform und Alkohol lösliche Substanz und etwa 0,9% Asche.

Weiteres s. bei Wooldridge und Pascucci.

Die kernhaltigen roten Blutkörperchen der Vögel, Amphibien, Fische enthalten außer den oben genannten Bestandteilen der kernlosen Erythrocyten noch die Bestandteile des Kernes (Histon, Nucleinsäure).

Zur Darstellung der Kernmasse der Vogelblutkörperchen werden die, wie oben (§ 672) beschrieben, wiederholt mit Kochsalzlösung zentrifugierten Blutkörperchen im Scheidetrichter in 40° warmem Wasser unter Umschütteln gelöst. Nach einiger Zeit fügt man 3,6 proz. Kochsalzlösung (auf 3 Tl. Lösung 1 Tl.) hinzu, zentrifugiert, suspendiert die abgesetzte Masse wieder in einem Scheidetrichter in 40° warmem Wasser unter Umschütteln, fügt dieselbe Kochsalzlösung in demselben Verhältnis hinzu und zentrifugiert. Man wiederholt dieses Verfahren, bis die Masse ein farblos glasiges Aussehen ohne rote Streifen hat und keinen Blutfarbstoff mehr abgibt. Jetzt bringt man sie wieder in Wasser zum Aufquellen, fügt das doppelte Volumen Alkohol hinzu, zentrifugiert, bringt den Rückstand in 96 proz. Alkohol, saugt ab, verreibt noch einmal mit 96 proz. Alkohol, dann mit absolutem Alkohol und Äther. Die Darstellung bis zum Einbringen in Alkohol muß in 3 Tagen geschehen sein. Über Nacht sind die Kernmassen nicht in Wasser, sondern in der Kochsalzlösung an einem kühlen Ort aufzuheben (Plenge<sup>9</sup>).

<sup>1</sup>) Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 6, S. 543. 1905.

<sup>2</sup>) Abderhalden u. Deetjen: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 51, S. 334. 1907; Bd. 53, S. 280. 1907. — Abderhalden u. Manwaring: desgl. Bd. 55, S. 377. 1908.

<sup>3</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 94, S. 131. 1919.

<sup>4</sup>) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 73, S. 595. 1898.

<sup>5</sup>) Journ. of physiol. Bd. 53, S. 264. 1919.

<sup>6</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 25, S. 65. 1898.

<sup>7</sup>) Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 6, S. 543. 1905.

<sup>8</sup>) Arch. f. Anat. u. Physiol., Physiol. Abt. 1881. S. 387.

<sup>9</sup>) Bei Ackermann: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 43, S. 299. 1904/05.

Über die Untersuchung der Kernmasse, welche im wesentlichen aus Nucleinsäure und Histon besteht, s. Plosz<sup>1)</sup>, Kossel<sup>2)</sup>, Bang<sup>3)</sup>, Ackermann<sup>4)</sup>.

#### 674. Isolierung und Untersuchung der weißen Blutkörperchen (Leukocyten).

Die weißen Blutkörperchen sind spezifisch leichter als die roten. Bei der Senkung im ungerinnbar gemachten Blut lagern sie sich deshalb als dünne weiße Schicht über dem aus roten Blutkörperchen bestehenden Bodensatz ab.

Nach Wacker und Hueck<sup>5)</sup> werden 12 l Pferdeblut in 1,2 l 2proz. Natriumoxalatlösung aufgefangen (jede Gerinnung muß vermieden werden), in 6—8 große Glaszylinder gefüllt und über Nacht in den Eisschrank gestellt. Das Plasma wird vorsichtig abgehebert und dann die grauweiße Schicht der Leukocyten mit der Pipette\*) unter Kontrolle des Auges abgehoben. Die vereinigten Leukocyten werden mit dem klaren Plasma nochmals versetzt, gut durchgerührt und in Glasröhren gefüllt, die eine Länge von mindestens 1 m bei einer lichten Weite von 28 mm haben. Im Eisschrank setzen sich die weißen Blutkörperchen als etwa 10 cm hohe graugelbliche Schicht über den roten Blutkörperchen bis zum nächsten Tage ab. Man hebt sie wieder mit der Pipette ab, wobei man vermeidet, die oberste, meist rein grauweiße Schicht, die fast nur aus Blutplättchen besteht, mit abzuheben. Wäscht und zentrifugiert man jetzt die Leukocyten noch etwa 3—4 mal mit physiologischer Kochsalzlösung, so erhält man schließlich einen rein graugefärbten, pastenartig weichen Brei, der irgendwie nennenswerte Mengen von roten Blutkörperchen nicht aufweist, eher noch einzelne Häufchen von Blutplättchen, die aber der Masse nach kaum die chemische Untersuchung stören dürften. Mancini<sup>6)</sup> setzte der physiologischen Kochsalzlösung beim Waschen noch etwas Oxalat zu, damit der Leukocytenbrei nicht zusammenklumpt. Aus 30 l Pferdeblut erhielt er 30 ccm noch feuchte Leukocyten.

Da es indessen bisher nicht gelang, sie in einer für die Untersuchung nötigen Menge und in hinreichend unverändertem Zustand zu isolieren, hat ihre Zusammensetzung noch nicht festgestellt werden können. Auf jeden Fall enthalten sie Nucleoproteide (Kossel, Mancini), Phosphatide und eine ätherlösliche schwefelhaltige Substanz.

Da die Eiterkörperchen zum allergrößten Teil mit den weißen Blutkörperchen identische Zellen (man faßt sie als ausgewanderte weiße Blutkörperchen auf) darstellen, so können die für jene gewonnenen Resultate (s. „Untersuchung des Eiters“ § 686 ff.) auf die Leukocyten des Blutes übertragen werden.

**Isolierung der Blutplättchen**<sup>7)</sup>. Das Verfahren, welches mit sehr großen Verlusten verbunden ist, beruht auf fraktioniertem Zentrifugieren. Vorschaltwiderstände erforderlich<sup>8)</sup>.

Das Blut wird dem Gefäß entnommen, ohne daß es mit Gewebssaft in Berührung kommt. Die Kanüle muß scharf und innen wie außen paraffiniert sein. Es wird in auf 0° abgekühlten, paraffinierten Gläsern gesammelt. Fluornatrium 1 : 3000, Natriumoxalat oder -citrat 1 : 1000 im Blut aufgelöst, erhöht die Stabilität. Das Blut wird in einer elektrischen Zentrifuge so lange zentrifugiert, bis die roten Blutkörperchen etwa zur Hälfte der Blutsäule herabgedrückt und mit einer feinen weißen Schicht, den Leukocyten, bedeckt sind, die mehr oder weniger Blutplättchen bereits einschließen. Genau läßt sich die Zeit nicht angeben; es ist Sache der Übung, die richtige Zeit zu treffen. Das darüberstehende Plasma, welches mehr oder weniger weißlich getrübt ist, aber auch fast klar sein kann, wird mit paraffinierter Pipette abgehoben, wobei eine etwa 2 cm hohe Schicht auf dem Bodensatz stehen bleibt, in ein gekühltes und paraffiniertes Zentrifugenglas gebracht und nochmals 3—4 Stunden bei einer Umdrehungszahl von etwa 2000 in der Minute oder 30 bis 40 Minuten bei 3200 Umdrehungen zentrifugiert. Der nunmehr erhaltene Bodensatz besteht in

\*) Mit längerem Schlauch und Quetschhahn versehen.

1) Med.-chem. Unters., herausg. von Hoppe-Seyler. Heft 4, S. 461. 1871.

2) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 8, S. 511. 1883/84.

3) Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 5, S. 319. 1904.

4) Bei Ackermann: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 43, S. 299. 1904/05.

5) Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 74, S. 423. 1913.

6) Laboratorium von Hofmeister: Biochem. Zeitschr. Bd. 26, S. 140. 1910.

7) Morawitz: Dtsch. Arch. f. klin. Med. Bd. 79, S. 224. 1904.

8) Dtsch. med. Wochenschr. Bd. 44, S. 1354. 1918.

günstigen Fällen ausschließlich aus Plättchen und macht etwa 1% vom Blutvolumen aus. Er haftet ziemlich fest am Boden und kann durch Behandeln mit physiologischer Kochsalzlösung vom Plasma, wenn auch nicht vollständig, befreit werden.

Die Blutplättchen enthalten Fermente, welche Polypeptide spalten (Abderhalden<sup>1</sup>). Im übrigen sind sie noch nicht untersucht worden.

#### *Nachweis und Bestimmung der einzelnen Bestandteile im Blute.*

675. Die einzelnen Bestandteile des Blutes außer Proteinstoffen werden nach den Angaben des vorigen Abschnittes („Untersuchung von serösen Flüssigkeiten“ § 630ff.) nachgewiesen und bestimmt. Die Bestimmung der Gesamtproteinstoffe geschieht nach § 663. Dabei ist zu bemerken, daß das dem Blutfarbstoff zugehörige Eisenoxyd, welches mit der Asche abgezogen worden ist, wieder hinzuaddiert werden muß. Zu diesem Zweck wird in einer besonderen Portion Blut eine Eisenbestimmung nach § 530 und § 542 ausgeführt. Der Blutfarbstoff wird nach § 676 nachgewiesen und nach § 677 bestimmt, der Fibringehalt nach § 680 ermittelt. Zum Nachweis des Glykogens, welches sich in den weißen Blutkörperchen befindet, verfährt man nach Huppert<sup>2</sup>).

#### *Nachweis des Blutfarbstoffs im Blute.*

676. Der Nachweis geschieht auf spektroskopischem Wege. Bei allmählicher Verdünnung des mit Luft geschüttelten Blutes mit Wasser beobachtet man mit dem Spektroskop die § 426 beschriebenen Erscheinungen und es treten die beiden charakteristischen Streifen des Oxyhämoglobins auf, die erst bei sehr großer Verdünnung verschwinden. Die Umwandlung des Blutfarbstoffs in Hämoglobin, Kohlenoxydhämoglobin, Methämoglobin, die Zersetzung unter Bildung von Hämatin (Hämochromogen) und Hämatoporphyrin läßt sich im Blut ebensogut wie in einer reinen Blutfarbstofflösung bewerkstelligen und bei passender Verdünnung spektroskopisch nachweisen (Spektraltafel).

1. Versetzt man eine verdünnte Blutlösung mit einem Reduktionsmittel, z. B. Schwefelammonium, Stokescher Lösung (Anh.) oder Natriumhydrosulfit, so zeigt sich im Spektrum der Streifen des Hämoglobins (§ 426), der beim Schütteln mit Luft den beiden Streifen des Oxyhämoglobins Platz macht, um bei ruhigem Stehen alsbald wieder zu erscheinen. Beim ruhigen Stehen geht die Umwandlung des Oxyhämoglobins in Hämoglobin auch spontan vor sich.

2. Leitet man durch eine verdünnte Blutlösung Kohlenoxyd (oder Leuchtgas), so erscheint das Spektrum des Kohlenoxydhämoglobins, das auf Zusatz von einem Reduktionsmittel nicht verschwindet (§ 427).

3. Auf Zusatz von einigen Tropfen einer konzentrierten, frisch bereiteten Ferricyankaliumlösung zu einer nicht zu verdünnten Blutlösung erscheint das Spektrum des Methämoglobins (§ 429), das durch ein Reduktionsmittel in das Spektrum des Hämoglobins verwandelt wird; letzteres geht beim Schütteln mit Luft in das Spektrum des Oxyhämoglobins über.

4. Beim Kochen von mit Wasser versetztem Blut mit Natronlauge erkennt man sofort oder nach weiterer Verdünnung mit Wasser das Spektrum des Hämatins (§ 286) in alkalischer Lösung, das auf Zusatz eines Reduktionsmittels in das charakteristische Spektrum des Hämochromogens übergeht (§ 285).

5. Auf tropfenweisen Zusatz von Blut unter Umschütteln zu konzentrierter  $H_2SO_4$  entsteht das Spektrum des Hämatoporphyrins (§ 288).

<sup>1</sup>) Abderhalden u. Deetjen: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 53, S. 280. 1907. — Abderhalden u. Manwaring: desgl. Bd. 55, S. 377. 1908. — Degkwitz: Zeitschr. f. d. ges. exp. Med. Bd. 11, S. 144. 1920.

<sup>2</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 18, S. 151. 1894.

6. Man trägt in auf dem Wasserbade erhitzten Eisessig allmählich unter Umschütteln etwa den 4. Teil seines Volumens Blut ein und erhitzt noch 1 Stunde. Der bis zum nächsten Tage abgeschiedene Bodensatz besteht aus Häminkrystallen (§ 287).

Nachweis in eingetrocknetem Blut.

7. Eine nicht zu verdünnte Lösung von eingetrocknetem Blut zeigt das Spektrum des Methämoglobins (s. 3.). Behandelt man sie nach 4. und nach 5., so erhält man das Spektrum des Hämochromogens und des Hämatoporphyrins.

Teichmannsche Häminprobe.

Aus sehr kleinen Mengen eingetrockneten Blutes lassen sich noch Häminkrystalle (s. 6.) in folgender Weise erhalten: Man verreibt eine kleine (etwa stecknadelkopfgroße) Menge mit einer Spur NaCl auf dem Objektträger, fügt einen Tropfen Eisessig hinzu, legt das Deckglas auf und stellt durch Reiben des Deckglases auf dem Objektträger eine völlig homogene Masse her. Jetzt hält man den Objektträger dicht über eine kleine Flamme, bis der Eisessig eben Blasen wirft (aber nicht länger), ersetzt den verdunsteten Eisessig durch neuen und betrachtet das Präparat mikroskopisch (schmale, braune rhombische Blättchen). Teichmanns Probe zum gerichtlichen Nachweis.

Diese Probe, welche für an der Luft eingetrocknetes, unzersetztes und von anderen Bestandteilen freies Blut sehr zuverlässig ist, kann versagen oder zweifelhaft ausfallen, wenn das Blut bis zur Trockne eingedampft war, wenn das trockene Blut bis auf 140° oder höher erhitzt oder in dünner Schicht längere Zeit dem Sonnenlicht ausgesetzt war, wenn das Eintrocknen bei Gegenwart von Salz- oder Salpetersäure oder von Rost stattgefunden hatte und unter manchen anderen Bedingungen<sup>1)</sup>.

Spektroskopischer Nachweis sehr kleiner Mengen eingetrockneten Blutes.

In diesen Fällen ist der spektroskopische Nachweis zu versuchen und zu dem Zweck ein wässriger Auszug a) des zu untersuchenden Materials herzustellen. Ist derselbe nicht gefärbt, so löst man in Alkali b).

a) Ist die Menge des eingetrockneten Blutes keine zu geringe, so extrahiert man mit wenig Wasser, filtriert durch ein kleines Filter und untersucht spektroskopisch, ob das Spektrum des Methämoglobins sichtbar und ob die Umwandlung in Hämoglobin und Oxyhämoglobin (vgl. 3) und die weitere Umwandlung in Hämochromogen (durch Zufügen eines Tropfens starker Natronlauge und Stehenlassen oder mäßiges Erwärmen und Zusatz von Schwefelammonium, vgl. 4) gelingt. Bei Anwesenheit von sehr wenig Material bringt man die zu untersuchende Substanz in die Vertiefung eines hohlgeschliffenen Objektträgers, fügt ein wenig Wasser hinzu, umzieht die Vertiefung mit Vaseline und legt ein Deckglas auf. Der geschlossene Raum soll gar keine oder nur wenig Luft enthalten. Wenn jetzt bei der spektroskopischen Prüfung des auf weißem Papier liegenden Präparates das Methämoglobinspektrum nicht deutlich zu erkennen ist, so überläßt man es längere Zeit bei warmer Temperatur der Fäulnis und prüft dann, ob das Spektrum des Hämoglobins und nach Lüftung des Deckglases das Spektrum des Oxyhämoglobins sichtbar ist, ferner auch, ob auf Zufügen kleiner Mengen Natronlauge und Schwefelammonium bei wieder aufgelegtem Deckglas nach einiger Zeit das Spektrum des Hämochromogens entsteht. Die Untersuchung auf weißem Untergrunde ist oft weniger zweckmäßig als diejenige auf dem Tisch des Mikroskopes, wenn das Objekt von unten her mittels des Spiegels hell beleuchtet und (nach Entfernung von Tubus mit Okular und Objektiven) von oben mit dem Browningschen Spektroskop (S. 18) betrachtet wird.

b) Tritt mit Wasser keine Lösung von Farbstoff ein, so behandelt man mit verdünnter Natronlauge. Die rote, in dünner Schicht grüne Flüssigkeit wird auf Zusatz von Schwefelammonium bald schön hellrot und zeigt das Spektrum des Hämochromogens. Dasselbe verschwindet beim kurzen Schütteln mit Luft und erscheint beim ruhigen Stehen wieder.

#### *Bestimmung des Blutfarbstoffs im Blute.*

Die quantitative Bestimmung benutzt entweder die Färbekraft und kann auf spektroskopischem und colorimetrischem Wege ausgeführt werden, oder sie benutzt das Sauerstoffbindungsvermögen des Hämoglobins (§ 679).

<sup>1)</sup> Vgl. Lewin u. Rosenstein: Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. Bd. 142, S. 134. 1895.

1. **Spektroskopische Bestimmung.** Zuerst von Vierordt angewendet. Sie geschieht am besten mit dem Spektrophotometer von Hüfner<sup>1)</sup> \*) oder in noch bequemerer Weise<sup>2)</sup> mit dem Spektralphotometer von König-Martens<sup>3)</sup> \*).

### 677. Colorimetrische Bestimmung.

**Prinzip.** Eine passend verdünnte wässrige Lösung krystallisierten Blutfarbstoffs von bekanntem Gehalt wird in geeigneter Dicke der Schicht mit der zu untersuchenden Flüssigkeit von derselben Schichtdicke colorimetrisch verglichen und eine der Flüssigkeiten so lange mit gemessenen Mengen Wasser verdünnt, bis beide die gleiche Farbenintensität zeigen. Für die Genauigkeit dieser Vergleichung ist es von großer Bedeutung, daß beide Lösungen unmittelbar nebeneinander gesehen werden. Dieses ist erreicht in den beiden Instrumenten von Hoppe - Seyler<sup>4)</sup> \*).

**Erforderliche Apparate und Lösungen.** 1. Hoppe - Seylers colorimetrische Doppelpipette oder Hoppe - Seylers colorimetrische Doppelpipette mit Albrechtschem Glaswürfel. 2. Eine Normlösung von Kohlenoxydhämoglobin. Die Apparate und die Herstellung der Lösung werden im folgenden beschrieben.

a) Hoppe - Seylers colorimetrische Doppelpipette. Abb. 31 stellt sie etwas von der Seite gesehen, Abb. 32 gerade von vorn dar, zwischen beiden eine Durchschnittsskizze\*).

Sie besteht im wesentlichen aus zwei Kammern, einer rechten und einer linken, deren lichte Weite (von vorn nach hinten) 5 mm beträgt. Die Kammer der einen Seite liegt hinter, die der anderen Seite vor einem Glaskörper von 5 mm Dicke (s. die mittlere Abbildung). Die Begrenzung der Kammern nach vorn und hinten geschieht durch drei planparallele, geschliffene und polierte Glasplatten, von denen die mittlere beiden Kammern gemeinsam ist, die Begrenzung nach der einen Seite durch den Glaskörper, nach der anderen Seite und nach oben und unten durch zwei Messingrahmen, welche mittels Schrauben und Muttern die Glasplatten und Glaskörper aneinanderdrücken. In jede Kammer mündet oben und unten je ein Rohr, über welche Kautschuckschläuche gezogen sind. Die unteren engen Schläuche sind mit den Gläschen *a, a* verbunden, welche in am Apparat befestigte Ringe eingehängt werden können (Abb. 31 und 32). Die ganze Pipette ist an einem Stativ angebracht. Die beschriebene Einrichtung bringt es mit sich, daß zwei in den Kammern befindliche Flüssigkeiten nebeneinander, nur durch eine feine Linie voneinander getrennt, gesehen werden.

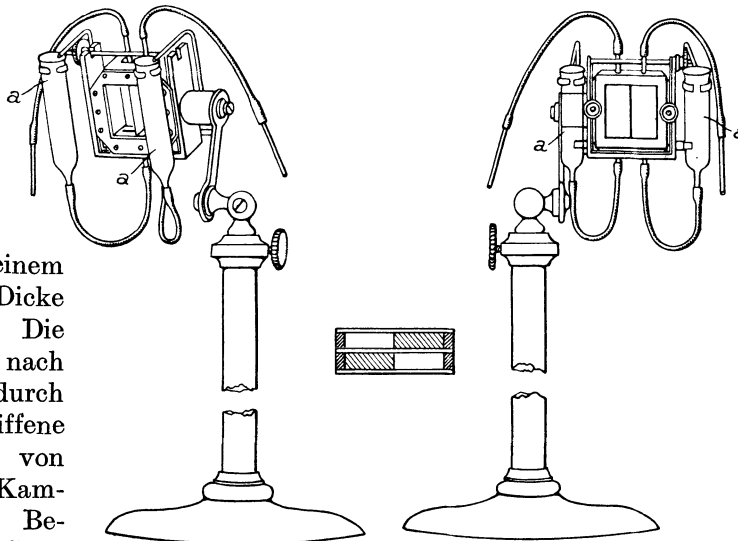


Abb. 31. Abb. 32.  
Hoppe-Seylers colorimetrische Doppelpipette.

\*) Die Apparate von Hüfner und Hoppe - Seyler sind ausgeführt und werden angefertigt von Universitätsmechaniker Albrecht Nachf. in Tübingen, der Apparat von König - Martens durch die Fa. Schmidt u. Haensch, Berlin S., Prinzessinnenstr. 16.

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physikal. Chem. Bd. 3, S. 562. 1889. — E. Albrecht: Anleitung zum Gebrauch des Hüfnerschen Spektrophotometers. Tübingen 1892; s. die neueste Beschreibung von Bürker in Tigerstedts Handb. d. physiol. Methodik Bd. II u. Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 142, S. 273. 1911.

<sup>2)</sup> Hari: Biochem. Zeitschr. Bd. 95, S. 266. 1919; Bd. 103, S. 271. 1920.

<sup>3)</sup> Verhandl. d. dtsh. physikal. Ges. Bd. 1. 1899. — Martens u. Grünbaum: Ann. d. Physik Bd. 12, S. 984. 1903.

<sup>4)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 16, S. 505. 1892. — G. Hoppe - Seyler: desgl. Bd. 21, S. 461. 1896. — H. Winternitz: desgl. Bd. 21, S. 468. 1896.

Colorimetrische  
Doppelpipette mit  
Albrechtschem  
Würfel.

b) Hoppe-Seylers colorimetrische Doppelpipette mit Albrechtschem Würfel. Dieser Apparat besteht aus einer Kombination einer Doppelpipette (Abb. 33, 3) mit dem Albrechtschen Würfel (Abb. 33, 2), einem Kollimator- und Fernrohr. Abb. 33, 1 stellt einen Vertikalschnitt des ganzen Instrumentes in  $\frac{1}{4}$  natürlicher Größe, Abb. 33, 3 die Doppelpipette und Abb. 33, 2 den Albrechtschen Würfel in halber Größe dar.

Das Fernrohr *F* und das Kollimatorrohr *C* sind in messingener Hülse so verschraubt, daß sie ein gerades Rohr darstellen; dies Rohr ist auf einem starken gußeisernen Dreifuß montiert und um eine horizontale und eine vertikale Achse drehbar. Am Kollimatorrohr ist in einem geschwärzten messingenen Gehäuse ein auf 4 Seiten geschliffener Glaswürfel *G* (Abb. 33, 2) so befestigt, daß zwei diagonal gegenüberliegende Kanten desselben in der optischen Achse des Fernrohrs stehen und daß die dem Fernrohr zugekehrte Kante zugleich in der Brennweite der Kollimatorlinse liegt.

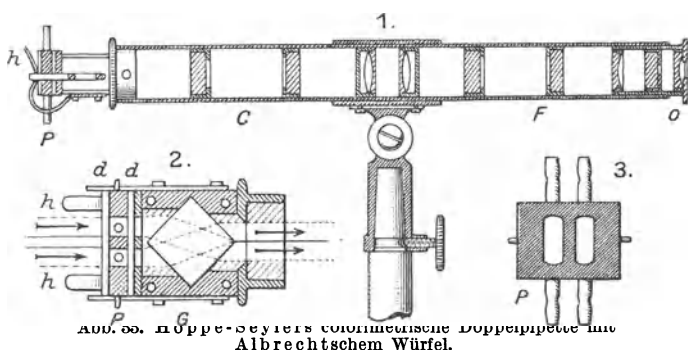


Abb. 33. Hoppe-Seylers colorimetrische Doppelpipette mit Albrechtschem Würfel.

Die Doppelpipette *P* ist aus einem rechteckigen, 5 mm dicken Messingstück hergestellt. Die eingeborenten Kammern sind durch einen 3,5 mm breiten Steg voneinander getrennt; in jede dieser Kammern münden

zwei Schlauchansätze (Abb. 33, 3). Mit den unteren Ansatzstücken sind durch Gummischläuche Glasröhrchen verbunden; dieselben fehlen in der Abbildung, ihre Anordnung ist aber aus Abb. 31 und 32 ersichtlich. Das Gehäuse des Flintglaswürfels *G* ist nach vorn mit einer genau eben geschliffenen Flansche abgeschlossen, in welcher sich zwei den Kammern der Doppelpipette entsprechende Öffnungen befinden. Vor dieser Flansche wird die mit zwei planparallelen Gläsern *dd* (Abb. 33, 2) bedeckte Pipette mit den Federn *hh* angeklemt und zugleich durch die am Würfelgehäuse angeschraubten messingenen Lamellen derart fixiert, daß sich die Kammern der Doppelpipette und die Öffnungen in der Flansche genau decken. Das Licht, welches durch die beiden 3,5 mm voneinander entfernten Kammern der Pipette einfällt, wird von dem Glaswürfel *G*, wie aus Abb. 33, 2 ersichtlich, so gebrochen, daß die Kante des Glaswürfels die Grenzen der beiden Kammern bildet. Das Okular *o* des Fernrohrs *F* ist mit einer Blendung mit quadratischer Öffnung abgeblendet. Wird nun das Fernrohr scharf auf die Kante des Würfels eingestellt, so erscheint das Quadrat der Okularblendung durch eine feine Linie in zwei oblonge Hälften geteilt. Das Fernrohr kehrt die vom Glaswürfel gewendeten Bilder der Pipettenkammern wieder um und es entspricht nun die rechte Hälfte des Okularquadrats dem Lichte, welches durch die rechte Kammer der Pipette eingefallen ist und die linke Hälfte dem Lichte der linken Kammer.

Da die beiden Hälften des Okularquadrats, wie bereits bemerkt, scharf zusammenstoßen, so ist eine außerordentlich genaue Vergleichung der Intensität des Lichtes, welches durch die beiden mit Farbstofflösungen gefüllten Kammern der Doppelpipette eingefallen ist, möglich.

Nach der Benutzung wird die Pipette vom Apparat entfernt, zerlegt, gereinigt und wieder eingeklemmt, um den Glaswürfel vor Staub zu schützen.



Herstellung der Normallösung. Man bereitet eine konzentrierte wässrige Lösung der nach § 424 gewonnenen Oxyhämoglobinkristalle, sättigt sie mit Kohlenoxyd und bestimmt in einigen Portionen von 15—20 ccm durch Abdampfen, Trocknen und Wägen des Rückstandes den Prozentgehalt an Blutfarbstoff. Von dieser Flüssigkeit bringt man in eine Reihe von auf der einen Seite ausgezogenen und zugeschmolzenen Glasröhren ungefähr je 6 ccm ein, leitet nochmals Kohlenoxyd durch und schmilzt zu. Der Inhalt dieser Röhren hält sich beliebig lange unverändert. Für einen Versuch öffnet man eine Röhre, gießt die Flüssigkeit aus, mißt sie und verdünnt sie mit gemessener Menge kohlenoxydhaltigen Wassers so weit, daß eine 0,2—0,3proz. Lösung von genau bekanntem Gehalt an Blutfarbstoff entsteht. Bei Benutzung der Doppelpipette mit Albrechtschem Würfel stellt man wegen der Vergrößerung durch die Linsenkombinationen zweckmäßig eine 0,25—0,32proz. Lösung her. Eine solche Normallösung reicht für zahlreiche Bestimmungen aus, ist aber nicht gut haltbar.

Herstellung der Normallösung.

Ausführung. Man bringt in ein mit eingeriebenem Stopfen versehenes 10-ccm-Maßkölbchen zunächst 1—2 ccm einer schwach alkalischen Salzlösung (z. B. 5proz. Kochsalzlösung, die auf 100 ccm etwa 5 Tropfen einer  $\frac{1}{10}$ -Natronlauge enthält), wägt, fügt mit einer Pipette mehrere Tropfen des zu untersuchenden Blutes hinzu, verschließt mit dem Stopfen und mischt gut durch leises Schwenken des Kölbchens. Nachdem man jetzt abermals gewogen hat, um das Gewicht des zugesetzten Blutes zu erfahren, füllt man bis zur Marke mit destilliertem Wasser auf, mischt gut, leitet Kohlenoxyd ein und filtriert. Steht nur sehr wenig Blut zur Verfügung, z. B. aus einer Wunde am Finger, so nimmt man dasselbe mit graduiertem Capillarrohr auf, mißt es hierin (0,04 bis 0,06 ccm), bläst es in ein entsprechend kleines Maßkölbchen ein, spült mit Wasser nach und verfährt wie oben angegeben. Jetzt kann man zur colorimetrischen Vergleichung übergehen.

Ausführung der Bestimmung.

Nachdem der Apparat so aufgestellt ist, daß das von einer ebenen, matten, weißen Papierfläche reflektierte Tageslicht in ihn hineinfällt, bringt man in das eine der Glasröhrchen *aa* (Abb. 31 und Abb. 32) die Normallösung, in das andere mit einer Pipette 2 ccm der zu bestimmenden Lösung, läßt die Flüssigkeiten durch Heben der Glasröhrchen in die Kammern eintreten und vergleicht die Farbenintensität. Ist nun die Blutlösung dunkler gefärbt als die Normallösung (so soll es sein), so fügt man aus einer in  $\frac{1}{10}$  ccm geteilten Bürette eine kleine gemessene Menge Wasser, welches vorher in einer Flasche mit Kohlenoxyd geschüttelt wurde, hinzu, bewirkt durch wiederholtes Senken und Heben des Gläschens eine völlige Mischung der Flüssigkeit und vergleicht die Farbe mit der Normallösung. Ist die Lösung noch zu dunkel gefärbt, so fügt man aufs neue kohlenoxydhaltiges Wasser aus der Bürette hinzu, mischt, vergleicht und setzt das so lange fort, bis gleiche Farbenhelligkeit der Blut- und Normallösung erreicht ist. Glaubt man an diesem Punkt angekommen zu sein, so tut man gut, ihn durch Zusatz von 1—2 weiteren Wassertropfen nach der anderen Richtung zu überschreiten und durch Eintritt einer Differenz in der Intensität der Färbungen beider Lösungen die Richtigkeit der Beobachtung zu kontrollieren. Nun wird abgelesen, wieviel Wasser zur abgemessenen Blutlösung zugesetzt worden ist.

Berechnung. Ist  $p$  das Gewicht der Blutportion,  $c$  der Prozentgehalt der verdünnten Normallösung an Blutfarbstoff,  $v$  das Volumen, zu welchem  $p$  verdünnt werden mußte, um gleiche Intensität der Färbung zu erreichen, so ist der Prozentgehalt des Blutes an Blutfarbstoff =  $\frac{v \cdot c}{p}$ .

Steht nur sehr wenig Blut zur Verfügung und ist dasselbe sehr arm an roten Blutkörperchen, so kann der Fall eintreten, daß die Verdünnung des Blutes bereits zu stark geworden ist und bei der Vergleichung in der Doppelpipette die Blutlösung heller erscheint als die verdünnte Normallösung. In diesem Falle wird eine Portion der letzteren abgemessen, mit kleinen gemessenen Mengen Wasser allmählich weiter verdünnt, bis bei der Vergleichung in der Doppelpipette die Farbenintensität derjenigen des verdünnten Blutes gleich geworden ist. Aus der stattgefundenen Verdünnung berechnet man dann den Prozentgehalt dieser weiter verdünnten Normallösung an Kohlenoxydhämoglobin und dann in der obigen Weise den Gehalt des Blutes an diesem Farbstoff.

Die colorimetrische Doppelpipette liefert gute Resultate; sie leistet alles, was ein colorimetrisches Verfahren überhaupt zu leisten vermag.

678. **Einfachere colorimetrische Verfahren.** Sie leiden sämtlich daran, daß eine Testlösung von bekanntem Gehalt an Farbstoff nicht leicht zu beschaffen ist. Der Ersatz durch gefärbte Gläser oder Lösungen anderer Farbstoffe bringt den großen Nachteil mit sich, daß meist keine völlige Farbgleichheit und große Ähnlichkeit nur in einem kleinen Bereich der Skala erzielt ist. Außerdem geht die Gleichheit bei einem Wechsel in der Beleuchtung wieder verloren. Für klinische Zwecke sind jedoch die Methoden genau genug (2—5% Fehler). Es kommt hinzu, daß man hier nicht so sehr Angaben über die absolute Menge des Blutes an Hämoglobin zu haben wünscht, als eine quantitative Angabe über die Abweichung von der Norm, die ja physiologischerweise nicht so unveränderlich ist, wie man anfangs geglaubt hat, sondern je nach Höhenlage des Ortes, nach Geschlecht, Rasse verschieden und Schwankungen um 20% in den Bereich des Normalen fallen. Man hilft sich in der Weise, daß man Blut anscheinend völlig Gesunder, das mehr als 5 Millionen rote Blutkörperchen im Kubikmillimeter enthält, die mikroskopisch völlig normal sind und ein normales Volumen besitzen (aus dem Viscositätswert erschlossen), als Testlösung benutzt und damit die Skala seines Häometers auf „normal“ eicht<sup>1)</sup>. Bürker<sup>2)</sup> empfiehlt, die dem Apparat beigegebene Standardlösung (z. B. salzsaures Hämatin) nach § 677 auf absolute Hämoglobinwerte zu eichen.

Apparat von  
Fleischl-  
Miescher

a) Der Apparat von Fleischl-Miescher<sup>3)</sup>.

Das Prinzip des Apparates ist folgendes: In der einen Hälfte einer durch eine senkrechte Scheidewand geteilten Kammer befindet sich eine Blutlösung von bekannter Verdünnung, in der anderen destilliertes Wasser. Unter dem Wasser wird ein Keil von Rubinglas verschoben, bis bei der Betrachtung von oben nach unten Farbgleichheit erreicht ist. An einer Skala kann der Blutfarbstoff abgelesen werden.

Die Schwierigkeit besteht darin, daß eine völlige Farbenübereinstimmung beim Vergleich mit dem Rubinglaskeil nicht immer zu erreichen ist. Es darf weder Tageslicht noch das einer elektrischen oder Gasglühlichtlampe verwendet werden, sondern von violetten Strahlen freies Petroleumlicht.

b) Ein ähnlich gebautes Instrument gibt Newcomer<sup>4)</sup> an. Er macht eine saure Hämatinlösung aus dem Blut und vergleicht gegen ein hochdurchlässiges gelbes Signalglas.

Sahlis Hämometer.

c) Sahlis Hämometer. Der Blutfarbstoff wird ebenfalls durch Salzsäure in Hämatin übergeführt; als Vergleichslösung dient eine Lösung bzw. Aufschwemmung von salzsaurem Hämatin in Glycerin. Die seit 1910 im Handel

<sup>1)</sup> S. z. B. v. Domarus: Methodik der Blutuntersuchung. Berlin: Julius Springer 1921 u. Naegeli: Blutkrankheiten und Blutdiagnostik. 4. Aufl. Berlin: Julius Springer 1923.

<sup>2)</sup> Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 142, S. 273. 1911.

<sup>3)</sup> Veillon: Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 39, S. 385. 1897.

<sup>4)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 37, S. 465. 1919.

befindliche Standardlösung ist (nach Bürker<sup>1)</sup>, im Dunkeln aufbewahrt, haltbar und entspricht einem Hämoglobingehalt von 17,3 g in 100 ccm Blut. Ob alle im Handel befindlichen Testlösungen dem gleichen Wert entsprechen, ist nicht untersucht worden. Vor Gebrauch muß das Teströhrchen vorsichtig geschüttelt werden. Die Braunfärbung beim Zusatz von Salzsäure zum Blut nimmt allmählich an Stärke zu; es wird daher vorgeschlagen, dies Gemisch 10 Minuten lang auf 30 bis höchstens 60° zu erwärmen. Dann ist Konstanz erreicht. Die Farbtiefe ist um etwa 20% größer als bei der gewöhnlichen Handhabung<sup>2)</sup>. Fehlergrenze 3—5% nach Bürker.

d) Colorimeter von Autenrieth-Königsberger. Über die Handhabung des Apparates und die ihm beigegebene Beschreibung s. § 29. Zum Vergleich dient die Lösung eines unbekanntes Farbstoffs. Das Nachdunkeln des Blutes stört hier stärker (Staeubli); da der Apparat aber rasches und genaues Arbeiten gestattet, hat er viel Anklang gefunden. Da ihm leere Glaskeile zur Selbstfüllung mitgegeben werden, kann man als Vergleichsflüssigkeit eine selbstbereitete salzsaure Hämatinlösung einfüllen. Doch ist dieses so schwer löslich, daß die Lösung sich nach einiger Zeit trübt. Palmer<sup>3)</sup> schlägt vor, nach Hoppe-Seylers und Haldanes Vorgang CO-Hämoglobin zum Vergleich zu benutzen. Fehlergrenze 1%.

Colorimeter von  
Autenrieth-  
Königsberger.

e) Eintauchcolorimeter von Bürker (§ 29). Das Blut wird durch Zusatz einiger Körnchen von Natriumhydrosulfit reduziert<sup>4)</sup>. Zum Vergleich dient eine haltbare Lösung von reduziertem Hämoglobin.

#### *Bestimmung des Sauerstoffbindungsvermögens des Blutes.*

679. Wenn es auch unwahrscheinlich ist, daß die verschiedenen Tierarten alle ein und dasselbe Hämoglobin besitzen (S. 519), so besteht doch entgegen der Auffassung Bohrs<sup>5)</sup> heute darüber eine Meinung, daß eine konstante Beziehung zwischen der Lichtextinktion, dem Gasbindungsvermögen und dem Eisengehalt des Blutfarbstoffs besteht und daß diese Verhältnisse für die verschiedenen Hämoglobine gleich sind<sup>6)</sup>. Dies entspricht der heute gültigen chemischen Auffassung, wonach die Farbstoffkomponente aller Hämoglobine sicher identisch ist. Das Sauerstoffbindungsvermögen von Hämoglobin ist allerdings von Menge und Art der Elektrolyte in der Lösung abhängig<sup>7)</sup> und insofern für verschiedene Blutarten nicht ganz gleich. Die Berechnung des Hämoglobingehaltes aus der Sauerstoffkapazität erfolgt auf Grund der Beobachtung, daß 1 g Hämoglobin bindet oder Oxyhämoglobin freigibt 1,34 ccm O<sub>2</sub> bei 0° und 760 mm. Blut, das für 100 ccm 18,5 ccm O<sub>2</sub> bindet, also 13,8 g Hämoglobin enthält, gilt nach Haldane als „normal“ oder 100 proz. Volumprozent O<sub>2</sub> multipliziert mit 0,746 ergibt den Gehalt an Hämoglobin.

<sup>1)</sup> Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 142, S. 273. 1911. Münch. med. Wochenschr. 1912, S. 14.

<sup>2)</sup> Staeubli: Münch. med. Wochenschr. 1911, S. 2429. — Komiya u. Katakura: Dtsch. med. Wochenschr. Bd. 48, S. 591. 1922. — Dunger: Münch. med. Wochenschr. 1918, S. 1142; 1919, S. 622. — Scholl: desgl. 1919, S. 214.

<sup>3)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 33, S. 119. 1918.

<sup>4)</sup> Zeitschr. f. angew. Chem. 1923, Heft 59, S. 427. Münch. med. Wochenschr. 1921, S. 571.

<sup>5)</sup> Nagels Handb. d. Physiol. Bd. I, S. 97. 1909. — Bornstein u. Müller: Arch. f. [Anat. u.] Physiol. 1907.

<sup>6)</sup> Hüfner: Arch. f. [Anat. u.] Physiol. 1894, S. 130; 1903, S. 217. — Butterfield: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 62, S. 173, 204ff. 1909. — Haldane u. Smith: Journ. of physiol. Bd. 25, S. 331. 1900; Bd. 26, S. 497. 1901. — Morawitz u. Röhmer: Dtsch. Arch. f. klin. Med. Bd. 94, S. 529. 1908. — Masing: desgl. Bd. 98, S. 122. 1910. — Masing u. Siebeck: desgl. Bd. 99, S. 130. 1910.

<sup>7)</sup> Barcroft u. Camis: Journ. of physiol. Bd. 39, S. 118. 1909.

a) **Apparat von Barcroft-Haldane.** Die Bestimmung beruht auf der — im einzelnen nicht bekannten — Überführung von Oxyhämoglobin durch Ferricyankali in ammoniakalischer Lösung in Methämoglobin; der dabei entwickelte Sauerstoff wird an der Druckzunahme im Apparat gemessen. Fehler durch Änderung in der Temperatur vermeidet der Differentialapparat Barcrofts. Diese neueste Form ist von Straub mit ausführlicher Gebrauchsanweisung an leicht zugänglicher Stelle<sup>1)</sup> beschrieben worden. Die Methode beansprucht nur 0,1—1,0 ccm Blut und ist im allgemeinen fast ebenso genau wie diejenigen

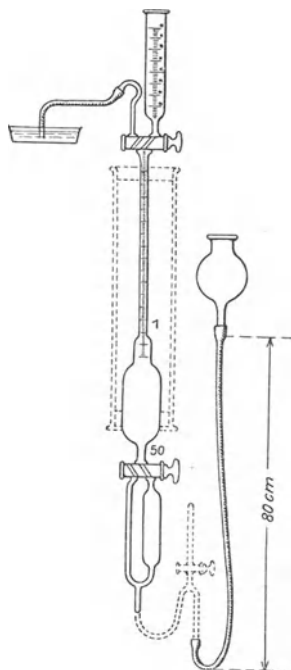


Abb. 34. Apparat zur Bestimmung des Sauerstoffbindungsvermögens nach van Slyke.

Methoden, bei denen die Blutgase ausgepumpt und analysiert werden. Gelegentlich kommen auch in ganz frischem Blut noch andere sauerstoffgebende Substanzen vor. Zum Teil ist das Ammoniak daran schuld<sup>2)</sup>; es wird durch Wasser ersetzt; außerdem kann man sich, allerdings nur unvollkommen, helfen, indem man das Blut mit reinem sauerstofffreien Kohlenoxyd sättigt und dieses wieder austreibt und mißt.

b) **Apparat von van Slyke**<sup>3)</sup>. (Abb. 34.)

Prinzip. Im Toricellischen Vakuum über Quecksilber wird mit wenig Ferricyanid das durch Wasser lackfarben gemachte Blut entgast; die Gasmenge wird gemessen, von CO<sub>2</sub> befreit, und die Sauerstoffmenge nach Abrechnung einer Korrektur für den N<sub>2</sub>-Gehalt des Blutes sowie die im Blut und Reagensgemisch gelöst bleibende Gasmenge errechnet oder auch durch Absorption mit Pyrogallol bestimmt. Bei sehr kleinen Gas Mengen wird ihr Volumen vergrößert, indem durch Senken der Birne ein Unterdruck von 500 mm gegenüber dem Atmosphärendruck hergestellt wird. Der Grad der Drucksenkung wird eingestellt durch einen (in der Abbildung nicht eingezeichneten) in dem Quecksilber der Birne schwimmenden Stab.

1. Vorbereiten des Apparates und seine Füllung. Durch wiederholtes Senken und Heben der Birne bei entsprechend gestellten Hähnen und Schütteln wird der Apparat luftfrei gemacht. Die Luft wird durch die obere Capillare, die in eine Wanne unter Quecksilber mündet, entfernt. Gas, das an der Wand der Gummischläuche hartnäckig haftet und sich vielleicht löst, sammelt sich am Dreiweghahn und kann nicht in den Apparat gelangen.

Ist der Apparat gasfrei, so werden durch die Bürette 6 ccm ausgekochtes destilliertes Wasser, dann 0,3 ccm einer 1 proz. Lösung von Saponin (Merck) und 2—3 Tropfen sekundärer Octylalkohol (Kahlbaum I) einlaufen gelassen (letztere bleiben als Dichtung in der capillaren Hahnbohrung), und wiederum die gelösten Gase aus der Füllung entfernt. Dann wird die Füllung in die Bürette gedrückt und das mit O<sub>2</sub> gesättigte Blut (2 ccm) eingefüllt. Aus einer Pipette mit zwei Marken (die untere muß mindestens so weit von der Spitze entfernt sein, als die Bürette des Apparates lang ist), deren Spitze man in die Nähe der Hahnbohrung hält, läßt man es unter die Füllung einlaufen, wobei mit der rechten Hand der Hahn so gestellt wird, daß das Blut sofort in den Apparat gesaugt wird. Die Blutreste wäscht die Büettenfüllung noch vollständig nach. Bevor die letzten

<sup>1)</sup> Handb. d. biolog. Arbeitsmethoden, herausg. v. Abderhalden, Abt. IV, Teil 10, S. 213. 1920; vgl. auch Siebeck: Handb. d. biochem. Arbeitsmethod., herausg. v. Abderhalden, Bd. 8, S. 12. 1914.

<sup>2)</sup> Butterfield: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 62, S. 205. 1909. — van Slyke u. Stadie: Journ. of biol. chem. Bd. 49, S. 11. 1921.

<sup>3)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 30, S. 289, 347, 362. 1917; Bd. 33, S. 127. 1918. Die Beschreibung entspricht der neuesten Form von van Slyke u. Stadie: Journ. of biol. Chem. Bd. 49, S. 1. 1921; zu beziehen von der Fa. Rob. Goetze, Leipzig, Nürnbergerstr. 56.

Reste davon eingelaufen sind, gibt man 0,12 ccm einer 20proz. Lösung von Ferricyankali\*) zu. Die Hahnbohrung zur Bürette wird mit etwas Quecksilber abgedichtet.

2. Ausführung der Bestimmung. Senken der Birne, bis nur noch wenige Tropfen Hg in der Gasbürette; Schütteln. War das Blut vor Zusatz von Ferricyankali bereits lackfarben geworden, so genügen 3 Minuten, um die Gase zu entbinden und die Atmosphäre mit der Flüssigkeit ins Gleichgewicht zu setzen. Wiederholung der Prozedur, um durch Messen der gesamten Gase die Vollständigkeit der Entbindung von O<sub>2</sub> zu prüfen, geht hier nicht an, da aus der nicht alkalisierten Blutlösung langsam CO<sub>2</sub> abdissoziiert. Man unterbricht das Vakuum durch Heben der Birne und Drehen des unteren Hahnes. Im allgemeinen werden sich jetzt 0,5 ccm O<sub>2</sub>, 0,015 ccm N<sub>2</sub> und 0,2 ccm CO<sub>2</sub> (etwa  $\frac{1}{5}$  der vorhandenen CO<sub>2</sub>) angesammelt haben. Jetzt läßt man bei ganz geringem Unterdruck 0,5 ccm einer  $\frac{n}{2}$ -Natronlauge einlaufen, um die Kohlensäure zu binden (2 Minuten). Bleibt Flüssigkeit im obersten capillaren Ende der Gasbürette, so spült man sie durch einen Tropfen Hg hinunter. Das Gasvolumen wird bei Atmosphärendruck gemessen. Wenn gewünscht, kann eine direkte Bestimmung des Sauerstoffs durch Pyrogallol angeschlossen werden<sup>1)</sup>. Man läßt ein wenig der alkalischen Pyrogallollösung\*\*), die unter Paraffinöl aufgehoben ist und auch in der Bürette mit Paraffinöl bedeckt wird, bei leichtem Unterdruck einlaufen. Absorption nach etwa einer Minute vollständig. Um die Ablesung zu erleichtern, wird die dunkle Lösung mit etwas Wasser oder Octylalkohol von der Wand abgespült.

3. Berechnung. Vom Gesamtvolumen sind abzuziehen der im Blut physikalisch gelöst gewesene N<sub>2</sub>. Er beträgt im Venenblut  $1,36 \pm 0,11$  Vol.-%, im mit Luft geschüttelten Blut  $1,52 \pm 0,2$  Vol.-% bei 20°. Außerdem sind 0,59 Vol.-% abzuziehen für den bei 20° physikalisch gelöst gewesenen Sauerstoff.

Bemerkungen. Das unter entsprechenden Vorsichtsmaßregeln dem Körper entnommene Blut kann natürlich auch direkt analysiert und so der Sättigungsgrad des Blutes mit Sauerstoff bestimmt werden. Kohlenoxyd wird ebenfalls mit Ferricyankali ausgetrieben und kann nach Absorption des O<sub>2</sub> und Korrektur für N<sub>2</sub> gemessen werden<sup>1)</sup>.

Zur Bestimmung des Gehaltes an CO<sub>2</sub> — gebunden an Alkali und die Proteine — oder des Alkalibindungsvermögens nach Sättigung des Blutes mit CO<sub>2</sub>, Ausführung der Bestimmung im Plasma (s. S. 800), dient der gleiche Apparat. Man läßt zum Plasma 5proz. Schwefelsäure zufließen. Für Vollblut eignet sich besser aufs 10fache verdünnte konzentrierte käufliche Milchsäure (D 1,20), da sie die Proteine nicht ausfallen läßt. Entbinden der Gase durch Schütteln, nachdem das Quecksilber bis zur Marke 50 ccm heruntergelassen ist. Dann Entfernen des Quecksilbers und beinahe der ganzen Blutlösung (ohne Gasverlust!) aus der Gasbürette. Aufheben des Vakuums durch Nachfließenlassen von Quecksilber bei umgestelltem unteren Hahn. Bindung der CO<sub>2</sub> durch  $\frac{n}{2}$ -Natronlauge.

Van Slyke<sup>2)</sup> benutzt die gleiche Blutprobe für beide Bestimmungen; er beginnt dann mit der CO<sub>2</sub>-Bestimmung, mißt das Gas aber über der nicht alkalischen, ferricyankalihaltigen Blutlösung. Von dieser wird CO<sub>2</sub> wieder verhältnismäßig rasch gelöst; er rechnet dafür zur gefundenen CO<sub>2</sub> 1,7% hinzu.

\*) Die Lösung ist durch Evakuieren leicht gasfrei zu machen; sie wird in einer Bürette unter Paraffin aufgehoben.

\*\*) 10 g Pyrogallol + 160 g Kaliumhydroxyd + 130 ccm Wasser.

<sup>1)</sup> Van Slyke u. Salvesen: Journ. of biol. chem. Bd. 40, S. 104. 1919.

<sup>2)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 49, S. 33. 1921.

*Bestimmung des Fibringehaltes im Blute oder Plasma.*

680. Für diesen Zweck benutzt man mit Vorteil ein kleines Becherglas, welches mit einer Kautschukkappe geschlossen ist (Abb. 35). Durch einen kleinen Röhrenansatz in der Mitte dieser Kappe steckt man den Stiel eines ruderförmigen Fischbeinstäbchens, so daß bei aufgesetzter Kappe der untere breite Teil desselben fast den Boden des Becherglases berührt.

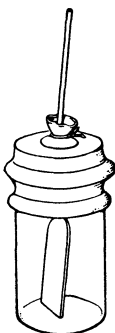


Abb. 35.  
Apparat  
zur Bestim-  
mung des  
Fibrin-  
gehaltes.

Man wägt den so vorbereiteten und getrockneten Apparat, nimmt den Kautschuküberzug ab, fängt eine Portion von 10—40 ccm des zu untersuchenden Blutes darin unmittelbar aus der Ader auf (zur Bestimmung im Plasma hebt man die entsprechende Portion aus dem im Eis stehenden Plasma mit einer Pipette hinein), zieht die Kautschukkappe über, schlägt nun das Blut etwa 10 Minuten lang und wägt nach dem völligen Erkalten. Man ist auf diese Weise imstande, das Schlagen des Blutes ohne Verlust durch Verdunstung auszuführen. Nachdem das Gewicht des Blutes ermittelt ist, hebt man den Kautschuküberzug ab, füllt das Becherglas fast ganz mit Wasser, rührt stark um und läßt das Fibrin sich absetzen; die ziemlich klare Flüssigkeit wird darauf in ein anderes Becherglas abgegossen und die Behandlung mit Wasser wiederholt. Das Fibrin wird dann mit einer neuen Portion Wasser, dem einige Tropfen Kochsalzlösung zugesetzt sind, auf ein kleines gewogenes Filter gebracht und mit reinem Wasser so lange ausgewaschen, bis die ablaufende Flüssigkeit völlig farblos und das Fibrin selbst höchstens hellrosarot gefärbt erscheint. Mit einer reinen Pinzette gelingt es leicht, Fibrinfasern, die am Fischbeinstäbchen haften, abzunehmen und den übrigen auf dem Filter zuzutügen. Schließlich wäscht man das Fibrin noch einige Male mit siedendem Alkohol und mit Äther, um eingeschlossenes Fett, Phosphatid, Cholesterin zu lösen und zu entfernen, trocknet dann bei 110—120° im Luftbade und wägt nach dem Erkalten über Schwefelsäure.

Der Zusatz des Chlornatriums zu der zweiten oder dritten Portion des Waschwassers hat vor allem den Zweck, die Flüssigkeit besser filtrierbar zu machen. Außerdem bewirkt er auch die Lösung des größtenteils aus den Blutkörperchen stammenden Globulins, wenn auch die Menge bei Säugetierblut eine so kleine ist, daß sie kaum Fehler bedingen kann.

Bei Vogel-, Amphibien- und Fischblut empfiehlt es sich, zum Auswaschen des Fibrins 1—3proz. Natriumsulfatlösung zu verwenden, bis die Blutkörperchen fast ganz entfernt sind, weil die Kerne sich sehr schwer durch Dekantieren mit Wasser vom Fibrin trennen lassen. Erst zuletzt wendet man auch hier Wasser und endlich heißen Alkohol und Äther an.

Absolut genaue Resultate liefert die angegebene Bestimmungsmethode des Fibrins nicht, aber immerhin recht brauchbare, vorausgesetzt, daß der Übergang von Fibrinogen in Fibrin quantitativ erfolgt. Es ist wichtig, daß man so lange wäscht und dekantiert, bis die Flüssigkeit über dem Fibrin fast völlig klar bleibt und erst dann das Fibrin aufs Filter bringt und mit Wasser weiter wäscht. Bringt man das Fibrin zu früh auf das Filter, so filtriert die Flüssigkeit sehr langsam und es kann Fäulnis vor der Beendigung eintreten. Verfährt man nach diesen Vorschriften, so erhält man gleichmäßige und befriedigende Resultate und jede Bestimmung ist in wenigen Stunden bis auf das Trocknen des Fibrins beendet.

Ausführung bei kleinen Mengen Blut s. Gram<sup>1)</sup>.

*Bestimmung des Fibrinogen auf refraktometrischem Wege<sup>2)</sup>.*

681. Prinzip. Der Gehalt des Blutes an Fibrinogen ist gleich der Differenz: Plasmaeiweiß weniger Serumeiweiß. Vernachlässigt werden die kleinen Mengen Fibrinogen, die im Serum gelöst

<sup>1)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 49, S. 279. 1921.

<sup>2)</sup> Winternitz: Arch. f. Dermatol. u. Syphilis Bd. 99, S. 441. 1910. — Naegeli: Blutkrankheiten und Blutdiagnostik. 4. Aufl. S. 53. 1921. — Leendertz u. Gromelski: Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 94, S. 114. 1923; Bd. 96, S. 305. 1923.

bleiben. Voraussetzung für die Brauchbarkeit der Methode ist, daß die Konzentration der übrigen Bestandteile in Serum und Plasma dieselbe ist. Dies trifft nicht zu, wenn das Serum durch Gerinnung von Vollblut entstanden ist. Dabei tritt Wasser und Chlorid in individuell schwankender Menge aus den Blutkörperchen in das Serum über. Deshalb muß das Serum aus dem blutkörperchenfreien Plasma gewonnen werden. Die Gerinnung wird am bequemsten durch Hirudin aufgehoben, dieses wird jedoch nicht mehr fabrikmäßig hergestellt\*). Nach Naegeli u. a. beeinflußt Oxalatzusatz den Brechungsindex des Plasmas in falscher und nicht abzuschätzender Weise. Leendertz zeigte indes, daß schon sehr kleine Mengen von Citrat\*\*) die Gerinnung genügend verlangsamen; bis sie eintritt, kann das Plasma durch Zentrifugieren gewonnen und sein Brechungsindex bestimmt worden sein. Die nötige Citratmenge ist jedoch bereits so groß, daß sie das osmotische Gleichgewicht verschiebt. Deshalb wird eine isotonische Citratlösung benutzt und die Verdünnung berücksichtigt bei der Berechnung.

**Ausführung bei Venenblut.** Stehen größere Blutmengen zur Verfügung, so arbeitet man wie folgt: Mit einer innen paraffinierten Kanüle wird die Cubitalvene punktiert. Es ist zweckmäßig, etwa 20 ccm Blut unbenutzt abfließen zu lassen, um die Wirkung der Stauung auf dasselbe möglichst auszuschalten. Dann erst werden zwei ausparaffinierte Zentrifugengläser mit Blut nahezu gefüllt und zentrifugiert, bis die Blutkörperchensäule etwa die halbe Höhe erreicht hat. Mittels einer paraffinierten Pipette werden sodann 1,5 ccm Plasma abgehoben und in einem Gläschen mit 0,2 ccm 3,55proz. Lösung von citronensaurem Natrium gemischt. Der Brechungsindex  $R_1$  wird bestimmt. Während das Instrument zur Bestimmung im Temperierbad steht, wird nochmals mit paraffinierter Pipette genügend Plasma abgehoben und zur Gerinnung in geschlossenes Gläschen gebracht. Von dem Serum werden 1,5 ccm mit 0,2 ccm Citratlösung gemischt und wiederum der Brechungsindex  $R_2$  bestimmt.  $(R_1 - R_2) \cdot 0,244^{***})$  = Prozentgehalt Fibrinogen. Man kann auch der Citratplasmamischung von vornherein 0,04 ccm einer 1,5proz. Lösung von Calciumchlorid zusetzen, wodurch die Gerinnung zwar nur aufgeschoben wird, aber so langsam eintritt, daß man inzwischen Zeit hat,  $R_1$  zu bestimmen. Im selben Gemisch wird dann  $R_2$  nach Ausfallen des Fibrins bestimmt.  $R_1 - R_2 \cdot 0,249$  ergibt den Fibrinogengehalt.

**Ausführung bei Capillarblut.** Steht weniger Blut zur Verfügung, so wird es gleich in isotonischer 3,55proz. Natriumcitratlösung, etwa im Verhältnis 15 : 1, aufgefangen, gut vermischt und unter Luftabschluß durch flüssiges Paraffin der Sedimentierung überlassen. Dann wird ein Quantum des so gewonnenen Citratplasmas mit etwa dem 30. Teil einer 1,5proz. Lösung von Calciumchlorid versetzt und wieder  $R_1$  vor,  $R_2$  nach eingetretener Gerinnung bestimmt. Die wirkliche Verdünnung des Plasmas ist in diesem Fall nicht ganz genau bekannt, und der Brechungswert der Citrat-Plasma-Calcium-Mischung mag dem durch Rechnung zu ermittelnden Werte nicht ganz genau gleich sein; doch macht dies nichts aus, da es nur auf den Unterschied beider Proben ankommt, der nur durch Ausfallen des Fibrinogens bedingt ist.

#### ***Bestimmung des Plasmas, des Serums, der Blutkörperchen im Blute.***

682. Für diese Bestimmung sind von Hoppe - Seyler folgende drei Verfahren I, II und III angegeben worden:

Verfahren I ist nur für Blut anwendbar, das langsam gerinnt und dessen Körperchen sich schnell senken, also z. B. für Pferdeblut oder für Blut von Menschen, welche an Entzündungskrankheiten leiden.

Verfahren II ist verhältnismäßig leicht ausführbar und genau, aber nur

\*) Bei Verwendung selbstbereiteter Extrakte ist die Methode noch nicht durchgeprüft worden.

\*\*) Oxalat bildet einen Niederschlag und ist unbrauchbar.

\*\*\*) Eiweißfaktor  $0,215 \times$  Verdünnungsfaktor  $\frac{17}{15}$ .

dann anwendbar, wenn die Blutkörperchen sich in dem geschlagenen und mit verdünnter Salzlösung vermischten Blut beim Zentrifugieren gut absetzen. Es eignet sich besonders für Vogel-, Amphibien- und Fischblut, meist auch für Menschenblut. Bunge<sup>1)</sup> und Abderhalden<sup>2)</sup> haben es mit gutem Erfolg beim Pferde-, Rinder-, Schweine-, Schaf-, Hunde-, Kaninchen-, Ziegen- und Katzenblut angewendet. Auch Erben<sup>3)</sup> hat es benutzt.

Verfahren III eignet sich auch für solche Blutarten, deren Blutkörperchen sich nicht gut absetzen, ist aber weniger genau als Verfahren II, da colorimetrische Bestimmungsmethoden zur Anwendung kommen.

### Verfahren I.

Prinzip. Das Fibrin ist als ein Stoff anzusehen, welcher ausschließlich oder so gut wie ausschließlich aus dem Plasma stammt. Die Spuren, welche etwa von den Blutkörperchen geliefert werden, sind so gering, daß sie vernachlässigt werden können. Bestimmt man nun einerseits in einer gewogenen Menge Blut, andererseits in einer gewogenen Menge Plasma das Fibrin, so ist aus diesen beiden Werten der Gehalt des Blutes an Plasma, an Serum und an Körperchen leicht zu berechnen.

Ein Nachteil der Methode liegt darin, daß wegen des geringen Fibringehaltes des Blutes und des Plasmas in der Fibrinbestimmung gemachte Fehler bei der Berechnung ver Hundertfacht werden.

Ausführung. Man bestimmt in einer Portion Blut (10—40 ccm) den Fibringehalt nach § 680. Eine zweite größere Portion wird in einem zylindrischen, in Eis stehenden Gefäße aufgefangen. Nachdem die Blutkörperchen sich hinreichend gesenkt haben, entnimmt man mit einer abgekühlten Pipette ungefähr dieselbe Menge des klaren Plasmas und ermittelt in ihm ebenfalls den Fibringehalt nach § 680.

Berechnung. Rechnet man die erhaltenen Werte auf 100 g Blut bzw. Plasma um und bezeichnet man mit:

$a$	den	Prozentgehalt	des	Blutes	an	Fibrin
$b$	„	„	„	Plasmas	„	„
$x$	„	„	„	Blutes	„	Plasma
$y$	„	„	„	„	„	Blutkörperchen
$z$	„	„	„	„	„	Serum,

$$\text{so ist } x = \frac{a \cdot 100}{b} \quad y = 100 - x \quad z = x - a.$$

### Verfahren II.

Prinzip. Die Methode beruht auf der experimentell begründeten Annahme, daß bei der Trennung von Plasma und Blutkörperchen durch verdünnte Salzlösung in der § 672 angegebenen Weise keine Proteinstoffe aus den Körperchen austreten und besteht in der Ermittlung und rechnerischen Verwertung folgender Daten:

1. Gehalt des Blutes an Proteinstoffen.
2. Gehalt des von den Bestandteilen des Serums befreiten Blutes an Proteinstoffen.
3. Gehalt des Blutes an Fibrin.
4. Gehalt des zugehörigen Serums an Proteinstoffen.

Ausführung. Es werden vier einzelne Portionen Blut aufgefangen und getrennt voneinander untersucht.

1. Portion. Man fängt 5—10 ccm in einem Becherglase, das zusammen mit einem Uhrglase vorher gewogen war, auf, wägt bei aufgelegtem Uhrglase nach dem Erkalten und bestimmt nach § 663 die Proteinstoffe\*).

\*) Unter der Asche, welche nach den Angaben des § 663 abgezogen wird, befindet sich auch das dem Blutfarbstoff zugehörige Eisenoxyd. Es ist nicht nötig, dieses besonders zu bestimmen und dem Gewichte der Proteinstoffe wieder zuzuaddieren, da die in Portion 1 und 2 erhaltenen Gewichtsprocente nur für die Berechnung dienen sollen. Bei dieser findet aber eine Subtraktion des einen Wertes vom anderen statt, wobei das hinzuaddierte Eisenoxyd wieder herausfallen würde.

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. Biol. Bd. 12, S. 191. 1876.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 23, S. 521. 1897; Bd. 25, S. 65. 1898.

<sup>3)</sup> Zeitschr. f. Heilk. Bd. 26, S. 245 u. 303. 1905.



2. Portion. Man fängt 5—10 ccm Blut in einem gewogenen und dann auf Körpertemperatur erwärmten Fibrinbestimmungsapparat (§ 680) auf, bringt das Blut durch Schlagen zur Gerinnung, wägt nach dem Erkalten und mischt die Flüssigkeit in einem größeren Becherglase mit dem 10fachen Volumen einer Mischung von 1 Tl. gesättigter Natriumchloridlösung und 9 Tl. Wasser. Man bringt jetzt die Flüssigkeit quantitativ in die Gläser einer Zentrifuge, zentrifugiert 1—2 Stunden, gießt die überstehende Flüssigkeit völlig klar ab, mischt den zurückbleibenden Blutkörperchenbrei mit derselben Salzlösung, zentrifugiert wieder, gießt von neuem ab und verfährt nochmals in derselben Weise. Nachdem durch diese Behandlung die serösen Bestandteile völlig entfernt worden sind, werden die in den einzelnen Gläsern zurückbleibenden Massen, welche aus Blutkörperchen, Fibrin und den Resten der Waschflüssigkeit bestehen, mit Hilfe von (möglichst wenig) Wasser quantitativ in einem Becherglase vereinigt, durch Alkohol gefällt und zur Bestimmung der Proteinstoffe\*) weiter nach § 663 behandelt.

3. Portion. Man fängt 10—40 ccm Blut in einem Fibrinbestimmungsapparat auf und ermittelt den Fibringehalt nach § 680.

4. Portion. Man fängt Blut in einer auf Körpertemperatur erwärmten Schale auf, bedeckt die Schale und läßt ruhig stehen. Von dem nach eingetretener Gerinnung allmählich aus dem Blutkuchen ausgetretenen Serum wägt man 5—10 ccm in einem Becherglase ab und bestimmt die Proteinstoffe nach § 663.

Berechnung. Berechnet man die in 1., 2. und 3. erhaltenen Werte auf 100 g Blut, den in 4. erhaltenen Wert auf 100 g Serum und bezeichnet man mit:

<i>a</i>	den Prozentgehalt des Blutes an	Proteinstoffen	(Resultat von 1.)
<i>b</i>	„ „ „ „	Fibrin + Proteinstoffen	
		der Blutkörperchen ( „ „ 2.)	
<i>c</i>	„ „ „ „	Fibrin	( „ „ 3.)
<i>d</i>	„ „ „ Serum	Proteinstoffen	( „ „ 4.)
<i>x</i>	„ „ „ Blutes	Serum	
<i>y</i>	„ „ „ „	Plasma	
<i>z</i>	„ „ „ „	Blutkörperchen,	

$$\text{so ist } x = \frac{a-b}{d} \cdot 100 \quad y = x + c \quad z = 100 - (x + c).$$

### Verfahren III.

Prinzip. Die Methode stimmt im wesentlichen mit der vorhergehenden überein, nur sind die der Rechnung zugrunde zu legenden Werte z. T. andere. Es wird festgestellt:

1. Der Gehalt des Blutes an Proteinstoffen.
2. Die relative Menge an Blutfarbstoff und Proteinstoffen in den Blutkörperchen.
3. Der Gehalt des Blutes an Fibrin und an Blutfarbstoff.
4. Der Gehalt des zugehörigen Serums an Proteinstoffen.

Die Bestimmung 2 des Verfahrens II, bei welchem eine völlige Abscheidung der Blutkörperchen durch die Zentrifuge geschehen muß, ist durch die colorimetrische Bestimmung des Blutfarbstoffes im Blute und durch die Bestimmung der relativen Menge an Blutfarbstoff (auf colorimetrischem Wege) und Proteinstoffen in den Blutkörperchen ersetzt. Infolgedessen eignet sich die Methode auch für solches Blut, dessen Blutkörperchen durch Zentrifugieren nicht quantitativ abgeschieden werden können.

Ausführung. Es werden 4 Portionen Blut aufgefangen und einzeln untersucht.

1. Portion. Man verfährt genau wie unter Verfahren II, 1 angegeben.

2. Portion. 30—50 ccm Blut werden in einem auf Körpertemperatur erwärmten Gefäße aufgefangen, durch Schlagen zur Gerinnung gebracht, mit dem 10fachen Volumen der verdünnten Salzlösung (s. Verfahren II, 2) vermischt, zentrifugiert und weiter wie unter Verfahren II, 2 angegeben, zur Entfernung der Bestandteile des Serums behandelt, nur mit dem Unterschiede, daß ein Verlust an Blutkörperchen beim Abgießen nicht vermieden zu werden braucht. Der vom Serum

\*) Siehe Fußnote \*) S. 818.

völlig befreite, aus Körperchen, Fibrin und Salzlösung bestehende Rückstand wird mit Wasser versetzt, die Flüssigkeit gut umgerührt und dann von dem Fibrin abgossen. In einem nicht zu kleinen, genau abgemessenen Teile bestimmt man nach § 663 die Proteinstoffe\*), in einem andern nach § 677 den Blutfarbstoff.

3. Portion. In 10—40 ccm Blut wird eine Fibrinbestimmung nach § 680 ausgeführt. Die abgossenen und abfiltrierten wässerigen Waschflüssigkeiten werden gesammelt und zur Blutfarbstoffbestimmung nach § 677 benutzt.

4. Portion. Man verfährt genau wie unter Verfahren II, 4 angegeben.

Berechnung. Man rechnet die in 1., 3. und 4. erhaltenen Werte auf 100 g Blut bzw. Serum um, und die in 2. erhaltenen auf ein bestimmtes Volumen der Flüssigkeit. Bezeichnet man nun mit:

$a$	den Prozentgehalt des Blutes	an Proteinstoffen	(Resultat von 1.)
$b$	„	„	Fibrin ( „ „ 3.)
$c$	„	„	Blutfarbstoff ( „ „ 3.)
$d$	„	„	Serums „ Proteinstoffen ( „ „ 4.)
$e$	das Verhältnis von Proteinstoffen zu Blutfarbstoff-		
		stoff in den Blutkörperchen	( „ „ 2.)
$w$	den Prozentgehalt des Blutes	an Proteinstoffen der Blutkörperchen	
$x$	„	„	Serum
$y$	„	„	Plasma
$z$	„	„	Blutkörperchen,

$$\text{so ist } w = c \cdot e \quad x = \frac{[a - (w + b)] \cdot 100}{d} \quad y = x + b$$

$$z = 100 - (x + b).$$

**Bestimmung der einzelnen Bestandteile des Blutes  
in ihrer Verteilung auf Serum und Körperchen (Gesamtblutanalyse).**

683. 1. Man führt eine Analyse nach § 682 Verfahren II oder III aus und berechnet den Prozentgehalt des Blutes an Serum, an Blutkörperchen und an Fibrin.

Dabei wird der Prozentgehalt des Serums an Proteinstoffen und der Prozentgehalt des Blutes an Proteinstoffen der Blutkörperchen festgestellt, letzterer aber um diejenige Menge Eisenoxyd, welche dem in 100 g Blut enthaltenen Blutfarbstoff entspricht, zu klein. Der Prozentgehalt des Blutes an Eisenoxyd ist deshalb in einer besonderen Portion Blut nach § 530 und § 542 zu ermitteln und hinzuzuaddieren.

Die so erhaltene Zahl gibt also an, wieviel Proteinstoffe in 100 g Blut auf die Blutkörperchen entfallen, während man durch Umrechnung des Prozentgehaltes des Serums an Proteinstoffen auf diejenige Menge Serum, welche in 100 g Blut enthalten ist, erfährt, wieviel Proteinstoffe in 100 g Blut auf das Serum entfallen.

2. Man macht eine Blutfarbstoffbestimmung nach § 677. Da der Blutfarbstoff ausschließlich in den Blutkörperchen vorkommt, so gibt der gefundene Prozentgehalt gleichzeitig an, wieviel Blutfarbstoff in den in 100 g Blut enthaltenen Blutkörperchen enthalten ist. Zieht man ihn von der in den Blutkörperchen enthaltenen Menge Proteinstoffe (s. oben) ab, so erfährt man, wieviel Proteinstoffe außer dem Blutfarbstoff in den Blutkörperchen enthalten sind.

3. Man bestimmt in 30—50 ccm Blut nach § 663 Cholesterin, Phosphatide, lösliche und unlösliche Salze usw. mit Ausnahme der Proteinstoffe und rechnet alle diese Werte auf 100 g Blut um. Sodann führt man dieselbe Bestimmung

\*) S. Fußnote \*) S. 818.

im Serum aus. Rechnet man nun die für 100 g Serum erhaltenen Mengen der einzelnen Stoffe auf die in 100 g Blut enthaltene Serummenge um, so erfährt man, wieviel Cholesterin, Phosphatid usw. in 100 g Blut auf das Serum kommen, und zieht man diese einzelnen Werte von den für 100 g Blut gefundenen ab, so ergibt sich, wieviel Cholesterin, Phosphatid usw. in 100 g Blut auf die Blutkörperchen kommen.

4. Man bestimmt in 40—50 ccm Blut nach § 653 den Prozentgehalt an Zucker. Dieser Wert gibt gleichzeitig an, wieviel Zucker in 100 g Blut auf das Serum kommt.

5. Man bestimmt in je einer Menge von 1—2 g nach § 631 den Prozentgehalt des Blutes und des Serums an Trockensubstanz. Berechnet man diejenige Menge Trockenrückstand, welche dem in 100 g Blut enthaltenen Serum entspricht, so erhält man die Menge Trockensubstanz, welche in 100 g Blut auf das Serum entfällt und zieht man diesen Wert + dem Prozentgehalt des Blutes an Fibrin von dem Prozentgehalt des Blutes an Trockensubstanz ab, so erfährt man, wieviel Trockensubstanz in 100 g Blut auf die Blutkörperchen entfällt.

**Bestimmung der Gesamtblut- und der Gesamtblutfarbstoffmenge eines Tieres.**

684. Bestimmung der Gesamtblutmenge nach Welcker<sup>1)</sup> nach der Beschreibung von Plesch<sup>2)</sup>. Bestimmung der Gesamtblutmenge.

Prinzip. Die Methode ist eine colorimetrische und beruht darauf, daß der Blutfarbstoff so gut wie ausschließlich dem Blute angehört (die kleinen, in den Muskeln vorkommenden Mengen bedingen keine wesentliche Ungenauigkeit) und daß bei der Extraktion der Organe mit Wasser keine anderen färbenden Substanzen in dieses übergehen. Man entnimmt dem Tier eine Portion Blut, stellt ihr Gewicht fest, entblutet dann das ganze Tier, erschöpft die zerkleinerten Organe mit Wasser, vereiniget Blut und Waschflüssigkeit, mißt das Volumen und verdünnt die zuerst entnommene Probe so weit mit gemessenen Mengen Wasser, bis beide Flüssigkeiten bei der colorimetrischen Untersuchung gleich sind. Die Berechnung ist dann einfach; sie ist die zur Zeit genaueste Methode und dient zur Prüfung anderer Methoden.

Ausführung. Das Tier wird auf ein gereinigtes Operationsbrett aufgebunden und auf einer Seite die Carotis und Jugularis frei präpariert. In beide Gefäße werden Glaskanülen zentral und distal vom Herzen eingebunden; die distalen Kanülen werden vorläufig abgeklemmt. Aus der Carotis fängt man zunächst in einem mit Ammonoxalatpulver beschicktem Gefäß etwas Blut auf, mit dem die später gewonnenen Blutproben verglichen werden und stellt das Gewicht fest. In die Vene wird aus einem ca.  $\frac{1}{2}$  m über der Einflußstelle stehenden Gefäß eine 0,9proz. Kochsalzlösung infundiert (Gscheidlen<sup>3)</sup>). Das Einfließen in die Vene und das Ausfließen aus der Carotis muß so reguliert werden, daß das Herz möglichst lange in Tätigkeit bleibt. Die abfließende Spülflüssigkeit wird in Glasgefäßen aufgefangen, in welchen ein die Gerinnung hemmendes Salz enthalten ist. Ist das Tier sehr geschwächt, so bindet man es los, wobei die Extremitäten passiv bewegt und der Bauch massiert werden. Bei Herzstillstand kann durch Herzmassage die Tätigkeit noch eine Zeitlang aufrecht erhalten werden. Hat das Herz zu schlagen aufgehört, so wird die Infusion mit einer Flüssigkeit fortgesetzt, die 0,9% Kochsalz und etwas Ammonoxalat enthält. Der Infusionsweg wird so geändert, daß die Kochsalzlösung von 1— $1\frac{1}{2}$  m Höhe in die distal und zentral eingebundene Kanüle der Carotis gleichzeitig einströmt. Die Waschflüssigkeit wird durch die V. jugularis und durch einen etwa 40 cm langen, in das rechte Herz eingeführten Katheter gesammelt. Die Spülung wird so lange fortgesetzt, bis die Flüssigkeit farblos zurückfließt. Der so gewonnenen Flüssigkeit kann man etwas Soda zusetzen. Die durch Gaze filtrierte Flüssigkeit

<sup>1)</sup> Prager Vierteljahrsschr. Bd. 4, S. 11. 1854.

<sup>2)</sup> Hämodynamische Studien. Hirschwald 1909. Zeitschr. f. klin. Med. Bd. 63, S. 47. 1907.

<sup>3)</sup> Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 7, S. 530. 1873.

wird abgemessen und als Probe I untersucht. Bei der Ausspülung ist es zweckmäßig, die Atmung möglichst lange in Gang zu halten. Die schon farblos zurückfließende Spülflüssigkeit wird nach dem Einleiten der künstlichen Atmung wieder blutig; es ist durch dieses Hilfsmittel noch ein beträchtlicher Teil auszuspülen, der sonst nur durch Auslaugen zu gewinnen wäre. Ist die Ausspülung beendet, so wird das Fell des Tieres abgezogen, wobei darauf zu achten ist, daß die Hautgefäße nicht mit abpräpariert werden. Dann wird die Haut mit Wasser ausgelaugt. Die Muskeln werden von den Knochen abgetrennt und mit den Organen zusammen fein gewiegt. Die Galle, der Harnblaseninhalte, die Augen, der Darminhalt, Gehirn und Rückenmark werden entfernt, da sie die colorimetrische Bestimmung fälschen würden. Die zerstückelte Masse kommt in einen Kübel Wasser und wird bei zeitweiligem Umrühren 24 Stunden stehen gelassen. Es ist zu empfehlen, dem Wasser ein Desinfiziens zuzusetzen, das das Hämoglobin nicht stört, z. B. Toluol. Am anderen Tage wird das Wasser abfiltriert und die Masse erst mit der Hand ausgepreßt, dann mit Quarzsand verrieben und unter Druck von 300 Atmosphären mit der Buchnerpresse ausgepreßt. Die an dieser Stelle des Verfahrens gewonnene Flüssigkeit wird wiederum genau abgemessen und wird als Portion II für sich untersucht. Das von Muskeln, Gehirn, Rückenmark und Augen befreite Knochenskelett wird zerkleinert, in einem Mörser zerstampft und in Wasser stehen gelassen. Nach 24 Stunden wird das Wasser abgelassen, die zurückgebliebene Masse ebenfalls mit Quarzsand verrieben und auf der Buchnerpresse ausgepreßt. Die so gewonnenen beiden Flüssigkeiten werden vereinigt und als Portion III untersucht. Für die colorimetrische Bestimmung ist es unbedingt notwendig, daß die Flüssigkeit klar ist. Schon geringe Trübungen können große Fehler geben und dies um so mehr, weil der Fehler, der bei der Bestimmung einer kleinen Probe entsteht, multipliziert wird. Das Klären der Flüssigkeiten ist die schwierigste Aufgabe bei dem ganzen Verfahren. Portion I wird meist einer besonderen Klärung nicht bedürfen, um so mehr aber II und III. Welcker kühlt auf 0° ab und filtriert durch Faltenfilter. Hans Meyer empfiehlt Natriumsulfat und Bariumchlorid zuzusetzen und zu zentrifugieren. (Zusatz von geglühter Kieselgur oder Talcum?). Plesch filtriert nach Zusatz von etwas Ammoniak zu allen drei Portionen. Die dadurch verursachte Farbänderung soll in allen drei Flüssigkeiten dem Hämoglobingehalt proportional sein. Dieser wird am besten nach § 633 bestimmt.

**Berechnung.** Probe I, II, III werden mit Blut verglichen, das der zuerst entnommenen unverdünnten Portion entstammt und in dem zur Colorimetrie beider Flüssigkeiten passenden Verhältnis mit Wasser verdünnt worden ist. Bei Farbgleichheit enthalten beide Flüssigkeiten gleichen Prozentgehalt an Blut. Für die eine läßt sich dieser leicht berechnen, da das Gewicht des Blutes und die zugefügten Wassermengen bekannt sind, die zu ihrer Bereitung gedient haben. Von der anderen ist das Volumen bekannt; ihr Gehalt an Blut läßt sich also leicht berechnen. Addiert man zu den so gefundenen Werten das Gewicht der zuerst entnommenen Probe Blut hinzu, so erhält man das Gesamtgewicht des Blutes.

Die Bestimmung ist möglichst schnell und möglichst bei niedriger Temperatur zu Ende zu führen, um eine Zersetzung des Blutfarbstoffes zu vermeiden.

#### **Bestimmung der Gesamtblutfarbstoffmenge.**

Man führt 1. eine Bestimmung des Gesamtblutgehaltes in der eben beschriebenen Weise und 2. eine Blutfarbstoffbestimmung nach § 677 aus und berechnet aus beiden Werten den Gesamthämoglobingehalt.

**Kombinierte Bestimmung der Gesamtblut- und Gesamtblutfarbstoffmenge nach H. Winternitz<sup>1)</sup>.**

Bestimmung der Gesamtblutfarbstoffmenge.

Bestimmung der Gesamtblut- und Gesamtblutfarbstoffmenge.

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 22, S. 469. 1897.

**Prinzip.** Es wird der prozentische Blutfarbstoffgehalt des unverdünnten Blutes und der Blutfarbstoffgehalt des gesamten Blutes bestimmt und aus diesen beiden Werten die Gesamtblutmenge berechnet.

**Ausführung.** Nach Einführung von Kanülen in die Art. carot. und in die Ven. jugul. wird eine gewogene Probe Blut für die Blutfarbstoffbestimmung nach § 677 entnommen und darauf in der oben beschriebenen Weise eine wässrige Lösung, welche das gesamte Blut des Tieres enthält, hergestellt, nur mit dem Unterschied, daß man zum Auslaugen der zerkleinerten Organe eine ganz schwache Natronlauge (auf 1000 Tl. Wasser etwa 0,04 g Ätznatron) benutzt. Ein kleiner Teil der gemessenen Gesamtfüssigkeit wird mit Kohlenoxyd gesättigt, klar filtriert und in die eine Kammer der Doppelpipette (§ 677) gebracht; in die andere Kammer kommt eine gemessene Menge einer verdünnten (etwa 0,2 proz.) Kohlenoxydhämoglobulinlösung von bekanntem Gehalt (S. 811). Dieser fügt man gemessene Mengen kohlenoxydhaltigen Wassers bis zur Farbengleichheit beider Lösungen hinzu (§ 677, vorletzter Absatz).

**Berechnung.** Da bei Farbengleichheit beide denselben Prozentgehalt an Blutfarbstoff enthalten müssen, so läßt sich die Menge des Farbstoffs in der gemessenen wässrigen Blutlösung leicht berechnen. Zu dem gefundenen Wert ist noch diejenige Menge Blutfarbstoff, welche die für die Hämoglobinbestimmung entnommene Probe Blut enthält, zu addieren, um die Gesamtmenge an Blutfarbstoff zu erhalten. Aus diesem Wert ( $h$ ) und dem Prozentgehalt des Blutes an Blutfarbstoff ( $p$ ) läßt sich die Gesamtmenge des Blutes in Grammen ( $x$ ) leicht berechnen:  $x = \frac{100 \cdot h}{p}$ .

**Bestimmung der Gesamtblutmenge beim Lebenden.**

685. Die Methoden<sup>1)</sup> beruhen auf dem Prinzip, dem Blut eine bekannte Menge einer Substanz zuzusetzen, die sich im Blut nicht verändert und die die Blutbahn nicht verläßt. In einer dann entnommenen Blutprobe wird der Gehalt an der betreffenden Substanz oder die Verdünnung des Blutes bestimmt. Meist wird physiologische Kochsalzlösung infundiert und vor und nach der Infusion die Erythrocytenzahl bestimmt<sup>2)</sup>, oder der Hämoglobingehalt<sup>3)</sup>, oder die Gefrierpunktserniedrigung<sup>4)</sup>, oder die Refraktion<sup>5)</sup>. Der künstlichen Plethora entledigt sich der Körper rasch. Deshalb wird bereits 5 Minuten nach der nicht zu langsam vorgenommenen Infusion die zweite Blutprobe entnommen. Es ist fraglich, ob zu dieser Zeit schon eine gleichmäßige Mischung des Blutes mit der Infusionsflüssigkeit stattgefunden hat. Bayliss<sup>6)</sup> infundiert Gummikochsalzlösung; sie konserviert den Blutdruck und verhindert die Hämolyse. Feste Partikel (chinesische Tusche) oder kolloidale Farbstoffe<sup>7, 8)</sup>, Dextrin<sup>9)</sup> verschwinden rasch

<sup>1)</sup> Neueste kritische Darstellung von Franz Müller in Handb. d. biolog. Arbeitsmethoden. Herausg. v. Abderhalden. Abt. IV, Teil 3, S. 159. 1921.

<sup>2)</sup> Zuntz u. Cohnstein: Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 42, S. 319. 1888.

<sup>3)</sup> Oerum: Hammarsten-Festschrift 1906.

<sup>4)</sup> Plesch: Zeitschr. f. exp. Pathol. u. Therapie Bd. 6, S. 405. 1909.

<sup>5)</sup> de Crinis: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 99, S. 131. 1917; s. auch Kritik von Reiß in Handb. d. biolog. Arbeitsmethoden. Herausg. v. Abderhalden Abt. IV. Teil 3, S. 332. 1923. — Mc Querrie, Davis u. Irvine: Americ. Journ. of physiol. Bd. 51, S. 257. 1920. Berichte über d. ges. Physiol. Bd. 1, S. 373. 1920.

<sup>6)</sup> Journ. of pharmacol. a. exp. therapie Bd. 15 S. 29. 1920. Ref. Berichte f. d. ges. Physiol. Bd. 2 S. 44. 1920.

<sup>7)</sup> Hooper, Smith, Belt u. Whipple: Americ. Journ. of physiol. Bd. 51, S. 205, 220. 1920. — Darson, Evans u. Whipple: desgl. Bd. 51, S. 232. 1920. Berichte über d. ges. Physiol. Bd. 1, S. 371. 1920.

<sup>8)</sup> Harris: Brit. Journ. of exp. pathol. Bd. 1, S. 142. 1920; Ref. Bericht über f. d. ges. Physiol. Bd. 4, S. 76. 1920.

<sup>9)</sup> Abderhalden u. Schmid: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 66, S. 121. 1910.

aus der Blutbahn. Tetanus-Antitoxin verwendet auf Ehrlichs Vorschlag Behring, da es lange in der Blutbahn bleibt; der Gehalt des Blutes daran wird im Giftversuch am Tier bestimmt. Ratner<sup>1)</sup> erhielt gegenüber den Befunden, die mit Welckers Methode gefunden sind, Abweichungen von —22% und +33%. Bei den Inhalationsmethoden wird nach Haldane<sup>2)</sup> Kohlenoxyd einatmen gelassen; Zuntz und Plesch<sup>3)</sup> haben das Verfahren verbessert. Trotzdem führt das Verfahren zu unwahrscheinlichen Werten (s. auch Lamson und Nagayama<sup>4)</sup> und Dreyer<sup>5)</sup>).

## Untersuchung des Eiters.

(Bearbeitet von K. Thomas - Leipzig.)

686. Der Eiter<sup>6)</sup> stellt eine dünn- oder dickflüssige oder auch breiige Masse dar und besteht aus einer Flüssigkeit, dem Eiterserum, in dem morphologische Elemente, die Eiterkörperchen, suspendiert sind.

Das spezifische Gewicht schwankt (durchschnittlich ungefähr 1030).

Die Reaktion ist gegen Lackmus alkalisch.

**Bestandteile.** Das Serum ist von gelblicher oder grünlicher Farbe und enthält die Bestandteile des Blutserums, darunter d-Milchsäure<sup>7)</sup>, außerdem gewöhnlich etwas Albumose (Hofmeister), auch Tyrosin, Leucin, Fettsäuren können besonders in länger bestehenden Eiteransammlungen vorhanden sein. Eine Blaufärbung kann von Pyocyanin (§ 322) herrühren. Die Körperchen enthalten in Wasser lösliche und unlösliche Proteinstoffe, darunter ein dem Kern zugehöriges Nucleoprotein (Miescher) und Albumosen (letztere viel reichlicher als das Serum; Hofmeister), Cholesterin, Phosphatide, sog. Protagon (Hoppe-Seyler, Kossel und Freytag), Fette, Glykogen (Huppert), proteolytisches Ferment, anorganische Salze (Kalium, Natrium, Calcium, Magnesium, Eisen, gebunden an Salzsäure und Phosphorsäure).

Weißer Blutkörperchen geben starke Adamkiewicz-Probe, aber tryptisch verdaut keine Bromreaktion und bei der Fäulnis nur Spuren von Indol (Weiß<sup>8)</sup>).

### *Trennung und Untersuchung von Eiterserum und Eiterkörperchen.*

687. **Trennung.** Die Isolierung des Serums gelingt, wenn auch sehr langsam, durch Filtration oder auch durch Zentrifugieren. Zur Isolierung der Körperchen verdünnt man den Eiter mit Natriumsulfatlösung (1 Tl. gesättigte Salzlösung und 9 Tl. Wasser) oder auch mit halbgesättigter Bariumnitratlösung, zentrifugiert die Mischung und wäscht den Bodensatz mit derselben Salzlösung. Chlornatriumlösung ist nicht zu benutzen, da sie die Körperchen in eine zäh-schleimige Masse verwandelt.

**Untersuchung des Eiterserums.** Sie erfolgt genau wie die einer serösen Flüssigkeit (§ 630ff.). Über Pyocyanin s. § 322.

<sup>1)</sup> Diss. Basel 1914. Domarus: Blutuntersuchung. Berlin: Julius Springer 1921. S. 140.

<sup>2)</sup> Haldane u. Smith: Journ. of physiol. Bd. 25, S. 331. 1899/1900.

<sup>3)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 11, S. 47. 1908.

<sup>4)</sup> Ref. Ber. über die gesamte Physiol. Bd. 4, S. 77. 1920. u. Naegeli: Blutkrankheiten. 4. Aufl. Berlin: Julius Springer 1921. S. 79, 80.

<sup>5)</sup> Mit Ray u. Walker: Skandinav. Arch. f. Physiol. Bd. 28, S. 299. 1913.

<sup>6)</sup> Miescher: Verhandl. d. naturh. Ges. in Basel Bd. 7, S. 138. Med.-chem. Unters. von Hoppe-Seyler Bd. 4, S. 441. 1870. — Hoppe-Seyler: Med.-chem. Untersuchungen Bd. 4, S. 486. 1870. — Kossel: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 7, S. 7. 1883. — Kossel u. Freytag: desgl. Bd. 17, S. 452. 1893. — Hofmeister: desgl. Bd. 4, S. 274. 1880. — Huppert: desgl. Bd. 18, S. 144. 1894.

<sup>7)</sup> Ito: Journ. of biol. chem. Bd. 26, S. 173. 1916.

<sup>8)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 98, S. 116. 1919.

**Untersuchung der Eiterkörperchen.** Man behandelt zunächst mit Wasser, wobei kleine Mengen noch wenig untersuchter Eiweißstoffe in Lösung gehen, filtriert und kocht den Rückstand mit starkem Alkohol aus.

**Alkoholisches Filtrat.** Beim Abkühlen scheiden sich protagonartige Substanzen ab, aus denen durch Behandlung mit methylalkoholischer Barytlösung Cerebroside erhalten worden sind (S. 390). Die Mutterlauge wird nach § 660 auf Cholesterin, Phosphatid und Fett untersucht.

**Rückstand.** Denselben verdaut man längere Zeit mit Pepsinsalzsäure (§ 505), filtriert und wäscht mit Wasser und warmem Alkohol aus. Von den ungelöst bleibenden Kernsubstanzen wird durch verdünnte Sodalösung oder sehr schwache Natronlauge Nuclein (§ 443) gelöst, das aus der alkalischen Lösung auf Zusatz einer Säure wieder ausfällt. Der in schwachem Alkali unlösliche Teil ist in starkem Alkali und auch in konzentrierter Salzsäure löslich.

Außer durch Verdauung gelingt die Isolierung der Kernsubstanz auch durch wochenlange Behandlung der Eiterzellen mit sehr verdünnter Salzsäure und nachheriges Schütteln des ungelösten Rückstandes mit Wasser und Äther. Dabei setzen sich die Kerne als feines Pulver am Boden der wässerigen Schicht ab.

Über Isolierung von Bernsteinsäure und Glutarsäure aus jauchigem Eiter s. § 89, über Isolierung von Milchsäure aus Eiter § 658.

**Steriler Eiter** — in kleinen Mengen — läßt sich durch Injektion von destilliertem Wasser ins Kniegelenk, in die Brust- und Bauchhöhle von Kaninchen und Meerschweinchen gewinnen. Man spült die Leukocyten am besten mit physiologischer Kochsalzlösung heraus. Dold<sup>1)</sup>, Levene und Meyer<sup>2)</sup> injizierten mittelgroßen Hunden zweimal im Abstand von 3 Tagen je 1,5 ccm Terpentinöl in die Pleurahöhle (das erste Mal in Äthernarkose). 18 Stunden nach der 2. Injektion wird das Exsudat aspiriert und entfernt; es enthält den größten Teil des Terpentinöls. Den nächsten Tag wird das erneute Exsudat angesaugt; es ist strohgelb, manchmal etwas rötlich. Die Leukocyten werden auf der Zentrifuge abgetrennt, mit Hilfe von Glasperlen mehrmals mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und in 1proz. Phosphatmischung nach Henderson suspendiert.

Gewinnung von  
sterilem Eiter.

## Die wichtigsten Mikromethoden zur Untersuchung von Blut, Plasma und Serum.

(Bearbeitet von S. Edlbacher-Heidelberg.)

Eine ganze Reihe von Bestandteilen des Blutes lassen sich mit genügender Genauigkeit in ganz geringen Mengen bestimmen. So gelingt es z. B. bei Anwendung der Bangschen Methode schon in etwa 100 mg Blut den Zuckergehalt zu ermitteln.

Man kann die Methoden in colorimetrische, nephelometrische, maßanalytische und gravimetrische einteilen.

Erforderlich für die Ausführung sind eine Zentrifuge mit hoher Tourenzahl und womöglich elektrischem Antrieb, ein gutes Colorimeter, am besten nach Duboscq, ferner Ostwaldsche Pipetten und Mikrobüretten, die in  $\frac{1}{20}$  ccm geteilt sind.

Eine Anzahl der beschriebenen Methoden ist in Buchform gesammelt erschienen:

<sup>1)</sup> Dtsch. Arch. f. klin. Med. Bd. 117, S. 206. 1915; Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. I, Orig. Bd. 76, S. 548. 1915.

<sup>2)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 11, S. 365. 1912.

1. F. Pregl: Die quantitative organische Mikroanalyse. 2. Aufl. Berlin: Springer 1922.
2. Mandel und Steudel: Minimetriche Methoden der Blutuntersuchung. 2. Aufl. Berlin und Leipzig: Vereinigung wissenschaftlicher Verleger 1924.
3. J. Bang: Methoden zur Mikrobestimmung einiger Blutbestandteile. 3. Aufl. Wiesbaden: Bergmann 1922.
4. L. Pincussen: Mikromethodik. Leipzig: G. Thieme. 1922.

**Bestimmung von Kalium, Natrium, Calcium und Magnesium in kleinen Blutmengen nach Kramer und Tisdall<sup>1)</sup>.**

688. Prinzip. Nach Enteiweißen mit Trichloressigsäure nach Greenwald bestimmt man in aliquoten Teilen der Flüssigkeit die einzelnen Elemente, das Magnesium im Zentrifugat des Calciums. Auch Phosphor kann bestimmt werden.

Enteiweißen. Man bringt 25 ccm destilliertes Wasser in einen 50-ccm-Maßkolben, wägt und gibt aus einer 19 ccm fassenden graduierten Spritze 7—8 ccm Blut langsam dazu unter dauerndem schwachen Schütteln, bis Hämolyse eingetreten ist. Nach abermaligem Wägen (zur genauen Ermittlung der Blutmenge) werden 2 Tropfen Oktylalkohol und unter sanftem Schütteln 12 bis 13 ccm einer 12proz. Trichloressigsäure zugefügt. Man mischt gut, füllt nach 10 Minuten zur Marke auf, mischt wieder, führt in eine Zentrifugenröhre über, zentrifugiert 10 Minuten und gießt ab. Vereinzelte auf der Oberfläche schwimmende Partikelchen beeinträchtigen die Bestimmungen nicht; sind sehr viele in der Flüssigkeit suspendiert, so stellt man in den Eisschrank, in dem sie sich innerhalb einiger Stunden absetzen. Von der Flüssigkeit, die in diesem Stadium 2 Wochen haltbar ist, bringt man einen aliquoten Teil (gewöhnlich 35 ccm) in ein Becherglas, dampft ein, löst den Rückstand in 0,1 ccm n-HCl und füllt in einem Meßkolben auf 10 ccm auf. Die Lösung, welche wie Serum aussieht und, falls sie trübe ist, nochmals zentrifugiert werden muß, dient zur Bestimmung.

Calcium und Magnesium können auch direkt ohne vorherige Entfernung des Eiweißes bestimmt werden<sup>2)</sup>.

**Natrium.** Erforderliche Lösung: Kaliumpyroantimoniatreagens. 500 ccm Wasser werden mit 10 g Kaliumpyroantimoniat 3—5 Minuten gekocht, sofort unter der Wasserleitung abgekühlt und mit 15 ccm 10proz. Kalilauge (aus mit Alkohol gereinigtem Ätzkali) versetzt. Die durch ein aschefreies Filter filtrierte und in einer paraffinierten Flasche aufzubewahrende Flüssigkeit klärt sich bei 24stündigem Stehen völlig und ist mindestens einen Monat haltbar. Vor der Benutzung muß sie auf Gegenwart von Natrium geprüft werden und ebenso darauf, ob Zusatz von Alkohol Kaliumsalz ausfällt. 10 ccm müssen mit 2 ccm Wasser und 3 ccm 95proz. Alkohol versetzt klar bleiben.

**Ausführung.** 4 ccm der vorbereiteten Flüssigkeit werden in einem Platinschälchen auf 2 ccm eingedampft, 1 Tropfen Phenolsulfonphthalein zugesetzt und mit 10proz. KOH gerade alkalisch gemacht, wozu gewöhnlich 10—12 Tropfen genügen werden. Nun setzt man 10 ccm Kaliumpyroantimoniatreagens zu und hierauf 3 ccm 95proz. Alkohol. Letzterer muß tropfenweise und unter Umrühren mittels eines mit Kautschuk überzogenen Glasstabes zugegeben werden. Nach 39 Minuten wird der Niederschlag in einen gewogenen Goochtiegel überführt und mit 5—10 ccm 30proz. Alkohol gewaschen, der Tiegel 1 Stunde lang bei 110° getrocknet und nach dem Abkühlen gewogen.

**Berechnung.** Das Gewicht des Niederschlages durch 11,08 dividiert gibt die Anzahl von Milligramm Natrium in der angewandten Probe.

H. Müller<sup>3)</sup> empfiehlt, das Antimon im Niederschlag jodometrisch zu bestimmen ( $\text{Sb}_2\text{O}_5 + 4 \text{HJ} = \text{Sb}_2\text{O}_3 + 2 \text{H}_2\text{O} + 2 \text{J}_2$ ). Für die Bestimmung genügen in diesem Fall 0,1 ccm Serum oder Plasma; auch kann das Enteiweißen fortfallen.

**Kalium<sup>4)</sup>.** Erforderliche Lösungen. 1. Natriumkobaltinitritreagens: Lösung A: 25 g kristallisiertes Kobaltinitrat werden in 50 ccm Wasser gelöst und 12,5 ccm Eisessig

<sup>1)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 48, S. 223. 1921.    <sup>2)</sup> desgl. Bd. 47, S. 475. 1921.

<sup>3)</sup> Helv. chim. acta Bd. 6, S. 1152. 1923; Biochem. Zeitschr. Bd. 147, S. 356. 1924.

<sup>4)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 48, S. 4. 1921; desgl. Bd. 46, S. 342. 1921.



zugesetzt. — Lösung B: 120 g Natriumnitrit (K-frei Merck) werden in 180 ccm Wasser gelöst = 220 ccm. Zur ganzen Menge der Lösung A werden 210 ccm der Lösung B zugesetzt und nun wird Luft durch die Flüssigkeit gesaugt, bis alle Stickoxyde entfernt sind. Das Reagens wird im Eisschrank aufbewahrt, vor dem Gebrauch filtriert, hat ein  $p_H$  von 5,7 und ist 1 Monat lang haltbar.

2. Etwa 4 n- $H_2SO_4$  (20 ccm konzentrierte auf 100 ccm verdünnt).

3. 0,02 n-Kaliumpermanganatlösung, hergestellt durch Verdünnen einer 0,1 n-Lösung und Titerstellung vor jeder Analysenserie gegen 0,01 n-Natriumoxalat. 0,01 n-Natriumoxalatlösung, hergestellt durch Verdünnen einer 0,1 n-Lösung. Diese wird dargestellt durch Auflösen von 6,7 g Sörensens Na-Oxalat in einem Liter Wasser unter Zusatz von 5 ccm konzentrierter  $H_2SO_4$ .

4. Natriumnitritlösung (15 g kaliumfreies Natriumnitrit in 30 ccm Wasser).

**Ausführung.** 0,2 ccm der vorbereiteten Flüssigkeit werden in ein graduiertes Zentrifugenröhrchen gemessen, 0,5 ccm Wasser und 0,5 ccm Natriumnitritlösung zugesetzt. Der Inhalt des Röhrchens wird gut gemischt und nach 5 Minuten mit Wasser bis auf 4 ccm aufgefüllt und neuerdings gemischt. Nun erfolgt tropfenweiser Zusatz von Natriumkobaltnitritreagens. Es wird wieder gemischt und nach  $\frac{1}{2}$  Stunde 7 Minuten lang zentrifugiert. Alles bis auf etwa 0,3 ccm der überstehenden Flüssigkeit wird entfernt, und zwar wie folgt: Durch eine Öffnung eines doppelt durchbohrten Korkes wird ein Glasrohr eingeschoben, durch das in der Zentrifugenröhre positiver Druck erzeugt werden kann. Durch die andere Öffnung des Korkes ist ein Rohr geschoben, welches 3—4 mm über den Niederschlag reicht. Das untere Ende dieses Rohres ist zur lichten Weite von 1 mm verjüngt und so gekrümmt, daß die Öffnung nach oben steht. Durch Einblasen in die erste Röhre kann die Flüssigkeit ohne Aufwirbeln des Niederschlages herausgedrückt werden. 5 ccm Wasser werden an der Wand des Röhrchens herunterfließen gelassen und mischen sich mit dem Reste der noch darin befindlichen Flüssigkeit. Man trachte danach, den Niederschlag so wenig als möglich aufzuwirbeln, indem man das Röhrchen vertikal hält und ganz gelinde schüttelt. Nun wird 5 Minuten zentrifugiert und das beschriebene Entfernen der Flüssigkeit und Waschen noch 3 mal wiederholt. Nach Abgießen des letzten Waschwassers wird in folgender Weise titriert: Ein Überschuß von 0,02 n-Permanganat wird zugesetzt (2 ccm genügen bei normalem Blut), dann 1 ccm etwa 4 n- $H_2SO_4$ . Mittels eines Glasstabes wird nun gut durchgemischt, das Röhrchen im siedenden Wasserbade 1 Minute lang erhitzt, worauf die Lösung klar und noch rosa sein soll. Wenn nicht aller Niederschlag oxydiert ist, erscheint die Flüssigkeit wolkig. Das Erhitzen muß dann noch weiter fortgesetzt werden. Wurde zu lange erhitzt, so trübt sich die Flüssigkeit neuerdings und bekommt einen bräunlichen Ton, in diesem Falle ist die Probe unbrauchbar geworden. Zu der rosafarbenen Flüssigkeit setzt man nun eine genau abgemessene Menge der 0,01 n-Natriumoxalatlösung (etwa 2 ccm), um die Flüssigkeit vollkommen zu entfärben. Der Überschuß an Oxalat wird durch Titration mit 0,02 n-Kaliumpermanganat aus der Mikrobürette ermittelt.

**Berechnung.** 1 ccm 0,01 n- $KMnO_4$  oxydiert eine Menge Kaliumkobaltnitrit entsprechend 0,071 mg K. Wenn z. B. 2 ccm 0,02 n- $KMnO_4$  ursprünglich zugesetzt wurden, 0,43 ccm der gleichen Lösung bei der Endtitration benutzt wurden und 2 ccm 0,01 n-NaOxalat notwendig waren, um die Lösung das erste mal zu entfärben, so berechnet sich die Menge K wie folgt:

2,43—0,03 (die Menge, um die gleiche Menge Wasser zu färben)  $\times$  2 (0,02 in 0,01 n verwandelt) — 2,00 (Kubikzentimeter 0,01 n-NaOxalat, die zugefügt wurden, um die Probe zu entfärben)  $\times$  0,071 = 0,199 mg K in der Probe.

**Calcium.** Erforderliche Lösungen. Das einzige Reagens, welches absolut genau hergestellt werden muß, ist eine 0,01 n-Natriumoxalatlösung. Sie wird benutzt, um den Titer der Permanganatlösung zu stellen. Man bereitet zunächst eine 0,1 n-Oxalatlösung und erleichtert die Auflösung des Oxalats durch Zusatz von 5 ccm konzentrierter  $H_2SO_4$ . Diese Lösung wird dann

auf das Zehnfache verdünnt und ist einige Monate lang haltbar. Ferner gesättigte Ammoniumoxalat-, gesättigte und filtrierte Natriumacetatlösung und 2proz. Ammoniakflüssigkeit (2 ccm konzentriertes Ammoniak auf 100 ccm Wasser), annähernd  $n\text{-H}_2\text{SO}_4$  und  $0,01\text{ n-KMnO}_4$ .

**Ausführung.** 4 ccm der vorbereiteten Flüssigkeit (oder 2 ccm Serum) werden in ein graduiertes Zentrifugenröhrchen gefüllt, das mit Schwefelchromsäure sorgfältig gereinigt war und zuerst 1 ccm gesättigte Ammoniumoxalatlösung, dann 2 ccm einer gesättigten und filtrierten Natriumacetatlösung zugesetzt. Nach Mischen und 1stündigem Stehen füllt man mit Wasser auf 6 ccm auf, mischt und zentrifugiert 15 Minuten lang bei ca. 1300 Touren in der Minute. Es fällt Calciumoxalat. Es wird alles in der bei Kalium angegebenen Weise bis auf 0,3 ccm entfernt, der Niederschlag und die restierende Flüssigkeit durch Schütteln gemischt. Nach Zufügen der 2proz. Ammoniakflüssigkeit bis zu 4 ccm (wobei Sorge zu tragen ist, daß die Wände des Röhrchens von anhaftender Oxalsäure befreit werden) zentrifugiert man wieder 5 Minuten und wiederholt diese Prozedur des Waschens mit Ammoniak noch 2mal. Nach Abgießen der dritten Waschflüssigkeit wird geschüttelt und der Niederschlag in der Flüssigkeit suspendiert, 2 ccm etwa  $n\text{-H}_2\text{SO}_4$  zugesetzt, im kochenden Wasserbade erwärmt und mit  $0,01\text{ n-Kaliumpermanganat}$  titriert, bis eine definitive Rosafärbung mindestens 1 Minute lang bestehen bleibt, wenn die Flüssigkeit gegen einen weißen Untergrund betrachtet wird.

**Berechnung.** Die Anzahl der Kubikzentimeter verbrauchter Permanganatlösung minus dem Volumen der gleichen Permanganatlösung, welche notwendig ist, um in der gleichen Menge Wasser dieselbe Farbintensität zu erzeugen, mit 0,2 multipliziert, ist gleich der Anzahl von Milligramm Ca in der angewandten Menge Blut oder Serum.

**Magnesium<sup>1)</sup>.** Erforderliche Lösungen. 1. Standardlösung von Ammoniummagnesiumphosphat. 0,102 g lufttrockenes  $\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{ H}_2\text{O}$  werden in 100 ccm  $0,1\text{ n-HCl}$  gelöst und auf ein Liter verdünnt. Von dieser Lösung entspricht 1 ccm 0,01 mg Mg. Das Magnesiumammoniumphosphat verliert sein Krystallwasser beim Erhitzen und muß darum bei Zimmertemperatur getrocknet werden.

2. Ammoniumphosphatlösung. 25 g  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  in 250 ccm Wasser gelöst. Zur Lösung 25 ccm konzentriertes  $\text{NH}_3$  zugefügt, über Nacht stehen gelassen, am nächsten Tage filtriert und der Überschuß des Ammoniaks durch Kochen entfernt. Nach dem Abkühlen mit Wasser auf 250 ccm aufgefüllt und mit 5 Teilen Wasser verdünnt.

3. EisenthioeyanatLösung. Die Lösung wird aus zwei Lösungen bereitet, welche 1 Stunde vor Gebrauch gemischt werden:

A. 0,3proz. Ammoniumrhodanatlösung.

B. 0,3proz. Ferrichloridlösung.

Je 5 ccm von A. und B. werden gemischt und das Ganze auf 40 ccm verdünnt.

4. 10proz. Ammoniakflüssigkeit. 100 ccm konzentriertes Ammoniak werden auf ein Liter verdünnt.

**Ausführung.** 5 ccm der bei der Ca-Bestimmung abgeheberten Flüssigkeit (die, wenn man von 2 ccm Serum ausgegangen, 1,66 ccm Serum entsprechen) werden in ein 30 ccm fassendes Becherglas gebracht. Man setzt 1 ccm Ammoniumphosphatlösung und 2 ccm konzentriertes Ammoniak zu, filtriert am nächsten Tag durch einen gut gedichteten Goochtiegel und wäscht 10 mal mit 5 ccm der 10proz. Ammoniakflüssigkeit und dann 2 mal mit 95proz. Alkohol, den man durch Zusatz von Ammoniak alkalisch gemacht hat. Dann wird der Tiegel in das Becherglas zurückgebracht und bei  $80^\circ$  einige Minuten lang im Trockenschrank getrocknet. Man bringt jetzt 10 ccm  $0,01\text{ n-HCl}$  dazu, führt nach einigen Stunden das ganze Material aus Tiegel und Becherglas in eine Zentrifugenröhre über, zentrifugiert und füllt 5 ccm der überstehenden Flüssigkeit in eine Colorimeterröhre mit flachem Boden, die eine Marke für 10 ccm

<sup>1)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 47, S. 476. 1921.

trägt und in die man schon vorher 2 ccm Eisenthiocyanatlösung gebracht hat. Nach Auffüllen mit 0,01 n-HCl auf 10 ccm und Verschließen mit einem Gummistopfen wird gemischt. Andererseits hat man sich eine Serie von Standardlösungen bereitet durch Zufügen verschiedener Mengen Ammoniummagnesiumphosphatstandardlösung zur Thiocyanatlösung und Auffüllen bis auf 10 ccm (gleich wie in der zu untersuchenden Probe). Die Farben werden nun gegen einen weißen Untergrund verglichen, indem man durch die ganze Länge der Flüssigkeitssäulen vergleicht.

Berechnung. Die Anzahl der Kubikzentimeter der Standardlösung, die gleiche Farbintensität mit der Probe hatte, multipliziert mit

$$\frac{0,01 \times 2 \times \frac{8}{5} \times 100}{\text{Anzahl der Kubikzentimeter Blut, die für die Ca-Bestimmung benutzt wurden.}} = \text{Milligramm Mg in 100 ccm Blut.}$$

Im Serum ist die Berechnung wie folgt: Die Anzahl der Kubikzentimeter der Standardlösung multipliziert mit  $0,01 \times 2 \times \frac{6}{5} \times 50 =$  Milligramm Mg in 100 ccm, wenn 2 ccm Serum verwendet wurden.

Es wurden in 100 ccm Blut gefunden: 170—225 mg Na, 153—201 mg K, 5,3—6,8 mg Ca, 2,3—4 mg Mg.

Die Schwankungen sind im Blute größer als im Serum, offenbar infolge des wechselnden Gehaltes an Blutkörperchen.

Wegen weiterer Methoden zur Bestimmung des Magnesiums s. Briggs<sup>1)</sup>, Hammet und Adams<sup>2)</sup>, Weitere Methoden zur Bestimmung des Magnesiums.

#### *Colorimetrische Bestimmung von Magnesium in kleinen Blutmengen*<sup>3)</sup>.

689. Prinzip. Im Filtrat der Calciumfällung wird das Magnesium als Magnesiumammoniumphosphat gefällt, die Phosphorsäuremenge des Niederschlages zur Bildung von Phosphorwolframsäure benutzt und dessen Menge durch die Blaufärbung des Reaktionsproduktes gemessen, das mit Hydrochinon aus ihr entsteht.

Erforderliche Lösungen. 1. Molybdänsäurelösung. 50 g Ammoniummolybdat ohne Wärme in 1 l phosphorsäurefreier  $\frac{2}{1}$ -Schwefelsäure lösen. Die Lösung ist dauernd haltbar. Sie muß im Blindversuch farblos bleiben. Ist das nicht der Fall, so muß die Phosphorsäure zunächst aus dem Molybdat entfernt werden. Das geschieht, indem es in Salpetersäure in der Wärme gelöst, mit Ammonnitrat versetzt wird, nach mehrtägigem Stehen in der Wärme wird vom phosphormolybdänsauren Ammonium abgetrennt, das Filtrat mit dem doppelten Volumen Alkohol versetzt und mit Ammoniak gegen Lackmus schwach sauer gemacht. Das Ammonmolybdat fällt aus, wird abfiltriert, mit 50 proz. Alkohol gewaschen und getrocknet.

2. Hydrochinonlösung. 20 g werden unter Zusatz von 1 ccm konzentrierter  $\text{H}_2\text{SO}_4$  zu 1 l gelöst. Die Lösung ist verschlossen zu halten. Zu stark gefärbte Lösungen sind zu verwerfen.

3. Carbonatsulfitlösung. Zu 2000 ccm einer 20 proz. Lösung von Soda (wasserfrei) werden 75 g Natriumsulfit, gelöst in 500 ccm Wasser, gegeben und filtriert. Geringer Gehalt von Phosphat stört nicht, da die komplexe Säure sich bei alkalischer Reaktion nicht bildet.

4. Vergleichslösung. Magnesiumammoniumphosphat in 0,1 n-Salzsäure gelöst. 5 ccm sollen 0,010 mg Mg enthalten. Der Magnesiumgehalt der Lösung wird durch Wägen des Glührückstandes bestimmt. 1 Tl. Mg entspricht 4,581 Tln.  $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$  und 5,971 Tln.  $\text{MgNH}_4\text{PO}_4 + 6 \text{H}_2\text{O}$ .

5. 5 proz. Lösung von Ammoniumphosphat.

6. Konzentriertes Ammoniak.

Ausführung. Erforderlich ist das calciumfreie Filtrat einschließlich der oxalathaltigen Waschwässer von etwa 2,00 ccm Blut oder Serum; sie werden auf einige Kubikzentimeter eingengt, in ein Zentrifugenglas gebracht, mit 0,5 ccm Ammoniumphosphat und 2 Tropfen konzentriertem Ammoniak versetzt und wenigstens 10 Stunden stehen gelassen. Zentrifugieren, die überstehende Flüssigkeit abhebern, 3 mal mit 5 ccm verdünntem Ammoniak (1:2) auf der Zentrifuge

<sup>1)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 52, S. 349. 1922.      <sup>2)</sup> desgl. Bd. 52, S. 211. 1922.

<sup>3)</sup> Denis: Journ. of biol. chem. Bd. 52, S. 411. 1922; s. auch Briggs: desgl. Bd. 52, S. 349. 1922. — Kleinmann: Biochem. Zeitschr. Bd. 99, S. 56. 1919.

waschen, zum Schluß 1 mal mit 75 proz. Alkohol, dem auf 1 l 10 ccm konzentriertes Ammoniak zugesetzt sind. Nach Abhebern wird der Rest des Ammoniaks in der Wärme verjagt, der Rückstand mit Hilfe von im ganzen 10 ccm 0,1 n-Salzsäure gelöst und in 25-cm-Meßkolben übergeführt. Zur colorimetrischen Bestimmung werden nacheinander 1 ccm Molybdänsäure, 2 ccm Hydrochinon zugesetzt und 10 Minuten später 10 ccm der Carbonatsulfitlösung. Es wird aufgefüllt, gemischt und nach 5–10 Minuten mit 10 ccm der Standardlösung verglichen, die zur gleichen Zeit angesetzt worden ist.

**Bestimmung des Calciums in wenig Blut, Plasma und Serum nach Clark<sup>1)</sup>.**

690. Erforderliche Lösungen. 1.  $\frac{n}{100}$ -Kaliumpermanganatlösung; 2. 1 proz. Ammoniumchloridlösung; 3. Schwefelsäure (annähernd normal); 4. 20 proz. Natriumacetatlösung; 5. 3 proz. Ammonoxalatlösung; ferner ein Zentrifugenglas von 50 ccm, Ende konisch verjüngt.

Ausführung. Man füllt 5 ccm Blut (Plasma, Serum) mit einer Pipette in einen 25-cm-Meßkolben, fügt mit derselben Pipette 2 mal 5 ccm Wasser von etwa 65° zu, mischt, läßt 29 Minuten stehen, gibt 5 ccm 1 proz. Ammonchloridlösung zu, füllt mit Wasser zur Marke auf, mischt gut, gießt die Flüssigkeit in ein 50-cm-Zentrifugenglas, verschließt dieses zum Schutze gegen Verdunstung und Staub mit einer Kautschukkappe und zentrifugiert 20 Minuten stark. Von der überstehenden Flüssigkeit wird mit einer Pipette eine Menge von 15 oder wenn möglich 20 ccm in ein zweites Zentrifugenglas gebracht, unter schwachem Schütteln mit 4 ccm 3 proz. Ammonoxalatlösung versetzt und nach gutem Mischen über Nacht stehen gelassen. Nachdem der an der Wand haftende Niederschlag mit Wasser und einem mit Kautschukkappe versehenen Glasstab heruntergespült ist, zentrifugiert man wieder, hebt die klare überstehende Flüssigkeit vollkommen ab, wirbelt den Niederschlag mittels eines feinen Strahls kalten Wassers auf, spritzt die Wände ab (nicht mehr als 35 ccm Wasser), zentrifugiert und hebert wieder ab. Der in 5 ccm  $H_2SO_4$  (Lösung 3) aufgelöste Niederschlag wird nach Erwärmen auf 75° mit  $\frac{n}{100}$ -Permanganat titriert.

Berechnung. 1 ccm  $\frac{n}{100}$ - $KMnO_4$  entspricht 0,2 mg Ca. Hat man 15 ccm des Zentrifugates verwendet, so ist die Menge Calcium in Milligrammen in 100 ccm Blut, Serum, Plasma: 
$$\frac{\text{Anzahl der verbrauchten ccm } \frac{n}{100}\text{-KMnO}_4 \cdot 0,2 \cdot 100}{3}$$

bei 20 ccm des Zentrifugates:

$$\frac{\text{Anzahl der verbrauchten ccm } \frac{n}{100}\text{-KMnO}_4 \cdot 0,2 \cdot 100}{4}$$

**Bestimmung der Alkalireserve des Blutes nach v. Slyke und Cullen<sup>2)</sup>.**

691. Prinzip. Wird Blut mit  $CO_2$  gesättigt, dann angesäuert, im Vakuum entgast und die Menge der entstandenen  $CO_2$  gemessen, so läßt sich aus dieser Menge berechnen, wieviel Alkali im Blute zur Bindung von Säuren vorhanden war. Eine genaue Beschreibung dieser Methode findet sich in dem Heftchen von Mandel und Steudel.

**Colorimetrische Bestimmung des Eisens in kleinen Blutmengen nach Berman<sup>3)</sup>.**

692. Prinzip. Das Eisen wird aus seiner Verbindung durch konzentrierte HBr abgespalten, nachdem die organische Verbindung durch Oxydation mit  $KMnO_4$  zerstört worden ist, und nach Zusatz von Ammonrhodanat und Aceton colorimetrisch bestimmt.

Erforderliche Lösungen. 1. Die Bromwasserstoffsäure soll etwa 34% HBr enthalten. Wenn die zwei zugesetzten Tropfen zur Klärung der Probe (s. bei „Ausführung“) nicht genügen, kann man einen dritten Tropfen zusetzen. Dieser muß dann aber auch zur Standardlösung gegeben werden.

2. 0,1 n-Permanganatlösung. Durch einen Blindversuch überzeuge man sich von der Eisenfreiheit, sonst ist es durch Umkrystallisieren zu reinigen.

<sup>1)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 49, S. 487. 1921.

<sup>2)</sup> desgl. Bd. 30, S. 289, 347. 1917.

<sup>3)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 35, S. 231. 1918.

3. Eisenstandardlösung. 4,355 g chemisch reines Ferrichlorid  $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  werden in 1 l Wasser gelöst. Man verdünnt von dieser Lösung 1 ccm auf 100 und erhält so eine Lösung, welche 0,009 mg Fe in 1 ccm enthält.

4. 5 n-Rhodanammiumlösung.

5. 0,1 n-Salzsäure.

Ausführung. 0,040 ccm Blut, in gewöhnlicher Weise der Fingerbeere oder dem Ohrläppchen entnommen und mit calibrierter Pipette abgemessen, werden mit 2 ccm Wasser, 0,2 ccm  $\frac{n}{10}$ -HCl und 2 ccm  $\frac{n}{10}$ - $\text{KMnO}_4$  gemischt und für 2 Minuten in ein Wasserbad gestellt, bis ein bräunliches Koagulum entsteht und die überstehende Flüssigkeit schwach gelblich gefärbt ist. Nach Zusatz von 2 Tropfen der Bromwasserstoffsäure läßt man noch 2 Minuten im Wasserbade und erhält so eine wasserklare Flüssigkeit, in der nur wenig Flocken schwimmen und die durch ein Analysenfilter in einen engen 20-ccm-Meßzylinder filtriert und bis zu 5 ccm nachgewaschen wird. Nun folgt ein Zusatz von der Rhodanammiumlösung bis auf 10 und von Aceton bis auf 20 ccm. Man verschließt den Zylinder, mischt, füllt wieder mit Aceton auf 20 ccm auf und mischt. Es entwickelt sich eine rote Farbe. Gleichzeitig stellt man eine Vergleichslösung her durch Zusatz von 2 Tropfen der Bromwasserstoffsäure zu 2 ccm der Eisenstandardlösung, 4 Minuten langes Erwärmen auf dem Wasserbad, Auffüllen mit Wasser bis auf 5 ccm, Zusatz von 5 ccm Rhodanlösung und 10 ccm Aceton usw., genau so, wie für die Lösung, deren Eisengehalt bestimmt werden soll, beschrieben. Beide Zylinder bleiben 5 Minuten stehen. Man vergleicht die Lösungen am besten im Duboscq'schen Colorimeter, indem man die Standardlösung auf 10 setzt.

Berechnung.  $\frac{10}{R} \cdot 45 = \text{Anzahl Milligramm Fe in 100 ccm Blut.}$

Die Vergleichung muß rasch ausgeführt werden, da das Aceton an der Luft verdampft.

***Bestimmung der Sulfate in kleinen Mengen Blut und Plasma nach Denis<sup>1)</sup>.***

693. Prinzip. Das Blut oder Plasma wird nach Schenck enteiweißt und in dem Filtrate ein Niederschlag von  $\text{BaSO}_4$  erzeugt, der nephelometrisch gemessen wird.

Erforderliche Lösungen. 1.  $\frac{1}{50}$  n-Salzsäure. 2. Salzsäure Sublimatlösung. Zu 5 proz. Sublimatlösung setzt man auf je 1 Liter 5 ccm konzentrierte Salzsäure vom spez. Gew. 1,178. 3. 1 proz. Ammoniumnitratlösung. 4. 1 proz. Bariumchloridlösung, die im Liter 5 ccm konzentrierte Salzsäure enthält. 5. Kaliumsulfatvergleichslösung: 5,4370 g reinstes umkrystallisiertes  $\text{K}_2\text{SO}_4$  werden zu 1 Liter gelöst. 6. 5 proz. Bariumchloridlösung.

Ausführung. 10 ccm Citratblut oder Plasma werden mit dem gleichen Volumen  $\frac{1}{50}$  n-HCl und nach 5 Minuten mit 30 ccm der salzsauren Sublimatlösung versetzt. Nun wird stark geschüttelt, 1 Stunde stehen lassen und filtriert. 10 ccm des klaren Filtrates werden in einem 100 ccm fassenden Becherglase mit 5 ccm der Ammoniumnitratlösung versetzt und unter Umrühren 5 ccm der  $\text{BaCl}_2$ -Lösung zugegeben. Nach 10 Minuten vergleicht man die gebildete Trübung im Nephelometer mit einer Standardlösung. Zu 10 ccm dieser Vergleichslösung von Kaliumsulfat (enthaltend 0,10 mg Schwefel) werden 10 ccm der salzsauren  $\text{HgCl}_2$ -Lösung, 10 ccm 1 proz. Ammoniumnitratlösung und 10 ccm einer 5 proz.  $\text{BaCl}_2$ -Lösung zugesetzt.

Berechnung. Man stelle die Vergleichslösung auf 20.

$\frac{20}{\text{abgelesenen Stand der Probe}} \times 50 = \text{mg Schwefel in 100 ccm Blut.}$

<sup>1)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 49, S. 311. 1921.

**Bestimmung der Chloride in kleinen Mengen Blut und Plasma nach Austin und v. Slyke<sup>1)</sup>.**

694. Prinzip. Das durch Wasser hämolysierte Blut oder Plasma wird mit Pikrinsäure enteiweißt, das Filtrat mit überschüssiger Silbernitratlösung versetzt, der Niederschlag von Chlorsilber abfiltriert und der Überschuß des Silbers im Filtrat mit Jodkalium zurücktitriert.

Erforderliche Lösungen: 1. Kaltgesättigte wässrige Pikrinsäure.

2. Silberlösung. 5,812 g  $\text{AgNO}_3$  und 250 ccm konzentrierte  $\text{HNO}_3$  auf 1 l aufgefüllt.

3. Stärkelösung. 2,5 g lösliche Stärke in 500 ccm kochendem Wasser gelöst, nach einigen Minuten Kochens 446 g kristallisiertes Natriumcitrat und 20 g Natriumnitrit zugegeben, noch heiß durch Watte filtriert und auf 1 l aufgefüllt.

4. Jodkaliumlösung. 3 g KJ in 1 l Wasser. Sie ist gegen die Silberlösung einzustellen und so zu verdünnen, daß 10 ccm genau 5 ccm der Silberlösung entsprechen. Das Einstellen erfolgt in der Weise, daß 5 ccm Silberlösung mit 5 ccm Stärkelösung versetzt werden und bis zur Blaufärbung mit der KJ-Lösung titriert wird.

Ausführung. 3 ccm Blut oder Plasma werden in ein 60-ccm-Meßkölbchen gebracht, nach Zufügen von 15 ccm Wasser mit 30 ccm (bei Plasma mit 10 ccm) Pikrinsäurelösung versetzt und zur Marke mit Wasser aufgefüllt. Man mischt, filtriert nach 10 Minuten, vermischt 40 ccm des Filtrats mit 10 ccm der Silberlösung und 2 Tropfen Amylalkohol, dekantiert am nächsten Tag von dem Chlorsilber vorsichtig ab und filtriert die abdekantierte Flüssigkeit. 20 ccm dieses Filtrates werden mit 4 ccm Stärkelösung gemischt und mit der KJ-Lösung zur bleibenden Blaufärbung titriert (1 ccm der KJ-Lösung = 1 mg NaCl).

Berechnung: Die benutzten 20 ccm Filtrat entsprechen 0,8 ccm Blut. Die Differenz zwischen 8 und der Anzahl der verbrauchten Kubikzentimeter KJ-Lösung ist gleich der Menge Chlornatrium in mg in 0,8 ccm Blut.

**Colorimetrische Bestimmung des Phosphors (Phosphorsäure) in kleinen Mengen Harn und Blut nach Bell und Doisy<sup>2)</sup>.**

695. Prinzip. Die Methode beruht auf der Beobachtung, daß gewisse reduzierende Substanzen, wie z. B. Hydrochinon, Molybdänsäure nicht reduzieren, wohl aber Phosphormolybdänsäure. Bei dieser Reduktion entsteht eine blaue Färbung, die colorimetrisch gemessen wird.

Erforderliche Lösungen. 1. Molybdänsäure. 50 g reines Ammoniummolybdat werden, ohne zu erhitzen, in 1 l phosphorfreier n- $\text{H}_2\text{SO}_4$  gelöst. 5 ccm der Lösung mit dem gleichen Volumen der unten beschriebenen Hydrochinonlösung und nach 5 Minuten mit 25 ccm der Carbonat-Sulfitlösung (s. unten) versetzt, müssen vollständig farblos bleiben. Wenn Färbung eintritt (Phosphatgehalt), muß das Molybdat zunächst gereinigt werden. Zu dem Zwecke löst man 150 g in 1 l Wasser, fügt 375 ccm konzentrierte Salzsäure (spez. Gew. 1,42), die auf 1 l verdünnt sind, hinzu, löst in dieser Mischung 200 g Ammoniumnitrat und läßt einige Tage an einem warmen Orte stehen. Nachdem das ausgefällte Ammoniumphosphormolybdat abfiltriert ist, wird das Filtrat mit 2 Volumen Alkohol versetzt und dann mit Ammoniak bis zur ganz schwach sauren Lackmusreaktion gebracht. Das Molybdat fällt in wenigen Minuten aus, wird abfiltriert, mit 50 proz. Alkohol gewaschen und getrocknet. Die oben angeführte Lösung hält sich unbegrenzt. Geringe Niederschläge, die sich mit der Zeit bilden, trennt man durch Dekantation.

2. Hydrochinonlösung. Siehe § 689.

3. Carbonat-Sulfitlösung. Siehe § 689.

4. Stammlösung von Monokaliumphosphat. 4,394 g reines Monokaliumphosphat, feinst gepulvert und im Exsiccator über  $\text{H}_2\text{SO}_4$  einige Tage getrocknet, werden zu 1 l in einem Meßkolben gelöst; 1 ccm dieser Lösung entspricht 1 mg Phosphor. Die Lösung wird mit Chloroform konserviert und sorgfältigst verschlossen gehalten.

5. Standard-Phosphatlösung für Harn. Genau 50 ccm der Lösung 4 werden auf genau 500 ccm verdünnt und mit Chloroform konserviert. Sobald sie sich trübt, ist sie zu verwerfen. 5 ccm dieser Lösung entsprechen 0,5 mg Phosphor.

6. Standard-Phosphatlösung für Blut. 5 ccm der Stammlösung 4 werden auf 1 l verdünnt, sonst wie Lösung 5. 5 ccm dieser Lösung entsprechen 0,025 mg Phosphor.

<sup>1)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 41, S. 345. 1920; Bd. 45, S. 461. 1920/21.

<sup>2)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 44, S. 55. 1920.

**Bestimmung im Harn.** a) Anorganischer Phosphor: In einen 100-ccm-Meßkolben bringe man genau 1—5 ccm Harn, in einen zweiten gleichen 5 ccm der Standardlösung 5, füge zu jedem hinzu je 25 ccm Wasser, 5 ccm der Molybdänsäurelösung und 5 ccm der Hydrochinonlösung und nach 25 Minuten je 25 ccm der Carbonatsulfitlösung, fülle mit Wasser bis zur Marke und mische. Die Lösungen sind nach 10 Minuten zur Bestimmung bereit. Zum Vergleich im Colorimeter müssen beide Lösungen zur gleichen Zeit in das Colorimeter eingefüllt werden. Man stelle die Standardlösung auf 20 mm ein (Duboscq'scher Apparat).

Berechnung. 
$$\frac{10}{\text{abgelesene Zahl} \times \text{Kubikzentimeter angew. Harn}} = \text{Gramm anorganischen Phosphors im Liter.}$$

b) Gesamtphosphor: 1 ccm Harn wird mittels einer Ostwaldschen Pipette in ein Hartglasreagensrohr gemessen, 6—8 Tropfen konzentrierter  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 1 ccm konzentrierter  $\text{HNO}_3$  und 1 Quarzkörnchen zugefügt. Die Röhre wird vorsichtig erhitzt, solange noch nitrose Dämpfe entweichen und nicht länger als die zurückdestillierenden Säuretropfen farblos sind. Auf keinen Fall darf zur Trockne erhitzt werden und Überhitzung der Wandung eintreten. Das Veraschungsgemisch wird mit etwa 25 ccm Wasser in ein 100-ccm-Meßkölbchen gebracht; in ein gleiches Kölbchen füllt man 6 Tropfen konzentrierte  $\text{H}_2\text{SO}_4$  und (je nach der Menge der gefundenen anorganischen Phosphorsäure) 2, 3 oder 5 ccm der Standardphosphatlösung 5 und das gleiche Volumen Wasser wie in der Probe. Nun verfährt man genau so wie bei der Bestimmung des anorganischen Phosphors.

Berechnung. 
$$\frac{2 \text{ mal Kubikzentimeter der angew. Standardlösung}}{\text{abgelesene Zahl}} = \text{Gramm Gesamtphosphor im Liter.}$$

c) Organischer Phosphor: Wie Taylor und Miller gefunden haben, ist es nicht möglich, den organischen Phosphor durch Subtraktion des anorganischen Phosphors vom Gesamtphosphor zu bestimmen, weil der Unterschied zu gering ist. Es wird deshalb der anorganische Phosphor mit Barium gefällt und der organische Phosphor im Filtrat bestimmt.

20 ccm Harn werden in ein 25-ccm-Meßkölbchen gemessen und mit gepulvertem Barythydrat gerade alkalisch gemacht, zur Marke aufgefüllt und filtriert. 20 ccm des Filtrats wieder in ein 25-ccm-Meßkölbchen gefüllt, mit verdünnter  $\text{H}_2\text{SO}_4$  gerade sauer gemacht, zur Marke aufgefüllt und filtriert. Ein Überschuß an  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ist zu vermeiden. 1 ccm dieses zweiten Filtrats entsprechen 0,64 ccm Harn. 10 ccm dieses Filtrats (6,4 ccm Harn) kocht man mit 10 Tropfen konzentrierter  $\text{H}_2\text{SO}_4$  auf 2 ccm ein, verascht nach Zusatz von 2 ccm konzentrierter Salpetersäure, wie früher beschrieben, und führt den Rückstand in ein 25-ccm-Kölbchen mit Hilfe von 10 ccm Wasser über. In einem gleichen 25-ccm-Kölbchen mißt man 5 ccm der verdünnten Standardlösung 6 für Blut, 6 Tropfen konzentrierter  $\text{H}_2\text{SO}_4$  und 5 ccm Wasser ab. In beide Kölbchen bringt man je 1 ccm Molybdänlösung, je 2 ccm Hydrochinon, nach 5 Minuten je 10 ccm Carbonat-Sulfitlösung und füllt mit Wasser bis zur Marke. Nun wird colorimetriert, nur mit dem Unterschied, daß man die Standardlösung auf 40 mm einstellt.

Berechnung. 
$$\frac{1000}{\text{abgelesener Stand} \times 6,4} = \text{Milligramm organischen Phosphors im Liter.}$$

**Bestimmung im Plasma oder Blut.** Es wird mit Trichloressigsäure enteweißt. Man bringt 5 ccm Plasma in ein 25-ccm-Meßkölbchen, fügt 15 ccm Wasser und

unter Umschütteln 2,5 ccm 20 proz. Trichloressigsäure hinzu, füllt mit Wasser zur Marke auf, mischt und filtriert nach 10 Minuten durch ein phosphatfreies Filter. Wenn das ganze Blut benutzt wird, werden 5 ccm mit 40 ccm Wasser hämolytisiert und in einem 50-ccm-Meßkölbchen mit 5 ccm 20 proz. Trichloressigsäure unter Schütteln gefällt. Auffüllen zur Marke und filtrieren nach 10 Minuten.

1. Anorganischer Phosphor. 10 ccm des Trichloressigsäurefiltrates werden in ein 25-ccm-Kölbchen gemessen und dazu 1 ccm Molybdänsäurereagens und 2 ccm Hydrochinon gegeben. Zur gleichen Zeit Ansetzen einer Kontrolllösung, in der 10 ccm der Standardphosphorlösung für Blut 6 und gleiche Mengen von Molybdän- und Hydrochinonlösung enthalten sind, und entweder 1 oder 2 ccm 20 proz. Trichloressigsäurelösung, je nachdem man entweder, wie vorher angegeben, auf 1:10 oder auf 1:5 verdünnt hat. Nach 5 Minuten Zusatz von je 10 ccm Carbonat-Sulfitlösung, Auffüllen zur Marke und mischen. Nach 10 Minuten wird colorimetriert. Man setze wieder die Standardlösung auf 20 mm.

Berechnung.  $\frac{100}{\text{abgelesene Zahl}} = \text{Milligramm Phosphor in 100 ccm, wenn}$

auf 1:10 verdünnt wurde, und  $\frac{50}{\text{abgelesene Zahl}} = \text{Milligramm Phosphor in}$   
100 ccm, wenn auf 1:5 verdünnt wurde.

2. Gesamtsäurelöslicher Phosphor. Dieser wird in ähnlicher Weise wie der Gesamtphosphor im Harn bestimmt. 10 ccm des Trichloressigsäurefiltrates werden in einem Hartglasreagensrohr auf 2 ccm eingedampft, mit 8 Tropfen konzentrierter  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 1 ccm konzentrierter  $\text{HNO}_3$  unter Zusatz eines Quarzstückchens verascht. Der Rückstand wird in ein 25-ccm-Meßkölbchen mit etwa 10 ccm Wasser übergeführt und weiter behandelt wie bei der Bestimmung des anorganischen Phosphors. Zur Standardlösung setzt man dann 6 Tropfen konzentrierter  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , aber keine Trichloressigsäure zu, da diese bei der Veraschung verflüchtigt ist.

#### *Colorimetrische Phosphorsäurebestimmung in kleinen Serummengen nach Tisdall<sup>1)</sup>.*

696. Prinzip. Ähnlich wie im Verfahren von Bell und Doisy (§ 695) wird die Phosphorsäure als Strychninphosphormolybdat isoliert und die Reduktion der Molybdänsäure durch Kaliumferrocyanid herbeigeführt. Die dabei entstehende grüne Färbung wird colorimetriert. Die Methode liefert ebenfalls gute Resultate.

Erforderliche Lösungen. 1. Strychninmolybdatreagens. Lösung A: hergestellt durch Lösen von 50 g Ammonmolybdat in 150 ccm warmem Wasser und Filtrieren. Lösung B besteht aus 2 Tl. konzentrierter Salzsäure und 1 Tl. Wasser. Lösung C: hergestellt durch Mischen von 1 Tl. A und 3 Tl. B. Lösung D: hergestellt durch Lösen von 7,5 g Strychninnitrat in 500 ccm Wasser unter Erwärmen. Zur Herstellung des Reagens mischt man 1 Vol. D mit 3 Vol. C. Die Mischung muß vor dem Gebrauche 24 Stunden stehen und ist unter Umständen zu filtrieren. Sie ist mindestens 1 Monat haltbar.

2. 29 proz. Ferrocyankaliumlösung. 3. 1 proz. Natronlauge.

4. Standardlösung. Eine Lösung von 219,3 mg  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in 1 l (in 100 ccm 5 mg P).

Ausführung. 1 ccm Serum wird in einer 15-ccm-Zentrifugenröhre mit 5 ccm einer 6 proz. Trichloressigsäure enteiweißt, mit einem Glasstab gemischt und 4 Minuten stehen gelassen. Nach 5 Minuten Zentrifugierens wird die überstehende Flüssigkeit abgehebert und es werden von dieser 5 ccm in einer 15 ccm fassenden graduierten Zentrifugenröhre eingemessen und mit Wasser bis auf 6 ccm aufgefüllt; nun erfolgt tropfenweiser Zusatz von 2 ccm Strychninmolybdatreagens unter Schütteln. Durch Klopfen am unteren Ende des Rohres wird

<sup>1)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 50, S. 329. 1922.



gut gemischt und in den nächsten 10 Minuten nochmals auf gleiche Weise umgeschüttelt. Man zentrifugiert 3 Minuten, entfernt die Flüssigkeit, wischt die Öffnung des Röhrchens mit einem trockenen Tuche ab, läßt an der Wand des Röhrchens 3 ccm Wasser herunterfließen, um alles hinunterzuspülen, mischt gut, wobei der Niederschlag so wenig wie möglich aufgewirbelt werden sollte, zentrifugiert, gießt ab und wiederholt das Waschen nochmals. Nach dem Abgießen des letzten Waschwassers setzt man 2 ccm 1 proz. NaOH zu und mischt mittels eines Glasstabes, wobei der Niederschlag sich löst. Nun werden 10 ccm Wasser zugesetzt und der Inhalt des Röhrchens in ein 100 ccm fassendes, mit Glasstopfen versehenes Meßkölbchen gebracht. Nach 2 maligem Nachspülen mit je 10 ccm Wasser fügt man 20 ccm der 29 proz. Lösung von Ferrocyankalium und 10 ccm konzentrierter Salzsäure hinzu, kehrt das Kölbchen 3 mal um, füllt nach 10 Minuten zur Marke auf, mischt gut und vergleicht im Colorimeter gegen die Standardlösung.

Zu Herstellung der Vergleichslösung wird 1 ccm der Standardlösung in ein graduiertes Zentrifugenröhrchen gemessen, welches 5 ccm Wasser enthält, und der Inhalt gut gemischt, dann werden tropfenweise 2 ccm Strychninmolybdatreagens zugesetzt. Dieser Schritt und die folgende Behandlung werden gleichzeitig und in ganz gleicher Weise mit der Probe ausgeführt. Die Menge des Präcipitates in der Standardlösung beträgt nach dieser Arbeitsweise genau 0,1 ccm. Wenn die Menge des Präcipitates in der Probe 0,2 ccm oder mehr beträgt, müßte seine Lösung in 1 % NaOH in aliquoter Weise verdünnt werden. Sollte die Menge in der Probe aber nur 0,5 ccm betragen, so fügt man zu der Lösung in 2 ccm 1 proz. NaOH nur 5 ccm Wasser und überführt in ein 50-ccm-Meßkölbchen. Naturgemäß sind dann alle weiteren Zusätze auch nur in der Hälfte anzuwenden.

Berechnung. Wurde auf 100 ccm aufgefüllt und die Standardlösung im Colorimeter auf 20 gestellt, so sind  $\frac{20}{\text{abgelesener Stand der Probe}} \times 6 = \text{Milligramm P}$  in 100 ccm Serum. Hat man nur auf 50 verdünnt, dividirt man dieses Resultat durch 2.

Die Werte mit dieser Methode haben eine Genauigkeit von plus oder minus 5%. Normalerweise wurden Mengen von 3,5—4 mg in 100 ccm Serum gefunden.

#### *Gravimetrische Bestimmung kleiner Phosphorsäuremengen nach Embden<sup>1)</sup>.*

697 Prinzip. Das Verfahren beruht auf der Fällbarkeit der  $\text{H}_3\text{PO}_4$  durch Strychnin + Molybdänsäure in wässriger  $\text{HNO}_3$ . Die Zusammensetzung des Niederschlages ist von dem gegenseitigen Verhältnis der Molybdänsäure und des Strychnins in dem verwendeten Reagens abhängig. Mit zunehmender Molybdänsäuremenge werden die zur Ausfällung nötigen Strychninmengen geringer. Bei Verwendung des gleichen Reagens erhält man doch stets einen Niederschlag, der dem gleichen Vielfachen der  $\text{H}_3\text{PO}_4$  entspricht.

Erforderliche Lösung. Man löst 50 g Ammonmolybdat in warmem Wasser, verdünnt auf 150 ccm und läßt 1 Vol. dieser Lösung unter Umschütteln aus einer Pipette in 3 Vol. reiner Salpetersäure einfließen, welche durch Verdünnen von 2 Vol. reiner Salpetersäure (1,40) mit 1 Vol. Wasser hergestellt wurde. Die so erhaltene klare und farblose Lösung bleibt, so lange sie keine Molybdänsäure ausfallen läßt, verwendbar. Das eigentliche Reagens wird erst unmittelbar vor der Benutzung hergestellt, indem man 1 Vol. einer Strychninlösung, die in 1 l 15 g Strychninnitrat (unter Erwärmen gelöst) enthält, in 3 Vol. obiger Lösung unter Schütteln einfließen läßt.

Ausführung. Die Phosphatlösung, in der die Fällung vorgenommen werden soll, soll annähernd 60 ccm betragen und neutral oder schwach sauer reagieren. Organische Substanzen, deren Phosphorsäuregehalt bestimmt werden

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 113, S. 138. 1921.

soll, sind zunächst zu veraschen, und zwar mit dem Neumannschen Säuregemisch (§ 530) (meist 2 ccm). Die Nitrosylschwefelsäure wird durch Kochen nach Wasserzusatz entfernt, die Lösung mit Ammoniak oder reinsten Natronlauge neutralisiert und auf 60 ccm aufgefüllt. Man fügt 20 ccm Fällungsreagens rasch hinzu. Der amorphe Niederschlag wird nach 30—40 Minuten (wiederholtes Schütteln) durch Asbestgoochtiegel, der bei 105—110° getrocknet und gewogen wurde, filtriert und mit 25 ccm einer eisgekühlten Mischung von 5 ccm Fällungsreagens und 20 ccm Wasser in den Tiegel übergeführt und mit eisgekühltem Wasser gewaschen, bis das abfließende Waschwasser blaues Lackmuspapier nicht mehr rötet. Dann wird der Tiegel wieder bei 105—110° getrocknet und gewogen.

Berechnung. Das Gewicht beträgt das 39fache des angewandten  $P_2O_5$ , das 28,24fache der angewandten  $H_3PO_4$  und das 89,32fache des angewandten P.

Das Verfahren liefert genaue Ergebnisse zwischen 1 und 4 mg  $P_2O_5$ . Störend wirken Ca- und Mg-Salze, welche mit dem Reagens Fällung geben. Bis zu einem Gehalt von 0,2%  $CaCl_2$  oder  $MgSO_4$  bleibt diese jedoch aus, wenn die Strychninphosphormolybdatfällung innerhalb 1 Stunde filtriert wird.

Die Mikrobestimmung gestattet die Bestimmung der anorganischen  $H_3PO_4$  in Lösungen, welche noch organische  $H_3PO_4$  (Lactacidogen) enthält, und liefert bei der Anwendung auf Muskelextrakte Werte, welche mit den nach der Makromethode erhaltenen gut übereinstimmen.

Sie läßt sich auch auf Blut übertragen.

*Mikrobestimmung des Stickstoffs im Blut, Serum und Harn nach Kjeldahl.*

698. 1. **Verfahren nach Pregl<sup>1)</sup>**. Das Prinzip ist dasselbe wie bei der Makrobestimmung (§ 558). 3—5 mg Substanz, 0,1—0,2 ccm Harn, Blut usw. werden in einem 50 ccm fassenden Kjeldahlkölbchen mit Schliff verascht, dabei wird 1 ccm konzentrierter  $H_2SO_4$  und je eine Messerspitze Kalium- und Kupfersulfat zugesetzt; außerdem werden, wenn die Flüssigkeit das erstemal klargeworden ist, 2 Tropfen Alkohol \*) zugesetzt und wieder bis zur Aufklärung gekocht. Die Destillation wird durch Durchblasen von Wasserdampf ausgeführt. Zur Titration verwendet man  $\frac{1}{70}$ n-Lösungen und als Indicator eine neutrale Lösung von Methylrot, die man gleich zu beiden Normallösungen zusetzt. Es sei hier nachdrücklichst darauf hingewiesen, daß man mit dieser Methode nur dann genaue Werte erhalten kann, wenn das Destillationsrohr nicht aus Glas, sondern aus Bergkrystall besteht. Bezüglich der Einzelheiten sei auf die Originalvorschrift hingewiesen.

2. **Verfahren mit Durchleiten von Luft nach Folin<sup>2)</sup>**. In einem Kjeldahlkölbchen von 100 ccm Inhalt verascht man 0,1—0,2 ccm Harn, Blut usw. oder etwa 5 mg fester Substanz unter Zusatz je einer Messerspitze Kalium- und Kupfersulfat mit 2 ccm konzentrierter  $H_2SO_4$ . Außerdem setzt man eine kleine Messerspitze Talkum zu. Man erhitzt mit kleiner Flamme bis zur Hellgrünfärbung und dann noch 10 Minuten lang weiter. Nach dem Erkalten verdünnt man mit etwa 20 ccm Wasser und bringt auf den Kjeldahlkolben einen doppelt durchbohrten Kautschukstopfen (s. beistehende Abbildung). In die eine Öffnung des Stopfens führt man ein bis fast zum Boden des Zersetzungskolbens reichendes Rohr und verbindet dieses mittels eines Schlauches mit einer Waschflasche, in der sich  $H_2SO_4$  befindet. In die andere Öffnung des Stopfens bringt man ein rechtwinklig gebogenes Röhrchen, das mittels eines etwa 3 cm langen Schlauchstückchens Glas an Glas mit einem zweiten Röhrchen verbunden ist, das ebenfalls in einem doppelt durchbohrten Kautschukstopfen steckt. Dieser zweite

\*) Statt dessen Perhydrol s. § 579, 4.

<sup>1)</sup> F. Pregl: Die quantitative organische Mikroanalyse. 2. Aufl. S. 113. Berlin: Springer 1922.

<sup>2)</sup> Folin u. Farmer: Journ. of biol. chem. Bd. 11, S. 493. 1912.

Stopfen dient zum Verschluss eines etwa 3 cm weiten und 20 cm hohen Reagensglases. Das vom Zersetzungskolben herkommende Rohr ist unten bis auf 1 mm lichte Weite verjüngt und endet einige Millimeter über dem Boden des Reagensglases. In die zweite Öffnung hat man ein rechtwinklig gebogenes Röhrchen eingeführt, das durch einen Schlauch mit der Wasserstrahlpumpe verbunden wird. Die Durchführung der Destillation des Ammoniaks gestaltet sich nun so: Man mißt in das Reagensglas mittels einer Mikrobürette 10 ccm  $\frac{1}{100}$ n- $\text{H}_2\text{SO}_4$  und 2 Tropfen Methylrotlösung\*). Man stellt nun alle Verbindungen her, saugt mit der Wasserstrahlpumpe einen mäßigen Luftstrom durch den Apparat (etwa 5 Blasen in der Sekunde), entfernt

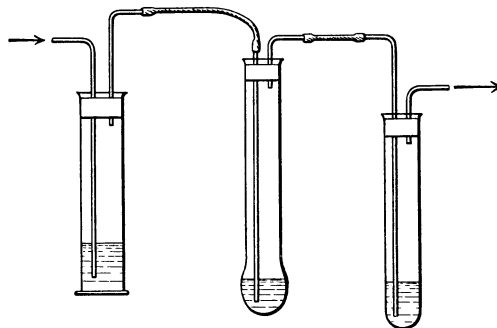


Abb. 36. Durchlüftungsapparat für die Ammoniakbestimmung.

den von der  $\text{H}_2\text{SO}_4$ -Waschflasche in den Kjeldahlkolben führenden Schlauch und setzt auf das zum Boden reichende Rohr einen kleinen Trichter auf, dessen Spitze man so weit ausgezogen hat, das er in das Rohr eingeführt werden kann. Durch den Trichter läßt man nun zu dem Veraschungsgemisch etwa 10 ccm 33 proz. Natronlauge zufließen, entfernt den Trichter, verbindet wieder mit der Waschflasche und saugt 1 Stunde lang Luft durch den Apparat, wobei man den Luftstrom etwas beschleunigen kann und das Austreiben des Ammoniaks gegen Ende der Destillation dadurch unterstützt, daß man den Kjeldahlkolben in ein Becherglas mit bis auf etwa  $60^\circ$  angewärmtem Wasser eintauchen läßt. Auch ist es von Vorteil, das vorgelegte Reagensglas in einen doppelt tubulierten Zylinder einzusenken, durch den man Kühlwasser leitet. Nach 1 Stunde ist das Übertreiben des Ammoniaks beendet. Man entfernt nun die beiden Schlauchverbindungen vom Reagensglas, spritzt das bis zum Boden reichende Rohr (innen und außen) einige Male mit destilliertem Wasser in das Reagensglas ab und titriert mit  $\frac{1}{100}$ n-NaOH bis zur bleibenden Gelbfärbung. Diese Methode stellt eine Kombination der Verfahren von Folin, Pregl, Abderhalden und Fodor dar und liefert bei richtiger Ausführung Werte, die das Makroverfahren an Genauigkeit übertreffen. Durch das Vermeiden einer Dampfdestillation wird der Fehler, der durch die Abgabe von Alkali aus dem Glas bedingt ist, vollkommen ausgeschaltet. Wenn man nur 2 Tropfen Indicator zusetzt, ist der Umschlag in Gelb äußerst scharf und bei Lampenlicht ebensogut erkennbar wie bei Tageslicht.

Das Durchlüftungsverfahren eignet sich natürlich auch für die Bestimmung von Ammoniak (§ 699), Reststickstoff (§ 700) usw.

### 3. Verfahren mit Nesslerisation nach Folin<sup>1)</sup>.

Prinzip. Das übergetriebene Ammoniak wird colorimetrisch an der Färbung ermittelt, die durch Nessler's Reagens hervorgerufen wird. Zum Vergleich dient eine Ammoniumsulfatlösung.

Erforderliche Lösungen. 1. Saure Veraschlösung. 300 ccm 85 proz. Phosphorsäure werden mit 100 ccm konzentrierter  $\text{H}_2\text{SO}_4$  gemischt und nach einer Woche langem Stehen auf je 100 ccm 20 ccm 3 proz. Kupfersulfatlösung zugesetzt.

2. Ammonsulfat-Vergleichslösung. 0,2830 g reines Ammoniumsulfat, das vorher bei  $100^\circ$  getrocknet wurde, werden genau zu 1 l aufgelöst. 5 ccm entsprechen 0,3 mg N.

3. Nessler's Reagens. In einem Becherglase löst man 2400 g reinstes NaOH in 2 l Wasser und füllt die Lösung in eine Flasche, die mit einem doppelt durchbohrten Gummistopfen ver-

\*) Diese wird in folgender Weise hergestellt: 0,1 g Methylrot werden in 300 ccm Alkohol gelöst und 200 ccm Wasser zugesetzt. Die relative Unempfindlichkeit dieses Indicators gegen  $\text{CO}_2$  stellt einen großen Vorteil dar.

<sup>1)</sup> Folin u. Farmer: Journ. of biol. chem. Bd. 11, S. 493. 1912.

geschlossen ist. Durch die eine Bohrung führt man ein rechtwinklig gebogenes Rohr bis fast zum Boden, in der anderen Bohrung steckt ein ebenfalls gebogenes Rohr, das dicht unter dem Stopfen endet. Dieses Rohr ist mit einem Gebläse in Verbindung gebracht, und zwar so, daß zwischen der Flasche und dem Gebläse noch ein T-Rohr eingeschaltet ist, dessen offenes Ende mit einem Natronkalkrohr in Verbindung steht. Wenn man das Gebläse in Betrieb setzt und mit dem Finger das offene Ende des Natronkalkrohres schließt, so wird die Flüssigkeit aus der Flasche herausgedrückt. Aus der Lösung krystallisiert nach einigen Tagen alles Carbonat aus. 800 ccm dieser klaren Lauge verdünnt man mit 3200 ccm Wasser und überzeugt sich durch Titration, daß die erhaltene Lauge wirklich 10 prozentig ist. Andererseits stellt man Jodquecksilberjodkalium auf folgende Art her. 110 g Jod und 150 g Jodkalium werden mit 100 ccm Wasser und 150 g Quecksilber in einem 500 ccm fassenden Kolben 10 Minuten stark geschüttelt. Sobald das Gemisch nur mehr rötlich ist, kühlt man unter fortwährendem Schütteln unter der Wasserleitung ab, bis die Farbe in einen grünlichen Ton umschlägt. Nun gießt man vom überschüssigen Hg ab und wäscht einige Male mit etwas Wasser nach. Lösung und Waschwasser werden in einem 2-l-Meßkolben vereinigt und zur Marke aufgefüllt. 750 ccm dieser Lösung werden unter Umrühren in 3500 ccm der oben beschriebenen 10 proz. Natronlauge eingegossen und mit 750 ccm Wasser auf 5 l verdünnt. Enthält diese Lösung zu wenig Alkali oder ist sie carbonathaltig, so entsteht beim Colorimetrieren eine braunrote Trübung und sie ist in diesem Falle unbrauchbar. Das Reagens ist unbegrenzt haltbar.

**Ausführung.** Die Veraschung wird in einem Reagensrohr aus Hartglas ausgeführt, das eine Marke bei 35 und eine bei 50 ccm trägt. Man mißt die zu veraschende Lösung, z. B. 5 ccm des enteweißten Blutfiltrates\*), in das Reagensglas, setzt 2 ccm Phosphorschwefelsäuremischung zu und kocht vom Augenblicke, in dem sich aus dem eingedampften Gemische dicke, weiße Anhydrid-dämpfe entwickeln, bis zur Farblosigkeit, aber auf keinen Fall länger als 3 Minuten. Nach einigen Minuten verdünnt man mit Wasser bis auf 35 ccm und kühlt gut ab, worauf Neßlers Reagens bis auf 50 ccm zugesetzt und gut gemischt wird.

Sollte die entstandene gelbe Lösung getrübt sein, so müßte sie vor dem Vergleiche noch durch Zentrifugieren geklärt werden.

In ein Meßkölbchen von 100 ccm pipettiert man 5 ccm der Ammonsulfatlösung, 30 ccm Wasser und 4 ccm Phosphorschwefelsäuremischung und dann 50 ccm Neßlers Reagens, und füllt auf 100 auf. Diese Lösung wird im Colorimeter mit der Probe verglichen, indem man erstere auf 20 stellt.

**Berechnung.** Hat man auf diese Art 0,5 ccm Blut in Arbeit genommen, so ist 
$$\frac{20}{\text{Stand der zu untersuchenden Lösung}} \times 30 = \text{Milligramm Rest-N in 100 ccm Blut.}$$

#### *Bestimmung des Ammoniaks in kleinen Mengen Blut.*

699. a) **Nach Folin und Denis<sup>1)</sup>.** Man bringt 5 ccm Oxalatblut und 3 ccm 20 proz. Sodalösung in den Kjeldahlkolben des beschriebenen Durchlüftungsapparates (§ 698, 2) und durchlüftet wie dort angegeben. Zur Verhinderung des Schäumens setzt man etwas Amyl- oder Octylalkohol oder flüssiges Paraffin zu. Die Temperatur soll etwa 45° betragen. Das in  $\frac{1}{100}$ n-Säure aufgefangene Ammoniak wird colorimetrisch oder besser titrimetrisch bestimmt.

b) **Nach Gad-Andresen<sup>2)</sup>.** Austreiben des Ammoniaks nach Boratzusatz durch Luftstrom, Auffangen in schwacher Schwefelsäure. Zersetzung des Ammoniaks durch Hypobromit und Bestimmung des Stickstoffs im Kroghschen Mikrorespirometer. Das Nähere s. in der Originalarbeit, in der sich eine Abbildung des Apparates befindet. Man benutzt 1 ccm Blut.

\*) Siehe die Bestimmung des Reststickstoffs § 700.

<sup>1)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 11, S. 527. 1912.

<sup>2)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 51, S. 367. 1922.

**Bestimmung des Reststickstoffs in wenig Blut und Serum nach Folin und Wu<sup>1)</sup>.**

700. Prinzip. Blut wird mit Natriumwolframat und Schwefelsäure enteiweißt und in dem proteinfreien Filtrat der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt.

Erforderliche Lösungen. 1. 10% Natriumwolframatlösung. 2.  $\frac{2}{3}$ n-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. 3. 2n-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Ausführung. 1 Vol. (5 ccm) Oxalatblut wird in einem Kölbchen mit der 7fachen Menge Wasser verdünnt, wobei man die Pipette, mit der das Blut abgemessen wurde, mehrmals mit diesem Wasser ausspritzt. Nach Zusatz von 1 Vol. Wolframatlösung und 1 Vol.  $\frac{2}{3}$ n-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wird das Kölbchen verschlossen und einige Male kräftig geschüttelt. Es darf sich kein Schaum bilden und die Farbe muß ins Bräunliche umschlagen. Sollte dies nicht eintreten, so setze man noch einige Tropfen 2n-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> zu, jedoch nicht mehr als 10. Nun wird die ganze Flüssigkeit auf einmal durch ein trockenes Faltenfilterchen gegossen. Das Filtrat muß wasserklar sein, anderenfalls ist es zu verwerfen. Dieses Blutfiltrat enthält das ursprüngliche Blut in 10facher Verdünnung und darf gegen Kongopapier nur ganz schwach sauer reagieren. Es kann auch für eine Reihe von anderen Bestimmungen benutzt werden, worauf in der Folge hingewiesen werden wird. Man setzt etwas Toluol zu, worauf es in gut verkorkten Flaschen längere Zeit brauchbar bleibt. Zur Bestimmung des Reststickstoffs werden 5 ccm dieses Filtrates nach Kjeldahl verascht, wobei man eine der beschriebenen Kjeldahlmethoden § 698 anwendet.

Ein anderes Verfahren ist von Bang<sup>2)</sup> angegeben worden.

Anderes Verfahren.

**Bestimmung der Eiweißkörper in kleinen Mengen Plasma und Serum nach Cullen und v. Slyke. Modifiziert nach Howe<sup>3)</sup>.**

701. Prinzip. Die verschiedenen Eiweißfraktionen werden durch Salzfällungen aus je 0,5 ccm Plasma oder Serum gefällt und in den Filtraten jeweils der N nach Kjeldahl (§ 698) bestimmt.

Ausführung. Plasma wird so entnommen, daß es 0,5% K-Oxalat enthält. Sowohl Plasma als Serum müssen klar zentrifugiert werden.

1. Gesamt-N. 0,1—0,5 ccm werden verascht und der N nach Kjeldahl bestimmt.

2. Fibrinogen. 0,5 ccm Plasma werden in ein Reagensglas gemessen und bei Zimmertemperatur 14 ccm 0,8proz. NaCl-Lösung zugefügt, dann 1 ccm 2,5proz. CaCl<sub>2</sub>-Lösung und ein Kryställchen Thymol zugegeben, die Röhre verschlossen. Nach 15 Minuten wird durch ein trockenes Filter filtriert. In je 5 ccm des Filtrats wird eine Kjeldahlbestimmung ausgeführt.

3. Euglobulin. 0,5 ccm Plasma oder Serum kommen in eine Proberöhre, dazu 15 ccm einer 14proz. Natriumsulfatlösung, welches Salz vor dem Abwägen bei 37° vom Krystallwasser befreit wurde und etwas Thymol wie bei Fibrinogen. Die Röhre wird verschlossen, geschüttelt und 3 Stunden stehen gelassen, dann wird durch ein trockenes Filter filtriert und je 5 ccm nach Kjeldahl verascht. Das Resultat gibt bei Serum das Euglobulin und bei Plasma Fibrinogen + Euglobulin an.

4. Euglobulin + Pseudoglobulin. Ausführung wie bei Euglobulin mit dem Unterschied, daß eine 18proz. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung angewandt wird.

5. Gesamtglobuline. Die gleiche Ausführung. Es wird aber mit einer 22,2proz. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung gefällt.

6. Nichteiweißstickstoff. 0,5 ccm werden mit 15 ccm 5proz. Trichlor-essigsäure gefällt, und der N im Filtrat bestimmt.

<sup>1)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 11, S. 527. 1912; Bd. 21, S. 61. 1915 u. Bd. 38, S. 90. 1919; vgl. Mandel u. Steudel a. a. O.

<sup>2)</sup> Bang: Methoden zur Mikrobestimmung einiger Blutbestandteile. 3. Aufl. Wiesbaden: Bergmann 1922.

<sup>3)</sup> Journ. of biol. Chem. Bd. 49, S. 109. 1921. Cullen und v. Slyke Bd. 41, S. 587. 1920.

**Berechnung.**

1. Fibrinogen-N = Gesamt-N minus dem N des Filtrates der Fällung mit 0,8proz. NaCl-Lösung.
  2. Euglobulin-N = Gesamt-N minus dem N des Filtrates der Fällung mit 13,5proz. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.
  3. Pseudoglobulin-N = N im Filtrat der 13,5proz. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Fällung minus N der 17,4proz. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Fällung.
  4. Gesamtglobulin-N = Total-N minus N im Filtrat der 21,5proz. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Fällung.
  5. Albumin-N = N im Filtrat der 21,5proz. Fällung minus Nichtprotein-N.
  6. Nichtprotein-N = N im Filtrat der Trichloressigsäurefällung.
- Andere Methode. Eine ähnliche Methode ist von Wu ausgearbeitet<sup>1)</sup>.

**Bestimmung des Harnstoffs in kleinen Mengen Blut und Serum.****702. 1. Nach v. Slyke und Cullen<sup>2)</sup>.**

Prinzip. Das enteiweißte Blutfiltrat wird mit Sojaurease behandelt und das so gebildete Ammoniumcarbonat entweder colorimetrisch durch Neßlerisieren oder mit dem bei der Kjeldahlmethode beschriebenen Durchlüftungsapparat (§ 698, 2) titrimetrisch ermittelt.

**a) Ausführung im Blut.**

Erforderliche Lösungen. 1. Pufferlösung.  $\frac{1}{3}$  Mol. NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O (46,03 g) und  $\frac{2}{3}$  Mol. Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O (238,8 g) werden auf 1 l gelöst.

2. Urease. Entweder verwendet man direkt gepulverte Sojabohnen (1 Messerspitze) oder man stellt eine Ureaselösung nach dem Permutitverfahren her. Man wäscht zu dem Zwecke 3 g Permutit\*) einmal mit 2proz. Essigsäure und zweimal mit Wasser, fügt 100 ccm 30proz. Alkohol und 5 g Sojabohnenmehl hinzu, schüttelt 10 Minuten und filtriert. Die Flüssigkeit wird in gut verkorkter Flasche am besten im Eisschrank aufbewahrt.

3. Die bei der Bestimmung des Reststickstoffs (§ 700) nötigen Reagenzien.

Ausführung. Von dem wie bei der Reststickstoffbestimmung (§ 700) angegeben hergestellten eiweißfreien Blutfiltrat werden 10 ccm entsprechend 1 ccm Blut in ein Kjeldahlkölbchen von 100 ccm eingeführt. (Das Blutfiltrat darf nur schwach sauer reagieren.) Dazu kommen 2 ccm Ureaselösung oder 1 Messerspitze Sojabohnenmehl und 1 ccm Pufferlösung. Man stellt das Kölbchen 20 Minuten in ein Wasserbad von 50°, währenddessen sämtlicher Harnstoff in Ammoniumcarbonat verwandelt wird und fügt es dann an den bei der Kjeldahlbestimmung beschriebenen Durchlüftungsapparat, während man in der Vorlage 10 ccm  $\frac{1}{50}$ -H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> oder -HCl gegeben hat. In das Kjeldahlkölbchen läßt man nun 2 ccm 10proz. NaOH und 2 Tropfen Amylalkohol einfließen, schaltet die Waschflasche mit H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wieder vor und saugt 1 Stunde lang einen mäßigen Luftstrom durch den Apparat. Die Titration erfolgt wie bei der Kjeldahlbestimmung mittels Methylrot als Indicator. Man kann auch das übergetriebene Ammoniak colorimetrisch durch Neßlerisieren bestimmen<sup>3)</sup>.

**b) Ausführung im Serum.**

Erforderliche Lösungen. 1. Kolloidales Eisenhydroxyd; 2. Gesättigte Magnesiumsulfatlösung; 3. Die Lösungen 1 und 2 von a).

Ausführung. Die Ausfällung des Eiweißes darf nicht mit Wolframsäure vorgenommen werden, sie geschieht mit kolloidalem Eisenhydroxyd. Man

\*) Zu beziehen von der Permutitaktiengesellschaft Berlin NW. 6, Luisenstr. 30.

<sup>1)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 51, S. 33. 1922. — Außerdem Henley: desgl. Bd. 52, S. 367. 1922.

<sup>2)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 19, S. 211. 1914.

<sup>3)</sup> Vgl. Mandel u. Steudel a. a. O.

versetzt 2 ccm Serum in einem 100-ccm-Meßkolben mit 50 ccm Wasser und 5 ccm Eisenhydroxyd, füllt bis zur Marke mit Wasser auf, mischt und filtriert durch ein trockenes Filter. 50 ccm des Filtrats entsprechend 1 ccm Serum werden zur Bestimmung (s. oben bei a) verwendet. Die Hälfte genügt auch.

### 2. Nach Bang<sup>1)</sup>.

Prinzip. Das Eiweiß wird durch Alkohol koaguliert und der Harnstoff mit Äther-Alkohol (1:1) extrahiert. Der eingedampfte Extrakt wird nach Kjeldahl (§ 698) verascht und der Stickstoff bestimmt.

Ausführung. Das wie bei den übrigen Bangschen Methoden mit Blut gewogene Papierblättchen\*) wird in einem Reagensglas mit Äther-Alkohol über Nacht verschlossen stehen gelassen. Das Extrakt wird in ein 100-ccm-Kjeldahlkölbchen abgegossen und mit einigen Kubikzentimeter Äther-Alkohol nachgewaschen. Man setzt sofort 1 ccm konzentrierte H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und einige Tropfen 10 proz. CuSO<sub>4</sub>-Lösung und 5–6 ccm Wasser zu. Nach Entfernung von Alkohol und Äther in langsam angewärmtem Wasserbad wird auf dem Drahtnetz weiter gekocht und verascht. Das weitere wie bei der Kjeldahlbestimmung. Auffangen in <sup>n</sup>/<sub>100</sub>-Säure.

### 3. Nach Gad-Andresen<sup>2)</sup>.

Prinzip. Ausfällen der Proteine durch Kochen mit <sup>n</sup>/<sub>100</sub>-Essigsäure, Zersetzen des Harnstoffs mit Bromlauge, Messen des gebildeten N in Kroghs Mikrorespirometer.

Ein neueres Verfahren<sup>3)</sup> beruht auf der Spaltung des Harnstoffs mit Urease und Bestimmung des Ammoniaks in der in § 699 angedeuteten Weise. Dieses dürfte den älteren Verfahren vorzuziehen sein.

### 4. Nach Siebeck-Neufeld<sup>4)</sup>.

Prinzip. Blut wird mit Trichloressigsäure enteiweißt und im Filtrat der Stickstoff durch Bromlauge in Freiheit gesetzt. Die Stickstoffmenge wird im Barcroftschen Apparat gemessen. Bezüglich der Ausführung s. auch Pincussen S. 104.

## *Bestimmung des Kreatinin und des Kreatinin + Kreatin in kleinen Mengen Blut nach Folin<sup>5)</sup>.*

### 703. a) Kreatinin.

Prinzip. Das Kreatinin wird mit Hilfe der Intensität der Färbung, die mit alkalischer Pikrinsäurelösung entsteht, colorimetrisch bestimmt.

Erforderliche Lösungen. 1. Gesättigte wässrige Pikrinsäure, vor Luft geschützt aufzubewahren. Bei zweifelhafter Reinheit ist das Präparat aus Wasser umzukristallisieren und nach Folin und Denis<sup>6)</sup> zu prüfen.

2. 10 proz. NaOH.

3. Kreatininlösung. Man bringt 6 ccm einer Lösung, welche in einem Liter <sup>n</sup>/<sub>10</sub>-Salzsäure 1,61 g Kreatininchlorzink oder 1,00 g Kreatinin\*\*) enthält, in einen Literkolben, setzt 10 ccm n-Salzsäure hinzu, füllt bis zur Marke auf und fügt einige Tropfen Toluol hinzu. 5 ccm dieser Lösung entsprechen 0,03 mg Kreatinin.

Ausführung. 10 ccm Blutfiltrat (s. § 700) werden in einem Erlenmeyerkolben mit 5 ccm Pikrinsäurelösung und 1 ccm 10 proz. NaOH versetzt. Nach 8 Minuten wird mit einer Lösung, die durch Vermischen von 5 ccm Kreatininlösung, 15 ccm Wasser, 10 ccm Pikrinsäure und 2 ccm 10 proz. NaOH hergestellt ist und ebenfalls 8 Minuten gestanden hat, verglichen.

Berechnung: 
$$\frac{\text{Stand der Vergleichslösung}}{\text{Stand der zu bestimmenden Lösung}} \times 1,5 = \text{Milligramm Kreatinin in 100 ccm Blut.}$$

Normales Blut enthält 1–2 mg Kreatinin in 100 ccm.

\*) Vgl. die Zuckerbestimmung nach J. Bang. (§ 705, 2).

\*\*) Wegen der Darstellung von reinem Kreatinin s. § 130.

<sup>1)</sup> Bang: Methoden zur Mikrobestimmung usw.

<sup>2)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 99, S. 1. 1919.

<sup>3)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 51, S. 373. 1922.

<sup>4)</sup> Dtsch. Arch. f. klin. Med. Bd. 116, S. 58. 1914.

<sup>5)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 17, S. 475. 1914.

<sup>6)</sup> desgl. Bd. 28, S. 349. 1916/17.

**b) Gesamtkreatinin (Kreatinin + Kreatin<sup>1</sup>).**

Prinzip. Das Kreatin wird durch Erhitzen mit n-HCl im Autoklaven bei 130° in Kreatinin übergeführt.

Erforderliche Lösungen. Dieselben wie bei der vorhergehenden Bestimmung.

Ausführung. 5 ccm Blutfiltrat (s. § 700) werden in einem Jenaer Reagensglas, das eine Marke für 25 ccm hat, mit 1 ccm n-HCl im Autoklaven 20 Minuten auf 130° erhitzt. Die nach dem Abkühlen des Autoklaven herausgenommene Lösung vergleicht man mit einer Lösung, die durch Einbringen von 20 ccm der Kreatininlösung in einen 50-ccm-Meßkolben und Zufügen von 2 ccm n-Salzsäure hergestellt wird. In beide Lösungen kommen nun je 10 ccm der Pikrinsäurelösung und 2 ccm 10proz. NaOH. Nach 10 Minuten wird die Vergleichslösung auf 50, das Blutfiltrat auf 25 ccm aufgefüllt.

Berechnung: 
$$\frac{\text{Stand der Vergleichslösung}}{\text{Stand der zu untersuchenden Lösung}} \times 6 = \text{Milligramm}$$
  
Gesamt-Kreatinin in 100 ccm Blut.

**Bestimmung der Harnsäure in kleinen Mengen Blut.****704. 1. Nach Folin<sup>2</sup>).**

Prinzip: Die Harnsäure wird aus dem Blutfiltrat (§ 700) zusammen mit den Chloriden durch milchsäures Silber ausgefällt, die Harnsäure aus dem Niederschlag durch salzsaure Kochsalzlösung herausgelöst und colorimetrisch durch die Blaufärbung bestimmt, die sie in einer alkalischen Phosphorwolframsäurelösung hervorruft. Als Vergleich dient eine Harnsäurelösung von bekanntem Gehalt.

Erforderliche Lösungen<sup>3</sup>). a) Silberlactatlösung. 100 g Silberlactat werden in ungefähr 700 ccm warmem Wasser gelöst, 100 ccm 85proz. Milchsäure durch 100 ccm 10proz. Natronlauge teilweise neutralisiert und beide Lösungen vereinigt. Man füllt auf 1 l auf und stellt beiseite, bis sich der stets auftretende Niederschlag abgesetzt hat.

b) Natriumchloridlösung. 10 g (pro analysi-Präparat) in 100 ccm  $\frac{n}{10}$ -NaOH.

c) Natriumcyanidlösung. Von Natriumcyanid werden 100–400 g abgewogen und für je 1 g 6,7 ccm  $\frac{n}{10}$ -NaOH hinzugefügt. Die Lösung färbt sich innerhalb der ersten 2–3 Wochen ein wenig, wird aber dadurch nicht unbrauchbar. Zu starker Ammoniakgehalt ist vom Übel, da er zu Niederschlägen Anlaß gibt. Die Flasche bleibt daher zweckmäßig nur leicht bedeckt stehen, so daß gebildetes Ammoniak abdunsten kann, im Notfall kann es weggekocht werden. Ganz frische Cyanidlösungen enthalten stets reduzierende Stoffe, die beim Stehen in etwa 3 Wochen verschwinden. Man prüft die Brauchbarkeit, indem man 5 ccm Wasser, 2 Tropfen Lithiumsulfat-, 2 ccm Cyanidlösung und 1 ccm Harnsäurereagens mischt. Die Lösung muß 2 Minuten farblos bleiben und darf sich erst färben, wenn sie  $1\frac{1}{2}$  Minute im kochenden Wasserbade gehalten wird. Um zu entscheiden, ob die Färbung so stark ist, daß sie die Bestimmung stört, werden zwei Ansätze mit 5 und 3 ccm der Standardlösung durchgeführt. Die Colorimeterhöhen müssen sich wie 3 : 5 verhalten. Die Cyanidlösung muß mit der Burette abgemessen werden.

d) Lithiumsulfatlösung. 20 g in 100 ccm Wasser lösen und filtrieren.

e) Harnsäurereagens nach Folin und Denis. 100 g wolframsäures Natrium werden mit 80 ccm 85proz. Phosphorsäure (spez. Gew. 1,71) und 700 ccm Wasser mindestens 2, längstens 24 Stunden lang gekocht am Rückfluß mit eingeschlifffnem Kühler oder unter Ersatz des verdampfenden Wassers. Nach dem Erkalten auf 1 l auffüllen.

f) Harnsäurelösung<sup>4</sup>):

1. Stammlösung. 1,000 g Harnsäure\*) wird mittels Trichters in einen 300-ccm-Kolben gebracht; 0,45–0,50 g Lithiumcarbonat werden in 150 ccm Wasser von 60° gelöst und damit die

\*) Reine käufliche Harnsäure wird in Ammoniakwasser gelöst, aus dem Filtrat mit Salzsäure gefällt, 3–4 mal aus Wasser umkristallisiert und bei 140° getrocknet. Biltz und Herrmann: Liebigs Ann. d. Chem. Bd. 431, S. 107 Anm. 1923.

<sup>1</sup>) Vgl. Mandel u. Steudel a. a. O.

<sup>2</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 14, S. 95. 1913; Bd. 54, S. 153. 1922. — Folin u. Wu: desgl. Bd. 38, S. 100. 1919. — Kritik „gefährlicher“ Anwendungen Harpuder u. Mond: Zeitschr. f. d. ges. exp. Med. Bd. 27, S. 54. 1922; Benedict u. Hitchcock: Journ. of biol. chem. Bd. 20, S. 619. 1915; Rogers: Journ. of biol. chem. Bd. 55, S. 325. 1923.

<sup>3</sup>) Folin: Journ. of biol. chem. Bd. 54, S. 169. 1923.

<sup>4</sup>) Journ. of biol. chem. Bd. 54, S. 159. 1923.



Harnsäurereste vom Trichter in den Kolben gespült und diese durch Schütteln rasch gelöst. Sobald klare Lösung eingetreten ist, wird unter fließendem Wasser gekühlt und in einen 1000-ccm-Meßkolben übergeführt, mit den Spülresten auf 400—500 ccm verdünnt, mit 25 ccm 40proz. Formaldehydlösung gemischt und mit 3 ccm Eisessig angesäuert. Man schüttelt, bis alle Kohlensäure entwichen ist, füllt auf und mischt sorgfältig durch. Die Lösung wird in 100 ccm Flaschen von gutem Glas abgefüllt, die, bis zum Hals gefüllt, fest verschlossen und im Dunkeln aufbewahrt werden. Sie hält sich monatelang.

2. Verdünnte Stammlösung. Zum Gebrauch wird 1 ccm in einen mit Wasser etwa zur Hälfte gefüllten 25-ccm-Meßkolben gebracht, mit 10 ccm  $\frac{2}{3}$ n-Schwefelsäure (s. Enteiweißung § 700) und 1 ccm 40proz. Formalin (nicht mehr) versetzt und aufgefüllt. Die Lösung ist frühestens nach 45 Minuten und noch nach 5 Wochen brauchbar. 1 ccm = 0,04 mg Harnsäure.

Ausführung der Bestimmung. Beim Enteiweißen (§ 700) ist darauf zu achten, daß niemals durch die Schwefelsäure, auch nicht an einzelnen Stellen, vorübergehend die Reaktion sauer wird. Der Eiweißniederschlag schließt dann leicht Harnsäure ein. Am sichersten geht man, wenn man zunächst nur  $\frac{4}{5}$  der erforderlichen Menge  $H_2SO_4$  Tropfen für Tropfen und unter ständigem Schütteln zusetzt, dann 20—30 Minuten stehen läßt und jetzt erst den Rest der Schwefelsäure ebenso zufügt.

5 ccm Blutfiltrat\*) werden in einem Zentrifugenglas mit höchstens 7 ccm Silberlösung (a) gemischt und nach 2 Minuten zentrifugiert (hierbei ist die Fällung vor der Wirkung des Lichtes möglichst zu bewahren). Die überstehende Flüssigkeit wird mit einem weiteren Tropfen Silberlösung darauf geprüft, daß die Fällung vollständig ist; sonst wird nochmals Silberlösung zugesetzt und wieder zentrifugiert. Besser ist es aber, einen neuen Ansatz mit weniger Blutfiltrat zu verarbeiten. Die überstehende Flüssigkeit wird möglichst vollständig entfernt, zweckmäßig durch ein capillar ausgezogenes Glasrohr, das an einem Stativ befestigt ist, in eine vorgeschaltete Saugflasche übergesaugt. Der Niederschlag wird in 1 ccm der Chloridlösung (b) gut verrührt, 4 ccm Wasser, 2—3 Tropfen von (d), 2 ccm von (c) (Bürette) zugesetzt und nochmals sorgfältig verrührt, damit sich Chlorsilber und Harnsäure lösen. Dann wird unter ständigem Schütteln Tropfen für Tropfen, im ganzen 1 ccm, von Harnsäurereagens (e) zugesetzt, 2 Minuten bei Zimmertemperatur stehen gelassen, darauf 80 Sekunden in ein stark siedendes Wasserbad getaucht. Man kühlt ab, führt quantitativ in einen Meßkolben von 25 ccm über und füllt zur Marke auf. Entsteht in der blauen Lösung ein Niederschlag, so versucht man, mit weniger Harnsäurereagens (e) auszukommen. Die Vergleichslösung wird sofort in einem zweiten Meßkolben von 25 ccm angesetzt, indem man 5 ccm der verdünnten Standardlösung, 2—3 Tropfen von (d), 2 ccm von (c), 1 ccm von (e) mischt und ebenso verfährt (0,2 mg Harnsäure).

Berechnung. Man stellt die Vergleichslösung auf 20 mm. 20 dividiert durch den abgelesenen Stand der zu untersuchenden Lösung mal 4 ist die Anzahl Milligramm Harnsäure in 100 ccm Blut.

## 2. Nach Benedict<sup>1)</sup>.

Prinzip. Das Verfahren ist ähnlich dem von Folin. Das Enteiweißen wird in gleicher Weise vorgenommen, es wird aber nicht mit Silber gefällt, sondern direkt durch Zusatz von Arsenphosphorwolframsäure eine Färbung hervorgerufen, welche colorimetrisch gemessen wird.

Erforderliche Lösungen. 1. Arsenphosphorwolframsäure. Zu einer Lösung von 100 g Natriumwolframat in 600 ccm Wasser setzt man nacheinander 50 g Arsenpentoxid, 25 ccm 85proz. Phosphorsäure und 20 ccm konzentrierte HCl. Die Mischung wird 20 Minuten lang gekocht und ist unbegrenzt haltbar.

2. Standard-Harnsäurelösung. A. 9 g krystallisiertes  $Na_2HPO_4$  und 1 g  $NaH_2PO_4$  werden in 300 ccm heißen Wassers gelöst. Die filtrierte Lösung wird auf 500 aufgefüllt. Anderer-

\*) Da die Anwesenheit von Kalium- und Ammoniumsalzen stört, muß die Gerinnung mit Lithium- und nicht mit Kaliumoxalat verhindert werden.

<sup>1)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 51, S. 187. 1922 u. Bd. 52, S. 387. 1922.

seits suspendiert man in 1-l-Meßkolben genau 200 mg Harnsäure in etwas Wasser, gießt die warme Phosphatlösung dazu und schüttelt bis alles gelöst ist. Es wird abgekühlt, genau 1,4 ccm Eisessig zugesetzt, auf 1 l aufgefüllt und noch etwas Chloroform zugefügt. 5 ccm entsprechen 1 mg Harnsäure. — B. 10 ccm von Lösung A werden in einem Meßkolben von 500 ccm mit etwa 250 Tl. Wasser versetzt. Nach Zufügen von 20 ccm verdünnter Salzsäure (1 : 10) füllt man auf 500 auf. Diese Lösung, welche in 5 ccm 0,02 mg Harnsäure enthält, muß alle 2 Wochen frisch aus A bereitet werden. Ev. benutzt man auch eine in analoger Weise hergestellte Vergleichslösung, welche 0,01 mg Harnsäure in 1 ccm enthält.

3. 5% Natriumcyanidlösung, die auf 1 l 2 ccm konzentriertes Ammoniak enthält.

**Ausführung.** Die Enteiweißung wird nach Folin und Wu, wie bei der Bestimmung des Reststickstoffs (§ 700) angegeben ist, ausgeführt. 5 ccm dieses Filtrats, entsprechend 0,5 ccm Blut, werden in einem Reagensrohr von 20 mm Durchmesser abgemessen und mit 5 ccm Wasser versetzt. In ein gleiches Rohr mißt man 5 ccm der Vergleichslösung B und füllt ebenfalls auf 10 ccm auf. In beide Röhren gibt man nun 4 ccm der Cyanidlösung und darauf 1 ccm Arsenphosphorwolframsäure und mischt den Inhalt sofort nach Zusatz des letzten Reagens durch einmaliges Umkehren. Unmittelbar darauf kommen beide Röhren gleichzeitig für 4 Minuten in ein kochendes Wasserbad und nach dieser Zeit für 3 Minuten wieder gleichzeitig in ein größeres Gefäß mit kaltem Wasser. Die beste Zeit zur Ablesung ist 5 Minuten nach dem Herausnehmen aus dem kalten Wasser. Es ist von größter Wichtigkeit, die Röhren möglichst gleichzeitig zu erhitzen und abzukühlen.

**Berechnung.** Bei Anwendung von 5 ccm der Vergleichslösung B (0,02 mg Harnsäure) und 5 ccm Blutfiltrat (1:10) ergibt sich der Gehalt des ursprünglichen Blutes an Harnsäure wie folgt:

$$\frac{\text{Stand der Vergleichslösung}}{\text{Stand der zu untersuchenden Lösung}} \times 4 = \text{Milligramm Harnsäure in 100 ccm Blut.}$$

Die Methode ist auch für Harn ausgearbeitet (§ 583, 6).

#### *Bestimmung des Zuckers in kleinen Mengen Blut\*).*

##### 705. 1. Nach Folin und Wu<sup>1)</sup>.

**Prinzip.** Das wie bei der Reststickstoffbestimmung (§ 700) enteiweißte Blut wird mit alkalischer Kupfertartratlösung gekocht, wobei sich Cuprooxyd bildet, welches durch Zusatz von Phosphormolybdänsäure aufgelöst wird, wobei sich die letztere unter Bildung einer blauen Färbung reduziert. Diese Färbung wird gegen eine in gleicher Art behandelte Zuckerlösung von bekanntem Gehalt verglichen.

**Erforderliche Lösungen.** 1. Alkalische Kupferlösung. 40 g wasserfreie Soda werden in 400 ccm Wasser gelöst und in einen Litermeßkolben gebracht, man setzt 7,5 g Weinsäure und 4,5 g krystallisiertes Kupfervitriol zu und verdünnt nach dem Auflösen auf 1 l.

2. Phosphormolybdänsäure. In einem Literbecherglase werden 35 g Molybdänsäure und 5 g Natriumwolframat mit 200 ccm 10proz. NaOH und 200 ccm Wasser 30 Minuten stark gekocht. Nach dem Abkühlen bringt man die Lösung auf 350 ccm, fügt 125 ccm 85proz. Phosphorsäure hinzu und verdünnt auf 500 ccm.

3. Zuckerlösungen: a) Stammlösung. 1% Traubenzuckerlösung, die mit etwas Toluol konserviert wird. — b) 5 ccm Stammlösung auf 500 ccm verdünnt (1 mg Zucker in 10 ccm). — c) 5 ccm Stammlösung auf 250 ccm verdünnt (2 mg Zucker in 10 ccm).

**Ausführung.** 2 ccm Blutfiltrat (§ 700) werden in ein Blutzuckerproberöhrchen von nebenstehender Form (Abb. 37) gebracht, in 2 andere gleiche Röhren je 2 ccm der beiden verdünnten Zuckerlösungen 3, b u. 3, c. In alle 3 Röhren gibt man nun je 2 ccm der alkalischen Kupferlösung, so daß die Kugel des Röhrens ganz gefüllt ist, sonst muß man noch etwas verdünnte

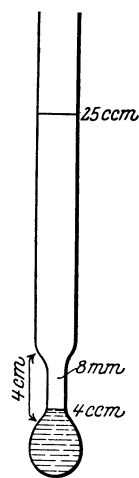


Abb. 37.  
Zuckerreagens-  
glas nach  
Folin u. Wu.

\*) Zur Kritik dieser Methoden siehe § 653, 3.

<sup>1)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 41, S. 367. 1920.

Kupferlösung zufügen. Nun werden die Röhren 6 Minuten in ein kochendes Wasserbad getaucht, dann 3 Minuten, möglichst ohne zu schütteln, in ein kaltes Wasserbad gestellt und darauf jedes Glas mit 2 ccm Phosphormolybdänsäurelösung versetzt. Wenn das Kupferoxydul gelöst ist, was meist nach 2 Minuten eintritt, verdünnt man bis zur Marke 25 mit Wasser, verschließt die Röhren mit einem reinen Kautschukstopfen und mischt. Nach 10 Minuten bis 1 Stunde hat sich die blaue Farbe voll entwickelt. Die 2 Standardlösungen lassen eine Bestimmung zwischen 70—400 mg Zucker in 100 ccm Blut ausführen. Man vergleicht diejenige Standardlösung mit der Probe, deren Farbton ihr am nächsten kommt.

Berechnung. Man stellt die Vergleichslösung auf 20.

20

$\frac{\text{Stand der zu bestimmenden Lösung}}{20} \times 100 = \text{Milligramm Traubenzucker in 100 ccm Blut, wenn zum Vergleich das 0,2 mg Zucker enthaltende Röhren (Lösung b) verwendet wurde. Bei Benutzung von Lösung c wird das Resultat noch mit 2 multipliziert.}$

## 2. Nach Bang<sup>1)</sup>.

Prinzip. Das auf einem Papierblättchen aufgefangene Blut wird mittels Uranylacetat enteiweißt, dabei geht der Zucker in Lösung. Die Flüssigkeit wird mit alkalischer Kupferlösung versetzt und aus der Reduktion derselben beim Kochen der Zuckergehalt ermittelt, indem das gebildete und dank den Salzen in Lösung gebliebene Kupferoxydul indirekt jodometrisch bestimmt wird. Man oxydiert dazu das Cuproxyd in saurer Lösung mit überschüssiger Jodsäure und ermißt deren Überschuß aus der Menge Jod, die aus Jodkalium in Freiheit gesetzt wird. Das Jod titriert man mit Thiosulfat.  $3 \text{ Cu}_2\text{O} + \text{HJO}_3 = 6 \text{ CuO} + \text{HJ}$ ;  $\text{HJO}_3 + 5 \text{ HJ} = 6 \text{ J} + 3 \text{ H}_2\text{O}$ .

Erforderliche Lösungen. Lösung 1. 13,60 ccm gesättigte Kaliumchloridlösung (= 30 g KCl auf 100 ccm Wasser) + 3 g Uranylacetat fein verrieben in 200 ccm Wasser aufgelöst + 1,5 ccm 25 proz. HCl werden mit Wasser auf 2 l aufgefüllt (Kal. chlor. purriss. pro analysi Kahlbaum).

Lösung 2. Alkalilösung. 75 g Kaliumcarbonat und 20 g Seignettesalz mit Wasser auf 1 l aufgefüllt.

Lösung 3.  $\frac{n}{10}$ -Jodatlösung. 3,5667 g reinstes Kaliumjodat werden mit 20 ccm 20 proz. Schwefelsäure und Wasser auf 1 l ergänzt (haltbar).

Lösung 4. Jodat-Kupfersulfatlösung. 10 ccm der Lösung 3 werden mit 0,25 g Kupfersulfat versetzt und mit Wasser auf 100 ccm aufgefüllt.

Lösung 5. 20 proz. Schwefelsäure (Vol.-%).

Lösung 6.  $\frac{n}{100}$ -Thiosulfatlösung, aus  $\frac{n}{10}$ -Natriumthiosulfatlösung durch Verdünnen mit kohlenstoffsaurem Wasser frisch bereitet.

7. Stärkelösung. 1 g lösliche Stärke (Kahlbaum) wird in 10 ccm Wasser heiß gelöst und mit gesättigter KCl-Lösung auf 100 ccm aufgefüllt.

8. 5 proz. Jodkaliumlösung.

Apparatur. Erlenmeyerkolben von 100—125 ccm (Reaktionsgefäß). Ein Dampfentwickler, ein Rundkolben von 500 ccm, mit Wasser halb gefüllt (Siedesteinchen), in dessen Hals mit Stopfen ein zweimal rechtwinklig gebogenes Glasrohr befestigt ist, das an seinem äußeren Ende zu einer kleinen, mit 5—6 kleinen Löchern versehenen Kugel aufgeblasen ist. Das Glasrohr ist so nach unten gebogen, daß die Kugel bis zum Boden in das Reaktionsgefäß eintauchen kann. Es dient dazu, Dampf in das Reaktionsgemisch zu leiten und so ein sehr gleichmäßiges Kochen desselben herbeizuführen. Das Reaktionsgefäß steht so auf einer Unterlage, daß man durch Niedrigerstellen das Dampfleinleiten rasch unterbrechen kann.

Ausführung. Das Blut läßt man auf ein kleines etwa 2 ccm großes, vorher gewogenes Stückchen von dickem Filterpapier sich aufsaugen und stellt sein Gewicht durch Wiederwiegen des Papierchens fest. Für die Wägungen benutzt man eine sog. Torsionswaage. Steht eine solche nicht zur Verfügung, so wägt man auf einer empfindlichen analytischen Waage die Blättchen vor und nach dem Aufsaugen des Blutes in kleinen Wägegläschen mit aufgeschliffener Kappe. Man kann das Blut auch mittels einer Capillarpipette abmessen (0,2 ccm<sup>2)</sup>).

<sup>1)</sup> Mikromethoden. 3. Aufl., 1922. S. 35.

<sup>2)</sup> Biochem. Journ. Bd. 15, S. 171. 1921.

Etwa 100 mg Blut (2—3) Tropfen werden aus der Fingerkuppe, wie beschrieben, entnommen und auf Filtrierpapier gewogen. Sodann wird das Papier in ein Reagensglas übergeführt, in dem sich 6,5 ccm Lösung 1 befinden. Nach  $\frac{1}{2}$  Stunde ist das Eiweiß koaguliert im Papier, während der Zucker diffundiert ist. Man gießt die 6,5 ccm in das Reaktionsgefäß, spült das Reagensglas mit weiteren 6,5 ccm Salzlösung nach, bringt auch diese in den Erlenmeyer und fügt je 2 ccm der Lösung 2 u. 4 hinzu. Inzwischen hat man den Dampfentwicker zum lebhaften Sieden erhitzt. Man läßt genau 4 Minuten (Sanduhr) den Dampf durch die Reaktionsflüssigkeit gehen, setzt dann mit einer Pipette 2 ccm der Lösung 5 zu und unterbricht die Dampfeinleitung durch Tiefstellen des Reaktionsgefäßes. Man spült das Einleitungsrohr ab, läßt mindestens 5 Min. stehen, setzt 25 ccm Wasser hinzu und kühlt ab. Nach Zusatz von 0,5 ccm der Lösung 8 und 1—2 Tropfen Stärkelösung titriert man mit  $\frac{n}{100}$  Thiosulfat (Lösung 6) etwa bis farblos.

Berechnung. 0,28 ccm der angewandten  $\frac{n}{100}$ -Thiosulfatlösung entsprechen 0,1 mg Glucose. (ccm Jodat — ccm Thiosulfat): 0,28 = gesuchte Zuckermenge in Zehntelmilligramm. Von der benutzten Menge Jodat ist die im Blindversuch gebrauchte abzuziehen.

### 3. Nach Hagedorn und Jensen<sup>1)</sup>.

Prinzip. Das eiweißfreie Blutfiltrat wird mit einer alkalischen Ferricyanidlösung in der Wärme behandelt, das gebildete Ferrocyanid als Zinkverbindung ausgefällt:  $2 \text{H}_4\text{FeCy}_6 + 3 \text{ZnSO}_4 \rightarrow \text{H}_2\text{Zn}_3(\text{FeCy}_6)_2 + 3 \text{H}_2\text{SO}_4$  und das überschüssige Ferricyanid jodometrisch bestimmt:  $2 \text{H}_3\text{FeCy}_6 + 2 \text{HJ} \rightarrow 2 \text{H}_4\text{FeCy}_6 + 2 \text{J}$ .

Erforderliche Geräte.

1. Präparatengläser 30 × 90 mm und 15 × 150 mm.
2. 2-ccm-Pipette für die Ferricyanidlösung.
3. 2-ccm-Mikrobürette, eingeteilt in 0,02 ccm, für Thiosulfat.
4. Meßpipetten mit 3 ccm Teilung.
5. 3-ccm-Pipette für Kaliumjodidlösung.
6. 2-ccm-Pipette für Essigsäure.
7. Trichter von 3—4 cm Durchmesser, beschickt mit einem kleinen Filter aus ausgewaschener, mit Wasser naßgemachter und nicht ganz fest angedrückter Baumwolle.

8. Wasserbad.

9. Capillarpipette für Blut. 0,1 ccm.

a) Erforderliche Lösungen für die Eiweißfällung:

1.  $\frac{n}{10}$ -NaOH } alle 8 Tage frisch zu bereiten aus  $\frac{2}{1}$  n-Lauge und
2. 0,45 proz. Zinksulfatlösung } 45% Zinklösung.

b) Erforderliche Lösungen für die Zuckerbestimmung:

1. Wässrige Lösung, die in 1000 ccm 1,65 g Kaliumferricyanid (zur Analyse) und 10,6 g wasserfreies Natriumcarbonat enthält. Vor Licht geschützt aufzubewahren.
2. Lösung, die in 200 ccm 5 g Kaliumjodid, 10 g Zinksulfat puriss. eisenfrei, 50 g Natriumchlorid enthält. Es empfiehlt sich, von der Lösung eine größere Menge ohne KJ vorrätig zu halten und nach und nach kleinere Mengen mit Kaliumjodid zu bereiten. Freies Jod kann auch durch dickes Filter fast vollständig entfernt werden. Kleine Fehler werden durch den Blindversuch ausgeschaltet.
3. Essigsäure. 3 ccm eisenfreier Eisessig (Kahlbaum) auf 100  $\text{H}_2\text{O}$ .
4. Stärkelösung. 1% in gesättigter Kochsalzlösung.
5. Thiosulfatlösung. 0,7 g Natriumthiosulfat in 500 ccm Wasser. Titerstellung mit 0,005 n Kaliumjodatlösung. Vom reinsten wasserfreien Salz werden 0,3566 g zu 2 l gelöst.

Ausführung. Enteiweißen. In einem Präparatenglas (15 × 150) werden 1 ccm  $\frac{n}{10}$ -Natronlauge und 5 ccm der Zinksulfatlösung (a 2) gemischt, 0,1 ccm Blut in die gelatinöse Zinkhydroxydaufschlammung ausgeblasen und die Capillarpipette 2 mal mit der Mischung ausgespült und leergeblasen. Das Präparatenglas wird dann im siedenden Wasserbad 3 Minuten erhitzt, wobei das Eiweiß vollständig in groben grauen Ballen ausfällt. Nun wird durch den kleinen mit Baumwolle versehenen Trichter (7) in ein Präparatglas (30 × 90 mm) filtriert, Trichter und Filter 2 mal mit Hilfe der Pipette mit je 3 ccm Wasser nachgewaschen.

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 135, S. 46. 1923.

**Zuckerbestimmung.** Es werden 2 ccm der alkalischen Ferricyanidlösung (b 1) zugesetzt und das Glas 15 Minuten im siedenden Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen soll innerhalb von 6 Stunden titriert werden. Es werden 3 ccm der Kaliumjodidlösung (b 2) zugesetzt, gemischt, dann mit 2 ccm der Essigsäure (b 3) angesäuert und das ausgeschiedene Jod unter Zusatz von 2 Tropfen der Stärkelösung (b 4) mit der Thiosulfatlösung (b 5) titriert.

**Berechnung.** Von dem aus der Tabelle (S. 58 der Originalarbeit) entnommenen Zuckerwert ist derjenige abzuziehen, der sich beim Blindversuch ergeben hat.

*Bestimmung der Acetonkörper in kleinen Mengen Blut nach Engfeldt<sup>1)</sup>.*

706. Prinzip. Aus entweißtem Blut wird zunächst das präformierte Aceton + dem aus Acetessigsäure stammenden und darauf das aus Oxybuttersäure durch Oxydation mit Chromsäure gebildete abdestilliert, worauf jodometrische Bestimmung erfolgt.

**Erforderliche Lösungen.** 1. Bleiessig; 2. Alaunlösung 1%; 3. Schwefelsäure, verdünnt (25 ccm konzentrierter  $H_2SO_4$  werden auf 100 ccm verdünnt); 4. Chromatschwefelsäure (2 g Kaliumbichromat + 20 ccm konzentrierte  $H_2SO_4$  werden mit Wasser auf 100 ccm verdünnt); 5. Natronlauge, konzentriert; 6.  $n/100$ -Jodlösung; 7.  $n/100$ -Thiosulfatlösung; 8. Stärkelösung 1%.

**Ausführung.** 2,5 ccm unter Zusatz von Kaliumoxalat ungerinnbar gemachtes Blut werden in einem Meßkolben von 100 ccm mit ungefähr 75 ccm Wasser verdünnt, 5 ccm Bleiessig und 10 ccm der 1 proz. Alaunlösung zugegeben und mit Wasser zur Marke aufgefüllt. Man läßt ungefähr  $1/2$  Stunde stehen und filtriert sodann durch ein dichtes Faltenfilter, so daß die Lösung vollständig klar erscheint. Zur Destillation des Filtrates benutzt man eine Vorrichtung, welche dem früher beschriebenen Durchlüftungsapparat zur Bestimmung des Ammoniaks (§ 698, 2) vollständig entspricht mit der alleinigen Abweichung, daß der Destillationskolben wegen der größeren in Betracht kommenden Volumina größer gewählt werden muß. 80 ccm des Filtrats werden in den Destillationskolben eingefüllt und 2 ccm der Schwefelsäure hinzugefügt. Das Auffangegefäß wird beschickt mit 2 ccm  $n/100$ -Jodlösung und 2 ccm konzentrierter Natronlauge. Nachdem die Verbindungen dicht hergestellt sind, wird unter direktem Erhitzen ein starker Luftstrom durchgesaugt, der während einer Dauer von 15 Minuten unterhalten wird und das gesamte Aceton (präformiertes und aus Acetessigsäure) aus der Lösung mitreißt. Nach Beendigung nimmt man das Auffangegefäß ab, verschließt es gut und läßt es 15 Minuten stehen. In diesem Gefäß hat sich das aus freiem Aceton sowie das aus Acetessigsäure entstandene Jodoform gebildet. Man schließt nun an den Apparat eine andere Vorlage an, welche genau in der gleichen Weise mit Jodlösung und Natronlauge beschickt ist, gießt in das auf seinem Platze gebliebene Destillationsgefäß durch den Trichter 10 ccm Chromatschwefelsäure und destilliert unter Erhitzen weitere 25 Minuten. Das nunmehr übergehende und Jodoform bildende Aceton ist aus  $\beta$ -Oxybuttersäure gebildet. Man läßt auch dieses Aufnahmegefäß 15 Minuten lang stehen.

Zur Titration werden in jedes Aufnahmegefäß etwas über 2 ccm Schwefelsäure (3) gefügt, so daß die Lösung deutlich sauer und durch Jodausscheidung bräunlich gefärbt ist. Man fügt einige Tropfen Stärkelösung hinzu und titriert mit  $n/100$ -Thiosulfatlösung bis zur Farblosigkeit.

**Berechnung.** Die Menge des Acetons berechnet sich daraus, daß 1 ccm  $n/100$ -Jodlösung 0,1024 mg Gesamtaceton entspricht. Da zur Bestimmung 2 ccm Blut angewendet worden waren ( $4/5$  von 2,5 ccm Blut), so wird die Menge Aceton in 1 ccm durch Multiplikation der gefundenen Zahl mit 0,0512 in Milligramm erhalten

<sup>1)</sup> Beiträge zur Kenntnis der Biochemie der Acetonkörper. Diss. rer. nat., Stockholm 1920. L. Pincussen: Mikromethodik. 1921, S. 69. Vgl. dazu Lublin: Klin. Wochenschr. Jg. 1, S. 895 u. 1559; ref. Chem. Zentralbl. 1922, IV, S. 352 u. 1160.

(bzw. in Grammen in 1000 ccm Blut). (Die Multiplikation mit der Zahl 0,1024 mg statt im allgemeinen 0,0967 mg erklärt sich daraus, daß man es mit einer Mischung von präformiertem Aceton und Aceton aus Acetessigsäure zu tun hat.)

Das zweite Destillat enthält eine Ausbeute von 69,2% Aceton aus Oxybuttersäure, so daß 1 ccm  $\frac{1}{100}$ -Jodlösung 0,25 mg Oxybuttersäure entspricht.

Beispiel: Es seien vorgelegt für die Bestimmung des Gesamtacetons (präformiert und aus Acetessigsäure) 2,0 ccm Jodlösung, zum Zurücktitrieren verbraucht 1,2 ccm Thiosulfatlösung, verbrauchte Jodlösung demnach 0,8 ccm. Das in der angewandten Blutmenge (2 ccm) enthaltene Aceton würde sich also zu  $0,8 \times 0,1024$ , also zu 0,0819 mg Aceton berechnen, die Menge des Gesamtacetons (präformiertes und aus Acetessigsäure) in 1 ccm zu  $0,8 \times 0,0512$  mg = zu 0,041 mg, die Menge in 100 ccm also zu 4,1 mg. Zur Bestimmung des Acetons aus  $\beta$ -Oxybuttersäure seien ebenfalls 2 ccm Jodlösung vorgelegt, zum Zurücktitrieren seien 0,8 ccm Thiosulfat verbraucht. Die Differenz  $1,2 \times 0,25$  mg = 0,3 mg entspricht der Menge Oxybuttersäure in 2 ccm Blut. In 1 ccm sind also 0,15 mg, in 100 ccm Blut 15 mg  $\beta$ -Oxybuttersäure enthalten.

Um präformiertes und aus Acetessigsäure stammendes Aceton getrennt zu bestimmen, treibt man zunächst ohne Erwärmen durch einen Luftstrom das präformierte Aceton über und destilliert dann nach Wechseln der Vorlage unter Erwärmen, wobei das aus der Acetessigsäure gebildete übergeht.

Zur Bestimmung des Gesamtacetons (präformiertes + Aceton aus Acetessigsäure und Oxybuttersäure) setzt man von vornherein Bichromatschwefelsäure hinzu.

Für die Berechnung ist, wenn man die Acetonkörper als Acetessigsäure ausdrücken will, die Menge des nicht verbrauchten Jod mit 0,22 mg zu multiplizieren.

Beispiel: Vorgelegt wurden 2 ccm Jodlösung, verbraucht zur Titration 0,4 ccm Thiosulfatlösung, verbrauchte Jodlösung 1,6 ccm. In 2 ccm Blut sind enthalten  $1,6 \times 0,22 = 0,352$  mg Gesamtaceton, in 1 ccm Blut also 0,176 mg, in 100 ccm Blut 17,6 mg Acetonkörper berechnet als Acetessigsäure.

Weiteres Verfahren.

Ein weiteres Verfahren zur Bestimmung des Gesamtacetons ist von Ljundahl<sup>1)</sup> angegeben worden. Das Verfahren arbeitet aber mit größeren Blutmengen.

**Bestimmung von Fettsäuren und Cholesterin in kleinen Mengen Blutplasma nach Bloor, Pelkan und Allen<sup>2)</sup>.**

707. Prinzip. Plasma wird mit Alkohol-Äther extrahiert, der Alkohol-Äther verdampft, der Rückstand verseift. Das aus der getrockneten Masse mit Chloroform extrahierte Cholesterin wird colorimetrisch, die aus den Seifen erhaltenen Fettsäuren werden nephelometrisch bestimmt.

Erforderliche Lösungen. 1. Vergleichs-Fettlösung. Man bereitet Lösungen von Oleinsäure und Palmitinsäure, indem man 200 mg jeder einzelnen Fettsäure in 500 ccm 95proz. Alkohol auflöst. Zum Gebrauch mischt man 60 ccm der Oleinsäurelösung mit 40 ccm Palmitinsäurelösung. 5 ccm enthalten dann 2 mg Fettsäure.

2. Vergleichs-Cholesterinlösung. Lösung von Cholesterin in Chloroform, enthaltend 1 mg Cholesterin in 5 ccm. Am besten durch Verdünnen einer konzentrierten Lösung hergestellt.

3. Konz. Natronlauge (aus Na).

4. Chloroform. Es muß neutral, trocken und alkoholfrei sein.

Extraktion und Verseifung. 5 ccm Blutplasma werden in einen 100-ccm-Kolben, in dem sich 75 ccm einer Mischung von 3 Tl. Alkohol und 1 Tl. Äther befinden, tropfenweise eingemessen, wobei der Kolben rasch umgeschwenkt wird, um die Bildung größerer Flocken zu vermeiden. Nach einigen Minuten wird der Kolben unter starkem Schwenken (um ein Überhitzen zu vermeiden) in kochendes Wasser eingetaucht. Sobald die Flüssigkeit zu sieden beginnt, kühlt man auf Zimmertemperatur ab, füllt mit Alkohol-Äther zur Marke auf und filtriert. Zur Bestimmung werden 10 oder 20 ccm des Filtrates in ein 100-ccm-Erlenmeyerkölbchen (aus widerstandsfähigem Glase) gemessen und nach

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 96, S. 345. 1919.

<sup>2)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 52, S. 191. 1922.

Zufügen von 0,1 ccm konzentrierter NaOH (aus Na bereitet) auf dem Wasserbad verdampft. Sobald nur noch wenige Tropfen Flüssigkeit vorhanden sind, wird das Kölbchen rotierend bewegt, um den Rückstand gleichmäßig über dem Boden zu verteilen (nicht an den Wänden). Das Erhitzen setzt man so lange fort, bis nur noch 2 oder 3 Tropfen zurückgeblieben sind und der Alkoholgeruch verschwunden ist. Nun wird vorsichtig durch Zufügen von 0,1 ccm verdünnter  $H_2SO_4$  teilweise\*) neutralisiert (1 ccm konzentrierter  $H_2SO_4$  + 3 ccm  $H_2O$ ), gut gemischt und wieder über dem Boden des Kölbchens verteilt. Man dampft ein bis alle Feuchtigkeit verschwunden ist, andererseits ist ein zu starkes Eintrocknen zu vermeiden.

Isolierung und Bestimmung von Cholesterin. Nach dem Abkühlen fügt man 10 ccm Chloroform zu und läßt unter Schütteln 10 Minuten stehen. Dann wird durch ein kleines gehärtetes Filterchen filtriert und noch 2 mal mit je 5 ccm Chloroform extrahiert. Wenn man gut getrocknet hat, bleibt alles Ungelöste am Boden des Kölbchens haften. Die vereinigten Chloroformextrakte werden auf 3 ccm eingedampft und in einen 10 ccm fassenden, graduierten, mit Glasstopfen versehenen Zylinder übergeführt. Man bringt das Volumen mit Chloroform auf 5 ccm, indem man das Kölbchen mehrmals nachwäscht.

Die Bestimmung des Cholesterins wird mittels der Liebermann-Burchardtschen Reaktion (§ 232) ausgeführt. Zu den 5 ccm Chloroformextrakt setzt man 1 ccm Essigsäureanhydrid und 0,1 ccm konzentrierte  $H_2SO_4$ , verschließt den Zylinder und mischt gut. Nach 15 Minuten Stehens bei 20—22° wird die Lösung in das Colorimeter gefüllt und gegen die Standardcholesterinlösung, die die gleichen Zusätze enthält, verglichen. Die Farbe ist gegen Licht empfindlich, weshalb es nötig ist, während der letzten 15 Minuten den Zylinder genau demselben Licht auszusetzen, bei dem die Ablesung gemacht wird.

Bestimmung der Fettsäuren. Der von Chloroform nicht gelöste Rückstand wird mit 10 ccm reinem Alkohol 10 Minuten lang auf dem Wasserbad gekocht, die heiße Lösung dann durch dasselbe gehärtete Filterchen gegossen, durch welches der Chloroformextrakt filtriert worden war. Nachdem die Extraktion nochmals mit 5 ccm Alkohol wiederholt ist, dampft man die vereinigten Filtrate auf etwa 3 ccm in einem Erlenmeyerkölbchen ein, bringt sie in einen verschließbaren, graduierten Zylinder und spült das Kölbchen mit Alkohol nach, bis das Volumen im Zylinder 5 ccm beträgt. Man mißt in ein Becherglas von 200 ccm 100 ccm destilliertes Wasser und gießt den Alkoholextrakt durch einen kleinen Trichter, dessen Ende zu einer Öffnung von 1 mm ausgezogen ist, in das Wasser ein, indem man dabei kräftig umrührt und das Trichterende bis nahe an den Boden des Becherglases einsenkt. Der Zylinder wird mit der erhaltenen Lösung durch den Trichter nachgespült. In einem anderen Becherglase hat man zu 100 ccm Wasser auf dieselbe Weise 5 ccm der alkoholischen Standardseifenlösung zugefügt. Nun werden in jedes Becherglas 10 ccm verdünnte HCl (1 konzentrierte HCl + 3  $H_2O$ ) unter Umrühren zugesetzt und die Flüssigkeiten nach Stehen von nicht weniger als 3 Minuten und nicht länger als 10 Minuten im Nephelometer verglichen.

*Bestimmung der Milchsäure in kleinen Mengen Substanz nach Laquer\*\*).*

708. Diese ursprünglich für Muskeln ausgearbeitete Methode läßt sich ganz allgemein anwenden.

\*) Man setzt etwas weniger Säure zu als zur Neutralisation nötig ist, damit keine freien Fettsäuren entstehen. Aus dem gleichen Grunde muß auch das Mischen sehr sorgfältig geschehen. Um besser mischen zu können, kann man auch ein oder zwei Tropfen Wasser zufügen.

\*\*) Es handelt sich um die in eine Mikromethode umgewandelte Methode von Embden. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 116, S. 169. 1921 u. Bd. 118, S. 215. 1922.

**Prinzip.** Das nach Schenck entweißte Muskelbreifiltrat (Blut, Serum) wird mit Äther extrahiert. Im Rückstande des Ätherextraktes wird die Milchsäure durch  $\text{H}_2\text{SO}_4$  und  $\text{KMnO}_4$  zu Acetaldehyd oxydiert. Dieser wird abdestilliert und in einer gemessenen Menge  $\text{NaHSO}_3$ -Lösung aufgefangen. Durch Titration mit  $\frac{n}{50}$ -Jodlösung wird die Menge der verbrauchten Sulfitlösung ermittelt.

**Erforderliche Lösungen.** 1. 4proz. Salzsäure. 2. Gesättigte Sublimatlösung. 3. 25proz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . 4. Ammoniumsulfat. 5. Reinsther Äther (mit Sodalösung und Wasser gewaschen, über  $\text{CaCl}_2$  getrocknet und über Na destilliert). 6.  $\frac{n}{10}$ -Natronlauge. 7.  $\frac{n}{250}$ - $\text{KMnO}_4$ -Lösung, für jeden Versuch aus  $\frac{n}{10}$ -Lösung mit frisch ausgekochtem Wasser zu bereiten. 8.  $\frac{n}{50}$ -Na-Bisulfitlösung, immer frisch aus festem Natriumbisulfit mit ausgekochtem Wasser zu bereiten. 9.  $\frac{n}{50}$ -Jodlösung für jeden Versuch frisch aus  $\frac{n}{10}$ -Lösung mit frisch ausgekochtem Wasser zu bereiten.

**Ausführung.** Etwa 2 g der unter Eiskühlung zerkleinerten Muskelmasse werden in einem Wägegläschen mit eingeschliffenem Stopfen gewogen und mit 5 ccm 4proz. HCl und 5 ccm gesättigter Sublimatlösung entweißt. Am nächsten Tage wird filtriert, das Filtrat mit  $\text{H}_2\text{S}$  entquecksilbert, der Schwefelwasserstoff durch einen Luftstrom verjagt. Alle Operationen sind quantitativ durchzuführen. In etwa 3—6 ccm der gemessenen Flüssigkeit wird eine Bestimmung ausgeführt. Sie werden mit 80 ccm reinem Äther in einem speziell konstruierten Mikroextraktionsapparat<sup>1)</sup> extrahiert. Vor Beginn der Extraktion setzt man 1 ccm 25proz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  und Ammoniumsulfat bis zur Sättigung zu. Die Extraktion dauert 30 Stunden. Dann wird der Ätherauszug in einen Erlenmeyer filtriert und mit je 10 ccm reinen Äthers 2 mal nachgewaschen, zum Filtrat fügt man etwa 30 ccm Wasser. Nach Abdestillieren des Äthers wird die zurückbleibende wässerige Lösung quantitativ in eine Porzellanschale übergespült, mit  $\frac{n}{10}$ -Natronlauge bis zur schwach alkalischen Reaktion versetzt und auf dem Wasserbad zum Verjagen der letzten Spuren von Äther und Alkohol auf  $\frac{1}{2}$ — $\frac{1}{3}$  des ursprünglichen Volumens eingedampft.

Die Lösung wird quantitativ in einen Destillationskolben von 200 ccm Inhalt gespült, mit 2 ccm 25proz. Schwefelsäure angesäuert und auf 100 ccm aufgefüllt, so daß die ganze Lösung 0,5% Schwefelsäure enthält. Man überzeugt sich, daß kongosaure Reaktion herrscht und versetzt mit einer Messerspitze Talkum.

Der Kolben wird mit einem doppelt durchbohrten Gummistopfen verschlossen. In der einen Bohrung steckt ein Tropftrichter von 100 ccm Inhalt, dessen ausgezogenes Ende höchstens 10 cm über dem Flüssigkeitsspiegel der Milchsäurelösung in dem Kolben endigen soll. Er wird mit einer  $\frac{n}{250}$ -Kaliumpermanganatlösung gefüllt. Das in der zweiten Bohrung befindliche möglichst lange Rohr ist schräg nach unten gebogen und mit einem kurzen Liebigkühler versehen. Es taucht in eine Vorlage, die 20 ccm einer etwa  $\frac{n}{50}$ -Bisulfitlösung in 40 ccm Wasser enthält und durch einen doppelten Eismantel kühl gehalten wird. Bei mangelnder Eiskühlung treten Titerverluste der Bisulfitlösung ein, die eine Aldehydbindung vortäuschen und somit zu hohe Milchsäurewerte liefern. Dann erhitzt man den Kolbeninhalt bis zum Sieden und läßt die Permanganatlösung möglichst langsam (nicht mehr als 60 Tropfen in der Minute) zutropfen, bis auch nach längerem Sieden eine deutliche Rotfärbung bestehen bleibt, wobei der Zufluß so geregelt wird, daß keine Volumenveränderung des Kolbeninhalts eintritt. 10 Minuten nach Beendigung der Oxydation bestimmt man in der Vorlage die Titerabnahme der Bisulfitlösung gegen die vorher benutzte  $\frac{n}{50}$ -Jodlösung.

1 ccm verbrauchter Jodlösung entspricht 0,9 mg Milchsäure.

Weitere Methoden.

Andere Methoden zur Bestimmung kleiner Mengen von Milchsäure sind von Harrop<sup>2)</sup> und Clausen<sup>3)</sup> angegeben worden.

<sup>1)</sup> Bezugsquelle F. u. M. Lautenschläger, Frankfurt. Abbildung in Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 118, S. 215. 1922.

<sup>2)</sup> Proc. of the soc. f. exp. biol. and med. Bd. 17, S. 162. 1920.

<sup>3)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 52, S. 263. 1921.



## Untersuchung der Stützgewebe.

### Untersuchung der Knochen, Zahnsubstanzen und Verkalkungen.

709. **Bestandteile.** Die Grundsubstanz des Knochengewebes und des Dentins der Zähne, welche von den die Zellen enthaltenden und miteinander verbundenen Knochenhöhlen bzw. von den Zahnkanälchen durchsetzt wird, ist zusammengesetzt aus Kollagen (mit kleinen, nur einige Zehntel Prozent des frischen Knochens betragenden Beimengungen von Osseomuroid und Osseoalbumoid) und anorganischen Salzen. Diese, die sog. Knochenerde, bestehen zum größten Teil aus Calcium und Phosphorsäure; in geringerer Menge findet sich Magnesium und Kohlensäure, in noch geringerer Natrium und Kalium und in Spuren Chlor- und Fluorwasserstoff.

Außerdem finden sich in Wasser und in Alkohol und in Äther lösliche Substanzen in geringer Menge (unter ihnen auch Glykogen<sup>1)</sup>, die vermutlich den (aus der Grundsubstanz nicht zu entfernenden) Zellen angehören.

Der Zement der Zähne ist echtes Knochengewebe, der Zahnschmelz ist frei von organischer Substanz.

Frische, gut gereinigte Knochen scheinen nie Eisen zu enthalten; dasselbe findet sich dagegen als Phosphat nicht selten in fossilen Zähnen, zuweilen sogar in erheblicher Quantität. Knochen, welche längere Zeit in der Erde gelegen haben, sind oft von Vivianit (S. 39) blau gefärbt.

### Nachweis der einzelnen Bestandteile in Knochen, Zähnen, Verkalkungen.

710. Die frischen, möglichst gereinigten und vom Mark befreiten Knochen werden 24 Stunden in fließendem Wasser liegen gelassen, nochmals gründlich abgeschabt und durch Zerstoßen, Zerreiben und Zermahlen zerkleinert. Zähne bzw. die einzelnen Zahnsubstanzen sowie Verkalkungen werden ebenfalls gründlich gereinigt und dann zerkleinert.

Herstellung des  
Untersuchungs-  
materials.

**Kohlensäure.** Man übergießt einen Teil des Pulvers mit verdünnter Salzsäure und weist die freigemachte Kohlensäure nach § 123, Schluß, nach.

**Fluorwasserstoff.** Zum Nachweis dient das in § 46, 1. angegebene Verfahren. Man nehme nicht zu wenig (mindestens 5 g) der Asche, da Hauchbilder allein, welche auch schon bei Benutzung von 1 g Asche auftreten, auch andere Ursachen der Entstehung haben können (Fresenius<sup>2)</sup>).

**Die übrigen Bestandteile.** Das Knochenpulver wird mit Wasser ausgewaschen (Kaltwasserauszug) und dann mit Alkohol und Äther extrahiert (Alkohol-Ätherauszug). Man behandelt die Massen jetzt mit verdünnter (0,2—0,5 proz.), mehrfach gewechselter Salzsäure, um die Salze in Lösung zu bringen und nach Filtration (Salzsäureauszug) und Entfernung der Salzsäure durch langes Auswaschen in fließendem, zuletzt in destilliertem Wasser mit halbgesättigtem Kalkwasser (2—5 ccm auf je 1 g der feuchten Substanz), um das Osseomuroid auszuziehen<sup>3)</sup>. Diese Extraktion ist nach 48stündigem Stehen und häufigem Umschütteln in verschlossenem Gefäß beendet. Jetzt wird filtriert (Kalkwasserauszug) und die zurückbleibende Masse mit Salzsäure übergossen und von dieser und dem gebildeten Calciumchlorid durch Auswaschen mit Wasser (wie oben) völlig befreit. Man kocht nun mit einzelnen Wasserportionen je einige Stunden aus, solange noch Kollagen (als Glutin) gelöst wird (Heißwasserauszug). Auf diese Weise werden erhalten: ein Kaltwasserauszug (1), ein Alkohol-Ätherauszug (2), ein Salzsäure- (3), ein Kalkwasser- (4), ein Heißwasserauszug (5) und ein Rückstand (6).

<sup>1)</sup> Händel: Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 92, S. 104. 1902.

<sup>2)</sup> Qualit. chem. Analyse. 17. Aufl. 1919, S. 383.

<sup>3)</sup> Hawk u. Gies: Americ. Journ. of physiol. Bd. 5, S. 387. 1901.

1. Kaltwasserauszug. Er enthält sehr geringe Mengen nicht weiter untersuchter Substanzen, unter denen sich jedenfalls aus den Zellen stammende lösliche Eiweißstoffe und Extraktivstoffe finden werden. In osteomalacischen Knochen fand C. Schmidt Milchsäure und durch diese bedingte saure Reaktion der Knochenflüssigkeit. Indessen erscheint die Richtigkeit dieser Angabe zweifelhaft (Levy<sup>1</sup>). Die Untersuchung auf Milchsäure würde nach § 83 zu geschehen haben.
2. Alkohol-Ätherauszug. Die Untersuchung auf Fett, Cholesterin, Phosphatide erfolgt nach § 660.
3. Salzsäureauszug. Derselbe enthält die anorganischen Bestandteile mit Ausnahme der Kohlensäure. Man engt ihn ein und untersucht ihn nach § 532 auf Calcium, Magnesium, Phosphorsäure, sowie nach § 531, 5. und 6. auf Kalium und Natrium. Für die Prüfung auf Salzsäure ist ein Teil des wie oben beschrieben gereinigten Knochenpulvers statt mit Salzsäure mit Salpetersäure zu extrahieren und der Nachweis nach § 531, 2. zu führen.
4. Kalkwasserauszug. Über die Darstellung des in ihm enthaltenen Osseomucoid. Osseomucoids s. § 468.
5. Heißwasserauszug. Die einzelnen, Glutin enthaltenden Auszüge werden vereinigt und eingengt; beim Erkalten gelatiniert die Flüssigkeit, deren weitere Untersuchung nach § 379 geschieht.
6. Rückstand. Er stellt das Osseoalbumoid (§ 383) dar, aber unreinigt mit sehr viel Asche (70—80%). Um es aschefreier (2—3% Asche) zu erhalten, behandelt man die Knochenmasse nach der Entfernung des Mucoids mit Kalkwasser, drei Wochen lang mit häufig gewechselter 0,3proz. Salzsäure, wäscht dann gründlich mit kaltem und warmem Wasser und kocht nun (zur Entfernung des Kollagens) mit großen Mengen häufig erneuerten Wassers tagelang (etwa 100 Stunden) aus. Zuletzt wird mit Alkohol und Wasser behandelt (Hawk und Gies<sup>2</sup>).

**Bestimmung des Gesamtstickstoffs, der einzelnen Aschebestandteile, der Gesamtasche in Knochen usw.**

711. Für diese Bestimmungen benutzt man Proben der in der § 710 angegebenen Weise gereinigten pulverisierten Substanz, nachdem man sie bei 110° bis zum konstanten Gewicht getrocknet hat.

**Gesamtstickstoff, einzelne Aschebestandteile.** Man bestimmt den Gesamtstickstoff nach Kjeldahl (§ 558b) unter Benutzung von 0,5 g, die einzelnen Aschebestandteile nach § 533 ff.

**Kohlensäure.** Die Ermittlung des Kohlensäuregehaltes geschieht nach § 556, indem man 5 g oder mehr des Pulvers verwendet. Man hat dabei nicht zu befürchten, daß die organische Substanz mit der verdünnten Salzsäure Kohlensäure entwickelt, während dagegen die Bestimmung der Kohlensäure nach dem Veraschen durch Glühen ein zu niedriges Resultat gibt (Wibel).

**Gesamtasche.** Man extrahiert einige Gramm mit Alkohol und Äther, versacht, befeuchtet den Rückstand nach dem Erkalten (zur Restituierung der ausgetriebenen Kohlensäure\*) mit Ammoncarbonat, trocknet, erhitzt wieder bis zum gelinden Glühen und wägt nach dem Erkalten. Man löst nun die Asche in einem Becherglase in verdünnter Salzsäure, filtriert etwa vorhandene Kohle

\*) Die Restitution ist aber nur eine teilweise. Wibel: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 7, S. 220. 1874. Journ. f. prakt. Chem. N. F. Bd. 9, S. 113. 1874.

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 19, S. 239. 1894.

<sup>2</sup>) Americ. journ. of physiol. Bd. 7, S. 340. 1902.

durch ein gewogenes aschefreies Filter ab, wäscht mit Wasser gut aus, trocknet, wägt Filter und Kohle und zieht das Gewicht der Kohle von dem der Asche ab.

*Quantitative Analyse der Asche von Knochen usw.*

712. Herstellung der Asche nach S. Gabriel<sup>1)</sup>. Man erhitzt in einem etwa 250 ccm fassenden Kölbchen etwa 10—15 g der Substanz mit 75 ccm Glycerinlauge (30 g Ätzkali in 1000 ccm Glycerin) unter häufigem Umschütteln allmählich bis auf 200° und erhält ungefähr 1 Stunde bei dieser Temperatur. Die Einwirkungsdauer hängt im wesentlichen von der Festigkeit des Gewebes und dem Feinheitsgrade des Pulvers ab. Die bis auf 150° erkaltete Masse gießt man in eine Schale, in der sich 500 ccm kochendes Wasser befinden, rührt um, läßt absitzen, zieht die überstehende Flüssigkeit mit einem mit Leinwand überspannten Heber ab, übergießt wieder mit Wasser und wiederholt diese Operationen so oft, bis das Waschwasser keine Spur alkalischer Reaktion mehr zeigt. Der auf ein Filter gebrachte und getrocknete Rückstand darf beim Glühen keine Spur einer Bräunung zeigen. Ist das der Fall, so muß das Erhitzen mit Glycerinlauge wiederholt werden.

Herstellung der  
Asche nach  
S. Gabriel.

Ausführung. Von dieser Asche benutzt man einzelne Portionen für die unter 1.—6. aufgeführten Bestimmungen. Da sie sehr hygroskopisch ist, so wägt man sie am besten lufttrocken ab, bestimmt in einer besonderen Portion den Wassergehalt durch Trocknen bei 130° bis zum konstanten Gewicht und berechnet die Analysenwerte auf Trockengewicht.

1. Calcium, Magnesium, Phosphorsäure, Eisen. Für die Bestimmung von Calcium und Magnesium löst man eine abgewogene Menge (3—4 g) in Salzsäure und verfährt nach §§ 536 und 538. Die Bestimmung der Phosphorsäure geschieht nach § 554. Eisen ist in frischen und gut gereinigten Knochen und Zähnen nicht vorhanden; in fossilen Zähnen kann es vorkommen. Es gibt sich dadurch zu erkennen, daß der Niederschlag, welcher in der salzsauren Lösung der Asche auf Zusatz von Ammoniak entsteht, in Essigsäure sich nicht völlig löst. Dieser unlösliche Teil (Ferriphosphat) wird auf einem kleinen aschefreien Filter gesammelt, ausgewaschen, getrocknet, geglüht und gewogen.

Calcium, Magnesium,  
Phosphorsäure,  
Eisen.

2. Kalium, Natrium. Man löst die abgewogene Menge (5 g oder mehr) in Salzsäure und verfährt nach § 533.

Kalium, Natrium.

3. Kohlensäure. Die Bestimmung, zu der man mindestens 3 g zu nehmen hat, geschieht nach § 556.

Kohlensäure.

4. Salzsäure. Die Menge ist sehr gering; zu ihrer Bestimmung löst man eine abgewogene Menge in Salpetersäure und verfährt nach § 545.

Salzsäure.

5. Fluorwasserstoff. Die sehr kleinen Mengen von Fluorwasserstoff genau zu bestimmen, macht Schwierigkeiten. Die Methode von Carnot<sup>2)</sup> (Wägung als Kaliumsiliciumfluorid) scheint brauchbar zu sein. Von Jodlbauer<sup>3)</sup> wird die gasanalytische Methode von Hempel empfohlen. Sie beruht im wesentlichen darauf, daß man das Volumen des aus der (vollständig kohlefreien) Asche gemeinsam entwickelten Kohlendioxyds und Siliciumfluorids bestimmt, das letztere durch Wasser zersetzt, das Gasvolumen wieder bestimmt und aus der Differenz das Fluor berechnet. Das Freseniusche Verfahren in der Modifikation von Brandl<sup>4)</sup>, welches auf der Abscheidung von Kieselsäure aus Siliciumfluorid beruht, liefert nach Jodlbauer zu niedrige Werte.

Fluorwasserstoff.

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 18, S. 275. 1894.

<sup>2)</sup> Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 114, S. 750. 1892.

<sup>3)</sup> Zeitschr. f. Biol. Bd. 41, S. 486. 1901; Bd. 44, S. 259. 1903.

<sup>4)</sup> Harms: Zeitschr. f. Biol. Bd. 38, S. 487. 1899.

Krystallwasser. 6. Wasser<sup>1)</sup>. a) Krystallwasser. Dasselbe entweicht erst bei etwa 350°. Da bei dieser Temperatur auch Kohlensäure ausgetrieben wird, so muß die Bestimmung in der Weise geschehen, daß man die Substanz wie bei der Elementaranalyse im Platinschiffchen mit übergeleitetem trockenen Luftstrom erhitzt und das Wasser in einem vorgelegten Chlorcalciumrohr auffängt.

Konstitutionswasser. b) Konstitutionswasser. Dasselbe entweicht erst beim Glühen mit wasserfreier Kieselsäure.

Analyse bei geringen Substanzmengen. Wenn es an der erforderlichen Substanz mangelt, so kann man in der Asche die Kohlensäure nach § 556 bestimmen, indem man dieselbe statt mit Salzsäure mit Salpetersäure austreibt. In der salpetersauren Lösung bestimmt man dann das Chlor als Chlorsilber, entfernt das überschüssige Silber durch Salzsäure und ermittelt im Filtrat den Gehalt an Calcium, Magnesium und Phosphorsäure nach 1.

#### *Bestimmung des Kollagens in Knochen und Zähnen.*

713. Man extrahiert das nach § 710 hergestellte und bei 110° getrocknete und gewogene Pulver nacheinander mit Alkohol und Äther, mit verdünnter Salzsäure und halbgesättigtem Kalkwasser in der § 710 beschriebenen Weise und wäscht zunächst mit verdünnter Salzsäure, dann mit Wasser bis zum Verschwinden der sauren Reaktion des Waschwassers. Die Masse wird jetzt mit Wasser in ein Glasrohr eingeschmolzen und etwa 24 Stunden bei 100° im Wasserbade oder bei 105—110° im Ölbad erhitzt. Man filtriert dann kochend heiß durch ein Faltenfilter, wäscht mit kochendem Wasser aus, verdunstet, trocknet bei 110° und wägt.

#### *Untersuchung des Knochenmarks.*

714. Das Knochenmark besteht zum allergrößten Teil aus Fett. Es sind außerdem in kleinen Mengen in ihm Proteine, Phosphatide, Cholesterin, Oxycholesterinester<sup>2)</sup>, Inosit, Milchsäure, Harnsäure, Nucleinbasen, Kreatin, Glykogen<sup>3)</sup>, ferner anorganische Salze nachgewiesen worden.

Man extrahiert nacheinander das fein zerkleinerte Mark mit 0,5 proz. Kaliumoxalatlösung und ganz verdünnter Sodalösung und prüft den ersteren Auszug nach § 635 und § 634 auf Albumin, Globulin, Fibrinogen<sup>4)</sup> und Nucleoproteid, den zweiten nach § 634 auf Glucoproteid und Nucleoproteid.

Ein aus mehreren Hundert Gramm Mark hergestellter Wasserauszug dient zur Untersuchung auf Extraktivstoffe nach § 721.

Isolierung und Nachweis der ätherlöslichen Stoffe (Fett, Cholesterin, Phosphatide) geschieht nach § 660. Für die Untersuchung der Fette behandelt man das Mark direkt mit Äther, filtriert und verdunstet.

Eingehende Untersuchungen über die Zusammensetzung des Markes sind von Nerking<sup>5)</sup> ausgeführt worden. Ein Verfahren zur Darstellung von Lecithin aus Knochenmark ist von Otolski<sup>6)</sup> angegeben, doch ist der isolierte Körper kein reines Lecithin, sondern jedenfalls ein Gemenge von Phosphatiden.

#### *Untersuchung des Knorpelgewebes.*

715. **Bestandteile.** Der Knorpel besteht aus der Intercellularsubstanz und den in sie eingelagerten Zellen. Beim hyalinen Knorpel ist sie frei von faserigen Beimischungen, beim elastischen wird sie von elastischen, beim Bindegewebsknorpel von fibrillären Fasern durchzogen. Die Intercellularsubstanz enthält Chondromucoid, Chondroitinschwefelsäure, Kollagen und Albumoid (C. Th. Mörrner<sup>7)</sup>), ferner etwas durch verdünnte Kochsalzlösung ausziehbare Globulin-

<sup>1)</sup> Gabriel: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 18, S. 276 u. 296. 1894.

<sup>2)</sup> Lifschütz: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 53, S. 140. 1907.

<sup>3)</sup> Händel: Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 92, S. 104. 1902.

<sup>4)</sup> P. Th. Müller: Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 6, S. 454. 1905.

<sup>5)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 10, S. 167. 1908. <sup>6)</sup> desgl. Bd. 4, S. 124. 1907.

<sup>7)</sup> Skandinav. Arch. f. Physiol. Bd. 1, S. 210. 1889. Über Albumoid s. auch Hawk u. Gies: Americ. journ. of physiol. Bd. 7, S. 354. 1902.

substanz (Hoppe-Seyler), ätherlösliche Stoffe und anorganische Salze (Calcium, wenig Magnesium und Natrium, kein Kalium oder nur Spuren davon, Phosphorsäure, Salzsäure und Schwefelsäure). Eine Trennung der Intercellularsubstanz von den Zellen ist unausführbar. Der Knorpel enthält auch in verhältnismäßig reichlicher Menge (0,2%) Glykogen (Pflüger<sup>1</sup>).

**Untersuchung.** a) Durch Erhitzen mit Wasser bei 110—120° werden dem Knorpel Chondromucoid, Chondroitinschwefelsäure und Leim entzogen (Chondrinlösung § 380), während Albumoid, Knorpelzellen und, bei elastischem Knorpel, auch Elastin (Hoppe-Seyler) zurückbleiben.

b) Zur Isolierung der einzelnen organischen Bestandteile behandelt man große Mengen des möglichst gereinigten und fein zerkleinerten hyalinen Knorpels in einzelnen Portionen in folgender Weise:

1. Chondromucoid. Vgl. § 464.

2. Chondromucoid und Albumoid. Man digeriert die Masse 1 bis 2 Wochen bei 40° mit 0,1—0,2proz. Salzsäure, bis sämtliches Kollagen in Leim umgewandelt und ausgezogen worden ist, wäscht dann mit Wasser vollständig säurefrei, extrahiert mit 0,05—0,1proz. Kalilauge und filtriert. Auf dem Filter bleibt zusammen mit Knorpelzellen das Albumoid (§ 382), aus dem Filtrat fällt auf Zusatz von verdünnter Säure das Chondromucoid, dessen Reinigung weiter nach § 464 erfolgt (C. Th. Mörner).

3. Glutin und Albumoid. Man behandelt den Knorpel zur Entfernung von Chondromucoid und Chondroitinschwefelsäure mit 0,2—0,5proz. Kalilauge, wäscht mit Wasser alkalifrei, kocht im Papinschen Topf und filtriert. Auf dem Filter bleibt das mit Knorpelzellen verunreinigte Albumoid (§ 382), aus dem Filtrat scheidet sich beim Sättigen mit Natriumsulfat der Leim (aus dem Kollagen während des Kochens entstanden) ab, dessen wässrige Lösung durch Dialyse von Salz befreit werden kann (C. Th. Mörner).

4. Chondroitinschwefelsäure. Vgl. § 257.

5. Glykogen. Die Isolierung und Bestimmung geschieht in der bei der Untersuchung der Organe angegebenen Weise.

c) Was die anorganischen Salze betrifft, so ist man auf die Untersuchung des Ascherückstandes angewiesen. Diese liefert aber insofern kein richtiges Bild, als auch die aus der Chondroitinschwefelsäure stammende Schwefelsäure sich in der Asche befindet.

### Untersuchung des Bindegewebes.

716. **Bestandteile.** Die Grundsubstanz des Bindegewebes, in die wenig zahlreiche Zellen eingelagert sind, besteht aus kollagenen und elastischen Fasern. Überwiegen die kollagenen, so spricht man von fibrillärem Bindegewebe, überwiegen die elastischen, von elastischem Gewebe. Außer Kollagen und Elastin finden sich in kleinen Mengen gerinnbare Eiweißstoffe, Glucoproteid (im Bindegewebe), Nucleoproteid (im elastischen Gewebe), Chondroitinschwefelsäure, ätherlösliche Substanzen, Extraktivstoffe, z. B. Kreatin, Nucleinbasen, Glykogen<sup>2</sup>), anorganische Salze (Salzsäure, Phosphorsäure, Schwefelsäure, Kieselsäure<sup>3</sup>), Natrium, Kalium, Calcium, Magnesium, Eisen).

<sup>1</sup>) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 92, S. 102. 1902. — Händel: desgl. Bd. 92, S. 104. 1902.

<sup>2</sup>) Händel: Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 92, S. 104. 1902.

<sup>3</sup>) H. Schulz: Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 84, S. 67. 1901; Bd. 89, S. 112. 1902; Bd. 131, S. 447. 1910 u. Bd. 144, S. 346. 1912. S. dazu Frauenberger (Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 57, S. 17. 1908), welcher viel weniger Kieselsäure fand. Die niedrigeren Werte sind wohl die richtigen.

**Untersuchung<sup>1)</sup>.** Zur Isolierung der Bestandteile behandelt man einzelne Portionen des von anhaftendem Gewebe befreiten und gut zerkleinerten Materials\*) in folgender Weise:

a) Eiweißstoffe. Man extrahiert mehrere Tage mit verdünnter Kochsalzlösung unter Thymolzusatz, filtriert und prüft nach § 634, auf Nucleoproteid und Glucoproteid, nach § 635 auf Albumine und Globuline.

b) Glucoproteid und Kollagen. Man extrahiert zunächst mit Wasser, dann mehrere Tage mit halbgesättigtem Kalkwasser und filtriert. Aus dem Filtrat scheidet sich auf vorsichtigen Zusatz von Salzsäure Glucoproteid ab (§ 466). Der Rückstand wird mit Wasser kalkfrei gewaschen, mit Alkohol und Äther ausgezogen und darauf mit einzelnen Wasserportionen je einige Stunden ausgekocht: Das Kollagen geht als Glutin in Lösung (§ 379).

c) Elastin s. § 378.

d) Ätherlösliche Substanzen. Man extrahiert die getrocknete und fein pulverisierte Substanz mit Äther und untersucht den Ätherrückstand auf Cholesterin, Phosphatide und Fett (§ 660).

e) Extraktivstoffe. Die Untersuchung des wässerigen Auszugs auf Kreatin usw. geschieht wie es für Organe (§ 721) angegeben ist.

f) Anorganische Salze. Für die Untersuchung der anorganischen Salze verascht man nach § 525 und prüft die Auszüge nach § 531 und § 532; doch ist dabei zu berücksichtigen, daß die Schwefelsäure wenigstens zum Teil aus organischen Bestandteilen des Gewebes stammen kann.

## Untersuchung der Muskeln und drüsigen Organe.

### *Allgemeines.*

Reinigen der Organe.

717. Die Organe sind möglichst frisch, für manche Zwecke, z. B. für Glykogenbestimmungen, unmittelbar nach dem Tode in Arbeit zu nehmen und möglichst vollständig von anhaftenden bindegewebigen Bestandteilen, Blutgefäßen, Nerven usw. frei zu präparieren. Je blutfreier ein Organ zur Untersuchung kommt, um so besser ist es. Der Verblutungstod schafft in dieser Beziehung die günstigsten Verhältnisse; auch Muskeln von menschlichen Extremitäten, die vor der Amputation mit der Esmarchschen Binde behandelt waren, sind verhältnismäßig blutarm. Bei Tieren kann eine völlige Entfernung des Blutes durch Verblutenlassen und Ausspülen des ganzen Gefäßsystems oder nur der Gefäße des einzelnen Organs mit 0,9 proz. Kochsalzlösung erreicht werden; indessen werden dabei gleichzeitig wasserlösliche Substanzen der Gewebe selbst mit fortgeschafft, so daß dieses Verfahren nur unter bestimmten Umständen zur Anwendung gelangen kann.

Ein gelegentlich brauchbares, allerdings sehr umständliches Hilfsmittel, um die durch die Anwesenheit des Blutes in den Organen für qualitative und quantitative Untersuchungen bedingten Unsicherheiten zu vermeiden, ist folgendes: Man bestimmt in einer abgewogenen Menge des Organs colorimetrisch durch Vergleichung mit einer gewogenen Menge des Blutes desselben Individuums nach § 684ff. den Blutgehalt und ermittelt andererseits sowohl im Blut als im Organ den Prozentgehalt der Substanz, um die es sich handelt. Durch Rechnung läßt sich dann leicht ermitteln, ob und in welcher Menge die Substanz sich im (blutfreien) Organ findet.

Zerkleinern der Organe.

Stets ist es nötig, das Organ vor der Untersuchung zu zerkleinern und in einen möglichst gleichmäßigen und möglichst feinen Brei zu verwandeln. Es geschieht das durch Zerschneiden mit Messer und Schere und

\*) Als fibrilläres Bindegewebe benutzt man am besten die Achillessehne vom Rind, als elastisches Gewebe das Lig. nuchae vom Rind.

<sup>1)</sup> Vandergrift u. Gies: Americ. Journ. of Physiol. Bd. 5, S. 287. 1901. — Buerger u. Gies: desgl. Bd. 6, S. 219. 1902. — Richards u. Gies: desgl. Bd. 7, S. 92. 1902.

Zerreiben in der Reibschale, wenn es sich um kleine Mengen oder mit der Fleischhackmaschine oder dem Hackmesser, wenn es sich um größere Quantitäten handelt. Das Zerreißen und Zerschneiden in der Hackmaschine ist sehr schnell ausführbar, aber gleichmäßiger und in beliebiger Feinheit gelingt die Zerkleinerung mit schwerem Wiegemesser auf einem Brett aus hartem Holz. Dieses letztere Verfahren bietet auch größere Sicherheit dafür, daß die einzelnen Fasern und Zellen zerschnitten und nicht bloß zerrissen werden. Das Zerreiben der grob zerstückelten Masse mit Glasstücken oder Sand gelingt ziemlich schnell und gut; es geht aber leicht der abgeriebene Kiesel- oder Glasstaub als Trübung durchs Filter, wenn eine Filtration der wässerigen Auszüge des Organbreies angeschlossen wird. Eine noch gründlichere Zerkleinerung und gleichmäßigere Durchmischung als mit Hackmaschine und Hackmesser wird erreicht, wenn man das Gewebe im Dewarschen Gefäß gefrieren läßt und weiter verfährt, wie § 733 angegeben. Über einen Apparat, der die Organe in hartgefrorenem Zustande in eine schneearartige Masse zu zerkleinern gestattet, s. Kossel<sup>1</sup>.

Isolierung der Zellen.

Eine Isolierung der Zellen der Organe gelingt in manchen Fällen, z. B. bei der Leber, Milz, Thymus, indem man das entblutete, mit Kochsalzlösung ausgespülte Organ durch Leinwand knetet. Bindegewebe, Gefäße usw. bleiben zurück. Der durchgepreßte Brei besteht zum größten Teil aus unbeschädigten Zellen (Plósz<sup>2</sup>), Krüger<sup>3</sup>).

Über die Herstellung von Organpreßsaft s. Offringa<sup>4</sup>). Vgl. auch § 502.

#### *Bestandteile der Organe.*

718. Der Muskel ist zusammengesetzt aus Muskelfasern, die durch fibrilläres Bindegewebe zusammengehalten werden. Er enthält ungefähr 75% Wasser und 25% feste Stoffe. Die festen Bestandteile der Muskelfasern sind zum größten Teil (etwa 80%) Proteinstoffe, und zwar hauptsächlich Eiweißstoffe, daneben in kleiner Menge Nucleoprotein und Oxyhämoglobin. Die Eiweißstoffe des frischen, nicht geronnenen Muskels\* (Muskelplasma) sind nach v. Fürth<sup>5</sup>) Myogen (§ 332) und Myosin (§ 334). Die Eiweißstoffe des abgestorbenen Muskels sind noch ungenügend bekannt; der am reichlichsten vorkommende wird ebenfalls Myosin genannt, ist aber in seinen Beziehungen zum Myosin des Plasmas noch nicht genügend aufgeklärt. Serumalbumin und Serumglobulin, die sich ebenfalls finden, gehören vielleicht dem Blut an. Ferner sind in den Muskelfasern nachgewiesen: Äthylalkohol, Acetaldehyd, flüchtige Fettsäuren, Milchsäure, Bernsteinsäure, Fumarsäure, Seifen, Fett, Glykogen, Glucose, Maltose, Ammoniak, Harnstoff (reichlich bei Haifischen und Rochen), Methylguanidin, Kreatin, Kreatinin, Purinbasen, Spuren von Harnsäure (reichlicher bei Alligatoren), Carnin, Carnosin, Carnitin, Betain (bei Fischen, Cephalopoden, einigen Muscheln, Schnecken, Regenwürmern), Myokynin, Vitiatin, von Aminosäuren Alanin und Glutaminsäure, Glykokoll (in den Muskeln einiger Lamellibranchiaten), im Fischfleisch Alanin, Leucin, Prolin, Tyrosin, Tryptophan, Histidin, im Hummerfleisch Alanin, Leucin, Tyrosin, Taurin (reichlicher bei Fischen, Cephalopoden, Gastropoden, Lamellibranchiaten), Dipeptid<sup>6</sup>), Glutathion, Inosit, Cholesterin, Lactacidogen, Phosphatide, Inosinsäure, Phosphorfleisssäure, proteolytische Fermente, Diastase, Lipase,

Bestandteile der Muskeln.

\*) Das Fischmuskelplasma enthält außerdem noch Myoprotein (v. Fürth<sup>5</sup>). Über die Eiweißstoffe der längsgestreiften Muskeln und der Wirbellosen s. die S. 459 und S. 461 zitierten Arbeiten.

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 33, S. 5. 1901.

<sup>2</sup>) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 7, S. 371. 1873.

<sup>3</sup>) Zeitschr. f. Biol. Bd. 27, S. 448. 1890. <sup>4</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 28, S. 112. 1910.

<sup>5</sup>) Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 36, S. 231. 1895.

<sup>6</sup>) Jona: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 83, S. 458. 1913; Bd. 89, S. 160. 1914.

glykolytisches Ferment, Purinkörper und Lactacidogen spaltende Fermente, Katalase, Oxydase, anorganische Stoffe (etwa 5%), und zwar Kalium, Natrium, Calcium, Magnesium, Eisen, gebunden an Phosphorsäure und Salzsäure. Unter den Basen überwiegt das Kalium und unter den Säuren die Phosphorsäure bei weitem, Magnesium findet sich meist mehr als Calcium. Salzsäure ist nur in sehr geringer Menge vorhanden und Schwefelsäure in noch geringerer. Etwas Kieselsäure ist auch nachgewiesen.

Bestandteile der drüsigen Organe.

Die drüsigen Organe, welche auch zu 70—80% aus Wasser bestehen, enthalten im großen und ganzen dieselben Stoffe wie die Muskeln. So sind in der Leber nachgewiesen: lösliche Eiweißstoffe (Globuline), Serumalbumin und Serunglobulin, die vermutlich dem Blut angehören, Nucleoproteide, und zwar in reichlicherer Menge als Eiweißstoffe, flüchtige Fettsäuren, auch freie Fettsäuren<sup>1)</sup> (darunter Buttersäure und Myristinsäure), Milchsäure, Fette (darunter verhältnismäßig viel mit ungesättigten Fettsäuren), Glucose, Glykogen, Ammoniak, Harnstoff, Methylguanidin, Kreatin, Kreatinin, Harnsäure, Purinbasen, Cholin, Aminosäuren, Taurin, Inosit, Scyllit (bei Rochen und Haifischen), Mytilit (bei Miesmuscheln), Cholesterin, Cholesterinester, Phosphatide, Cerebroside. Von Fermenten sind u. a. festgestellt: proteolytische, Diastase, Lipase, Nuclease, Nucleosidase, auf Purinbasen einwirkende, Arginase (in ihrem Vorkommen so ziemlich auf die Leber beschränkt), Oxydasen. Die anorganischen Stoffe sind dieselben wie in dem Muskel; dazu kommt noch Eisen.

Von sonstigen, in ihrem Vorkommen auf einzelne Drüsen beschränkten Stoffen sind noch zu nennen: Mucin in der Submaxillar-, der Sublingualdrüse, den Schleimdrüsen, Thyreoglobulin in der Schilddrüse, Adrenalin in der Nebenniere. Bernsteinsäure ist in Milz, Thymus und Thyreoidea nachgewiesen. Carnosin, Carnitin und Methylguanidin wurden in der Niere (von Ochsen<sup>2)</sup> und Milz (von Ochsen<sup>3)</sup> nicht gefunden, erstere beiden auch nicht in der Rinderleber<sup>4)</sup>. Carnosin und Carnitin sind bisher nur in den Muskeln festgestellt.

### Nachweise und Isolierungen einzelner Stoffe.

#### *Nachweis der anorganischen Salze in Organen.*

719. Die Untersuchung geschieht nach vorangegangener Zerkleinerung und Verteilung in Wasser nach § 632, wobei nur zu bemerken, daß in dem wässerigen Auszug außer den wasserlöslichen anorganischen Phosphaten auch ein Teil der Nucleoproteide, bei den Muskeln auch die phosphorsäurehaltigen Verbindungen Inosinsäure, Lactacidogen, Phosphorfleischsäure, und im Filtrerrückstand Nucleoproteide und Phosphorproteide enthalten sind.

#### *Isolierung und Nachweis der Proteinstoffe der Organe.*

im frischen Muskel.

720. a) im frischen (quergestreiften) Muskel. Über die Darstellung des Myogens und Myosins aus Muskelplasma s. § 332 und § 334 und die dort zitierte Arbeit von v. Fürth.

Extrahiert man frische quergestreifte Muskeln, welche durch Eiskühlung dauernd vor dem Eintritt der Totenstarre möglichst geschützt werden, mit 10 proz. Salmiaklösung, und zwar in wiederholter Einzelextraktion, so gelingt es, bis zu 90% der Eiweißstoffe in Lösung zu bringen, so daß die Menge der unlöslichen Eiweißstoffe (das sog. Stroma) nur 11—12% beträgt. Aus totenstarren quergestreiften Muskeln läßt sich nur gegen 30% der Eiweißstoffe extrahieren.

<sup>1)</sup> Pferdeleber. Sammartino: Biochem. Zeitschr. Bd. 132, S. 343. 1922.

<sup>2)</sup> Bebeschin: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 72, S. 380. 1911.

<sup>3)</sup> Demianowski: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 132, S. 109. 1924.

<sup>4)</sup> Smorodinzew: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 80, S. 218. 1912.



Aus frischer Herzmuskulatur erhält man nur etwa 43% und aus frischer glatter Muskulatur nur etwa 28%. Der Eintritt der Totenstarre hat einen nur unbedeutenden oder gar keinen Einfluß (Saxl<sup>1</sup>).

b) im abgestorbenen (quergestreiften) Muskel. Man rührt den Muskelbrei (etwa 100 g) in der Reibschale mit der ungefähr doppelten Menge eiskalten Wassers zusammen, läßt unter Umrühren einige Stunden bei niedriger Temperatur stehen und filtriert durch lockere Leinwand (Wasserauszug). Der Rückstand wird ausgepreßt und noch wiederholt in gleicher Weise mit größeren Wassermengen behandelt, darauf mit der doppelten Menge 0,15proz. Sodaauszug verrührt, ausgepreßt, mit der gleichen Menge Wasser verrührt und nach einigen Stunden filtriert und ausgepreßt (Sodaauszug). Man behandelt jetzt in der gleichen Weise mehrmals mit 12—15proz. Salmiaklösung, indem man jedesmal unter häufigem Umrühren einige Stunden stehen läßt (Salmiakauszug) und darauf (nach Entfernung des Salmiaks aus der rückständigen Masse durch viel Wasser) mit 0,1proz. Salzsäure (4 ccm konzentrierter Salzsäure auf 1 l Wasser) so oft, bis eine Probe der salzsauren Lösung beim Neutralisieren mit Soda oder auf Zusatz von Ferrocyankalium nicht mehr wie Spuren eines Niederschlages gibt (Salzsäureauszug). Jetzt wird die wiederum ausgepreßte und mit Wasser gewaschene Masse mit verdünnter Kalilauge (1—2 g Ätzkali auf 1 l Wasser) zusammengerieben und nach einigem Stehen ebenfalls filtriert (Alkaliauszug). Man erhält auf diese Weise einen Wasser- (1), Soda- (2), Salmiak- (3), Säure- (4) und Alkaliauszug (5) sowie einen Rückstand (6). Von allen Auszügen wird eine für die Untersuchung geeignete Menge durch Papier klar filtriert (evtl. unter Druck durch einen Papierbrei).

1. Wässeriger Auszug. Bestimmt man die Koagulationspunkte in der § 24 beschriebenen Weise, so wird man mehrere, durch ihre Gerinnungstemperatur sich unterscheidende Eiweißstoffe nachweisen können. Bestimmte Angaben über die Natur der einzelnen Albuminstoffe können bei dem jetzigen Stande unserer Kenntnisse nicht gemacht werden. Beim langsamen Erwärmen erscheint Trübung und flockiger Niederschlag bei 45—48°. Alles, was bis etwa 55° ausfällt, scheint dem Myosin (§ 334) zuzugehören. Zwischen 60 und 70° erfolgt wieder Trübung und bei 72—75° flockige Fällung. Diese beiden Abscheidungen bestehen wohl aus Serumalbumin (§ 328) und Serumglobulin (§ 337). Ist Blutfarbstoff zugegen, so gibt derselbe gleichfalls bei dieser Temperatur Coagula, scheidet sich aber erst beim Sieden vollständig aus. Der Rest des wässerigen Auszugs wird zum Kochen erhitzt und filtriert, das eiweißfreie Filtrat nach S. 550 unten auf Phosphorfleischsäure\*) verarbeitet.

2. Sodaauszug. Er gibt auf Zusatz von Essigsäure einen erst in reichlichem Überschuß der Essigsäure löslichen Niederschlag. Man trennt ihn durch Zentrifugieren, löst ihn in sehr verdünntem Ammoniak, fällt die Lösung wieder mit Essigsäure, zentrifugiert und wäscht mit Wasser: Nucleoproteid (S. 540), das man nach § 634, 1b prüfen kann.

3. Salmiakauszug. Er enthält die Hauptmenge des Myosins (§ 334) und gibt infolgedessen einen Niederschlag beim Eintropfen der Lösung in Wasser und eine Ausscheidung bei ihrer Sättigung mit Kochsalz. Die Sättigung läßt sich am besten erreichen durch Einstellen eines über die Oberfläche hinausragenden Steinsalzkrystals in die Flüssigkeit; die Ausscheidung des Myosins erfolgt als schleimiger Überzug um den Krystall. Die Lösung des abfiltrierten Niederschlages in wenig Wasser gerinnt bei etwa 55°.

\*) Für den Nachweis dieser Säure ist es zweckmäßiger, von einer größeren Menge Fleisch (500—1000 g) auszugehen.

<sup>1</sup>) Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 9, S. 1. 1907. S. auch Grindley: Journ. of the Americ. chem. soc. Bd. 26, S. 1082. 1904; Bd. 27, S. 658. 1905; Bd. 28, S. 469. 1906.

4. Salzsäureauszug. Das in dieser Lösung enthaltene und durch Neutralisation mit Soda sowie durch Sättigen mit Kochsalz ausfallende Acidalbumin ist als ein Umwandlungsprodukt des Myosins, dessen Extraktion durch Salmiaklösung niemals völlig gelingt, anzusehen.

5. Alkaliauszug. Auf Zusatz von Säuren fällt eine Substanz aus, die sich leicht in verdünntem Alkali (aber nicht bei Gegenwart von Salmiak) löst. Sie gehört weder den Nucleoproteiden noch den Glucoproteiden zu<sup>1)</sup>.

6. Rückstand. Mit Wasser und schwach essigsaurem Wasser gewaschen, geht er bei anhaltendem Kochen zum Teil in Lösung. Das Filtrat enthält das aus dem Kollagen entstandene Glutin und erstarrt nach genügender Konzentration auf dem Wasserbade beim Erkalten. Der auf dem Filter bleibende Rückstand besteht aus Sarkolemmschläuchen, elastischen Fasern, welche in ihrer mikroskopischen Struktur kaum verändert sind.

in drüsigem Organen. c) in drüsigem Organen. Über die Darstellung von Nucleoproteiden s. § 436 ff., Mucin § 456 ff., Thyreoglobulin § 342. Im übrigen verfährt man nach b). Es ist zu bemerken, daß die Trennung der einzelnen Eiweißstoffe in dem Wasser- und Salmiakauszug auch durch fraktionierte Koagulation und außerdem auch durch fraktionierte Sättigung mit Magnesiumsulfat und mit Natriumchlorid erreicht wird. Außer Eiweißstoffen geht auch ein Teil des Nucleoproteids schon in die neutralen Auszüge über. Durch Essigsäure wird es gefällt.

**Isolierung und Nachweis von flüchtigen Fettsäuren, Bernsteinsäure, Fumarsäure, Milchsäure, Oxalsäure, Harnstoff, Inosit.**

Harnstoff wird nach § 643, Milchsäure nach S. 84, Oxalsäure nach § 88, flüchtige Fettsäuren nach § 80, Inosit nach § 203 isoliert. Wegen Bernsteinsäure und Fumarsäure s. § 89.

**Isolierung von Kreatin, Kreatinin, Nucleinbasen, Milchsäure, Taurin, Inosit aus Organen\*).**

721. **Kreatin, Nucleinbasen<sup>2)</sup>.** 200—500 g oder mehr vom Organbrei werden mit dem ungefähr gleichen Gewicht Wasser gründlich verrührt und auf dem Wasserbade unter stetem Umrühren auf 55—60° erwärmt. Die Flüssigkeit wird kolfiert, der Rückstand mit der Hand in kleinen Portionen ausgepreßt, wieder mit 60—80 ccm Wasser angerührt und zum zweiten Male gründlich ausgepreßt. Die vereinigten Flüssigkeiten werden über freiem Feuer unter Umrühren zum Kochen erhitzt und nach dem Erkalten von den ausgeschiedenen Eiweißstoffen abfiltriert. Jetzt fällt man mit Bleiessig, so lange ein Niederschlag entsteht, aber unter Vermeidung eines großen Überschusses, filtriert, leitet Schwefelwasserstoff ein, filtriert wieder und dampft auf dem Wasserbade bis zum dünnen Sirup ab. Während 2—3 tägigen Stehens an einem kühlen Orte krystallisiert aus der gelblichen, sirupösen Flüssigkeit das Kreatin aus. Es wird abgesaugt und mit 88 proz. Alkohol gewaschen. Der Nachweis geschieht nach § 129.

Die von den Kreatinkrystallen abgesaugte Flüssigkeit wird nach Entfernung des Alkohols durch Eindampfen und nach Zusatz von Ammoniak mit Silbernitrat versetzt. Der Niederschlag besteht aus den Silberverbindungen der Nucleinbasen\*\*). Löst man den einmal mit Wasser gewaschenen Niederschlag in wenig

\*) Ein geeignetes Objekt für die Isolierung dieser Substanzen stellt auch das Fleischextrakt dar.

\*\*\*) Über die Isolierung mit Hilfe von Zinksalzfällung siehe Salkowski<sup>3)</sup>.

<sup>1)</sup> Holmgren: Malys Jahresber. d. Tierchem. 1893, S. 360. — Goodmann: Americ. Journ. of physiol. Bd. 4, S. 260. 1900.

<sup>2)</sup> Neubauer: Zeitschr. f. analyt. Chem. Bd. 2, S. 26. 1863; Bd. 6, S. 33. 1867.

<sup>3)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 55, S. 254. 1913.

Salpetersäure (spez. Gewicht 1,1) auf dem Wasserbade und filtriert heiß, so scheiden sich beim Erkalten die Nucleinbasen als Silbernitratverbindungen teilweise krystallinisch ab. Wegen der Isolierung der einzelnen Nucleinbasen s. § 741.

**Kreatinin, Milchsäure, Taurin.** Nachdem zunächst das Kreatin in der oben angegebenen Weise entfernt ist, dampft man das Filtrat (+ Waschkohol) nach Zusatz von etwas Bariumcarbonat zur Trockne ein, erschöpft den Rückstand mit absolutem Alkohol und filtriert.

**Filtrat.** Man setzt zu der (evtl. etwas eingedampften) Flüssigkeit ein wenig alkoholische säurefreie Chlorzinklösung (spez. Gew. 1,2). Während mehrtägigen Stehens scheidet sich das Kreatinin als Chlorzinkverbindung ab. Für den **Kreatinin**-Nachweis kocht man die abfiltrierten Krystalle mit Bleioxydhydrat, filtriert und prüft das Filtrat mit Hilfe der S. 163 angegebenen Reaktionen.

Die von dem Kreatininchlorzink abfiltrierte alkoholische Lösung wird auf dem Wasserbade verdunstet, der sirupöse Rückstand mit Phosphorsäure angesäuert und wiederholt mit großen Mengen Äther ausgeschüttelt. Aus dem Rückstand der Ätherauszüge stellt man nach S. 85 das Zinksalz der Milch- **Milchsäure**-säure dar und identifiziert dasselbe durch Bestimmung des Krystallwasser- und Zinkgehaltes (S. 86).

**Rückstand.** Die konzentrierte wässrige Lösung des Rückstandes wird der langsamen Verdunstung überlassen. Scheiden sich keine Krystalle ab, so kann man eine Abscheidung von Taurin durch Quecksilberoxyd versuchen **Taurin**. (§ 179). Der nach § 53 festzustellende bedeutende Schwefelgehalt des Taurins erleichtert die Auffindung selbst bei sehr kleinen Mengen.

**Taurin.** Zweckmäßiger ist es für die Gewinnung des Taurins, das sich **Taurin** in den Organen der Wirbeltiere nur in geringer Menge findet, die Auszüge nach der Entfernung des koagulablen Eiweißes mit Tannin und dann mit Phosphorwolframsäure zu fällen (§ 723) und das Filtrat nach Fällen mit Baryt und Entfernen des überschüssigen Baryts durch Kohlensäure zu verarbeiten. Auf diese Weise gewann Mico<sup>1)</sup> Taurin aus Fleischextrakt. Jona<sup>2)</sup> erhielt es aus dem mit Ammonsulfat ausgesalzenen und dann mit Phosphorwolframsäure gefällten Fleischextrakt.

Ist es reichlich vorhanden, wie in den Muskeln der Cephalopoden, Gastropoden, Lamellibranchiaten, so krystallisiert es schon mit dem Kreatin (s. oben) aus oder an dessen Stelle.

**Inosit.** Die von den Kreatinkrystallen abfiltrierte Flüssigkeit (siehe oben) **Inosit** wird nach dem Verfahren von Boedeker (Fällung mit bas. Bleiacetat und Ammoniak) weiter behandelt (§ 203). Weit besser ist das dort beschriebene Acetonverfahren.

#### *Isolierung von Carnosin, Methylguanidin, Carnitin aus Muskeln nach Gulewitsch\*).*

722. Ganz frisches Fleisch (5–10 kg) wird fein zerkleinert und wiederholt mit größeren Mengen Wasser bei einer 65° nicht übersteigenden Temperatur extrahiert, die Auszüge werden durch Kolieren und Pressen vom Rückstand getrennt und auf etwa 2 l eingedampft. Man fällt jetzt mit einer 10 proz. Lösung von Mercurisulfat in 5 proz. Schwefelsäure, und zwar vorsichtig, solange ein

\*) Unter Benutzung der für die vorige Auflage dieses Handbuchs von Herrn Krimberg gegebenen Darstellung, der Arbeiten von Smorodinzew<sup>3)</sup> und einer persönlichen Mitteilung von Herrn Gulewitsch.

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 56, S. 180. 1908.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. Chem. Bd. 83, S. 460. 1913.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 87, S. 12. 1913; Bd. 92, S. 214 u. 221. 1914; Bd. 123, S. 116. 1922.

Niederschlag sogleich nach dem Zusatz des Fällungsmittels entsteht. Nach 1—2 Tagen wiederholt man die Prüfung und setzt, wenn nötig, noch etwas hinzu.

Gulewitsch verbrauchte in einem Falle bei einer aus 14,5 kg Pferdefleisch stammenden Flüssigkeitsmenge von 6 l 940 ccm der Mercurisulfatlösung, in einem Falle bei einer aus 14 kg Ochsenfleisch stammenden Flüssigkeitsmenge von 2 l 750 ccm.

Es wird abfiltriert und ausgewaschen (Fällung 1). Das Filtrat + Waschwasser gibt bei weiterem Zusatz von Mercurisulfat zunächst keinen Niederschlag, der aber nach Zufügen großer Mengen auftritt.

Im ersten der oben erwähnten Fälle mußten noch 1000 ccm, im zweiten noch 2000 ccm zugefügt werden, bis die Fällung vollständig war.

Der Niederschlag wird abfiltriert und ausgewaschen (Fällung 2). Man erhält so 2 Fällungen und 1 Filtrat.

Fällung 1. In ihr findet sich nur wenig Carnosin.

Fällung 2. Sie wird in Wasser zerteilt, mit Schwefelwasserstoff zerlegt und filtriert. Sollte die Filtration langsam gehen und der Niederschlag in kolloidaler Lösung durch das Filter laufen, so kann man dem durch vorsichtigen Zusatz von Barytwasser abhelfen. Das Filtrat wird durch Barytwasser von der Schwefelsäure, durch Kohlensäure von Baryt befreit und auf dem Wasserbade zur Sirupdicke eingeeengt. Nach längerem Stehen wird das ausgeschiedene Carnosin scharf abgesaugt und mit verdünntem Alkohol ausgewaschen. Aus der eingeeengten Mutterlauge erhält man auf dieselbe Weise weitere Mengen. Das auskrystallisierte Carnosin wird in Wasser unter Zusatz von Tierkohle gelöst und mit Alkohol gefällt. Diese Reinigung wird nötigenfalls einige Male wiederholt. Das reine Carnosin<sup>1)</sup> schmilzt in dem auf 230° vorgewärmten Thieleschen Block bei 246—250° unter starker Zersetzung (der Zersetzungspunkt kann je nach den Bedingungen des Erhitzens etwas schwanken) und zeigt  $[\alpha]_D = +21,1^\circ$  (bei  $p = 5,625\%$  und  $t = 20,2^\circ$ ).

Filtrat. Es wird mit Schwefelwasserstoff zersetzt, das Filtrat (nach Entfernung des Schwefelwasserstoffs) mit Baryt von der Schwefelsäure, mit Kohlensäure von Barium befreit und auf etwa 1 l eingedampft. Man fügt bis zu 5% Schwefelsäure hinzu und so viel 50proz. Phosphorwolframsäure, bis 1 proz. Phosphorwolframsäure keinen Niederschlag mehr gibt. Nach 1—2tägigem Stehen an kühlem Ort wird der Niederschlag abgesaugt, mit viervolumenprozentiger Schwefelsäure sorgfältig gewaschen und durch Zerreiben mit krystallinischem Ätzbaryt und Wasser bei Zimmertemperatur zerlegt, das Filtrat durch Kohlensäure vom überschüssigen Baryt sofort befreit, mit Salpetersäure neutralisiert, bis auf etwa 1/2 l eingeeengt und mit 20proz. Silbernitratlösung versetzt, bis kein Niederschlag mehr entsteht. Nach Absaugen des Niederschlags fährt man mit dem Zusatz der Silbernitratlösung fort, bis eine kleine Probe der Flüssigkeit, auf einem Uhrglase mit Barytwasser gemischt, einen in der Hauptmasse noch weißen Niederschlag gibt, in welchem aber schon deutlich braune, bald schwarz werdende Teilchen sichtbar sind. Nun fügt man eine warme gesättigte Ätzbarytlösung hinzu, bis kein Niederschlag mehr entsteht, saugt sofort ab und wäscht sorgfältig aus. Man erhält so einen Niederschlag (Silberbarytniederschlag 1) und ein Filtrat.

Silberbarytniederschlag 1. Er enthält etwas Kreatin und Kreatinin.

Filtrat. Es wird mit Schwefelwasserstoff entsilbert, abermals filtriert, mit Schwefelsäure neutralisiert, mit Magnesiumoxyd gemischt und bis zur Sirupdicke eingeeengt. Nach Hinzufügung von Barytwasser wird der Niederschlag abgesaugt, das Filtrat mit Kohlensäure behandelt, nochmals filtriert, mit Salpetersäure neutralisiert, eingeeengt und mit 20proz. Silbernitratlösung versetzt.

<sup>1)</sup> Gulewitsch: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 87, S. 8. 1913.

Nach Entfernung des gewöhnlich geringen Niederschlags fährt man mit dem Zusatz des Silbernitrats fort, bis wiederum eine kleine Probe der Flüssigkeit, mit Barytwasser gemischt, einen braunen Niederschlag gibt. Zuletzt wird die Flüssigkeit mit Ätzbarytlösung ausgefällt, der Niederschlag abfiltriert und gewaschen. Man erhält so einen Niederschlag (Silberbarytniederschlag 2) und ein Filtrat.

Silberbarytniederschlag 2. Er wird mit Schwefelwasserstoff zerlegt, das Filtrat mittels verdünnter Schwefelsäure von den letzten Spuren Baryt vorsichtig befreit, mit Salpetersäure neutralisiert, mit Tierkohle gekocht, abermals filtriert und eingengt. Es scheidet sich das Methylguanidinnitrat<sup>1)</sup> Methylguanidin. in Form glänzender Täfelchen ab. Die Krystalle werden abgesaugt und mit kaltem Wasser gewaschen. Nach einmaligem Umkrystallisieren aus heißem Wasser, evtl. unter Zusatz von Tierkohle, ist das Methylguanidinnitrat vollständig rein und schmilzt dann genau bei 150°.

Das Filtrat wird mit Salzsäure neutralisiert, das neue Filtrat bis etwa  $\frac{1}{4}$  l eingengt und mit Natriumwismutjodidlösung\*) ausgefällt<sup>2)</sup>. Der zuerst flockig ausfallende Niederschlag ballt sich nachher zusammen und bildet zuletzt einen harten zusammenhängenden Klumpen. Die Flüssigkeit wird abgegossen, der Niederschlag mit Wasser oberflächlich gewaschen, zerkleinert und mit frischgefälltem Bleihydroxyd bei gewöhnlicher Temperatur zerrieben. Der neue Niederschlag wird abgesaugt und gewaschen, das Filtrat mit Schwefelwasserstoff entbleit, abermals filtriert und die alkalisch reagierende Flüssigkeit, welche kein Jod mehr enthalten darf, bis zur Sirupdicke eingedampft\*\*). Der Sirup wird in Alkohol gelöst, der Rückstand noch 2 mal mit frischem Alkohol extrahiert, die Auszüge vereinigt, eingengt\*\*\*), der Rückstand wird mit absolutem Alkohol extrahiert und der zuletzt erhaltene alkoholische Auszug mit einer heißen konzentrierten alkoholischen Lösung von Quecksilberchlorid ausgefällt. Man hört mit dem Hinzufügen der heißen Quecksilberchloridlösung auf, wenn die auszufällende Flüssigkeit nach dem Versetzen mit kaltgesättigter alkoholischer Sublimatlösung längere Zeit klar bleibt. Den Niederschlag, welcher beim Reiben mit einem Glasstabe sehr bald krystallisiert, läßt man einige Stunden an kühlem Orte stehen, zerreibt in einem Mörser, saugt ab und wäscht mit Alkohol aus. Der Niederschlag, welcher die Sublimatverbindung des Carnitins<sup>Carnitin.</sup>  $C_7H_{15}NO_3 \cdot 2 HgCl_2$  enthält, wird von anhaftendem Alkohol befreit und unter Zusatz von Tierkohle wiederholt mit heißem Wasser extrahiert. Diese Operation führt man zweckmäßig in der Weise aus, daß man den Kolben längere Zeit in einem kochenden Wasserbade hält und öfters umschüttelt. Aus den heiß filtrierten und vereinigten Auszügen scheidet sich beim Erkalten gewöhnlich ein geringer Niederschlag ab. Man entfernt den letzteren und engt das Filtrat recht stark

\*) Die Natriumwismutjodidlösung wird nach Kraut dargestellt. Man löst einerseits 80 g basisches Wismutnitrat in 200 ccm reiner Salpetersäure von 1,18 spez. Gew., andererseits 300 g Jodnatrium in wenig Wasser, und gießt die Wismutlösung langsam und unter Umschütteln in die Jodnatriumlösung, wobei sich der anfangs entstehende braune Niederschlag zu gelbroter Flüssigkeit löst. Aus dieser läßt man durch starkes Abkühlen den gebildeten Salpeter möglichst auskrystallisieren, beseitigt die Krystalle und füllt die Flüssigkeit zu einem Liter auf. Die Lösung ist im Dunkeln aufzubewahren, weil am Licht sich allmählich Wismutjodid ausscheidet.

\*\*\*) R. Krimberg: Über die stickstoffhaltigen Extraktivstoffe der Muskeln. S. 140. Wissenschaftliche Abhandlungen der Universität Moskau. Jg. 1907. (Russisch.) Es ist allerdings besser, wenn das alkalische Filtrat zusammen mit dem ersten Waschwasser im Vakuum bei etwa 40° eingengt wird; die weiteren Waschwässer dampft man in jedem Fall zuerst auf dem Wasserbade stark ein. Nach dem Einengen im Vakuum gießt man den sirupösen Rückstand in Alkohol.

\*\*\*) Auch dieses Einengen führt man besser im Vakuum aus.

<sup>1)</sup> Gulewitsch: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 47, S. 471. 1906.

<sup>2)</sup> Gulewitsch u. Krimberg: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 45, S. 326. 1905.

ein. Es scheidet sich beim Stehen das Quecksilbersalz des Carnitins in nadel-förmigen meistens sphärisch gruppierten Krystallen aus. Die Krystalle werden abgesaugt und mit kaltem Wasser gewaschen. Aus der Mutterlauge erhält man durch Einengen weitere Mengen des Salzes. Zuletzt scheidet die eingeeengte Mutterlauge auch bei längerem Stehen keine Krystalle mehr aus, obwohl sie gewöhnlich noch Carnitin enthält. Um auch diesen Rest des Carnitins zu isolieren, zerlegt man die Mutterlauge mit Schwefelwasserstoff, neutralisiert das Filtrat mit Soda, engt ein, säuert mit Schwefelsäure an und fällt mit Phosphorwolframsäure. Aus dem gewaschenen Niederschlage stellt man auf die übliche Weise durch Zersetzen mit Baryt und Behandeln des Filtrates mit Kohlensäure die freie Base dar, engt deren Lösung bis zur Sirupdicke ein, extrahiert den Rückstand mit absolutem Alkohol, fällt den alkoholischen Auszug abermals mit alkoholischer Sublimatlösung aus und isoliert aus dem Niederschlag auf die schon beschriebene Weise die Sublimatverbindung des Carnitins. Die erhaltenen Fraktionen des Carnitinsalzes werden aus heißem Wasser unter Anwendung von Tierkohle umkrystallisiert. Das reine Salz  $C_7H_{15}NO_3 \cdot 2 HgCl_2$  schmilzt bei 204—205° unter Zersetzung.

**Isolierung von Basen aus Muskeln und drüsigen Organen nach Kutscher.**

723. Dieses Verfahren ist auf Muskeln<sup>1)</sup>, Nebennieren<sup>2)</sup>, Schilddrüsen<sup>2)</sup>, Hoden<sup>2)</sup> und eine Reihe niederer Tiere (Krabben<sup>3)</sup>, Maikäfer<sup>4)</sup>, Regenwürmer<sup>5)</sup>, Miesmuscheln<sup>6)</sup>, Eledone moschata<sup>7)</sup>, Actinia equina<sup>8)</sup>, Dornhai<sup>9)</sup>, Seewalze<sup>10)</sup> angewendet worden.

Gang der Untersuchung. Das von Eiweiß durch Kochen und von die Krystallisation störenden Substanzen durch Fällen mit Gerbsäure nach Kutscher und Steudel befreite Material wird mit Phosphorwolframsäure gefällt. Dieser Niederschlag, welcher die Basen enthält, wird zerlegt und die Lösung der Basen fraktioniert mit Silbernitrat gefällt. Man erhält 3 Fraktionen (Purinbasen-, Histidin- und Argininfraktion), welche einzeln untersucht werden. Das Filtrat der letzten Silberfällung wird mit Phosphorwolframsäure gefällt (Lysinfraktion). Gelegentlich ist auch die erste Fällung mit Phosphorwolframsäure fortgelassen und auf das Tanninfiltrat gleich die Silberfällung angewendet worden. Doch empfiehlt sich das weniger. Sie ist auf jeden Fall dann auszuführen, wenn auch die nicht basischen Extraktivstoffe untersucht werden sollen.

Die isolierten und zerkleinerten Organe oder bei niederen Tieren die ganzen Leiber (von Maikäfern etwa 15 kg, von Regenwürmern 30 kg, von Miesmuscheln 40 kg, Eledone 15 kg) werden wiederholt mit großen Mengen Wasser ausgekocht und die vereinigten Filtrate eingeeengt (z. B. das Extrakt der Muskeln von 10 Hunden auf 20 l). Von Liebigs Fleischextrakt nimmt

<sup>1)</sup> Kutscher: Über Liebigs Fleischextrakt. Zeitschr. f. Untersuch. d. Nahrungs- u. Genußmittel Bd. 10, S. 528. 1905; Bd. 11, S. 582. 1906. Zentralbl. f. Physiol. Bd. 21, S. 33 u. 586. 1908. — Ackermann: Zeitschr. f. Biol. Bd. 59, S. 433. 1913 (Hundemuskel); Bd. 61, S. 373. 1913 (Pferdemuskel). — Engeland u. Biehler: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 123, S. 290. 1922 (menschliche Skelettmuskeln).

<sup>2)</sup> Lohmann: Zeitschr. f. Biol. Bd. 56, S. 1. 1911. Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 128, S. 142. 1909.

<sup>3)</sup> Ackermann u. Kutscher: Zeitschr. f. Untersuch. d. Nahrungs- u. Genußmittel Bd. 13, S. 180, 610, 613. 1907 u. Bd. 14, S. 687. 1907.

<sup>4)</sup> Ackermann: Zeitschr. f. Biol. Bd. 71, S. 193. 1920; Bd. 73, S. 319. 1921; Bd. 75, S. 325. 1922.

<sup>5)</sup> Ackermann u. Kutscher: Zeitschr. f. Biol. Bd. 75, S. 315. 1922.

<sup>6)</sup> Ackermann: Zeitschr. f. Biol. Bd. 74, S. 67. 1922 und Bd. 80, S. 193. 1924.

<sup>7)</sup> Ackermann, Holtz u. Kutscher: Zeitschr. f. Biol. Bd. 77, S. 241. 1923 und Bd. 80, S. 155. 1924.

<sup>8)</sup> Ackermann, Holtz u. Reinwein: Zeitschr. f. Biol. Bd. 79, S. 113. 1923.

<sup>9)</sup> Suwa: Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 128, S. 421. 1909; Bd. 129, S. 231. 1909.

<sup>10)</sup> Ackermann, Holtz u. Reinwein: Zeitschr. f. Biol. Bd. 80, S. 163. 1924.

man etwa 0,5 kg und zur Lösung 2500 ccm Wasser; von Krabbenextrakt ähnliche Mengen. Man fällt bei schwachsaurer Reaktion (die, wenn nötig, durch Phosphorsäurezusatz hergestellt wird) mit 20proz. Gerbsäure aus (für 450 g Fleischextrakt 500—600 g Gerbsäure) und läßt 24—48 Stunden in der Kühle stehen.

Bei Fleischextrakt beobachtet man häufig nach dem anfänglichen Auftreten eines massigen Niederschlages bei weiterem Gerbsäurezusatz eine milchige Trübung. In solchen Fällen ist mit dem Zusatz fortzufahren, bis sich beim Umrühren eine flockige Fällung zeigt, die die Trübung mitreißt. Während des Stehens sintert der Niederschlag zu einer braunen, pechartigen Masse zusammen.

Wenn, wie beim Regenwurm, mit Gerbsäure nur eine Trübung, kein richtiger Niederschlag entsteht, nimmt man die Fällung mit Bleiessig bei essigsaurer Reaktion vor, befreit das Filtrat durch Schwefelwasserstoff vom Blei und fällt nach Einengen bei schwefelsaurer Reaktion mit Phosphorwolframsäure (s. weiter unten). Engeland<sup>1)</sup> benutzte bei der Untersuchung menschlicher Muskeln auch Bleiessig statt Gerbsäure.

Der Niederschlag wird abfiltriert, oberflächlich gewaschen, das Filtrat mit bei 50° gesättigtem Barytwasser so lange versetzt, bis sich beim Umrühren an der Oberfläche ein rötlicher Schaum zeigt, und auf Kossels Nutsche\*) abgesaugt. Um aus dem mißfarbenen Filtrat das Tannin ganz zu entfernen, übersäuert man schwach mit Schwefelsäure, trägt überschüssiges, am besten frisch gefälltes Bleioxyd ein, rührt einige Zeit um und saugt die fast farblos gewordene und meist alkalisch reagierende Flüssigkeit ab.

Beim Einengen der Flüssigkeit (wenn sauer nach Zusatz von etwas frisch gefälltem Bleioxyd) auf kleines Volumen schieden sich bei Fleischextrakt Kreatin und Kreatinin ab, beim Krabbenextrakt und bei Nebennieren Leucin und Tyrosin, bei Maikäfern Leucin.

Die Flüssigkeit wird nun auf ein geeignetes Volumen gebracht (1—2 l) und nach starkem Ansäuern mit Schwefelsäure mit Phosphorwolframsäure (nach Drechsel hergestellt) gefällt (und zwar setzt man so viel hinzu, bis eine Probe auf erneuten Zusatz 1—2 Minuten klar bleibt), der Niederschlag abfiltriert, mit 5proz. Schwefelsäure gewaschen und mit Barytwasser von Schwefelsäure, mit Kohlensäure von Barium befreit. Die so erhaltene Lösung der kohlen-sauren Basen bringt man auf ein passendes Volumen (etwa 500 ccm) und fällt sie nach schwachem Ansäuern mit Salpetersäure mit 20proz. Silbernitratlösung. Der Niederschlag (Purinbasenfraktion) wird nach längerem Stehen abfiltriert, das Filtrat weiter mit Silbernitratlösung derselben Konzentration versetzt, bis eine Probe mit gesättigtem Barytwasser sofort einen braunen Niederschlag gibt und darauf vorsichtig kalt gesättigtes Barytwasser zugegeben, bis ein Tropfen, auf einer Glasplatte mit ammoniakalischer Silberlösung\*\*) zusammengebracht, an der Berührungsstelle nur eine schwache oder gar keine Fällung zeigt. Man saugt ab (Histidinfraktion), wäscht mit etwas Wasser und fügt zu dem Filtrat Barytwasser, so lange noch eine Fällung entsteht. Man saugt ab (Argininfraktion). Das Filtrat wird durch Salzsäure von Silber, durch Schwefelsäure von Barium befreit, mit Schwefelsäure stark angesäuert und mit Phosphorwolframsäure ausgefällt. Man verfährt wie oben angegeben; auch die Zerlegung des Niederschlages und die Überführung in die Basencarbonate geschieht wie oben angegeben (Lysinfraktion).

**Purinbasenfraktion.** Sie enthält die Purinbasen (so weit sie nicht durch Tannin und Blei gefällt sind) als Silbernitratverbindungen. Sie werden durch Aufschwemmen in Ammoniak und Zufügen von ammoniakalischer Silberlösung in die Silberverbindungen übergeführt und nach § 741 untersucht. Bei Muskeln

\*) Zu beziehen vom Mechaniker des Physiologischen Instituts in Würzburg, J. Strohbach.

\*\*) Zur Herstellung der ammoniakalischen Silberlösung versetzt man 10proz. Silbernitratlösung mit 10proz. Ammoniaklösung, bis sich gerade das ausfallende Silberoxyd wieder gelöst hat, und setzt 1—2 Tropfen Ammoniaklösung hinzu.

<sup>1)</sup> Engeland u. Biehler: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 123, S. 290. 1922.

ist diese Fraktion nicht untersucht worden. Bei Krabben wurde Hypoxanthin gefunden.

Man kann auch die Fraktion in sehr verdünnter Salpetersäure mit Schwefelwasserstoff zerlegen und nach Abfiltrieren des Schwefelsilbers bei etwa 60° einengen. Aus den sich abscheidenden Krystallisationen ließen sich bei Maikäfern Adenin und Hypoxanthin (durch Fällung mit Pikrinsäure) als Pikrat gewinnen<sup>1)</sup>, bei Regenwürmern und Eledone (nach Reinigung durch Fällung mit Phosphorwolframsäure) Adenin<sup>2)</sup>, bei *Mytilus edulis* und Seewalze ebenfalls Adenin.

**Histidinfraktion.** Sie wird mit Wasser verrieben und nach Zusatz einiger Tropfen Schwefelsäure (zur Beseitigung des anhaftenden Bariums) mit Schwefelwasserstoff zerlegt, das Schwefelsilber abfiltriert, das Filtrat zum Sirup eingedampft. Beim Fleischextrakt erstarrte dieser zu einem Krystallbrei von Kreatinin und Carnosin, welche durch Auskochen mit absolutem Alkohol, in dem Carnosin unlöslich ist, getrennt werden können. Man löst den Rückstand in Wasser (wobei meist etwas Kreatin zurückbleibt), entfärbt mit Tierkohle, dampft zum Sirup ein, überschichtet diesen mit absolutem Alkohol und läßt leicht bedeckt stehen. Carnosin\*) krystallisiert aus.

Die Untersuchung dieser Fraktion des Regenwurmes, welche verhältnismäßig reichlich ausfiel, hat zu keinen Ergebnissen geführt, bei den übrigen niederen Tieren ist sie nicht ausgeführt worden.

**Argininfraktion.** Sie wird mit Wasser verrieben, nach Zusatz von etwas Schwefelsäure durch Schwefelwasserstoff zerlegt und das Filtrat vom Schwefelsilber durch genaue Ausfällung mit Barytwasser von der Schwefelsäure befreit.

Bei Fleischextrakt krystallisierte nach dem Einengen Methylguanidin aus, welches sich leicht in das in Wasser ziemlich schwer lösliche Nitrat überführen läßt.

Bei Krabben, Maikäfern, Miesmuscheln, Eledone wurde mit Salpetersäure lackmussauer (nicht kongosauer) gemacht, eingengt, mit Kupfercarbonat gekocht und von dem überschüssigen Carbonat abfiltriert. Aus der eingengten tiefblauen Lösung schied sich d-Arginin-kupfernitrat ab. Kreatinin und Methylguanidin enthalten diese Tiere nicht. Bei Miesmuscheln fand sich in dieser Fraktion noch Betain, welches aus der Mutterlauge des Arginin-kupfernitrat nach Entfernung des Kupfers als Kupfersulfid mit Phosphorwolframsäure gefällt wurde und sich aus der aus dieser Fällung gewonnenen Basencarbonatlösung als Chloraurat isolieren ließ.

Aus Fleischextrakt.

**Lysinfraktion.** Aus Fleischextrakt. Die zum Sirup eingedampfte Flüssigkeit erstarrt zu einem Krystallbrei, der im wesentlichen aus Kreatin, Kreatinin und Kaliumcarbonat besteht. Er wird abgesaugt und mit wenig kaltem Wasser gewaschen, das zum Sirup eingedampfte Filtrat mit konzentrierter Salzsäure stark angesäuert und mit absolutem Alkohol versetzt, solange die entstehende krystallinische Fällung sich vermehrt. Etwa auftretende schmierige Abscheidungen werden durch Salzsäure in Lösung gebracht. Der im wesentlichen aus anorganischen Salzen bestehende Niederschlag wird abgesaugt und mit Alkohol gewaschen, das Filtrat eingengt, bis eine abgekühlte Probe mit alkoholischer Sublimatlösung sofort starken körnig krystallinischen Niederschlag gibt. Nun fällt man die ganze Masse mit der Sublimatlösung aus, saugt die Fällung nach 24—48 Stunden ab und wäscht mit gesättigter alkoholischer Sublimatlösung aus. Man erhält so einen Filtrerrückstand a) und ein Filtrat b).

a) Der Filtrerrückstand, welcher wohl immer Novain (das wohl mit Carnitin identisch ist), unter Umständen auch Neosin und Carnomuscarnin enthält, wird in heißem Wasser gelöst und mit Schwefelwasserstoff zersetzt, das Filtrat von Quecksilbersulfid eingengt, der Syrup mit absolutem Alkohol

\*) Engeland und Biehler<sup>3)</sup> fanden es bei Untersuchung der menschlichen Muskeln vorwiegend in der Argininfraktion.

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. Biol. Bd. 75, S. 325. 1922.    <sup>2)</sup> desgl. Bd. 75, S. 315. 1922; Bd. 77, S. 242. 1923.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 123, S. 290. 1922.



aufgenommen (wobei etwas anorganische Substanz zurückbleibt) und die Lösung mit alkoholischer Platinchloridlösung gefällt unter sorgfältiger Vermeidung eines Überschusses. Man saugt ab, wäscht mit Alkohol, behandelt den Niederschlag mit wenig Wasser und saugt wieder ab. Dieses schwer lösliche Platinat zeigte recht wechselnde Zusammensetzung, in manchen Fällen zeigte es große Ähnlichkeit mit dem Muscarinplatinat (Carnomuscarin), in anderen handelte es sich um Oblitin (s. b). Das Filtrat wird nach Entfernen des Platins durch Schwefelwasserstoff stark eingeengt und fraktioniert mit Goldchlorid gefällt, wobei man nach dem Abfiltrieren einer Fällung immer wieder zum dünnen Sirup einengt, bevor man weiter Goldchlorid zufügt. Aus der ersten Fraktion wird, wenn es überhaupt vorhanden ist, Neosin gewonnen, gelegentlich statt dessen Neurin und Cholin<sup>1)</sup>, aus den späteren Novain (Carnitin).

b) Das Filtrat wird auf dem Wasserbad stark eingeengt und einige Tage bedeckt in der Kühle stehen gelassen. Die dabei entstehende Krystallabscheidung wird abgesaugt und mit alkoholischer Sublimatlösung gewaschen. Man erhält so einen Filtrerrückstand  $\alpha$ ) und ein Filtrat  $\beta$ ).

$\alpha$ ) Der Filtrerrückstand. Er wird in heißem Wasser gelöst, die Lösung mit Schwefelwasserstoff zersetzt, das Filtrat zum Sirup eingeengt. Nach Entfernung von nach einiger Zeit auskrystallisierendem salzsauren Kreatinin durch Behandeln mit kaltem absoluten Alkohol, in dem dieses Salz ziemlich schwer löslich ist, fällt man das alkoholische Filtrat mit Platinchlorid unter Vermeidung eines größeren Überschusses. Die Fällung wird abgesaugt, mit absolutem Alkohol gewaschen, mit wenig Wasser behandelt und wieder abgesaugt. Aus der Lösung des Rückstandes in heißem Wasser krystallisiert beim Eindampfen das Platinat von Oblitin.

$\beta$ ) Das Filtrat. Es wird abwechselnd mit heißer gesättigter alkoholischer Natriumacetat- und gesättigter alkoholischer Sublimatlösung versetzt, bis kein Niederschlag mehr auftritt, der Niederschlag am nächsten Tage abgesaugt und mit einem Gemisch beider Fällungsmittel ausgewaschen. Nach Entfernung des Alkohols durch Erwärmen löst man in Salzsäure, behandelt mit Schwefelwasserstoff, entfernt aus dem zum Sirup eingeengten Filtrat das Kochsalz nach Möglichkeit durch absoluten Alkohol und fällt die konzentrierte alkoholische Lösung mit heißer gesättigter alkoholischer Cadmiumchloridlösung. Die Fällung wird nach 24 Stunden abgesaugt, mit kalter gesättigter alkoholischer Cadmiumchloridlösung gewaschen, in Wasser gelöst und durch Schwefelwasserstoff von Cadmium befreit. Nach Einengen krystallisiert Histidindichlorid aus, aus der Mutterlauge auf Zusatz von 30 proz. Goldchloridlösung Vitiatingoldchlorid.

Aus menschlichen Skelettmuskeln. Es wurden Carnitin, Myokynin, Neosin, Mirgelin isoliert. aus menschlichen Skelettmuskeln,

Aus Hunde- und Pferdemuskeln. Es wurde Myokynin erhalten. aus Hunde- und Pferdemuskeln

Aus Nebennieren, Schilddrüsen, Hoden. Mit Hilfe von Sublimat, Platin- und Goldchlorid wurde Cholin gewonnen; aus Nebennieren auch Neurin. Aus Nebennieren, Schilddrüsen, Hoden,

Aus Maikäfern, Miesmuscheln, Regenwürmern, Krabben, *Actinia equina*, usw. Die eingeengten Basensirupe wurden (bei den aus Miesmuscheln und Seewalzen stammenden, nachdem auskrystallisiertes Betain abgetrennt) in die Pikrate verwandelt und diese in einzelne Fraktionen getrennt, und zwar in eine in Wasser und Alkohol schwer lösliche (Fraktion 1), eine in Wasser leicht, in Alkohol schwer lösliche (Fraktion 2), eine in Wasser schwer, in Alkohol leicht lösliche (Fraktion 3), eine in Wasser und Alkohol leicht lösliche (Fraktion 4). Mit Hilfe von Sublimat, Platin- und Goldchlorid (das Nähere s. in den Originalarbeiten) wurden erhalten: aus niederen Tieren.

<sup>1)</sup> Kutscher: Zeitschr. f. Untersuch. d. Nahrungs- u. Genußmittel Bd. 11, S. 582. 1906.

aus Maikäfern: aus Fraktion 1 Putrescin, Lysin, aus Fraktion 2 kein Betain, aus Fraktion 3 Cholin und vielleicht p-Oxyphenyläthylamin, aus Fraktion 4 Cholin;  
 aus Miesmuscheln: aus Fraktion 1 Betain, aus Fraktion 2 Betain, Neosin, aus Fraktion 3 + 4 Betain, Methylpyridylammoniumhydroxyd, Crangonin;  
 aus Regenwürmern: aus Fraktion 1 Lysin, aus Fraktion 3 + 4 Betain, Cholin;  
 aus Krabben: aus Fraktion 1 Lysin, aus Fraktion 2 + 3 + 4 (die nicht voneinander getrennt wurden) Betain, Crangitin, Methylpyridylammoniumhydroxyd, Neosin, Crangonin;  
 aus Actinia equina: aus Fraktion 1 Tetramin (Tetramethylammoniumhydroxyd);  
 aus Eledone: aus Fraktion 1 Betain (in Alkohol schwer lösliches Chlorid), sowie Eledonin  $C_{14}H_{30}N_2O_3$  und Homoeledonin  $C_{15}H_{32}N_2O_3$  (in Alkohol lösliche Chloride);  
 aus Seewalze: Betain, Betainogen  $C_{15}H_{32}N_2O_3$ , Eledonin  $C_{14}H_{30}N_2O_3$ ;  
 aus Dornhai: Trimethylaminoxid, Betain.

**Isolierung von Basen (Purin-, Pyrimidin-, Hexonbasen, Diamine, Cholin, Guanidin) z. B. aus weitgehend autolytierten drüsigen Organen (Thymus, Pancreas) nach Kutscher<sup>1</sup>).**

**Fraktionierung.** 724. 1. Fraktionierung. Die Flüssigkeit wird filtriert, das Filtrat aufgekocht, eingeengt, von ausgeschiedenem Tyrosin usw. abgesaugt, mit Barytwasser ausgefällt, filtriert, mit Kohlensäure behandelt, wieder filtriert und eingeengt bis zur Ausscheidung von Leucin. Man filtriert dieses ab oder bringt es auch durch Wasser wieder in Lösung, säuert mit Salpetersäure schwach an und stellt durch Fällung mit Silbernitrat, Silbernitrat und Barytwasser, Phosphorwolframsäure die Fraktionen (Purinbasen-, Histidin-, Arginin-, Lysinfraktion) her, wie § 723 angegeben.

**Untersuchung der einzelnen Fraktionen.**

2. Untersuchung der einzelnen Fraktionen.

**Purinbasen.** a) Purinbasenfraktion. Sie enthält die Purinbasen als Silbernitratverbindungen, welche durch Aufschwemmen in Ammoniak und Zufügen von ammoniakalischer Silbernitratlösung in die Silberverbindungen übergeführt und nach § 741 untersucht werden können. Über andere in dieser Fraktion vorhandene Substanzen s. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 35, S. 437. 1902.

b) Histidinfraktion. Sie kann enthalten Histidin, Cytosin, Thymin, Uracil, ferner Asparaginsäure, Glutaminsäure, vielleicht auch Tryptophan<sup>2</sup>). Der Niederschlag wird mit Wasser verrieben, mit Schwefelsäure angesäuert und mit Schwefelwasserstoff zerlegt, das Filtrat nach Entfernung des Schwefelwasserstoffs vorsichtig mit Phosphorwolframsäure ausgefällt.

**Histidin. Cytosin.**

α) Der Niederschlag kann Histidin und Cytosin enthalten.

β) Das Filtrat, welches Thymin, Uracil und die Aminosäuren enthalten kann, wird durch Baryt von Phosphorwolframsäure und Schwefelsäure, durch Kohlensäure von überschüssigem Baryt befreit und eingeengt. Etwa vorhandenes Thymin, Uracil. Thymin und Uracil werden auskrystallisieren<sup>3</sup>).

3. Argininfraktion. In ihr kann außer Arginin Guanidin\*) vorhanden sein. Der Niederschlag wird in Schwefelsäure gelöst, das Silber durch Schwefelwasserstoff, die Schwefelsäure durch Baryt, das Barium durch Kohlensäure entfernt. In der Lösung fällt man das Arginin durch alkoholische Pikrolonsäure aus, die das Guanidin gelöst läßt, aus dem Filtrat nach Entfernung der Pikrolonsäure das Guanidin als Pikrat<sup>4</sup>).

**Guanidin.**

\*) Es ist bei der Autolyse des Pankreas gefunden worden (Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 43, S. 93. 1904/05).

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 39, S. 159. 1903.

<sup>2</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 44, S. 386. 1905.

<sup>3</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 35, S. 438. 1902; Bd. 44, S. 386. 1905.

<sup>4</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 42, S. 457. 1904.

4. Lysinfraktion. Sie kann enthalten Lysin, Cadaverin, Putrescin, Cholin. Sie wird zum dünnen Sirup eingeengt und mit alkoholischer Pikrinsäure ausgefällt. Das ausgefallene Pikrat wird abfiltriert und mit absolutem Alkohol ausgekocht.

a) In Alkohol unlösliche Pikrate. Sie können Lysin, Cadaverin, Putrescin enthalten. Zur Trennung läßt sich Pikrolonsäure verwenden, welche mit Lysin eine leicht lösliche, mit den beiden anderen in Wasser und Alkohol nur schwer oder gar nicht lösliche Verbindungen bildet<sup>1)</sup>; vgl. auch Lawrow<sup>2)</sup>.

b) Das Filtrat + Alkohol. Es kann Cholin enthalten, welches nach Entfernung der Pikrinsäure mit Sublimat ausgefällt und als Cholinplatinchlorid oder Aurat identifiziert wird<sup>3)</sup>. Aus dem Filtrat der Quecksilberfällung ist noch Lysin zu isolieren<sup>4)</sup>.

#### *Isolierung der Monamino-säuren aus Organen.*

725. Man benutzt das Filtrat der Fällung, die in dem mit Tannin nach § 723 behandelten Heißwasserauszug der Organe mit Phosphorwolframsäure entsteht, nach Entfernung des Fällungsmittels. Siehe dazu z. B. Micko<sup>5)</sup>.

#### *Isolierung und Nachweis von Alkohol aus Muskeln und Organen.*

726. Siehe die Angaben § 58.

Nachweis nach Landsberg<sup>6)</sup>. Er beruht auf der Umwandlung des durch Destillation isolierten Alkohols in Aldehyd und Nachweis des Aldehyds. Die zerkleinerten Organe (einige 100 g) werden mit etwa dem doppelten Volumen Wasser destilliert, bis etwa der dritte Teil übergegangen ist. Das Destillat wird mit Schwefelsäure und Kaliumchromat (auf 100 ccm 5 ccm konzentrierte Schwefelsäure und 5 ccm einer 2 proz. Kaliumchromatlösung) versetzt und wieder destilliert. Die ersten 15 ccm werden für folgende Reaktionen auf Aldehyd benutzt:

1. Erhitzen mit konzentrierter Natronlauge: Trübung oder nur Gelbfärbung und charakteristischer Geruch (Bildung von Aldehydharz).

2. Gelbfärbung auf Zusatz von Nessler's Reagens.

3. Jodoformprobe (§ 58).

Die beiden letzten Proben sind wesentlich empfindlicher als die erste.

#### *Nachweis von Zucker in Organen.*

727. Zum Nachweis des Zuckers wird der Organbrei mit Wasser mehrmals ausgekocht, das vereinigte Filtrat bei niedriger Temperatur eingeengt und mit dem mehrfachen Volumen Alkohol gefällt. Das Filtrat wird wieder eingeengt und abermals mit absolutem Alkohol gefällt. Nach einigem Stehen filtriert man ab, löst den Rückstand in Wasser, fügt zu der Lösung salzsaures Phenylhydrazin und Natriumacetat (§ 101) und erwärmt auf dem Wasserbade. Das dabei erhaltene Osazongemenge ist z. T. in heißem Wasser unlöslich, z. T. darin löslich. Der in heißem Wasser unlösliche Teil ist Phenylglucosazon (Panormoff<sup>7)</sup>), der darin lösliche hat den Schmelzpunkt des Isomaltosazons, 152—154°, und stellt nach Osborne und Zobel<sup>8)</sup> ein Maltosazon dar, welches durch das Osazon eines dextrinartigen Körpers verunreinigt ist. Die Menge des erhaltenen Glucosazons ist geringer, als die des in heißem Wasser löslichen Osazons.

#### *Nachweis der gebundenen Pentose in Organen.*

728. Man kocht den Organbrei mit 0,5 proz. Ammoniaklösung, filtriert, fällt das Filtrat mit Essigsäure und wäscht den abfiltrierten Niederschlag mit Wasser,

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 41, S. 336. 1904. <sup>2)</sup> desgl. Bd. 33, S. 325. 1901.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 39, S. 161 u. 315. 1903.

<sup>4)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 44, S. 382. 1905. <sup>5)</sup> desgl. Bd. 56, S. 180. 1908.

<sup>6)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 41, S. 505. 1904. <sup>7)</sup> desgl. Bd. 17, S. 596. 1893.

<sup>8)</sup> Journ. of physiol. Bd. 29, S. 1. 1903.

Alkohol und Äther aus. Versetzt man nun etwas von dieser Substanz in einem Reagensglase mit 1 ccm Wasser, 1 ccm konzentrierter Salzsäure und Phloroglucin und kocht, so tritt sofort oder allmählich eine himbeer- bis kirschrote Färbung auf, welche den charakteristischen Absorptionsstreifen zeigt (§ 100) (Blumenthal<sup>1</sup>).

**Nachweis der Phosphatide in Organen.**

729. Über den Nachweis siehe § 261.

Über die Darstellung einzelner Phosphatide siehe § 263 ff.

**Bestimmungen einzelner Stoffe.**

**Bestimmung von Trockenrückstand, Gesamtstickstoff, einzelnen anorganischen Bestandteilen in Organen.**

730. **Vorbereitung.** Etwa 50 g gut zerkleinerte und gemischte Substanz wird in einer gewogenen Schale (+ Glasstab) genau abgewogen, mit so viel Alkohol zusammengerührt, daß die Masse krümelig wird, in dünner Schicht ausgebreitet und auf dem Wasserbade, dessen Temperatur weniger wie 80° beträgt, unter häufiger Durchmischung der Partikelchen mit dem Glasstabe getrocknet, bis der Alkoholgeruch verschwunden ist. Ist die Masse jetzt noch nicht gut pulverisierbar, so wird nochmals Alkohol zugefügt und wieder verdunstet (E. Voit<sup>2</sup>). Nach mehrstündigem Stehen an der Luft stellt man das Gewicht fest und zerreibt die Masse in einer Reibschale zu einem möglichst feinen Pulver. Um es völlig homogen zu machen, treibt man es durch einen Sieb von 0,25 qmm Maschenweite. Dieses lufttrockene Pulver wird in einem gut schließenden Gefäß aufbewahrt und dient für die einzelnen Bestimmungen.

**Trockenrückstand.** Man wägt genau 1—2 g ab und trocknet zunächst bei etwa 80° und dann bei 100° bis zum konstanten Gewicht. Man benutzt für diesen Zweck den Uhrglasapparat (§ 9).

**Gesamtstickstoff\*).** Man verfährt nach Kjeldahl (§ 558 b) unter Benutzung von etwa 0,3 g. Das Abwägen geschieht in einem Wägeröhrchen (§ 12).

**Einzelne anorganische Bestandteile\*).** Der Gesamtschwefel wird nach § 550, das Gesamteisen nach § 542, die Gesamtphosphorsäure nach § 553 oder auch § 697 ermittelt. Für die Eisenbestimmung nimmt man mindestens 5 g, für die anderen beiden 1—2 g. Kalium und Natrium werden nach § 533, Calcium und Magnesium nach § 536, Calcium nach § 537, Salzsäure nach § 545 ff. bestimmt.

**Bestimmung der Gesamtphosphorsäure in Muskeln nach Embden<sup>3</sup>).**

731. Man verascht eine gewogene Muskelmenge (etwa 0,5 g) im Mikro-Kjeldahlkolben mit 2 ccm des Neumannschen Veraschungsgemisches, indem man zur Vollendung der Veraschung noch ein oder mehrere Male  $\frac{1}{2}$ —1 ccm konzentrierte Salpetersäure zufügt und verfährt weiter wie § 697 angegeben.

**Bestimmung der Phosphorsäure in verschiedenen Formen ihrer Bindung (Phosphatide, Phosphorproteide, Nucleoproteide) und der anorganischen in Organen.**

732. Ein solches Verfahren, bei dem die Eigenschaft der Phosphorproteide im Unterschied zu den Nucleoproteiden die Phosphorsäure bei 24stündiger

\*) Man kann natürlich auch die frische Substanz für diese Bestimmungen verwenden, doch bietet das vorherige Trocknen und Pulverisieren größere Gewähr für einen richtigen Durchschnittswert. Von der frischen Substanz nimmt man etwa die vierfache Menge (Abwägen § 12).

<sup>1</sup>) Berlin. klin. Wochenschr. 34, S. 245. 1897, Zeitschr. f. klin. Med. Bd. 34, S. 166. 1898.

<sup>2</sup>) Zeitschr. f. Biol. Bd. 35, S. 555. 1898.

<sup>3</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 113, S. 138. 1921. — Wechselmann: desgl. Bd. 113, S. 149. 1921.

Einwirkung von 1 proz. Natronlauge bei 37° abzuspalten benutzt wird, ist von Plimmer und Scott<sup>1)</sup> angegeben.

**Bestimmung der Lactacidogenphosphorsäure in Muskeln nach Embden<sup>2)</sup>.**

733 Prinzip. Lactacidogen spaltet die in ihm enthaltene Phosphorsäure in 1—2 Stunden bei 40° vollständig ab, während das bei den anderen im Muskel enthaltenen Phosphorsäureverbindungen nicht der Fall ist. Man bestimmt die anorganische Phosphorsäure in einem gewogenen Teil des Muskels sofort, in einem anderen nach zweistündigem Verweilen bei 40°. Der Zuwachs ist als Lactacidogenphosphorsäure anzusehen.

Von dem nach der Tötung der Tiere so schnell als möglich und bei niedriger Temperatur hergestellten und gut gemischten Muskelbrei werden 80 g sofort mit je 80 ccm gekühltem Wasser, 2 proz. Salzsäure und 5 proz. Sublimatlösung (zur Entfernung des Eiweiß) versetzt, andere 80 g nach Zusatz von 20 ccm gesättigter Natriumbicarbonatlösung und so viel Ringerlösung (ohne Zusatz von Zucker und Bicarbonat), daß das Gesamtvolumen 160 ccm beträgt, 2 Stunden bei 40° gehalten. Nachdem dann auch dieser Portion je 80 ccm 2 proz. Salzsäure und 5 proz. Sublimatlösung zugesetzt sind, saugt man am nächsten Tage auf trocknen Nutschen rasch ab, befreit die Filtrate durch H<sub>2</sub>S von Quecksilber und durch Luftstrom von H<sub>2</sub>S und bestimmt in aliquoten Teilen (entsprechend 25 g Fleischbrei) die Phosphorsäure in folgender Weise:

Man versetzt in der Kälte mit Magnesiamischung und reichlichem Überschuß von Ammoniak, läßt bedeckt 24 Stunden in der Kälte stehen, filtriert durch aschefreies Filter, wäscht wiederholt mit 2 proz. Ammoniak, löst den Niederschlag in etwa 8 proz. Salpetersäure, wobei die Lösung in das benutzte Becherglas fließt und wäscht das Filter mit kaltem Wasser aus. Jetzt wird wieder in der Kälte mit ausreichender Menge 25 proz. Salpetersäure (1 Tl.), 34 proz. Ammonnitrat (1 Tl.) und 3 proz. Ammonmolybdat (3 Tl.) versetzt und der Niederschlag nach 24 Stunden möglichst vollständig auf aschefreies Filter gebracht, mit ammonnitraithaltigem Wasser gewaschen und dann unter Lösung mit Ammoniak in das Becherglas zurückgebracht. Nun fällt man in gewöhnlicher Weise in der Wärme als Magnesiumammoniumphosphat und wägt als Magnesiumpyrophosphat (S. 673).

Unter Benutzung der von Embden angegebenen Phosphorsäurebestimmungsmethode (§ 697) kann man diese Bestimmung auch mit kleinen Muskelmengen (einzelne Muskeln von Frosch, Kaninchen, Kröte) ausführen (Wechselmann<sup>3)</sup>, Adler<sup>4)</sup>, Embden und Adler<sup>5)</sup>, Panajotakos<sup>6)</sup>). Man verwendet in diesen Fällen auch eine bessere und zweckmäßigere Art der Zerkleinerung des Gewebes und verfährt so<sup>7)</sup>: Die sofort nach der Entnahme in einem Dewarschen Gefäß gefrorenen Muskelstücke werden, in eine einfache Schicht guter Verbandgaze eingeschlagen, in einer mit flüssiger Luft von innen gekühlten Schale mit einem in flüssiger Luft gekühltem Pistill zerstoßen. Von dem grobkörnigem trockenen Pulver dienen 2 Portionen A und B für die Bestimmung.

Portion A. Man wägt schnell auf einer Hornwage die gewünschte Menge (etwa 1,5 g) annähernd ab, bringt sie in ein 20 cm hohes mit Schliffdeckel versehenes 5 ccm 2 proz. Salzsäure enthaltendes Wägegglas, das nach Wägung bei Zimmertemperatur auf 0° abgekühlt ist und mischt sie mit Hilfe eines sehr

<sup>1)</sup> Journ. of the chem. soc. (London) Bd. 93, 2, S. 1699. 1908. Journ. of physiol. Bd. 38, S. 247. 1909.

<sup>2)</sup> Embden, Schmitz u. Meincke: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 113, S. 16. 1921. — Embden, Griesbach u. Schmitz: desgl. Bd. 93, S. 7. 1914/15.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 113, S. 146. 1921. <sup>4)</sup> desgl. Bd. 113, S. 176. 1921.

<sup>5)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 113, S. 201. 1921. <sup>6)</sup> desgl. Bd. 113, S. 245. 1921.

<sup>7)</sup> Lyding: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 113, S. 226. 1921. — Wechselmann: desgl. Bd. 113, S. 148. 1921.

Bestimmung  
in kleinen  
Muskelmengen,

dünnen Glasstabes mit der Salzsäure, wobei rasch Auftauen erfolgt. Nach 20 bis 30 Minuten langem Stehen des verschlossenen Glases auf Eis läßt man es die Temperatur des Wägezimmers annehmen, stellt das Gewicht fest, fügt 5 ccm Wasser von Zimmertemperatur und 5 ccm 5proz. auf 0° abgekühlte Sublimatlösung hinzu, rührt gut um und läßt verschlossen unter ein oder zweimaliger Wiederholung des Umrührens bis zum nächsten Tage stehen.

Portion B. Man bringt eine etwa gleiche Menge des Pulvers in ein gewogenes Wägegglas der gleichen Form, wägt nach Abkühlen auf Zimmertemperatur, läßt nach Zusatz von 5 ccm 2proz. Natriumbicarbonatlösung 2 Stunden bei 45° stehen, kühlt wenige Minuten auf 0° ab und fügt 5 ccm 4proz. Salzsäure und 5 ccm 5proz. Sublimatlösung hinzu.

Die weitere Behandlung, welche in beiden Fällen die gleiche ist, besteht darin, daß man durch aschefreies Filter filtriert, eine abgemessene (bei A u. B gleiche) Menge des Filtrats mit frisch bereitetem Schwefelwasserstoffwasser in nicht zu großem Überschuß versetzt, sofort in einen mit einer Marke bei 60 ccm versehenen Kolben durch aschefreies Filter filtriert, mit kaltem Wasser wäscht, bis das Filtrat fast die Höhe der Marke erreicht, den Schwefelwasserstoff durch einen Luftstrom entfernt, mit Ammoniak neutralisiert, bis zur Marke auffüllt und die Phosphorsäure nach § 697 bestimmt.

*Bestimmung der organischen löslichen Nicht-Lactacidogenphosphorsäure in Muskeln nach Embden.*

734. Man bestimmt in einem aliquoten Teil des nach vorigem Paragraph erhaltenen eiweißfreien Filtrates sofort die Gesamtmenge der Phosphorsäure nach vorausgegangener Veraschung nach Neumann, in einem gleichen Teil des Filtrates nach 2stündigem Stehen bei 40° die freie Phosphorsäure und zieht letzteren Wert von ersterem ab. S. dazu Wechselmann<sup>1)</sup>, Adler<sup>2)</sup>, Embden und Adler<sup>3)</sup>.

*Bestimmung der Phosphatidphosphorsäure in Organen.*

735. Eine abgewogene Menge des fein zerkleinerten und gut gemischten Gewebes wird zunächst wiederholt mit absolutem Alkohol ausgekocht (wobei man zum Filtrieren Glaswolle benutzt) und dann im Soxhletapparat mit Petroläther extrahiert. Der Rückstand, welcher nach Verdunsten von Alkohol und Petroläther hinterbleibt, wird mit Chloroform aufgenommen und die Lösung filtriert. Nach Verdunsten des Chloroforms und Veraschen mit Soda und Salpeter bestimmt man die Phosphorsäure nach § 554 oder man nimmt Veraschung und Bestimmung nach Neumann vor (§ 530 und 553).

*Bestimmung des Kollagens in Organen nach G. Hoppe-Seyler<sup>4)</sup>.*

736. Das fein zerkleinerte Gewebe (50—100 g) wird mit künstlichem Pankreassaft unter Toluolzusatz bei etwa 37° verdaut, bis mikroskopisch nur noch die Bindegewebszüge, aber keine Zellen mehr nachweisbar sind. Man zentrifugiert, entfernt die überstehende Flüssigkeit und saugt ab. Der Rückstand wird mit schwacher Sodalösung bei Gegenwart von Toluol gewaschen, bis das Filtrat keine Biuretreaktion mehr gibt, mit Alkohol und Äther extrahiert, bis zum konstanten Gewicht getrocknet, gewogen und verascht. Das Gewicht des Trockenrückstandes nach Abzug des Gewichts der Asche ergibt die Menge des Kollagens.

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 113, S. 149. 1921.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 113, S. 175. 1921.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 113, S. 205. 1921.

<sup>4)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 98, S. 285. 1916/17.

*Bestimmung des Ammoniaks in Organen.*

737. Man verfährt nach Grafe<sup>1)</sup>, welcher die Erfahrungen von Boussignault, Wurster<sup>2)</sup>, Krüger und Reich<sup>3)</sup> und Folin<sup>4)</sup> benutzte.

Prinzip. Das Ammoniak wird durch kochsalzhaltige Natriumcarbonatlösung (Folin) in Freiheit gesetzt, im Vakuum (Boussignault, Wurster) bei einer Temperatur bis zu 37° überdestilliert, in titrierter Schwefelsäure aufgefangen und durch Zurücktitrieren mit Natronlauge quantitativ bestimmt. Das Schäumen während der Destillation wird durch Zusatz von Alkohol beseitigt (Krüger und Reich, Folin).

Erforderliche Lösungen und Apparate. 1. Gesättigte Kochsalzlösung (ammoniakfrei). 2. Gesättigte Natriumcarbonatlösung (ammoniakfrei). 3.  $\frac{n}{10}$  Schwefelsäure und  $\frac{n}{10}$  Natronlauge. 4. Lacmoid. 5. Der § 578 abgebildete Apparat. Die Peligotsche Röhre hat zweckmäßig eine Höhe von 26 cm und einen Fassungsraum (bis zum oberen Rand der beiden Kugeln gemessen) von etwa 450 ccm, es empfiehlt sich, sie schräg aufzustellen, und zwar so, daß die der Wasserstrahlpumpe zugekehrte Hälfte erhöht ist. Als Destillationskolben dient ein Jenaer Rundkolben von 1—2 l mit langem Hals.

Vorbereitung. Die Leber ist unmittelbar nach dem Tode des Tieres in möglichst ausgeblutetem Zustande zu verwenden, andere weniger zersetzliche Organe lassen sich ohne nachweisbaren Nachteil bis zum nächsten Tage aufheben, wenn man sie mit Salicylsäure bestreut auf Eis liegen läßt. Siehe indessen den Schluß dieses Paragraphen, wonach jedenfalls beim Muskel besondere Vorsichtsmaßregeln nötig sind, um eine postmortale Umwandlung von Harnstoff in Ammoniak zu vermeiden. Nach Entfernung von Häuten und großen Gefäßen sind die Organe möglichst fein mit Hilfe der Fleischhackmaschine zu zerkleinern oder, wo das möglich ist, wie bei der Leber durch Reiben durch ein Sieb.

Ausführung. Nachdem in die Peligotsche Röhre 10 ccm  $\frac{n}{10}$  Schwefelsäure und ebensoviel destilliertes Wasser eingebracht sind, wägt man von dem Organbrei 50 g (bis auf 0,1 g genau) ab, spült ihn mit 100 ccm konzentrierter Kochsalzlösung, 50 ccm Alkohol und 100 ccm (ammoniakfreiem) Wasser in den Kolben, fügt 50 ccm gesättigte Sodalösung hinzu und verschließt den Kolben. In den Scheidetrichter wird Alkohol gebracht. Nachdem Stopfen und Hähne mit neutral reagierendem, flüssigem Paraffin abgedichtet wurden, wird die Flamme unter dem Wasserbad angezündet und evakuiert. Bei einem Vakuum von 20 mm beginnt schon nach einer Viertelstunde, wenn das Thermometer 25—28° zeigt, der Kolbeninhalt zu sieden. Es ist ratsam, in den ersten 3 Stunden nicht viel über diese Temperatur hinauszugehen, da bei höherer Temperatur leicht Organteile, die noch nicht ganz mit der alkalischen Flüssigkeit durchtränkt sind, an die Kolbenwand spritzen und nicht alles Ammoniak abgeben. Eintretendes Schäumen beseitigt man durch vorsichtige Zugabe von etwas Alkohol aus dem Scheidetrichter oder auch durch vorübergehende Verringerung des Vakuums. Ist einmal die Destillation in ruhigen Gang gebracht (was bei einiger Übung in 20—30 Minuten der Fall ist), bedarf es zunächst keiner weiteren Aufsicht. Nach etwa 3 Stunden steigert man die Temperatur des Wasserbades auf 36—37°. Nach 6—7 Stunden (gerechnet vom Beginne des Siedens) ist die Destillation beendet. Die Abstimmung des Apparates und die Titration geschieht in der § 578 angegebenen Weise.

Bestimmung in Muskeln. Nach Gad-Andersen<sup>5)</sup> beginnt alsbald nach dem Tode eine Umwandlung des Harnstoffs in Ammoniak, welche nach 5 Stunden vollständig geworden ist. Um das präformierte Ammoniak zu bestimmen, gibt er folgende Methode an: Man bringt ein sofort nach dem

Bestimmung in Muskeln.

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 48, S. 300. 1906.

<sup>2)</sup> Zentralbl. f. Physiol. Bd. 1, S. 485. 1888. Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 22, 2, S. 1903. 1889.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 39, S. 165. 1903.

<sup>4)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 37, S. 161. 1902/03.

<sup>5)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 39, S. 267. 1919.

Tode entnommenes Muskelstück (3—5 g) oder anderes Gewebe möglichst schnell in ein eine passende Menge Alkohol enthaltendes Wäageglas, das vorher mit seinem Inhalt gewogen und auf 20° unter 0° abgekühlt ist. Durch Wiedewägen erfährt man das Gewicht des Muskelstücks. Es wird nun schnell mit Sand in einer Reibschale, die mittels Kältemischung auf weit unter 0° abgekühlt ist, zerrieben, der Brei mit Alkohol aus dem Wäageglas bedeckt und dann in einen Kolben überführt. Die Bestimmung geschieht nach Übertreiben mit einem Luftstrom (§ 578, 2).

**Bestimmung des Harnstoffs.**

738. Ein von Gad - Andersen<sup>1)</sup> angegebenes Mikroverfahren beruht auf der Spaltung des Harnstoffs durch Urease, Übertreiben des Ammoniaks durch Luftstrom, Zersetzung mit Bromlauge und Bestimmung des Stickstoffs im Kroghschen Mikrorespirometer. In der Originalarbeit, auf die verwiesen sei, findet sich auch eine Abbildung des benutzten Apparates.

**Bestimmung des Gesamtkreatins (Kreatin + Kreatinin) in Muskeln nach Hahn und Schäfer<sup>2)</sup>.**

739. Die Entfernung des Eiweißes geschieht mit Trichloressigsäure, bei deren Benutzung weder Kreatin noch Kreatinin durch das ausfallende Eiweiß adsorbiert werden<sup>3)</sup>; die Überführung von Kreatin in Kreatinin geschieht in der von Hahn und Barkan<sup>4)</sup> angegebenen Weise, die Bestimmung des Kreatinins nach Folin.

Erforderliche Lösungen. Die § 582 erwähnten. Ferner 10proz. Trichloressigsäure (jedemal frisch hergestellt), 1proz. alkoholische Lösung von p-Nitrophenol, 5proz. Kochsalzlösung, 10proz. Essigsäure, etwa 50proz. und etwa 30proz. Natronlauge.

Man kocht 40 g reines zerkleinertes Muskelgewebe in einer Porzellanschale mit 150 ccm 5proz. Kochsalzlösung unter Zusatz von 20 Tropfen 10proz. Essigsäure 10 Minuten, gießt die dekantierte Flüssigkeit auf ein nicht zu kleines Faltenfilter und kocht den Rückstand in der Schale mit 150 ccm Wasser 5 Minuten. Wenn die Filtration langsam zu werden beginnt, bringt man den Trichter mit dem Filter über ein neues Filter und durchsticht das erste Filter. Die überstehende Flüssigkeit der zweiten Auskochung wird auf das durchstochene Filter gebracht (um es auszuwaschen) und filtriert durch das zweite. Der Muskelrückstand in der Schale wird nun in derselben Weise unter Benutzung von je 100 ccm Wasser noch 3 mal je 5 Minuten ausgekocht und immer die überstehende Flüssigkeit auf das erste durchstochene Filter gegossen. Die Filtration erfolgt jetzt rasch. Man vereinigt die abgekühlten Extrakte in einem 1-l-Meßkolben, füllt bis zur Marke auf, mischt, versetzt 100 ccm mit 50 ccm der Trichloressigsäure und filtriert nach kurzem Stehen durch ein trockenes Faltenfilter. 100 ccm des wasserklaren Filtrats werden in einer mit Gummistopfen gut verschließbaren Flasche nach Zusatz von 3 Tropfen der alkoholischen Lösung von p-Nitrophenol mit einer etwa 50proz. Natronlauge aus einer Bürette bis zur Gelbfärbung versetzt, um die Trichloressigsäure zu neutralisieren (wozu 1,8—2,0 ccm erforderlich sind), und nach Zufügen von 100 ccm 2n-Salzsäure und Verschuß der Flasche 24 Stunden bei 65° im Thermostaten gehalten. Jetzt bringt man eine gemessene Menge der Flüssigkeit (in der Regel 10 ccm) in einen 100-ccm-Meßkolben, titriert mit 30proz. Natronlauge, bis der Umschlag in Gelb erfolgt und macht die colorimetrische Bestimmung nach § 582.

<sup>1)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 51, S. 367 und 373. 1922.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. Biol. Bd. 78, S. 156. 1923

<sup>3)</sup> Hahn u. Meyer: Zeitschr. f. Biol. Bd. 76, S. 247. 1922.

<sup>4)</sup> Zeitschr. f. Biol. Bd. 72, S. 305. 1920.



**Bestimmung des Kreatinins in Muskeln.**

740. In diesem Falle kann man die Enteiweißung nicht mit Trichloressigsäure vornehmen, da wegen des geringen Kreatiningehaltes ein Eindampfen im Vakuum erfolgen muß, was sich aber wegen starken Schäumens nicht ausführen läßt<sup>1)</sup>. Man bewirkt deshalb die Entfernung des Eiweiß durch kolloidales Ferrihydroxyd nach Rona<sup>2)</sup>, durch welches Kreatinin nicht adsorbiert wird.

Man verfährt zunächst wie § 739 beschrieben. Von dem auf 1000 ccm gebrachten Extrakt versetzt man 450 ccm in einem Erlenmeyerkolben tropfenweise unter Schütteln mit 50 ccm Liquor ferri oxydati dialysati und filtriert durch ein trockenes Faltenfilter. Das wasserklare und eiweißfreie Filtrat wird gemessen, bei 55° im Vakuum zur Trockne verdampft, der Rückstand mit Hilfe von möglichst wenig Wasser in ein 100-ccm-Meßkölbchen gebracht und weiter nach § 582 verfahren.

**Bestimmung der beim Kochen mit verdünnten Säuren aus Organen erhaltenen Nucleinbasen\*)<sup>3)</sup>.**

741. 500 g Muskelbrei (von drüsigen Organen entsprechend weniger, z. B. 50—500 g) werden mit verdünnter Schwefelsäure (5—10 g konzentrierte H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> auf 1 l Wasser) 3—4 Stunden im Dampftopf auf 100—110° oder am Rückflußkühler auf dem Sandbade zum Sieden erhitzt. Die Flüssigkeit wird dann mit Natronlauge alkalisch gemacht und mit Essigsäure wieder angesäuert. Von einem dabei entstehenden Niederschlage wird abfiltriert, das Filtrat mit Natronlauge schwach alkalisch gemacht und mit Kupfersulfat und Natriumbisulfit in der Siedehitze ausgefällt (S. 941). Der abfiltrierte und ausgewaschene Kupferoxydulniederschlag wird in heißem Wasser suspendiert und mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Nach dem Ansäuern mit etwas Schwefelsäure wird in der Siedehitze filtriert, das Filtrat auf etwa 1 l eingeengt, mit Ammoniak stark alkalisch gemacht und mit ammoniakalischer Silbernitratlösung ausgefällt. Der Niederschlag wird zuerst auf einem Faltenfilter gesammelt, dann auf der Nutsche abgesaugt und mit ammoniakhaltigem Wasser so lange gewaschen, bis das Filtrat keine Salpetersäurereaktion mehr gibt. Dann wird der Niederschlag in heißem Wasser aufgeschwemmt und mit Salzsäure in der Siedehitze zersetzt, bis sich reines Chlorsilber abscheidet. Nun fügt man noch einen kleinen Überschuß von Salzsäure hinzu, saugt vom Chlorsilber ab und dampft das Filtrat in einer Porzellanschale, zum Schluß bei niederer Temperatur und unter häufigem Umschwenken ein bis zur Trockne.

1. Bestimmung des Guanins. Der Rückstand wird mit heißem Wasser (etwa 100—150 ccm) aufgenommen und in der Wärme mit einer wässrigen Ammoniaklösung im Überschuß versetzt. Der Niederschlag, der das Guanin enthält, wird nach 24stündigem Stehen abfiltriert, noch einmal mit 2 proz. Ammoniaklösung in der Wärme digeriert, wieder nach 24 Stunden filtriert, in wenig verdünnter Natronlauge gelöst, evtl. filtriert, und die klare Lösung mit Essigsäure angesäuert. Die Fällung (Guanin) wird abfiltriert, mit Alkohol und Äther gewaschen, bei 100° getrocknet und gewogen. Guanin.

2. Bestimmung des Adenins. Die vom Ammoniakniederschlage abfiltrierten Flüssigkeiten werden zur Vertreibung des überschüssigen Ammoniaks

\*) Bearbeitet von H. Steudel-Berlin.

<sup>1)</sup> Hahn u. Meyer: Zeitschr. f. Biol. Bd. 76, S. 247. 1922.

<sup>2)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 27, S. 348. 1910.

<sup>3)</sup> A. Kossel: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 5, S. 267. 1881; Bd. 6, S. 422. 1882; Bd. 7, S. 7. 1883; Bd. 8, S. 404. 1884. — Schindler: desgl. Bd. 13, S. 432. 1889. — Bruhns: desgl. Bd. 14, S. 533. 1890. — Burian u. Schur: desgl. Bd. 23, S. 55. 1897. — Krüger u. Salomon: desgl. Bd. 24, S. 364. 1898; Bd. 26, S. 350. 1899. — His d. J. u. Hagen: desgl. Bd. 30, S. 350. 1900. — Krüger u. Schittenhelm: desgl. Bd. 35, S. 153. 1902. — Steudel u. Nakagawa: desgl. Bd. 126, S. 250. 1923.

eingedampft, auf etwa 100—150 ccm mit Wasser verdünnt und nach Zusatz eines Tropfens wässriger Methylorangefärbung tropfenweise mit Salzsäure bis zum Auftreten einer Rotfärbung versetzt. Man fügt jetzt eine kalte konzentrierte Lösung von Natriumpikrat so lange hinzu, als noch ein weiterer Zusatz des Fällungsmittels zu einer Probe des Filtrates sofort eine Trübung erzeugt. Der Niederschlag von pikrinsaurem Adenin wird sofort mit Hilfe einer Saugvorrichtung abfiltriert, bei 100° getrocknet und gewogen. Stimmt der Zersetzungspunkt (281°), so ist das Adeninpikrat rein und man berechnet das

Adenin (1).

Adenin nach der Formel  $C_5H_5N_5 \cdot C_6H_2(NO_2)_3OH$ . Andernfalls wägt man einen Teil des Niederschlages ab, übergießt ihn mit heißem Wasser und bringt ihn durch Zusatz einer abgemessenen Menge 2-n-NaOH in Lösung, filtriert evtl. und fällt das Filtrat durch Zusatz derselben Menge 2-n-Schwefelsäure, wie man NaOH verbraucht hat. Dann pflegt das Adeninpikrat meist rein auszukristallisieren. Sollte es nun noch nicht rein sein, muß man die Fällung mit ammoniakalischer Silbernitratlösung wiederholen, nachdem man die Pikrinsäure vorher bei saurer Reaktion mit Äther oder Benzol ausgeschüttelt hat.

3. Trennung von Hypoxanthin und Xanthin. Man säuert die vom Adeninpikrat abfiltrierte Flüssigkeit mit Salpetersäure an und entfernt die Pikrinsäure durch Ausschütteln mit Benzol. Hierauf fällt man den Rest der Basen mit ammoniakalischer Silberlösung und verfährt wie oben beschrieben, um die Basen in die Chloride überzuführen. Die Lösung wird dann zur Trockne verdampft und zur völligen Entfernung der Salzsäure der Rückstand noch mehrere Male mit Wasser und Alkohol eingedunstet, sodann in wenig Wasser von 40° gelöst und die Lösung zur Ausscheidung des Xanthins 24 Stunden hingestellt. Den aus Xanthin und Xanthinchlorhydrat bestehenden Rückstand filtriert man ab, wäscht mit Wasser chlorfrei und verfährt weiter nach 5.

4. Bestimmung des Hypoxanthins. Das Filtrat vom Xanthin wird mit einem kleinen Überschuß von Pikrinsäure in 50 ccm Wasser heiß gelöst. Trübt sich die Flüssigkeit beim Abkühlen, so war etwas Adenin der ersten Fällung entgangen; man filtriert die Trübung sofort ab. Der Filtrückstand wird getrocknet und gewogen. Nach Bestimmung des Zersetzungspunktes dient

Adenin (2).

sein Gewicht zur Korrektur der unter 2 gefundenen Adeninmenge. Die klare, von Adenin völlig freie Lösung scheidet beim Einengen und Erkaltenlassen das Hypoxanthinpikrat in makroskopischen tafelförmigen Krystallen aus. Es wird abfiltriert, in siedendem Wasser gelöst und mit neutraler oder nur schwach saurer Silbernitratlösung versetzt. Der Niederschlag besteht aus Hypoxanthin-silberpikrat, er wird bei 100° getrocknet und gewogen und dient zur Berechnung

Hypoxanthin.

des Hypoxanthins nach der Formel  $C_5H_3AgN_4O \cdot C_6H_2(NO_2)_3 \cdot OH$ .

5. Bestimmung des Xanthins. Die vom Hypoxanthinpikrat abfiltrierte Flüssigkeit wird mit Salpetersäure und Benzol von Pikrinsäure befreit und mit überschüssigem Ammoniak versetzt. In dieser Flüssigkeit löst man den aus Xanthin bestehenden Niederschlag (s. 3) und fällt die Lösung mit ammoniakalischer Silberlösung. Der Niederschlag dient, salpetersäurefrei gewaschen und nach Vertreibung des Ammoniaks durch Kochen mit  $BaCO_3$ , zur Stickstoffbestimmung, aus deren Resultat die Menge des Xanthins berechnet wird.

Xanthin.

#### *Bestimmung der Harnsäure in Organen*<sup>1)</sup>.

742. 50—500 g vom Organbrei werden in großen Kolben mit 2 l Wasser und 10 ccm konzentrierter Schwefelsäure 12 Stunden lang so erhitzt, daß die

<sup>1)</sup> Stadthagen: Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. Bd. 109, S. 390. 1887. — His d. J. u. Hagen: Hoppe-Seylers Zeitsehr. f. physiol. Chem. Bd. 30, S. 350. 1900. Dieser letzteren Arbeit ist die obige Beschreibung entnommen.

Flüssigkeit niemals ins Sieden kommt. Die Flüssigkeit wird nach 12stündigem Stehen durch große Faltenfilter abfiltriert und der Rückstand noch zweimal mit Schwefelsäure von 0,5 Vol.-% je 2—3 Stunden in der Wärme extrahiert. Die vereinigten Filtrate werden mit so viel Barythydrat versetzt, als der zugesetzten Schwefelsäure entspricht. (Da etwas Schwefelsäure im ausgefallenen Eiweiß zurückgehalten wird, so kommt auf diese Weise ein geringer Überschuß von Baryt in die Lösung. Dieser geringe Überschuß schadet nicht.) Das Bariumsulfat setzt sich bei gelinder Wärme in einigen Stunden gut ab. Man filtriert, fügt zu dem Filtrat Lithiumcarbonat bis zur neutralen Reaktion und neutralisiert, während der Niederschlag sich absetzt, von Zeit zu Zeit von neuem mit Essigsäure. Das Absitzen erfolgt am besten bei 30—40°. Eine Probe der überstehenden Flüssigkeit darf weder mit Baryt noch mit Lithiumcarbonat eine Trübung geben. Ist dies, evtl. durch nachträglichen Zusatz, erreicht, so wird filtriert und mit heißem Wasser mehrfach nachgewaschen. Man dampft das Filtrat ein, filtriert von ausgeschiedenen Albumosen ab und fällt die Harnsäure als harnsaure Silbermagnesia aus. Über das Weitere s. § 583, 1. Auf jeden Fall ist es nötig, die schließlich erhaltene Harnsäure mikroskopisch und mit Hilfe der Murexidprobe zu identifizieren.

Ein anderes Verfahren ist von Brugsch und Schittenhelm<sup>1)</sup> benutzt worden.

Ein colorimetrisches Verfahren nach Folin (beruhend auf der Reduktion der Phosphorwolframsäure durch Harnsäure, wobei eine mit Alkali sich blau färbende Substanz entsteht) ist von Landmann<sup>2)</sup> angegeben worden.

#### *Bestimmung des Carnosins in Muskeln.*

743. Es sind colorimetrische Methoden angegeben worden, von denen die eine auf der Bildung eines Azofarbstoffs mit Diazobenzolsulfosäure (v. Fürth und Hryntschak<sup>3)</sup>, Hunter<sup>4)</sup>, die andere auf der violetten Farbe der Carnosinkupferverbindung beruht. Die Methodik bedarf noch weiterer Ausbildung. Der Fehler der ersteren Methode wird auf etwa 5% veranschlagt (Hunter). Das Nähere s. in den Originalarbeiten.

#### *Bestimmung der Aminosäuren in Muskeln.*

744. v. Fürth und Schwarz<sup>5)</sup> sowie Buglia und Costantino<sup>6)</sup> haben unter Benutzung der Formoltitration solche Bestimmungen ausgeführt. Für genaue Werte reicht die Methodik nicht aus.

#### *Bestimmung von Gesamtaceton (Acetessigsäure + Aceton), Acetessigsäure und Aceton in Blut und Organen nach Embden<sup>7)</sup>.*

745. Die Entfernung des Eiweißes geschieht nach Schenck (§ 652), die Bestimmung nach Huppert-Messinger (§ 608).

1. Gesamtaceton. Mindestens 150 g frisches Blut bzw. 150 g frischer Organbrei werden mit der gleichen Menge Wasser und je der doppelten Menge 2 proz. Salzsäure und 5 proz. Sublimatlösung versetzt, durchgerührt und nach Absitzen des Eiweißniederschlags durch Faltenfilter filtriert. Von 500 ccm des Filtrats werden in 20—25 Minuten etwa 60 ccm unter starker Kühlung destilliert. Über das Weitere s. § 608, b.

2. Acetessigsäure. Von dem nach 1 hergestellten eiweißfreien Filtrat wird eine gemessene, große Menge genau mit Natronlauge neutralisiert und im

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. exp. Pathol. u. Therapie Bd. 4, S. 534. 1907.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 92, S. 416. 1914.

<sup>3)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 64, S. 172. 1914. — Bubanovic: desgl. Bd. 92, S. 125. 1918.

<sup>4)</sup> Biochem. Journ. Bd. 15, S. 689. 1921; Bd. 16, S. 640. 1922.

<sup>5)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 30, S. 413. 1911.

<sup>6)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 81, S. 132. 1912.

<sup>7)</sup> Embden u. Schmitz: Handb. d. biochem. Arbeitsmethoden, herausgeg. von Abderhalden, Bd. 3, S. 915 u. 923. 1910 oder Handb. d. biol. Arbeitsmethoden (Abderhalden), Abt. IV, Teil 5, Heft 2, Lief. 119, S. 207 u. 221. 1924. — Embden u. Engel: Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 11, S. 323. 1908.

Rundkolben unter möglichst niedrigem Druck auf dem Wasserbad, dessen Temperatur 34—35° nicht übersteigt, während etwa 1 Stunde destilliert, so daß ungefähr 100 ccm übergehen. Jetzt wird der Destillationsrückstand mit einer der zugefügten Natronlauge entsprechenden Menge Salzsäure versetzt und destilliert, wie unter 1. angegeben. Die gefundene Acetonmenge entspricht der Acetessigsäure.

3. Aceton. Seine Menge ergibt sich aus der Differenz von den bei 1. und 2. gefundenen Werten.

Mikroverfahren.

Über ein Mikroverfahren für Blut siehe § 706.

#### *Bestimmung des Adrenalins in Nebennieren.*

746. Von Folin, Cannon und Denis<sup>1)</sup> ist eine colorimetrische Methode angegeben, welche auf der Reduktion der Phosphorwolframsäure durch Adrenalin zu blau gefärbten Verbindungen beruht. S. dazu die Kritik von Maiweg<sup>2)</sup>, nach der wegen der vorhandenen Adrenalinvorstufen die Bestimmungen ungenau sind.

#### *Bestimmung des Alkohols in Muskeln.*

747. 1. Eine titrimetrische Bestimmung kleiner Mengen Alkohol nach seiner Isolierung durch Destillation ist von Nicloux<sup>3)</sup> angegeben und von Landsberg als ganz brauchbar befunden worden. Sie beruht auf der reduzierenden Wirkung des Alkohols auf die Chromsäure. Ein auf demselben Prinzip beruhendes Verfahren ist früher von Bodländer<sup>4)</sup> beschrieben. Beide Methoden leiden an einer wenig scharfen Endreaktion. Nach Nicloux beträgt der relative Fehler bei seiner Methode ungefähr 5%. Um eine scharfe Endreaktion zu erhalten, ist empfohlen worden, das Destillat (die wässrige Alkohollösung) mit einem Überschuß einer titrierten Kaliumbichromatlösung zu versetzen und den Überschuß mit einer Ferroammonsulfatlösung zurückzutitrieren unter Feststellung der Endreaktion durch Tüpfelprobe mit Ferrocyankalium (s. Pringsheim<sup>5)</sup>).

2. Genauere Resultate erhält man nach Stritar<sup>6)</sup> bei der Anwendung des Jodidverfahrens von Zeisel und Fanto<sup>7)</sup>. Man kocht die alkoholhaltige Flüssigkeit mit Jodwasserstoff, wobei sich Äthyljodid bildet, leitet die Dämpfe durch eine Suspension von rotem Phosphor, wobei der Jodwasserstoff absorbiert wird und darauf in eine alkoholische Silbernitratlösung, durch welche das Jod des Äthyljodids an Silber gebunden wird. Das Jodsilber wird gewogen und durch Multiplikation seiner Menge mit 0,1960 die entsprechende Menge Äthylalkohol erhalten.

Der Fehler beträgt nach Stritar nur 0,5—1%, wenn mindestens 0,05 g Alkohol vorhanden sind. Über die zweckmäßigste Art der Anreicherung des Destillats an Alkohol durch wiederholte Destillation s. bei Stritar, über die Einzelheiten der Methode die unten zitierten Arbeiten<sup>7)</sup>. Eine eingehende Beschreibung des Jodidverfahrens und Abbildung des Apparates findet sich auch bei Tangl und Weiser<sup>8)</sup>. Über Fehlerquellen und ihre Ausschaltung s. auch bei Stritar.

#### *Bestimmung der Milchsäure in Muskeln (und Leber) nach Embden<sup>9)</sup>.*

Bestimmung durch  
Wägung.

748. **Wägung als Zinklactat.** Der Muskelbrei (100 g), welcher nach der Tötung des Tieres so schnell als möglich und bei niedriger Temperatur hergestellt werden muß, um eine Bildung von Milchsäure aus Lactacidogen zu verhindern, wird mit je 100 ccm eiskaltem Wasser, 2 proz. Salzsäure und 5 proz. Sublimatlösung (Entfernung des Eiweiß) versetzt und nach gutem Umrühren und Stehen über Nacht im Eisschrank abgesaugt, das Filtrat mit Schwefelwasserstoff vom Queck-

<sup>1)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 13, S. 477. 1912/13. — Autenrieth u. Quantmeyer: Münch. med. Wochenschr. Jg. 68, S. 1007. 1921.

<sup>2)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 134, S. 292. 1923.

<sup>3)</sup> Recherches expér. sur l'élimination de l'alcool ct. 1 Vol. Paris 1900, bei O. Doin, u. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 43, S. 476. 1904/05.

<sup>4)</sup> Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 32, S. 398. 1883.

<sup>5)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 12, S. 143. 1908.

<sup>6)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 50, S. 22. 1906/07.

<sup>7)</sup> Zeitschr. f. d. landw. Versuchsw. in Österreich Bd. 5, S. 729. 1902. Zeitschr. f. analyt. Chem. Bd. 42, S. 549. 1903. — Stritar: Zeitschr. f. analyt. Chem. Bd. 42, S. 579. 1903.

<sup>8)</sup> Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 115, S. 152. 1906.

<sup>9)</sup> Embden u. Kraus: Biochem. Zeitschr. Bd. 45, S. 1. 1912. — S. Oppenheimer: desgl. Bd. 45, S. 30. 1912. — Embden: Handb. d. biochem. Arbeitsmethoden, herausgeg. von Aberhalden Bd. 5, S. 1254. 1912. — v. Fürth u. Charnass: Biochem. Zeitschr. Bd. 26, S. 199. 1910.

silber, durch einen Luftstrom vom Schwefelwasserstoff befreit und nach genauer Neutralisation mit starker Natronlauge und ganz schwachem Ansäuern mit verdünnter Salzsäure im Vakuum bei einer  $50^{\circ}$  nicht übersteigenden Temperatur des Heizwassers auf etwa 100 ccm eingeengt. Die Flüssigkeit, welche klar und neutral oder ganz schwach sauer sein muß (ist die Reaktion alkalisch, so ist die Bestimmung zu verwerfen), wird in den Lindschen Apparat (S. 3) übergeführt, mit 15 ccm konzentrierter Phosphorsäure versetzt, mit Ammonsulfat gesättigt und 40 Stunden mit Äther extrahiert, darauf nach Wechseln des Extraktionskölbchens nochmals 20 Stunden. In dem zweiten Extrakt läßt sich oft gar keine Milchsäure, manchmal noch eine geringe Menge nachweisen. Man filtriert die ätherische Lösung in einen Erlenmeyerkolben, schüttelt die etwa an den Wandungen haftenden Tröpfchen mit neuem Äther durch, bringt auch diesen auf das Filter und wäscht mit Äther nach. Das Filtrat wird unter Zusatz von 20 ccm Wasser zur Entfernung des Äthers destilliert, die zurückbleibende Flüssigkeit nach Zusatz von 200—300 ccm Wasser mit reinem Bleicarbonat\*) 1 Stunde auf lebhaft siedendem Wasserbade erwärmt (zur Entfernung von Phosphorsäure) und nach Stehen über Nacht im Eisschrank durch Dekantation und Waschen mit kaltem Wasser vom Bleiniederschlag befreit. Es folgt Ausfällen des gelösten Bleies mit Schwefelwasserstoff, Filtrieren, Auswaschen mit heißem Wasser, Entfernen des  $H_2S$  durch einen Luftstrom, 1stündiges Erwärmen mit Zinkcarbonat\*\*), Filtrieren und Auswaschen mit heißem Wasser. Das Filtrat wird in einer Porzellanschale auf etwa 20 ccm eingeengt, nochmals filtriert, mit heißem Wasser gewaschen, in gewogenem Schälchen auf kleines Volumen eingeengt und im nicht evakuierten Exsiccator der Krystallisation überlassen. Man trocknet bei  $107-108^{\circ}$  bis zur Gewichtskonstanz und berechnet aus der Menge des gewogenen Zinksalzes die Milchsäure.

**Titration.** An die Wägung kann man eine titrimetrische Bestimmung nach der von Embden verbesserten Methode von v. Fürth und Charnass anschließen, welche auf jeden Fall dann auszuführen ist, wenn das Zinksalz unvollkommen krystallisiert und verunreinigt ist, aber andererseits nicht benutzt werden darf, wenn mit der Möglichkeit der Anwesenheit anderer Verbindungen, z. B. Oxybuttersäure zu rechnen ist, welche wie die Milchsäure bei der Oxydation flüchtige bisulfitbindende Substanzen liefern. Läßt sich die Anwesenheit solcher Substanzen mit Sicherheit ausschließen, so kann man auch das Titrationsverfahren direkt auf den Ätherauszug anwenden, nachdem man den Äther nach Wasserzusatz abdestilliert und die Flüssigkeit nach Neutralisation mit Natronlauge stark eingeengt hat (zur Entfernung aus dem Äther stammender Alkoholspuren).

Bestimmung durch Titration.

Prinzip. Oxydation der Milchsäure in saurer Lösung mit Kaliumpermanganat zu Acetaldehyd, Versetzen des den Acetaldehyd enthaltenden Destillates mit gemessener Menge titrierter Kaliumbisulfitlösung und Zurücktitrieren der nicht an Aldehyd gebundenen Bisulfitmenge mit  $\frac{n}{10}$ -Jodlösung.

Erforderliche Lösungen.  $\frac{n}{100}$ - $KMnO_4$ -Lösung;  $\frac{n}{5}$ -Kaliumbisulfitlösung, hergestellt durch Auflösen von 12 g  $KHSO_3$  in 1000 ccm Wasser;  $\frac{n}{10}$ -Jodlösung. Der Titer der Kaliumbisulfitlösung ist bei jeder Bestimmung durch Titration mit  $\frac{n}{10}$ -Jodlösung und Stärke festzustellen.

**Genauigkeit.** Die Werte sind nicht ganz genau, doch betragen die Verluste bei Milchsäuremengen von mindestens 0,08 g wohl nie über 4%.

**Ausführung.** Das Zinksalz wird in heißem Wasser gelöst und in einen Kjeldahlkolben von 800 ccm gebracht, die Lösung, welche nicht mehr als 50 ccm betragen und nicht mehr als 0,2 g Milchsäure enthalten soll, wird mit 300 ccm

\*) Das Präparat ist durch sehr oft wiederholtes Behandeln mit heißem Wasser von stets vorhandenen alkalisch reagierenden Verunreinigungen zu befreien.

\*\*) Das Präparat ist in derselben Weise zu reinigen.

0,5proz. Schwefelsäure und etwas Talkum versetzt. Der Kolben ist mit einem Tropftrichter versehen und mittels eines Stutzerschen Aufsatzrohres mit einem Schlangenkühler verbunden, dessen Rohr in eine Vorlage von 1 l Fassungsraum führt. Sie ist mit Eis gekühlt und enthält etwa 150 ccm Wasser und Bisulfitlösung in einer gemessenen und zur Bindung des bei der Oxydation entstehenden Acetaldehyds mehr als genügenden Menge\*). Wenn die Flüssigkeit lebhaft kocht und keine Luft mehr aus der Vorlage entweicht, gibt man durch den Tropftrichter Permanganatlösung zu, und zwar etwa 90—120 Tropfen in der Minute, wobei ein so lebhaftes Kochen stattfinden soll, daß das Volumen ungefähr das gleiche bleibt. Sobald sich — gegen Ende der Oxydation — die Flüssigkeit bräunlich zu färben beginnt, verlangsamt man das Zutropfen der Permanganatlösung und destilliert etwa 10 Minuten weiter, während die Färbung langsam zunimmt. Die Destillation wird jetzt abgebrochen und das Destillat nach Stärkezusatz mit  $\frac{n}{10}$ -Jodlösung titriert.

Berechnung. Die Differenz der bei der Titerstellung und der bei der Titration verbrauchten Anzahl Kubikzentimeter  $\frac{n}{10}$ -Jodlösung mit 4,5 mg multipliziert ergibt die Menge Milchsäure.

Mikromethode.

Über dieselbe Methode als Mikromethode s. § 708.

**Bestimmung der Milchsäure in Muskeln und Leber nach Yoshikawa<sup>1)</sup>.**

749. Sie beruht auf der polarimetrischen Bestimmung des aus dem Ätherauszug dargestellten Lithiumlactats. Zugefügte Milchsäure wird bis zu 95% wiedererhalten. Voraussetzung für die Verwendbarkeit des Verfahrens ist die Abwesenheit anderer optisch-aktiver Substanzen im Ätherauszug, z. B. der  $\beta$ -Oxybuttersäure. Kleine Mengen dieser Säure sollen nach Mondschein<sup>2)</sup> im normalen Muskel vorkommen.

**Bestimmung der gebundenen Pentose in Organen nach Tollens<sup>3)</sup>.**

750. Prinzip. Das bei der Destillation von Pentosen mit Salzsäure sich bildende Furfurol ( $C_5H_{10}O_5 - 3 H_2O = C_5H_4O_2$ ) gibt mit Phloroglucin sich abscheidendes Furfurolphloroglucid ( $2 C_5H_4O_2 + 2 H_6C_6O_3 = C_{22}H_{18}O_9 + H_2O$ ), welches gewogen wird.

Die Methode gehört in die Reihe der konventionellen, verlangt also genaues Einhalten der Vorschriften.

Das frische Organ wird fein zerkleinert, das ganze oder ein Teil gewogen, mit der gleichen Menge einer Mischung gleicher Teile Alkohol und Äther, der 1—2 ccm Essigsäure zugesetzt sind, verrührt, filtriert, der Rückstand bei 50 bis 55° getrocknet, nach etwa 48 Stunden wieder gewogen und zu einem homogenen Pulver zerrieben.

Eine gewogene Menge (etwa 5 g) dieses Pulvers wird in einem etwa 300 ccm fassenden Kolben, in dessen Stopfen eine Hahnpipette eingefügt ist, mit 100 ccm 12proz. Salzsäure destilliert. Nachdem 30 ccm abdestilliert sind, läßt man aus der Hahnpipette wieder 30 ccm derselben Säure nachfließen und fährt so fort, bis sich im Destillat längere Zeit kein Furfurol (Rotfärbung von Anilinacetatpapier) nachweisen läßt. Die Destillate enthalten weiße flockige Häutchen; sie bleiben meist bei vorsichtigem Abgießen zurück. Gelingt das nicht, so muß filtriert werden. Das vereinigte wasserklare Destillat wird mit mehr als der nötigen Menge Phloroglucin (in 12proz. Salzsäure gelöst), aber unter Vermeidung eines großen Überschusses\*\*) versetzt, mit 12proz. Salzsäure auf 400 ccm

\*) Die aus 0,1 g Milchsäure entstehende Menge Acetaldehyd braucht zur Bindung theoretisch 11—12 ccm  $\frac{n}{5}$ -KHSO<sub>3</sub>-Lösung.

\*\*) Es ist zweckmäßig, durch einen Vorversuch die ungefähr nötige Menge zu ermitteln.

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 87, S. 382. 1913.

<sup>2)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 42, S. 121. 1912.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 36, S. 239. 1902. Zeitschr. f. angew. Chem. 1902, S. 477. — Bendix u. Ebstein: Zeitschr. f. allg. Physiol. Bd. 2, S. 1. 1903. Vgl. auch Grund: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 35, S. 111. 1902.

aufgefüllt, durchgeschüttelt und 12—14 Stunden stehen gelassen. Nach dieser Zeit saugt man den Niederschlag durch einen mit Asbest versehenen Porzellan-Goochtiiegel ab, wäscht mit 150 ccm Wasser nach, indem man dafür sorgt, daß der Niederschlag immer mit Flüssigkeit bedeckt ist, saugt dann möglichst trocken und trocknet 4 Stunden bei 97—98° (Wassertrockenschrank). Dann wird der Tiegel im geschlossenen Wägegläschen gewogen. Zieht man das vorher festgestellte Gewicht des Wägegläschens + Tiegel von dem gefundenen Gewicht ab, so erhält man die Menge des Phloroglucids. Die diesem entsprechende Menge Pentose erfährt man aus der von Kröber (Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 36, Anhang) aufgestellten Tabelle.

**Bestimmung des Glykogens\*) in Organen nach Pflüger<sup>1)</sup>.**

751. Prinzip. Das zerkleinerte Organ wird mit Kalilauge gekocht, die Lösung mit Alkohol gefällt, das abfiltrierte Glykogen entweder direkt polarimetrisch oder nach seiner Hydrolyse als Traubenzucker bestimmt.

In einer sehr großen Anzahl von Bestimmungen wurde von Pflüger völlige Übereinstimmung bei beiden Bestimmungsformen gefunden, nur in einem Ausnahmefall war der polarimetrische Wert höher.

**Isolierung des Glykogens.** Unmittelbar nachdem das Tier getötet, nimmt man das Organ heraus, zerkleinert es mit möglichster Schnelligkeit in der Hackmaschine, wägt von dem Brei auf einer Wage, die 0,1 g anzeigt, 100 g\*\*) ab, bringt sie in einen Kolben, welcher bereits 100 ccm 60proz. Kalilauge (Kaliumhydrat 1<sup>a</sup> Merck) enthält und schon längere Zeit im kochenden Wasserbad bei 100° erhitzt worden ist. Wenn der Inhalt des Kolbens die Temperatur des Wasserbades erreicht hat, verschließt man ihn mit einem Gummistopfen und läßt ihn 2 Stunden in dem kochenden Wasser, währenddessen man ihn 2 mal (nach 10 und nach 20 Minuten) herausnimmt und stark schüttelt. Nach 2 Stunden wird er unter der Wasserleitung abgekühlt, in ein Becherglas entleert und mit 200 ccm Wasser ausgespült. Zu der also jetzt 400 ccm betragenden Flüssigkeit gibt man 800 ccm Alkohol, rührt gut um und läßt über Nacht bedeckt stehen. Währenddessen setzt sich das Glykogen als flockiger Niederschlag\*\*\*) ab. Man gießt nun die überstehende Flüssigkeit in ein anderes geräumiges Becherglas, von da aus auf ein gutes Faltenfilter, welches in einem großen, mit Hahn (oder Gummischlauch mit Quetschhahn) versehenen Trichter liegt, und wäscht zuletzt mit 66proz. Alkohol aus, während der Niederschlag, auf ein schwedisches Filter (Durchmesser 15 cm) gebracht, mit 66proz. Alkohol so lange, bis das Filtrat nahezu farblos abläuft, dann mit absolutem Alkohol, Äther und nochmals mit absolutem Alkohol gewaschen wird. Man nimmt jetzt das feuchte schwedische Filter aus dem Trichter, entfaltet es über einem Becherglas von 300—500 ccm Inhalt, bringt mit Hilfe eines Spatels das Glykogen möglichst vollständig in das Becherglas, setzt das Filter wieder in den Trichter und befestigt diesen unter dem Trichter mit dem Faltenfilter (siehe oben), so daß also die beiden Filter übereinander sich befinden. Auf das Faltenfilter gegossenes kochendes Wasser läuft auf das untere, füllt es, löst die auf ihm befindlichen Glykogenspuren (was man

\*) Bei niederen Tieren hat sich diese Methode vielfach als nicht ohne weiteres brauchbar erwiesen; s. darüber Starkenstein<sup>2)</sup>, Starkenstein u. Henze<sup>3)</sup>.

\*\*) Muß man weniger nehmen, so sind die späteren Zahlenangaben entsprechend zu verkleinern.

\*\*\*) Zuweilen entsteht eine milchige Trübung, die sich allmählich als durchsichtiger Firnis oder feiner Staub abscheidet. In solchen Fällen muß vor der Filtration die völlige Klärung der Flüssigkeit abgewartet werden.

<sup>1)</sup> Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 96, S. 94. 1903 oder Das Glykogen, S. 104, 2. Aufl. Bonn 1905. — Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 129, S. 362. 1909.

<sup>2)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 27, S. 53. 1910.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 82, S. 417. 1912.

mit Hilfe eines kleinen Pinsels befördert) und wird in dem Becherglas, in dem sich die Hauptmenge des Glykogens befindet, aufgefangen. Durch längeres Rühren bringt man das Glykogen in Lösung.

Abkürzung des  
Verfahrens durch  
Zentrifugieren.

Die in vielen Fällen, besonders z. B. bei der Verarbeitung von Leber, viel Zeit erfordernden Operationen der Filtration und der späteren Lösung des Glykogens lassen sich nach Bang<sup>1)</sup> ganz wesentlich abkürzen, wenn man die Abtrennung und das Waschen des Glykogens in einem Zentrifugierglas (durch Zentrifugieren) bewirkt und in demselben Glas dann auch die Spaltung vornimmt. S. darüber bei Bang.

Polarimetrische  
Methode.

**Bestimmung durch Polarisation.** Man filtriert durch Glaswolle in einen Meßkolben von 100—1000 ccm (je nach der Glykogenmenge). Meist ist ein Kolben von 200 ccm geeignet. Die trübe, schmutzige Lösung wird nun in dem noch nicht ganz aufgefüllten Kolben abgekühlt und tropfenweise und langsam mit Salzsäure (spez. Gew. 1,19) versetzt, bis sich in der klaren Flüssigkeit deutliche Flöckchen ausscheiden. Gewöhnlich braucht man 0,5 bis 1—2 ccm. Von dem richtigen Zusatz hängt die Klarheit ab. Einige Kubikzentimeter konzentrierter Kochsalzlösung befördern die Abscheidung der Flocken. Glaubt man die richtige Fällung erzielt zu haben, so füllt man bis zur Marke, gießt in ein Becherglas, wartet einige Zeit, bis die meist stark gefärbten Flocken sich gesenkt haben, und filtriert durch ein schwedisches Filter oder, wenn dieses kein ganz klares Filtrat liefert, durch Blauband Nr. 589 (Schleicher und Schüll). Diese Lösung, welche bei richtigem Säurezusatz vollkommen farblos ist, wird polarisiert. Bei etwaiger Färbung verdünnt man vorher. Unter Berücksichtigung der spezifischen Drehung ( $[\alpha]^D = +196,57^\circ$ ) wird der Glykogengehalt berechnet.

Zur Kontrolle kann man 90 ccm in einem 150-ccm-Meßkolben mit 5 ccm Salzsäure (spez. Gew. 1,19) 3 Stunden erhitzen, nach Abkühlen und Neutralisieren mit 60 proz. Kalilauge bis zur Marke auffüllen und die filtrierte Lösung, welche den aus dem Glykogen entstandenen Traubenzucker enthält, titrieren.

**Bestimmung als Zucker.** Die Lösung wird durch tropfenweisen Zusatz von Salzsäure (spez. Gew. 1,19) aus einer Bürette unter Kontrolle eines kleinen hineingeworfenen Stückes Lackmuspapier genau neutralisiert und in einen 500-ccm-Meßkolben übergeführt. Nach Waschen mit Wasser und Zusatz von 25 ccm Salzsäure (spez. Gew. 1,19), aus der Bürette abgemessen, füllt man nahezu bis zur Marke auf, bringt den Kolben (welcher annähernd 2,2% HCl enthält) in ein siedendes Wasserbad, verschließt ihn, wenn die Flüssigkeit sich nicht mehr ausdehnt, mit einem Gummistopfen, erhitzt 3 Stunden, läßt abkühlen, füllt bis zur Marke auf, mischt und filtriert durch trockenes schwedisches Filter. Das Glykogen ist quantitativ in Zucker übergeführt.

Prinzip. Das beim Kochen mit alkalischer Kupferoxydlösung gebildete Cuprooxyd wird durch Asbest filtriert und entweder gravimetrisch bestimmt oder titrimetrisch nach Volhard, indem man es durch Salpetersäure löst, bei Gegenwart von schwefliger Säure durch überschüssig zugesetzte  $\frac{n}{10}$ -Rhodanammونیumlösung als Kupferrhodanür fällt und im Filtrat den Überschuß des Rhodanammöniums mit  $\frac{n}{10}$ -Silberlösung ermittelt.

Die gravimetrische Methode a) gibt nahezu richtige Werte. Da aber unter Umständen die Möglichkeit, daß das gewogene Cuprooxyd kleine Verunreinigungen enthält, nicht ganz auszuschließen ist, so empfiehlt es sich, um völlig sicher zu gehen, eine Kontrolle durch titrimetrische Bestimmung b) des in dem gewogenen Cuprooxyd enthaltenen Kupfers auszuführen. Man kann diese Bestimmung natürlich auch allein ausführen. Sie erfordert etwas mehr Zeit und Lösungen, stellt aber weniger Anforderungen an das Asbeströhrchen.

Gravimetrische  
Methode.

a) Gravimetrische Methode.

Erforderliche Lösungen und Apparate. 1. Eine Lösung, welche in 500 ccm 34,639 g Kupfervitriol ( $\text{CuSO}_4 + 5 \text{H}_2\text{O}$ ) enthält.

Das Kupfervitriol ist 1 mal aus Salpetersäure, 3 mal aus Wasser umzukristallisieren. Läßt man das durch gestörte Krystallisation erhaltene feine Mehl des Kupfervitriols, nachdem es zwischen

<sup>1)</sup> Hammarsten-Festschrift Nr. II. Upsala u. Wiesbaden 1906.



Filtrierpapier ausgepreßt wurde, möglichst ausgebreitet auf Filtrierpapier 24 Stunden liegen, so hat es den richtigen Krystallwassergehalt.

2. Eine Lösung, welche in 500 ccm 173 g Seignettesalz und 125 g Ätzkali enthält.

Man erhitzt in einem Becherglas 150 ccm Wasser zum Sieden, nimmt die Flamme fort, bringt 173 g Seignettesalz hinein und rührt bis zur Lösung. Nach Abkühlung gießt man die Flüssigkeit in einen 500 ccm-Meßkolben, fügt 208 ccm 60proz. Kalilauge (hergestellt aus bestem Ätzkali) hinzu, spült mit Wasser nach, füllt nach völliger Abkühlung und guter Durchmischung bis zur Marke auf und filtriert durch dichte Glaswolle.

Beide Lösungen sind haltbar.

3. Kalilauge, welche 68% reinstes Ätzkali enthält.

4. Asbestfilterröhrchen. Ein Glasrohr von 10 cm Länge und 1,7 cm lichter Weite läuft nach unten in eine Verjüngung und darauf folgende birnförmige Erweiterung von etwa 1 cm äußerem Durchmesser aus. An diese Erweiterung schließt sich abermals nach einer Verjüngung das 6 cm lange Abflußrohr. Die kleine birnförmige Erweiterung enthält allein den Asbest, welcher also Größe und Gestalt einer großen Erbse hat. Der zu benutzende Asbest von langfaseriger, weicher Beschaffenheit wird nach mehrtägigem Verweilen in roter, rauchender Salpetersäure so oft mit destilliertem Wasser gewaschen, bis das Wasser beim Umrühren keine Spur einer Trübung mehr zeigt, und dann getrocknet. Man zerteilt nun weiche langfaserige Stränge auf einer Glasplatte mit Präpariernadeln in einzelne Fäden oder feine Faserbündel, vereinigt sie zu einem Haufen, schiebt sie mit einer Pinzette in das Röhrchen und mit einem Draht durch die Verjüngung in die Birne. Der Asbestfilz darf weder zu locker noch zu dicht sein. Um das Röhrchen auf seine Brauchbarkeit zu prüfen, saugt man heißes mit dem gleichen Volumen kalten Wassers verdünntes Gemisch gleicher Teile der Lösung 1 und 2 durch, wäscht mit 100 ccm Wasser aus, gießt Salpetersäure von 1,4 spez. Gewicht auf und läßt langsam durchfiltrieren, wäscht dann mit Wasser, absolutem Alkohol und absolutem Äther aus, trocknet bei 100° und wägt. Dieser Versuch wird wiederholt, bis der Gewichtsverlust bei zwei aufeinanderfolgenden Wägungen 0,2—0,3 mg nicht übersteigt. Ein solches Röhrchen ist für viele Versuche zu benutzen.

Eine Kontrolle der Dichtigkeit besteht darin, daß man stets zwei Parallelglykogenbestimmungen macht.

Ausführung\*). In ein etwa 300 ccm fassendes Becherglas bringt man je 30 ccm der Lösung 1 und 2, 4 ccm der Kalilauge (3) (zum Neutralisieren der in der Zuckerlösung enthaltenen Salzsäure) und 81 ccm der Zuckerlösung\*\*) und mischt durch rotierende Bewegung (das Gesamtvolumen muß in jedem Fall 145 ccm betragen). Nachdem das Becherglas mit einem Uhrglas (Konkavität nach unten) bedeckt und in einen horizontalen, an einem Stativ angefügten Ring gehängt ist, taucht man es in einem gegebenen Moment in ein stark siedendes Wasserbad, so daß es etwas über die untere Hälfte eintaucht, hebt es nach genau 30 Minuten wieder heraus, fügt sofort 130 ccm kaltes Wasser hinzu und filtriert mit der Saugpumpe durch das Asbeströhrchen (dessen Abflußrohr in den Gummistopfen einer Saugflasche eingefügt ist) mit der Vorsicht, daß sich dauernd Flüssigkeit im Röhrchen befindet. Man gießt zunächst die überstehende blaue Flüssigkeit hinein, läßt dann an einem die Glaswand berührenden Glasstab 100 ccm Wasser in das Becherglas fließen (wodurch der Niederschlag nicht aufgerührt wird), gießt dieses Wasser ebenfalls auf das Filter und bringt nun erst mit Hilfe von Spritzflasche\*\*\*) und Pinsel das Cuprooxyd quantitativ in das Röhrchen. Sobald der Niederschlag völlig aufgebracht und das Wasser fast ganz abgelaufen ist, wäscht man mehrmals mit absolutem Alkohol und mehrmals mit absolutem Äther nach, trocknet dann das Röhrchen im Trockenschrank bei 100—120° und wägt.

\*) Es sind stets zwei Parallelversuche auszuführen.

\*\*) Diese 81 ccm dürfen nicht weniger als 12 und nicht mehr als 250 mg Traubenzucker enthalten.

\*\*\*) Pflüger empfiehlt für diesen Zweck eine Spritzflasche, an der die äußeren Enden beider Glasröhren mit langen dünnen Gummischläuchen versehen sind. Der Schlauch, durch den das Wasser austritt, trägt eine Glasspitze, die man in die Hand nimmt, das Ende des anderen Schlauches nimmt man in den Mund, während die Flasche auf dem Tisch steht. Mit der einen Hand hält man das Becherglas, mit der anderen richtet man den Wasserstrahl.

**Berechnung.** Die der gefundenen Menge Cuprooxyd entsprechende Menge Traubenzucker erfährt man aus der Tabelle (Anhang). Durch Multiplikation des erhaltenen Zuckerwertes mit 0,927 erhält man die entsprechende Glykogenmenge<sup>1</sup>).

Statt das Kupfer als Cuprooxyd zu wägen, kann man es auch vor der Wägung in Cuprioxyd überführen, indem man das Asbestfiltrerröhrchen mit der Saugpumpe verbindet und erhitzt, während ein Luftstrom hindurchgeht. Der erhaltene Wert ist durch Multiplikation mit 0,799 in den entsprechenden Kupferwert überzuführen und die diesem entsprechende Zuckermenge in der Tabelle (Anhang) abzulesen.

Titrimetrische  
Methode.

#### b) Titrimetrische Methode.

**Erforderliche Lösungen und Apparate.** 1. Die unter a) aufgeführten Lösungen 1 und 2.

2. Asbestfiltrerröhrchen. Ein etwa 10 cm langes und 1,5 cm weites Glasrohr, das sich in ein engeres Abflußrohr verjüngt und an dessen anderem Ende ein Trichter von etwa 100 ccm Gehalt angeschmolzen ist. In dem unteren Teil des Glasrohres befindet sich ein lockerer, der Wandung gut anliegender Pfropf von weichem, langfaserigem Asbest, der keine Spur Cuprooxyd durchlassen darf.

3.  $\frac{n}{10}$ -Silberlösung.

4.  $\frac{n}{10}$ -Rhodanammiumlösung.

5. Salpetersäure (1,2 spez. Gew.), der vor dem Gebrauch einige Harnstoffkrystalle zuzufügen sind.

6. Kaltgesättigte wässerige Lösung von schwefliger Säure.

7. Kaltgesättigte wässerige Lösung von Eisenammoniakalaun.

**Ausführung.** Nachdem zunächst in der unter a) angegebenen Weise verfahren worden ist, setzt man das sämtliche Cuprooxyd enthaltende Asbeströhrchen auf eine Saugflasche, löst das Cuprooxyd durch vorsichtiges Übergießen mit Salpetersäure (man bedecke den Trichter mit einem Uhrglase, um Herausspritzen zu vermeiden!) und wäscht nun unter Anwendung der Saugpumpe mit Wasser völlig aus. Lösung und Spülwasser werden mit etwas mehr als der berechneten Menge Schwefelsäure (zur Überführung des Kupfernitrat in Kupfersulfat) versetzt und bis etwa zur Trockne in einer Glasschale verdampft. Der Rückstand wird in Wasser gelöst und die Lösung in einen 300-ccm-Maßkolben übergeführt. Nun gibt man einige Tropfen konzentrierte Soda-lösung hinzu, bis eben ein bleibender Niederschlag entsteht, fügt 50 ccm der schwefligen Säure hinzu, wodurch der Niederschlag wieder gelöst wird, erhitzt, kocht 1 Minute und fügt zu der heißen Flüssigkeit aus einer Bürette so viel der  $\frac{n}{10}$ -Rhodanammiumlösung zu, bis die blaugrüne Kupferfarbe vollständig verschwunden ist. Es bildet sich ein feinflockiger Niederschlag von Cuprorhonanid, der in einer wasserhellen Flüssigkeit schwimmt. Nach dem Erkalten wird der Kolben bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt und nach gutem Umschütteln durch ein trockenes Filter filtriert. Zu 100 ccm des klaren Filtrates setzt man in einem Becherglase 100 ccm Wasser, 50 ccm Salpetersäure und 10 ccm der Eisenammoniakalaunlösung, fügt  $\frac{n}{10}$ -Silberlösung aus einer Bürette bis zum völligen Verschwinden der roten Farbe hinzu und titriert nun mit  $\frac{n}{10}$ -Rhodanlösung zurück, bis ein schwach gelbrötlicher Farbenton erreicht ist. Ist nach 24stündigem Stehen des bedeckten Becherglases im Dunkeln die rötliche Farbe wieder verschwunden, so sind noch 1 oder auch 2 Tropfen Rhodanlösung zuzufügen.

**Berechnung.** Die Differenz zwischen der Anzahl der verbrauchten Kubikzentimeter Rhodanammium- und Silberlösung multipliziert mit 6,36 gibt die Menge des reduzierten Kupfers in Milligrammen an. Die den gefundenen Milligrammen Kupfer entsprechende Menge Traubenzucker liest man in der Tabelle (Anh.) ab. Durch Multiplikation mit 0,927 erfährt man die zugehörige Menge Glykogen.

<sup>1</sup>) Nerking: Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 85, S. 320. 1901.

**Bestimmung der ätherlöslichen Substanzen in den Organen.**

752. Man wägt einige Gramme des gut gemischten Organbreies ab, übergießt sie in einem Becherglase mit der etwa 5fachen Menge absoluten Alkohols, läßt 24 Stunden unter wiederholtem Umrühren bedeckt stehen und verfährt weiter nach § 660. Die Ätherextraktion wird 24 Stunden fortgesetzt.

**Bestimmung der höheren Fettsäuren in den verseiften Organen und tierischen Flüssigkeiten nach Kumagawa und Suto<sup>1)</sup>.**

753. Für die Bestimmung geht man von dem frischen, gut zerkleinerten und gemischten Organ oder von dem Organpulver aus. Zur Herstellung des letzteren wird das fein zerkleinerte Material (nicht über 200 g) in einer Schale mit der gleichen Menge Alkohol auf kochendem Wasserbade unter häufigem Durchmischen mit dem Glasstab zur Trockne gebracht, pulverisiert und durch ein Sieb von 0,25 qmm Maschenweite getrieben. Nach 24stündigem Stehen an der Luft wägt man die ganze Masse und die einzelnen für die Bestimmung dienenden Proben. Bei der Trocknung, die möglichst schnell geschehen soll, findet allerdings ein ganz kleiner Verlust durch Oxydation der Fettsäuren statt (Shimidzu), dafür ist die Homogenität des Materials eine größere als die des Organbreies. Die Genauigkeit ist in beiden Fällen die gleiche; s. dazu Tamura. Für Gewebe, welche sich nur schwer trocknen bzw. pulverisieren lassen, wie Haut, Knochen, ebenso für kleinere Tiere, kann nur die direkte Verseifung in Betracht kommen.

Für die Bestimmung in Blut, Blutplasma, Blutserum, Gehirn muß zunächst ein Alkoholauszug hergestellt und dieser verseift werden (Kumagawa).

Verseifung. Von Organbrei bringt man je nach Fettgehalt 5—20 g <sup>Verseifung.</sup> + 7—8 ccm gesättigter Natronlauge, von Pulver je nach Fettgehalt 2—5 g + 25 ccm 20 proz. Natronlauge in ein Becherglas von 150—200 ccm Inhalt und fügt bei Verwendung von etwa 5 g Brei noch etwa 14 ccm Wasser, bei Verwendung von etwa 10 g Brei noch 10 ccm Wasser, bei Verwendung von 20 g eine entsprechend kleinere Menge Wasser hinzu. Das Becherglas steht auf einem kochenden Wasserbad unter einer Glasglocke, die nach oben zu in eine Röhre mit feiner Öffnung ausläuft. Während des 2stündigen Erhitzens wird einige Male umgerührt. Man gießt die noch warme Lösung in einen gut schließenden Scheidetrichter von etwa 250 ccm Inhalt, spült 2—3 mal mit je 5 ccm warmem Wasser nach, fügt nach dem Erkalten bis auf 40—50° zunächst 20 ccm 20 proz. Salzsäure hinzu und nach Schütteln und Abkühlen noch 10 ccm derselben Salzsäure. Man kühlt wieder ab und gibt 70—100 ccm Äther zu und schüttelt gut durch. Es erfolgt meist sofortige Trennung der Schichten, indem der Niederschlag sich zu einer dünnen Schicht in der Mitte verdichtet. Man läßt nach einigen Minuten die klare wässrige Schicht ab, gießt die bräunliche ätherische in ein Becherglas, spült Trichter und Niederschlag zweimal mit je 5—10 ccm Äther nach und gießt diese Portionen zu der Hauptmenge. Der Niederschlag im Scheidetrichter wird nun mit etwa 5 ccm Normalnatronlauge unter Schütteln gelöst, die Lösung mit 30—50 ccm Äther stark geschüttelt, mit der zuerst abgegossenen, stark sauren, wässrigen Flüssigkeit versetzt und nochmals gut geschüttelt. Den abgeschiedenen Äther vereinigt man mit dem der ersten Ausschüttelung, verdunstet\*), nimmt nochmals mit absolutem Äther auf, filtriert durch Asbest\*\*), verdunstet wieder, trocknet den Rückstand bei 50° einige Stunden und gießt auf den noch warmen Rückstand unter sanftem Umschwenken 20—30 ccm wasserfreien Petroläther (Siedep. 50—60°). Nachdem eine in der

\*) Die Abbildung einer zum Verdunsten empfohlenen Einrichtung findet sich in der Originalarbeit.

\*\*) Die Abbildung des Trichters, in dessen Enge ein aus Asbest und entfetteter Watte bestehendes Filter steckt, findet sich in der Originalarbeit.

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 8, S. 212. 1908. — Kumagawa: Biochem. Arbeitsmethoden, herausgeg. von Abderhalden Bd. 5, S. 477. 1911. — Shimidzu: Biochem. Zeitschr. Bd. 28, S. 237. 1910. — Watanabe: desgl. Bd. 41, S. 71. 1912. — Tamura: desgl. Bd. 41, S. 78. 1912 u. Bd. 51, S. 463. 1913.

Regel auftretende milchige Trübung beim Stehen des bedeckten Glases in  $\frac{1}{2}$  bis 1 Stunde sich zum größten Teil harzartig niedergeschlagen hat, filtriert man durch Asbest in ein gewogenes Becherglas von etwa 100 ccm, verdunstet das farblose Filtrat und trocknet bei  $50^\circ$  bis zur Gewichtskonstanz. Das Abkühlen soll im evakuierten Exsiccator über Chlorcalcium erfolgen.

Entfernung der unverseifbaren Substanzen.

Entfernung der unverseifbaren Substanzen. Um die noch beigemengten unverseifbaren Substanzen zu entfernen, löst man wieder in wasserfreiem Petroläther, bringt die Lösung in einen Scheidetrichter, spült mit Petroläther nach, und zwar mit so viel, daß die Gesamtmenge des Petroläthers 50 bis 70 ccm beträgt und fügt  $\frac{n}{5}$  absolut-alkoholische Kalilauge in einer solchen Menge hinzu, daß sie etwa das 30—40fache Volumen des ursprünglichen Petrolätherextraktes beträgt. Man schüttelt einmal gut durch (wobei wieder eine ganz klare Lösung entsteht), fügt eine der Kalilauge genau gleiche Menge Wasser hinzu und schüttelt wieder einige Male. Indem hierdurch die Konzentration des Alkohols auf etwa 50 Vol.-% sinkt, erfolgt eine sofortige glatte Trennung in zwei Schichten, wobei die unverseifbaren Substanzen in den Petroläther, die Seifen in den wässrigen Alkohol gehen. Die abgetrennte alkoholische Lösung wird nochmals mit 30—50 ccm Petroläther geschüttelt. Die vereinigten Petroläthermengen werden verdunstet, der Rückstand wird nochmals in ein wenig absolutem Alkohol gelöst, mit 0,5—1 ccm  $\frac{n}{10}$  absolut alkoholischer Natronlauge versetzt, wieder auf dem Wasserbade verdunstet, der Rückstand 15—30 Minuten bei  $100^\circ$  getrocknet. Man extrahiert ihn jetzt noch heiß mit Petroläther, filtriert durch Asbest, verdunstet und trocknet bei  $100^\circ$  bis zur Gewichtskonstanz.

Berechnung.

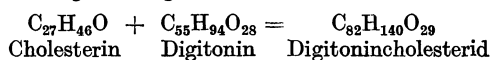
Berechnung. Die Differenz zwischen diesem Gewicht und dem oben erhaltenen ergibt die Menge der Fettsäuren.

Umrechnung in Neutralfett.

Die Fettsäuren stammen zum größten Teil aus dem Fett, zum kleinen Teil aus Cholesterinfett, Phosphatiden, Cerebrosiden. Will man die gefundene Fettsäure als Neutralfett ausdrücken, so multipliziert man mit 1,046.

#### *Bestimmung des Cholesterins und der Cholesterinester in Organen und Serum\*).*

754. Prinzip. Die Isolierung von Cholesterin und Cholesterinestern geschieht nach Fe x<sup>1)</sup>, indem man das Gewebe durch Behandlung mit 2 proz. Natronlauge in Lösung bringt und mit Äther ausschüttelt, die Bestimmung des Cholesterins nach Windaus<sup>2)</sup> als Digitonincholesterid durch Fällen der alkoholischen Lösung mit Digitonin:



Die im Filtrat dieser Fällung befindlichen Cholesterinester werden durch Natriumalkoholat verseift und das abgespaltene Cholesterin ebenfalls als Digitoninverbindung gefällt und gewogen.

Isolierung.

Isolierung von Cholesterin und Cholesterinestern<sup>3)</sup>. Eine abgewogene Menge des fein zerkleinerten Gewebes oder Blutserum (10—20 g) wird mit etwa der doppelten Gewichtsmenge 2proz. Natronlauge in einem Kolben bei Zimmertemperatur stehen gelassen, bis die Masse aufgequollen ist und gallertige Beschaffenheit angenommen hat (3—4 Stunden), dann auf kochendem Wasserbad erhitzt, bis Lösung erfolgt ist (etwa  $\frac{1}{2}$  Stunde). Die braunrote Flüssigkeit wird unter Nachwaschen mit kleinen Mengen Wasser in

\*) Auf etwa vorhandenes Oxycholesterin, welches nach Lifschütz durch Digitonin teilweise gefällt wird, ist hierbei keine Rücksicht genommen. Über Versuche, die Cholesterinstoffe nebeneinander zu bestimmen, s. Lifschütz<sup>4)</sup>.

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 104, S. 82. 1920.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 65, S. 110. 1910. Die von Thaysen (Biochem. Zeitschr. Bd. 62, S. 89. 1914) und von Fe x angegebenen Verbesserungen sind berücksichtigt.

<sup>3)</sup> Fe x, Biochem. Zeitschr. Bd. 104, S. 134. 1920.

<sup>4)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 48, S. 373. 1913; Bd. 54, S. 212. 1913; Bd. 62, S. 219. 1914.

einen Scheidetrichter überführt und mit etwa 150 ccm Äther versetzt, wobei man den Äther noch zum Ausspülen des Kolbens benützt. Man schüttelt mehrmals kräftig in halbstündigem Zwischenraum, läßt dann mindestens 12 Stunden stehen und läßt die wässrige Flüssigkeit in einen anderen Scheidetrichter laufen. Der Äther im ersten Scheidetrichter wird einige Male mit kleinen Mengen Wasser gewaschen, dieses Wasser in den zweiten Scheidetrichter gebracht, worauf man in den letzteren etwa 150 ccm Äther bringt und eine zweite Ätherextraktion auf dieselbe Weise wie die erste vornimmt. Frühestens nach 12 Stunden wird die alkalische Lösung abgelassen und der Äther in den ersten Scheidetrichter gebracht. Man schüttelt den Äther zunächst wiederholt mit je etwa 20 ccm Wasser, dem einige Tropfen Natronlauge zugesetzt sind, bis dieses nach dem Ansäuern nicht mehr opaleszierend wird, also keine Seifen mehr enthält und darauf mit destilliertem Wasser, bis Phenolphthalein keine Rotfärbung mehr hervorruft. Der Äther wird nun portionsweise in einem kleinen weithalsigen Kolben verdunstet und der Rückstand getrocknet. Die Benutzung von Korken und Kautschuk ist zu vermeiden, da sie an den Äther durch Digitonin fällbare Substanz abgeben.

Bestimmung des Cholesterins. Der Rückstand, welcher so gut wie ausschließlich aus Cholesterin und Cholesterinestern besteht, wird in der etwa 50fachen Menge heißen Alkohols gelöst und die Lösung mit heißer 1 proz. Lösung von Digitonin in 90 proz. Alkohol im Überschuß versetzt. Der Überschuß muß mindestens 2<sup>0</sup>/<sub>100</sub> betragen\*). Man läßt einige (mindestens 2 Stunden) stehen, filtriert durch ein bei 100° getrocknetes und gewogenes Filter (oder Goochtiiegel), wäscht mit Alkohol und Äther\*\*), trocknet bei 100° und wägt. Das Gemisch mit 0,2431 multipliziert ergibt die Cholesterinmenge.

Bestimmung des  
Cholesterins.

Bestimmung der Cholesterinester. Um die Cholesterinester zu isolieren, dampft man das Filtrat + Waschalkohol und Äther auf dem Wasserbad unter Durchleiten eines Luftstromes ein, trocknet den Rückstand, übergießt ihn mit einer reichlichen Menge Äther, läßt 12 Stunden stehen und filtriert den Äther in einen anderen Kolben. Nachdem der in dem ersten Kolben hinterbliebene Bodensatz auf dem Wasserbad getrocknet ist, wird eine neue gleich große Äthermenge zugefügt, die wieder 12 Stunden stehen bleibt und dann zu der ersten filtriert wird. Diese beiden Extraktionen genügen, um die Gesamtmenge der Cholesterinester in ätherische Lösung überzuführen. Der nach Abdestillieren des Äthers hinterbliebene Rückstand wird mit 5 proz. Natriumalkoholat mindestens 8 Stunden auf dem Wasserbad am Rückflußkühler verseift, die noch heiße Lösung in einen Scheidetrichter gegossen und mit viel Äther, der vorher zur Ausspülung des Verseifungskolbens benutzt wurde, versetzt. Man schüttelt, fügt etwa halb so viel Wasser, als die Menge Alkohol betrug, hinzu, läßt bis zur Klärung der Flüssigkeiten stehen und den wässrig-alkoholischen Teil in einen anderen Scheidetrichter laufen. Nachdem der im Kolben zurückgebliebene Äther noch einige Male mit wenig Wasser gewaschen worden und dieses in den zweiten Scheidetrichter gebracht, schüttelt man den Inhalt des zweiten Scheidetrichters nochmals mit Äther aus. Die vereinigten Ätherlösungen werden mit kleinen Mengen ganz verdünnter Natronlauge und darauf mit kleiner Menge

Bestimmung der  
Cholesterinester

\*) Ist zu wenig Digitonin zugesetzt, was erst nach der Wägung festgestellt werden kann, ist das Filtrat etwas einzuengen und mit mehr Digitoninlösung zu versetzen.

\*\*) Das Waschen mit Äther muß gründlich vorgenommen werden, besonders dann, wenn Cholesterinester in reichlicher Menge vorhanden sind. Da sie in kaltem Alkohol schwer löslich sind, können sie sich abscheiden und dem Cholesterid zugesellen. Sie müssen durch Äther entfernt werden. Es ist zweckmäßig, das Trichterrohr mit Gummischlauch und Quetschhahn zu versehen und den Äther einige Zeit auf den Filtrerrückstand einwirken zu lassen.

Wasser ausgeschüttelt und dann verdunstet. Der Rückstand enthält das aus den Estern stammende Cholesterin, das als Digitonincholesterid in der oben beschriebenen Weise bestimmt wird.

**Colorimetrische Bestimmung des Cholesterins + Cholesterinester in Muskeln.**

755. Während im allgemeinen die colorimetrischen Bestimmungen des Cholesterins bis jetzt kein befriedigendes Ergebnis gehabt haben (s. Fex<sup>1</sup>), Gardner und Williams<sup>2</sup>), Gardner und Fox<sup>3</sup>) empfehlen Embden und Lawaczek<sup>4</sup>) für die Bestimmung in den Muskeln folgendes Verfahren.

Der mit der Schere zerkleinerte und gut gemischte Muskelbrei wird durch 2stündiges Erhitzen mit der 10fachen Menge 25proz. Kalilauge in siedendem Wasserbad am Rückflußkühler gelöst und 6mal mit nicht zu geringer Äthermenge (etwa der doppelten Menge der Lösung) ausgezogen. Nachdem die einzelnen Ätherauszüge nacheinander mit demselben Wasser kurz und (um Emulsionsbildung zu vermeiden) nicht zu energisch geschüttelt sind, trocknet man sie mit Natriumsulfat, destilliert den Äther ab, trocknet den Rückstand bei 80°, nimmt ihn mit Chloroform auf, bringt die Chloroformlösung in einen Meßkolben auf ein bestimmtes Volumen (25—100 ccm) und benutzt einen aliquoten Teil zur Colorimetrie. Zum Vergleich dient eine Cholesterinchloroformlösung, welche in 100 ccm 0,01 g im Exsiccator über Chlorcalcium getrocknetes Cholesterin enthält. Man versetzt unmittelbar hintereinander je 5 ccm dieser Standardlösung und der zu prüfenden mit 2 ccm Essigsäureanhydrid und 0,1 ccm konzentrierter Schwefelsäure, schüttelt gut durch, hält 15 Minuten in einem in verdunkeltem Raum befindlichen Wasserbad bei 35°, kühlt unter der Wasserleitung stark ab, bringt jene in den Keil, diese in den Trog des Autenriethschen Colorimeters und macht sofort die Bestimmung.

Ein Vergleich mit der Digitoninmethode ergab (für die weißen Muskeln von Kaninchen) mehrfach etwas höhere Werte wie diese.

**Untersuchung des Gehirns, Rückenmarks und der Nerven.**

**Bestandteile.**

756. Die Zusammensetzung der Gehirn- und Nervensubstanz weicht sehr von der der übrigen Organe ab. Es finden sich in ihr reichliche Mengen von Cholesterin (kein Cholesterinester), Oxycholesterin<sup>5</sup>), Oxycholesterinester<sup>6</sup>), Phosphatide (Lecithin, Kephalin, Sphingomyelin), Cerebroside (Cerebron, Kerasin) und andere noch wenig bekannte, z. T. schwefelhaltige Substanzen, ferner Eiweißstoffe, Nucleoproteid, Neurokeratin, in Wasser lösliche Extraktivstoffe (Milchsäure, Harnstoff, Kreatin, Harnsäure, Nucleinbasen, Pyrimidinbasen<sup>7</sup>), Cholin\*), Neuridin\*\*), Amino- und Diaminosäuren<sup>7</sup>), Inosit (Scyllit

\*) Von Kauffmann in ganz frischem Gehirn nicht gefunden<sup>8</sup>).

\*\*) Von Gulewitsch in ganz frischem Gehirn nicht gefunden<sup>9</sup>).

<sup>1</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 104, S. 82. 1920.

<sup>2</sup>) Biochem. Journ. Bd. 15, S. 363. 1921.

<sup>3</sup>) Biochem. Journ. Bd. 15, S. 376. 1921.

<sup>4</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 125, S. 204. 1923.

<sup>5</sup>) Rosenheim: Biochem. Journ. Bd. 8, S. 74. 1914.

<sup>6</sup>) Lifschütz: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 63, S. 222. 1909. — Rosenheim: a. a. O.

<sup>7</sup>) Shimizu: Biochem. Zeitschr. Bd. 117, S. 252. 1921.

<sup>8</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 74, S. 175. 1911.

<sup>9</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 27, S. 50. 1899.

bei Rochen- und Haifischen), Fermente (Proteasen<sup>4 u. 5</sup>), Amylase<sup>3-6</sup>, Invertase<sup>5</sup>), Lipasen<sup>3-5</sup>), Phosphatidasen<sup>4 u. 5</sup>), Cerebrosidasen<sup>5</sup>), Nucleasen<sup>2 u. 5</sup>), Katalasen, Peroxydasen<sup>1, 3, 5</sup>), autolytische Fermente<sup>6-10</sup>), anorganische Salze (Kalium, Natrium, Calcium, Magnesium, gebunden an Salzsäure, Phosphorsäure, Kohlensäure und sehr wenig Schwefelsäure).

***Isolierung und Nachweis der anorganischen Salze in Gehirn und Nerven.***

757. Direkte Verkohlung und Veraschung führen zu Aschen, in denen wohl Kalium, Natrium, Calcium und Magnesium, aber keine Säuren bestimmt werden können, weil die sehr reichlich in organischen Bindungen enthaltene Phosphorsäure die übrigen Säuren austreibt und sogar pyrophosphorsaures Salz liefert. Bis zu einem gewissen Grade lassen sich die Schwierigkeiten in folgender Weise vermeiden. Man extrahiert den Gehirnbrei mit 80 proz. Alkohol, filtriert (alkoholischer Auszug), erschöpft ihn darauf nacheinander mit Äther, warmem 85 proz. Alkohol und warmem Benzol oder Chloroform enthaltenden Alkohol und kocht ihn schließlich mit Wasser (wässriger Auszug) aus. In dem so erhaltenen alkoholischen (1) und wässrigem Auszug (2) finden sich die wasserlöslichen, in dem in allen angewandten Lösungsmitteln unlöslichen Rückstand (3) die wasserunlöslichen Salze.

Der alkoholische Auszug (1) wird vorsichtig im Vakuum verdunstet, der Rückstand zur Entfernung von Phosphatiden mit Äther ausgezogen und darauf mit Wasser aufgenommen. Man filtriert, vereinigt das Filtrat mit dem wässrigen Auszug (2), dampft ein, verascht und untersucht die wässrige Aschelösung nach § 531. Läßt sich die Flüssigkeit nicht filtrieren, so muß sie nach Vereinigung mit dem wässrigen Auszug direkt eingedampft und verascht werden. Der Rückstand (3), welcher außer Calcium und Magnesiumphosphat auch koagulierte Eiweißstoffe, Neurokeratin, Nucleoproteid u. a. enthält, wird zur Entfernung des Proteids mit 0,5 proz. Ammoniak extrahiert und in einer Platinschale verbrannt. In der salzsauren Lösung der Asche lassen sich Calcium, Magnesium und Phosphorsäure nach § 532 nachweisen.

***Isolierung und Nachweis der Proteine in Gehirn und Nerven.***

758. Man verrührt den Gehirnbrei mit viel Wasser zu einer feinen Emulsion, fügt Natriumsulfatlösung bis zur Abscheidung feiner Flocken hinzu und filtriert. Ist die Flüssigkeit trübe, so kann man versuchen, sie durch Schütteln mit Äther im Scheidetrichter und Filtrieren nach Trennung beider Schichten zu klären.

Eiweißstoffe erkennt man durch Koagulation beim Kochen; man kann sie durch ihre verschiedenen Gerinnungstemperaturen und ihr verschiedenes Verhalten beim Aussalzen voneinander trennen (vgl. § 720). Halliburton<sup>11</sup>) unterscheidet zwei, beide Globuline.

<sup>1</sup>) Battelli u. Stern: Biochem. Zeitschr. Bd. 13, S. 44. 1908.

<sup>2</sup>) Iuschtschenko: Biochem. Zeitschr. Bd. 31, S. 377. 1911.

<sup>3</sup>) Wroblewski: Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 152, S. 1334; ref. Chem. Zentralbl. 1911, II, S. 96.

<sup>4</sup>) English u. Mac Arthur: Journ. of the Americ. chem. soc. Bd. 37, S. 653; ref. Chem. Zentralbl. 1915, II, S. 33.

<sup>5</sup>) Slowtzoff: Ber. d. ges. Physiol. Bd. 16, S. 374. 1923.

<sup>6</sup>) Petrunkin: Ber. d. ges. Physiol. Bd. 17, S. 531. 1923.

<sup>7</sup>) Simon: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 72, S. 463. 1911. Hier ältere Literatur.

<sup>8</sup>) Traetta-Mosca: Chem. Zentralbl. 1913, II, S. 1239.

<sup>9</sup>) Gibson, Umbreit u. Bradley: Journ. of biol. chem. Bd. 47, S. 333. 1921.

<sup>10</sup>) Georgiewskaja: Ber. d. ges. Physiol. Bd. 16, S. 365. 1923.

<sup>11</sup>) Journ. of physiol. Bd. 15, S. 90. 1894. Ergebn. d. Physiol. Bd. 4, S. 30. 1905.

Nucleoproteid. Nucleoproteid<sup>1 u. 2)</sup> fällt nach Zusatz von Essigsäure und wird nach § 634 als solches identifiziert. Eine weitere Menge Nucleoproteid läßt sich durch längere Extraktion des Filtrerrückstandes mit 0,5proz. Ammoniakflüssigkeit und Fällen des Filtrats mit Essigsäure erhalten.

Mc Gregor<sup>3)</sup> isolierte wasserlösliche Proteine, indem er die ganz vorsichtig und bei niedriger Temperatur getrocknete und dann mit Benzol, welches 5proz. absoluten Alkohol enthielt, extrahierte Gehirnmasse mit Wasser (oder Neutralsalzlösung) und dann mit verdünntem Alkali auszog. In dem ersten Auszug entsteht beim Erhitzen und durch Ammonsulfat Fällung, in dem zweiten fällt auf Säurezusatz ein Eiweißkörper mit 0,6% P.

Neurokeratin. Neurokeratin. Wegen seiner Darstellung s. § 375.

#### *Trennung einzelner Gruppen organischer Gehirnstoffe von einander.*

759. Die systematische Aufarbeitung des Gehirns und eine gewisse Fraktionierung seiner Bestandteile kann in folgender Weise geschehen.

Die von den Häuten befreiten, mit Wasser abgespülten, abgetrockneten und durch die Fleischhackmaschine zerkleinerten Gehirne werden in einer Flasche mit Aceton (gleiche bis 1½fache Menge) zusammengebracht und unter häufigem Umschütteln stehen gelassen. Nachdem so eine Anzahl Gehirne, etwa 5 menschliche, unter Aceton vereinigt sind, bringt man die Masse in einen geeigneten Extraktionsapparat, läßt abtropfen und saugt zuletzt ab (1. Acetonauszug).

Als Extraktionsapparat eignet sich ein zylindrisches Gefäß aus Weißblech, das oben durch einen Deckel abschließbar ist, nach unten zu sich verjüngt und in ein Ansatzrohr ausläuft. Der zylindrische Teil ist etwa 35 cm lang und 15 cm breit, der sich verjüngende etwa 10 cm, das Rohr etwa 7 cm lang. Dort wo die Verjüngung beginnt, ist eine Siebplatte angebracht, auf die ein Papierfilter gelegt wird. Das Gefäß, welches 5 Menschengehirne gut faßt, ist von einem Mantel umgeben, der nach Art der Heißwassertrichter unten einen seitlichen Sporn trägt. In dem Mantel befindet sich Wasser, das durch Unterstellen eines Brenners unter den Sporn erwärmt werden kann.

Nachdem möglichst vollständig abgesaugt ist, verschließt man das Ablaufrohr, gießt neues Aceton auf, rührt mit einem Glasstab durch, setzt den Deckel auf und erwärmt auf 35°. Nach stundenlanger Einwirkung läßt man ablaufen. Diese Extraktion wird an den folgenden Tagen mit neuem Aceton wiederholt, bis das Aceton nur noch wenig Substanz aufnimmt (2., 3. usw. Acetonauszug). Nach Entfernen des warmen Wassers aus dem Mantel und Verschluss des Ablaufrohrs gießt man Äther oder Petroläther (Sp. 40—55°) auf, verteilt ihn in der Masse durch Rühren mit dem Glasstab, setzt den Deckel auf und läßt über Nacht stehen. Nachdem der Äther (Petroläther) abgelaufen und zum Schluß abgesaugt ist, bringt man die Masse in eine Schale, trocknet im Vakuum, zerreibt in einer Reibschale, treibt durch ein ganz feines Seidenfilter und beendet die Extraktion durch Schütteln des staubfreien Pulvers in einer Flasche mit Äther (Petroläther). Nach Aufhören des Schüttelns senkt sich das Pulver schnell zu Boden und die überstehende Flüssigkeit ist klar oder wenigstens nahezu klar (Äther oder Petrolätherauszug).

Eine Beendigung der Extraktion (wenigstens der nichtgetrockneten Masse) in dem Apparat empfiehlt sich ebensowenig wie ein Schütteln in der Flasche ohne vorangegangenes Trocknen, da im ersten Falle das Abtropfen immer langsamer wird und fast ganz aufhört, im zweiten Falle nach dem Schütteln kein Absetzen erfolgt.

Das mit Äther oder Petroläther erschöpfte Pulver wird mit der etwa 5fachen Menge 85proz. Alkohols einige Minuten ausgekocht und heiß auf einer großen

<sup>1)</sup> Journ. of physiol. Bd. 15, S. 90. 1894. Ergebn. d. Physiol. Bd. 4, S. 30. 1905.

<sup>2)</sup> Levene: Arch. of neurol. a. psychopathol. Bd. 2, S. 1. 1899.

<sup>3)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 28, S. 403; ref. Chem. Zentralbl. 1917, I, S. 1118.



Nutsche (doppeltes gut abschließendes Filter) abgesaugt. Die Extraktion mit kochendem Alkohol wird wiederholt, bis das Filtrat beim Abkühlen nur noch wenig abscheidet (Alkoholauszug). Man erhält auf diese Weise 4 Auszüge und einen Rückstand.

1. Acetonauszug. Er enthält das Wasser des Gehirns (das Aceton dient Extraktivstoffe also als Entwässerungsmittel) und die Extraktivstoffe, auch etwas Cholesterin und Phosphatide.

Wegen der Isolierung der Milchsäure s. §§ 82 u. 721, des Harnstoffs § 643, des Kreatins §§ 129 u. 721, des Inosits § 203 u. 721.

2., 3. usw. Acetonauszug. Sie enthalten die Hauptmenge des Cholesterins, daneben auch Phosphatide, die an und für sich in Aceton unlöslich durch das Cholesterin gelöst werden. Nach dem Einengen krystallisiert das Cholesterin aus und kann durch einmalige Umkrystallisation aus Aceton rein erhalten werden. Cholesterin.

Das Cholesterin läßt sich auch in folgender Weise gewinnen: Man mischt das zerkleinerte Gehirn mit etwas Sand und ungefähr 3 Teilen Gips, zerreibt die nach einigen Stunden hart gewordene Masse und extrahiert sie mehrmals mit Aceton. Beim Eindampfen der vereinigten Auszüge krystallisiert nahezu reines Cholesterin aus, das nach Umkrystallisieren aus einer Mischung von Alkohol und Aceton, der etwas Tierkohle zugesetzt ist, völlig rein wird (Rosenheim<sup>1</sup>).

Äther- (Petroläther-) Auszug. Er enthält von bekannten Stoffen die Phosphatide. Phosphatide Lecithin und Kephalin, außerdem Cerebroside und Sphingomyelin in kleinen Mengen. Ein Teil der letzten beiden Substanzen scheidet sich beim Abkühlen der ätherischen Lösungen auf 0° ab und läßt sich, am besten durch Zentrifugieren, abtrennen, um der Hauptmenge dieser Stoffe, die erst durch Alkohol extrahiert wird, zugefügt zu werden.

Wegen der Darstellung der Phosphatide s. S. 368 u. 370.

Alkoholauszug. Er enthält von bekannten Stoffen die Cerebroside, Sphingomyelin Cerebroside und Sphingomyelin, welche sich beim Abkühlen der heiß filtrierte Lösung abscheiden.

Wegen der Darstellung der Cerebroside s. § 282, des Sphingomyelins § 266.

Rückstand. Er besteht im wesentlichen aus Proteinstoffen und ent- Proteinstoffe hält auch anorganische Salze.

#### **Bestimmung der Cerebroside im Gehirn nach Smith und Mair<sup>2</sup>).**

760. Die Methode, welche genau nach Vorschrift ausgeführt werden muß, kann hier nur skizziert werden. Wegen aller Einzelheiten ist die Originalarbeit einzusehen.

Eine genau gewogene Menge (etwa 10 g) des trockenen, fein zerriebenen Gehirns wird im Soxhletapparat mit siedendem Chloroform erschöpft (16 bis 24 Stunden), der Chloroformauszug in gewogenem Kölbchen zur Trockne gebracht und durch Wiegen der Trockenrückstand festgestellt. Eine gewogene Menge von diesem (etwa 1 g) kocht man mit methylalkoholischer Barytlösung bestimmter Konzentration 4—4½ Stunden, macht den noch heißen Kolbeninhalt mit Essigsäure sauer, bringt ihn zur Trockne und extrahiert 24 Stunden im Soxhletapparat mit heißem Aceton. Die beim Abkühlen und Stehen auftretenden Abscheidungen (Cerebroside) werden gewogen. Das Filtrat kann zur Cholesterinbestimmung benutzt werden (Verdunsten des Acetons, Lösen des Rückstandes in Alkohol, Fällen eines aliquoten Teiles dieser Lösung mit Digitonin).

<sup>1</sup>) Journ. of physiol. Bd. 34, S. 104. 1906.

<sup>2</sup>) Journ. of pathol. and bacteriol. Bd. 17, S. 608. 1912/13.

**Bestimmung des Cholesterins im Gehirn\*).**

761. Man verfährt wohl am besten unter Benutzung des Isolierungsverfahrens von O. Rosenheim und der Digitoninfällung von Windaus nach M. C. Rosenheim<sup>1)</sup> in folgender Weise: 5 g fein zerkleinertes Gehirn werden mit 15 g allerbestem gebranntem Gips gemischt, die nach dem Erhärten zerkleinerte und im Exsiccator völlig getrocknete Substanz im Soxhletapparat einige Tage mit Aceton unter wiederholtem Wechsel des Extraktionsmittels extrahiert, bis der letzte Extrakt nur eine Spur Rückstand hinterläßt und seine alkoholische Lösung mit Digitonin keine Fällung mehr gibt. Der Trockenrückstand der vereinigten Acetonauszüge wird mit 70 ccm 95proz. Alkohol aufgenommen, die Lösung filtriert und heiß mit 35 ccm 1proz. Lösung von Digitonin in 90proz. Alkohol gefällt. Man hält einige Minuten im Kochen und filtriert am nächsten Tage durch gewogenen Goochtiiegel, wäscht mit Alkohol und Äther und trocknet bei 105° bis zum konstanten Gewicht. Die Gewichts Differenz mit 0,2431 multipliziert gibt die Cholesterinmenge, wobei Oxycholesterin mit als Cholesterin bestimmt wird.

Wegen einer anderen Methode, bei der auch mit Digitonin gefällt wird, siehe Kirschbaum und Linnert<sup>2)</sup>.

**Untersuchung von Hornhaut, Linse, Glaskörper, Humor aqueus.**

762. **Hornhaut<sup>3)</sup>.** Sie ist zusammengesetzt aus der Grundsubstanz, dem Epithellager und der Descemetischen Haut, welche durch anatomische Präparation voneinander zu trennen sind.

**Grundsubstanz.** Sie enthält von festen Bestandteilen hauptsächlich Kollagen, daneben etwas Mucoid, anorganische Salze und nur Spuren von Eiweißstoffen. Das Corneamucoid (§ 462) läßt sich durch verdünntes Alkali extrahieren; das Kollagen bleibt dabei zurück und geht nach völliger Entfernung des Alkalis durch Auswaschen beim Kochen mit Wasser als Glutin in Lösung (§ 379).

**Epithellager.** In ihm finden sich zwei Globuline, von denen das eine wohl mit dem Serumglobulin identisch ist.

**Descemetische Haut.** Sie besteht aus einem Membranin (§ 384).

**Linse<sup>4)</sup>.** Sie ist zusammengesetzt aus der Linsensubstanz und der Linsenkapsel.

**Linsensubstanz.** Sie enthält ungefähr 36% Trockenrückstand, welcher zum größten Teil aus Proteinstoffen besteht und außerdem aus etwas ätherlöslicher Substanz (Cholesterin, Phosphatide, Fett) und anorganischen Salzen. Bei senilem Katarakt wurde Tyrosin gefunden (Burdon-Cooper<sup>5)</sup>). Beim Zerreiben und Schütteln mit Wasser geht etwa die Hälfte der Proteinsubstanz in Lösung:  $\alpha$ - und  $\beta$ -Krystallin (§ 341) und etwas Albumin. Die unlösliche Hälfte besteht aus Albumoid (§ 381). Cholesterin und Phosphatide sollen sich nach Goldschmidt<sup>6)</sup> der getrockneten Linse nicht vollständig mit Äther entziehen lassen. Er empfiehlt, für die vollständige Extraktion nacheinander Alkohol, Petroläther, Aceton, Benzol zu verwenden.

**Linsenkapsel.** Die Grundlage derselben ist ein Membranin (§ 384).

\*) Oxycholesterin, das im Gehirn des Erwachsenen nach Rosenheim<sup>7)</sup> vorzukommen scheint, wird teilweise mit bestimmt.

<sup>1)</sup> Biochem. Journ. Bd. 8, S. 76. 1914.      <sup>2)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 46, S. 253. 1912.

<sup>3)</sup> C. Th. Mörner: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 18, S. 213. 1894.

<sup>4)</sup> C. Th. Mörner: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 18, S. 61. 1894. — Pautz: Zeitschr. f. Biol. Bd. 31, S. 212. 1904. — Jess: desgl. Bd. 61, S. 93. 1913.

<sup>5)</sup> Malys Jahresber. d. Tierchem. 1914, S. 323.      <sup>6)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 127, S. 210. 1922.

<sup>7)</sup> Biochem. Journ. Bd. 8, S. 74. 1914.

**Glaskörper**<sup>1)</sup>. Die Häute, welche zurückbleiben, wenn man den mit der Schere zerschnittenen Glaskörper filtriert, bestehen aus Kollagen (§ 379). Das klare, nicht fadenziehende Filtrat reagiert alkalisch und enthält etwas gerinnbares Eiweiß, eine sehr geringe Menge Mucoïd, ferner etwas Milchsäure, Traubenzucker, Harnstoff und anorganische Salze. Valentin<sup>2)</sup> fand im Glaskörper der Pferde auch Fett, Cholesterin, Phosphatide. Man untersucht die Flüssigkeit nach den für seröse Flüssigkeiten gegebenen Vorschriften § 630 ff.

Über die Darstellung von Hyalomucoïd s. § 463.

**Humor aqueus.** Die alkalisch reagierende klare Flüssigkeit enthält etwas Eiweiß, Milchsäure, Traubenzucker, Harnstoff, anorganische Salze und wird wie eine seröse Flüssigkeit untersucht (§ 630 ff.).

## Untersuchung der Sekrete.

(Bearbeitet\*) von G. Hoppe-Seyler-Kiel.)

Die Sekrete sind Produkte der Tätigkeit der Drüsenzellen. Sie enthalten neben spezifischen Stoffen, welche dem Blute fehlen, auch solche, welche in ihm vorkommen, aber in anderer prozentischer Menge. Einige Sekrete, z. B. Speichel, Magensaft, sind sehr arm, andere, z. B. Galle, Milch, reich an festen Bestandteilen.

## Untersuchung des Speichels.

### *Allgemeines.*

763. Der gemischte Speichel, wie er aus dem geöffneten Munde bei gesenktem Kopfe und Vermeidung des Schlingens ausläuft, stellt ein ungleichförmiges, teils tropfbar-flüssiges, teils zäh-schleimiges Gemenge der Sekrete der 3 großen Speicheldrüsen, Gland. parot., Gland. submaxill. und Gland. sublingual., und der zahlreichen kleinen Schleimdrüsen der Mundhöhle dar.

**Bestandteile.** Der gemischte Speichel enthält nur 0,5—1,0% Trockensubstanz, darunter 0,3—0,4% organische Stoffe. Unter letzteren sind außer den weiter unten erwähnten organisierten Beimengungen Mucin, Eiweißstoffe, diastatisches Ferment (Ptyalin) (fehlt bei manchen Tieren, z. B. Hund und Katze), Maltase nachgewiesen worden. Rhodanwasserstoff kommt bei Gesunden wohl stets vor (in vermehrter Menge bei Rauchern), er fehlt dem Speichel von Pferden und Hunden. Harnstoff ist wiederholt bei Gesunden und Kranken gefunden worden, auch Harnsäure wurde nachgewiesen<sup>3)</sup>. Die anorganischen Stoffe bestehen aus Alkalien, Kalk und Magnesia, die an Salzsäure, Kohlensäure, Phosphorsäure und ein wenig Schwefelsäure gebunden sind. Ammoniak ist immer vorhanden, salpetrige Säure findet sich nach Wurster<sup>4)</sup> im frischen Speichel in der Regel nicht, wohl aber Wasserstoffsuperoxyd, welches alsbald aus dem Ammoniak salpetrige Säure bildet.

**Allgemeine Eigenschaften.** Das spezifische Gewicht schwankt zwischen 1002 und 1008. Spezifisches  
Gewicht.

Die Reaktion ist in der Regel (nach dem Essen stets) gegen Lackmus Reaktion. alkalisch, aber nicht gegen Phenolphthaleïn. Eine gegen Lackmus saure Reaktion ist wohl in vielen, wenn auch nicht in allen Fällen auf bakterielle Zersetzungen zurückzuführen; sie wird nach längerem Nüchternsein und besonders bei vielem Sprechen beobachtet.

\*) Die Bearbeitung von G. Hoppe-Seyler betrifft alle Sekrete außer Schweiß, Milch, Talgdrüsensekret und Sperma.

<sup>1)</sup> C. Th. Mörner: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 18, S. 244. 1894.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 105, S. 33. 1919.

<sup>3)</sup> Lewis u. Updegraff: Chem. Zentralbl. 1924. I. S. 1949.

<sup>4)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 22, 2, S. 1901. 1889.

**Klarheit.** Beimengungen von abgestoßenen Epithelien der Mund- und Zungenschleimhaut und von kleineren rundlichen Gebilden, den sog. Speichelkörperchen, bedingen eine etwas trübe Beschaffenheit. Beim Stehen an der Luft bildet sich ein feiner Niederschlag oder auch ein feines Häutchen an der Oberfläche: Calciumcarbonat (aus doppeltkohlensaurem Kalk abgeschieden) mit etwas organischer Beimengung.

**Pathologische Veränderungen.** In fieberhaften Krankheiten ist die Sekretion vermindert, stockt, wie es scheint, oft gänzlich (Trockenheit des Mundes und Rachens, belegte Zunge, veränderter Geschmack usw.). Bei Jod- und besonders bei Quecksilbersalivation enthält der Speichel die Sekrete der entzündeten Mund- und Rachenschleimhaut beigemischt und ist infolgedessen reicher an Eiweiß und anorganischen Salzen (bis über 0,7%). Bei akuter und chronischer Nephritis ist oft Harnstoff<sup>1)</sup> in vermehrter, dem Harnstoffgehalt des Blutes entsprechender Menge (über 40 mg-% bei Urämie gegen 18—40 mg-% bei Gesunden) vorhanden, bei Urämie wurde auch Harnsäure<sup>2)</sup> (direkt durch die Murexidprobe nachweisbar) gefunden. Bei kachektischen Kranken kann Rhodanwasserstoff fehlen. Bei Ikterus tritt kein Gallenfarbstoff und bei Diabetes kein Zucker im Speichel auf (Fleckseder gibt an, ihn in seltenen Fällen bei Diabetes gefunden zu haben<sup>3)</sup>), wohl aber ist bei dieser letzteren Krankheit oft saure Reaktion, die in einem Falle nach Lehmann durch freie Milchsäure bedingt war, beobachtet worden. Bei fieberhaften Krankheiten, bei Digestionsstörungen und anderen pathologischen Zuständen ist die Reaktion ebenfalls oft sauer. Auch hier dürften Mikroorganismen häufig die Ursache sein.

#### 764. Sekrete der einzelnen Speicheldrüsen.

**Parotisspeichel.** Parotisspeichel. Das normale Sekret der Parotis, wie man es durch Einführung einer Kanüle in den Ausführungsgang oder aus einer Fistel erhält, stellt bei Menschen und Tieren, soweit die Untersuchungen reichen, eine wasserklare Flüssigkeit von völlig dünnflüssiger Beschaffenheit und gegen Lackmus alkalischer Reaktion dar. Sie trübt sich beim Stehen unter Abscheidung von Calciumcarbonat. Der Trockenrückstand beträgt 0,7—1,6% und besteht ungefähr zu gleichen Teilen aus organischen und anorganischen Stoffen. Unter den organischen findet sich Eiweiß (beim Pferd besonders reichlich, beim Kaninchen fehlt es), kein Mucin, eine oder mehrere flüchtige Fettsäuren, Harnstoff, diastatisches Ferment (fehlt bei manchen Tieren, z. B. Hund), Rhodanwasserstoff. Die anorganischen Salze sind dieselben wie im gemischten Speichel.

**Submaxillarisspeichel.** Submaxillarisspeichel. Das Sekret der Submaxillardrüse, ebenfalls mittels eingeführter Kanüle oder aus einer Fistel erhalten, ist eine schleimig-fadenziehende Flüssigkeit von gegen Lackmus alkalischer Reaktion (ebenso beim Hunde). Im normalen Zustande enthält sie wenig Speichelkörperchen, bei Stagnation im Drüsengange wird sie reicher an diesen und trübe. Sie enthält 0,3—0,6% Trockenrückstand, darunter Mucin (ebenso bei Tieren, außer Kaninchen), Eiweiß, diastatisches Ferment (beim Hunde nicht oder sehr wenig), Rhodanwasserstoff (fehlt beim Hunde), anorganische Salze.

**Sublingualisspeichel.** Sublingualisspeichel. Das Sekret der Sublingualdrüse ist noch zäher, schleimiger als der Submaxillarisspeichel, reagiert ebenfalls gegen Lackmus alkalisch. Mucin, diastatisches Ferment und Rhodanwasserstoff sind nachgewiesen worden. Wegen seiner geringen Menge und schwierigen Gewinnung ist das Sekret bisher wenig untersucht worden.

<sup>1)</sup> Boucheron: Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 100, S. 1308. 1885. — Landsberg: Klin. Wochenschr. 1923, S. 306.

<sup>2)</sup> Verhandl. d. 2. Kongr. f. inn. Med. Wiesbaden 1883. S. 119.

<sup>3)</sup> Zentralbl. f. inn. Med. 1905, S. 41.

*Nachweis der Proteinstoffe im Speichel.*

765. Man versetzt den Speichel mit Essigsäure. Ein entstehender Niederschlag, welcher aus Mucin besteht, wird abfiltriert und nach § 634, 1a auf Mucin geprüft. Enthält der Speichel Eiweiß, so trübt sich das Filtrat beim Kochen sowie auf Zusatz von Ferrocyankalium.

*Nachweis der Fermente im Speichel.*

766. Eine Reindarstellung des diastatischen Fermentes und der Maltase aus dem Speichel ist noch nicht gelungen. Über das Verfahren, das diastatische Ferment einigermaßen zu isolieren, s. § 514.

Ihr Nachweis besteht in dem Nachweis der Spaltungsprodukte, welche durch ihre Einwirkung auf Amylum oder Glykogen entstehen. Das diastatische Ferment wandelt diese beiden Stoffe in Dextrine, Maltose und Isomaltose(?) (§ 514), die Maltase wandelt die Maltose in Traubenzucker (§ 517) um.

Über die Anstellung eines diastatischen Verdauungsversuchs und die Prüfung auf Dextrine und Zucker s. § 516.

Zum getrennten Nachweis von Maltose, Isomaltose und Traubenzucker dient die Darstellung und Isolierung der Osazone §§ 101, 108, 109, 105. Um Maltose und Traubenzucker quantitativ zu bestimmen, fällt man die Verdauungsflüssigkeit mit Alkohol, filtriert, verdunstet das Filtrat, extrahiert den Rückstand mit absolutem Alkohol, verdunstet die filtrierte Lösung und löst den Rückstand in Wasser. Nachdem das Volumen der Lösung festgestellt ist, bestimmt man das Reduktionsvermögen durch Titration (§ 599). Der Rest wird wieder gemessen, nach Zusatz von Salzsäure  $\frac{1}{4}$  Stunde lang gekocht, nach dem Erkalten mit Sodalösung neutralisiert, auf das ursprüngliche Volumen gebracht und wieder titriert. Da 100 Gewichtsteile Maltose und 66,8 Gewichtsteile Traubenzucker das gleiche Reduktionsvermögen haben, so wird das Ende der Titrierung jetzt mit weniger Zuckerlösung erreicht werden als vor dem Kochen mit Salzsäure, und aus der Anzahl der weniger verbrauchten Kubikzentimeter läßt sich berechnen, wieviel Glucose und wieviel Maltose die Lösung enthält. Das Vorkommen der Isomaltose ist noch zu zweifelhaft, als daß auf sie hierbei Rücksicht genommen werden könnte.

Quantitative Bestimmung des durch d. Speichelfermente gebildeten Zuckers.

Über ein anderes Verfahren zur Bestimmung der Verdauungsprodukte s. § 515.

*Nachweis und Bestimmung des Rhodanwasserstoffs im Speichel.*

767. Der Nachweis geschieht nach § 122 mit der Eisenchloridreaktion (Rotfärbung auf Zusatz von etwas Salzsäure und verdünnter Eisenchloridlösung) oder in noch empfindlicherer Weise mit der Reaktion von Solera (Blaufärbung eines Filtrierpapierstreifens, der mit einer 0,5% Stärke und etwas Jodsäure enthaltenden Lösung getränkt und nachher getrocknet worden ist). Für die Reaktion von Colasanti (smaragdgrüne Färbung mit Kupfersulfat) ist der Speichel mit Alkohol auszufällen, das alkoholische Filtrat zu verdunsten und der Rückstand in Wasser zu lösen.

Für die quantitative Bestimmung dient das Verfahren von Rupp (§ 587). Man wägt eine nicht zu kleine Menge Speichel ab, verdunstet bei mäßiger Temperatur, zieht den Rückstand mit Alkohol aus, filtriert, verdunstet und fällt die wässrige Lösung des Rückstandes nach dem Ansäuern mit Salpetersäure mit Silbernitrat aus. Der abfiltrierte und ausgewaschene Niederschlag wird weiter nach § 587 behandelt.

Quantitative Bestimmung.

Einfacher, aber weniger genau läßt sich die Bestimmung auf colorimetrischem Wege ausführen. Sie beruht auf der Rotfärbung, welche Eisenchlorid in mit Salzsäure versetzten Rhodansalzlösungen hervorruft. Als Vergleichslösung benutzt man eine Rhodanidlösung von bekanntem Gehalt.

**Nachweis der salpetrigen Säure im Speichel.**

768. Zum Nachweis der salpetrigen Säure, welche, wie oben erwähnt, nach Wurster im ganz frischen Speichel in der Regel nicht vorhanden ist, prüft man mit Jodkaliumstärkekleister und verdünnter Schwefelsäure (Blaufärbung), mit Metaphenylendiamin und verdünnter Schwefelsäure (Gelbfärbung) oder einem anderen Reagens auf salpetrige Säure.

**Nachweis anderer Stoffe im Speichel.**

Über den Nachweis und evtl. über die Bestimmung von Ammoniak s. § 642, von Harnstoff s. § 643, von Harnsäure s. § 647, Milchsäure s. § 82, anorganischen Salzen s. §§ 632 und 663.

**Speichelsteine, Zahnstein.**

769. **Speichelsteine** werden oft in den Ausführungsgängen der Speicheldrüsen bei Menschen und Säugetieren gefunden. Sie sind, wenn nicht mehrere nebeneinander liegen und sich gegenseitig abgeschliffen haben, rundlich, meist hart und schwer, von weißlicher oder gelblicher Farbe und bestehen fast immer im wesentlichen aus Calciumcarbonat mit Beimengungen von etwas Calciumphosphat und wechselnder Menge organischer Substanz (Proteinstoffe u. a.).

Qualitative  
Analyse.

**Qualitative Analyse.** Man behandelt einen Teil des zerriebenen Steins mit Salzsäure (Aufbrausen!), filtriert von der organischen Substanz ab und untersucht die Lösung nach § 532.

Quantitative  
Analyse.

**Quantitative Analyse.** Man wägt eine Portion des zerriebenen Steins ab, behandelt das Pulver mit kochendem Wasser, filtriert durch ein gewogenes, aschefreies Filter, wägt nach dem Trocknen, verascht, fügt zur Asche etwas Ammoncarbonat, trocknet, erhitzt zum beginnenden Glühen und wägt nach dem Erkalten. Man erfährt auf diese Weise die Menge der wasserunlöslichen organischen und anorganischen Substanz sowie die sehr geringe Quantität der wasserlöslichen Stoffe. In dem Glührückstand des wasserunlöslichen Teils kann die Kohlensäure nach § 556, in seiner salzsauren Lösung der Kalk nach § 536, in dem Filtrat vom Kalkniederschlag die Phosphorsäure nach Zufügen von Ammoniak durch Fällung mit Magnesiamischung nach § 538 bestimmt werden.

**Zahnstein** findet sich oft an Zähnen bei Menschen und alten Haustieren abgesetzt und besteht aus denselben Stoffen wie die Speichelsteine, enthält aber mehr Calciumphosphat und schließt viele Mikroorganismen ein. Die Untersuchung ist dieselbe wie die der Speichelsteine.

**Untersuchung des Nasensekrets.**

770. **Bestandteile.** Nach den Ergebnissen der bisherigen, allerdings spärlichen Untersuchungen enthält das Nasensekret neben Schleimkörperchen und Epithelzellenresten verhältnismäßig viel Mucin, 1—3% Extraktivstoffe (darunter etwas Rhodanwasserstoff), sehr wenig in Äther lösliche Stoffe und 0,5 bis 0,6% anorganische Salze. Je mehr seröse Flüssigkeit sich beimengt, um so reicher an Eiweiß und anorganischen Salzen (bis gegen 1%) wird es, während der Gehalt an Mucin abnimmt. Bei eitriger Beschaffenheit des Sekrets nimmt der Gehalt an ätherlöslichen Stoffen zu. Die Reaktion ist gegen Lackmus alkalisch.

**Nachweis und Bestimmung der einzelnen Bestandteile des Nasensekrets.**

Der Rhodanwasserstoff wird nach § 122 nachgewiesen und bestimmt. Im übrigen geschieht die Untersuchung wie die einer serösen Flüssigkeit (§ 630 ff.). Über die Abscheidung des Mucins vgl. auch § 773.

**Nasensteine.**

In der Nase abgelagerte Konkremente, Nasensteine, enthalten hauptsächlich Calciumphosphat, außerdem Calciumcarbonat und organische Substanz. Ihre Analyse geschieht in der § 769 angegebenen Weise.

**Untersuchung der Tränen.**

771. Das völlig wasserklare Sekret enthält kleine Mengen von Proteinstoffen, Fett und anorganischen Salzen (darunter hauptsächlich Kochsalz) und reagiert gegen Lackmus alkalisch. Im Conjunctivalsekret ist Rhodanwasserstoff (§ 122) nachgewiesen.

Es gerinnt beim Kochen und bildet in Wasser getropft einen Niederschlag, der wahrscheinlich aus Globulin besteht (Hoppe - Seyler<sup>1</sup>). Die weitere Untersuchung geschieht wie die einer serösen Flüssigkeit (§ 630 ff.).

**Untersuchung der Sputa<sup>2</sup>).**

Bei den verschiedenen krankhaften Zuständen der Schleimhaut der Luftwege und der Lunge werden ihrer äußeren Beschaffenheit und ihrer Zusammensetzung nach verschiedene Sputa ausgeworfen.

772. **Bestandteile.** Die rein schleimigen, glasig durchscheinenden oder auch rauchgrauen Sputa der chronischen Bronchitis und des Asthma bronchiale sind reich an Mucin, enthalten nur Spuren von Eiweiß, aber Nucleoproteide, vielleicht auch Phosphorproteide, Albumosen (kein Pepton) und andere stickstoffhaltige Substanzen, ferner in Äther lösliche Stoffe (Phosphatide, Cholesterin, Fette), aber weniger als die eitrigen, Protagon\*), anorganische Salze.

Die gelben oder roten (rostfarbenen) Sputa der croupösen Pneumonie von zäh gallertig-schleimiger Beschaffenheit sind desto reicher an Eiweiß und Nucleoproteiden, je mehr Serum oder Eiter sich beimischt, enthalten Mucin und vielleicht auch Phosphorproteide, Albumosen (kein Pepton) und andere stickstoffhaltige Substanzen, ferner ätherlösliche Stoffe und anorganische Salze. Beimischung von Bronchialsekret oder Speichel setzt den Eiweißgehalt herab.

Die serös-schleimigen und schleimig-eitrigen Sputa des gewöhnlichen Katarrhs und der Lungentuberkulose enthalten Mucin, Eiweiß, phosphorhaltige Proteide, Albumosen (kein Pepton) und andere stickstoffhaltige Substanzen, ätherlösliche Substanzen, und zwar diese entsprechend ihrem Gehalt an Eiter in reichlicherer Menge, anorganische Salze.

Die dünnflüssigen, rein serösen Sputa bei Lungenödem enthalten viel Eiweiß.

Die Sputa aus Bronchiektasien, tuberkulösen Kavernen usw. enthalten außer den genannten Stoffen die bakteriellen Zersetzungsprodukte von Proteinstoffen, von Phosphatiden und von Fett: Ammoniak, Methylamin und andere Basen, Schwefelwasserstoff, niedere und höhere Fettsäuren, Phenol, Kresol, Indol, Skatol usw. Man findet in ihnen die dünnen, breiten, biegsamen Nadeln von Palmitin- und Stearinsäure, Cholesterinkristalle, Charcotsche Krystalle.

\*) Die sog. Myelinformen, wie sie im bronchitischen Sputum und im Morgensputum Gesunder bei der mikroskopischen Untersuchung sich zeigen, sind in Alkohol löslich, in Äther unlöslich und bestehen aus sog. Protagon (§ 270). A. Schmidt u. Fr. Müller: Berl. klin. Wochenschr. 1898, S. 73 u. 75.

<sup>1</sup>) Physiol. Chem. S. 701. Berlin, Hirschwald 1881.

<sup>2</sup>) H. Kossel: Zeitschr. f. klin. Med. Bd. 13, S. 149. 1887. — v. Hoesslin: Das Sputum. Berlin: Julius Springer 1921. — Fr. Müller: Zeitschr. f. Biol. Bd. 42, S. 468. 1901. — Wanner: Dtsch. Arch. f. klin. Med. Bd. 75, S. 347. 1903.

Der Reststickstoff ist besonders bei Bronchiektasien und bei Pneumonien kurz vor und nach der Krise erhöht.

Tryptisches Ferment ist oft bei Gangrän (Filehne), in eitrigem Sputum und im Sputum nach der pneumonischen Krise vorhanden, Glucose bei Diabetes, Harnstoff bei Urämie.

**Allgemeine Eigenschaften.** Die Reaktion des frisch ausgeworfenen Sputums ist in der Regel gegen Lackmus alkalisch.

Das spezifische Gewicht schwankt zwischen 1004 und 1037. Die rein schleimigen Sputa zeigen das niedrigste spezifische Gewicht, die serösen das höchste. Zur Bestimmung verflüssigt man das Sputum in einem Kölbchen mit Steigrohr durch langsames Erwärmen auf dem Wasserbade und gießt es nach dem Abkühlen in ein Pyknometer (H. Kossel).

#### *Nachweis und Bestimmung einzelner Bestandteile der Sputa.*

773. Die Untersuchung geschieht nach den für die serösen Flüssigkeiten (§ 630 ff.) gemachten Angaben.

Mucin. Um Mucin und andere durch Essigsäure fällbare Substanzen abzuscheiden, ist es zweckmäßig, die dickschleimigen Massen in einem Kölbchen mit 3proz. Essigsäure stark zu schütteln und zu filtrieren.

Bestimmung des Mucins. Zur quantitativen Bestimmung des Mucins hat Wanner<sup>1)</sup> dessen Eigenschaft, bei 3stündigem Kochen mit 10proz. Salzsäure 33,6proz. reduzierende Substanz (auf Traubenzucker berechnet) abzuspalten, benutzt. Das von stärkehaltigen\*) Speiseresten befreite Sputum wird mit dem doppelten Volumen Alkohol gewaschen und 3 Stunden mit 10proz. Salzsäure am Rückflußkühler gekocht. Nach dem Abkühlen fällt man die Eiweißstoffe mit Phosphorwolframsäure, filtriert, entfernt die überschüssige Phosphorwolframsäure mit Barytwasser, den überschüssigen Baryt mit Schwefelsäure und stellt das Reduktionsvermögen durch Titration mit Fehlingscher Lösung (§ 599) oder nach Bertrand (§ 653) fest. Die Mengen reduzierender Substanz, welche bei der Hydrolyse aus anderen Proteinen entstehen, sind verhältnismäßig gering, so daß man sie ohne wesentliche Fehler vernachlässigen kann.

Auf niedrige und höhere Fettsäuren prüft man Sputa aus Bronchiektasien usw. nach § 80 und 81.

Farbstoffe. 774. Farbstoffe. Der färbende Bestandteil der rostfarbigen Sputa ist zum Teil unveränderter Blutfarbstoff, zum Teil ein unbekanntes gelbliches Derivat desselben. Bilirubin findet sich im Sputum bei Ikterus, bei Pneumonien, bei Durchbruch von Leberabscessen oder -echinokokken in die Lunge, wenn Serum oder Eiter sich dem Sputum beimischen. Die gelben und grünen Färbungen, welche die eitrigten Sputa zeigen und die von beigemengtem gefärbten Eiter herrühren, sind noch nicht untersucht. Unter Umständen ist die grüne Farbe durch farbstoffbildende Bakterien hervorgerufen. Um zu entscheiden, ob die graue oder schwärzliche Farbe eines Sputums von eingatmeten Kohlepartikelchen (Lampenruß oder dgl.) oder von einem im Körper entstandenen Farbstoff herrührt, löst man das Sputum in Antiforminlösung (unterchlorigsaures Natrium und Natronlauge) oder in verdünnter Natronlauge und leitet einige Minuten Chlorgas hindurch. Kohle bleibt völlig unverändert, alle organischen Farbstoffe werden entfärbt. Die perlgraue Farbe der Sputa bei chronischer Bronchitis (s. oben) ist durch pigmentierte Zellen bedingt, deren Farbstoff bei dieser Behandlung schnell gebleicht wird. Etwa vorhandenes Eisenoxyd würde erst beim Übersättigen und Erwärmen mit Salzsäure entfärbt und gelöst werden.

\*) Kleinere Stärkemengen, ebenso aus Eiter stammendes Glykogen, werden in kurzer Zeit durch das diastatische Ferment in Zucker übergeführt, welcher durch die folgende Behandlung mit Alkohol entfernt wird.

<sup>1)</sup> Dtsch. Arch. f. klin. Med. Bd. 75, S. 368. 1903.



Cholesterinkrystalle (§ 232) kommen in dem Sputum zuweilen bei Durchbruch von Empyemen in die Lunge vor, ebenso sind Hämatoidinkrystalle (§ 295) in solchen Fällen in dem Sputum beobachtet worden.

Loebisch und v. Rokitansky<sup>1)</sup> erhielten aus einem bronchiektatischen Sputum nach der Methode von Baumann und v. Udránszky (§ 153) Pentamethyldiamin (?) als Benzoylverbindung.

## Untersuchung des Magensaftes und des Mageninhalts.

### *Allgemeines über den Magensaft.*

775. Der Magensaft, das Sekret der Drüsen der Magenschleimhaut, zeichnet sich durch seine intensiv saure Reaktion vor den übrigen Sekreten aus.

Reiner Magensaft, frei von Nahrungsmitteln und Speichel, läßt sich leicht <sup>Magensaft.</sup> in großen Mengen von oesophago- und gastrotomierten Hunden<sup>2)</sup> während der sog. Scheinfütterung (Pawlow) gewinnen. Auch von Menschen<sup>3)</sup> ist in einigen Fällen ganz reiner Magensaft erhalten worden. Von etwas Schleim durch Filtration befreit, stellt er eine völlig klare oder ein wenig opaleszierende Flüssigkeit von stark saurer Reaktion dar, welche die Xanthoprotein-, gelegentlich auch die Biuret- und Millonsche Reaktion gibt. Beim Erwärmen auf 58—60° gerinnt er. Er enthält freie Salzsäure, und zwar beim Menschen 0,4—0,5%, beim Hunde 0,5—0,6%, ferner Pepsin, Labferment und Lipase.

Vom Hundemagensaft, welcher genauer untersucht worden ist, liegen noch weitere Angaben vor:

Er zeigt Linksdrehung, er scheidet beim vorsichtigen Neutralisieren einen flockigen Niederschlag ab, welcher bei erreichter Neutralität sich wieder löst. Er wird durch Alkohol gefällt. Beim Abkühlen auf 0° und ebenso beim Zentrifugieren des eine Zeitlang gegen destilliertes Wasser dialysierten Saftes scheidet sich ein Niederschlag ab (s. § 503). Er enthält Rhodanwasserstoff, der sich zuweilen direkt, zuweilen erst nach sehr starker Konzentration nachweisen läßt, und Ammoniak. Der Trockenrückstand beträgt 0,3—0,6%, die Asche (Kalium, Natrium, Calcium, Magnesium, Eisen, Salzsäure, Phosphorsäure, Schwefelsäure) 0,1—0,16%. Die organischen Substanzen sind in der Hauptsache Proteine.

Der menschliche Magensaft bildet eigentlich nur als Bestandteil des **Magens** <sup>Mageninhalt.</sup> **inhalts** ein Objekt für die Untersuchung. Die Methoden, welche diesen Untersuchungen dienen, werden im folgenden besprochen.

### *Nachweis der Säuren im Mageninhalt.*

776. **Vorbemerkungen.** Die Flüssigkeit, welche sich durch eine elastische Sonde, die einige Zeit nach einer Mahlzeit in den Magen eingeführt wird, gewinnen läßt, stellt ein Gemisch von Magensaft und mehr oder weniger veränderten Nährstoffen dar. Dieses Gemisch reagiert gegen Lackmus sauer. An der sauren Reaktion können außer der Salzsäure saure Phosphate, Milchsäure und flüchtige Fettsäuren beteiligt sein. Die Summe aller bedingt die „Gesamtacidität“.

<sup>Gesamtacidität.</sup>

Salzsäure ist als freie oder als gebundene Salzsäure vorhanden. Enthält das Gemisch Eiweißstoffe oder Verdauungsprodukte derselben, so binden diese

<sup>1)</sup> Zentralbl. f. klin. Med. Bd. 11, S. 1. 1890.

<sup>2)</sup> Schoumow - Simanowsky: Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 33, S. 336. 1894. — Nencki u. Sieber: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 32, S. 291. 1901. — Pekelharing: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 35, S. 8. 1902. — Rosemann: Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 118, S. 467. 1907.

<sup>3)</sup> Sommerfeld: Arch. f. Anat. u. Physiol. (Physiol. Abt.) 1905, Suppl.-Bd. S. 455. Biochem. Zeitschr. Bd. 9, S. 352. 1908. — Bickel: Dtsch. med. Wochenschr. 1906, S. 323.

Gebundene Salzsäure. Salzsäure des Magensaftes („gebundene Salzsäure“), und nur wenn mehr Salzsäure sezerniert worden ist, als dem Bindungsvermögen jener Stoffe entspricht, findet sich auch „freie Salzsäure“. Die gebundene und die freie Salzsäure machen die „Gesamtsalzsäure“ aus. Unter letzterer versteht man also sämtliche nicht an Metalle gebundene Salzsäure.

Freie Salzsäure.  
Gesamtsalzsäure.

In der ersten Zeit nach Aufnahme eiweißhaltiger Speisen findet sich keine freie Salzsäure im Mageninhalt, indem sämtliche sezernierte Salzsäure an Eiweiß und seine Verdauungsprodukte gebunden ist. Die Sekretion des Magensaftes schreitet aber fort und unter gesunden Verhältnissen ist 45—60 Minuten nach einem „Probefrühstück“ (300 ccm Tee oder Wasser oder fettfreie Fleischsuppe und 25 g Weißbrot) oder 3—4 Stunden nach einer „Probemahlzeit“ (ein großer Teller Suppe, ungefähr 200 g Fleisch und 50 g Brot oder Kartoffelmus) freie Salzsäure vorhanden. Besonders gut eignet sich zur chemischen Untersuchung Mageninhalt, der 30 Minuten nach Darreichung von 300 ccm 5proz. Alkohol gewonnen ist. Bei Carcinom, auch bei Magenkatarrhen, bei fieberhaften Zuständen ist aber der Nachweis freier Salzsäure gewöhnlich nicht zu führen, weil die Menge der Verdauungsprodukte mehr wie hinreichend ist, um die in geringerer Quantität sezernierte Salzsäure zu binden<sup>1)</sup>. Schleim aus Rachensputum, Speichel usw. binden ziemlich viel Salzsäure. Ein Sistieren der Salzsäureabsonderung findet auch unter den genannten pathologischen Verhältnissen außer bei vollkommener Atrophie der Schleimhaut nicht statt<sup>2)</sup>. Man bestimmt dann oft die Menge der Salzsäure, die nötig ist, um die Verdauungsprodukte zu binden (Salzsäuredefizit). Einen guten Überblick über den Ablauf der Magenverdauung erhält man, wenn man die Duodenalsonde mit  $\frac{1}{2}$  l Haferschleimsuppe schlucken und im Magen liegen läßt, dann alle 10 Minuten mit einer kleinen Spritze etwas Inhalt aspiriert und untersucht, bis regurgitierender galliger Duodenalinhalt erscheint.

Milchsäure und flüchtige Fettsäuren treten, wenn sie nicht präformiert mit der Nahrung eingeführt worden sind, nur unter pathologischen Verhältnissen infolge bakterieller Zersetzungen der Nährstoffe auf. Der Mageninhalt von Leichen enthält oft reichliche Mengen dieser Säuren, besonders bei kleinen Kindern.

Für die einzelnen Nachweise benutzt man Proben des filtrierte Mageninhalts.

Nachweis: 777. Freie Salzsäure. Zum Nachweise, welcher darauf beruht, daß eine Reihe von Farbstoffen gegenüber verdünnten organischen und an Eiweißstoffe gebundenen Mineralsäuren ein anderes Verhalten zeigt als gegen freie Mineralsäuren, dienen die unter 1—4 aufgeführten Reaktionen.

Reoch<sup>3)</sup> wies zuerst darauf hin, daß in einer Mischung von Ferricitrat oder -tartrat und Rhodanammonium die blutrote Färbung durch Bildung von Eisenrhodanid nur bei Gegenwart von Mineralsäuren, nicht bei Gegenwart von organischen Säuren auftritt. Szabó<sup>4)</sup> wandte diese Reaktion zur Prüfung des Magensaftes auf Salzsäure an. von den Velden<sup>5)</sup> empfahl zu dem gleichen Zwecke einige Anilinfarbstoffe. Seitdem hat man noch andere für diese Reaktion geeignete Substanzen angegeben und festgestellt, daß die „gebundene Salzsäure“ sich diesen Farbstoffen gegenüber wie organische Säure verhält, die Reagenzien also zum Nachweis „freier Salzsäure“ dienen können.

1. Kongopapier nimmt eine intensiv blaue (blauschwarze) Färbung an. Weniger intensive Blaufärbung kann auch durch Milchsäure hervorgerufen werden.

2. Methylviolett. Auf Zusatz einiger Kubikzentimeter der Untersuchungsflüssigkeit zu einer stark verdünnten, wässrigen, hellvioletten Lösung tritt Blaufärbung ein.

3. Dimethylaminoazobenzol. Zu dem Mageninhalt setzt man 1 Tropfen halbprozentiger alkoholischer Lösung des Farbstoffs. Kirschrote Farbe bei

<sup>1)</sup> Honigmann u. v. Noorden: Zeitschr. f. klin. Med. Bd. 13, S. 87. 1887.

<sup>2)</sup> Cahn u. v. Mering: Dtsch. Arch. f. klin. Med. Bd. 39, S. 233. 1886.

<sup>3)</sup> Journ. of the anat. a. physiol. 1874, S. 274.

<sup>4)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 1, S. 152. 1878.

<sup>5)</sup> Dtsch. Arch. f. klin. Med. Bd. 23, S. 31. 1879; Bd. 27, S. 339. 1880.

freier Salzsäure (rötlichgelbe Farbe bei Anwesenheit von viel Milchsäure) (Töpfer).

4. Phloroglucin-Vanillin. Einige Tropfen des Reagens (2 Tl. Phloroglucin, 1 Tl. Vanillin auf 30 Tl. Alkohol) werden mit ebensoviel Tropfen des Mageninhalts in einer kleinen Porzellanschale über kleiner Flamme verdunstet. Es entsteht ein roter Spiegel (Günzburg).

Diese letztere Reaktion ist die empfindlichste, sie zeigt noch 0,1 prom. freie Salzsäure an. Sie fällt im Gegensatz zu den übrigen auch bei konzentrierter Milchsäure negativ aus.

778. **Milchsäure.** Man schüttelt 5 ccm der Flüssigkeit in einem kleinen Scheidetrichter mit der mehrfachen Menge (etwa 20—30 ccm) reinem, alkoholfreiem Äther ordentlich durch, verdunstet den abgegossenen Äther, nimmt den Rückstand in wenig Wasser auf und versetzt die wässrige Lösung mit dem blauvioletten Uffelmannschen Reagens<sup>1)</sup> (30 ccm einer 1proz. Karbolösung + einige Tropfen Eisenchloridlösung): zeisiggelbe Färbung. Oder man schüttelt den Ätherextrakt mit Wasser, das durch Eisenchloridzusatz eine ganz gering gelbliche Farbe erhalten hat. Das Wasser wird dann im Vergleich zu der ursprünglichen Färbung intensiv zeisiggelb.

Da Alkohol, Zucker, Phosphate diese Reaktion auch geben, ist die Isolierung der Milchsäure in der angegebenen Weise erforderlich.

Andere Proben sind von Croner und Cronheim<sup>2)</sup> (Modifikation eines Verfahrens von Vournasos<sup>3)</sup> und von Thomas<sup>4)</sup> angegeben worden.

779. **Flüchtige Fettsäuren.** Dieselben geben sich meist schon durch den Geruch zu erkennen. Ist das nicht der Fall, so erhitzt man die Flüssigkeit zum Kochen und prüft die Dämpfe mittels eines feuchten blauen Lackmuspapiers auf saure Reaktion oder man destilliert und prüft das Destillat. Oder der Ätherextrakt des Mageninhalts wird verdunstet, der Rückstand mit Wasser aufgenommen, mit verdünnter Sodalösung neutralisiert, mit Alkohol und etwas Schwefelsäure erwärmt, wobei der charakteristische Geruch des Essigesters auftritt (Essigsäure). Buttersäure wird auch mit Äther extrahiert, der Rückstand nach Verdunsten mit wenig Äther aufgenommen, mit etwas Chlorcalcium in Substanz versetzt, worauf sich Buttersäure in öligen Tropfen ausscheidet.

**Saure Phosphate.** Man fügt nach Leo<sup>5)</sup> in einem Uhrgläse zu einigen Kubikzentimetern der Flüssigkeit etwas gepulvertes reines Calciumcarbonat, verrührt mit einem Glasstabe und prüft mit Lackmuspapier. Saure Reaktion zeigt die Anwesenheit saurer Phosphate an.

#### *Bestimmung der Säuren im Mageninhalt.*

780. **Gesamtacidität.** Man titriert 10 ccm filtrierte Flüssigkeit mit  $\frac{n}{10}$ -Natronlauge unter Benutzung von Phenolphthalein als Indicator bis zur beginnenden rotvioletten Färbung.

Vielfach drückt man die Gesamtsäure in der Zahl von Kubikzentimetern  $\frac{n}{10}$ -Lauge aus, die nötig sind, um 100 ccm Magensaft gegen Phenolphthalein zu neutralisieren.

Unter normalen Verhältnissen braucht man für 10 ccm Mageninhalt, der 45—60 Minuten nach Einnahme eines Probefrühstücks (§ 776) entnommen ist, 3—6 ccm  $\frac{n}{10}$ -Natronlauge.

<sup>1)</sup> Dtsch. Arch. f. klin. Med. Bd. 26, S. 441. 1880.

<sup>2)</sup> Berl. klin. Wochenschr. 1905, S. 1080.

<sup>3)</sup> Zeitschr. f. angew. Chem. Bd. 15, S. 172. 1902.

<sup>4)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 50, S. 540. 1906/07.

<sup>5)</sup> Zentralbl. f. med. Wissensch. 1889, S. 481.

der Gesamtsäure  
nach Leo.

### 781. Gesamtsäure nach Leo<sup>1)</sup>.

**Prinzip.** Die Methode beruht darauf, daß alle Säuren (inklusive der gebundenen Salzsäure) durch Calciumcarbonat neutralisiert werden, während die Acidität etwa vorhandener saurer Phosphate und anderer alkalibindender Substanzen durch dieses Salz nicht verändert wird, und besteht darin, daß man einen Teil der Flüssigkeit direkt, einen anderen nach Behandlung mit Calciumcarbonat titriert.

**Ausführung.** Man versetzt 10 ccm der zu untersuchenden Flüssigkeit mit 5 ccm konzentrierter Chlorcalciumlösung\*) und titriert unter Benutzung von Phenolphthalein mit  $\frac{n}{10}$ -Natronlauge. Weitere 15 ccm verreibt man mit 1 g trockenem pulverisierten Calciumcarbonat und filtriert durch ein aschefreies Filter. Von dem Filtrat werden 10 ccm durch Einleiten von Luft von Kohlensäure befreit und nach Zusatz von 5 ccm konzentrierter Chlorcalciumlösung\*) und Phenolphthalein titriert.

**Berechnung.** Die Differenz beider Resultate gibt die der Gesamtsäure entsprechende Acidität an.

Enthält die Flüssigkeit keine Milchsäure und flüchtige Fettsäuren, oder sind diese durch Ausschütteln mit Äther vorher entfernt, so ist das Resultat auf Gesamtsalzsäure zu beziehen.

der Gesamtsalzsäure  
nach Sjöqvist.

### 782. Gesamtsalzsäure. a) Nach Sjöqvist<sup>2)</sup>.

**Prinzip.** Die Methode beruht darauf, daß beim Eintrocknen einer Flüssigkeit, welche organische Säuren und Salzsäure enthält, mit Bariumcarbonat und Verkohlen des Rückstandes die organischen Säuren unlösliches Bariumcarbonat, die Salzsäure lösliches Bariumchlorid liefern. Um die Menge des gelösten Bariums zu erfahren, wird das Bariumchlorid in Bariumchromat umgewandelt, dieses mit Salzsäure und Jodkalium zusammengebracht und das nach der Gleichung  $2 \text{BaCrO}_4 + 16 \text{HCl} + 6 \text{KJ} = 2 \text{BaCl}_2 + 2 \text{CrCl}_3 + 8 \text{H}_2\text{O} + 6 \text{KCl} + 3 \text{J}_2$  freigemachte Jod durch Thiosulfatlösung titriert.

**Erforderliche Lösungen.** 1. Ammonacetatlösung, hergestellt durch Neutralisation von 25 proz. Essigsäure mit 10 proz. Ammoniak.

2. 25 proz. Essigsäure.

3. 25 proz. Salzsäure.

4. Etwa 6 proz. Lösung von neutralem, schwefelsäurefreiem Ammonchromat.

5. Jodkaliumlösung (50 g in 100 ccm Wasser) in dunkler Flasche aufzubewahren.

6. Jodzinkstärke.

7. Natriumthiosulfatlösung, von der 1 ccm etwa 3 mg HCl entspricht (s. folgenden Absatz).

**Titerstellung der Natriumthiosulfatlösung.** Es werden 2 Lösungen bereitet, von denen die eine im Liter 31 g umkrystallisiertes Natriumthiosulfat, die andere im Liter etwa 10 g (genau abgewogen) umkrystallisiertes und bis zum Schmelzen erhitztes, dann im Exsiccator abgekühltes Kaliumbichromat enthält. Von letzterer Lösung mißt man genau 16 ccm ab, fügt 40 ccm Wasser, 2 ccm Jodkaliumlösung und 5 ccm Salzsäure hinzu und titriert vorsichtig und unter lebhaftem Umrühren mit der Thiosulfatlösung, bis die rote Jodfarbe abblaßt. Jetzt fügt man 2 ccm Jodzinkstärke hinzu und darauf wieder Thiosulfatlösung, bis die intensiv blaue Farbe in die blaßgrüne des Chromchlorids umschlägt. Waren z. B. 10,10 g Kaliumbichromat abgewogen und 16 ccm Thiosulfatlösung verbraucht, so entspricht, da 1 Mol.  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  (294,5) 4 Mol. HCl (145,83) erfordern, 1 ccm Thiosulfatlösung  $\frac{0,101 \cdot 145,8}{294,5 \cdot 16} = 3,125$  mg HCl. Der Titer muß bisweilen kontrolliert werden.

\*) Dieser Zusatz ist mit Rücksicht auf etwaige Anwesenheit saurer Phosphate nötig. S. bei Leo.

<sup>1)</sup> Diagnostik der Krankheiten der Verdauungsorgane. 1890. S. 115.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 13, S. 1. 1889. Skandinav. Arch. f. Physiol. Bd. 5, S. 305. 1895 oder Zeitschr. f. klin. Med. Bd. 32, S. 451. 1897.

**Ausführung.** 10 ccm der Flüssigkeit werden in einer Platinschale mit etwa 0,5 g chlorfreiem Bariumcarbonat versetzt, fein zerrieben, auf dem Wasserbade zur Trockne eingedampft, bei aufgelegtem Deckel und gelinder Temperatur (kaum Rotglühhitze) bis zum Grauwerden der Asche verbrannt und nach dem Erkalten wiederholt mit kleinen Mengen heißen Wassers extrahiert bis zum Ausbleiben der Chlorreaktion. Die Filtrate (etwa 50 ccm) werden mit 4 ccm Ammonacetatlösung und 1 ccm Essigsäure versetzt, eben aufgeköcht und mit 15 ccm Ammonchromatlösung gefällt. Nach 2 Stunden befreit man den Niederschlag durch Dekantation, Filtration und Waschen mit Wasser von Ammonchromat, bringt ihn dann mit dem Filter in das Becherglas, in dem die Fällung vorgenommen wurde, zurück, fügt 10 ccm Wasser und einige Tropfen Salzsäure hinzu und bewirkt durch Zerreiben des Filters mit dem Glasstab völlige Lösung des Niederschlags. Nun fügt man 30 ccm Wasser, 2 ccm Jodkaliumlösung und 5 ccm Salzsäure hinzu und titriert, wie oben bei der Titerstellung beschrieben.

Statt dessen kann man auch in der vom Bariumcarbonat abfiltrierten Flüssigkeit das Barium mit Schwefelsäure ausfällen und das Bariumsulfat bestimmen. Die Menge des gefundenen Bariumsulfats multipliziert mit 0,3123 gibt die Menge der Salzsäure.

Das Verfahren von Sjöqvist ist nicht brauchbar bei Gegenwart von Erdalkalichloriden und deshalb nicht auf den Magensaft von Haifischen, welcher diese Salze in reichlicher Menge enthält, anzuwenden (Weinland<sup>1</sup>).

b) Nach Lüttke<sup>2</sup>.

der Gesamtsalzsäure  
nach Lüttke.

**Prinzip.** Man bestimmt in einer Probe die gesamte Chlormenge, in einer anderen die Chlormenge, welche nach dem Verbrennen der organischen Substanz zurückbleibt. Die Differenz beider Werte auf Salzsäure umgerechnet gibt die Gesamtsalzsäure.

**Erforderliche Lösungen.** Die bei der Volhardschen Chlortitrierung (§ 574) aufgeführten.

**Ausführung.** In 10 ccm der Flüssigkeit wird eine Chlorbestimmung nach Volhard (§ 574) ausgeführt. In den seltenen Fällen, in denen die Flüssigkeit stark gefärbt ist, fügt man nach dem Silberzusatz 5—10 Tropfen Permanganatlösung hinzu.

Weitere 10 ccm werden in einer Platinschale zur Trockne verdampft. Den Rückstand verbrennt man über freier Flamme, aber vorsichtig, und nur so lange, bis die Kohle nicht mehr mit leuchtender Flamme brennt. Die Kohle wird angefeuchtet, zerrieben und mit 100 ccm warmem Wasser extrahiert. In dem Filtrat bestimmt man wieder den Chlorgehalt nach Volhard.

**Berechnung.** Die Differenz der in beiden Bestimmungen erhaltenen Chlormengen multipliziert mit 1,0284 ergibt die Menge der Gesamtsalzsäure.

Diese Methode gibt etwas höhere Werte als die vorige.

**783. Freie Salzsäure.** Es werden 5—10 ccm filtrierter Flüssigkeit unter Benutzung von Dimethylaminoazobenzol als Indicator (Kongorot eignet sich weniger) mit  $\frac{1}{10}$ -Natronlauge titriert (bis zur Lachsfarbe). Einen noch genaueren Wert erhält man, wenn man eine zweite der ersten gleiche Menge filtrierter Flüssigkeit mit etwa  $\frac{1}{10}$  ccm  $\frac{1}{10}$ -Lauge weniger versetzt als bei dem ersten Versuche verbraucht war, und nun so lange tropfenweise  $\frac{1}{10}$ -Lauge zufügt, bis ein Tropfen der Reaktionsflüssigkeit gerade die Phloroglucin-Vanillinprobe (§ 777) nicht mehr gibt.

<sup>1</sup>) Zeitschr. f. Biol. Bd. 55, S. 58. 1911. — v. Herwerden: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 56, S. 453. 1908. — v. Herwerden u. Ringer: desgl. Bd. 75, S. 290. 1911.

<sup>2</sup>) Dtsch. med. Wochenschr. 1891, S. 1325. — Martius u. Lüttke: Die Magensäure des Menschen. Stuttgart: Enke 1892. S. 101.

Die Berechnung des Prozentgehaltes von freier Salzsäure geschieht dann, da 1 ccm  $\frac{n}{10}$ -NaOH 0,00365 HCl neutralisiert, in der Weise, daß die verbrauchte Menge  $\frac{n}{10}$ -NaOH mit  $0,00365 \times 100$  multipliziert durch die Zahl der Kubikzentimeter Mageninhalt dividiert wird. Vielfach drückt man die Menge der freien Salzsäure in der Zahl von Kubikzentimetern  $\frac{n}{10}$ -NaOH aus, die nötig wären, um 100 ccm Mageninhalt gegen Dimethylaminoazobenzol zu neutralisieren, die der Gesamtsäure durch die entsprechende mit Phenolphthalein erhaltene Zahl (§ 780): also z. B. freie Salzsäure 30, Gesamtsäure 40. Für praktische Zwecke genügen diese Titrationsbestimmungen (Christiansen<sup>1</sup>).

der Wasserstoffionen-  
konzentration

Die Wasserstoffionenkonzentration als exaktes Maß der Acidität kann mittels Konzentrationsketten festgestellt werden (L. Michaelis<sup>2</sup>). Statt dieser umständlichen Methode kann man sich auch einer Zusammenstellung von Indicatoren bedienen, die so ausgewählt sind, daß sie eine Reihe in der Weise bilden, daß die Farbumschläge der einzelnen Indicatoren verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen entsprechen. Solche Reihen sind von L. Michaelis und Davidsohn<sup>3</sup>), Davidsohn und Müller<sup>4</sup>), Lanz<sup>5</sup>) u. a. angegeben worden.

der freien Salzsäure,  
Gesamtsalzsäure  
und Gesamtsäure  
nebeneinander.

Um freie Salzsäure, Gesamtsalzsäure und Gesamtsäure in einer Probe nebeneinander zu bestimmen, verfährt man so: Es werden 5—10 ccm filtrierten Mageninhalt mit 1—2 Tropfen  $\frac{1}{2}$ proz. alkoholischer Lösung von Dimethylaminoazobenzol und 2 Tropfen 1proz. alkoholischer Phenolphthaleinlösung versetzt, dann mit  $\frac{n}{10}$ -Natronlauge titriert, bis die rosafarbene Lösung gerade etwas gelblichrote Farbe (lachsfarben) zeigt (Punkt 1), dann weiter, bis sie ganz gelb wird (Punkt 2), und weiter, bis sie eine dauernde rotviolette Farbe annimmt (Punkt 3). Punkt 1 entspricht der freien Salzsäure, die Mitte zwischen Punkt 1 und Punkt 2 der Gesamtsalzsäure, Punkt 3 der Gesamtsäure.

#### *Nachweis und Bestimmung der Fermente im Mageninhalt.*

Pepsin.

784. **Pepsin.** Um zu untersuchen, ob eine Flüssigkeit, die aus dem Magen stammt, Eiweiß zu verdauen vermag, prüft man am besten ihr Verhalten zu ausgewaschenem Fibrin. Man übergießt eine kleine Rinderfibrinflocke in einem Reagensglase mit einer kleinen Menge der filtrierten Flüssigkeit und bringt das Glas in den Brutschrank (37—40°). Unter normalen Verhältnissen ist die Fibrinflocke spätestens in  $\frac{1}{2}$  Stunde so gut wie völlig gelöst. Da das Fibrin in Säure nicht ganz unlöslich ist, so muß stets ein Kontrollversuch mit Säure allein (8 Tl. konzentrierter Salzsäure auf 1000 Tl. Wasser) angestellt werden. Ist die Lösung ungenügend und tritt sie auch in den nächsten Stunden nicht ein, so darf man daraus noch nicht auf Abwesenheit oder Verminderung des Pepsins schließen. Der Grund kann vielmehr allein in mangelnder freier Salzsäure liegen. Um das zu entscheiden, setzt man der zu prüfenden Flüssigkeit vor Anstellung des Verdauungsversuchs auf 20 ccm etwa 1 ccm einer 2,5proz. Salzsäure hinzu.

Statt des Fibrins kann man auch in feinste Scheibchen geschnittenes gekochtes Hühnereiweiß benutzen. Dasselbe wird schwerer als Fibrin gelöst. Unter normalen Verhältnissen ist nach halbstündigem Aufenthalt im Brutschrank eine Abrundung der Kanten und eine deutliche Verkleinerung des Scheibchens nachweisbar.

Ein Fehlen des Pepsins ist selten, es wird beobachtet bei Atrophie der Magenschleimhaut, auch bei Carcinom.

<sup>1</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 46, S. 24ff. 1912.    <sup>2</sup>) desgl. Bd. 79, S. 1. 1917.

<sup>3</sup>) Zeitschr. f. exp. Pathol. u. Therapie Bd. 8, S. 398. 1910.

<sup>4</sup>) Zeitschr. f. d. ges. exp. Med. Bd. 26, S. 149. 1922.

<sup>5</sup>) Arch. f. Verdauungskrankh. Bd. 27, S. 282. 1921.

Die beschriebene Methode läßt natürlich auch eine quantitative Schätzung der verdauenden Kraft zu, indem diese ihren Ausdruck in der Geschwindigkeit der Lösung des Fibrins findet.

Quantitative  
Schätzung der  
verdauenden  
Kraft des Pepsins.

Grützner empfiehlt für diese Versuche die Benutzung von Fibrin, das mit einer konzentrierten neutralen Carminlösung getränkt und dann völlig mit Wasser ausgewaschen ist. Bei seiner Verdauung nimmt die Flüssigkeit eine mit der Lösung zunehmende Rotfärbung an. Aus der Stärke der Färbung läßt sich colorimetrisch dann die Pepsinmenge annähernd bestimmen. Statt Carmin kann man, da es sich nicht lange hält, als Vergleichslösung eine Lösung von rosanilintrisulfonsaurem Natrium (E. Merck) und Pikrinsäure nehmen (Sahli<sup>1</sup>).

Über genauere Methoden zur Bestimmung der relativen eiweißverdauenden Kraft s. § 504. Die dort geschilderte Mettsche Methode eignet sich für praktische Zwecke, ebenso die

Bestimmung der  
verdauenden Kraft  
des Pepsins.

Edestinmethode nach Fuld und Levison<sup>2</sup>). Es wird Edestin zu 1% in  $\frac{n}{33}$ -HCl gelöst, aufgeköcht, unter Toluol aufbewahrt. 1 ccm Mageninhalt wird mit 100, 200, 300 ccm usw.  $\frac{n}{33}$ -Salzsäure verdünnt, von jeder Verdünnung 1 ccm mit 2 ccm Edestinlösung versetzt, 1—2 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen, dann überschichtet mit starkem Ammoniak oder mit etwas Kochsalz in Substanz einmal geschüttelt. Die Probe, in der keine Ringbildung oder Trübung auftritt, gibt das Maß der Verdauungskraft des Pepsins.

Großsche Methode<sup>3</sup>). 1 g Casein wird mit 16 ccm 25 proz. HCl (spez. Gew. 1,124) in 1 l Wasser auf dem Wasserbade gelöst. Je 10 ccm der auf 39—40° vorgewärmten Flüssigkeit kommen in eine Reihe von Reagensgläsern, die mit steigenden Mengen des Mageninhalts (0,01—0,05 ccm) versetzt und dann für  $\frac{1}{4}$  Stunde in ein Wasserbad oder einen Brutschrank von 40° gestellt werden. Darauf Zusatz einiger Tropfen konzentrierter Lösung von Natriumacetat; unverdautes Casein fällt aus. Als Einheit gilt die Pepsinmenge, die das in 10 ccm befindliche Casein verdaut.

Auch die Ricinmethode nach Jacoby<sup>4</sup>) wird vielfach verwendet.

Das Verfahren zur Isolierung der peptischen Verdauungsprodukte ist § 505 angegeben.

**Labferment.** Man versetzt 10 ccm frischer Milch mit 1—2 ccm des filtrierten und auf ganz schwache Acidität gebrachten Mageninhaltes. Bei Gegenwart von Lab soll die Milch bei Körpertemperatur in 10—20 Minuten ohne Änderung der Reaktion gerinnen (§§ 510 und 511).

Labferment.

Das Labferment scheint unter pathologischen Verhältnissen häufiger als das Pepsin zu fehlen, z. B. bei Carcinom.

**Lipase.** Man bringt filtrierten und neutralisierten Mageninhalt mit einer natürlichen Emulsion (Eigelb, Rahm, Milch) zusammen und untersucht nach 5—15 Minuten in der § 513 angegebenen Weise auf abgespaltene Fettsäuren.

Lipase.

#### *Nachweis fremder Beimengungen im Mageninhalt.*

785. **Galle** findet sich häufig im Erbrochenen nach Eingabe von Vomitiven, bei Puerperalfieber, bei der Urämie usw. Der Nachweis der Gallensäuren geschieht nach § 237, 4, nachdem sie vorher nach § 246 isoliert worden sind, der Nachweis der Gallenfarbstoffe nach S. 421, 1. Auch Urobilin kann nach Extraktion mit Alkohol und Chloroform spektroskopisch nachgewiesen werden (§ 303).

<sup>1</sup>) Lehrbuch der klinischen Untersuchungsmethoden. 6. Aufl. 1913. S. 622.

<sup>2</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 6, S. 473. 1907.

<sup>3</sup>) Berl. klin. Wochenschr. 1908, S. 643.

<sup>4</sup>) Biochem. Zeitschr. Bd. 1, S. 53. 1906. — Solms: Zeitschr. f. klin. Med. Bd. 64, S. 159. 1907.

**Blut** ist gleichfalls oft in erbrochenen Massen vorhanden, aber in unzersetztem Zustande nur bei ganz aufgehobener Verdauung oder sehr reichlichen Magenblutungen. Meist ist es durch die Einwirkung der freien Säure des Magensaftes in eine kaffeesatzartige Masse verwandelt, welche Hämatin enthält. Zum Nachweis löst man die Masse in etwas Soda oder Natronlauge, filtriert, fügt Schwefelammonium hinzu und prüft mit dem Spektroskop auf Hämochromogen (§ 285). Enthalten die erbrochenen Massen andere aus den Speisen stammende Farbstoffe oder Galle in reichlicherer Menge, so entfernt man diese störenden Substanzen zunächst, indem man die Flüssigkeit mit etwas verdünnter Salpetersäure erwärmt und filtriert. Der Niederschlag wird in sehr verdünnter Natronlauge gelöst, die Lösung mit Schwefelammonium versetzt und geprüft.

**Eiweiß** in größeren Mengen kommt sehr häufig in ausgebrochenen Massen bei Magenkatarrh, Cholera usw. vor, ohne daß es mit der Nahrung eingeführt war. Es kann durch die Kochprobe (§ 325, 2), durch Salpetersäure (§ 325, 3) oder eine der anderen Reaktionen nachgewiesen werden.

Bei Magencarcinom findet sich Eiweiß im nüchternen Magen (Salomon). Man spült abends den Magen aus, ebenfalls morgens nüchtern mit 400 ccm physiologischer Kochsalzlösung. In der Spülflüssigkeit wird das Eiweiß nachgewiesen, evtl. seine Menge durch Kjeldahlbestimmung gefunden. Mit Essigsäure prüft man in einer Probe auf Mucingehalt.

Mucin enthält der Mageninhalt gewöhnlich in kleinen Mengen, in erhöhtem Maße bei Magenkatarrh und infolge Hinabschluckens von Speichel, Sputum aus Rachen und Atemorganen. Durch Essigsäure kann es ausgefällt werden, wenn es nicht durch Salzsäure und Pepsin verändert ist und daher die Reaktion nicht gibt.

**Freie Fettsäuren** (Ölsäure) enthält der carcinomatöse Mageninhalt (Grafe). Nachweis der Ölsäure im Ätherextrakt durch Jod.

**Gase<sup>1)</sup>**. Der Magen enthält immer etwas mit Speisen, Speichel usw. hinabgeschluckte Luft. Die Zusammensetzung ändert sich durch Resorption von Sauerstoff und Beimengung von Kohlensäure. Bei Gärung im Magen entstehen größere Mengen von Kohlensäure (bei Hefegärung der Kohlenhydrate besonders), auch wohl Wasserstoff (Essigsäuregärung). Durch Einschalten eines mit Wasser gefüllten Rohrs, das oben eine Capillare mit Schlauchstück und Quetschhahn trägt, oder einer umgekehrten Wulfschen Flasche bei der Magenspülung, welche zunächst die Magenflüssigkeit, dann das Gasgemenge aufnimmt, läßt sich das Gas aufsammeln. Seine Analyse erfolgt mit den Hempelschen Gasbestimmungsmethoden.

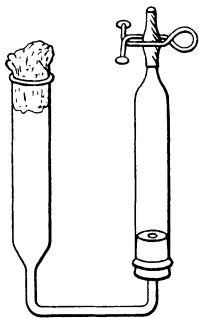


Abb. 38. Apparat zum Auffangen von Gärungsgasen nach G. Hoppe-Seyler.

Auch kann man Mageninhalt in einem Gärungsrohr im Brutschrank gären lassen und dann das gebildete Gas untersuchen.

Das mit Ansatzschlauch und Quetschhahn versehene Rohr (Abb. 38) wird mit Mageninhalt bis oben gefüllt und mit einem Gummistopfen verschlossen, der von einem U-förmigen Steigrohr durchbohrt ist. Eintritt von Luft in das Gärungsrohr ist zu vermeiden. Das Steigrohr ist mit Watteverschluß versehen. Das Ganze kann vorher sterilisiert werden.

**Nachweis und Bestimmung von Ammoniak, Harnstoff, Zucker im Mageninhalt oder im Erbrochenen** geschehen nach §§ 642, 643 und 652.

<sup>1)</sup> G. Hoppe-Seyler: Dtsch. Arch. f. klin. Med. Bd. 50, S. 82. 1892. — Wissel: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 21, S. 234. 1895/96. — G. Hoppe-Seyler: 14. Kongr. f. inn. Mediz. S. 561. 1896.



### Untersuchung des Pankreassaftes.

786. Der normale Pankreassaft des Hundes (aus einer Fistel gewonnen) stellt eine klare, dickliche, alkalische Flüssigkeit mit wechselndem Trockenrückstand dar. Der (höchstwahrscheinlich) normale, von Glaessner<sup>1)</sup> untersuchte menschliche Pankreassaft war ebenfalls wasserklar, leicht schäumend und stark alkalisch (gegen Lackmus und gegen Phenolphthalein).

**Bestandteile.** Die festen Bestandteile sind zum größten Teil Protein-stoffe (Albumin, Globulin, Albumosen, Peptone, bei der Hydrolyse Purinbasen liefernde Substanzen in geringer Menge<sup>2)</sup>). Der Eiweißgehalt kann so reichlich sein, daß beim Kochen nach Ansäuern mit Essigsäure völlige Gerinnung erfolgt. Außerdem sind Fette, Seifen, Cholesterin und ein wenig Leucin nachgewiesen worden, ferner mehrere Enzyme: Trypsinogen, Labferment, diastatisches Ferment, Maltase (in dem von Glaessner untersuchten menschlichen Pankreassaft fehlten Labferment und Maltase), Lipase und ungefähr 0,9% anorganische Salze (hauptsächlich Kochsalz und Alkalicarbonat, ferner Phosphorsäure, Calcium, Magnesium und Eisen).

Die Analyse des oben erwähnten menschlichen Pankreassaftes ergab 1,25 bis 1,27% Trockensubstanz, darunter 0,13—0,17% koagulables Eiweiß, 0,4—0,5% in Alkohol lösliche organische Stoffe und 0,57—0,7% anorganische Salze. Im Sekret einer menschlichen Pankreasfistel fand ich (G. Hoppe - Seyler) 1,56% Trockensubstanz, darunter 0,142% koagulables Eiweiß, und zwar 0,052% Albumin, 0,09% Globulin, ferner 0,031% Ätherextrakt. Spez. Gew. 1,01. Die Alkaleszenz entsprach 75 ccm  $\frac{1}{10}$ -Salzsäure (Lackmus), 110 ccm (Dimethylaminoazobenzol) auf 100 ccm Pankreassaft.

#### *Nachweis der Fermente im Pankreassaft.*

787. Trypsinogen. Man bringt in einem Reagensglase zu dem Saft einige Tropfen Darmsaft oder durch Auspressen vom Dünndarm erhaltenen Saft (dessen Kinase aus dem Trypsinogen wirksames Trypsin macht), eine Fibrinflocke und etwas Toluol und beobachtet, ob bei Bruttemperatur Lösung erfolgt. Weiteres s. §§ 506 und 507.

Labferment. Vgl. §§ 510 und 511 und 784.

Diastatisches Ferment und Maltase. Vgl. §§ 514 und 515 und 766.

Lipase. Vgl. §§ 512 und 513.

#### *Nachweis und Bestimmung der übrigen Stoffe im Pankreassaft.*

Man verfährt nach den Vorschriften des Abschnittes, welcher von der „Untersuchung der serösen Flüssigkeiten“ handelt (§ 630 ff.).

#### *Pankreassteine.*

788. Konkremente finden sich in seltenen Fällen im Ductus Wirsungianus. Sie bestehen in der Regel aus Calciumcarbonat, Calciumphosphat und organischer, stickstoffhaltiger Materie, aber in sehr wechselnden Verhältnissen. Die Untersuchung geschieht in derselben Weise wie die der Speichelsteine (§ 769). Es kommen aber auch Steine vor, welche viel Cholesterin, Fett, Fettsäuren und Seifen enthalten. Literatur über Pankreassteine bei Scheunert und Bergholz<sup>3)</sup>.

### Untersuchung des Darmsaftes.

789. Der Darmsaft, im wesentlichen das Sekret der Lieberkühnschen Drüsen, ist gelegentlich von Menschen mit Darmfisteln erhalten worden, siehe

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 40, S. 465. 1903/04.

<sup>2)</sup> Schittenhelm: Dtsch. Arch. f. klin. Med. Bd. 81, S. 450. 1904.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 52, S. 338. 1907.

z. B. Demant<sup>1)</sup>, Hekma<sup>2)</sup>). Man gewinnt ihn in einfacher Weise von Tieren, denen eine Thiry-Vellasche Fistel angelegt ist. Er stellt eine dünn- oder mehr dickflüssige, gegen Lackmus alkalisch reagierende Flüssigkeit dar und ist mit mehr oder weniger gallertigen Klumpen oder Flocken durchsetzt.

**Bestandteile.** Es sind in ihm nachgewiesen: Eiweiß, Mucin, Erepsin<sup>3)</sup> (§ 508), diastatisches Ferment in geringer Menge, Invertin, Maltase, Lactase, Lipase, Enterokinase, anorganische Salze, darunter Kochsalz und so viel Natriumcarbonat, daß der Saft beim Übergießen mit Salzsäure aufbraust.

Die Untersuchung geschieht wie die des Pankreassaftes (§ 787).

Um auf Erepsin zu prüfen, versetzt man den Darmsaft mit einer Lösung von Deuteroalbumose und etwas Chloroform und prüft nach 24stündigem oder mehrtägigem Aufenthalt im Brutschrank auf Leucin und Tyrosin in der § 507, a und § 616 angegebenen Weise.

Duodenalsaft.

Duodenalsaft (Gemisch von Galle, Pankreassaft und Darmsaft) wird gewöhnlich mit der Duodenalsonde (langer, dünner Gummischlauch mit durchbohrtem metallenen Knöpfchen am Ende, der nüchtern heruntergeschluckt wird und bei rechter Seitenlage in das Duodenum hineingeleitet) gewonnen, indem von Zeit zu Zeit etwas mit einer Spritze angesaugt wird. Er gleicht in nüchternem Zustande sehr dem Pankreassaft, vermischt mit etwas Galle, ist daher goldgelb bis braungelb gefärbt, zäh, fadenziehend, klar oder leicht trübe, gegen Lackmus neutral oder schwach alkalisch, verbraucht 20–40 ccm  $\frac{n}{10}$ -HCl bei Dimethylaminoazobenzol als Indicator auf 100 ccm, enthält 1,44% Trockensubstanz, davon 1,027 organische Substanz (0,142% koagulierbares Eiweiß, 0,09% Stickstoff), 0,413% Asche, spez. Gew. beträgt 1005 (Einhorn und Rosenbloom<sup>4)</sup>). Durch Einspritzen von Äther durch die Sonde erhält man mehr Pankreassaft, von Wittepeptonlösung dunkle Blasengalle, während sonst die hellere Lebergalle kontinuierlich sich ergießt. Eiweiß ist vermehrt bei Entzündung der Gallenwege (Icterus catarrhalis, Cholangitis), daneben finden sich Peptone, Albumosen und andere Eiweißabbauprodukte. Neben Bilirubin und Gallensäuren enthält Duodenalsaft immer etwas Urobilin (Strauß und Hahn<sup>5)</sup>). Von Fermenten sind Trypsin, Diastase, Lipase vorhanden. Die Untersuchung geschieht im wesentlichen so, wie es bei Pankreassaft (§ 786) und Galle (§ 790) angegeben ist.

Weniger gut eignet sich zur Untersuchung Duodenalinhalt, der durch Erbrechen bei nüchternem Magen oder nach Einführen von 200 ccm Olivenöl in den leeren Magen, nachdem vorher 1 Teelöffel Magnesiumoxyd (Magnesia usta) in Wasser hinabgeschluckt ist, gewonnen ist.

### Untersuchung der Galle.

790. Die Galle stellt im normalen Zustande bei Menschen und Tieren eine schleimige, völlig klare, braune, gelbbraune, grüne oder bläulichgrüne, bitter schmeckende und eigentümlich aromatisch riechende Flüssigkeit von neutraler oder (gegen Lackmus) schwach alkalischer Reaktion dar. Man unterscheidet die Lebergalle, das unmittelbare Sekret der Leber, und die Blasengalle, welche in der Gallenblase durch Resorption von Wasser und Beimengung von Schleim eine Konzentration erfahren hat. Die frische menschliche Lebergalle

<sup>1)</sup> Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. Bd. 75, S. 419. 1879.

<sup>2)</sup> Ref. Malys Jahresber. d. Tierchem. 1902, S. 468.

<sup>3)</sup> Salaskin: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 35, S. 419. 1902. — Kutscher u. Seemann: desgl. Bd. 35, S. 442. 1902. — Hekma: a. a. O.

<sup>4)</sup> Arch. of intern. med. Bd. 6, S. 666.

<sup>5)</sup> Münch. med. Wochenschr. 1920, S. 1286.

scheint stets rotgelb oder gelbbraun gefärbt zu sein. Menschliche Galle erhält man aus Gallen fisteln oder, gemischt mit Pankreassekret und Darmsaft mittels der Duodenalsonde (siehe § 789), und zwar im nüchternen Zustand dünnflüssige, hellgelbe Lebergalle, nach Einspritzung von 30 ccm 5proz. Wittepeptonlösung ins Duodenum dunkle, dickflüssige Blasengalle (Stepp<sup>1</sup>).

**791. Bestandteile.** Die menschliche Lebergalle enthält ungefähr 2—3% feste Stoffe, darunter 0,7—0,8% anorganische Salze, die Blasengalle ungefähr 10—17% feste Stoffe, darunter ebenfalls gegen 1% anorganische Salze. Die Galle ist frei von Eiweiß (keine Gerinnung beim Kochen) und normalerweise nach Schittenhelm<sup>2</sup>) auch frei von Nucleoproteiden. Sie enthält neben wenig Gallenschleim, welcher aus Phosphorprotein und Mucin besteht (in der Rindergalle überwiegt das Phosphorprotein) in der Hauptsache eigentümliche, fast immer größtenteils an Natron gebundene Säuren (gepaarte Gallensäuren, § 243 ff.), die sich außer in Galle und Darminhalt im normalen Zustande im ganzen Körper nicht finden. Gallensäuren

In der menschlichen Galle überwiegt die Glykocholsäure über die Taurocholsäure (2—14 : 1); letztere kann auch ganz fehlen (Hammarsten<sup>3</sup>). Ferner findet sich Glykodesoxycholsäure (Glykocholeinsäure).

In der Rindergalle findet sich reichlich Glykocholsäure, ferner Glykodesoxycholsäure (Glykocholeinsäure), Taurocholsäure, Taurodesoxycholsäure (Taurocholeinsäure), außerdem eine gepaarte Säure, welche bei der Hydrolyse Lithocholsäure liefert.

Die Gallen vom Kaninchen, Hasen, Känguruh, Nilpferd, Orang-Utan enthalten überwiegend Glykocholsäure (Hammarsten<sup>4</sup>).

In der Schweinegalle findet sich Hyoglykocholsäure.

In der Galle von Fleischfressern, Vögeln, Schlangen und Fischen, Schafen und Ziegen überwiegt die Taurocholsäure\*) (Hammarsten<sup>4</sup>).

Die Hundegalle enthält neben reichlich vorhandener Taurocholsäure auch Taurodesoxycholsäure (Taurocholeinsäure), die der Gänsegalle Taurochenocholsäure, die Galle von Seehund und Walroß Phocaetaurocholsäure. Aus verseifter Eisbären-galle wurde von Hammarsten Ursocholeinsäure dargestellt.

In der Haifischgalle findet sich gepaarte Schwefelsäure (Scymnolschwefelsäuren, § 248), keine Taurocholsäure. Eine ähnliche gepaarte Schwefelsäure kommt in der Galle einer Roche (*Raja batis*) vor, während sie bei anderen bisher untersuchten Fischen (Makrele, Dorsch, Seewolf) fehlt (Hammarsten<sup>4 u. 5</sup>). Gepaarte Schwefelsäuren.

In der menschlichen Galle (nicht regelmäßig und vielleicht im Zusammenhang mit der Darmfäulnis) und in der Nilpferdgalle sind gepaarte Schwefelsäuren anderer Art (vielleicht dieselben wie im Harn) gefunden worden (Hammarsten<sup>4 u. 2</sup>). Die Hundegalle enthält keine gepaarte Schwefelsäure (v. Bergmann<sup>6</sup>).

Weitere Bestandteile der Galle sind Cholesterin, gepaarte Glucuronsäuren, geringe Mengen von Fett und Seifen, in geringer Menge Harnstoff (reichlich in der Haifischgalle). Cholesterin und andere Stoffe.

\*) Indessen bedürfen diese Resultate, welche durch Berechnung der Taurocholsäure aus dem Schwefelgehalt gewonnen worden sind, der Bestätigung, da in verschiedenen Gallen Ätherschwefelsäure und andere schwefelhaltige organische Substanzen aufgefunden worden sind (Hammarsten<sup>4</sup>).

<sup>1</sup>) Zeitschr. f. klin. Med. Bd. 89, S. 313. 1920.

<sup>2</sup>) Dtsch. Arch. f. klin. Med. Bd. 81, S. 449. 1904.

<sup>3</sup>) Zur Kenntnis der Lebergalle des Menschen. Mitgeteilt v. d. Kgl. Ges. d. Wissensch. zu Upsala am 15. Juni 1893. — Oerum: Skandinav. Arch. f. Physiol. Bd. 16, S. 273. 1904.

<sup>4</sup>) Ergebn. d. Physiol. Bd. 4, S. 7. 1905.

<sup>5</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 24, S. 322. 1898.

<sup>6</sup>) Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 4, S. 196. 1904.

- Phosphatide.** Ferner finden sich Lecithin und andere Phosphatide. Die Menge der in Alkohol löslichen phosphorhaltigen Verbindungen schwankt bei verschiedenen Tieren sehr; am reichlichsten finden sie sich in der Eisbäregalle (etwa 1% Phosphor) und Hundegalle (0,7% Phosphor), in der menschlichen Lebergalle ist 0,1—0,6% Phosphor gefunden (Hammarsten<sup>1</sup>).
- Fermente.** Von Fermenten sind diastatische und proteolytische, Oxydasen und Katalasen nachgewiesen.
- Gallenfarbstoffe.** Was die Gallenfarbstoffe betrifft, so ist beim Menschen, ebenso bei den meisten Fleischfressern, wie es scheint, das Bilirubin der hauptsächlich färbende Bestandteil; in manchen Gallen, sehr häufig auch in der menschlichen, findet sich auch Urobilin und Urobilinogen, regelmäßig in der in das Duodenum entleerten Galle (Strauß und Hahn<sup>2</sup>). Im Hungerzustand zeigt sich stets grüne Färbung der Galle durch Biliverdin, ebenso im erbrochenen Mageninhalt.
- Anorganische Stoffe.** Von anorganischen Stoffen enthält die Galle stets Salzsäure, Phosphorsäure, auch wohl Schwefelsäure, gebunden an Natrium, Kalium, Calcium, Magnesium, Eisen, oft auch Spuren von Kupfer; in größter Menge finden sich Salzsäure und Natrium.
- Pathologische Bestandteile.** Pathologische Bestandteile. Eiweiß, veränderter Blutfarbstoff, Zucker kommen öfters vor, auch Aminosäuren (Leucin und Tyrosin) sind nachgewiesen worden. Durch Entzündung der Gallenblase und behinderten Abfluß kann eine Ansammlung von farbloser, fadenziehender Flüssigkeit in der Gallenblase zustande kommen, die gar keine Galle mehr, hauptsächlich Pseudomucine und Eiweißstoffe, enthält. Über Konkreme in der Gallenblase s. §§ 800ff.
- 792. Verhalten verschiedenen Einwirkungen gegenüber.** Verdampft man Galle auf dem Wasserbade zur Trockne, so hinterbleibt ein harziger, spröder, beim Erwärmen erweichender, sehr hygroskopischer Rückstand, der bei der trockenen Destillation in reichlicher Menge ein stark aromatisch riechendes Öl liefert.
- Verhalten zu:**  
**Alkohol** Die Galle ist mit Wasser in jedem Verhältnis mischbar, gibt dagegen mit Alkohol einen reichlichen, flockigen, beim Trocknen sehr schwindenden Niederschlag von Gallenschleim mit etwas Farbstoff und Spuren von diastatischem Ferment; derselbe löst sich in Wasser nur schwer und unvollständig wieder auf.
- Ammonsulfat** Durch Ammonsulfat werden nach Méhu<sup>3</sup>) Gallensäuren, Gallenfarbstoff  
**Natriumchlorid** und Schleim quantitativ ausgefällt. Durch Kochsalz bis zur Sättigung eingetragene Rindergalle und Hundegalle nicht, Dorschgalle reichlich gefällt (Tengström<sup>4</sup>). Da Lösungen von glykochol- und taurocholsauren Salzen durch Sättigung mit Kochsalz gefällt werden, so muß in manchen Gallen eine Substanz (oder Substanzen) vorhanden sein, welche diese Fällung verhindert. Ein solcher Stoff, welcher in bestimmter relativer Menge diese Wirkung ausübt, ist ölsaures  
**Natriumsulfat** Natrium (Tengström). Mit krystallisiertem Natriumsulfat in hinreichender Quantität versetzt, gibt die Schweinegalle einen flockigen Niederschlag von hyglykocholsaurem Alkali, der Niederschlag ist in Wasser wieder leicht löslich; andere Gallensäuren geben diesen Niederschlag nicht, so daß man Schweinegalle auf diese Weise von anderer Galle unterscheiden kann.
- Alkalien** Alkalien verändern die Farbe der Galle, bewirken aber keine Nieder-  
**Säuren** schläge, während diese durch Säuren reichlich entstehen. Fügt man wenig Essigsäure zur Galle, so wird zunächst nur der Schleim gefällt, ebenso beim Zusatz von einigen Tropfen sehr verdünnter Mineralsäure; durch Zusatz von

<sup>1</sup>) *Ergebn. d. Physiol.* Bd. 4, S. 15. 1905.

<sup>2</sup>) *Münch. med. Wochenschr.* 1920, S. 1281.

<sup>3</sup>) *Journ. de physiol. et de pathol. gén.*, August 1878.

<sup>4</sup>) *Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem.* Bd. 41, S. 217. 1904.

großen Säuremengen entstehen Niederschläge von Glykocholsäure zunächst in Flocken, die bald zur harzigen Masse zusammenbacken, sich aber in konzentrierter Schwefelsäure mit bräunlicher Farbe und allmählich auftretender starker grünlicher Fluorescenz wieder lösen (Fluorescenzreaktion auf Gallensäure, S. 336, 3).

Chlorbarium bringt in der frischen Galle keinen Niederschlag hervor, <sup>anderen Salzen.</sup> dagegen geben Bleizuckerlösung und Bleiessig und überhaupt viele Salze schwerer Metalle unlösliche Niederschläge, die aus Verbindungen der Gallensäuren mit diesen Metallen bestehen. Durch diese Fällungen kann man Glykochol- und Taurocholsäure bis zu einem gewissen Grade voneinander trennen.

Fällt man Rindergalle nach Entfernung des Schleimes durch Alkohol und Entfärbung durch Tierkohle nacheinander mit Bleizucker, Bleiessig und Bleiessig + Ammoniak, so enthält die erste Fällung etwa 34, die zweite etwa 66 und die dritte etwa 73% der Gallensäuren als Taurocholat. Fällt man mit Eisenchlorid, so findet sich im Niederschlag etwa 49, im Filtrat etwa 84% der Gallensäuren als Taurocholat (Tengström<sup>1</sup>).

Beim Stehen an der Luft unterliegt Galle leicht der Fäulnis <sup>Fäulnis.</sup> unter Zuhilfenahme der alkalischen Reaktion und Abspaltung der in frischer Galle nicht vorhandenen Cholsäure aus Taurocholsäure. Diese große Fäulnisfähigkeit hängt mit der Anwesenheit des Gallenschleimes zusammen, denn sobald dieser durch Alkohol ausgefällt ist, zeigt die Flüssigkeit, auch nach Verdunsten des Alkohols, keine Neigung zur Zersetzung mehr. Auch die Farbstoffe erfahren bei der Fäulnis der Galle Veränderungen, doch bleiben sie auch in fauler Galle noch lange Zeit durch die Gmelinsche Reaktion (S. 421, 1) nachweisbar.

#### *Nachweis normaler Bestandteile der Galle.*

**793. Anorganische Bestandteile.** Da die Galle schwefel- und phosphorhaltige organische Substanzen (Taurocholsäure, Phosphatide, Gallenschleim) enthält, so ist eine direkte Veraschung aus den § 632 angeführten Gründen unstatthaft, vielmehr in folgender Weise zu verfahren. Man verdunstet die Galle bei niedriger Temperatur zur Trockne, zieht den Rückstand mit absolutem Alkohol aus und erhält so einen in Alkohol unlöslichen Rückstand und einen alkoholischen Auszug.

Der Rückstand, welcher den Schleimstoff der Galle, die Phosphate und Sulfate, sowie auch einen Teil der Chloride enthält, wird mit verdünnter Essigsäure behandelt. Die essigsäure Lösung wird verdunstet, der Rückstand nach § 525 verascht und der wässrige und salzsaure Auszug nach §§ 531 und 532 untersucht. Der in verdünnter Essigsäure unlösliche Teil, welcher den Schleimstoff und an Phosphorsäure gebundenes Eisen enthält, wird ebenfalls nach § 525 verascht und die Asche auf Eisen untersucht.

Der alkoholische Auszug, welcher die gallensauren Natronsalze, Phosphatide sowie kleine Mengen von Chloralkalien enthalten kann, wird bei niedriger Temperatur eingedampft und nach Entfernung der Phosphatide durch Äther nach § 525 verascht und der wässrige Auszug nach § 531 auf Salzsäure und Alkalien geprüft.

Da die Galle oft Kupfer enthält, ist bei der Untersuchung auf dieses zu achten (vgl. § 532, †-Anmerkung).

**Gallenschleim.** Man fällt die Galle mit Alkohol, löst den Niederschlag in ganz verdünntem Alkali, fällt wieder und wiederholt Lösung und Fällung. Der Niederschlag wird nach § 634, 1a auf Glukoproteid, nach § 634, 1b auf Phosphorproteid geprüft.

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 41, S. 210. 1904. — Gullbring: desgl. Bd. 45, S. 448. 1905.

**794. Gallensäuren.** Zum Nachweis dienen die Fluoreszenz- und die Pettenkofersche Reaktion (S. 336 und 337), die beide direkt mit der Galle angestellt werden können. Auch stalagmometrisch kann man ihre Anwesenheit nachweisen.

In den seltenen Fällen, in denen diese Reaktionen bei menschlichen Blasengallen versagen, enthalten diese Flüssigkeiten auch keine Gallensäuren mehr.

Zur Isolierung benutzt man das S. 343, 1 beschriebene Verfahren. Die dabei erhaltenen krystallisierten Salze (Plattnersche krystallisierte Galle) stellen in den meisten Fällen Gemenge verschiedener gallensaurer Salze dar und die Gemenge sind wieder bei verschiedenen Tieren verschieden (§ 791).

Die wässerigen Lösungen der auf diese Weise aus verschiedenen menschlichen Gallen isolierten Gemenge gallensaurer Salze verhalten sich nach Hammarsten<sup>1)</sup> verschieden: die einen werden durch wenig Essigsäure sowie durch Chlorbarium und Chlorcalcium gefällt, die anderen nicht oder nur erst durch einen großen Überschuß von Essigsäure. Durch Mineralsäuren, Kupfersulfat, Silbernitrat, Eisenchlorid und Bleizucker werden sie alle gefällt.

Über die Isolierung der Glykocholsäure, Glykcholeinsäure, Taurocholsäure und Taurocholeinsäure s. §§ 243—247.

**795. Cholesterin, Phosphatide, Fett.** Die alkoholisch-ätherische Lösung, aus der sich die gallensauren Natronsalze krystallinisch abgeschieden haben (s. S. 343, 1), hinterläßt beim Verdunsten Cholesterin, Phosphatid und Fett (zum Teil krystallisiert). Man nimmt den Rückstand nochmals mit Äther auf, filtriert und verdunstet. Zum Nachweis der Phosphatide prüft man einen Teil des Rückstandes auf Phosphor nach § 54, zum Nachweis des Cholesterins verseift man den Rest nach § 94, schüttelt die Seifenlösung mit Äther aus und prüft den Ätherrückstand nach § 232.

Über Isolierung von typischem Lecithin und anderen Phosphatiden aus Eisbärengalle s. Hammarsten<sup>2)</sup>.

Eine in der Galle etwa vorhandene jecorin- oder protagonartige Substanz findet sich auch in jenem Ätherrückstande neben Cholesterin, Phosphatid und Fett. Ihr Nachweis gelang Hammarsten<sup>3)</sup> in der Eisbärengalle in folgender Weise. Man löst den Rückstand in möglichst wenig absolutem Alkohol, fällt mit überschüssigem Aceton, löst den abfiltrierten Niederschlag in Alkohol und verdünnt die filtrierte Lösung mit viel Alkohol. Ein hierbei sich abscheidender Niederschlag wird abfiltriert, mit Alkohol ausgewaschen und in möglichst wenig Wasser gelöst. Den aus der Lösung auf Zusatz von Alkohol ausfallenden Niederschlag prüft man auf Schwefel- und Phosphorgehalt und auf sein Vermögen, Kupferoxyd in alkalischer Lösung beim Erwärmen zu reduzieren. Eine ähnliche Substanz kommt in der Walroßgalle vor (Hammarsten<sup>4)</sup>).

Aus Eisbären<sup>5)</sup> und Menschengalle<sup>6)</sup> wurde sie auch in der S. 916 oben beschriebenen Weise gewonnen.

**Harnstoff.** Man fällt die Galle mit überschüssigem Alkohol, läßt bis zum nächsten Tage stehen, filtriert, dampft bei gelinder Temperatur ab, nimmt den Rückstand mit wenig Alkohol auf und fällt den alkoholischen Auszug mit großem Überschuß von Äther. Die nach einiger Zeit klar abgegossene Lösung wird bei niedriger Temperatur verdunstet, der Rückstand in wenig Wasser aufgenommen und die filtrierte Flüssigkeit weiter nach § 643 behandelt.

Man kann den Harnstoff auch indirekt mit Hilfe der Ureasmethode nachweisen und bestimmen. S. darüber Cohen<sup>7)</sup>.

1) Zur Kenntnis der Lebergalle des Menschen. Mitgeteilt v. d. Kgl. Ges. d. Wissensch. zu Upsala am 15. Juni 1893. — Oerum: Skandinav. Arch. f. Physiol. Bd. 16, S. 322. 1904.

2) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 36, S. 528. 1902. 3) desgl. Bd. 32, S. 446. 1901.

4) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 61, S. 454. 1909.

5) Hammarsten: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 32, S. 439. 1901.

6) Oerum: Skandinav. Arch. f. Physiol. Bd. 16, S. 275. 1904.

7) Biochem. Zeitsch. Bd. 139, S. 516. 1923.

**796. Gallenfarbstoff.** Der Nachweis läßt sich in der mit Wasser verdünnten Galle direkt mit der Gmelinschen Probe (S. 421) führen.

Schüttelt man die Galle von Menschen oder fleischfressenden Tieren mit Chloroform, so geht ein Teil des Bilirubins und Cholesterins in Lösung und scheidet sich beim Verdunsten der abgehobenen Chloroformlösung krystallinisch aus. Man löst in ganz verdünntem Alkali und stellt mit der Lösung die Gmelinsche Reaktion (S. 421) oder Hammarstensche Reaktion (S. 422) an. Eine quantitative Bestimmung hat bisher nicht ausgeführt werden können. Weder die colorimetrische noch die spektrophotometrische Methode ist dazu geeignet, da die Galle, auch die frisch sezernierte, neben Bilirubin auch Biliverdin und sehr häufig auch Urobilin oder einen ähnlichen Farbstoff enthält und eine quantitative Trennung dieser Farbstoffe voneinander nicht möglich ist.

**Urobilin.** Man entfärbt die Galle nach Hammarsten mit Tierkohle (welche das Bilirubin leicht, aber das Urobilin nur schwer zurückhält) und untersucht, ob das Filtrat direkt oder nach genügender Konzentration den Streifen zwischen den Linien *b* und *F* und auf Zusatz von Chlorzink und Ammoniak die Fluoreszenzerscheinung zeigt (§ 303).

Man kann auch die evtl. mit Wasser verdünnte Galle mit dem gleichen bis 3fachen Volumen absolutem Alkohol, welcher 10% Zinkacetat enthält und vorher durchgeschüttelt ist (Schlesinger), versetzen, filtrieren und das Filtrat auf Absorptionsstreifen und Fluoreszenz prüfen. Ist die Galle zu reich an Gallenfarbstoff, entfärbt man sie vorher durch Zufügen von Calciumchlorid und Ammoniak bis zur schwach sauren Reaktion und Filtration.

#### *Nachweis pathologischer Bestandteile der Galle.*

**797. Eiweiß.** Man säuert die Galle mit sehr stark verdünnter Essigsäure an, aber so schwach, daß noch keine Fällung von Gallenschleim entsteht, fügt einige Tropfen Kochsalzlösung hinzu und kocht. Auch bei geringem Gehalt an Eiweiß tritt Trübung oder Niederschlag ein. Fügt man mehr Essigsäure hinzu, so fällt außer dem Gallenschleim auch mehr oder weniger Eiweiß als Gallensäureeiweißverbindung in der Kälte aus und entzieht sich so dem Nachweis (Brauer<sup>1</sup>).

**Zucker.** Man fällt die Galle mit Alkohol und wenig Essigsäure (bis zur sauren Reaktion), filtriert, dampft ein, nimmt den Rückstand mit Wasser auf und prüft die mit Tierkohle möglichst entfärbte wässrige Lösung mit der Trommerschen Probe (§ 97).

**Aminosäuren.** Man fällt die Galle mit Bleiessig und etwas Ammoniak völlig aus, filtriert, entfernt aus dem Filtrat das Blei durch Schwefelwasserstoff, dampft ein und untersucht den Rückstand nach § 616 und 650.

**Blut.** Da die Galle bei Bluttemperatur binnen kürzester Zeit nicht allein Blutkörperchen auflöst, sondern auch das Oxyhämoglobin in Hämatin und Proteinstoff spaltet und die Spaltungsprodukte zum größten Teil als unlöslichen Niederschlag abscheidet, so ist Blut nur dann in der Gallenblase zu finden, wenn diese keine Galle enthält. In obiger Weise verändertes Blut findet sich nicht allzu selten. Die Lösung dieser krümligen Niederschläge in verdünnter Natronlauge läßt auf Zusatz von Schwefelammonium das Spektrum des Hämochromogens erkennen (§ 285).

#### *Bestimmung des Trockenrückstandes in der Galle.*

**798.** Man wägt eine Menge, die bei Lebergalle 10—20 ccm, bei Blasen-galle weniger beträgt, in einem mit eingeriebenem Glasdeckel versehenen flachen Glasgefäß, dessen Gewicht bekannt ist, ab (oder auch in einem Schälchen, welches in einem verschließbaren Wägegefäß Platz hat und mit diesem zusammen

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 40, S. 203. 1903/04.

gewogen ist), dampft bei 40—45° ein, trocknet bei 100 bis höchstens 105° bis zum konstanten Gewicht und wägt in verschlossenem Gefäß.

Eine Veraschung und Wägung des Glührückstandes anzuschließen, hat keinen Zweck, da sich auf diese Weise die Menge der anorganischen Salze nicht genau bestimmen läßt (vgl. § 793).

*Bestimmung der Gallensäuren in der Galle.*

Eine Bestimmung der Gallensäuren, ausgedrückt durch ihren Stickstoffgehalt, welche von Schmidt u. Dart<sup>1)</sup> angegeben ist, beruht auf ihrer Spaltbarkeit beim Erhitzen mit Natronlauge, wobei Glykokoll und Taurin frei werden und der Ermittlung des in diesen Aminosäuren enthaltenen Stickstoffs nach v. Slyke. Auf Grund einer Bestimmung des Schwefelgehaltes der von Eiweiß befreiten Galle läßt sich berechnen, wieviel des Stickstoffs auf Taurin und auf Glykokoll kommt, unter der Voraussetzung, daß keine anderen schwefelhaltigen Substanzen vorhanden sind.

*Bestimmung des Gesamtstickstoffs, des Ammoniaks und einzelner Aschenbestandteile in der Galle.*

Man bestimmt den Gesamtstickstoff nach Kjeldahl (§ 558), das Ammoniak nach § 642, die einzelnen Aschenbestandteile nach § 533 ff.

*Quantitative Analyse der Galle.*

799. Diese Bestimmung geschah früher nach einem von Hoppe - Seyler angegebenen, von Hammarsten<sup>2)</sup> modifizierten Verfahren etwa in folgender Weise:

Ungefähr 50 g der von etwa vorhandenen zusammenhängenden zähen Massen oder Klümpchen durch Zentrifuge befreiten Blasengalle\*) werden genau gewogen und mit der annähernd 10fachen Menge Alkohol gefällt. Nach längerem Stehen wird der Niederschlag auf ein gewogenes aschefreies Filter gebracht, mit kaltem und dann mit warmem Alkohol gewaschen, mit Alkohol in das Becherglas zurückgespritzt, eine Zeitlang auf dem Wasserbade bei 40—45° erwärmt, auf dasselbe Filter gebracht und noch einige Male in dieser Weise behandelt\*\*). Man erhält so einen Filterrückstand (A) und ein alkoholisches Filtrat (B) (+ Waschalkohol).

Gallenschleim.  
Ferriphosphat.

A. Filterrückstand (Gallenschleim mit etwas anhaftendem Farbstoff und anorganische Salze). Man wäscht mit Essigsäure und essigsäurehaltigem Wasser aus, um anorganische Salze zu entfernen, trocknet bei 100—105°, wägt, verascht, wägt den Ascherückstand und erfährt auf diese Weise die Menge von Gallenschleim (+ etwas Farbstoff) und von Ferriphosphat. Über das essigsäure Filtrat, welches Phosphate, Sulfate und Chloride enthalten kann, s. weiter unten (B 1).

Erweist sich das Auswaschen des Gallenschleimes mit Essigsäure wegen starken Aufquellens als unausführbar, so stellt man das Trockengewicht fest, verascht, wägt wieder und erfährt so die Menge von Gallenschleim und von dem Salzgemenge (Phosphate, Sulfate, Chloride).

B. Alkoholisches Filtrat. Filtrat (+ Waschalkohol) wird bei 40—45° zur Trockne verdunstet, der Rückstand mit absolutem Alkohol behandelt. Man filtriert und wäscht aus.

Phosphate, Sulfate,  
Chloride (1).

1. Der Filterrückstand wird mit dem essigsäuren Auszug von A vereinigt, getrocknet und verascht, die Asche gewogen. Man erfährt so die Menge der in Alkohol unlöslichen anorganischen Salze mit Ausnahme des schon bestimmten Ferriphosphats (Phosphate, Sulfate, auch wohl ein Teil der Chloride).

2. Das Filtrat wird auf ein kleines Volumen eingengt und mit überschüssigem Äther gefällt. Nach mehrtägigem Stehen filtriert man ab und wäscht mit Äther aus.

a) Filtrat. Es wird bei 40—45° völlig verdunstet und der Rückstand mit wasserfreiem Äther aufgenommen. Der in Äther unlösliche Teil wird abfiltriert, in Alkohol gelöst und die Lösung der alkoholischen Lösung von b zugefügt. Das ätherische Filtrat, welches Cholesterin,

\*) Von der sehr viel weniger konzentrierten Lebergalle nimmt man je nach dem spezifischen Gewicht 400—800 ccm.

\*\*\*) Ein Teil des Farbstoffs haftet fest am Mucin und läßt sich auch durch wiederholte Alkoholbehandlung nicht entfernen.

<sup>1)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 45, S. 415. 1920/21, s. auch Foster u. Hooper: Journ. of biol. chem. Bd. 38, S. 355. 1919.

<sup>2)</sup> Zur Kenntnis der Lebergalle des Menschen. Mitgeteilt v. d. Kgl. Ges. d. Wissensch. zu Upsala am 15. Juni 1893.



Phosphatide (Lecithin), Fett enthält, wird nach § 663 B 3 b verarbeitet. Man erfährt auf diese Weise die Menge von Cholesterin, Lecithin und Fett. Cholesterin, Lecithin, Fett.

b) Niederschlag. Er wird in Alkohol gelöst und die Lösung mit der unter a) erwähnten vereinigt. Diese Lösung, welche gallensaure Alkalien, ätherschwefelsaures Alkali, Seifen, Harnstoff, anorganische Salze (Chloride) enthält, wird genau gemessen und in 4 gleichfalls genau gemessene Portionen geteilt.

1. Portion. Man dampft ein, trocknet bei 100—105°, wägt bei aufgelegtem Uhrglase, verascht und wägt wieder. In der Asche wird die Salzsäure nach § 545 oder 546 bestimmt und auf Chlornatrium berechnet. Zieht man diesen Wert von dem gefundenen Trockengewicht ab, so bleibt als Rest die Summe von gallensauren Salzen, ätherschwefelsaurem Salz, Seifen und Harnstoff. Chloride (2).  
Summe von gallensauren Salzen, ätherschwefelsaurem Salz, Seifen u. Harnstoff.

2. Portion. Man dampft ein und bestimmt den Schwefel nach § 550: Gesamtschwefel als Bariumsulfat. Gesamtschwefel als Bariumsulfat.

3. Portion. Sie wird auf dem Wasserbade eingedampft und in so viel Wasser gelöst, daß eine etwa 2proz. Lösung entsteht. Diese Lösung wird mit Chlorbarium versetzt (auf je 50 ccm etwa 10 ccm einer 5proz. Chlorbariumlösung), nach längerem Stehen von einem evtl. entstandenen Niederschlage abfiltriert, das klare Filtrat mit 5proz. Salzsäure versetzt, einige Stunden im Wasserbade erwärmt und zur Trockne verdunstet. Den Rückstand behandelt man wiederholt mit Alkohol und Wasser, sammelt ihn auf dem Filter, wäscht mit heißem Wasser, verdünnter Salzsäure, Wasser, Alkohol und Äther aus, glüht und wägt: Schwefel der Ätherschwefelsäure als Bariumsulfat. Schwefel der Ätherschwefelsäure.

4. Portion. Man verdunstet und bringt die wässrige Lösung des Rückstandes mittels eines langen Trichterrohres in ein Einschmelzrohr, in dem sich mindestens 5 g krystallisierter Ätzbaryt befinden, spült mit kleinen Mengen Wasser nach, schmilzt etwa 10 cm über dem Flüssigkeitsniveau zu, schüttelt nach dem Erkalten gut um und erhitzt 10—12 Stunden bei 110—120°. Man öffnet nach dem Erkalten vorsichtig, gießt die Flüssigkeit in ein Becherglas aus, spült mit warmem Wasser nach, sättigt die warme Lösung mit Kohlensäure, erhitzt zum Kochen, filtriert siedend heiß im Heißwassertrichter und wäscht so lange mit heißem Wasser nach, als sich noch Barium im Filtrat nachweisen läßt.

Der Rückstand, welcher die Barytsalze der Fettsäuren enthält, wird mit Salzsäure zerlegt und mit Äther ausgeschüttelt, die ätherische Lösung abgetrennt und der nach dem Verdunsten des Äthers hinterbleibende Rückstand gewogen: Fettsäuren (Palmitinsäure, Stearinsäure, Ölsäure). Fettsäuren.

Das Filtrat wird mit der Waschflüssigkeit eingedampft. Im Rückstand wird nach § 550 der Schwefel bestimmt: Taurinschwefel als Bariumsulfat. Taurinschwefel.

Berechnung. Außer den oben bestimmten Werten findet man durch Rechnung noch folgende:

1. Die Summe der anorganischen Salze (außer Ferriphosphat) nach B 1 und B 2 b Portion 1.

2. Den Gehalt an Taurocholsäure\*) durch Multiplikation des dem Taurinschwefel entsprechenden Bariumsulfats (B 2 b Portion 4) mit 2,2089. Die dem Taurinschwefel entsprechende Menge Bariumsulfat erhält man auch, wenn man das Bariumsulfat, welches der Ätherschwefelsäure (B 2 b Portion 3) entspricht, von dem Bariumsulfat, welches dem Gesamtschwefel entspricht (B 2 b Portion 2), abzieht. (Diese Bestimmung dient zur Kontrolle der direkten.)

3. Den Gehalt an glykocholsaurem\*\*) (+ ätherschwefelsaurem) Alkali. Man erhält ihn, indem man die berechnete Menge Taurocholsäure durch Multiplikation mit 1,043 auf taurocholsaures Natron und die erhaltene Menge Fettsäuren (B 2 b Portion 4) durch Multiplikation mit 1,10 auf Seifen umrechnet und diese beiden Werte sowie den Gehalt der Galle an Harnstoff\*\*\*) von dem Wert für gallensaure Salze + ätherschwefelsaures Salz + Seifen + Harnstoff (B 2 b Portion 1) abzieht. Da die Ätherschwefelsäure noch unbekannt ist, so läßt sie sich nicht aus dem ihr entsprechenden Bariumsulfat berechnen und in Abzug bringen. Der für glykocholsaures Alkali gefundene Wert wird also um so genauer ausfallen, je mehr Ätherschwefelsäure in der Galle vorhanden ist.

Hoppe-Seyler empfahl, für die Bestimmung der Gallensäuren die Polarisierung zu benutzen. Da aber in den Gallen ein Gemenge optisch-aktiver Gallensäuren vorliegt und nur für die Glyko- und Taurocholsäure die spezifische Drehung bekannt ist, so läßt sich dieses Verfahren nicht anwenden.

\*) Taurocholsäure ist nicht die einzige schwefelhaltige gepaarte Gallensäure, aber die am besten bekannte. Deshalb ist ihre Zusammensetzung der Rechnung zugrunde gelegt.

\*\*) Darunter sind glykocholsaures Natron + Natronsalze der anderen schwefelfreien gepaarten Gallensäuren verstanden.

\*\*\*) Die kleinen Mengen Harnstoff können mit Rücksicht auf die Ungenauigkeit der Methode im allgemeinen vernachlässigt werden.

Die umfassenden Untersuchungen von Hammarsten und seinen Schülern, welche sich auf menschliche Galle und die Gallen vieler Tierarten erstrecken, haben zu folgenden Resultaten geführt, welche die Unzulänglichkeit des beschriebenen Verfahrens nach verschiedenen Richtungen ergeben<sup>1)</sup>:

1. In vielen Gallen, auch in der menschlichen, findet sich eine organische schwefel- und phosphorhaltige Substanz, auf welche das Verfahren keine Rücksicht nimmt. Ein Teil dieser Substanz ist in B 1 enthalten, und man kann weitere Mengen von ihr gewinnen, wenn man das Filtrat B 2 wieder vorsichtig zur Trockne verdunstet, mit absolutem Alkohol behandelt, vom Ungelösten abfiltriert und in der Weise fortfährt, bis das alkoholische Filtrat nach dem Einengen sich vollständig oder nahezu vollständig in absolutem Alkohol löst. Die einzelnen so gewonnenen alkoholunlöslichen Teile werden in Wasser gelöst, die Lösung wird filtriert, verdunstet, der Rückstand getrocknet und gewogen. Er besteht aus der schwefel- und phosphorhaltigen Substanz und anorganischen Salzen (Hammarsten<sup>2)</sup>, Örum<sup>3)</sup>). Ein Verfahren zur quantitativen Abtrennung und Bestimmung ist aber bisher nicht bekannt.

2. Eine vollständige Scheidung der Phosphatide von den gallensauren Salzen, mit Hilfe von Äther (B 2a und b), wie sie der Untersuchungsgang annimmt, ist nicht ausführbar. Immer enthalten einerseits die gallensauren Salze Beimengungen von Phosphatiden, andererseits die Phosphatide Beimengungen gallensaurer Salze.

#### *Gallensteine, Gallensedimente.*

800. Man kann verschiedene Gruppen von Konkrementen in den Gallenwegen unterscheiden:

- |                      |  |
|----------------------|--|
| Cholesterinsteine.   | 1. Cholesterinsolitärsteine. Sie treten bei nichtinfizierter Gallenstauung in der Gallenblase beim Menschen auf. Sie zeichnen sich durch krystallinisch glänzende Bruchflächen von radiärer Streifung, Weichheit und niedriges spezifisches Gewicht aus. Sie bestehen in der Hauptsache aus krystallisiertem Cholesterin, dem wenig Gallenfarbstoff (in Verbindung mit Kalk) und Calciumcarbonat beigemischt ist. Sie sind rundlich, vielfach oval, oft ziemlich groß, mit unebener, verschieden gefärbter Oberfläche. |
| Geschichtete Steine. | 2. Die auf stärkerer Entzündung infolge Infektion beruhenden geschichteten Cholesterin pigmentkalksteine und Cholesterinkalksteine, die meist in größerer Menge und verschiedenen Formen (rundlich, walzenförmig, am häufigsten eckig, facettiert) in der Gallenblase vorkommen und auf dem Durchschnitt zahlreiche verschieden gefärbte Schichten aus Cholesterin und Pigmentkalk zeigen. Bald überwiegt mehr das Cholesterin, bald der Pigmentkalk in den Schichten.   |
| Kombinationssteine.  | 3. Kombinationssteine. Es haben sich um einen Cholesterinsolitär infolge stärkerer infektiöser Entzündung Schalen von Schichten wie bei den eben genannten Steinen abgelagert.   |
| Bilirubinkalksteine. | 4. Bilirubinkalksteine. Sie sind die bei Rindern am häufigsten vorkommenden, werden aber auch beim Menschen, besonders in den Gallengängen, gefunden. Sie haben gewöhnlich unregelmäßige Formen, schwarze Farbe, sind klein und enthalten neben wenig Cholesterin reichlich Farbstoff in Verbindung mit Kalk und gewöhnlich auch etwas Kupfer und Eisen. Der Farbstoff ist in der Regel hauptsächlich Bilirubin, doch sind auch Pigmentsteine, die wesentlich andere Gallenfarbstoffe enthalten, beobachtet worden.    |

<sup>1)</sup> S. darüber Hammarsten: *Ergebn. d. Physiol.* Bd. 4, S. 1. 1905.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers *Zeitschr. f. physiol. Chem.* Bd. 32, S. 439. 1901.

<sup>3)</sup> Skandinav. *Arch. f. Physiol.* Bd. 16, S. 275. 1904.

5. Hauptsächlich aus Calciumcarbonat bestehende kleine rundliche Calciumcarbonatsteine. Steinchen von gelber oder brauner Farbe. Sie finden sich selten (in Form von Sand und Gries) in der menschlichen Galle, häufiger (auch noch etwas Calciumphosphat enthaltend) bei Rindern.

6. Es werden in der Galle zuweilen flockige weiche Niederschläge, welche meist amorph, seltener krystallisiert sind und Cholesterin, Schleim- und Eiweißsubstanzen und Bilirubin enthalten, beobachtet.

Näheres bei Naunyn: Klinik der Cholelithiasis, Leipzig 1892; Aschoff und Bacmeister: Die Cholelithiasis, Jena 1909; Quincke und Hoppe-Seyler: Leberkrankheiten, Wien und Leipzig 1912, 2. Aufl.

**Qualitative Untersuchung.** Man erschöpft die fein gepulverten und (zur Entfernung von Gallenresten) mit Wasser ausgekochten und wieder getrockneten Massen mit einer Mischung von gleichen Teilen Alkohol und Äther, filtriert und wäscht mit derselben Mischung aus, übergießt darauf nach Wechseln des Becherglases mit Salzsäure (bei Anwesenheit von Calciumcarbonat entsteht Aufbrausen) und wäscht mit Wasser gut aus. Man erhält so einen alkoholisch-ätherischen (1) und einen salzsauren Auszug (2) und einen Filterrückstand (3).

1. Der alkoholisch-ätherische Auszug wird verdunstet und das zurückbleibende Cholesterin durch seine Reaktionen (S. 233) erkannt. Cholesterin.

2. Der salzsaure Auszug wird zur Trockne verdunstet, der Rückstand gegläht, in verdünnter Salzsäure gelöst und die Lösung nach § 532 auf anorganische Salze untersucht. Man achte auf Kupfer (§ 532, †-Anmerkung). Anorganische Salze.

3. Der Filtrerrückstand wird zwischen Filtrierpapier trocken gepreßt und in heißem Chloroform gelöst. Der beim Verdunsten der Chloroformlösung hinterbleibende Rückstand wird in ganz verdünnter Natronlauge gelöst und die Lösung nach S. 421 auf Bilirubin geprüft. Auf etwa gleichzeitig vorhandenes Urobilin ist nach § 796 zu prüfen. Bilirubin. Urobilin.

Aus Rindergallensteinen wurde auch Choleinsäure und Stearinsäure erhalten (H. Fischer u. Meyer<sup>1)</sup>). Erstere schied sich beim Verdunsten des Ätherauszuges des trockenen Gallensteinpulvers krystallisch ab.

**Quantitative Untersuchung.** Man geht von einer getrockneten und gewogenen Portion des mit Wasser ausgekochten Steinpulvers aus und verfährt im ganzen nach den Angaben des vorigen Paragraphen. Im einzelnen ist noch folgendes zu bemerken:

Das Cholesterin (1) wird bei 110° getrocknet und gewogen.

Die in 2 erhaltene salzsaure Lösung des Glührückstandes wird durch Schwefelwasserstoff von evtl. vorhandenem Kupfer befreit. Im Filtrat bestimmt man nach § 536 ff. Kalk, Magnesia, Eisen und Phosphorsäure. Vorhandenes Schwefelkupfer wird mit dem Filter in einem gewogenen Platintiegel bei gutem Luftzutritt bis zur Verkohlung des Filters erhitzt und dann mit Salpeter und etwas Soda geschmolzen. Man behandelt die Schmelze mit Wasser, sammelt das ungelöste Kupferoxyd auf aschefreiem Filter, wäscht aus, trocknet, glüht in demselben Platintiegel und wägt.

Der Filtrerrückstand (3) (das Gewicht des Filters muß bekannt sein) wird bei 110° getrocknet und gewogen: Gallenfarbstoff.

### Untersuchung des Schweißes.

801. Der Schweiß stellt eine klare wasserhelle Flüssigkeit dar, die von beigemengten Epithelzellen durch Filtration befreit werden kann.

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 76, S. 95. 1911/12.

Normale Bestand-  
teile.

**Bestandteile.** Spuren von Eiweiß, Harnstoff, Kreatinin, Serin, Fett, niedere Fettsäuren und fettsaure Alkalien, Cholesterin, Alkalisalze, gepaarte Schwefelsäuren und aromatische Oxysäuren<sup>1)</sup>, anorganische Salze (besonders Chloralkalien, außerdem schwefelsaure und phosphorsaure Alkalien). Nach Einnahme von Benzoesäure soll der Schweiß Hippursäure enthalten.

Pathologische  
Bestandteile.

Unter pathologischen Verhältnissen findet sich Zucker bei Diabetes, Harnstoff bei Urämie und Cholera. Im urämischen Stadium der Cholera beim Aufhören der Nierensekretion findet sich die Körperoberfläche zuweilen mit Krystallen von Harnstoff bedeckt. Die Ursache der Klebrigkeit gewisser pathologischer Schweiße ist noch nicht bekannt.

Zersetzung.

Bei unreiner Haut unterliegt der mit Schmutz, Epithelzellen und Talgdrüsensekret vermischte Schweiß alsbald nach seiner Sekretion einer lebhaften bakteriellen Zersetzung. Ein solcher zersetzter Schweiß enthält in reichlicher Menge flüchtige Fettsäuren und andere übelriechende Stoffe (stinkende Fußschweiße), Leucin, Tyrosin, Ammoniak usw.

**Allgemeine Eigenschaften.** Das spezifische Gewicht schwankt zwischen 1003 und 1005 und der Gehalt an festen Stoffen beträgt im Durchschnitt 1—2%.

Die Reaktion des menschlichen Schweißes ist gewöhnlich sauer, kann aber besonders nach reichlichem Schwitzen (Pilocarpin, Schwitzbäder) neutral und alkalisch gefunden werden. Die Vermutung, daß der reine, frisch sezernierte Schweiß stets alkalisch reagiert und die saure Reaktion nur durch Beimengung des Sekrets der Talgdrüsen oder durch Zersetzungs Vorgänge bedingt sei, erscheint unbegründet.

**Untersuchung.** Sie geschieht wie diejenige einer serösen Flüssigkeit (§§ 630 ff.). Für den Nachweis der aromatischen Oxysäuren verfährt man nach § 593, für Nachweis und Bestimmung der gepaarten Schwefelsäuren nach §§ 568 und 575.

Den für die Untersuchung zu benutzenden Schweiß sammelt man am besten während eines Heißluftbades nach sorgfältiger Reinigung der Körperoberfläche und unter antiseptischen Kautelen. Kann die Verarbeitung nicht gleich angeschlossen werden, so ist das Sekret sofort mit dem 3fachen Volumen Alkohol zu mischen, um jede Zersetzung auszuschließen.

## Untersuchung der Milch.

### *Allgemeines.*

Die Milch stellt ein in seinen physikalischen Eigenschaften jedem bekanntes Sekret dar und besteht aus einer schwach gefärbten Flüssigkeit, dem Milchplasma, in der runde Körperchen von sehr verschiedener, aber stets mikroskopischer Größe, die Milchkügelchen, suspendiert sind.

Bestandteile  
der Milch-  
kügelchen.

802. **Bestandteile.** Die Milchkügelchen (Fettkügelchen) bestehen aus einem bei gewöhnlicher Temperatur nicht völlig flüssigen, gelbgefärbten Fett und sind von einer sehr dünnen Eiweißhülle umgeben. Dieses Eiweiß, welches nicht Casein ist, gibt bei der Hydrolyse eine reduzierende Substanz (Storch<sup>2)</sup>). Es besteht nach Abderhalden und Völtz<sup>3)</sup> aus einem wechselnden Gemisch verschiedener Proteine. Die gelbe Farbe des Fettes der Kuhmilch ist durch Pflanzenfarbstoffe der Nahrung Carotin und Xanthophyll verursacht (Palmer und Eckles<sup>4)</sup>). Das Fett ist ein Gemisch von einsäurigen und gemischten Triglyceriden von Palmitin-, Stearin-, Öl-, Myristin-, Laurin-, Arachin-, Butter-, Capron-, Capryl- und Caprinsäure. Die Zusammensetzung ist eine wechselnde. Stets finden sich in dem Fett Cholesterin und Phosphatide.

<sup>1)</sup> Kast: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 11, S. 501. 1887.

<sup>2)</sup> Malys Jahresber. f. Tierchem. 1897, S. 273.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 59, S. 13. 1909.

<sup>4)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 17, S. 191. 1914.

In dem Milchplasma sind nachgewiesen: Casein (gebunden an Calcium), Lactalbumin, Lactoglobulin, ein alkohollöslicher Eiweißstoff (Osborne und Wakeman<sup>1)</sup> Opalisin (?), Nucleon (?), Milchzucker, Orotsäure, Aminosäuren, Adenin und Guanin (Voegtlin und Sherwin<sup>2)</sup>, Kreatinin, Kreatin, Harnstoff, Rhodanwasserstoff (Musso<sup>3)</sup>, Citronensäure, Fettsäure, Aceton (Engfeldt<sup>4)</sup>, Cholesterin, Phosphatide (Osborne und Wakeman<sup>5)</sup>, proteolytische Fermente<sup>6</sup>) (?), diastatisches Ferment (s. Zaitschek<sup>6</sup>), anorganische Salze (Kalium, Natrium, Calcium, Magnesium, Ammonium<sup>7</sup>), Eisen gebunden an Phosphorsäure, Salzsäure, Schwefelsäure<sup>8</sup>), Citronensäure, Kohlensäure). Unter den Salzen findet sich reichlich Calciumphosphat, ferner mehr Kalium als Natrium und mehr Phosphorsäure als Salzsäure. Calcium ist bis zu 50%, Phosphor bis zu 60% in nicht diffusibler Form vorhanden. Kalium und Chlor sind ihrer ganzen Menge nach diffusibel (Rona und Michaelis<sup>9</sup>), György<sup>10</sup>, Wha<sup>11</sup>). Albumosen und Peptone kommen in der frischen Milch nicht vor.

Bestandteile  
des Milch-  
plasmas.

Die in größter Menge in der Milch enthaltenen Bestandteile sind Protein-  
stoffe (unter ihnen überwiegt das Casein), Fette, Milchzucker und Salze. Der  
Prozentgehalt an diesen Stoffen ist bei verschiedenen Tierarten verschieden,  
aber auch innerhalb derselben Art kommen Schwankungen vor, die von der Rasse,  
der Individualität, der Lactationszeit usw., auch von der Ernährung abhängen.

Folgende Prozentzahlen sind lediglich als Mittelwerte anzusehen:

Zusammensetzung.

	Frauenmilch	Kuhmilch	Eselinmilch <sup>12)</sup>
Wasser . . . . .	86,4	88,0	91,23
Trockensubstanz . . . . .	13,6	12,0	8,77
Casein . . . . .	1,0	3,0	0,94
Albumin + Globulin . . . . .	0,5	0,3	0,53
Fett . . . . .	3,5	3,5	1,15
Milchzucker . . . . .	6,6	4,5	6,0
Salze . . . . .	0,25	0,75	0,4

Die Ziegenmilch ist der Kuhmilch ähnlich zusammengesetzt. Die Stutenmilch zeigt einen ähnlich niedrigen Fettgehalt wie die Eselinmilch. Die Hundemilch ist sehr reich an Fett (9—10%) und Proteinstoffen, ärmer an Milchzucker (3—4%). Eine Zusammenstellung der prozentischen Zusammensetzung der Milch verschiedener Tiere s. bei Pröscher<sup>13</sup>), Hammarsten<sup>14</sup>), Folin, Denis und Minot<sup>15</sup>).

Die zu Beginn der Lactation abgesonderte Milch, das sog. Colostrum, enthält zahlreiche Colostrum.  
Colostrumkörperchen und ist wohl etwas ärmer an Casein, Fett und Milchzucker, vor allem aber

<sup>1)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 33, S. 243. 1918.      <sup>2)</sup> desgl. Bd. 33, S. 145. 1918.

<sup>3)</sup> Malys Jahresber. d. Tierchem. 1877, S. 168.

<sup>4)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 95, S. 337. 1915.

<sup>5)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 21, S. 539, ref. Chem. Zentralbl. 1915, II, S. 852; Bd. 28, S. 1, ref. Chem. Zentralbl. 1917, I, S. 883; Journ. of biol. chem. Bd. 33, S. 7. 1918. Nach Glikin (Biochem. Zeitschr. Bd. 21, S. 348. 1909) fehlen sie im Plasma.

<sup>6)</sup> Zaitschek: Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 104, S. 539. 1904. — Vandeveld, de Waele u. Sugg: Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 5, S. 571. 1904.

<sup>7)</sup> Tillmans, Splittgerber u. Riffart: Zeitschr. f. Untersuch. d. Nahrungs- u. Genußmittel Bd. 27, S. 59 u. 801. 1914.

<sup>8)</sup> Tillmans u. Sutthoff: Zeitschr. f. Untersuch. d. Nahrungs- u. Genußmittel Bd. 20, S. 49. 1910.

<sup>9)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 21, S. 114. 1909.      <sup>10)</sup> desgl. Bd. 142, S. 1. 1923.

<sup>11)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 144, S. 278. 1924.

<sup>12)</sup> Ellenberger, Seeliger u. Klimmer: Arch. f. wiss. u. prakt. Tierheilk. Bd. 28, H. 3 u. 4. 1902.

<sup>13)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 24, S. 285. 1898.

<sup>14)</sup> Lehrbuch der physiologischen Chemie. 9. Aufl. S. 522. 1921.

<sup>15)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 37, S. 349. 1919.

sehr viel reicher an gerinnbarem Eiweiß (Albumin und Globulin). Eine eingehende Untersuchung des Colostrums der Kühe ist von Winterstein u. Strickler<sup>1)</sup> ausgeführt worden.

Das **spezifische Gewicht** der Frauenmilch und ebenso der Kuh- und Eselinmilch schwankt zwischen 1028 und 1034. In der abgerahmten Milch ist es höher; in abgerahmter Kuhmilch 1032—1036. Da die Milch keine homogene Flüssigkeit darstellt, so läßt sich ihr spezifisches Gewicht nur mit Hilfe des Pyknometers genau ermitteln; aber auch die weniger genaue Bestimmung mit dem Aräometer gibt für die Beurteilung der Güte der Marktmilch wertvolle Anhaltspunkte. Es sind für diesen Zweck besondere Aräometerspindeln, auf deren Skala nur die spezifischen Gewichte von 1015—1040 berücksichtigt sind und die nächste Dezimalstelle noch abgelesen werden kann, in Gebrauch (*Lactodensimeter*). In jedem Falle muß die Milch vor der Bestimmung des spezifischen Gewichts sorgfältig gemischt werden, damit sich das Fett gleichmäßig in der Flüssigkeit verteilt.

**Reaktion.** Die Frauenmilch und die Milch der Pflanzenfresser zeigt gegen Lackmus eine alkalische oder amphotere und gegen Phenolphthalein eine saure Reaktion, und zwar ist die Kuhmilch stärker alkalisch (gegen Lackmus) und stärker sauer (gegen Phenolphthalein) als die Frauenmilch. Die Eselinmilch steht zwischen beiden. Die Milch der Fleischfresser scheint gegen Lackmus stets sauer zu sein. Im physikalisch-chemischen Sinne ist die Reaktion der Milch nahezu neutral  $p_H$  für Kuhmilch 6,57, für Frauenmilch 6,97 (Davidsohn<sup>2)</sup>).

**803. Verhalten verschiedenen Einwirkungen gegenüber.** Mit Hilfe der Zentrifuge läßt sich eine (wenn auch nicht vollständige) Trennung der Fettkügelchen vom Plasma erreichen; auch schon beim ruhigen Stehen steigt ein großer Teil der Kügelchen an die Oberfläche. (Aus diesem Grunde ist es nötig, die Milch vor der Entnahme einer Probe für die quantitative Bestimmung sorgfältig zu mischen.) Beim Schütteln mit Äther wird ein großer Teil des Fettes von diesem aufgenommen, ohne daß die weiße Farbe der Milch sich ändert; die Milch wird aber hell und durchsichtig, sobald ein wenig Natronlauge oder Säure hinzugefügt wird, indem diese sofort eine die Fetttröpfchen umgebende Hülle lösen und so ein völliges Übergehen des Fettes in den Äther ermöglichen.

**Verhalten:**  
zu Salzen. Eintragen von Salz in die Milch hat eine Abscheidung der Eiweißstoffe (+ Fett) zur Folge, und zwar wird durch Sättigen der Milch mit Ammonsulfat Casein, Albumin und Globulin, durch Sättigen mit Magnesiumsulfat Casein und Globulin und durch Sättigen mit Natriumchlorid Casein ausgefällt. Vorsichtiger Zusatz einer Säure, z. B. Essigsäure, Milchsäure oder Salzsäure bewirkt die Bildung eines Niederschlags, welcher aus Casein (+ Fett) besteht. Über die Ausscheidung des Caseins aus Frauenmilch durch die verschiedenen Säuren s. Engel<sup>3)</sup>.  
zu Säuren. Versetzt man Milch mit Natronlauge, so nimmt das Gemisch allmählich, schneller beim Erwärmen bis auf 50° eine gelbe, rötliche und dann schön rote\*) Farbe an. Beim Kochen koaguliert frische Milch gewöhnlich nicht (auch wenn vorher Kohlensäure eingeleitet war, § 804); eine Koagulation findet nur ausnahmsweise statt, regelmäßig im Beginn der Lactation wegen des reichen Gehaltes des Colostrums an Albumin.

Frische Milch entfärbt bei 70° bei Gegenwart von Form- oder Acetaldehyd Methylenblau (Schardingersche Reaktion). Versetzt man 5 ccm Frauenmilch mit 2,5 ccm 10proz. wässrigem Ammoniak und erwärmt 15—20 Minuten im Wasserbade auf 60°, so entsteht violettrotliche Färbung (Umikoffsche Reaktion). Die Milch der Kühe und anderer Pflanzenfresser gibt die Reaktion nicht.

**Reaktion von Schardinger.**  
**Reaktion von Umikoff.**

\*) S. darüber bei Krüger: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 50, S. 293. 1906/07.

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 47, S. 58. 1906.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. Kinderheilk. Bd. 9, S. 11. 1913. Wegen Frauenmilch s. auch Szili: Biochem. Zeitschr. Bd. 84, S. 194. 1917.

<sup>3)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 13, S. 89. 1908.

**Gerinnung der Milch.**

804. a) Durch Mikroorganismen. Die Milch verändert sich beim Stehen (in der Wärme bis zu Bruttemperatur schneller als bei niedrigerer Temperatur) unter der Einwirkung von Mikroorganismen (besonders des *Bact. acid. lact.*), welche aus Milchzucker Säuren (hauptsächlich Milchsäure, auch Bernsteinsäure) bilden. Die Reaktion wird mehr und mehr sauer und bei einem bestimmten Säuregrad scheidet sich das Casein (+ Fett) aus, indem die ganze Flüssigkeit zur gallertigen Masse wird. Die Gallerte zieht sich allmählich zusammen und preßt eine leicht trübe Flüssigkeit aus, das Milchserum oder die sauren Molken. Die Tätigkeit der Mikroorganismen geht weiter und hört erst auf, wenn die Flüssigkeit ungefähr 4% Milchsäure enthält. Um die Milchsäure zu isolieren, dampft man das abfiltrierte Milchserum auf dem Wasserbade ein, schüttelt den mit Phosphorsäure angesäuerten dünnflüssigen Sirup mit Äther aus und verfährt weiter nach S. 84.

Gerinnung durch  
Mikroorganismen.

Schon lange vor der spontanen Gerinnung läßt sich die Zunahme der Säure daran erkennen, daß das Casein durch einen Strom Kohlensäure und nachheriges Erhitzen zum Kochen fällbar wird. Es folgt dann ein Stadium bei dem Kochen allein (ohne Kohlensäure) das Casein zur Abscheidung bringt, und bei weiterer Säurezunahme genügt Kohlensäure allein, bis schließlich die Gerinnung freiwillig erfolgt.

Ein beim Kochen einer Milch von normaler Reaktion entstehendes Koagulum kann nur aus Albumin (+ Globulin) bestehen. Ist aber die Reaktion sauer, so versetzt man zur Entscheidung der Frage, ob der beim Erhitzen entstehende Niederschlag Casein oder Albumin ist, die Milch mit einigen Tropfen einer Lösung von Natriumphosphat bis zur schwach sauren Reaktion, schüttelt um und kocht auf. Eine durch Anwesenheit von viel Albumin bedingte Gerinnung erfolgt auch jetzt, während Casein sich nicht mehr abscheidet.

b) Durch Labferment (§ 445 und §§ 510, 511). Die Gerinnung der Kuhmilch auf Zusatz von Labferment erfolgt ohne Änderung der Reaktion, sehr schnell bei Körpertemperatur. Das Gerinnsel besteht aus Paracasein (+ Fett). Das ausgepreßte Milchserum enthält noch die ganze Menge des Milchzuckers und wird im Gegensatz zu den sauren Molken (vgl. a) süße Molken genannt.

Gerinnung durch  
Labferment.

Die Gerinnung der Frauenmilch durch Labferment erfolgt nur unvollkommen in Form zarter dünner Flöckchen oder auch gar nicht. Nach Fuld und Wohlgemuth<sup>1)</sup> gerinnt sie aber auf Zusatz von Lab, nachdem sie 3 mal 24 Stunden in gefrorenem Zustande gehalten worden, dann wieder aufgetaut und mit der nötigen Menge Chlorcalcium versetzt ist. Über das Verhalten der Frauenmilch zu Säure und Lab s. auch Engel<sup>2)</sup>.

**Qualitative Untersuchung der Milch.**

805. a) Kuhmilch und Milch anderer Tiere (mit Ausnahme der Eselinmilch\*). Etwa 100 ccm Milch werden mit der 5fachen Menge Wasser verdünnt, vorsichtig mit verdünnter Essigsäure ausgefällt und weiter nach den Prinzipien behandelt, wie sie § 808 für die quantitative Bestimmung angegeben sind. Man erhält auf diese Weise 1. einen durch Essigsäure hervorgerufenen und mittels Alkohol und Äther extrahierten Niederschlag (Casein), 2. einen durch Kochen hervorgerufenen Niederschlag (Albumin + Globulin), 3. einen Ätherextrakt (Fett, Phosphatide, Cholesterin) und 4. eine wässrige Lösung (Milchzucker, Salze). Die Untersuchung geschieht in folgender Weise:

\*) Über die Untersuchung der Eselinmilch s. Ellenberger, Seeliger u. Klimmer: a. a. O.

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 5, S. 118. 1907. <sup>2)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 13, S. 89. 1908.

1. **Casein.** Man verreibt es mit ganz verdünnter Natronlauge, filtriert und fällt das Filtrat mit Essigsäure vorsichtig aus. Der abfiltrierte und ausgewaschene Niederschlag wird nach § 52 auf Stickstoff, nach § 54 auf Phosphor, nach § 53 auf Schwefel geprüft und evtl. weiter nach den Angaben von § 445 untersucht.

2. **Albumin + Globulin.** Die Probe auf Stickstoff (§ 52), auf Schwefel (§ 53) und die Farbenreaktionen (§ 325 B) fallen positiv aus.

3. **Fett, Phosphatide, Cholesterin.** Man prüft zunächst eine kleine Menge nach § 54 auf Phosphor (positiver Ausfall dient als Nachweis für Phosphatid), dann eine andere nach S. 99 auf Fettsäuren. Nach ihrer Entfernung in der S. 99 angegebenen Weise wird die ganze Menge des Fettes nach § 94 verseift und die Seifenlösung weiter in der dort angegebenen Weise behandelt. Beim Ansäuern mit Schwefelsäure tritt der Geruch nach Buttersäure auf. Da nur das Milchlipp Butyrin enthält, so ist dieser Geruch für Milchlipp charakteristisch. Die Phosphatide finden sich im wesentlichen in dem Casein- und dem Lactalbumin- und Lactoglobulinniederschlag und können aus ihnen durch Extraktion mit Alkohol gewonnen werden (Osborne und Wakeman).

4. **Milchlippzucker, Salze.** Der Nachweis des Milchlippzuckers geschieht nach § 110. Um die anorganischen Salze nachzuweisen, dampft man die Flüssigkeit ein (währenddessen scheidet sich schon Calciumphosphat ab), versacht den Rückstand nach § 525 oder § 527 und stellt einen wässerigen und einen salzsauren Auszug her, deren Untersuchung nach §§ 531 und 532 ausgeführt wird.

In dieser Lösung findet sich auch die Orotsäure (§ 134) und nach Siegfried auch das Nucleon, dessen Isolierung als Eisenverbindung nach § 454 oben geschieht. S. dazu auch Osborne und Wakeman<sup>1)</sup>, welche aus dieser Lösung durch Sättigung mit Ammonsulfat eine albumoseartige Substanz abscheiden konnten und das Nucleon für ein Gemenge halten (§ 454).

b) **Frauenmilch.** Das Verfahren ist dasselbe, nur muß die Ausfällung des Caseins in der § 808, 2 b angegebenen Weise vorgenommen werden.

#### *Bestimmung des Trockenrückstandes in der Milch.*

806. Man mißt oder wägt 5—10 g der gut gemischten Milch in einem mit eingeriebenem Glasdeckel versehenen flachen Gefäß von bekanntem Gewicht (oder in einem Schälchen, welches in einem verschließbaren Wägeglast Platz hat und mit diesem zusammen gewogen worden ist) genau ab, dampft bei 50 bis 60° ein und trocknet zunächst im Vakuum über Schwefelsäure, dann bei einer Temperatur, die 100° nicht übersteigt (am besten im Vakuum bei 95—100°) bis zum konstanten Gewicht. Wegen der stark hygroskopischen Eigenschaften des Rückstandes ist im verschlossenen Gefäß zu wägen.

Sobald die Milch zu trocknen beginnt, färbt sie sich infolge einer geringen Zersetzung des Milchlippzuckers bräunlich. Will man den dadurch bedingten Fehler, der allerdings so unbedeutend ist, daß er vernachlässigt werden kann, vermeiden, so ist das Trocknen im Vakuum über Schwefelsäure bis zum konstanten Gewicht fortzusetzen. Das erfordert natürlich lange Zeit.

#### *Bestimmung des Gesamtstickstoffs und einzelner anorganischer Bestandteile in der Milch.*

Der Gesamtstickstoff wird nach § 558b, der Gesamtschwefel nach § 550, das Gesamteisen nach § 533, die Gesamtphosphorsäure nach § 553, Kalium und Natrium nach § 533, Calcium und Magnesium nach § 536 ff., Salzsäure nach § 545 oder 546 bestimmt. Man benutzt 5 ccm Milch, um den Stickstoff, 200 ccm, um Eisen, 15—25 ccm, um die übrigen Stoffe zu

<sup>1)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 33, S. 7. 1918.



bestimmen. Die Chloride lassen sich auch ohne Veraschung bestimmen im Prinzip nach dem § 694 angegebenen Verfahren von Austin und v. Slyke zur Bestimmung der Chloride in Blut. Wegen der Ausführung in der Kuhmilch s. Denis und Sisson<sup>1)</sup>, in der Menschenmilch dieselben Autoren<sup>2)</sup>.

*Bestimmung des Gesamtproteinstickstoffs in der Kuh- und Frauenmilch.*

807. Verfahren nach Sebelien<sup>3)</sup>. 5 oder 10 ccm Milch werden mit nach Sebelien mindestens dem 9fachen Volumen Wasser verdünnt, mit etwas Kochsalzlösung versetzt und in der Kälte mit Alménscher Gerbsäurelösung (Anh.) im Überschuß (etwa 1½fache Menge der Milch) gefällt. Der Niederschlag wird abfiltriert (man bringe zuerst die überstehende Flüssigkeit und zuletzt erst den Niederschlag auf das Filter), mit kaltem Wasser ausgewaschen und samt Filter nach Kjeldahl (§ 558, 6) behandelt. Multiplikation des erhaltenen Stickstoffwertes mit 6,37\*) gibt den Proteinstoffgehalt.

Verfahren nach Ritthausen<sup>4)</sup>-Munk<sup>5)</sup>. 10 ccm Milch werden nach Ritthausen-Munk in einem 250 ccm fassenden Bechergläse mit Wasser auf 100 ccm verdünnt (bei Frauenmilch genügt schon Verdünnung auf 60 ccm), falls die Reaktion deutlich alkalisch ist, neutralisiert, erhitzt, zuerst 1—2 ccm Alaunlösung, dann, wenn die Flüssigkeit eben ins Sieden gerät, 2—5 ccm von aufgeschwemmtem Kupferhydroxydbrei\*\*) hinzugefügt und einige Minuten im Sieden erhalten. Der zumeist feinflockige Niederschlag, welcher sich, sobald die Mischung vom Feuer genommen ist, schnell absetzt, wird noch warm abfiltriert, auf dem Filter mit heißem Wasser ausgewaschen und samt Filter noch feucht nach Kjeldahl (§ 558, 6) behandelt. Umrechnung auf Proteinstoff wie beim vorstehenden Verfahren.

Beide Methoden geben die gleichen Werte.

Verfahren nach Weyl<sup>6)</sup>. Eine Mischung von 20 ccm Milch und 20 ccm nach Weyl Wasser wird unter Umrühren in 80 ccm Aceton eingetragen und nach einstündigem Stehen (unter mehrfachem Umrühren) der Niederschlag abfiltriert (wenn das Filtrat zunächst trübe, ist es zurückzugießen). Das Filter wird 2 mal mit einem Gemisch gleicher Teile Aceton und Wasser gefüllt, 2 mal mit absolutem Alkohol (das Filtrat ist zurückzugießen, bis es klar ist) und mit Äther gewaschen und dann nach Kjeldahl behandelt. Umrechnung auf Proteinstoff wie bei den vorangehenden Verfahren.

Vergleiche der Ergebnisse mit denen der beiden anderen Methoden liegen nicht vor.

\*) Siehe dazu die Sternnote auf S. 924.

\*\*) Man stellt denselben nach Stutzer so dar: 100 g krystallisiertes Kupfersulfat werden in 5 l Wasser gelöst und mit 2,5 g Glycerin versetzt. Aus dieser Lösung wird durch Zusatz verdünnter Natronlauge bis zur alkalischen Reaktion das Kupfer als Hydrat ausgefällt. Es wird abfiltriert und durch Anreiben mit 0,5% Glycerin enthaltendem Wasser aufgeschlemmt, durch wiederholtes Dekantieren und Filtrieren von den letzten Spuren Alkali befreit, der Filtrerrückstand mit 10% Glycerin enthaltendem Wasser verrieben und zu einer solchen Verdünnung gebracht, daß eine gleichmäßige mit der Pipette aufsaugbare Masse entsteht. Diese ist, in dunkler Flasche aufbewahrt, haltbar.

<sup>1)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 46, S. 483. 1921.

<sup>2)</sup> Sisson und Denis, Americ. journ. of dis. of childr. Bd. 21, S. 389; ref. Ber. über d. ges. Physiol. Bd. 8, S. 110. 1921.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 13, S. 157. 1889. — J. Munk: Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. Bd. 134, S. 501. 1893.

<sup>4)</sup> Journ. f. prakt. Chem. N. F., Bd. 15, S. 329. 1877.

<sup>5)</sup> Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. Bd. 134, S. 501. 1893.

<sup>6)</sup> Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 43, 1, S. 508. 1910. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 65, S. 246. 1910.

**Bestimmung von Casein, Albumin + Globulin, Milchzucker und Fett  
(d. h. ätherlösliche Substanzen) in der Milch.**

In tierischer Milch. 808. a) In der Kuh- und Ziegenmilch und der Milch anderer Tiere (außer Eselinmilch). Man mißt von der gut gemischten Milch 20 ccm ab oder wägt eine entsprechende Menge, vermischt sie in einem Becherglase mit etwa 380 ccm Wasser, fügt unter Umrühren sehr verdünnte Essigsäure tropfenweise hinzu, bis ein flockiger Niederschlag sich zeigt, leitet dann  $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{2}$  Stunde Kohlensäure hindurch und läßt bis zum nächsten Tage stehen. Es ist zweckmäßig, 3 Portionen in dieser Weise zu behandeln und diejenige, bei der die Abscheidung am besten gelungen ist, weiter zu verarbeiten. Man bringt zuerst die klare Flüssigkeit, dann den Niederschlag (zuletzt mit Hilfe kleiner Mengen des Filtrats) auf ein stickstoffreies Filter und wäscht mit Wasser nach. Man erhält so einen Filterrückstand (1) und ein Filtrat (2).

1. Der Filterrückstand, welcher Casein und Fett enthält, wird mit starkem Alkohol übergossen, das Filtrat in einem Becherglase aufgefangen, solange zurückgegossen, bis es klar abläuft und dann bei niedriger Temperatur (unter 60°) verdunstet. Jetzt nimmt man den Rückstand mit Äther auf, bringt die ätherische Lösung in den Kolben eines Soxhlet'schen Extraktionsapparates, spült mit Äther nach, bringt andererseits den alkoholfuchten Niederschlag in das Extraktionsgefäß desselben Apparates und extrahiert längere Zeit. Der das Fett enthaltende Äther (+ Waschäther) wird nun in einem gewogenen Fett. Becherglase verdunstet, im Vakuumexsiccator getrocknet und gewogen: Fett (+ Phosphatide + Cholesterin). Das Casein (mit dem Filter) wird nach Kjeldahl (§ 558b) behandelt (man bringe in die Vorlage 100 ccm  $\frac{n}{10}$ -Säure!). Casein. Der gefundene Stickstoffwert ergibt, mit 6,37\*) multipliziert, das Casein.

Das ausgefallte Casein (+ Fett) kann auch auf aschefreiem, bei 120° getrocknetem und gewogenem Filter gesammelt und nach der Entfettung wieder bei 120° bis zum konstanten Gewicht getrocknet und gewogen werden. In diesem Falle ist es nötig, Filter + Casein im Platintiegel mit kleiner gewogener Menge Eisenoxyd zu veraschen und das Gewicht der Asche in Abzug zu bringen. Ebenso läßt sich auch das Albumin + Globulin (s. 2) gewichtsanalytisch bestimmen. Eine Veraschung ist dabei nicht nötig.

2. Das Filtrat, welches Albumin + Globulin, Milchzucker und etwas gelöste Proteinsubstanz enthält, wird in einer Porzellanschale zum Kochen erhitzt und einige Minuten im Sieden erhalten. Man sammelt den entstandenen Niederschlag auf stickstofffreiem Filter, wäscht mehrmals mit kaltem Wasser und behandelt Filter und Niederschlag\*\*) nach Kjeldahl. Der gefundene Stickstoffwert, mit 6,34 multipliziert, ergibt Albumin + Globulin. Das Filtrat (+ Waschwasser) wird nach dem Erkalten gut gemischt und gemessen. Man füllt mit der Flüssigkeit eine Bürette und benutzt sie zur Titration von 20 ccm Fehlingscher Lösung, die mit 80 ccm Wasser verdünnt sind, in der § 599 angegebenen Weise. Da 20 ccm Fehlingsche Lösung 0,134 g Milchzucker entsprechen, ist der Gehalt der ganzen Flüssigkeitsmenge an Milchzucker leicht zu berechnen.

In der Frauenmilch. b) In der Frauenmilch. In der beschriebenen Ausführung eignet sich diese Methode für menschliche Milch nicht, weil das Frauenmilchcasein durch Essigsäure und Kohlensäure nur unvollkommen gefällt wird (Hoppe - Seyler).

\*) Nach Pfyl u. Turnau (Arb. a. d. Reichs-Gesundheitsamte Bd. 47, S. 350. 1914) und Bleyer u. Seidl (Biochem. Zeitschr. Bd. 128, S. 58. 1922) soll man mit 6,45 multiplizieren.

\*\*) In diesem Niederschlag ist ein weiterer Teil der Phosphatide enthalten, welcher ihm durch Alkohol entzogen werden kann (Osborne u. Wakeman<sup>1)</sup>).

<sup>1)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 21, S. 539; ref. Chem. Zentralbl. 1915, II, S. 852 und Journ. of biol. chem. Bd. 28, S. 1; ref. Chem. Zentralbl. 1917, I, S. 883.

Nach J. Schmidt<sup>1)</sup> und meiner eigenen Erfahrung kann aber das Verfahren auch für diese Milch benutzt werden, wenn die Milch-Wassermischung während des Ansäuerns mit Essigsäure und während des halbstündigen Einleitens der Kohlensäure auf 40° gehalten wird.

Engel<sup>2)</sup> empfiehlt, Milch mit so viel  $\frac{n}{10}$ -Essigsäure zu versetzen, daß auf 10 ccm 6—8 ccm kommen, mit so viel Wasser zu verdünnen, daß das Gesamtvolumen das 5fache der Milch beträgt (also auf 100 ccm Milch 60—80 ccm  $\frac{n}{10}$ -Essigsäure und Wasser bis 500 ccm), zu mischen, 2—3 Stunden bei + 3—4° zu halten und, nach abermaligem Umschütteln, unmittelbar in ein Wasserbad von 40° zu bringen, wobei in wenigen Minuten eine grobflockige, gut filtrierbare Ausfällung erfolgt.

**Bestimmung von Casein, der Summe der übrigen Proteinstoffe und Fett (d. h. ätherlösliche Substanzen) in tierischer Milch\*) nach Schloßmann<sup>3)</sup>.**

809. Man verdünnt 10 ccm gut gemischter Milch (abgemessen oder abgewogen) mit 30—50 ccm Wasser, erwärmt vorsichtig auf dem Wasserbade auf 40°, fügt 1 ccm einer konzentrierten Kalialaunlösung hinzu und wartet unter Umrühren ab, ob eine mittelflockige Koagulation und rasches Absitzen der Koagula erfolgt. Ist das nicht der Fall, so fügt man weiter  $\frac{1}{2}$  ccm der Alaunlösung hinzu, rührt um, wartet  $\frac{1}{2}$  Minute und fährt in dieser Weise fort, bis Koagulation und Abscheidung erfolgt. Die Temperatur soll andauernd 40° betragen; ein kleiner Überschuß von Alaunlösung (bis 1 ccm) schadet nichts. Man wartet nun noch einige Minuten und filtriert dann durch ein stickstofffreies Filter. Läuft die Flüssigkeit trübe durch, so muß das Filtrat zurückgegossen werden, bis es völlig klar ist. Zuletzt wird mehrmals mit Wasser gewaschen.

Der Filtrerrückstand, welcher Casein und Fett enthält, wird nach § 808a,1 weiter behandelt. Soll keine Fettbestimmung ausgeführt werden, so schließt man direkt das Kjeldahlverfahren an (§ 558b). Casein, Fett.

Die nach diesem Verfahren gefundenen Werte für Casein stimmen mit den durch Essigsäure- und Kohlensäurefällung (§ 808) erhaltenen überein (Simon<sup>4)</sup>).

Das Filtrat wird mit 10 ccm Alménscher Lösung (Anh.) versetzt, der entstehende voluminöse Niederschlag abfiltriert, mit Wasser gewaschen und nach Kjeldahl verbrannt. Der gefundene Stickstoff, mit 6,34 multipliziert, ergibt die Menge Proteinstoffe, welche außer dem Casein in der Milch enthalten ist. Die übrigen Proteinstoffe.

**Bestimmung von Casein (+ Globulin) und Albumin in menschlicher und tierischer Milch.**

810. Man mißt oder wägt 10 ccm der gut gemischten Milch ab, fügt 30 bis 40 ccm gesättigte Magnesiumsulfatlösung und etwas mehr pulverisiertes Magnesiumsulfat, als sich zu lösen vermag, hinzu, läßt unter häufigem Umrühren einige Stunden stehen, filtriert dann durch ein stickstofffreies Filter ab und wäscht mehrmals mit gesättigter Magnesiumsulfatlösung nach. Die Filtration geht nur langsam vonstatten, die Anwendung der Wasserstrahlpumpe bietet eher Nachteil als Vorteil.

Der Niederschlag, welcher Casein, Globulin und Fett enthält, wird direkt oder nach Entfernung des Fettes (§ 808a, 1) nach Kjeldahl (§ 558b) behandelt und der gefundene Stickstoffwert mit 6,37\*\*) multipliziert: Casein + Globulin. Casein + Globulin.

\*) Nach Schloßmann Kuh-, Ziegen-, Schweine- und Eselinmilch.

\*\*) S. Sternnote S. 924.

<sup>1)</sup> Malys Jahresber. d. Tierchem. 1884, S. 175.

<sup>2)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 14, S. 234. 1908.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 22, S. 221. 1897. <sup>4)</sup> desgl. Bd. 33, S. 498. 1901.

Das Filtrat (+ Waschwasser) wird mit etwas Wasser verdünnt, mit Essigsäure angesäuert, zum Kochen erhitzt und einige Minuten im Sieden erhalten. Der durch ein stickstofffreies Filter abfiltrierte und mit Wasser gewaschene Niederschlag wird nach Kjeldahl behandelt und der gefundene Stickstoff mit Albumin. 6,34 multipliziert: Albumin.

*Bestimmung des Fettes (d. h. ätherlösliche Substanzen) in der Milch.*

811. Die in den §§ 808—810 beschriebenen Methoden gestatten auch eine genaue Bestimmung des Fettes in der § 808a, 1 angegebenen Weise. Diese Verfahren sind indessen zu umständlich, wenn es sich lediglich um eine Ermittlung des Fettgehaltes handelt.

Von den vielen speziell für die Zwecke der Fettbestimmung vorgeschlagenen Verfahren sollen die 3 folgenden beschrieben werden; die beiden ersten sind gewichtsanalytische, das dritte ist ein aräometrisches:

Bestimmung:  
im Soxhlet'schen  
Extraktions-  
apparat

a) Man bringt 5—10 ccm der gut gemischten Milch tropfenweise auf reinen, ausgeglühten Sand, der sich in der Papierhülse des Soxhlet'schen Extraktionsapparats befindet, trocknet längere Zeit bei 100° und extrahiert nun mit Äther. Die ätherische Lösung wird dann unter Nachspülen mit Äther in ein gewogenes Becherglas übergeführt und verdunstet; der Rückstand wird im Vakuumexsiccator getrocknet und gewogen.

nach Hoppe-  
Seyler

b) Nach Hoppe - Seyler. Man bringt 30 ccm Milch in einer gut verschließbaren Flasche mit etwa 1,5 ccm starker Kalilauge (1,27 spez. Gew.) und etwa 100 ccm Äther zusammen und bewirkt durch vorsichtige drehende Bewegungen während längerer Zeit eine ausgedehnte Berührung beider Flüssigkeiten. Ein starkes Schütteln ist wegen der dabei leicht eintretenden Emulsionsbildung zu vermeiden. Nach guter Trennung beider Schichten gießt man die klare ätherische Lösung durch ein trockenes Filter in einen geräumigen Kolben, bringt eine neue Ätherportion zu der Milch hinzu, mischt wieder in derselben Weise, filtriert durch das gleiche Filter in denselben Kolben und wiederholt das so lange, bis eine Probe der abgegossenen Ätherlösung beim Verdunsten in einem Becherglase keinen beachtenswerten Fettrückstand hinterläßt. Man destilliert jetzt einen großen Teil des Äthers ab, bringt den Rest in ein gewogenes Becherglas, spült mit kleinen Mengen Äther nach, verdunstet den Äther, trocknet im Vakuumexsiccator und wägt.

nach Soxhlet.

c) Nach Soxhlet.

Prinzip. Man führt das Fett in ätherische Lösung über, bestimmt das spezifische Gewicht und die Temperatur dieser Lösung und liest aus einer Tabelle den Fettgehalt ab.

Erforderliche Lösungen und Apparate. 1. Kalilauge vom spez. Gew. 1,27.

2. Mit Wasser gesättigter Äther.

3. Ein großes Gefäß mit etwa 4 l Wasser von 17—18° gefüllt und zum Einstellen der Milchflasche (G) bestimmt.

4. Der in Abb. 39 abgebildete Apparat: Je eine Pipette zu 200, 60 und 10 ccm. Das Gefäß B, welches, von einem Wassermantel A umgeben, oben durch einen Stopfen J verschlossen ist und sich nach unten verjüngt. Über diese Verjüngung ist ein Gummischlauch gezogen, welcher das Gefäß mit dem rechtwinklig gebogenen Glasrohr D verbindet. Dieses Rohr steckt in der einen Bohrung des die Flasche G (von 300 ccm Inhalt) verschließenden Stopfens E, die andere Bohrung füllt ein unter dem Stopfen abschneidendes Rohr F aus, das mit dem Gebläse H verbunden ist. In dem Gefäß B befindet sich das feine, mit Thermometer versehene Aräometer c. Dasselbe ist sehr zerbrechlich und vorsichtig einzuführen, und zwar nachdem man das Gefäß (durch Verstellen des um seine horizontale Achse drehbaren Trägers) in eine ziemlich wagerechte Lage gebracht hat.

Ausführung. Man bringt 200 ccm der 17—18° warmen und gut gemischten Milch in die Flasche G, fügt 10 ccm Kalilauge und nach Umschütteln 60 ccm Äther von 17,5—18,5° hinzu, verschließt sofort mit einem soliden Kautschukstopfen und schüttelt  $\frac{1}{2}$  Minute lang gut durch. Jetzt wird die

Flasche in das Wasser von 17—18° eingesetzt und  $\frac{1}{4}$  Stunde darin gelassen, indem man in Zwischenräumen von  $\frac{1}{2}$  Minute 3—4 senkrechte Stöße ausführt\*). Man läßt dann noch  $\frac{1}{4}$  Stunde ruhig stehen, währenddessen die Abscheidung der Ätherschicht durch einige drehende Bewegungen beschleunigt wird. Meist sammelt sich in dieser Zeit der klare Äther in genügender Menge oben an; nur sehr fettreiche Milch erfordert längere Zeit, selbst 1—2 Stunden. Jetzt füllt man das Gefäß *A* mit Wasser von 17—18°, verschließt den Schlauch durch eine Klemme (Abb. 39), setzt auf die Milchflasche *G* den mit Glasröhren versehenen Stopfen auf, schiebt das Rohr *E* bis auf die unterste Schicht reiner Ätherlösung und erzeugt mittels des Gebläses *H* einen positiven Druck in der Milchflasche. Nun wird unter Lüftung des Stopfens *J* und vorsichtigem Öffnen der Klemme Äther in das Gefäß *B* getrieben und darauf sofort Stopfen und Klemme wieder geschlossen. Schwimmt das Aräometer noch nicht, so verfährt man weiter in derselben Weise, bis genügend Äther übergetreten ist. Nach Senkrechtstellung des Apparates (durch Drehen der Schraube am Fuße des Stativs) wird die dem Teilstrich, bis zu der das Aräometer eingesunken ist, entsprechende Zahl und die Temperatur abgelesen. Nach jedem Versuch sind das Gefäß *B*, das Rohr *D* und der sie verbindende Schlauch mit Äther zu reinigen.

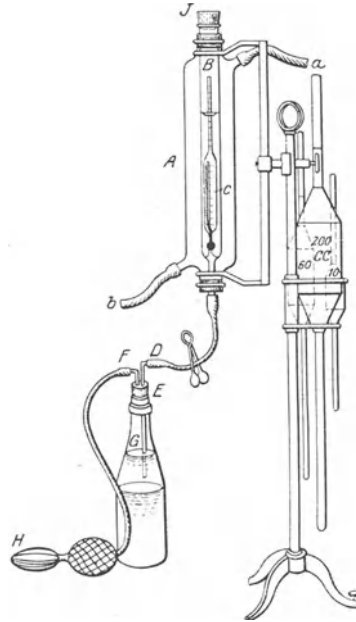


Abb. 39. Apparat zur Milchfettbestimmung nach Soxhlet.

Berechnung. War die Temperatur der Ätherlösung 17,5°, so ist keine Korrektur nötig, andernfalls ist für jeden Zehntelgrad, den das Thermometer höher steht, 0,1 zur Angabe des Aräometers hinzuzufügen und für jeden Zehntelgrad, den es tiefer steht, 0,1 von der Angabe abzuziehen. Aus der Tabelle (Anh.) liest man den der abgelesenen bzw. korrigierten Zahl entsprechenden Prozentgehalt an Fett ab. Die Zahlen, welche in der Tabelle als spezifische Gewichte angegeben sind, sind die Ergänzungen für 0,7000 in 2.—4. Dezimalstelle. 43,0 entspricht also dem spez. Gew. 0,7430.

#### Bestimmung des Milchzuckers in der Milch.

812. 1. Durch Polarisation. a) Nach Hoppe-Seyler. Man bringt durch Polarisation 50 ccm der gut gemischten Milch in einen Kolben von etwa 150 ccm Inhalt, fügt 25 ccm einer Lösung von neutralem Bleiacetat hinzu, verschließt mit einem Stopfen, in dessen Durchbohrung das untere Ende eines geraden, ungefähr 30 cm langen Glasrohres steckt, und erhitzt nach gutem Umschütteln mit kleiner Flamme zum einmaligen Aufkochen. Nach völligem Erkalten, währenddessen der entwickelte und im Glasrohr verdichtete Dampf wieder zurückgeflossen ist, wird durch ein trockenes Filter in ein trockenes Gefäß filtriert und das klare (evtl. mehrfach auf das Filter zurückgegossene) Filtrat polarisiert. Betrag die Länge des Rohres 2 dm, die Temperatur 20°, der abgelesene Winkel  $\alpha$  und der Gehalt des Milchzuckers in 100 ccm Milch  $x$ , so ist, da die spezifische Drehung des Milchzuckers bei Natriumlicht und bei 20° + 52,5 beträgt,

$$x = \frac{\alpha \cdot 100}{52,5 \cdot 2} \cdot \frac{3}{2} = \alpha \cdot 1,429 \quad (\S 32).$$

\*) Diese Vorschriften sind genau zu befolgen.

Wurde die Bestimmung mit einem Saccharimeter (§ 34) ausgeführt und wurden die Prozente Traubenzucker  $p$  abgelesen, so ist (die spezifische Drehung des Traubenzuckers bei Natriumlicht zu 52,6 angenommen):

$$x = \frac{p \cdot 52,6}{52,5} \cdot \frac{3}{2}.$$

Da die Farbendispersion bei der Zirkumpolarisation durch Trauben- und Milchzucker nicht merklich verschieden ist, so gilt der für Natriumlicht gefundene Quotient auch für weißes Licht.

b) Nach Salkowski<sup>1)</sup>. Man bringt in einen mit Glasstöpsel versehenen Maßzylinder von 150—200 ccm Inhalt 50 ccm Milch und 17,5 g Ammonsulfat, schüttelt bis zur Lösung, füllt mit gesättigter Ammonsulfatlösung bis zu 100 auf, mischt, filtriert durch ein trockenes Filter und polarisiert. Die Berechnung wie oben, nur daß man statt mit  $\frac{3}{2}$  mit 2 multipliziert.

Das Eiweiß kann auch durch Aceton oder durch kolloidales Eisenhydroxyd (Kretschmer<sup>2)</sup>) oder durch Aluminiumhydroxyd (Welker und Marsh<sup>3)</sup>) entfernt werden.

durch Titration  
nach Fehling.

2. Durch Titration mit Fehlingscher Lösung. Die Ausführung dieser Bestimmung, welche die vorherige Entfernung der Proteinstoffe erfordert, ist schon § 808 beschrieben worden. Die kleinen Mengen Proteinkörper, welche nach Fällung mit Essigsäure, Kohlensäure und Kochen noch gelöst bleiben, beeinträchtigen die Genauigkeit nicht.

Sebelien<sup>4)</sup> erhielt bei der Bestimmung des Milchzuckers in der Milch mit Hilfe von Fehlingscher Lösung (Wägung des reduzierten Kupferoxyduls als Kupfer) immer um 1—3‰ niedrigere Werte als bei der polarimetrischen Bestimmung. Er schließt daraus auf die Anwesenheit anderer reduzierender Substanzen, welche stärker rechtsdrehend sind als Milchzucker, und meint, daß eine dieser Substanzen eine Pentose sei.

3. Durch Titration ohne vorherige Entfernung der Eiweißstoffe. S. darüber Folin und Denis<sup>5)</sup>.

durch Colorimetrie.

4. Über ein colorimetrisches Verfahren s. Autenrieth und Funk<sup>6)</sup> sowie Folin und Denis.

#### *Bestimmung des Gesamtnichtproteinstickstoffs und einzelner Extraktivstoffe in der Milch.*

813. Man erfährt die Menge des Stickstoffs der Extraktivstoffe (des sog. Reststickstoffs) durch Subtraktion des nach § 807 ermittelten Stickstoffs der Gesamtproteinstoffe von dem nach Kjeldahl (§ 558b) ermittelten Gesamtstickstoff der Milch oder auch in der Weise, daß man die gesamten Filtrate der nach § 807 erhaltenen Niederschläge auf ein kleines Volumen einengt und in diesem den Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt. S. dazu auch Denis und Minot<sup>7)</sup>. Hier sind auch Methoden zur Bestimmung des Harnstoffs, Kreatinins und Kreatins, des Aminostickstoffs und der Harnsäure angegeben.

Bestimmung von  
Harnstoff, Krea-  
tinin, Kreatin,  
Aminostickstoff,  
Harnsäure.

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 78, S. 89. 1912. S. dazu Jahnsen - Blohm: desgl. Bd. 83, S. 441. 1913. — Kretschmer: desgl. Bd. 85, S. 286. 1913. — Rosemann: desgl. Bd. 89, S. 133. 1914.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 85, S. 286. 1913.

<sup>3)</sup> Journ. of the Americ. chem. soc. Bd. 35, S. 823; ref. Chem. Zentralbl. 1913, 2, S. 789.

<sup>4)</sup> Hammarsten-Festschrift Nr. 17. 1906. Upsala und Wiesbaden.

<sup>5)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 33, S. 521. 1918.

<sup>6)</sup> Münch. med. Wochenschr. Bd. 58, S. 1717. 1911.

<sup>7)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 37, S. 353. 1919. — Denis, Talbot u. Minot: Journ. of biol. chem. Bd. 39, S. 47. 1919.

**Bestimmung der Citronensäure in der Milch.**

**814. Nach Scheibe**<sup>1)</sup>. Abscheidung. 400 ccm Milch werden mit 4 ccm 2,5 n-Schwefelsäure versetzt, aufgeköcht, nach Zufügen von 10 g spanischer Klärerde, die mit Wasser zu einem dicken Schleim angerührt sind, nochmals aufgeköcht und nach dem Erkalten quantitativ in einen Halblitermaßkolben unter Nachspülen mit Wasser übergeführt. Man füllt bis zur Marke mit Wasser auf, mischt und filtriert. (Ist das Filtrat nicht klar, so muß nochmals spanische Klärerde angewendet werden.) Man mißt jetzt 100 ccm des Filtrates ab, fügt so viel Barytwasser hinzu, daß die zugefügte Schwefelsäure gerade gesättigt und die ursprüngliche Reaktion der Milch wieder hergestellt ist, dampft zum Sirup ein und fügt 3,2 ccm 2,5 n-Schwefelsäure (eine Menge, die genügt, um die Citronensäure freizumachen), darauf allmählich 20 ccm absoluten Alkohol und nach kurzem Absitzenlassen 60 ccm Äther hinzu. Dadurch wird aller Milchzucker ausgefällt, während die Citronensäure in Lösung bleibt. Die Mischung wird durch Baumwolle in einen Destillationskolben filtriert, das Filtrat mit alkoholischem Ammoniak (100 ccm konzentrierter Ammoniak, 900 ccm Alkohol) bis zur bleibenden Trübung versetzt und bis auf etwa 20 ccm abdestilliert. Aus dem Rückstande scheidet man durch Zufügen von 60 ccm absolutem Alkohol und 10 ccm alkoholischem Ammoniak die Citronensäure als Triammoniumverbindung völlig ab. Der beim Stehen sich abscheidende Niederschlag enthält außerdem noch etwas schwefelsaures, phosphorsaures und salzsaures Ammoniak und ein wenig organische Substanz, die durch Wiederholung der Fällung mit alkoholischem Ammoniak entfernt werden muß.

Ein Gehalt der Milch an Milchsäure ist ohne Nachteil, da diese Säure durch alkoholisches Ammoniak nicht gefällt wird.

**Bestimmung.**

**Prinzip.** Die Citronensäure wird mit einer bestimmten Menge Kaliumbichromat versetzt und das zur Oxydation der Citronensäure nicht gebrauchte Bichromat durch Titration mit Ferroammonsulfat zurückgemessen.

**Erforderliche Lösungen.** 1. Eine 4,61 proz. Lösung von Kaliumbichromat. 1 ccm derselben sollte nach der Gleichung  $C_6H_8O_7 + 6 CrO_3 = 6 CO_2 + 3 Cr_2O_3 + 4 H_2O$  0,01 g Citronensäure entsprechen; nach den ausgeführten Titrierungen entspricht er aber 0,0102 g.

2. Eine Lösung, die in 1000 ccm 150 g Ferroammonsulfat und 100 ccm konzentrierte Schwefelsäure enthält.

Um den Wirkungswert dieser Lösungen zueinander festzustellen, mißt man 20 ccm der letzteren ab, fügt 80 ccm Wasser hinzu und läßt aus einer Bürette die Kaliumbichromatlösung hinzufließen, bis 1 Tropfen der Mischung mit Ferricyankalium keine Blaufärbung mehr gibt. 20 ccm der Eisenlösung verbrauchen 7,7—8 ccm der Bichromatlösung.

**Ausführung.** Das citronensaure Ammoniak wird in Wasser gelöst. Die auf 20 ccm konzentrierte Lösung wird mit 20—30 ccm (genau gemessen) der Bichromatlösung und 20—25 ccm konzentrierter Schwefelsäure vorsichtig unter Umrühren versetzt und darauf etwa  $\frac{1}{4}$  Stunde erhitzt (aber nicht bis zum Sieden). Die Oxydation ist dann zu Ende, die Kohlensäureentwicklung hat aufgehört. Man verdünnt jetzt mit 50 ccm Wasser, setzt (gemessene Mengen) Ferroammonsulfatlösung im Überschuß hinzu, bis die braune Farbe in eine grüne übergegangen ist, und titriert nun mit Bichromat zurück.

Die Berechnung ist einfach.

**Nach Denigès-Beau**<sup>2)</sup>. Die Methode beruht auf der von Denigès angegebenen Reaktion zum Nachweis der Citronensäure (S. 97): Oxydation der Citronensäure zu Acetondicarbonsäure, welche mit Mercurisulfat eine in saurer Lösung unlösliche Verbindung gibt. Man erfährt die Citronensäure durch Wägung des Niederschlags oder durch titrimetrische Bestimmung des im Harn enthaltenen Quecksilbers. Wegen der Ausführung siehe die Originalarbeit.

### Untersuchung des Sekretes der Talgdrüsen und der diesem ähnlich zusammengesetzten Sekrete.

**815.** Hierher gehören außer dem Hautfett<sup>3)</sup> (Fett der Talgdrüsen, der Knäueldrüsen, der Oberhautschicht) die Vernix caseosa<sup>4)</sup>, der Wollschweiß

<sup>1)</sup> Die landwirtschaftlichen Versuchsstationen Bd. 39, S. 153. 1891.

<sup>2)</sup> Chem. Zentralbl. 1904, II, S. 856. Malys Jahresber. der Tierchemie 1904. S. 281.

<sup>3)</sup> Hoppe-Seyler: Physiologische Chemie S. 760. — Linser: Dtsch. Arch. f. klin. Med. Bd. 80, S. 201. 1904. — Röhmann: Ref. Zentralbl. f. Physiol. Bd. 19, S. 317. 1906. — Unna u. Golodetz: Biochem. Zeitschr. Bd. 20, S. 469. 1909.

<sup>4)</sup> Liebreich: Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. Bd. 121, S. 383. 1890. — Ruppel: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 21, S. 122. 1896. — Zumbusch: desgl. Bd. 59, S. 506. 1909.

der Schafe<sup>1)</sup>, das Sekret der Bürzeldrüse der Vögel<sup>2)</sup>, das Smegma<sup>3)</sup>, das Ohrenschmalz<sup>4)</sup>, der Inhalt der Balggeschwülste und Dermoidcysten<sup>5)</sup>.

**Bestandteile.** Diese Massen haben eine salbenförmige oder dünnbreiige Konsistenz und enthalten mehr oder weniger Epithelzellen, manche auch Fetttröpfchen und Cholesterinkristalle beigemengt.

Alle zeichnen sich durch einen mehr oder weniger reichen Fettgehalt aus, daneben finden sich noch Cholesterinester (Sekret der Talg- und Knäueldrüsen, Oberhautfett, Nagelfett, Vernix caseosa, Ohrenschmalz, Wollfett der Schafe; nicht in der Bürzeldrüse), Isocholesterinester (Wollfett der Schafe, aber nicht in den Fetten der menschlichen Haut und der Vernix caseosa), Oxycholesterinester (Fett der Talg- und Knäueldrüsen, der Nägel, nicht in Vernix caseosa und Ohrenschmalz), Metacholesterinester (?) (Wollfett der Schafe), Octadecylalkoholester (Fett der Bürzeldrüse, in der die Glycerinester an Menge zurücktreten, wahrscheinlich auch in Dermoidcysten), Eikosylalkoholester (wahrscheinlich in Dermoidcysten, vielleicht auch im Sekret der Hauttalgdrüsen), Cerylalkoholester (Wollfett der Schafe), Carnaubylalkoholester (Wollfett der Schafe, indessen von Röhmann nicht bestätigt). Was die Säurekomponenten der Ester betrifft, so handelt es sich in der Hauptsache um höhere Fettsäuren. Im Dermoidcystenfett sind nachgewiesen: Palmitinsäure, Stearinsäure, Ölsäure, Myristinsäure, Arachinsäure neben wenig Ameisensäure und Buttersäure (v. Zeynek). Im Wollfett der Schafe findet sich nach Röhmann Cerotin-, Stearin-, Palmitinsäure, Anhydrid der Lanocerinensäure, nach Darmstädter und Lifschütz noch andere Säuren. S. dazu auch Grassow. Über die Fettsäuren aus dem Bürzeldrüsenfett s. Röhmann.

Außerdem kommen in diesen Sekreten Phosphatide, freies Cholesterin (reichlich in Atherombälgen (Linser), im Sekret der Bürzeldrüsen fehlt es nach Röhmann), Proteinstoffe und anorganische Salze vor. Unter den Proteinstoffen fand sich im Hauttalg und in der Bürzeldrüse ein proteid(casein)-artiger Stoff (de Jonge). Zucker ist nicht vorhanden. In Atherombälgen sind auch Leucin und Tyrosin enthalten, im Wollschweiß ist Phenolschwefelsäure gefunden.

Die **Untersuchung** dieser Massen geschieht wie die seröser Flüssigkeiten (§ 630 ff.); nur in betreff der Proteinstoffe und der unverseifbaren ätherlöslichen Stoffe ist noch einiges zu bemerken.

**Proteinstoffe.** Da alle diese Sekrete keine Flüssigkeiten darstellen, so sind die Proteinstoffe, soweit sie löslich sind, zunächst in wässrige Lösung zu bringen. Das geschieht, indem man die salbenförmigen oder breiigen Massen mit Wasser zerreibt oder schüttelt und dann filtriert. Die Filtrate werden nach § 634 und 635 untersucht.

<sup>1)</sup> Hartmann: Diss. Göttingen 1868. — E. Schulze: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 5, S. 1075. 1872; Bd. 6, S. 251. 1873. — Liebreich: a. a. O. — Darmstaedter u. Lifschütz: Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 29. 1896; Bd. 31. 1898, mehrere Arbeiten. — Röhmann: Ref. Zentralbl. f. Physiol. Bd. 19, S. 317. 1906. Biochem. Zeitschr. Bd. 77, S. 298. 1916. Grassow: Biochem. Zeitschr. Bd. 148, S. 61. 1924.

<sup>2)</sup> de Jonge: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 3, S. 225. 1879. — Röhmann: Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 5, S. 110. 1904.

<sup>3)</sup> C. G. Lehmann, L. Gmelin: Handbuch d. Chem. Bd. 8, S. 295. — Linser: a. a. O. — Zaribnicky: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 80, S. 232. 1912.

<sup>4)</sup> Petrequin: Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences Bd. 68, S. 940. 1869; Bd. 69, S. 987. 1869. — Lamois u. Martz: Ref. Malys Jahresber. d. Tierchem. 1897, S. 40. — Linser: a. a. O.

<sup>5)</sup> Sotnitschewsky: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 4, S. 345. 1880. — v. Zeynek: desgl. Bd. 23, S. 40. 1897. — Linser: a. a. O. — Ameseder: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 52, S. 121. 1907. — Salkowski: Biochem. Zeitschr. Bd. 32, S. 341. 1911.



In der auf diese Weise aus dem Sekret der Bürzeldrüse und aus dem Hauttalg erhaltenen wässrigen Lösung rief Kohlensäure einen flockigen Niederschlag hervor, der in 7proz. Kochsalzlösung unlöslich, in Natriumcarbonat und verdünnter Salzsäure löslich war. Im Filtrat von diesem Niederschlag entstand durch Kochen eine weitere Fällung.

Unverseifbare ätherlösliche Stoffe. Sie werden isoliert, indem man den nach den Prinzipien des § 660 gewonnenen Ätherextrakt nach § 94 verseift, die verseifte Masse mit Äther extrahiert und den Ätherauszug verdunstet, und können aus Cholesterin, Oxycholesterin, Isocholesterin, anderen noch unbekanntem cholesterinartigen Alkoholen, Octadecyl-, Eikosylalkohol und anderen höheren Alkoholen der Fettreihe bestehen. Man löst den Ätherrückstand in heißem absoluten Alkohol. Beim Erkalten scheiden sich Cholesterin, Isocholesterin, Octadecyl- und Eikosylalkohol aus, während Oxycholesterin und andere cholesterinartige Alkohole, wie sie sich nach v. Zeynek in den Dermoidcysten finden, in Lösung bleiben. Zur Trennung der aliphatischen Alkohole von Cholesterin benutzt man fraktionierte Krystallisation aus Alkohol, zur Trennung von Cholesterin und Isocholesterin das Digitoninverfahren. Cholesterin wird nach § 232, Isocholesterin nach § 236, Octadecyl-, Eikosylalkohol und andere Alkohole nach S. 53 identifiziert.

Unverseifbare,  
ätherlösliche  
Stoffe.

Über die noch wenig bekannten cholesterinartigen Alkohole, welche in den Dermoidcysten gefunden wurden, s. bei v. Zeynek. Sie sind auch von Linser gefunden worden (Dermoolein von Röhm ann). Im übrigen s. betreffs der Untersuchung die angeführten Originalarbeiten.

### Untersuchung des Spermas.

816. Das menschliche Sperma, ein Sekret von dickflüssiger Beschaffenheit, weißlicher bis gelblicher Farbe und milchigem Aussehen, besteht aus der sog. Zwischenzellenflüssigkeit und den Spermatozoen. Es reagiert alkalisch und enthält etwa 10% Trockenrückstand, darunter sehr wenig ätherlösliche Substanzen, anorganische Salze (etwa 0,9% hauptsächlich Natriumchlorid und Calciumphosphat) und Proteinstoffe (etwa 2,5%), und zwar sowohl durch Essigsäure schon in der Kälte als auch erst beim Erhitzen nach Ansäuern mit Essigsäure fällbare, ferner Albumosen\*). Unter den durch Essigsäure in der Kälte fällbaren Proteinstoffen findet sich ein Nucleoprotein, welches den Spermatozoen angehört, und wohl auch Glucoprotein (Slowtzoff<sup>1</sup>), ferner ist Nucleon (Cavazzani<sup>2</sup>), ein Protamin, das bei der Hydrolyse Arginin gibt (Hofmann<sup>3</sup>), und eine Base<sup>4</sup>) gefunden.

Während das menschliche Sperma noch nicht genauer untersucht worden ist, sind eingehende Arbeiten über das Sperma von Fischen, besonders über das Lachsperma, ausgeführt worden (Miescher<sup>5</sup>). Auf dieses beziehen sich die folgenden Angaben.

**Trennung in Zwischenzellenflüssigkeit und Spermatozoen.** Sie geschieht durch Zentrifugieren des ganz frischen Spermas, noch vollständiger, wenn das ganz frische Sekret vorher mit einer Glaubersalzlösung (1,02 spez. Gew.) vermischt wird.

Untersuchung  
des Lachs-  
spermas.

\*) Nach Posner, welcher Albumosen zuerst fand (Berl. klin. Wochenschr. 1888, S. 417), stammen sie aus akzessorischen Drüsen (Zentralbl. f. med. Wissensch. 1892, S. 225).

<sup>1</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 35, S. 358. 1902. Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. Bd. 79, S. 208; ref. Malys Jahresber. d. Tierchem. 1918, S. 895.

<sup>2</sup>) Arch. ital. d. biol. Bd. 42, S. 151, 156, 161; ref. Zentralbl. f. Physiol. Bd. 19, S. 142. 1906.

<sup>3</sup>) Fol. urologica Bd. 4, S. 85. 1909; ref. Biochem. Zentralbl. Bd. 9, S. 206.

<sup>4</sup>) Siehe Wrede u. Banik: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 131, S. 38. 1923.

<sup>5</sup>) Verhandl. d. naturh. Ges. in Basel Bd. 6, H. 1, S. 138. 1874. Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 37, S. 100. 1896.

**Trennung der Spermatozoen in Köpfe und Schwänze.** Sie gelingt durch wiederholtes Zentrifugieren der Spermatozoen mit immer erneutem Wasser, bis die zentrifugierte Flüssigkeit ganz klar ist. Die Köpfe bleiben als Sediment zurück, während die Schwänze unter Quellung und Trübung der Flüssigkeit in diese übergehen.

**Untersuchung.** 1. der Zwischenzellenflüssigkeit. Sie ist völlig klar, wasserhell, alkalisch und enthält anorganische Salze (Natrium, Kalium, Salzsäure, Schwefelsäure, Kohlensäure), Spuren von Eiweiß (ganz geringe Abscheidung auf Zusatz von Ferrocyankalium + Essigsäure), kein Pepton.

2. der die Schwänze enthaltenden Flüssigkeit. Durch Zufügen von überschüssigem Ammonacetat und einigen Tropfen Salzsäure entsteht ein Niederschlag, welcher durch Behandeln mit Alkohol und Äther in einen in diesen Flüssigkeiten löslichen und einen darin unlöslichen Teil getrennt werden kann. Der erstere besteht aus Cholesterin, Phosphatid, Fett und wird nach S. 99 und § 795 untersucht, der letztere aus Proteinsubstanz.

3. der Köpfe. Diese bestehen zum allergrößten Teil aus nucleinsaurem Salmin. Man extrahiert sie mit Alkohol und Äther (wobei äußerst wenig in Lösung geht, darunter kein Phosphatid) und darauf bei niedriger Temperatur mit 0,25—0,5proz. Salzsäure. Dabei wird Salmin gelöst, während Nucleinsäure ungelöst bleibt. Aus dem Filtrat läßt sich Salmin mittels Platinchlorid ausfällen. S. dazu die Untersuchungen von Steudel<sup>1)</sup>, aus denen ebenfalls hervorgeht, daß die Köpfe der Spermatozoen wohl ausschließlich aus nucleinsaurem Protamin bestehen.

Das unreife Sperma von Fischen (bei manchen auch das reife Sperma) enthält statt der Protamine Histone. Im Sperma vom Frosch, Hahn, Stier (Miescher), von Stier und Eber (Mathews<sup>2)</sup>) konnte keine protamin- oder histonartige Substanz nachgewiesen werden.

Über die Darstellung der Protamine aus Sperma vgl. § 358, der Histone aus Sperma § 350 ff. und über die Darstellung der Nucleinsäuren aus Sperma § 274.

## Untersuchung des Darminhaltes.

(Bearbeitet von G. Hoppe-Seyler-Kiel.)

### Untersuchung des Dünndarminhaltes.

817. **Bestandteile.** Der Chymus, wie er in einem Fall einer Darmfistel beim Menschen aus dem untersten Ende des Dünndarms nach gemischter Ernährung ausfloß, stellte eine dünnbreiige, gelb bis gelbbraun gefärbte, fast geruchlose Masse von saurer Reaktion dar. Es fanden sich in ihm in der Hitze gerinnendes Eiweiß, Pepton, Mucin, Stärke, Dextrin, Zucker, Milchsäure, flüchtige Fettsäuren, besonders Essigsäure, Gallensäuren, Bilirubin, aber kein Leucin und Tyrosin und keine Endprodukte der Fäulnis oder höchstens Spuren (Nencki<sup>3)</sup>).

Im Dünndarminhalt mit Fleisch gefütterter Hunde finden sich stets Peptone und Amino- und Diaminosäuren<sup>4)</sup> und Spaltungsprodukte der Nucleinsäuren wie Guanylsäure, Guanodin und vielleicht auch Adenosin (London,

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 72, 305. 1911; Bd. 73, S. 471. 1911; Bd. 83, S. 72. 1913; Bd. 114, S. 161. 1921.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 23, S. 410. 1897.

<sup>3)</sup> Macfadyen, Nencki u. Sieber: Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 28, S. 311. 1891.

<sup>4)</sup> Kutscher u. Seemann: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 34, S. 528. 1902. — Abderhalden u. Mitarbeiter, desgl. Bd. 53, S. 148. 1907; Bd. 71, S. 411. 1911; Bd. 74, S. 436. 1911; Bd. 78, S. 342. 1912.

Schittenhelm und Wiener<sup>1)</sup>. Die Reaktion ist neutral oder sauer, niemals alkalisch (J. Munk<sup>2)</sup>).

Die **Untersuchung** des Dünndarminhaltes geschieht wie die der Faeces (§ 818 ff.). Über den Nachweis der Mono- und Diaminosäuren s. bei Kutscher und Seemann sowie bei Abderhalden.

Zum Nachweis von Bilirubin und Urobilin nebeneinander empfiehlt Salkowski<sup>3)</sup> folgendes Verfahren: Der Dünndarminhalt (oder die aus einer Fistel fließende Flüssigkeit) wird auf dem Wasserbade eingeeengt und mit Alkohol ausgezogen, der filtrierte Auszug eingeeengt, die dabei erhaltene wässerig-trübe (bei reichlicher Fettausscheidung mit Äther auszuschüttelnde) Flüssigkeit mit Natriumcarbonat leicht alkalisch gemacht, mit Calciumchlorid versetzt und filtriert. Den ausgewaschenen Niederschlag prüft man mit der modifizierten Gmelinschen Probe (S. 757) auf Bilirubin. (Die Huppert-Salkowskische Probe, S. 758, 4, fällt auch bei Gegenwart von Bilirubin meist nicht typisch aus, sondern die Farbe bleibt gelb, nimmt höchstens einen leicht grünlichen Ton an. Um sie zu erhalten, ist es nötig, 1 Tropfen einer 0,5 proz. Kaliumnitritlösung zuzufügen.) Das Filtrat dient zur Prüfung auf Urobilin. Man macht es mit Salzsäure sauer, schüttelt im Scheidetrichter mit Chloroform, reinigt die Chloroformlösung durch Schütteln mit Wasser und filtriert sie. Nach Beseitigung etwaiger Trübung durch gelindes Erwärmen oder Zufügung von Alkohol fügt man Chlorzinklösung hinzu: bei Anwesenheit von Urobilin färbt sich das Chloroform rosenrot mit grüner Fluorescenz und bei der spektroskopischen Untersuchung zeigt sich der Streifen (Spektraltafel).

Nachweis von  
Bilirubin und  
Urobilin neben-  
einander.

## Untersuchung der Faeces.

### Allgemeines.

Die Faeces sind ebenso sehr ein Objekt für die mikroskopische Untersuchung wie für die chemische. Im folgenden wird nur von der letzteren die Rede sein.

818. **Bestandteile.** Menge und Zusammensetzung der menschlichen Faeces sind vor allem abhängig von der Art der Nahrung. Bei reiner Fleischkost ist ihre Quantität am geringsten und kaum größer als beim Hungern, bei vegetabilischer am größten. Die Bestandteile lassen sich in folgende 4 Gruppen einteilen:

1. Reste der Nahrung (zum Teil unverdauliche, zum Teil unverdaute): Keratinhaltige Substanzen, Reste von elastischem Gewebe und von Bindegewebe, Casein und Paranuclein (nach reichlicher Milchzufuhr), Hämatin, Cellulose, Amylum, Fett, Phosphatide<sup>4)</sup>, Kalkseifen (aus Fett stammend), Harze, anorganische Stoffe (Calcium, Magnesium, Kalium, Natrium, Eisen, gebunden an Phosphorsäure, Schwefelsäure, Kohlensäure), und zwar überwiegend im allgemeinen unter den Basen die alkalischen Erden und unter den Säuren Phosphorsäure, während Schwefelsäure und Salzsäure in geringer Menge sich finden. Sand ist meist ziemlich reichlich vorhanden; dazu unter pathologischen Verhältnissen: lösliche Eiweißstoffe, Leucin und Tyrosin und jedenfalls auch andere Aminosäuren (aus dem Eiweiß stammend), Zucker.

Reste der  
Nahrung.

2. Reste der Verdauungssäfte: Mucine, Nucleoproteide und Nucleinbasen (die Purinkörper stammen unter normalen Verhältnissen im wesentlichen

Reste der Ver-  
dauungssäfte.

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 72, S. 459. 1911.

<sup>2)</sup> Zentralbl. f. Physiol. Bd. 16, S. 33. 1903.

<sup>3)</sup> Arb. a. d. pathol. Inst. Berlin. S. 583. Hirschwald 1906.

<sup>4)</sup> Long u. Johnson: Journ. of the Americ. chem. soc. Bd. 28, S. 1499. 1906; Bd. 29, S. 1214. 1907.

aus den Verdauungssäften<sup>1)</sup>, sich abstoßenden Epithelien<sup>2)</sup> und aus Bakterien<sup>3)</sup>, unter Umständen aber zum Teil auch aus den Nahrungspurinen<sup>2)</sup>, ferner Fermente (Diastase, Invertin, Pepsin, Trypsin, Erepsin, Lipase besonders bei Diarrhöe) und manche der unter 1. genannten Stoffe. Dazu unter pathologischen Verhältnissen: Glyko- und Taurocholsäure.

Produkte  
bakterieller  
Einwirkung.

3. Produkte bakterieller Einwirkung. Wasserstoff, Ammoniak, Schwefelwasserstoff, Sumpfgas, flüchtige Fettsäuren, Methylmercaptan, Hydro-p-cumarsäure, p-Oxyphenylessigsäure, Phenole, Skatol, Indol, Cholsäure, Koprosterin, Urobilinogen, Urobilin und dazu unter pathologischen Verhältnissen Milchsäure, Cadaverin und Putrescin (häufig bei Cystinurie).

Organisierte  
Elemente.

4. Organisierte Elemente. Epithelzellen, Mikroorganismen usw.; unter pathologischen Verhältnissen auch Epithelkörperchen und Blutkörperchen. Unveränderte Blutkörperchen finden sich nur bei Blutungen in den Darm, und zwar (abgesehen von den Fällen mit sehr beschleunigter Peristaltik und rascher Entleerung wie bei akuter Gastroenteritis, Typhus und Cholera, oder von außerordentlich reichlichen Blutungen) nur bei solchen Blutungen, welche in den untersten Teil des Dickdarms erfolgen. Unter normalen Verhältnissen erfährt das Blut im Darm eine Zersetzung, und der Blutfarbstoff erscheint als Hämatin in den Faeces.

**Allgemeine Eigenschaften.** Die Konsistenz ist von dem Wassergehalt abhängig. Die normalen menschlichen Faeces sind geformt oder breiig.

Die Farbe ist bei gemischter Nahrung bräunlich, bei reiner Fleischkost dunkler (bis schwarz), bei vegetabilischer heller, bei Milchkost gelblich, bei Abschluß von Galle weißlich oder grau, bei reichlicher Blutbeimischung braunschwarz, bei Wismuteinnahme reinschwarz, bei Eisendarreichung grünlich-schwarz, bei Genuß grüner Gemüse (Chlorophyll) grünlich, ebenso nach Kalomel-eingabe.

Die Reaktion ist bei gemischter Nahrung gegen Lackmus neutral oder schwach alkalisch oder schwach sauer. Eine stärker saure Reaktion ist meist durch lebhaftere Gärung von Kohlenhydraten, Fehlen von Galle, eine stärker alkalische durch vermehrte Eiweißfäulnis im Darm, ferner durch Schleim bei Typhus, Cholera, Ruhr usw. bedingt. Zur Prüfung der Reaktion zerreibt man die Faeces mit etwas Wasser, befeuchtet mit der Masse ein Reagenspapier und beobachtet die Farbe der Rückseite oder spritzt es ab. Die Prüfung muß bald nach der Entleerung erfolgen, da beim Stehen die Reaktion durch Eiweißfäulnis und Kohlenhydratgärung rasch sich ändern kann.

Der Geruch ist der bekannte, als fäkalartig bezeichnete. Er rührt hauptsächlich von Indol und Skatol her, bei starker Eiweißfäulnis ist er aashaft stinkend, bei Kohlenhydratgärung und Milchkost säuerlich, bei reichlichem Schleimgehalt wie der von Leim oder Sperma.

#### *Nachweis von anorganischen Salzen in den Faeces.*

819. Eine direkte Veraschung ist aus den § 632 entwickelten Gründen unzulässig. Um die Fehlerquellen, zu denen in diesem Falle noch der Gehalt an eisenhaltigem Hämatin und an Kieselsäure hinzukommt, nach Möglichkeit zu vermeiden, verrührt man die Faeces mit einem großen Überschuß von Alkohol, filtriert und zieht den Rückstand zunächst mit verdünnter Essigsäure und

<sup>1)</sup> Weintraud: Zentralbl. f. inn. Med. Bd. 16, S. 433. 1895. Verhandl. d. 14. Kongr. f. inn. Med. 1896, S. 190. — Krüger u. Schittenhelm: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 35, S. 153. 1902.

<sup>2)</sup> Schittenhelm: Dtsch. Arch. f. klin. Med. Bd. 81, S. 423. 1904.

<sup>3)</sup> Schittenhelm u. Tollens: Zentralbl. f. inn. Med. 1904, S. 761.

darauf mit verdünnter Salzsäure aus. Es werden auf diese Weise eine alkoholische, eine essigsäure und eine salzsaure Lösung erhalten.

1. Die alkoholische und essigsäure Lösung. Man vereinigt sie, dampft ein\*), verascht nach § 525 und untersucht den wässerigen und den salzsauren Auszug nach §§ 531 und 532. (Etwa gefundenes Eisen zeigt Hämatin an, welches den Faeces durch Alkohol entzogen worden ist.)

2. Die salzsaure Lösung. Man verdampft und verascht ebenfalls, nimmt die Asche mit Salzsäure auf und untersucht die Lösung nach § 532 auf Phosphorsäure und auf Eisen. An dieser Stelle gefundenes Eisen war in den Faeces als Phosphat oder als Oxyd vorhanden.

#### *Nachweis von Fermenten in den Faeces.*

820. Der Nachweis von Fermenten in den Faeces erfolgt im wesentlichen wie im Pankreassaft. Um auf Trypsin zu prüfen, benutzt man die Methode von Müller und Schlecht: Nach Abführmitteln (Senna oder Kalomel) erhaltener dünnflüssiger Stuhl wird mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt im Verhältnis 1 : 10 bis 1 : 200. Von den einzelnen Verdünnungen werden Tropfen auf die einzelnen Felder einer Serumplatte gebracht. Wenn nach einigen Stunden bei 50° an ihrer Stelle infolge Verflüssigung des Serums Dellen entstehen, so ist Trypsin nachgewiesen. Erepsin verdaut das Serum nicht.

#### *Nachweis von Proteinstoffen in den Faeces.*

821. Man zerreibt die Faeces mit schwach essigsäurehaltigem Wasser, filtriert, zerreibt den Rückstand mit ganz verdünnter Natronlauge oder Kalkwasser und filtriert abermals. Das erste Filtrat wird nach § 613 auf Eiweiß untersucht, das zweite Filtrat nach § 634 auf phosphorhaltige Proteide und Glucoproteide.

#### *Nachweis von Nucleinbasen in den Faeces<sup>1)</sup>.*

822. Zum Nachweis der Nucleinbasen (und zwar der freien sowie der durch Spaltung der Nucleoproteide erhaltenen) erhitzt man die Tagesmenge Faeces mit 2 l Wasser und 15 ccm konzentrierter Schwefelsäure 2—3 Stunden, filtriert, macht mit Natronlauge alkalisch, mit Essigsäure stark sauer, kocht noch einmal auf und filtriert. In der heißen Lösung entsteht auf Zusatz von Kupfersulfat und Natriumbisulfid ein Niederschlag, welcher die Kupferoxydulverbindungen der Nucleinbasen enthält.

Um die einzelnen Basen zu isolieren und nachzuweisen, verfährt man nach § 741.

#### *Nachweis von aromatischen Substanzen, Koprosterin, Fett, Fettsäuren, Kohlenhydraten in den Faeces.*

823. Die mit Wasser zum dünnen Brei verriebenen Faeces werden destilliert, bis etwa  $\frac{1}{3}$  des Volumens übergegangen ist. Man erhält so ein Destillat (A) und einen Rückstand (B).

A. **Destillat\*\*).** Man übersättigt mit Natriumcarbonat und destilliert wieder etwa  $\frac{1}{3}$  der Flüssigkeit über.

\*) Da Taurin (Taurocholsäure) und Sulfat sich nebeneinander in diesem Rückstand befinden können, eine Trennung beider aber nicht ausführbar erscheint, so ist es nötig, die Prüfung auf Sulfat vor der Veraschung vorzunehmen und zu dem Zwecke eine Probe des Rückstandes in verdünnter Salzsäure zu lösen und das klare Filtrat mit Chlorbarium zu versetzen.

\*\*\*) Dieses Destillat, welches Phenole, Indol, Skatol und flüchtige Fettsäuren enthalten kann, läßt sich auch nach § 229 A untersuchen.

<sup>1)</sup> Krüger u. Schittenhelm: Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 35, S. 153. 1902.

1. Rückstand. Man säuert mit Schwefelsäure an, destilliert, vereinigt das Destillat mit B 1 b  $\alpha$  und untersucht nach S. 77 auf flüchtige Fettsäuren.

2. Destillat. Man übersättigt mit Natronlauge und destilliert wieder den 3. Teil über.

a) Rückstand. Er wird nach Übersättigen mit Schwefelsäure destilliert und das Destillat nach § 200 auf Phenole geprüft.

b) Destillat. Wegen Prüfung auf Indol und Skatol s. §§ 219 und 220. Nach Herter und Foster<sup>1)</sup> macht man mit Natronlauge schwach alkalisch und fügt  $\beta$ -naphthochinonmonosulfosaures Natrium (2proz. Lösung) in geringem Überschuß hinzu. Eine blaue Fällung oder blaue oder grünblaue Farbe zeigt Indol an. Man säuert nun an und destilliert. Dabei geht Skatol über (Indol nur in sehr kleiner Menge), welches mit Hilfe der Ehrlichschen Reaktion (S. 309, 3) nachgewiesen wird.

Herter und Foster haben auf dieses Trennungsverfahren auch eine colorimetrische Bestimmungsmethode von Indol und Skatol gegründet.

Handelt es sich nur um Nachweis von Indol und Skatol, so destilliert man etwa 25 g Faeces mit 20 ccm Wasser und 1—2 ccm 10proz. Natronlauge im Dampfstrom, bis im Destillat die Ehrlichsche Reaktion (S. 308, 2) negativ ausfällt und prüft, wie oben angegeben.

**B. Rückstand.** Man dampft etwas ein, säuert nach dem Erkalten mit Schwefelsäure stark an, extrahiert nacheinander mit Alkohol und mit Äther und vereinigt die abfiltrierten Auszüge. Man erhält so alkoholisch-ätherische Auszüge (1) und einen Rückstand (2).

1. Alkoholisch-ätherische Auszüge. Man übersättigt mit Natriumcarbonat, destilliert Alkohol und Äther ab, zerteilt den Rückstand in viel Wasser, schüttelt mit Äther aus und trennt die ätherische (a) und wässrige (b) Lösung im Scheidetrichter.

a) Ätherische Lösung. Man verdunstet den Äther, verseift den Rückstand nach § 94, zieht die Seifenlösung mit Äther aus und untersucht den Ätherrückstand nach § 235 auf Koprosterin (etwa gleichzeitig vorhandenes Cholesterin läßt sich durch seine Unlöslichkeit in kaltem Alkohol von Koprosterin abtrennen). Darauf wird die Seifenlösung mit Schwefelsäure stark angesäuert, mit Äther ausgeschüttelt und zur Untersuchung auf höhere und niedere Fettsäuren weiter nach § 94 verfahren. Die Fettsäuren stammen aus den Fetten.

b) Wässrige Lösung. Nach Verdunsten des Ätherrestes säuert man mit Schwefelsäure an und destilliert die Hälfte der Flüssigkeit ab.

$\alpha$ ) Destillat. Es kann noch flüchtige Fettsäuren enthalten und wird mit dem Destillat von A 1 vereinigt.

$\beta$ ) Kolbeninhalt. Derselbe wird nach dem Erkalten filtriert.

$\alpha\alpha$ ) Filtrerrückstand. Man löst ihn in Äther und untersucht die klare ätherische Lösung nach § 81 auf Palmitinsäure, Stearinsäure und Ölsäure.

$\beta\beta$ ) Filtrat. Ein kleiner Teil wird mit der Trommerschen Reaktion (§ 97) auf Zucker geprüft. Die Hauptmenge schüttelt man mit Äther aus, verdunstet die abgegossene Ätherlösung und prüft die wässrige Lösung des Rückstandes auf p-Oxyphenylpropionsäure und Hydro-p-cumarsäure (Rotfärbung mit Millonschem Reagens, §§ 211 und 212).

2. Rückstand. Er wird mit Wasser verdünnt, längere Zeit gekocht und filtriert.

<sup>1)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 1, S. 257. 1906; Bd. 2, S. 267. 1907.

a) Filtrat. Man prüft es auf Amylum und Dextrine: Amylum färbt sich mit Jod blau, Erythrodextrin rot (§ 113). Beide werden durch Kochen mit verdünnter Salzsäure in Traubenzucker umgewandelt, der mit der Trommerschen Probe (§ 97) nachgewiesen werden kann. Amylum, Dextrine.

b) Filtrerrückstand. Man erwärmt ihn mit verdünnter Natronlauge, filtriert nach Wasserzusatz durch Asbest, trocknet und zerreibt ihn (inklusive Asbest) mit konzentrierter Schwefelsäure in der Reibschale. Die Lösung wird in die 20fache Menge siedenden Wassers gegossen, noch  $\frac{1}{2}$  Stunde am Rückflußkühler gekocht und dann mit der Trommerschen Reaktion geprüft. Ein positiver Ausfall zeigt Cellulose an. Cellulose.

**Nachweis von Gallensäuren (gepaarte Säuren und Cholsäure) in den Faeces<sup>1)</sup>.**

824. Man extrahiert die Faeces mit Alkohol, filtriert, entfernt den größten Teil des Alkohols durch Eindampfen, macht mit Salzsäure sauer, dann mit Barytwasser stark alkalisch, leitet Kohlensäure ein, erhitzt zum Kochen, filtriert heiß und kocht den Rückstand noch mehrmals mit Wasser aus. Die vereinigten Filtrate werden eingedampft, der Rückstand wird (um vorhandene Tauro- und Glykocholsäure zu spalten) mit 25 ccm 33 proz. Natronlauge 3 Stunden gekocht, indem nach erfolgter starker Konzentration immer wieder das verdampfte Wasser durch heißes ersetzt wird. Man säuert dann mit Schwefelsäure an, schüttelt mit Äther aus, löst den Ätherrückstand in wenig verdünnter Natronlauge und prüft mit der Pettenkoferschen Probe (S. 337) auf Cholsäure. Da die Rotfärbung allein nicht beweisend ist, so gießt man die Lösung in Eisessig und sieht, ob die Flüssigkeit rot gefärbt ist und einen deutlichen Streifen im Grünen zeigt.

Zur Darstellung der Cholsäure extrahiert man die Faeces nach Hoppe-Seyler mit Alkohol, filtriert, dampft unter Zusatz von etwas Essigsäure auf dem Wasserbade zum Sirup ein und zieht den Rückstand mit kaltem Wasser aus. Das Ungelöste wird mit Barytwasser übergossen und nach Zufügen von etwas Wasser erwärmt. Man leitet jetzt Kohlensäure ein, erhitzt zum Sieden, filtriert heiß, erschöpft den Rückstand durch Auskochen mit heißem Wasser und dampft die vereinigten heiß filtrierten Auszüge auf ein kleines Volumen ein. Nach dem Erkalten wird etwas Äther und dann Salzsäure hinzugefügt, gut umgerührt und eine Zeitlang stehen gelassen. Man filtriert die ausgeschiedene Cholsäure ab, wäscht mit Wasser, löst in Alkohol, dampft die alkoholische, nötigenfalls mit Tierkohle entfärbte Lösung auf ein kleineres Volumen ein und läßt zur Krystallisation stehen. Die ausgeschiedenen Krystalle werden nach S. 337 auf Cholsäure geprüft. Darstellung der Cholsäure.

**Nachweis von Farbstoffen in den Faeces.**

825. Urobilin. 1. Probe von A. Schmidt<sup>2)</sup>. Man verreibt frische Faeces in einer kleinen Porzellanschale mit wässriger gesättigter Sublimatlösung, bringt die Masse in ein Uhrschälchen, läßt bedeckt stehen und prüft nach 24 Stunden (oder auch früher) makroskopisch und mikroskopisch. Die urobilinhaltigen Teile der Faeces sind rosa- bis tief rosenrot, die bilirubinhaltigen dagegen grün gefärbt. Probe von A. Schmidt.

2. Probe von Schlesinger<sup>3)</sup>. Man verreibt frische Faeces mit Wasser, fügt das gleiche Volumen des durchgeschüttelten Reagens (10% Zinkacetat enthaltender Alkohol) hinzu und filtriert: Das Filtrat zeigt grüne Fluoreszenz und den charakteristischen Streifen (Spektraltafel). Filtriert man erst nach 24 Stunden, so zeigt ein positiver Ausfall auch Urobilinogen an, das in dieser Zeit in Urobilin umgewandelt ist. Probe von Schlesinger.

<sup>1)</sup> Ury: Arb. a. d. pathol. Inst. Berlin. S. 634. Hirschwald 1906.

<sup>2)</sup> Verhandl. d. 13. Congr. f. inn. Med. S. 320. 1895. — Schorlemmer: Münch. med. Wochenschrift. 1900, S. 458.

<sup>3)</sup> Dtsch. med. Wochenschr. 1903, S. 561.

**Urobilinogen.** Man verreibt die Faeces wiederholt sorgfältig mit Ligroin, bis alles Indol und Skatol entfernt ist, zieht den Rückstand mit Alkohol aus, filtriert und prüft das Filtrat mit der Ehrlichschen Aldehydreaktion (S. 424). Es tritt sofort oder nach einigen Minuten schöne Rotfärbung auf, und bei der spektroskopischen Prüfung sieht man den Streifen im Orange (daneben meist auch den Urobilinstreifen).

**Bilirubin.** 1. Probe von A. Schmidt s. oben.

2. Probe von Steensma<sup>1)</sup>, welche wesentlich empfindlicher ist als die vorige. Man reibt etwa 5 g Faeces in einer Reibschale mit 95proz. Alkohol zusammen, erhitzt die Mischung in einem Kolben auf dem Wasserbade, gießt nach einiger Zeit den Alkohol ab, ersetzt ihn durch neuen und fährt in der Weise fort, bis der Alkohol fast keinen Farbstoff mehr aufnimmt. Der Rückstand wird nun in der Reibschale nach Zusatz von etwas verdünnter Kalilauge mit Alkohol verrieben, die Flüssigkeit filtriert, das Filtrat mit wenig salzsäurehaltigem Alkohol (5 Vol.-% konzentrierte Salzsäure enthaltenden 95proz. Alkohol) angesäuert und gekocht. Entsteht dabei keine grüne Farbe, so setzt man noch 1 Tropfen einer 0,5proz. Natriumnitritlösung hinzu.

3. Probe von Huppert - Salkowski. Man verreibt Faeces mit Wasser und verfährt, wie § 621 angegeben. Tritt keine Grün- oder Blaufärbung ein, so fügt man noch 1 Tropfen einer 0,5proz. Natriumnitritlösung hinzu (Steensma<sup>2)</sup>).

**826. Blutfarbstoff.** Hämatin. Reichliche Mengen erkennt man, indem man die mit etwas Schwefelsäure versetzten Faeces mit Äther oder Alkohol extrahiert, das Filtrat mit Natronlauge und Schwefelammonium versetzt und spektroskopisch auf Hämochromogen prüft (Spektraltafel). Auch der Nachweis reichlicher Mengen von Eisen in dem alkoholischen Auszug der Faeces nach § 55 ist für die Erkennung zu verwenden.

Zum Nachweis kleiner Mengen von Blutfarbstoff oder Hämatin dienen folgende Proben, von denen die zweite empfindlicher ist als die erste.

Spektroskopischer  
Nachweis.

1. Probe von Schumm<sup>3)</sup>. Man reinigt die Faeces mit Alkoholäther (s. 2), extrahiert den Rückstand mit Eisessig, verdünnt das Filtrat mit der 2—3fachen Menge Äther, setzt dem Gemisch  $\frac{1}{2}$  Vol. Wasser zu und schüttelt tüchtig durch, trennt die Ätherlösung ab, schüttelt sie nochmals mit wenigen Kubikzentimetern Wasser aus, macht sie unter Kühlung durch Schütteln mit Ammoniak alkalisch, läßt die ammoniakalische Lösung nebst ein wenig des Äthers in ein Glasgefäß fließen, fügt Schwefelammonium hinzu und prüft spektroskopisch auf Hämochromogen (Spektraltafel).

Nach Snapper<sup>4)</sup> wird der Stuhl mit Aceton verrieben, filtriert, der Rückstand wieder mit 1 Tl. Eisessig, 3 Tl. Äther verrieben, filtriert,  $\frac{1}{4}$  Vol. Pyridin, 1 Tropfen frisches Schwefelammonium (oder Hydrazinhydrat oder Natriumhyposulfit) zugesetzt und nun spektroskopisch auf Hämochromogen untersucht.

Guajacprobe.

2. Probe von Weber<sup>5)</sup> in der Ausführung von Schumm<sup>6)</sup>. Eine etwa walnußgroße Durchschnittsprobe\*) (4 g) wird mit 30 ccm einer Mischung gleicher Teile Alkohol und Äther fein zerrieben, filtriert, der Filtrerrückstand einmal mit Alkoholäther, dann ein- oder mehreremal mit Äther unter Aufrühren nachgewaschen. Das zuletzt Abfließende soll nahezu ungefärbt sein.

\*) Bei dünnen Stühlen nimmt man etwas mehr und verreibt mit der 4fachen Menge Alkoholäther, bei sauren Stühlen verreibt man zunächst mit mehreren Tropfen konzentrierter Sodalösung und dann erst mit Alkoholäther.

<sup>1)</sup> Ref. Biochem. Zentralbl. Bd. 7, S. 834. 1908. <sup>2)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 8, S. 209. 1908.

<sup>3)</sup> Zentralbl. f. d. ges. Physiol. u. Pathol. d. Stoffw. 1908.

<sup>4)</sup> Dtsch. med. Wochenschr. 1921 S. 985.

<sup>5)</sup> Berl. klin. Wochenschr. 1893, S. 441.

<sup>6)</sup> Zentralbl. f. d. ges. Physiol. u. Pathol. d. Stoffw. 1908.



Der Rückstand wird auf dem Filter mit 4 ccm Eisessig vorsichtig gemischt und, nachdem ein Teil der Flüssigkeit filtriert ist, nochmals mit 4 ccm Eisessig übergossen. Ist der größere Teil filtriert, gießt man das Filtrat nochmals auf das Filter zurück und lockert gleichzeitig den Filterinhalt mit einem Glasstabe. Das Filtrat wird in einem Scheidetrichter von etwa 100 ccm mit der 2—3fachen Menge Äther verdünnt, der Mischung ihr halbes Volumen destilliertes Wasser zugefügt und gut geschüttelt. Tritt nicht schnell Schichtenbildung ein, so gibt man etwas Alkohol (vielleicht auch etwas Wasser oder Äther) hinzu. Man läßt dann die wässrige Schicht abfließen, schüttelt die ätherische nochmals mit etwas Wasser aus und läßt auch dieses ablaufen. Einen kleinen Teil der Ätherlösung (die Hauptmenge kann man nach 1 zur spektroskopischen Prüfung benutzen) wird mit etwa 5—10 Tropfen frisch bereiteter schwacher Guajactinktur und etwa 20 Tropfen guten verharzten Terpentinöls (s. S. 759) versetzt. Bei Anwesenheit von Blutfarbstoff tritt innerhalb 2—3 Minuten ein starker Farbenwechsel ein, indem die Flüssigkeit mehr oder weniger reine und kräftige Blau-, Violett-, auch wohl Grünblau- oder Purpurfärbung annimmt. Bei reichlichem Blutgehalt kann die Ätherlösung so dunkel und die Farbenreaktion so intensiv sein, daß eine Verdünnung erforderlich ist, um den Farbenwechsel gut beobachten zu können.

3. **Benzidinprobe.** Ein bohnen großes Stück Faeces wird mit einigen Kubikzentimetern Wasser verrührt und gekocht. Eine Messerspitze Benzidin (etwa 0,2 g) wird in 2 ccm Eisessig unter leichtem Erwärmen gelöst, dazu werden einige Tropfen der Faecesaufschwemmung und einige Tropfen Wasserstoffsuroxydlösung gesetzt: Blau- oder Grünfärbung.

4. **Phenolphthaleinprobe nach Boas<sup>1)</sup>.** 2 g Phenolphthalein, 20 g Ätzkali, 100 ccm Wasser werden mit 10 g metallischen Zinkpulvers erwärmt bis die violette Lösung farblos geworden ist. Das Reagens wird dann mit etwas Zinkpulver aufbewahrt. 1 ccm Reagens, 2 ccm Wasserstoffsuroxydlösung und einige Tropfen Alkohol werden mit etwas Faecesextrakt (bohnen großes Stück Faeces mit einigen Kubikzentimetern Alkohol und einigen Tropfen Eisessig extrahiert) überschichtet. Bei Blutgehalt tritt sofort ein roter Ring auf.

**Koproporphyrin.** 1. Probe von H. Fischer<sup>2)</sup>. Der Stuhl wird mit Alkohol und Äther extrahiert, der Rückstand mit salzsäurehaltigem Alkohol extrahiert und filtriert, das Filtrat spektroskopisch untersucht (§ 294).

2. Probe von Snapper<sup>3)</sup>. Die Extraktion geschieht wie bei Hämatin (s. oben), der Ätherextrakt wird mit verdünnter Salzsäure ausgeschüttelt und die salzsaure Lösung spektroskopiert.

#### *Nachweis verschiedener Bestandteile in den Faeces.*

827. **Milchsäure.** Man fällt die mit Wasser verrührten Faeces mit Barytwasser, befreit das Filtrat mittels Kohlensäure von überschüssigem Baryt, filtriert, dampft ein und verfährt weiter, wie S. 84 angegeben.

**Leucin und Tyrosin.** Der Nachweis geschieht nach § 616.

**Phosphatide.** Man extrahiert die Faeces mit Alkohol, dampft das Filtrat bei niedriger Temperatur (unterhalb 50°) ein, zieht den Rückstand mit Äther aus und prüft das Ätherextrakt nach § 54 auf Phosphor.

**Koprosterin.** Isolierung und Nachweis geschieht nach § 235, siehe auch § 823, B, 1a.

**Cadaverin und Putrescin.** Man verfährt nach den Angaben von § 153.

**Ammoniak** wird nach § 51, **Schwefelwasserstoff** nach § 47 nachgewiesen.

<sup>1)</sup> Dtsch. med. Wochenschr. 1911, S. 62.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 96, S. 148. 1915/16.

<sup>3)</sup> Arch. f. Verdauungskrankh. Bd. 25, S. 230. 1919. Dtsch. med. Wochenschr. 1921, S. 985.

**Nachweis und Untersuchung der Darmgase.**

828. Durch Gärung und Fäulnis bilden sich besonders aus Kohlenhydraten und Eiweiß Gase im Darm: Kohlensäure, Wasserstoff, Sumpfgas, Schwefelwasserstoff, Ammoniak. Diesen mischt sich Stickstoff aus hinabgeschluckter Luft bei, deren Sauerstoff, außer bei sehr raschem Passieren des Darmkanals, vollständig resorbiert zu sein pflegt.

Man kann (in ähnlicher Weise wie bei der Gewinnung von Magengasen § 785 beschrieben) Darmgas zur Analyse nach Hempel erhalten, indem man in den Verbindungsschlauch zwischen Darmrohr und Spülkanne oder Trichter ein für die Gasaufnahme bestimmtes Rohr mit Schlauchverschluß am oberen Ende einführt. Zur Prüfung auf Gärungsvorgänge verwendet man zweckmäßig den kleinen § 785 abgebildeten Apparat (G. Hoppe - Seyler<sup>1</sup>), in den in Wasser verteilter Stühlgang eingebracht und der in den Brutschrank gestellt wird. Ein ähnliches Gärrohr hat Strassburger<sup>2</sup>) angegeben. Steht ein solches Gärrohr nicht zur Verfügung, so kann man auch ein Reagensglas benutzen, das durch einen Gummistopfen, in dessen Bohrung ein U-Rohr steckt, verschlossen wird.

**Herstellung lufttrockener Faeces für quantitative Bestimmungen.**

829. **Vorbemerkung.** Die für quantitative Bestimmungen notwendige gleichmäßige Mischung wird am besten durch Trocknen und Pulverisieren erreicht. Um Zersetzungen und Verlust an Ammoniak zu vermeiden, ist es nötig, alkalisch reagierende Faeces vor dem Eintrocknen mit ein wenig Schwefelsäure zu ver-rühren\*).

**Ausführung nach Poda<sup>3</sup>.** Die frischen Faeces (eine Tagesmenge) werden in einer Porzellanschale, deren Gewicht inklusive Glasstab bekannt ist, abgewogen und auf schwach siedendem und durch eine kleine Flamme erhitztem Wasserbade eingedampft. Wenn die Konsistenz zähflüssig geworden ist (nach 4—6 Stunden), wird das an den Wandungen Haftende mit einem Messer zusammengekratzt und das Ganze mit etwa 50 ccm absolutem Alkohol zusammengerührt. Nach weiterem etwa 1stündigem Erwärmen wird aufs neue Alkohol zugefügt, wieder verdunstet und mit dem Zusatz von Alkohol und dem Erwärmen fortgeföhren, bis die Faeces nach dem Abkühlen pulverisierbar geworden sind. Jetzt stellt man das Gewicht fest, zerreibt zu einem feinen Pulver und bringt dasselbe in ein verschließbares Gefäß. Es dient für die folgenden Bestimmungen.

**Bestimmung des Trockenrückstandes.**

830. Man wägt 2—3 g des nach Poda § 829 erhaltenen Pulvers ab und trocknet bei 100° bis zum konstanten Gewicht. Zum Abwägen, Trocknen und Wägen benutzt man am besten einen Uhrglasapparat (§ 9).

**Bestimmung der Gesamtmenge an Stickstoff und einzelnen Aschebestandteilen in den Faeces.**

831. Man bestimmt den Gesamtstickstoff nach Kjeldahl (§ 558 b) und die einzelnen Aschebestandteile nach §§ 533 ff. Für die Bestimmung des Gesamtphosphors nach A. Neumann (§ 553) benutzt man etwa 1 g, für den Gesamtschwefel (§ 550) 2 g, für das Gesamteisen nach A. Neumann (§ 542) 3—4 g des nach Poda § 829 hergestellten Pulvers.

\*) Nach Zaitschek<sup>4</sup>) findet auch trotz des Zusatzes der Schwefelsäure beim Trocknen ein allerdings nur geringer Verlust an Stickstoff statt.

<sup>1</sup>) Vgl. Levy: Diss. mediz. Fak. Kiel 1895.

<sup>2</sup>) A. Schmidt: Klinik der Darmkrankheiten, 2. Aufl., S. 134. 1921.

<sup>3</sup>) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 25. S. 355. 1898.

<sup>4</sup>) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 98, S. 595. 1903.

**Bestimmung des Nucleinbasenstickstoffs\*) in den Faeces nach Krüger und Schittenhelm<sup>1)</sup>.**

832. Erforderliche Lösungen. Die § 584 unter 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8 und 9 aufgeführten.

Die Faeces (ganz frische\*\*) gewogene Tagesmenge oder ein abgewogener Teil werden mit 1—2 l Wasser, dem 10—20 ccm konzentrierter Schwefelsäure zugesetzt sind, mehrere Stunden über freiem Feuer am Rückflußkühler erhitzt. Die Lösung wird mit Natronlauge deutlich alkalisch, dann durch Zufügen von 10 oder 20 ccm Eisessig sauer gemacht und nach Zufügen von 5 oder 10 g Oxalsäure (zur Ausfällung des Kalkes) kurze Zeit auf dem Wasserbade erhitzt. Nach dem Erkalten wird auf 1500 oder 3000 ccm aufgefüllt und durch ein trockenes Faltenfilter filtriert. (Erscheint indessen der Niederschlag sehr groß, empfiehlt es sich, ihn mit heißem Wasser vom Filter zu spritzen, nochmals mit Natriumacetat und essigsäurehaltigem Wasser zu digerieren, zu filtrieren und die Filtrate zu vereinigen). Ein gemessener Teil des essigsäuren Filtrates, mindestens 500 ccm, wird in einem Rundkolben zunächst mit Natronlauge schwach alkalisch gemacht, dann mit Natriumbisulfatlösung (auf 100 ccm 10 ccm) versetzt und zum Kochen erhitzt. Man fügt Kupfersulfatlösung (auf 100 ccm 10 ccm) hinzu und erhält noch wenigstens 3 Minuten im Sieden. Der flockige Niederschlag wird sofort durch ein Faltenfilter filtriert, mit heißem Wasser ausgewaschen und mitsamt dem Filter in den Fällungskolben zurückgebracht. Man fügt Wasser hinzu, schüttelt den Kolbeninhalt kräftig durch, erhitzt zum Sieden und gibt so viel Natriumsulfidlösung hinzu, bis 1 Tropfen der Flüssigkeit Bleiacetatpapier deutlich braun färbt. Man kocht noch mehrere Minuten, säuert mit 10 proz. Essigsäure an, setzt das Sieden fort, bis das Kupfersulfid sich leicht in Flocken zusammenballt und die überstehende Flüssigkeit möglichst klar ist. Der Niederschlag wird nun abgesaugt und mit heißem Wasser ausgewaschen, das Filtrat unter Zusatz von 10 ccm 10proz. Salzsäure zur Trockne eingedampft und der Rückstand mit 5 ccm Salzsäure und etwas Wasser auf dem Wasserbade digeriert.

Nach dem Erkalten filtriert man von dem geringen Rückstand ab, wäscht mehrmals mit Wasser aus und bestimmt in dem etwa 80 ccm betragenden Filtrat die Basen mit Hilfe der Kupfer- oder Silberfällung.

a) Mit Hilfe der Kupferfällung. Das Filtrat wird zum Sieden erhitzt und mit Ammoniak schwach alkalisch gemacht. Man fügt nun 10 ccm Natriumbisulfatlösung, dann 5—10 ccm der Kupfersulfatlösung hinzu, erhält noch 3 Minuten im Sieden, filtriert durch ein Faltenfilter aus schwedischem Papier (z. B. Munktell Nr. 1), wäscht mit heißem Wasser aus und bestimmt den Stickstoff nach Kjeldahl (§ 558b).

b) Mit Hilfe der Silberfällung. Das Filtrat wird mit Ammoniak schwach alkalisch gemacht und mit 10 ccm ammoniakalischer Silberlösung und 20 ccm 10proz. Ammoniak versetzt. Um das Absitzen usw. S. 715, 2b, Zeile 5 von oben.

Zur Isolierung und quantitativen Bestimmung der einzelnen Nucleinbasen sind die Faeces täglich in der oben beschriebenen Weise bis zur Herstellung der Kupferfällung (siehe oben) zu verarbeiten, die im Laufe einiger Wochen gesammelten Kupferniederschläge zu vereinigen und nach § 741 zu untersuchen.

Isolierung und Bestimmung der einzelnen Nucleinbasen.

\*) Und zwar des Stickstoffs der freien Nucleinbasen und der durch Spaltung der Nucleoproteide und Nucleinsäure entstehenden.

\*\*\*) Die Nucleinbasen unterliegen alsbald der bakteriellen Zersetzung (Schittenhelm<sup>2)</sup>).

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 45, S. 21. 1905.

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 39, S. 199. 1903.

**Bestimmung des Fettes (ätherlösliche Substanz), des Fettes + der Fettsäuren und der flüchtigen Fettsäuren in den Faeces.**

833. a) **Fett.** Man wägt 5—6 g des nach Poda (§ 829) erhaltenen Pulvers ab, bringt sie in eine Papierhülse des Soxhletschen Apparates und extrahiert völlig mit Äther. Der Äther wird verdunstet, der Rückstand wieder mit Äther aufgenommen, die ätherische Lösung (zur Entfernung von freien Fettsäuren) mit einer verdünnten Sodalösung geschüttelt, verdunstet, der Rückstand mit Petroläther aufgenommen und die Lösung weiter nach § 663 B 3b behandelt. Nur die Befreiung des Cholesterins von beigemengten Seifen kann nicht in der angegebenen Weise erreicht werden, da das Cholesterin der Faeces, das Koprosterin, in kaltem Alkohol auch leicht löslich ist. Es empfiehlt sich, stattdessen den gut getrockneten Rückstand nochmals mit wenig wasserfreiem Petroläther aufzunehmen, wobei die Seifen wenigstens zum größten Teil ungelöst bleiben werden.

b) **Fett + Fettsäuren.** Man verreibt die abgewogene Menge des nach Poda (§ 829) gewonnenen Pulvers mit ein wenig Schwefelsäure oder schwefelsäurehaltigem Alkohol, trocknet und verfährt nun genau wie unter (a) angegeben, nur mit dem Unterschied, daß das Ausschütteln der ätherischen Lösung mit Sodalösung unterbleibt.

c) **Gesamtmenge der flüchtigen Fettsäuren** nach McCaughey<sup>1)</sup>. 25—30 g Faeces werden mit 250—300 ccm 96proz. Alkohol verrieben, die ganze Masse wird in einem Kolben zum Sieden erhitzt, filtriert, der Rückstand mit kochendem Alkohol gewaschen, das Alkoholextrakt mit n-NaOH bis zur schwach alkalischen Reaktion versetzt, im Wasserbade zur Trockne verdampft und der Rückstand mit destilliertem Wasser aufgenommen. Man fügt 10 ccm Phosphorsäure (1,12 spez. Gew.) hinzu, destilliert nach Welde<sup>2)</sup> (S. 77) im Vakuum mit Dampf, mißt das Destillat und titriert mit  $\frac{1}{10}$ -NaOH und Phenolphthalein. Von der Zahl der Kubikzentimeter wird der durch CO<sub>2</sub> und flüchtige Phosphorsäure bedingte Fehler abgezogen (1 ccm  $\frac{1}{10}$ -NaOH für je 1400—1500 ccm Destillat).

**Bestimmung des Amylum (+ Dextrin) und der Cellulose in den Faeces.**

834. **Prinzip.** Stärke und Dextrin werden durch Kochen mit verdünnter Säure in Traubenzucker übergeführt und dieser titrimetrisch bestimmt. Cellulose bleibt ungespalten.

Bei Anwesenheit von Mucin gibt das Verfahren keine genauen Werte, da Mucin bei der hydrolytischen Spaltung auch ein reduzierendes Kohlenhydrat liefert. Durch mechanische Entfernung größerer Schleimflocken vor dem Eintrocknen der Faeces läßt sich diese Fehlerquelle wohl verkleinern, aber nicht ganz beseitigen. Cellulose bedingt keine Fehler. Etwa vorhandener Zucker wird mitbestimmt. Bei pentosanreicher Kost ist eine Korrektur anzubringen (Weiser und Zaitschek<sup>3)</sup>).

**Ausführung.** Man benutzt nach Strassburger<sup>4)</sup> eine Kombination der Methoden von Liebermann<sup>5)</sup> und von Pflüger-Volhard und verfährt in folgender Weise: Man erhitzt 2—3 g des nach Poda (§ 829) erhaltenen lufttrockenen Pulvers in einem Kolben mit 100 ccm 2proz. Salzsäure 1½ Stunden am Rückflußkühler (L. Liebermann), neutralisiert nach dem Erkalten nahezu mit Natronlauge, filtriert durch ein Asbestfilter unter Druck, wäscht mit Wasser nach und bringt das Filtrat auf 200 ccm. Von der evtl. noch einmal filtrierten Flüssigkeit werden 50 ccm in einem etwa 300 ccm fassenden Becherglase mit 30 ccm der seignettesalzhaltigen Lauge, 30 ccm Kupfersulfatlösung und 35 ccm Wasser zusammengebracht und weiter genau nach § 751 behandelt. Durch

<sup>1)</sup> Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 72, S. 149. 1911.

<sup>2)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 28, S. 505. 1910.

<sup>3)</sup> Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 93, S. 98. 1902. <sup>4)</sup> desgl. Bd. 84, S. 173. 1901.

<sup>5)</sup> Malys Jahresber. d. Tierchem. 1886, S. 55.

Multiplikation der gefundenen Menge Traubenzucker mit 0,94 erfährt man die Menge Stärke.

Zur Bestimmung der Cellulose ist von Simon und Lohrisch<sup>1)</sup> ein Verfahren angegeben worden. Cellulose.

**Bestimmung des Urobilinogens in den Faeces nach Eppinger und Charnas<sup>2)</sup>.**

835. Die 24stündige Stuhlmenge wird in Glasgefäßen, die mit schwarzem Papier umhüllt sind, gesammelt und möglichst bald nach der Entleerung verarbeitet, bei künstlichem Licht gewogen, verrieben und gemischt. In einer Schale werden 10 g mit warmem 1% Weinsäure enthaltendem 95proz. Alkohol allmählich verrieben, das Extrakt in einen Rundkolben gespült, 1 Minute auf dem Wasserbade gekocht und filtriert, dann so lange mit Alkohol nachgewaschen, bis das Filtrat keine oder minimale Reaktion auf Urobilinogen gibt. Die alkoholische Lösung wird zu gleichen Teilen mit 20proz. Ammonsulfatlösung versetzt, mit Natronlauge alkalisch gemacht, mit 250—300 ccm gereinigtem Äther (durch Schütteln mit starker Lauge und Waschen gereinigt von Aldehyden und Säuren) extrahiert, die wässerig-alkoholische Lösung mit Weinsäure stark angesäuert, mit Äther mehrmals extrahiert. 10—20 ccm dieses Ätherextrakts werden in einem Meßzylinder zu 30 ccm mit etwas trockenem Dimethylamidobenzaldehyd versetzt, auf dem Wasserbade auf 1 ccm eingeengt, mit 3—4 Tropfen Salzsäure (spez. Gew. 1,19) versetzt, mit Alkohol verdünnt und der Farbstoffgehalt spektrophotometrisch bestimmt.

Normale Stühle sollen, dunkel aufgefangen, nur Urobilinogen enthalten, während es in Stühlen mit saurer Gärung zerstört wird. Normal sollen 0,13 g Urobilinogen täglich ausgeschieden werden.

**Darmkonkremente, Darmsteine.**

836. Sowohl bei Menschen als bei Pflanzenfressern finden sich in den Faeces häufig Inkrustationen von Speiseresten mit anorganischen Salzen oder Konkretionen von Haaren, harzigen Massen und Fasern genossener Stengel und Blätter. Außerdem kommen auch Steine vor: Gallensteine (§ 800), Pankreassteine (§ 788) sowie im Darm selbst entstandene Steine. Letztere und die Inkrustationen bestehen fast ausschließlich aus phosphorsaurem Ammoniak-Magnesia ( $\text{NH}_4\text{MgPO}_4 + 6 \text{H}_2\text{O}$ ) mit etwas Calciumphosphat; an menschlichen Darmsteinen sieht man zuweilen\*) große, wohlausgebildete Krystalle des ersteren Salzes. Raper<sup>3)</sup> fand in einem menschlichen Darmstein neben Fettsäuren (10,85%), Fett, unverseifbaren Substanzen (5,52%) und Nahrungsresten (8,4%) 72,5% ungepaarte Gallensäure, und zwar fast ausschließlich Choleinsäure. Ein solcher Choleinsäurestein (mit 75% Choleinsäure) ist auch von C. Th. Mörner<sup>4)</sup> beschrieben. Mörner erwähnt noch einen weiteren solchen Stein. Die Darmsteine des Pferdes, welche ein Gewicht von über 5 kg erreichen können, enthalten nur Spuren von phosphorsaurem Kalk.

Die Untersuchung der Darmsteine und Inkrustationen wird wie die der Harnsteine ausgeführt (§§ 628ff.). Die Prüfung auf Harnsäure, Cystin, Xanthin usw. fällt fort. Die oben erwähnte Choleinsäure ließ sich durch Extraktion mit Aceton im Soxhletapparat gewinnen.

\*) Ein schöner Fall von Virchow beschrieben und abgebildet. Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. Bd. 20, S. 403. 1860.

1) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 42, S. 55. 1904.

2) Zeitschr. f. klin. Med. Bd. 78, S. 387. 1913.

3) Biochem. Journ. Bd. 15, S. 49; ref. Chem. Zentralbl. Bd. 21.

4) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 130, S. 24. 1923

Im Darminhalt von Leichen sind zuweilen Abscheidungen von blauen Vivianitkörnchen beobachtet worden (§ 42).

Bezoare. Die Bezoare, wahrscheinlich Darmsteine von *Antilopa dorcas* und *Capra aegagrus*, sind olivenfarbig, konzentrisch geschichtet und auf dem Bruch wachsglänzend, schmelzen beim Erhitzen und bestehen fast ganz aus Lithofellinsäure (S. 341) neben Spuren von grünem Farbstoff, wahrscheinlich Gallenfarbstoff, und etwas Schleim. Andere Bezoare sind dunkler gefärbt, schmelzen beim Erhitzen nicht und enthalten wohl Ellagsäure  $C_{14}H_6O_8$ .

#### *Untersuchung des Meconiums.*

837. Das Meconium stellt eine pechähnliche Masse dar und enthält Schleim, Epithel der Darmschleimhaut, Nucleoproteide, Harnsäure<sup>1)</sup> (im extrauterinen Leben sind die Faeces frei von Harnsäure), Gallensäuren, Gallenfarbstoffe, Cholesterin, Fett, anorganische Salze, Lipase, Trypsin, Pepsin und Lab in Vorstufen (Rud. Schmidt<sup>2)</sup>), aber keinerlei Fäulnisprodukte.

Dampft man den alkoholischen Auszug mit Natriumcarbonat zur Trockne und zieht den Rückstand zunächst mit Äther und dann mit Alkohol aus, so erhält man beim Verdunsten des Ätherauszugs Cholesterin in strahligen Krystallen (§ 232), während der Rückstand des alkoholischen Auszugs die Fluorescenz- und die Pettenkofer'sche Reaktion der Gallensäuren (S. 336 und 337) gibt.

Bei Extraktion des Meconiums mit Chloroform geht Bilirubin in dieses über; bei Extraktion mit Aceton oder Methylalkohol erhält man einen grünen Farbstoff mit 2 Streifen im Spektrum bei  $\lambda = 535$  und  $\lambda = 542 \mu\mu$  (Lewin<sup>3)</sup>). Im übrigen geschieht die Untersuchung wie die der Faeces.

<sup>1)</sup> Weintraud: Verhandl. d. 14. Kongr. f. inn. Med. 1896, S. 190. — Schittenhelm: Dtsch. Arch. f. klin. Med. Bd. 81, S. 444. 1904.

<sup>2)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 63, S. 287. 1914.

<sup>3)</sup> Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 145, S. 393. 1912.

## Anhang.

### Einige Reagenzien\*).

**Alménische Lösung.** Man löst 4 g Gerbsäure in 8 ccm 25proz. Essigsäure und fügt 190 ccm 40—50proz. Alkohol hinzu.

**Brückes Reagens** (Quecksilberkaliumjodidlösung). Man erhitzt eine Lösung, die im Liter 100 g Jodkalium enthält, und trägt solange Quecksilberjodid ein, als es sich löst. Nach dem Erkalten gießt man von den roten Krystallen ab und fügt noch einige Krystalle Jodkalium hinzu.

**Ehrlichs Aldehydreagens.** Man löst 2 g p-Dimethylaminobenzaldehyd in 50 ccm konz. rauchender Salzsäure und verdünnt mit Wasser bis auf 100 ccm.

**Glyoxylsäurelösung<sup>1)</sup>.** Man versetzt 1 l einer gesättigten Oxalsäurelösung in einem hohen Zylinder mit ungefähr 60 g Natriumamalgam, filtriert nach Beendigung der Wasserstoffentwicklung und verdünnt mit der zwei- oder dreifachen Menge Wasser.

Benedict<sup>2)</sup> empfiehlt folgende Darstellung. Man bedeckt 100 g pulverisiertes Magnesium in einem großen Erlenmeyerkolben völlig mit Wasser, schüttelt, fügt 250 ccm einer gesättigten wässrigen Oxalsäurelösung langsam hinzu, wobei unter der Wasserleitung gekühlt wird, schüttelt, filtriert, wäscht mit wenig Wasser, säuert mit Essigsäure an und füllt mit Wasser auf 1 l auf.

**Magnesiummischung.** Man löst 110 g krystallisiertes Magnesiumchlorid und 140 g Ammoniumchlorid in 1300 ccm Wasser, fügt 700 g 10proz. Ammoniakflüssigkeit hinzu, mischt, läßt einige Tage stehen und gießt von einem etwa entstandenen Niederschlag ab.

**Millons Reagens.** Man löst Quecksilber in dem doppelten Gewicht einer Salpetersäure von dem spez. Gewicht 1,42 znnächst in der Kälte, dann unter mäßigem Erwärmen, fügt das doppelte Volumen Wasser hinzu, läßt einige Stunden stehen und gießt die klare Flüssigkeit vom krystallinischen Niederschlag ab.

O. Nasse<sup>3)</sup> empfiehlt eine wässrige Lösung von Quecksilberacetat, die erst zum Gebrauch mit einigen Tropfen einer 1proz. Kaliumnitritlösung und, falls die Reaktion nicht genügend sauer, mit etwas verdünnter Essigsäure versetzt wird.

**Molybdänsaures Ammoniak.** Man löst 50 g Molybdänsäure in 200 g 10proz. Ammoniakflüssigkeit, vermischt die Lösung mit 750 g Salpetersäure (spez. Gewicht 1,2) und gießt nach mehrtägigem Stehen an einem gelinde warmen Ort von etwa entstandenem Bodensatz ab.

**Nesslers Reagens.** Man löst 50 g Kaliumjodid in etwa 50 ccm heißem destillierten Wasser und versetzt mit einer konz. heißen Quecksilberchloridlösung, bis der dabei entstehende rote Niederschlag aufhört, sich wieder zu

\*) Wegen der Darstellung anderer hier nicht aufgeführter siehe das Inhaltsverzeichnis.

<sup>1)</sup> Hopkins u. Cole: Journ. of physiol. Bd. 27, S. 418. 1902.

<sup>2)</sup> Journ. of biol. chem. Bd. 6, S. 51. 1909.

<sup>3)</sup> Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 83, S. 361. 1901.

lösen (20—25 g Quecksilberchlorid sind hierzu erforderlich). Man filtriert, fügt 150 g Ätzkali in 300 ccm Wasser gelöst hinzu, verdünnt auf 1 l, fügt noch etwa 5 ccm der Quecksilberchloridlösung hinzu, läßt den Niederschlag sich absetzen und dekantiert. Die Lösung ist in kleinen, verschlossenen Gefäßen aufzubewahren. Ein später noch auftretender Niederschlag schadet nicht, man gießt von ihm ab.

**Phosphorwolframsäure<sup>1)</sup>.** Man löst 4 kg reines, möglichst carbonatfreies, wolframsaures Natrium in 4 l heißem Wasser, fügt 1 kg krystallisiertes, ammoniakfreies Natriumphosphat hinzu und kocht die Flüssigkeit, bis das Phosphat völlig in Lösung gegangen ist. Die noch warme alkalische Flüssigkeit wird nun mit einem warmen Gemisch von 1 l Wasser und 1 l engl. Schwefelsäure unter vorsichtigem Zufügen schwach angesäuert und eingedampft, bis an der Oberfläche eine dünne Krystallhaut entsteht, die nach dem Abkühlen nach einiger Zeit wieder verschwindet. Die während 24—36stündigen ruhigen Stehens sich bildende Ausscheidung von Glaubersalzkrystallen wird durchstoßen, die sirupöse Flüssigkeit abgegossen und evtl. von noch ausgeschiedenem Glaubersalz abgeseiht; sie besitzt bei genügender Konzentration das spez. Gewicht 1,8—2. Man bringt nun 200—300 ccm dieser öligen Phosphorwolframsäure in einen großen Scheidetrichter, schichtet das doppelte Volumen Äther darauf und fügt unter jeweiligem guten Umschütteln gut gekühlte, annähernd 70 proz. Schwefelsäure in kleinen Portionen hinzu. Nach einiger Zeit fallen schwere, hellgelbe ölige Tropfen — eine ätherische Lösung von Phosphorwolframsäure — herunter; man läßt dieselben abfließen und setzt das Ausäthern unter Zusatz von Schwefelsäure so lange fort, bis keine ölige Ausscheidung mehr erfolgt. Die vereinigten ätherischen Lösungen werden nun zweckmäßig noch einmal mit Äther unter Wasserzusatz extrahiert. Man destilliert nun den ätherischen Auszug unter Durchleiten eines Dampfstroms (zur Verhinderung des Stoßens) ab und leitet in die dunkle, noch warme, von Äther möglichst vollständig befreite Flüssigkeit solange Chlorgas ein, bis die Farbe hellgelb geworden ist. Nach dem Erkalten krystallisiert ein großer Teil der Phosphorwolframsäure aus, der Rest wird durch starkes Konzentrieren der Mutterlauge erhalten. Die zuletzt übrigbleibende Mutterlauge kann bei einer weiteren Darstellung wieder verwertet werden. Aus 4 kg Wolframat erhält man auf diese Weise 2,3 kg krystallisierte Säure.

**Stokessche Lösung** ist eine frisch hergestellte ammoniakalische Lösung von weinsaurem Ferroxyd (Ferosulfat + Weinsäure).

#### Atomgewichte<sup>2)</sup>.

Aluminium	Al	27,1	Jod	J	126,92	Sauerstoff	O	16,00
Antimon	Sb	121,8	Kalium	K	39,10	Schwefel	S	32,07
Arsen	As	74,96	Kobalt	Co	58,97	Silber	Ag	107,88
Barium	Ba	137,4	Kohlenstoff	C	12,00	Silicium	Si	28,06
Blei	Pb	207,2	Kupfer	Cu	63,57	Stickstoff	N	14,008
Bor	B	10,82	Lithium	Li	6,94	Strontium	Sr	87,6
Brom	Br	79,92	Magnesium	Mg	24,32	Uran	U	238,2
Cadmium	Cd	112,40	Mangan	Mn	54,93	Wasserstoff	H	1,008
Calcium	Ca	40,07	Molybdän	Mo	96,0	Wismut	Bi	209,0
Chlor	Cl	35,46	Natrium	Na	23,00	Wolfram	W	184,0
Chrom	Cr	52,0	Nickel	Ni	58,68	Zink	Zn	65,37
Eisen	Fe	55,84	Phosphor	P	31,04	Zinn	Sn	118,7
Fluor	F	19,0	Platin	Pt	195,2			
Gold	Au	197,2	Quecksilber	Hg	200,6			

<sup>1)</sup> Verfahren von Drechsel, Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. Bd. 20, 2, S. 1454. 1887, in der Modifikation von Winterstein, Chemiker-Zeit. 1898, S. 539.

<sup>2)</sup> Aus der Nr. 1 der Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. 1924 beigegebenen Tabelle.



## Tabellen der spezifischen Gewichte.

Ammoniak bei 15°		Kallauge bei 15°			Natronlauge bei 15°		
spezifisches Gewicht	100 g enthalten NH <sub>3</sub>	spezifisches Gewicht	100 g enthalten		spezifisches Gewicht	100 g enthalten	
			K <sub>2</sub> O	KOH		Na <sub>2</sub> O	NaOH
0,980	4,80	1,007	0,7	0,9	1,007	0,47	0,61
0,978	5,30	1,014	1,4	1,7	1,014	0,93	1,20
0,976	5,80	1,022	2,2	2,6	1,022	1,15	2,00
0,974	6,30	1,029	2,9	3,5	1,029	2,10	2,71
0,972	6,80	1,037	3,8	4,5	1,036	2,60	3,35
0,970	7,31	1,045	4,7	5,6	1,045	3,10	4,00
0,968	7,82	1,052	5,4	6,4	1,052	3,60	4,64
0,966	8,33	1,060	6,2	7,4	1,060	4,10	5,29
0,964	8,84	1,067	6,9	8,2	1,067	4,55	5,87
0,962	9,35	1,075	7,7	9,2	1,075	5,08	6,55
0,960	9,91	1,083	8,5	10,1	1,083	5,67	7,31
0,958	10,47	1,091	9,2	10,9	1,091	6,20	8,00
0,956	11,03	1,100	10,1	12,0	1,100	6,73	8,68
0,954	11,60	1,108	10,8	12,9	1,108	7,30	9,42
0,952	12,17	1,116	11,6	13,8	1,116	7,80	10,06
0,950	12,74	1,125	12,4	14,8	1,125	8,50	10,97
0,948	13,31	1,134	13,2	15,7	1,134	9,18	11,84
0,946	13,88	1,142	13,9	16,5	1,142	9,80	12,64
0,944	14,46	1,152	14,8	17,6	1,152	10,50	13,55
0,942	15,04	1,162	15,6	18,6	1,162	11,14	14,37
0,940	15,63	1,171	16,4	19,5	1,171	11,73	15,13
0,938	16,22	1,180	17,2	20,5	1,180	12,33	15,91
0,936	16,82	1,190	18,0	21,4	1,190	13,00	16,77
0,934	17,42	1,200	18,8	22,4	1,200	13,70	17,67
0,932	18,03	1,210	19,6	23,3	1,210	14,40	18,58
0,930	18,64	1,220	20,3	24,2	1,220	15,18	19,58
0,928	19,25	1,231	21,1	25,1	1,231	15,96	20,59
0,926	19,87	1,241	21,9	26,1	1,241	16,76	21,42
0,924	20,49	1,252	22,7	27,0	1,252	17,55	22,64
0,922	21,12	1,263	23,5	28,0	1,263	18,35	23,67
0,920	21,75	1,274	24,2	28,9	1,274	19,23	24,81
0,918	22,39	1,285	25,0	29,8	1,285	20,00	25,80
0,916	23,03	1,297	25,8	30,7	1,297	20,80	26,83
0,914	23,68	1,308	26,7	31,8	1,308	21,55	27,80
0,912	24,33	1,320	27,5	32,7	1,320	22,35	28,83
0,910	24,99	1,332	28,3	33,7	1,332	23,20	29,93
0,908	25,65	1,345	29,3	34,9	1,345	24,20	31,22
0,906	26,31	1,357	30,2	35,9	1,357	25,17	32,47
0,904	26,98	1,370	31,0	36,9	1,370	26,12	33,69
0,902	27,65	1,383	31,8	37,8	1,383	27,10	34,96
0,900	28,33	1,397	32,7	38,9	1,397	28,10	36,25
0,898	29,01	1,410	33,5	39,9	1,410	29,05	37,47
0,896	29,69	1,424	34,4	40,9	1,424	30,08	38,80
0,894	30,37	1,438	35,4	42,1	1,438	31,00	39,99
0,892	31,05	1,453	36,5	43,4	1,453	32,10	41,41
0,890	31,75	1,468	37,5	44,6	1,468	33,20	42,83
0,888	32,50	1,483	38,5	45,8	1,483	34,40	44,38
0,886	33,25	1,498	39,6	47,1	1,498	35,70	46,15
		1,514	40,6	48,3	1,514	36,90	47,60
		1,530	41,5	49,4	1,530	38,00	49,02
		1,546	42,5	50,6			
		1,563	43,6	51,9			
		1,580	44,7	53,2			

## Tabellen der spezifischen Gewichte.

Salzsäure bei 15°		Salpetersäure bei 15°		Alkohol bei 15,6°		
spezifisches Gewicht	100 g enthalten HCl	spezifisches Gewicht	100 g enthalten HNO <sub>3</sub>	spezifisches Gewicht	Volumprozent (T r a l l e s)	Gewichtsprozent
1,010	2,14	1,020	3,70	0,9335	50	42,52
1,015	3,12	1,030	5,50	0,9315	51	43,47
1,020	4,13	1,040	7,26	0,9295	52	44,42
1,025	5,15	1,050	8,99	0,9255	53	45,36
1,030	6,15	1,060	10,68	0,9254	54	46,32
1,035	7,15	1,070	12,33	0,9234	55	47,29
1,040	8,16	1,085	14,74	0,9213	56	48,26
1,045	9,16	1,100	17,11	0,9192	57	49,23
1,050	10,17	1,115	19,45	0,9170	58	50,21
1,055	11,18	1,130	21,77	0,9148	59	51,20
1,060	12,19	1,145	24,08	0,9126	60	52,20
1,065	13,19	1,160	26,36	0,9104	61	53,20
1,070	14,17	1,175	28,63	0,9082	62	54,21
1,075	15,16	1,190	30,88	0,9059	63	55,21
1,080	16,15	1,205	33,09	0,9036	64	56,22
1,085	17,13	1,220	35,28	0,9013	65	57,20
1,090	18,11	1,235	37,53	0,8989	66	58,27
1,095	19,06	1,250	39,82	0,8965	67	59,32
1,100	20,01	1,265	42,10	0,8941	68	60,38
1,105	20,97	1,280	44,41	0,8917	69	61,42
1,110	21,92	1,295	46,72	0,8892	70	62,50
1,115	22,86	1,310	49,07	0,8867	71	63,58
1,120	23,82	1,325	51,53	0,8842	72	64,66
1,125	24,78	1,340	54,07	0,8817	73	65,74
1,130	25,75	1,355	56,66	0,8791	74	66,83
1,135	26,70	1,370	59,39	0,8765	75	67,93
1,140	27,66	1,385	62,24	0,8739	76	69,05
1,1425	28,14	1,400	65,30	0,8712	77	70,18
1,145	28,61	1,415	68,63	0,8685	78	71,31
1,150	29,57	1,430	72,17	0,8658	79	72,45
1,152	29,95	1,445	75,98	0,8631	80	73,59
1,155	30,55	1,460	79,98	0,8603	81	74,74
1,160	31,52	1,475	84,45	0,8575	82	75,91
1,163	32,10	1,490	89,60	0,8547	83	77,09
1,165	32,49			0,8518	84	78,29
1,170	33,46			0,8488	85	79,50
1,171	33,65			0,8458	86	80,71
1,175	34,42			0,8428	87	81,94
1,180	35,39			0,8395	88	83,19
1,185	36,31			0,8367	89	84,46
1,190	37,23			0,8332	90	85,75
1,195	38,16			0,8299	91	87,00
1,200	39,11			0,8265	92	88,37
				0,8230	93	89,71
				0,8194	94	91,07
				0,8157	95	92,46
				0,8118	96	93,89
				0,8077	97	95,34
				0,8034	98	96,84
				0,7988	99	98,39
				0,7939	100	100

**Volumen und Dichte des Wassers**  
(bezogen auf Volumen und Dichte bei 4°).

Grad	A. Volumen	B. Dichte	Grad	A. Volumen	B. Dichte
0	1,000122	0,999878	21	1,001939	0,998065
1	1,000067	0,999933	22	1,002156	0,997849
2	1,000028	0,999972	23	1,002383	0,997623
3	1,000007	0,999993	24	1,002621	0,997386
4	1,000000	1,000000	25	1,002868	0,997140
5	1,000008	0,999992	30	1,00425	0,99577
6	1,000031	0,999969	35	1,00586	0,99417
7	1,000067	0,999933	40	1,00770	0,99236
8	1,000118	0,999882	45	1,00974	0,99035
9	1,000181	0,999819	50	1,01197	0,98817
10	1,000261	0,999739	55	1,01436	0,98584
11	1,000350	0,999650	60	1,01694	0,98334
12	1,000456	0,999544	65	1,01967	0,98071
13	1,000570	0,999430	70	1,02261	0,97789
14	1,000703	0,999297	75	1,02570	0,97493
15	1,000847	0,999154	80	1,02891	0,97190
16	1,000997	0,999004	85	1,03225	0,96876
17	1,001162	0,998839	90	1,03574	0,96549
18	1,001339	0,998663	95	1,03941	0,96208
19	1,001527	0,998475	100	2,04323	0,95856
20	1,001731	0,998272			

**Tabelle über die den gefundenen Kupfer- und Cuprooxydmengen  
entsprechenden Traubenzuckermengen nach E. Pflüger.**

Zu S. 884.

mg Zucker	mg Kupfer	0,1 mg Zucker entsprechen mg Kupfer	mg Cupro- oxyd	0,1 mg Zucker entsprechen mg Cupro- oxyd	mg Zucker	mg Kupfer	0,1 mg Zucker entsprechen mg Kupfer	mg Cupro- oxyd	0,1 mg Zucker entsprechen mg Cupro- oxyd
12	32,8	0,21064	36,8	0,23688	38	86,5	0,2028	97,4	0,2288
13	34,9	„	39,2	„	39	88,5	„	99,7	„
14	37,0	„	41,6	„	40	90,5	„	101,9	„
15	39,1	„	43,9	„	41	92,6	„	104,2	„
16	41,2	„	46,3	„	42	94,6	„	106,5	„
17	43,3	„	48,7	„	43	96,6	„	108,8	„
18	45,4	„	51,0	„	44	98,6	„	111,1	„
19	47,5	„	53,4	„	45	100,7	„	113,4	„
20	49,6	„	55,8	„	46	102,7	„	115,7	„
21	51,7	„	58,1	„	47	104,7	„	118,0	„
22	53,8	„	60,5	„	48	106,7	„	120,2	„
23	55,9	„	62,9	„	49	108,8	„	122,5	„
24	58,0	„	65,2	„	50	110,8	„	124,8	„
25	60,1	„	67,6	„	51	112,8	0,204	127,1	0,22976
26	62,1	0,2028	69,9	0,2288	52	114,9	„	129,4	„
27	64,2	„	72,2	„	53	116,9	„	131,7	„
28	66,2	„	74,5	„	54	119,0	„	134,0	„
29	68,2	„	76,8	„	55	121,0	„	136,3	„
30	70,2	„	79,1	„	56	123,0	„	138,6	„
31	72,3	„	81,3	„	57	125,1	„	140,9	„
32	74,3	„	83,6	„	58	127,1	„	143,2	„
33	76,3	„	85,9	„	59	129,2	„	145,5	„
34	78,4	„	88,2	„	60	131,2	„	147,8	„
35	80,4	„	90,5	„	61	133,2	„	150,1	„
36	82,4	„	92,8	„	62	135,3	„	152,4	„
37	84,4	„	95,1	„	63	137,3	„	154,7	„

mg Zucker	mg Kupfer	0,1 mg Zucker entsprechen mg Kupfer	mg Cupro-oxyd	0,1 mg Zucker entsprechen mg Cupro-oxyd	mg Zucker	mg Kupfer	0,1 mg Zucker entsprechen mg Kupfer	mg Cupro-oxyd	0,1 mg Zucker entsprechen mg Cupro-oxyd
64	139,4	0,204	157,0	0,22976	122	255,9	0,198	288,1	0,2232
65	141,4	"	159,3	"	123	257,8	"	290,3	"
66	143,4	"	161,6	"	124	259,8	"	292,6	"
67	145,5	"	163,9	"	125	261,8	"	294,8	"
68	147,5	"	166,2	"	126	263,7	0,1884	296,9	0,212
69	149,6	"	168,5	"	127	265,6	"	299,0	"
70	151,6	"	170,8	"	128	267,5	"	301,2	"
71	153,6	"	173,0	"	129	269,3	"	303,3	"
72	155,7	"	175,3	"	130	271,2	"	305,4	"
73	157,7	"	177,6	"	131	273,1	"	307,5	"
74	159,8	"	179,9	"	132	275,0	"	309,6	"
75	161,8	"	182,2	"	133	276,9	"	311,8	"
76	163,8	0,202	184,5	0,2272	134	278,8	"	313,9	"
77	165,8	"	186,7	"	135	280,6	"	316,0	"
78	167,9	"	189,0	"	136	282,5	"	318,1	"
79	169,9	"	191,3	"	137	284,4	"	320,2	"
80	171,9	"	193,6	"	138	286,3	"	322,4	"
81	173,9	"	195,8	"	139	288,2	"	324,5	"
82	175,9	"	198,1	"	140	290,1	"	326,6	"
83	178,0	"	200,4	"	141	291,9	"	328,7	"
84	180,0	"	202,6	"	142	293,8	"	330,8	"
85	182,0	"	204,9	"	143	295,7	"	333,0	"
86	184,0	"	207,2	"	144	297,6	"	335,1	"
87	186,0	"	209,5	"	145	299,5	"	337,2	"
88	188,1	"	211,7	"	146	301,4	"	339,3	"
89	190,1	"	214,0	"	147	303,2	"	341,4	"
90	192,1	"	216,3	"	148	305,1	"	343,6	"
91	194,1	"	218,6	"	149	307,0	"	345,7	"
92	196,1	"	220,8	"	150	308,9	"	347,8	"
93	198,2	"	223,1	"	151	310,7	0,176	349,8	0,1986
94	200,2	"	225,4	"	152	312,4	"	351,8	"
95	202,2	"	227,6	"	153	314,2	"	353,8	"
96	204,2	"	229,9	"	154	315,9	"	355,7	"
97	206,2	"	232,2	"	155	317,7	"	357,7	"
98	208,3	"	234,5	"	156	319,5	"	359,7	"
99	210,3	"	236,7	"	157	321,2	"	361,7	"
100	212,3	"	239,0	"	158	323,0	"	363,7	"
101	214,3	0,198	241,2	0,2232	159	324,7	"	365,7	"
102	216,3	"	243,5	"	160	326,5	"	367,7	"
103	218,2	"	245,7	"	161	328,3	"	369,6	"
104	220,2	"	247,9	"	162	330,0	"	371,6	"
105	222,2	"	250,2	"	163	331,8	"	373,6	"
106	224,2	"	252,4	"	164	333,5	"	375,6	"
107	226,2	"	254,6	"	165	335,3	"	377,6	"
108	228,1	"	256,8	"	166	337,1	"	379,6	"
109	230,1	"	259,1	"	167	338,8	"	381,6	"
110	232,1	"	261,3	"	168	340,6	"	383,5	"
111	234,1	"	263,6	"	169	342,3	"	385,5	"
112	236,1	"	265,8	"	170	344,1	"	387,5	"
113	238,0	"	268,0	"	171	345,9	"	389,5	"
114	240,0	"	270,2	"	172	347,6	"	391,5	"
115	242,0	"	272,5	"	173	349,4	"	393,5	"
116	244,0	"	274,7	"	174	351,1	"	395,5	"
117	246,0	"	276,9	"	175	352,9	"	397,5	"
118	248,0	"	279,2	"	176	354,6	0,1664	399,3	0,1874
119	250,0	"	281,4	"	177	356,2	"	401,2	"
120	252,0	"	283,6	"	178	357,9	"	403,1	"
121	253,9	"	285,9	"	179	359,6	"	404,9	"

mg Zucker	mg Kupfer	0,1 mg Zucker entsprechen mg Kupfer	mg Cuproxyd	0,1 mg Zucker entsprechen mg Cuproxyd	mg Zucker	mg Kupfer	0,1 mg Zucker entsprechen mg Kupfer	mg Cuproxyd	0,1 mg Zucker entsprechen mg Cuproxyd
180	361,2	0,1664	406,8	0,1874	216	419,7	0,1572	472,8	0,178
181	362,9	„	408,7	„	217	421,2	„	474,6	„
182	364,5	„	410,6	„	218	422,8	„	476,3	„
183	366,2	„	412,4	„	219	424,4	„	478,1	„
184	367,9	„	414,3	„	220	425,9	„	479,9	„
185	369,5	„	416,2	„	221	427,5	„	481,7	„
186	371,2	„	418,1	„	222	429,1	„	483,5	„
187	372,9	„	419,9	„	223	430,7	„	485,2	„
188	374,5	„	421,8	„	224	432,2	„	487,0	„
189	376,2	„	423,7	„	225	433,8	„	488,8	„
190	377,9	„	425,6	„	226	435,3	0,146	490,4	0,1636
191	379,5	„	427,4	„	227	436,7	„	492,1	„
192	381,2	„	429,3	„	228	438,1	„	493,7	„
193	382,9	„	431,2	„	229	439,6	„	495,3	„
194	384,5	„	433,1	„	230	441,1	„	497,0	„
195	386,2	„	434,9	„	231	442,6	„	498,6	„
196	387,8	„	436,8	„	232	444,0	„	500,3	„
197	389,5	„	438,7	„	233	445,5	„	501,9	„
198	391,2	„	440,6	„	234	446,9	„	503,5	„
199	392,8	„	442,4	„	235	448,4	„	505,2	„
200	394,5	„	444,3	„	236	449,9	„	506,8	„
201	396,1	0,1572	446,1	0,178	237	451,3	„	508,4	„
202	397,6	„	447,9	„	238	452,8	„	510,1	„
203	399,2	„	449,6	„	239	454,2	„	511,7	„
204	400,8	„	451,4	„	240	455,7	„	513,3	„
205	402,4	„	453,2	„	241	457,2	„	515,0	„
206	403,9	„	455,0	„	242	458,6	„	516,6	„
207	405,5	„	456,8	„	243	460,1	„	518,2	„
208	407,1	„	458,5	„	244	461,5	„	519,9	„
209	408,6	„	460,3	„	245	463,0	„	521,5	„
210	410,2	„	462,1	„	246	464,5	„	523,6	„
211	411,8	„	463,9	„	247	465,9	„	524,8	„
212	413,4	„	465,7	„	248	467,4	„	526,4	„
213	414,9	„	467,4	„	249	468,8	„	528,1	„
214	416,5	„	469,2	„	250	470,3	„	529,7	„
215	418,1	„	471,0	„					

Zu S. 926. **Tabelle über die dem gefundenen spezifischen Gewicht der Ätherfettlösung entsprechende Fettmenge nach Soxhlet.**

Spezifisches Gewicht	Fett %	Spezifisches Gewicht	Fett %	Spezifisches Gewicht	Fett %	Spezifisches Gewicht	Fett %	Spezifisches Gewicht	Fett %
<b>21</b>		<b>26</b>	0,46	<b>31</b>	0,92	<b>36</b>	1,37	<b>41</b>	1,87
1	0,00	1	0,47	1	0,93	1	1,38	1	1,88
2	0,01	2	0,48	2	0,94	2	1,39	2	1,89
3	0,02	3	0,49	3	0,95	3	1,40	3	1,90
4	0,03	4	0,50	4	0,95	4	1,41	4	1,91
5	0,04	5	0,50	5	0,96	5	1,42	5	1,92
6	0,05	6	0,51	6	0,97	6	1,43	6	1,93
7	0,06	7	0,52	7	0,98	7	1,44	7	1,94
8	0,07	8	0,53	8	0,99	8	1,45	8	1,95
9	0,08	9	0,54	9	1,00	9	1,46	9	1,96
<b>22</b>	0,09	<b>27</b>	0,55	<b>32</b>	1,01	<b>37</b>	1,47	<b>42</b>	1,97
1	0,10	1	0,56	1	1,02	1	1,48	1	1,98
2	0,11	2	0,57	2	1,03	2	1,49	2	1,99
3	0,12	3	0,58	3	1,04	3	1,50	3	2,00
4	0,13	4	0,59	4	1,05	4	1,51	4	2,01
5	0,14	5	0,60	5	1,05	5	1,52	5	2,02
6	0,15	6	0,60	6	1,06	6	1,53	6	2,03
7	0,16	7	0,61	7	1,07	7	1,54	7	2,04
8	0,17	8	0,62	8	1,08	8	1,55	8	2,05
9	0,18	9	0,63	9	1,09	9	1,56	9	2,06
<b>23</b>	0,19	<b>28</b>	0,64	<b>33</b>	1,10	<b>38</b>	1,57	<b>43</b>	2,07
1	0,20	1	0,65	1	1,11	1	1,58	1	2,08
2	0,21	2	0,66	2	1,12	2	1,59	2	2,09
3	0,22	3	0,67	3	1,13	3	1,60	3	2,10
4	0,23	4	0,68	4	1,14	4	1,61	4	2,11
5	0,24	5	0,69	5	1,15	5	1,62	5	2,12
6	0,25	6	0,70	6	1,15	6	1,63	6	2,13
7	0,25	7	0,71	7	1,16	7	1,64	7	2,14
8	0,26	8	0,72	8	1,17	8	1,65	8	2,16
9	0,27	9	0,73	9	1,18	9	1,66	9	2,17
<b>24</b>	0,28	<b>29</b>	0,74	<b>34</b>	1,19	<b>39</b>	1,67	<b>44</b>	2,18
1	0,29	1	0,75	1	1,20	1	1,68	1	2,19
2	0,30	2	0,76	2	1,21	2	1,69	2	2,20
3	0,30	3	0,77	3	1,22	3	1,70	3	2,22
4	0,31	4	0,78	4	1,23	4	1,71	4	2,23
5	0,32	5	0,79	5	1,24	5	1,72	5	2,24
6	0,33	6	0,80	6	1,24	6	1,73	6	2,25
7	0,34	7	0,80	7	1,25	7	1,74	7	2,26
8	0,35	8	0,81	8	1,26	8	1,75	8	2,27
9	0,36	9	0,82	9	1,27	9	1,76	9	2,28
<b>25</b>	0,37	<b>30</b>	0,83	<b>35</b>	1,28	<b>40</b>	1,77	<b>45</b>	2,30
1	0,38	1	0,84	1	1,29	1	1,78	1	2,31
2	0,39	2	0,85	2	1,30	2	1,79	2	2,32
3	0,40	3	0,86	3	1,31	3	1,80	3	2,33
4	0,40	4	0,87	4	1,32	4	1,81	4	2,34
5	0,41	5	0,88	5	1,33	5	1,82	5	2,35
6	0,42	6	0,88	6	1,33	6	1,83	6	2,36
7	0,43	7	0,89	7	1,34	7	1,84	7	2,37
8	0,44	8	0,90	8	1,35	8	1,85	8	2,38
9	0,45	9	0,91	9	1,36	9	1,86	9	2,39

Spezifisches Gewicht	Fett %	Spezifisches Gewicht	Fett %	Spezifisches Gewicht	Fett %	Spezifisches Gewicht	Fett %	Spezifisches Gewicht	Fett %
<b>46</b>	2,40	<b>50</b>	2,88	<b>54</b>	3,37	<b>58</b>	3,90	<b>62</b>	4,47
1	2,42	1	2,90	1	3,38	1	3,91	1	4,48
2	2,43	2	2,91	2	3,39	2	3,92	2	4,50
3	2,44	3	2,92	3	3,40	3	3,93	3	4,52
4	2,45	4	2,93	4	3,41	4	3,95	4	4,53
5	2,46	5	2,94	5	3,43	5	3,96	5	4,55
6	2,47	6	2,96	6	3,45	6	3,98	6	4,56
7	2,49	7	2,97	7	3,46	7	3,99	7	4,58
8	2,50	8	2,98	8	3,47	8	4,01	8	4,59
9	2,51	9	2,99	9	3,48	9	4,02	9	4,61
<b>47</b>	2,52	<b>51</b>	3,00	<b>55</b>	3,49	<b>59</b>	4,03	<b>63</b>	4,63
1	2,54	1	3,01	1	3,51	1	4,04	1	4,64
2	2,55	2	3,03	2	3,52	2	4,06	2	4,66
3	2,56	3	3,04	3	3,53	3	4,07	3	4,67
4	2,57	4	3,05	4	3,55	4	4,09	4	4,69
5	2,58	5	3,06	5	3,56	5	4,11	5	4,70
6	2,60	6	3,08	6	3,57	6	4,12	6	4,71
7	2,61	7	3,09	7	3,59	7	4,14	7	4,73
8	2,62	8	3,10	8	3,60	8	4,15	8	4,75
9	2,63	9	3,11	9	3,61	9	4,16	9	4,77
<b>48</b>	2,64	<b>52</b>	3,12	<b>56</b>	3,63	<b>60</b>	4,18	<b>64</b>	4,79
1	2,66	1	3,14	1	3,64	1	4,19	1	4,80
2	2,67	2	3,15	2	3,65	2	4,20	2	4,82
3	2,68	3	3,16	3	3,67	3	4,21	3	4,84
4	2,70	4	3,17	4	3,68	4	4,23	4	4,85
5	2,71	5	3,18	5	3,69	5	4,24	5	4,87
6	2,72	6	3,20	6	3,71	6	4,26	6	4,88
7	2,73	7	3,21	7	3,72	7	4,27	7	4,90
8	2,74	8	3,22	8	3,73	8	4,29	8	4,92
9	2,75	9	3,23	9	3,74	9	4,30	9	4,93
<b>49</b>	2,76	<b>53</b>	3,25	<b>57</b>	3,75	<b>61</b>	4,32	<b>65</b>	4,95
1	2,77	1	3,26	1	3,76	1	4,33	1	4,97
2	2,78	2	3,27	2	3,78	2	4,35	2	4,98
3	2,79	3	3,28	3	3,80	3	4,36	3	5,00
4	2,80	4	3,29	4	3,81	4	4,37	4	5,02
5	2,81	5	3,30	5	3,82	5	4,39	5	5,04
6	2,83	6	3,31	6	3,84	6	4,40	6	5,05
7	2,84	7	3,33	7	3,85	7	4,42	7	5,07
8	2,86	8	3,34	8	3,87	8	4,44	8	5,09
9	2,87	9	3,35	9	3,88	9	4,46	9	5,11
								<b>66</b>	5,12

## Alphabetisches Inhaltsverzeichnis.

Finden sich hinter einem Wort mehrere Zahlen, so zeigt die fettgedruckte diejenige Seite an, auf welcher der betreffende Stoff hauptsächlich behandelt wird.

- A.**
- Aalschleim, Phosphatide 372.  
 Abdampfen von Flüssigkeiten I.  
 Abderhaldensche Reaktion, s. Abwehrfermente.  
 Abmessen von Flüssigkeiten 10.  
 Absorption von Fermenten 601, 604, **605**.  
 Absorptionsstreifen 19.  
 Abwägen 9.  
 Abwehrfermente 622, 624.  
 Accipencer stellatus, Protamin 474.  
 — sturio, Protamin 474.  
 Acetaldehyd 57.  
 — Vorkommen 57.  
 — Darstellung 58.  
 — Eigenschaften 58.  
 — Nachw. im Harn 745.  
 — — im Blut 790.  
 — Vork. im Muskel 857.  
 Acetamid aus Eiweiß 447.  
 Acetessigsäure 92.  
 — Vorkommen 92.  
 — Darst. und Eigenschaften 92.  
 — Best. im Blut 877.  
 — Nachw. im Harn 738.  
 — Best. im Harn 739.  
 — — mit Aceton 739.  
 — — neben Aceton u.  $\beta$ -Oxybuttersäure 744, 745.  
 — — getrennt von Aceton 740.  
 — — nach Embden-Schliep 740.  
 — — nach Folin 741.  
 Aceton 59.  
 — Vorkommen 59.  
 — Darstellung 59.  
 — — aus Harn 59.  
 — Eigenschaften 59.  
 — Umwandlungen 59.  
 — Nachweis 59.  
 — bei der Eiweißzersetzung 447, 490.  
 — Vork. in Milch 919.  
 — Nachw. im Harn 738.  
 — — bei Abwesenheit von Acetessigsäure 738.
- Aceton, Nachw. bei Anwesenheit von Acetessigsäure 738.  
 — — — — und  $\beta$ -Oxybuttersäure 744, 745.  
 — Best. von Aceton + Acetessigsäure in Blut u. Organen 877.  
 — — — — im Harn 739.  
 — — von Aceton allein 740.  
 — — nach Embden-Schliep 740.  
 — — nach Folin 741.  
 — — kleiner Mengen 744.  
 — — neben Acetessigsäure u.  $\beta$ -Oxybuttersäure 745.  
 Acetonhäm 403, **405**.  
 Acetonkörper, Mikrobest. im Blut 847.  
 Acetyldiglucoamin 143.  
 Acetylenhämoglobin 527.  
 Acetylglucoamin 142.  
 Acetylproteine 516.  
 Achillessehne 856, Anm. — Mucoïd 555.  
 Achroodextrin 132.  
 Acidalbumin 445, 469, **494**, 613.  
 — Unterschied gegen Albuminate 495.  
 — aus Muskel, Nachw. 860.  
 Acidhämoglobin 528, **530**.  
 Acidimetrie 11 ff.  
 Acidität des Harns 680.  
 — des Bluts, Best. 800.  
 — des Mageninhalts 899.  
 — — — Bestimmung 901.  
 Acrolein aus Fetten 100.  
 Actinia equina, Tetramin 194.  
 — — Isol. von Basen 864.  
 Adamkiewicz Probe (Allantoin) 156.  
 — — (Eiweiß u. Tryptophan) 449.  
 Adenase 641.  
 Adenin 169, 174, **180**.  
 — Vorkommen 180.  
 — Synthese 180.  
 — Eigenschaften 180.  
 — Verbindungen 181.
- Adenin, Umwandlungen 182.  
 — Nachweis 182.  
 — Darst. aus Harn 187.  
 — — aus Thymonucleinsäure 382.  
 — — aus Adenylsäure 375.  
 — u. Guanin, quantitative Gewinnung aus Nucleinsäuren 382, 385.  
 — Isol. aus Organen u. Muskeln 866.  
 — Best. in Muskeln u. Organen 875.  
 — Vork. in Milch 919.  
 — Trennung von Epiguanin, Hypoxanthin, Paraxanthin 181, **186**.  
 Adeninuracildinucleotid 388.  
 Adenosin 112, 375, **387**.  
 — Fermentspaltung 641.  
 — Vork. im Dünndarminhalt 932.  
 Adenosinhexosid 388.  
 Adenosinphosphorsäure 387, s. Adenylsäure.  
 Adenylsäure 375, **387**.  
 — Gewinnung aus Hefenucleinsäure 386.  
 Adipocire, s. Leichenwachs.  
 l-Adrenalin 207.  
 — Darst. aus Nebenniere 208.  
 — Verhalten zu Oxydasen 646.  
 — Best. in Nebenniere 878.  
 Äpfelsäure, Bildung aus Asparaginsäure 243.  
 — — aus Fumarsäure 95, 646.  
 — Verhalten zu Geweboxydasen 646.  
 Äthanolamin 192, s. Aminoäthylalkohol.  
 Äthanolmethylamin 192.  
 Äther, hämolytische Wirkung 519.  
 — Best. im Blut 790.  
 Ätherlösliches, Best. in Organen 885.  
 Ätherschwefelsäuren, aromatische 349, s. Schwefelsäuren, gepaarte.



- Äthyläther, s. Äther.  
 Äthylalkohol 51.  
 — Oxydation durch Fermente 646.  
 — Best. im Blut 790.  
 — Nachw. u. Best. in Muskeln u. Organen 869, 878.  
 — Tabelle des spez. Gew. 948.  
 Äthylenhämoglobin 527.  
 Äthylenmilchsäure 83.  
 Äthylidenmilchsäure 83, s. Milchsäure.  
 Äthylsulfid 56.  
 — aus Eiweiß 447.  
 — aus Cystin durch Bakterien 256.  
 Ätiophyllin und Ätioporphyrin 413.  
 Agmatin 204.  
 Ailanthuskokon 509.  
 Akrylsäure aus  $\beta$ -Alanin 193.  
 Aktivatoren der Fermente 602, s. Kinasen.  
 Alanin 229.  
 — Vorkommen 229.  
 — Darstellung 229.  
 — Eigenschaften 229.  
 — Optische Eigenschaften 230.  
 — Verbindungen 229.  
 — Carbaminat 228.  
 — Umwandlungen und Zersetzungen 230.  
 — Nachweis 231.  
 — Bildung aus Cystin 256.  
 — Racemisierung 229.  
 — Trennung in optisch-aktive Komponenten 229.  
 — aus Eiweiß 447.  
 — Vork. im Muskel 857.  
 — Ninhydrinreaktion 219.  
 — aus Serin 232.  
 — Isol. aus Eiweißhydrolysat 563, 568, 569, 570.  
 — Gehalt einiger Proteine daran 596–599.  
 — Isol. aus Harn 752.  
 $\beta$ -Alanin 192, 199, 210, 244.  
 d-Alanin 229, vgl. Alanin.  
 l-Alanin 229.  
 d-Alaninäthylester, Flüchtigkeit 567.  
 d-Alanyl-d-alanin 510.  
 d-Alaninhydrat 510.  
 d-Alanylglycin, Gewinnung aus Fibroin 507.  
 — Eigenschaften 509.  
 d-Alanylglycinhydrat 492, s. Glycylalaninhydrat.  
 d-Alanylglycyl-l-tyrosin 513.  
 $\beta$ -Alanylhistidin 210, s. Carnosin.  
 d-Alanyl-l-leucin 507, **510**.  
 — Isolierung 507.
- d-Alanyl-l-leucinhydrat 507, **510**.  
 d-Alanylphenylalaninhydrat 511, s. Phenylalanyl-d-alaninhydrat.  
 d-Alanylprolinhydrat 510.  
 Albumin 147.  
 — aus Ovalbumin 147.  
 Albuminate 445, s. Alkalialbuminate.  
 — Unterschied gegen Acidalbumine 495.  
 Albumine 446, vgl. auch Lactalbumin, Ovalbumin, Serumalbumin.  
 — Zusammensetzung und allgemeine Eigenschaften 446.  
 — Umwandlung u. Zersetzung 446.  
 — Unterschied gegen Globuline 452.  
 — Einzelvertreter 452.  
 — Nachw. u. Best. im Harn 748.  
 — Vork. in Colostrum 920.  
 — — in Pankreassaft 907.  
 — — in Linse 892.  
 — Nachw. u. Best. in Milch 922, 924, 925.  
 — Nachw. im Knochenmark 854.  
 Albuminoide 445, **482**.  
 — Verhalten zu Fermenten 482.  
 Albuminose von Miescher 472.  
 Albuminsäuren 494, s. Alkalialbuminate.  
 Albuminstoffe, s. Eiweißstoffe.  
 Albumoid des Knochens 482, 491.  
 — des Knorpels 482, 491.  
 — — — Isolierung 855.  
 — der Linse 482, **490**, 892.  
 — — — Gehalt an Aminosäuren 598.  
 Albumosen 445, 447, 495, **496**.  
 — Darst. nach Kühne 496.  
 — — nach Pick 496.  
 — — nach Haslam 497.  
 — Abscheidung aus einem Albumose - Peptongemisch 496, 497, 613.  
 — — der primären Albumosen 496, 497.  
 — — der Deuteroalbumosen 498.  
 — Weitere Aufteilung der primären und Deuteroalbumosen 498.  
 — Eigenschaften, allgemeine 499.  
 — Verhalten zu eiweißfällenden Mitteln 451.
- Albumosen, Verhalten zu Eripisin 621.  
 — einzelne Albumosen und ihre Eigenschaften 499.  
 — Charakteristisches Verhalten 499.  
 — Prüfung auf schwer fällbare 497.  
 — — auf leicht fällbare 497.  
 — Nachweis in der peptischen Verdauungsflüssigkeit 613.  
 — Überführung in Plasteine 505.  
 — Nachw. in der tryptischen Verdauungsflüssigkeit 620.  
 — — im Harn 749.  
 — — nach Hofmeister 749.  
 — — nach Devoto 750.  
 — — in serösen Flüssigkeiten 773.  
 — aus Horn 500.  
 — Auftreten bei Oxydation von Eiweiß 514.  
 — nitrierte, aus Xanthoprotein 515.  
 — Vork. im Eiter 824.  
 — — in Sputis 897.  
 — — im Pankreassaft 907.  
 — — im Sperma 931.  
 Aldehydase der Leber, der Milch usw., s. Oxydase und Aldehydomutase.  
 Aldehyde 57.  
 — bei Oxydation von Eiweiß 447.  
 Aldehydomutase 643.  
 — der Milch 644.  
 Aldehydreagens von Ehrlich 275, s. Ehrlichs Aldehydprobe.  
 Aldosen, Reaktionen 106.  
 — Unterschied von Ketosen 107.  
 Alkalialbuminate 445, 469, **482**, **494**.  
 — Unterschied von Acidalbumin 495.  
 — von Lieberkühn 457.  
 Alkalialbumose 500.  
 Alkalibindungsvermögen des Bluts, Best. 815.  
 Alkalimetalle 34.  
 Alkalimetrie 11.  
 — der Aminosäuren und Polypeptide **582**, 614, 619.  
 Alkalireserve des Bluts, Best. 830.  
 Alkaloidreagenzien, Verhalten zu Protaminen 476.  
 — — zu Eiweiß 448.  
 Alkaptochrom 304.  
 Alkaptoneharn 303, 304.

- Alkohole 51ff., vgl. auch Äthylalkohol usw.  
 Alkoholoxydase 643, 646.  
 Alkylamine 188, s. auch Amine.  
 — Trennung 190.  
 — Abtrennung aus Fäulnisgemischen 217.  
 Allantoin **154**, 173, 219.  
 — Vorkommen 154.  
 — Darstellung 155.  
 — Isolierung 155.  
 — Eigenschaften 155.  
 — Zersetzungen 156.  
 — Nachweis 156.  
 — Bildung aus Harnsäure 173, 642.  
 — Nachw. u. Best. im Harn 154, 706.  
 — Isol. aus serösen Flüssigkeiten 780.  
 Allantoisflüssigkeit 154.  
 Alligator, Harnsäuregehalt des Muskels 857.  
 Alloisoleucin 240.  
 Alloxan aus Harnsäure 173.  
 Alloxurkörper 169, s. Purinderivate.  
 — des Harns 182, 186.  
 Alloxypoteinsäure 517.  
 Alménsche Lösung (Reagens) 945.  
 Almén-Nylanders Probe (Zucker) 107, s. Böttgers Probe.  
 Ameisensäure 60, **62**, 117.  
 — Vork. u. Eigenschaften 62.  
 — Abscheidung und Trennung 76, 78.  
 — Zersetzungen 62.  
 — Nachweis 63.  
 — — u. Best. im Blut 790.  
 — Best. im Harn 718.  
 — Bildung bei Spaltung von Oxyhämoglobin 523.  
 Amidstickstoff, Best. in Proteinstoffen 587.  
 Amidulin 127.  
 Amine, biogene 187.  
 — Unterscheidung primärer und sekundärer 188.  
 Aminoäthandisulfid aus Cystin 255.  
 Aminoäthylalkohol **192**.  
 — aus Phosphatiden 363, 369.  
 Aminoäthylimidazol 209, s. Histamin.  
 Aminoäthylsulfosäure 247, s. Taurin.  
 Aminobernsteinsäure 242, s. Asparaginsäure.  
 $\alpha$ -Aminobuttersäure 193, 229, **232**, 247.  
 $\gamma$ -Aminobuttersäure 193.  
 — aus Eiweiß 447.  
 $\epsilon$ -Aminocaprinsäure 199, 213.  
 n- $\alpha$ -Aminocaprinsäure 241, s. Norleucin.  
 Aminodicarbonsäuren, Trennung von Monaminosäuren 560.  
 — Isolierung 574.  
 — Gehalt der Proteine daran 596—599.  
 Aminoessigsäure 225, s. Glykokoll.  
 $\alpha$ -Aminofettsäuren 218.  
 — Allgemeines 218.  
 — Vorkommen 218.  
 — Eigenschaften 218.  
 — Titration 218.  
 — Fällbarkeit 219.  
 — Ninhydrinreaktion 219.  
 — Verbindungen 220.  
 — Ester 221.  
 — — Darst. aus Ester-Chlorhydraten 565, 566.  
 — — fraktionierte Destillation 567.  
 — Ester-Chlorhydrate, Bildung 564, 566.  
 — Benzoylverbindungen 222.  
 — Naphthalinsulfoverbindungen 222.  
 — Uraminosäuren 223.  
 — Phenylisocyanat 223.  
 — Naphthylisocyanat 223.  
 — Carbamate 224.  
 — Betaine 224.  
 — Reaktion von van Slyke 224.  
 — Einwirkung von Formaldehyd 225.  
 — Best. nach van Slyke 585.  
 — — nach Sörensen 582, s. Formoltitration.  
 — — alkalimetrische 582.  
 — Verhalten zu Hefe 225.  
 — — zu Oxydationsmitteln 225.  
 — Isol. aus Eiweißhydrolysat 560, 567.  
 — — — mit Butylalkohol 561.  
 — Gehalt einiger Proteine daran 596—599.  
 — im Eiweiß 447.  
 — Nachw. im Harn 750.  
 — Isol. aus Harn, direkte 750.  
 — — aus Harn als Naphthalinsulfoverbindung 751.  
 — — — als Ester 752.  
 — — — als Hydantoin 752.  
 — Nachw. im normalen Blut 783.  
 — Vork. im Muskel 857.  
 — Nachw. in serösen Flüssigkeiten 783.  
 — — in Galle 913.  
 $\alpha$ -Aminofettsäuren, Vork. in Faeces 933.  
 — Nachw. u. Isol. aus Organen 869.  
 — Vork. in Milch 919.  
 — — im Dünndarminhalt 932.  
 — Nachw. im Dünndarminhalt 933.  
 $\alpha$ -Aminoglutarsäure 244, s. Glutaminsäure.  
 Aminoisobuttersäure 232.  
 Aminoisobutylessigsäure 235, s. Leucin.  
 Aminoisovaleriansäure 191, s. Valin.  
 $\alpha$ -Amino- $\beta$ -methylpropionsäure 259, s. Isoleucin.  
 $\alpha$ -Amino- $\beta$ -oxypropionsäure 231, s. Serin.  
 2-Amino-6-Oxypurin 169, s. Guanin.  
 6-Amino-2-Oxypurin 177.  
 6-Amino-2-Oxypyrimidin 164, s. Cytosin.  
 $\alpha$ -Amino- $\delta$ -oxyvaleriansäure 277.  
 $\alpha$ -Aminopropionsäure 229, s. Alanin.  
 $\beta$ -Aminopropionsäure 192, s.  $\beta$ -Alanin.  
 — aus Eiweiß durch Bakterien 447.  
 6-Aminopurin 169, s. Adenin.  
 Aminosäuren, s.  $\alpha$ -Aminofettsäuren.  
 Aminosäure  $C_5H_{11}SNO_2$  256.  
 Aminosäuren, Best., s. Aminosäuren und Aminostickstoffbest.  
 Aminostickstoff, Best. durch Formoltitration 582.  
 — — nach van Slyke 585, 590.  
 — — — bei Fermentversuchen 614, 619.  
 — — im Harn nach Krüger-Schmid 754.  
 — — — nach Sörensen-Henriques 755.  
 — — — nach van Slyke 755.  
 — — im Blut 784.  
 — — in Muskeln 877.  
 — — in Milch 928.  
 $\delta$ -Amino-n-valeriansäure **193**, 261.  
 — Isol. aus einem Fäulnisgemisch 218, 320.  
 — Bildung aus Prolin 279.  
 — aus Eiweiß 447.  
 Ammoniak, Vork. und Eigenschaften 48.  
 — Nachweis 48.  
 — Nachw. in Spuren 48.  
 — Tabelle des spez. Gew. 947.

- Ammoniak** aus Eiweiß durch Zersetzung 447.  
 — Gehalt einiger Proteine daran 596—599.  
 — Nachw. im Harn 694.  
 — Best. im Harn nach Krüger-Reich 694.  
 — — — nach Folin 695.  
 — — — nach Schlösing 696.  
 — Mikrobestimmung 696.  
 — Nachw. u. Best. im Harnstein 765, 766, 768.  
 — — — in serösen Flüssigkeiten 777.  
 — — — im Speichel 777, 896.  
 — Mikrobest. in Blut 838.  
 — Nachw. u. Best. im Mageninhalt 906.  
 — — — in Galle 914.  
 — — in Faeces 939, 940.  
 — Best. in Organen 873.  
 — Vork. in Schweiß 918.  
 — — in Sputis 897.  
 — — im Muskel 857.  
 — Verhalten bei Best. des Aminostickstoffs 585, 587.  
 — molybdänsaures, Reagens Darst. 945.  
**Ammoniakstickstoff**, Best. in Proteinen 587, 588.  
**Ammoniumbasen** 194.  
**Ammoniummagnesiumphosphat**, Nachw. u. Best. in Harnsteinen 763, 765, 766, 767.  
 — in Darmsteinen 943.  
**Amniosflüssigkeit**, Untersuchung 768.  
 — Allantoinvorkommen 154.  
 — Kreatinvorkommen 158.  
**Amylalkohol** aus Leucinen 236, 238, 241.  
**d-Amylamin** 240.  
**Amylase** 631, s. Diastatisches Ferment.  
**Amylodextrin** 132.  
**Amyloid** 558.  
 — Darst. auf mechanischem Wege 558.  
 — — durch Verdauung 559.  
 — Beziehung zur Chondroitinschwefelsäure 357.  
 — in Nierensteinen 767.  
**Amyloidentartete Organe**, Chondroitinschwefelsäure 357.  
**Amylopectin** 127.  
**Amylose** 127.  
**Amylum** 127, s. Stärke.  
**Analyse**, quantitative 8.  
**Anhydromannose** 141.  
**Anhydromannonsäure** 142.  
**Anhydrotalonsäure** 142.  
**Anhydrotalosalochleimsäure** 142.  
**Anilinohämin** 407.  
**Anorganische Salze** 34.  
 — Allgemeines 34.  
 — Nachw. u. Best. im Harn 682, 683.  
 — Nachw. u. Best. in serösen Flüssigkeiten 770, 795, 796, 826ff.  
 — im Bindegewebe 855, 856.  
 — in Blut 820, 826ff.  
 — in roten Blutkörperchen 805.  
 — im Darmsaft 908.  
 — im Eiter 824.  
 — in Faeces 934, 940, 943.  
 — in Galle 909, 911, 914, 915.  
 — in Gallensteinen 917.  
 — im Gehirn 889, 891.  
 — in Harnsteinen 763.  
 — in Knochen 851, 852, 853.  
 — im Knorpelgewebe 855.  
 — in Magensaft 899.  
 — in Milch 919, 922.  
 — in Muskeln und Organen 856, 858, 870.  
 — in Nasensteinen 897.  
 — im Pankreassaft 907.  
 — in Pankreassteinen 907.  
 — im Schweiß 918.  
 — im Sekret der Talgdrüse und ähnlichen Sekreten 930.  
 — im Speichel 770, 795, 896.  
 — in Speichelsteinen 896.  
 — im Sperma 931.  
 — in Tränen 897.  
**Anorganische Stoffe**, Allgemeines 34.  
**Anthracen** 443.  
**Anthrachinonfarbstoffe** 442.  
**Anthracin** 212.  
**Antialbumid** 494.  
**Antifermente** 602.  
**Antipathidenachsenskelett**, Cornein 492.  
**Antipepsin** 602, 610.  
**Antipepton** 502.  
**Antoxyproteinsäure** 517.  
**Aorta**, Amyloid 558.  
 — Chondroitinschwefelsäure 356, 557.  
 — Elastin 485.  
 — Mucoid, Chondrosamingehalt 141.  
**Aporrhегmen** 187.  
**Arabinose** 110.  
 — Vorkommen 110.  
 — Darst. aus Harn 110.  
 — Eigenschaften 110.  
 — Verbindungen 110.  
 — Nachw. u. Best. im Harn 735, 736.  
**Arabinosebenzylphenylhydrazon**, Darst. 109.  
**Arachidonsäure** 76, 366, 368, 369.  
**Arachinsäure** 70.  
 — Abscheidung und Trennung 81.  
**Aräometer** 15.  
**Arbaciasperma (Arbacin)** 474.  
**Arbacin** 474.  
**Arginase** 637.  
 — Vorkommen 637.  
 — Eigenschaften 637.  
 — Wirkung 637.  
 — — auf Protamine 476.  
**Arginin** 259.  
 — Vorkommen 259.  
 — Darstellung und Synthese 259.  
 — Eigenschaften 260.  
 — optische Eigenschaften 261.  
 — Verbindungen 260.  
 — Umwandlungen 261.  
 — Verhalten bei Aminostickstoffbest. 585, 587.  
 — Nachweis 262.  
 — Bildung aus Eiweiß 447.  
 — Isol. aus Eiweißhydrolysat 577.  
 — Best. im Eiweißhydrolysat 587.  
 — Gehalt einiger Proteine daran 596—599.  
 — Isol. aus Organen und Muskeln 866, 868.  
**Arnoldsche Probe** auf Acetessigsäure 738.  
**Aromatische Säuren** 287.  
 — Verbindungen, Paarung mit Schwefelsäure 349.  
 — — — mit Glucuronsäure 353.  
**Arsen** 42.  
**Arsengehalt** der Gewebe 42.  
**Arthropodenblut**, Hämocyanin 531.  
**Asche**, Untersuchung mit dem Spektralapparat 18.  
**Aschen**, Herstellung 649.  
 — Vorprüfung 649.  
 — Veraschung auf trockenem Wege 649.  
 — — nach Stolte 651.  
 — — auf nassem Wege 652.  
 — — von Harn, Vorbehandlung 652.  
 — — unter Sodazusatz 650.  
 — — von eiweißreichen Substanzen 649, 651.  
 — Best. der Gesamtasche 675.  
 — Untersuchung:  
 — — auf Calcium 654, 658, 659.  
 — — auf Calcium und Magnesium 657, 660.

- Aschen, Untersuchung auf Chlor 666.  
 — — auf Eisen 655, 660, 661, 663.  
 — — auf Jod 667.  
 — — auf Kalium 654, 655, 656, 657.  
 — — auf Kieselsäure 654, 673.  
 — — auf Kohlensäure 653, 674.  
 — — auf Magnesium 654, 659.  
 — — auf Magnesium und Calcium 657, 660.  
 — — auf Mangan 655.  
 — — auf Natrium 654, 655.  
 — — auf Phosphorsäure 654, 671, 673.  
 — — auf Salzsäure 654, 664.  
 — — auf Schwefel 669.  
 — — bleischwäzender 671.  
 — — auf Schwefelsäure 654, 670.  
 Aschenauszug, qualitative Untersuchung des wässerigen 653.  
 — — — des salzsauren 654.  
 — — quantitative Best. einzelner Aschenbestandteile 655.  
 — — — und Analyse der Gesamtasche 675.  
 — Herstellung der Harnasche 683.  
 — — der Knochenasche 853.  
 — — der Gallenasche 911.  
 Asbestfilter 8.  
 — Herstellung 8, 883, 884.  
 Ascidie, Tunicin 134.  
 Ascites, chylöser (Cholesterinester) 324.  
 Ascitesflüssigkeit, s. auch seröse Flüssigkeiten.  
 — Albumingehalt 452.  
 — Allantoingehalt 155.  
 — Glucosamingehalt 138.  
 — Glykokollgehalt 225.  
 — Harnsäuregehalt 169.  
 — Hyaloidingehalt 147.  
 — Serosamucin 557.  
 — Untersuchung 768.  
 Asellin 216.  
 Asparagin 242, 248.  
 — Ninhydrinreaktion 219.  
 — Verhalten bei Aminostickstoffbest. 587.  
 Asparaginsäure 192, 222, 242.  
 — Vorkommen 242.  
 — Darstellung 242.  
 — Carbaminat 224.  
 — Darst. der optisch aktiven 242.  
 — Eigenschaften 242.  
 — Optische Eigenschaften 243.  
 — Verbindungen 242.  
 Asparaginsäure, Umwandlungen 243.  
 — Nachweis 244.  
 — Trennung von Leucin 244.  
 — — von Glutaminsäure 242.  
 — aus Eiweiß 447.  
 — Isol. aus Eiweißhydrolysat 568, 571, 572, 575, 576.  
 — Gehalt einiger Proteine daran 596—599.  
 Asteriasterin 334.  
 Atherombälge, Untersuchung 930.  
 — Cholesteringehalt 323, 930.  
 — Leucingehalt 235, 930.  
 — Tyrosingehalt 930.  
 Atmidalbumin 482, 500.  
 Atmidalbumose 482, 500.  
 Atmidkeratin 482.  
 Atmidkeratose 482.  
 Atomgewichte 946.  
 Austern, Tauringehalt 249.  
 — Trimethylamin 190.  
 Auswaschen der Niederschläge 5.  
 Autodigestion 621.  
 Autolyse von Organen 621.  
 Autolytisches Ferment 621.  
 Avertebraten, Fermente 635.  
 Azelainsäure aus Eiweiß 448.  
 Azulminsäure aus Adenin 182.
- B.**
- Bacterienfarbstoff im Eiter, s. Pyocyanin 444.  
 — im Sputis 898.  
 Badeschwamm, Jod 42.  
 — Jodgorgosäure 302.  
 — Jodospongin 493.  
 — Spongin 493.  
 Baeyers Probe (Indol) 307.  
 Balngeschwülste, Bestandteile und Untersuchung 930.  
 Barfoeds Probe (Zucker) 118.  
 Barium, Vorkommen 37.  
 Barrenscheen-Weltmanns Probe (Harnstoff) 153.  
 — Allantoin 156.  
 Barscheier, Ichthulin 547.  
 — Ichthulin-Lecithinverbindung 548.  
 — Mucin 558.  
 Basen, organische 187.  
 — Isol. aus Harn 715, 716.  
 — Isol. aus Muskeln und Organen 864.  
 — Isol. und Trennung aus autolysierten Organen 868.  
 — unbekannter Konstitution:  
 — —  $C_2H_5N$  212.  
 — —  $C_2H_8N_2$  212.  
 — —  $C_3H_5NO_2$  212.  
 — —  $C_3H_6N_2O$  212.  
 Basen unbekannter Konstitution:  
 — —  $C_3H_8N_2$  212.  
 — —  $C_3H_8N_2O$  212.  
 — —  $C_3H_{10}N_2$  213.  
 — —  $C_5H_7NO_6$  213.  
 — —  $C_6H_{11}N_3O_2$  213.  
 — —  $C_6H_{12}N_2O_4$  213.  
 — —  $C_6H_{14}N_4$  213.  
 — —  $C_6H_{14}N_2O_2$  213.  
 — —  $C_7H_9NO$  214.  
 — —  $C_7H_{11}N$  214.  
 — —  $C_7H_{12}N_4O_2$  ( $C_7H_{14}N_4O_2$ ?) 214.  
 — —  $C_7H_{15}NO_2$  214.  
 — —  $C_7H_{18}N_2O_6$  214.  
 — —  $C_8H_{11}N$  214.  
 — —  $C_8H_{13}N$  215.  
 — —  $C_8H_{14}N_4O_8$  215.  
 — —  $C_8H_{13}N$  215.  
 — —  $C_9H_{13}NO$  215.  
 — —  $C_{10}H_{15}N$  215.  
 — —  $C_{10}H_{17}N$  215.  
 — —  $C_{12}H_9N_4O_4$  215.  
 — —  $C_{13}H_{26}N_2O_3$  216.  
 — —  $C_{13}H_{26}N_2O_5$  216.  
 — —  $C_{14}H_{12}N_2O_2$  216.  
 — —  $C_{15}H_{36}N_8O_{13}$  216.  
 — —  $C_{16}H_{24}N_2O_4$  216.  
 — —  $C_{17}H_{38}N_4$  216.  
 Basenstickstoff, Best. im Eiweißhydrolysat 587, 588.  
 Batylalkohol 55.  
 Beersches Gesetz 20.  
 Beilsteins Probe (Halogen in organischen Substanzen) 51.  
 Bence-Jones Eiweißkörper 467.  
 — Gehalt an Aminosäuren 596.  
 Benzaldehyd aus Eiweiß 448, 490.  
 Benzoesäure 287.  
 — aus Eiweiß 447, 490.  
 — aus Oxyprotsulfonsäure 514.  
 — Isol. aus Flüssigkeiten 287.  
 — Nachw. u. Best. im Harn 722.  
 — — — Serum 724, 795.  
 Benzoesäureglucuronsäure 355.  
 Benzol aus Eiweiß 486.  
 — aus Oxyprotsulfonsäure 514.  
 — aus Tyrosin 300.  
 Benzolderivate 281.  
 Benzolsulfoguanidin 157.  
 Benzoylcreatin 159.  
 Benzoylornithin 289, s. Ornithursäure.  
 Benzoylverbindungen der Aminosäuren 222.  
 — des Eiweißes 517.  
 Benzylalkohol, fermentative Oxydation 646.  
 Benzylphenylhydrazin 108.  
 Bernsteinsäure 94.

- Bernsteinsäure, Vorkommen 94.  
 — — im Muskel 857.  
 — — in Organen 858.  
 — Darstellung 94.  
 — Isol. aus Organen und Flüssigkeiten 95.  
 — — aus Eiter **96**, 852.  
 — Eigenschaften, Salze 95.  
 — Umwandlungen 95.  
 — — durch Fermente 646.  
 — Nachweis 96.  
 — aus Arginin 261.  
 — aus Asparaginsäure 244.  
 — aus Eiweiß 447, 448, 490.  
 — aus Glutaminsäure 247.  
 — aus Hämatinsäure 272.  
 — aus Milchzucker 921.  
 — Isol. aus Fäulnisgemisch 320, 321.  
 — — aus Muskel und Organen **95**, 860.  
 — Nachw. in serösen Flüssigkeiten **95**, 795.  
 Betain 190, **198**.  
 — Trennung von Cholin 196.  
 — Isol. aus „Argininfraktion“ 866.  
 — Vork. im Muskel 857.  
 Betaine der Aminosäuren 224.  
 Betainogen, Isol. 868.  
 Bezoare 341, **944**.  
 — Lithofellinsäure 341.  
 Bials Probe (Pentosen im Harn) 736.  
 Bienengift 313.  
 — Vork. von Ameisensäure 62.  
 — — von Tryptophan 313.  
 Bienenwachs 53, 71, **106**.  
 Bilicyanin 421.  
 Bilifuscin 418.  
 Bilihumin 418.  
 Bilinigrin 421.  
 Biliprasin 418.  
 Bilipurpurin s. Phylloerythrin 425.  
 Bilirubin, s. auch Gallenfarbstoffe 417.  
 — Vorkommen 417.  
 — — in Sputis 898, 899.  
 — Darst. aus Gallensteinen 417.  
 — — aus Serum 419.  
 — Isol. aus Flüssigkeiten 418, 419.  
 — Eigenschaften 419.  
 — Verbindungen 420.  
 — Spektrum 420.  
 — Umwandlungen 421.  
 — Oxydation 270.  
 — Reduktion 272, 421, 422, 423.  
 — Nachweis 421.  
 — — im Harn 757.  
 Bilirubin, Nachw. u. Best. im Serum 793.  
 — — im Meconium 944.  
 — — in Galle 910, 913.  
 — — in Gallensteinen 917.  
 — — neben Urobilin im Dünndarminhalt 933.  
 — — in Faeces 938.  
 Bilirubinammonium 418.  
 Bilirubingallensteine 916.  
 Bilirubinsäure 273, **422**.  
 Biliverdin 417, 421, **424**, 910.  
 Bindegewebe, Bestandteile 855.  
 — Elastingehalt 485.  
 — Fettgehalt 97.  
 — Kieselsäuregehalt 47.  
 — Kollagengehalt 486.  
 — Untersuchung 856.  
 Bittermandelöl bei der Oxydation des Eiweißes 448, 490.  
 Biuret 152.  
 Biuretreaktion 153, 268, 449.  
 — des Eiweißes 449.  
 Blasengalle 908.  
 Blasenschleimhaut, Phosphorproteinid 549.  
 Blattfarbstoff, Reduktion 272.  
 Blattlaus, Dextran 133.  
 Blausäure, s. Cyanwasserstoff.  
 Blei 41.  
 — Schwefeltleiprobe im Eiweiß 450.  
 Blut, vgl. auch Seröse Flüssigkeiten.  
 — Untersuchung 797.  
 — Bestandteile 797.  
 — Spez. Gew. 797.  
 — Farbe 798.  
 — Reaktion 799.  
 — Best. der Titrationsalkaleszenz 800.  
 — Verhalten zu Salzlösungen 798.  
 — Hämolyse 798.  
 — Gerinnung 801.  
 — — Verzögerung 802.  
 — — Aufhebung 802.  
 — — Beschleunigung 802.  
 — Blutkuchen, Serum, defibriertes Blut 802.  
 — Trennung u. Untersuchung von Plasma (Serum) und Blutkörperchen 803.  
 — Trennung 803.  
 — Isol. von Plasma 803.  
 — Isol. von Serum 804.  
 — — — in kleinen Blutmen- gen 804.  
 — Auffangen des Blutes 804.  
 — Isol. der roten Blutkörperchen 519, **804**.  
 — Untersuchung der roten Blutkörperchen 805.  
 Blut, Isol. und Untersuchung der weißen Blutkörperchen 806.  
 — — der Blutplättchen 806.  
 — Nachw. u. Best. der einzelnen Bestandteile im Blut 807.  
 — — des Blutfarbstoffs 807.  
 — Best. des Blutfarbstoffs 808.  
 — — des Fibringehaltes im Blut oder Plasma 816.  
 — Isol. von Fibrinogen 461.  
 — Best. des Fibrinogens 816.  
 — — des Plasmas, Serums und der Blutkörperchen im Blute 817.  
 — — des Sauerstoffbindungsvermögens 813.  
 — — — nach Barcroft-Haldane 814.  
 — — — nach van Slyke 814.  
 — — des Alkalibindungsvermögens 815.  
 — — der Alkalireserve 830.  
 — — des Reststickstoffs 839.  
 — Gesamtblutanalyse 820.  
 — Best. der Gesamtblut- und Gesamtblutfarbstoffmenge eines Tieres 821.  
 — — der Gesamtblutmenge beim Lebenden 823.  
 — Nachw. im Harn 758.  
 — — im Mageninhalt 906.  
 — — in Galle 913.  
 — Einzelbestandteile:  
 — Acetaldehyd, Nachw. 790, Vork. 57.  
 — Acetessigsäure, Vork. 92.  
 — Acetonkörper, Mikrobest. 847.  
 — Adrenalin, Vork. 207.  
 — Äther, Nachw. 790.  
 — Ätherlösliche Bestandteile, Best. 791.  
 — Äthylalkohol, Best. 790.  
 — Alanin, Vork. 229.  
 — Allantoin, Vork. 154, Isol. 155, 786.  
 — Ameisensäure, Vork. 62.  
 — — Nachw. u. Best. 790.  
 — Aminosäuren, Vork. 218.  
 — Ammoniak, Mikrobest. 838.  
 — Arginin, Vork. 259.  
 — Asparaginsäure, Vork. 242.  
 — Bence-Jones' Eiweißkörper, Vork. 467.  
 — Benzoesäure, Best. 724, 795.  
 — Bernsteinsäure, Nachw. **95**, 795.  
 — Bilirubin, Nachw. u. Best. 739.  
 — Blutfarbstoffe, s. diese.  
 — Buttersäure, Vork. 64.

- Blut, Einzelbestandteile:
- Calcium, Mikrobest. 827, 830.
  - Carotin, Vork. 439, Nachw. u. Best. 794.
  - Cellulose, Vork. 134.
  - Chloride, Best. 666.
  - — Mikrobest. 832.
  - Cholesterin, Vork. 323.
  - — Best. 792, Mikrobest. 848.
  - Cholesterinester, Vork. 323, 330, Nachw. 792.
  - Cholin, Vork. 195.
  - Diastatisches Ferment, Vork. 631.
  - Eisen, Best. 660.
  - — Mikrobest. 830.
  - Eiweiß, Best. 795, 818.
  - — Mikrobest. 839.
  - — Entfernung 785.
  - Essigsäure, Vork. 63.
  - Fäulnisprodukte, Best. 791.
  - Fett, Nachw. u. Best. 791, 795.
  - Fettsäuren, Best. 76, 795.
  - — Mikrobest. 848.
  - — niedrigere Abscheidung 76.
  - Fibrin und Fibrinogen, Isol. u. Best. 461, 816.
  - Gallensäuren, Isol. u. Nachw. 347, 395.
  - Glucose, Nachw. u. Best. 784, 787.
  - — Mikrobest. 844.
  - Glucuronsäuren, gepaarte, Vork. 134.
  - Glutaminsäure, Vork. 244.
  - Glycerin, Best. 790.
  - Glycerinphosphorsäure, Vork. 359.
  - Glykokoll, Vork. 225.
  - Hämatoporphyrin, s. Blutfarbstoffe.
  - Hämoglobin, s. Blutfarbstoffe.
  - Harnsäure, Vork. 169, Nachw. 782.
  - — Mikrobest. 842.
  - Harnstoff, Vork. 150.
  - — Best. 777, Mikrobest. 840.
  - Histamin, Best. 791.
  - Histidin, Vork. u. Darst. 265.
  - Homogentisinsäure, Vork. 303.
  - Indican, Best. 791.
  - Inosit, Isol. u. Nachw. 284, 795, 799.
  - Invertin, Vork. 636.
  - Isocholesterinester, Vork. 323.
- Blut, Einzelbestandteile:
- Isomaltose, Vork. 124.
  - Jecorin, Vork. 373.
  - Jod, Vork. 42.
  - Kalium, Mikrobest. 826.
  - Katalase, Isol. 645.
  - Kohlensäure, Vork. 148.
  - Kreatin, Isol. u. Nachw. 158, 795.
  - — und Kreatinin, Vork. 158, 160, Isol. 781.
  - — — Mikrobest. 841.
  - Leucin, Vork. 235.
  - Lipase, Nachw. 628.
  - Lipochrome, Vork., Nachw. u. Best. 437, 794.
  - Lutein, s. Xanthophyll.
  - Lysin, Vork. 262.
  - Magnesium, Mikrobest. 828, 829.
  - Maltase, Vork. 636.
  - Methämoglobin, Vork. 528, Best. 794.
  - Milchsäure, Isol. 84, Best. 790, Mikrobest. 849.
  - Mucoïd, Vork. 554.
  - Mucoïtinschwefelsäure 357.
  - Natrium, Best. 656, Mikrobest. 826.
  - Nuclease, Vork. 640.
  - Nucleoproteid 541.
  - Oxyhämoglobin, s. Blutfarbstoffe.
  - Oxyproteinsäuren 517.
  - Peroxydase, Vork. 645.
  - Phenole, Best. 791.
  - Phosphatide, Vork. 362, Best. 792, 794, 795.
  - Phosphorsäure, Mikrobest. 832.
  - Prolin, Vork. 277.
  - Proteasen, Vork. 622, Nachweis 624.
  - Saccharase, Vork. 636.
  - Seifen, Best. 796 Anm.
  - Serumalbumin, Isol. 452.
  - Serumglobulin, Isol. 462.
  - Stickstoff, Best. 676, 777.
  - — Mikrobest. 831.
  - Sulfate, Mikrobest. 831.
  - Trimethylamin, Vork. 190.
  - Urobilin, Vork. 429.
  - Valin, Vork. 233.
  - Xanthophyll, Vork. 437.
  - — Isol. u. Best. 794.
- Blutextravasate, Gehalt an Hämatin 399.
- — an Hämatoidin 417.
- Blutfarbstoffe, vgl. auch Hämocyanin, Hämoglobin, Kohlenoxydhämoglobin, Methämoglobin, Oxyhämoglobin.
- Blutfarbstoffe u. ihre nächsten Derivate 445, 518, 519.
- Beziehung zum Muskelfarbstoff 519.
  - zur Harnfarbe 680.
  - Spektrophotometrische Untersuchung 20.
  - Nachw. im Harn 758.
  - — in serösen Flüssigkeiten 794.
  - — in roten Blutkörperchen 820.
  - — im Blut 807.
  - — in eingetrocknetem Blut 808.
  - — in sehr kleinen Mengen eingetrockneten Blutes 808.
  - Best. im Blut 808.
  - — spektroskopisch 20, 809.
  - — colorimetrisch mit Hoppe-Seylers Doppelpipette 809.
  - — — einfacheres Verfahren 812.
  - Nachw. im Muskel 859.
  - — in Galle 913.
  - — in Faeces 938.
  - — in Sputis 898.
  - Farbstoffgruppen 397.
  - — Oxydation 270.
  - — Reduktion 272.
- Blutkörperchen, rote, Untersuchung 804.
- Bestimmung 817.
  - Trennung von Plasma (Serum) 519, 803.
  - Isolierung 803, 804.
  - Bestandteile 805.
  - Darst. des Stroma 805.
  - Eigenschaften des Stroma 805.
  - kernhaltige 805.
  - Darst. der Kernmasse 805.
  - Gewinnung von Blutfarbstoff 519.
  - Vork. von Cerebrosiden 390.
  - — von Nuclease 640.
  - — von Peroxydase 645.
  - — von Protease 622.
  - Histon 469, 806.
  - Protagonartige Stoffe 374.
  - Nucleoproteid 538.
- Blutkörperchen, weiße 806.
- Isol. u. Untersuchung 806.
  - Inosit 284.
  - Katalase 645.
  - Nuclease 640.
  - Oxydase 645.
  - Peroxydase 645.
  - Tyrosinase 647.
  - Protagonartige Stoffe 374.
- Blutplättchen, Isol. 806.
- Blutkuchen 802.

Blutplasma, Isol. 803.  
 — Untersuchung 803, s. seröse Flüssigkeiten 768,  
 — Best. im Blut 817.  
 — — des Fibrins 816.  
 Blutserum, Bestandteile und Untersuchung 768.  
 — Isolierung 804.  
 — Best. im Blut 817.  
 — Vgl. weiter „Seröse Flüssigkeiten“.  
 Blutzucker, vgl. Seröse Flüssigkeiten, Nachw. u. Best. von Zucker.  
 Böttgers Probe (Zucker) 107.  
 — im Harn 726.  
 Bohnen, grüne, Gewinnung von Inosit 284.  
 Bombicesterin 334.  
 Borsäure 47.  
 Brenzcatechin 283.  
 — Entstehung aus Glucose 117.  
 — Darst. von B. und Hydrochinon aus Harn 283.  
 Brenzcatechinschwefelsäure 283, **351**.  
 — Nachw. u. Best. im Harn 351, 720.  
 Brenztraubensäure 92.  
 — aus Keratinen 483.  
 — aus Milchsäure 87.  
 — Trennung von Milchsäure 92.  
 Brom, Vork. u. Nachw. 43.  
 — Vork. in Cornein 492.  
 Bromcarmin 443.  
 Bromcoffein 176.  
 Bromgorgosäure 302.  
 Bromhämmin 402, 404.  
 Bromlauge, für Harnstoffbestimmung 705.  
 Bromphenacylester der Fettsäuren 61.  
 Bromphenylhydrazin als Zuckerreagens 108.  
 Bromreaktion der Phenole 282.  
 — des Tryptophans 316.  
 Bromtyrosin 302.  
 Bromwasserstoff, Nachw. 43.  
 Bromxanthin 176.  
 Bronchialdrüsen, Pigment 434.  
 Brownings Taschenspektroskop 18.  
 Brückes Reagens 129, 133.  
 — — Darstellung 945.  
 Büchnersche Nutsche 5.  
 Bürzeldrüsensekret, Bestandteile und Untersuchung 930.  
 — Octadekylalkohol 53.  
 — Casein 542.  
 Bufagin 342.  
 Bufo aqua, Adrenalin 207.  
 Bufotalidin 342.

Bufotalin 341.  
 Butter, Fettsäuren 64, 67, 68, 69, 70, 72.  
 Buttersäure 64.  
 — Oxydationsprodukte 65.  
 — aus Inosit 285.  
 — aus Eiweiß 447, 486.  
 — aus Oxyhämoglobin 523.  
 — Vork. in Leber 858.  
 — Trennung von and. niederen Fettsäuren 76, 78.  
 — Nachw. im Mageninhalte 901.  
 Butylalkohol als Extraktionsmittel für Aminosäuren 560.  
 Butylamin **191**, 235.  
 Butylmercaptan 56.  
 Butyrin 101.  
 — bei Lipasebestimmung 630, 631.  
 Butyrobetain 199, 200, 214.  
 Byssus 492.  
 — Gehalt an Aminosäure 598.

## C.

Cadaverin 201.  
 — Isolierung aus faulenden Substanzen 218.  
 — Nachw. im Harn 756.  
 — — in Faeces 939.  
 — Isol. aus autolytierten Organen 869.  
 — — aus Sputis 899.  
 Calcium, Vork., Eigenschaften 37.  
 — Nachw. in Aschen 654, 655.  
 — Best. in Aschen 657.  
 — — als Sulfat 659.  
 — — als Oxyd 658.  
 — Mikrobestimmung 658.  
 — — im Blut 827, 830.  
 — Best. titrimetrisch 658, 660.  
 — Nachw. im Harn 682.  
 — Best. in eiweißhaltigem Harn 685 Anm., 687.  
 — — in Harnasche 687.  
 — Nachw. u. Best. in Harnkonkrementen 765, 766, 768.  
 — — in Speichel und Speichelnsteinen 896.  
 — Vork. in Muskel und Organen 858.  
 — — in Milch 919.  
 — — in Pankreassaft 907.  
 — Best. in Gallensteinen 917.  
 — Nachw. u. Best. in Knochen 852, 853.  
 Calciumcarbonat, Nachw. in Aschen 654.  
 — Nachw. in Harnsteinen 763, 766.  
 — u. Best. in Speichelnsteinen 896.

Calciumcarbonat, Vork. in Pankreassteinen 907.  
 — — im Speichel 894.  
 — Nachw. in Gallensteinen 917.  
 Calciumoxalat, Nachw. u. Best. in Harnsteinen und Sedimenten 764, 766, 768.  
 Calciumphosphat, Nachw. in Aschen 655.  
 — Nachw. in Harnsteinen 763.  
 — — u. Best. in Speichelnsteinen 896.  
 — Vork. in Pankreassteinen 907.  
 — — im Sperma 931.  
 — — in Nasensteinen 897.  
 — — in Milch 919.  
 — Nachw. in Gallensteinen 917.  
 Calciumsalze von Fettsäuren 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 70.  
 — — in Faeces 933.  
 — Einfluß auf Fermente 602.  
 Calciumsulfat, Nachw. in Harnsteinen 763, 765.  
 Campherol 355.  
 Camphoglucuronsäure 134, **355**.  
 Canis ochropus, Kynurensäure 321.  
 Caprinsäure 68.  
 — Trennung von Butter-, Capron-, Caprylsäure 77, 78.  
 Capronin 101.  
 d-Caprinsäure **67**, 241.  
 Caprinsäure 67.  
 — Trennung von Butter-, Capryl-, Caprinsäure 68, 77, 78.  
 — aus Eiweiß 447.  
 Caprylin 101.  
 Caprylsäure 68.  
 — Trennung von Butter-, Capron-, Caprinsäure 78.  
 Carbaminoreaktion des Glucosamins 139.  
 Carbaminosäuren, Kalksalze 224.  
 Carbonate, Nachw. im Harnsediment 766.  
 Carcinom, Pigment 434.  
 Carminfibrin 611.  
 Carminsäure 442.  
 Carnaubasäure 71.  
 Carnaubon 71, 373.  
 Carnaubylalkohol **53**, 930.  
 Carniferrin 550.  
 Carnin 185, 377.  
 — Vork. in Muskeln 857.  
 Carnitin **199**, 214.  
 — Isol. aus Muskeln und Organen 863, 866, 867.  
 Carnomuscarin 866.

- Carnosin 210.  
 — Histidinbildung 265.  
 — Isol. aus Muskeln 862.  
 — Vork. in „Histidinfraktion“ 866.  
 — Best. in Organen 877.  
 Carotin 437, 439.  
 — Nachw. u. Best. im Serum 794.  
 — Isol. aus Corpus luteum 439.  
 Carotinoide 437, 794.  
 — des MilCHFetts 918.  
 — des Serums 792.  
 Caseinsäure 249.  
 Casein 544.  
 — Vorkommen 542.  
 — Darst. aus Kuhmilch 542.  
 — — aus Frauenmilch 542.  
 — Zusammensetzung 543.  
 — Eigenschaften 543.  
 — — optische 544.  
 — Umwandlung beim Erhitzen auf 100° 544.  
 — — durch Labferment 544.  
 — — durch Pepsinsalzsäure 545, 612.  
 — — durch Trypsin 545.  
 — Hydrolyse 545.  
 — — Isol. von Polypeptiden 510, 511.  
 — Oxydation 545.  
 — — mit Kaliumpermanganat 157, 514.  
 — Einwirkung von Salpetersäure 515.  
 — Stickstoffverteilung 545.  
 — Gehalt an Aminosäuren 599.  
 — Nachw. in der Milch 922.  
 — Best. in der Milch 924, 925.  
 — Vork. in Faeces 933.  
 Caseinartiger Stoff im Hauttalg und in der Bürzeldrüse 931.  
 Caseinokyrin 504.  
 — Aufspaltung zu Peptiden 505.  
 Caseonphosphorsäure 546, siehe Polypeptidphosphorsäure.  
 Cellulose 134.  
 — Nachw. u. Best. in Faeces 937, 943.  
 Centrophorushiston 471.  
 Cephalopoden, Betaingehalt 198, 857.  
 — Tauringehalt 857.  
 Cerebrin 390  
 Cerebron 390.  
 — Trennung von Kerasin 393.  
 Cerebronsäure 90, 390.  
 Cerebroside 94, 390.  
 — Galaktosegehalt 120, 390.  
 — Best. im Gehirn 891.  
 Cerebroside, Vork. in Leber 858.  
 — der roten Blutkörperchen 390.  
 — im Eiter, Isolierung 825.  
 Cerebrospinalflüssigkeit, Cholin 195.  
 — Brenzcatechin 283.  
 — Glucose, Vork. 114.  
 Cerotinsäure 71.  
 Cerylalkohol 53, 930.  
 Cetylalkohol 52, 106.  
 Charcootsche Krystalle in Sputis 897.  
 Chenocholelsäure 340.  
 Chinesisches Wachs 53, 72, 106.  
 Chinolin aus Oxytryptophan 317.  
 — aus Kynurensäure 322.  
 Chinolinderivate 321.  
 Chinon aus Hydrochinon 284.  
 Chitin 138, 142, 277.  
 — Glucosamingehalt 138.  
 Chitopyrrol 144, 277.  
 Chitosamin, s. Glucosamin 138.  
 Chitosan 142, 144.  
 — Glucosamingehalt 138.  
 Chitose 141.  
 Chlor, Best. des Gesamtchlors 666.  
 Chlorazol, bei der Zersetzung des Eiweißes 448.  
 Chlorhämין 402, s. Hämין.  
 Chloride, Best. im Blut und Organen 666.  
 — Mikrobest. im Blut 832.  
 — Best. in Milch 927.  
 Chlormethylchinolin aus Skatol 309.  
 Chloroform, hämolytische Wirkung 798.  
 Chlorophyllan, Nachw. in Faeces 427.  
 Chlorophyllderivate 408.  
 — Beziehung zum Phylloerythrin 426.  
 — totale Reduktion 272.  
 — Übergang in Ätioporphyrin 414.  
 Chlorwasserstoff 42, s. Salzsäure  
 Cholalsäure 325, s. Cholsäure.  
 Cholansäure aus Cholesterin 324.  
 — aus Cholsäure 335.  
 — aus Desoxycholsäure 338.  
 Cholecyanin 421.  
 Choleinsäure 337, 339, s. Desoxycholsäure.  
 — Vork. in Darmsteinen 943.  
 Choleprasin 418.  
 Cholestankörper 324.  
 Cholesterin 323.  
 — Vorkommen 323.  
 — Konstitution 324.  
 Cholesterin, Zusammenhang mit Phytosterinen 323.  
 — Darst. aus Gallensteinen 324.  
 — — aus Gehirn 324.  
 — Isol. aus Geweben und Flüssigkeiten 324.  
 — Eigenschaften 325.  
 — Optische Eigenschaften 326.  
 — Verbindungen 326.  
 — Nachweis 326.  
 — Fällungsreaktionen 326.  
 — Farbenreaktionen 326.  
 — Quantitative Best. 327.  
 — Isol. aus verseiftem Fett 99.  
 — Isol. aus Talgdrüsen und ähnlichen Sekreten 931.  
 — Nachw. u. Best. in serösen Flüssigkeiten 791, 792, 795.  
 — — — in Serum und Organen 886.  
 — Best. in Muskeln 888.  
 — Mikrobest. im Blut 848.  
 — Nachw. u. Best. in Geweben 856.  
 — — — in Gallensteinen 917.  
 — — im Eiter 824, 825.  
 — — in Faeces 936.  
 — — in Galle 909, 912, 915.  
 — — im Gehirn 892.  
 — — in Harnsteinen 764.  
 — — in Knochen 852.  
 — — in Milch 922.  
 — — im Pankreassaft 907.  
 — — im Schweiß 918.  
 — — in Sperma 932.  
 — — in Sputis 897, 899.  
 — Vork. in roten Blutkörperchen 805.  
 — — in Galle 909.  
 — — in Glaskörper 893.  
 — — in Leber 858.  
 — — in Linse 892.  
 — — im Meconium 944.  
 — — in Muskel 857.  
 — — in Pankreassteinen 907.  
 Cholesterinester 329.  
 — Vorkommen 323.  
 — Darst. aus Blut 330.  
 — — aus der großen weißen Niere 330.  
 — Trennung von Cholesterin 329.  
 — Eigenschaften 330.  
 — Nachw. in serösen Flüssigkeiten 792.  
 — Isol. aus Talgdrüsen und ähnlichen Sekreten 930.  
 — Vork. in Leber 858.  
 — Best. in Serum und Organen 886.  
 — — im Muskel 888.  
 Cholesteringallensteine 916.



- Cholesterinfettsäureester **329**, 330.  
 Cholesterinkongremente im Harn 762, 764.  
 Choletelin 421.  
 Choleverdin 421.  
 Cholin 190, **195**.  
 — Eigenschaften und Verbindungen 196.  
 — Darst. aus Eidotter 195.  
 — Bildung von Neurin 197.  
 — Einwirkung auf Eiweiß 495.  
 — Trennung von anderen Basen 196.  
 — aus Phosphatiden 363.  
 — aus Lecithin 368.  
 — aus Sphingomyelin 371.  
 — Vork. in Leber 858.  
 — Isol. aus Fäulnisgemisch 227.  
 — — aus Muskel und Organen 867, 868, 869.  
 Cholohämatin (Phylloerythrin) 425.  
 Cholsäure 335.  
 — Vorkommen 335.  
 — Darst. aus Rindergalle 335.  
 — — aus Faeces 336, 937.  
 — Eigenschaften 336.  
 — Optische Eigenschaften 336.  
 — Anhydride 336.  
 — Nachweis 336.  
 — Unterschied von Desoxycholsäure 339.  
 — Nachw. von Cholsäure neben Glyko- und Taurocholsäure 347.  
 — — in Faeces 937.  
 Chondridin 358.  
 Chondrin 490.  
 Chondroalbumoid 482, 491.  
 — Nachw. im Knorpel 855.  
 Chondroitin 356.  
 Chondroitinschwefelsäure 141, **356**, 550.  
 — Darst. aus Knorpel 557, 855.  
 — Eigenschaften 357.  
 — Konstitution 356.  
 — Vorkommen 356.  
 — — in Chondrin 490.  
 — Nachweis 357.  
 — Spaltung 358.  
 — aus Glucoproteiden 555.  
 — aus Mucoiden 555.  
 — Best. u. Nachw. im Harn 725.  
 — Nachw. im Knorpel 855.  
 Chondromucoid 555.  
 — Verhalten zu Verdauungssäften 556.  
 — Beziehung zu Chondroitinschwefelsäure 356.  
 Chondromucoid, Isol. aus Knorpelgewebe 555, 855.  
 Chondrosamin 141.  
 — enthaltende Glucoproteide 550, **555**.  
 Chondrosaminsäure 141, 142.  
 Chondrosin 358.  
 Chorioidea, Farbstoff 434.  
 Chortosterin 333, s. Hippokoprosterin.  
 Chromophotometer nach Plesch 20.  
 Chrysophansäure, Harnfarbe 680.  
 Chylus, Myristinsäure 68.  
 — Fettgehalt 98.  
 — Serumalbumin 453.  
 Chymosin 625, s. Labferment.  
 Chymosin, Unterschied von Parachymosin 625, 626.  
 Chymus 932.  
 — Vork. von Polypeptiden 505.  
 Citronensäure 96.  
 — Verhalten zu Oxydasen 646.  
 — zur Verhinderung der Blutgerinnung 802.  
 — Best. in der Milch 929.  
 Clionasterin 334.  
 Clupanodonsäure 75.  
 Clupein 474, **478**.  
 Clupeon 481.  
 Clupeovin 549.  
 Coccida, Farbstoffe 442.  
 Coccinin 443.  
 Cochenille 442, s. Carminsäure.  
 Cochenillesäure 443.  
 Coffein 169, 182.  
 — Synthese aus Xanthin 176.  
 — im Harn 183.  
 Colamin 192, s. Aminoäthylalkohol.  
 Colorimeter nach Duboscq 20.  
 — nach Autenrieth-Königsberger 20.  
 Colorimetrie 20.  
 — von Blutfarbstoffen 809.  
 Colostrum 919.  
 — Glycerinphosphorsäure 359.  
 — Phosphatide 362.  
 Conalbumin 455, **458**.  
 — Stickstoffverteilung 458.  
 Conchiolin 482, **492**.  
 Conjunctivalsekret, Rhodanwasserstoff 147.  
 Convolvulin, d-Valeriansäure 67.  
 Coridin 215.  
 Corium, Kollagen 486.  
 — Mucoid 556.  
 Cornea 892, s. Hornhaut.  
 Corneamucoid **555**, 892.  
 Cornein 482, **492**, 516.  
 Cornikrystallin 492.  
 Corpora lutea, Carotin 437, **439**.  
 Crangitin 216.  
 — Isol. aus Muskeln und Organen 869.  
 Crangonin 216.  
 — Isol. aus Muskeln und Organen 869.  
 Crenilabrin 480.  
 $\alpha$ -Crotonsäure 90.  
 — aus Carnitin 200.  
 Crusta inflammatoria 803.  
 Crustaceen, Hämocyanin 532.  
 — Hemicellulase 635.  
 — Lipochrom 440.  
 — Methylamin 189.  
 — Vgl. weiter Hummer, Krabbe, Krebs.  
 Crustaceorubin 440.  
 Cryptobranchus japonicus, Methylguanidin 203.  
 Cuorin 372.  
 Cyanhämoglobin 530.  
 Cyanokrystallin 440.  
 Cyansäure 150, 152.  
 Cyanwasserstoffbildung aus Lysin 264.  
 — aus Adenin 182.  
 — bei der Zersetzung des Eiweißes 448.  
 — bei Veraschung unter Sodazusatz 654.  
 Cyclopterin 480.  
 Cyprinin 476, **479**.  
 Cypriningruppe der Protamine 476.  
 $\alpha$ -Cyprinin, Gehalt an Aminosäuren 597.  
 Cystein 251.  
 — Isaethionsäure 252.  
 Cysteinsäure 256.  
 Cystenflüssigkeit, s. Untersuchung seröser Flüssigkeiten 768.  
 — Bilirubin 417.  
 — Cholesterin 323.  
 — Hämatoïdinkrystalle 417.  
 — Methämoglobin 528.  
 Cystin 224, **252**.  
 — Vorkommen 252.  
 — — im Glutathion 513.  
 — Darst. durch Synthese 232, 252.  
 — — aus Haaren od. Horn 253.  
 — — aus Cystinsteinchen oder Harnsedimenten 253, 751.  
 — Trennung von Tyrosin 253, 751.  
 — Verbindungen 254.  
 — Eigenschaften 254.  
 — — optische 255.  
 — Nachweis 256.  
 — Oxydationen und Reduktionen 256.

- Cystin, Aminostickstoffbest. 587.  
 — Zersetzungen 255.  
 — Bildung von Methylmercaptan 56.  
 — — von Äthylsulfid 56.  
 — — von Taurin 250.  
 — — von unterschwefliger Säure 45.  
 — Schwefelbleiprobe im Eiweiß 450.  
 — Vork. im Eiweißhydrolysat 563.  
 — Best. im Eiweißhydrolysat 589.  
 — — — colorimetrisch 591.  
 — Isol. aus Eiweißhydrolysat 253, 580.  
 — Gehalt einiger Proteine daran 596—599.  
 — Isol. aus Harn 751.  
 — Best. im Harn 753.  
 — Nachw. im Harnstein 764, 766.  
 Cystinsteine im Harn 762, 764.  
 Cytidin 375, 387.  
 Cytidinphosphorsäure 387, vgl. Cytosylsäure.  
 Cytosin 164, 166, 375.  
 — Darst. aus Thymonucleinsäure 384.  
 — — aus Störtestikel 166.  
 — Eigenschaften 167.  
 — Umwandlungen 167.  
 — Nachweis 167.  
 — Vork. in „Histidinfraktion“ 579.  
 — Isol. aus autolytierten Organen 868.  
 Cytosinhexosediphosphorsäure 384.  
 Cytosinhexosephosphorsäure 384.  
 Cytosylsäure 375, 387.  
 — Gewinnung aus Hefenucleinsäure 386.
- D.**
- Dakin-Kondos Probe (Skatol) 310.  
 Darmgase, Untersuchung 940.  
 Darminhalt, Untersuchung 932.  
 — Untersuchung des Dünndarminhalts 932.  
 — — der Darmkonkremente 943.  
 — Untersuchung der Faeces 933.  
 — — des Meconiums 944.  
 Darmsaft, Untersuchung 907.  
 — Vork. von Cholin 195.  
 — — von diastatischem Ferment 632.  
 Darmsaft, Vork. von Erepsin 620.  
 — — von Glycerophosphatase 638.  
 — — von Lactase 636.  
 — — von Lipase 628.  
 — — von Nuclease 640.  
 — — von Saccharase 635.  
 Darmschleimhaut, Vork. u. Nachw. von Erepsin 620, 621.  
 — — von diastatischem Ferment 632.  
 — — von Lipase 628.  
 — — von Phosphatasen 638, 639.  
 — — von Melanin 435.  
 — — von Nuclease 382, 640.  
 — — von Reticulin 490.  
 Darmsteine 943.  
 Darmwand, Histamin 209.  
 Defibriertes Blut 802.  
 Dehydrase 643, vgl. Oxydase.  
 — der Milch 644.  
 Dehydrochloridhämין 404, 407.  
 Dehydrocholan 336.  
 Dehydrogenase 644.  
 Dehydroxybilirubin 421.  
 Dekantieren 6.  
 Denigés Probe (Citronensäure) 97.  
 — (Harnsäure) 173.  
 — (Tyrosin) 301.  
 Dentin 851.  
 Dermoidecyste, Untersuchung 930.  
 — Arachinsäure 70.  
 — Eikosylalkohol 53.  
 — Myristinsäure 68.  
 — Octadekylalkohol 53.  
 Desamidasen, s. Purindesamidasen 641.  
 Desaminoproteine 515.  
 Desaminoprotein 481.  
 Desaminoprotosäure 514.  
 Desaminosturin 480.  
 Desaminotriphosphonucleinsäure 388.  
 Descemetsche Haut, Membranin 892.  
 Desinfektionsmittel bei Fermentversuchen 602.  
 Desoxycholsäure 337.  
 — Abtrennung von Cholsäure 335.  
 — Beziehung zur Choleinsäure 337.  
 Destillation 2.  
 — fraktionierte, von Aminosäurenestern 567.  
 Deuteroalbumosen 496, 497, 498, 499, 500.  
 Deuteroelastose 486.  
 Deuteroelastose 482.  
 Deuteroelastose 482, 500.  
 Deuterosponginoase 493.  
 Dextran, tierisches 133.  
 Dextrine 132.  
 — Nachw. u. Best. in Faeces 942.  
 — Vork. im Dünndarminhalt 932.  
 Dextrin  $\alpha$  und  $\beta$  133.  
 Dextrose 114, s. Glucose.  
 Diacetylglucosamin 143.  
 Diäthylamin 191.  
 Diäthylmethylsulfoniumhydroxyd 56.  
 Dialysieren 3.  
 — von Fermentlösungen 604.  
 Diamine 200.  
 — Isol. aus Fäulnisgemischen 217.  
 — — aus autolytierten Organen 869.  
 $\alpha$ -,  $\epsilon$ -Diaminocaprinsäure 262, s. Lysin.  
 Diaminoessigsäure 257, s. Säure  $C_2H_6N_2O_2$ .  
 Diaminomonophosphatide 362, 371.  
 Diaminosäuren 257.  
 — Nachw. im Serum 783.  
 — — im Dünndarminhalt 933.  
 — Isol. neben Monaminosäuren aus der hydrolytischen Zersetzungsflüssigkeit der Proteine 574, 577.  
 — Gehalt einiger Proteine daran 597—599.  
 —  $C_2H_6N_2O_2$  von Drechsel 257.  
 Diaminosäurenstickstoff, Best. 587.  
 Diaminotrioxydodecansäure 248.  
 $\alpha$ -,  $\delta$ -Diaminovaleriansäure 257, s. Ornithin.  
 $\alpha$ -Diamylose 133.  
 Diastatisches Ferment 631.  
 — Vorkommen 631.  
 — Isolierung 632.  
 — Eigenschaften 633.  
 — Wirkung 633.  
 — Beeinflussung 633.  
 — Nachw. u. Best. 634.  
 — — im Darmsaft 908.  
 — — in Faeces 935.  
 — — in Galle 910.  
 — — im Harn 756.  
 — — im Pankreassaft 907.  
 — — im Speichel 895.  
 — Vork. im Duodenalsaft 908.  
 — — in Leber 858.  
 — — in Milch 919.  
 — — in Muskel 857.

- Diazobenzolsulfosäure, Herstellung für Diazoreagens nach Pauly 450 Anm.  
 Diazolösung nach P. Ehrlich, Herstellung 681, 793.  
 Diazoreaktion 166, 167, 168, 176, 178, 179, 211, 268, 269, 274, 275, 276, 301, 306, 307, 420, 422, 425, 429.  
 — des Eiweißes 450.  
 — im Harn 681.  
 — im Serum 793.  
 — von Bilirubin 420, 422, 793.  
 Dibenzoyllysin 263, s. Lysursäure.  
 Dibenzoylornithin 289, s. Ornithursäure.  
 Dibromindigo 441.  
 Dibromstearinsäure 73.  
 Dibromtyrosin 302.  
 Dichlordithiodilactylsäure aus Cystin 256.  
 Dickdarminhalt, s. Faeces 933.  
 Diffusion 3.  
 Digitoninfällung der Sterine 326, 328, 331, 333, 792, 886.  
 Dihydroanilin 447.  
 Diindolylmethene 433.  
 3-5-Dijodtyrosin 301, s. Jodgorgosäure.  
 Diketopiperazine 506, s. Dipeptidanhidride.  
 Dimethyläthylpyrrole 275, s. Hämopyrrol und Isohämopyrrol.  
 Dimethylamin 189.  
 Dimethylaminobenzaldehyd 275, s. Ehrlichs Aldehydreagens.  
 Dimethylaminobenzoeglucuronsäure 356.  
 Dimethyldioxypurine 169, siehe Theophyllin, Theobromin, Paraxanthin.  
 Dimethylguanidin 204, 205.  
 Dimethylpyrrolpropionsäuren 276, s. Phonopyrrolcarbon-säuren.  
 Dimethylsphingosin 395.  
 Dimethylxanthine 169, s. Dimethyldioxypurine.  
 Dinitrobenzol für Oxydasenachweis 647.  
 2, 4-Dinitrophenylverbindungen der Aminosäuren 222.  
 Dioleopalmitin 102.  
 Dioleostearin 102.  
 Dioxydiaminokorksäure 249.  
 Dioxymethylenkreatinin 159, 162.  
 3, 4-Dioxyphenylalanin 305.  
 2, 5-Dioxyphenylessigsäure 303, s. Homogentisinsäure.  
 2, 5-Dioxyphenylmilchsäure 305, s. Uroleucinsäure.  
 2, 6-Dioxyapurin 169, s. Xanthin.  
 2, 6-Dioxyuracil 164, siehe Uracil.  
 Dioxystearinsäure 73.  
 Dipeptidanhidride 506.  
 — Auftreten bei vollständiger Säurehydrolyse von Eiweiß 506, 562, 568.  
 — — bei schwacher Säurehydrolyse 506.  
 — Darst. aus stark hydrolysiertem Casein 508.  
 — Bildung aus Dipeptidestern 506 Anm.  
 Dipeptid aus Glutaminsäure und Tryptophan 511.  
 Dipeptide, Isol. aus Eiweiß 507.  
 Diphenylhydrazin als Zuckerreagens 108.  
 Diphenylmethandimethyl-dihydrazin als Zuckerreagens 111, 112.  
 Disaccharide 106, 122.  
 Distearyllecithin 368, s. Hydrolecithin.  
 Ditetraoxybutylpyrazin 139.  
 Dixanthylharnstoff 152, 701.  
 Dopaoxydase 643, 648.  
 Dorschfleisch, Kreatinin 160.  
 Dorschleberöl, Myristinsäure 68  
 Drechsels Diaminosäure 257.  
 Drehung, Untersuchung der spezifischen 24.  
 Drüsensekret von Tritonium nodosum, Asparaginsäure 242.  
 Drüsige Organe, Bestandteile 858.  
 Dünndarm, Inhalt 932.  
 — s. auch Darmsaft.  
 Duodenalsaft, Untersuchung 908.  
 — Gewinnung 908.  
 Dyslysin 336.
- E.**
- Echinodermen, Histon 472.  
 — Isoleucin 239.  
 — Prolin 277.  
 — Taurin 249.  
 Echinokokkenflüssigkeit, siehe Untersuchung seröser Flüssigkeiten 770.  
 — Inosit 284.  
 Edlbachers Probe (Tryptophan) 316.  
 — im Eiweiß 449.  
 Ehrlichs Aldehydprobe (Chondroitinschwefelsäure) 357, (Glucoproteide) 550, (Hämopyrrol) 275, (Indol) 308, (Indolessigsäure) 311, (Phonopyrrolcarbon-säuren) 276, (Tryptophan) 316, (Urobilinogen) 424.  
 Ehrlichs Aldehydprobe in Faeces 938, 943.  
 Ehrlichs Aldehydreagens, Darstellung 945.  
 Ehrlichs Diazoreagens, Darst. 681, 793.  
 Ehrlich-Neubauers Probe im Eiweiß 450.  
 Eialbumin 455, s. Ovalbumin.  
 Eidotter, Arachidonsäure 76.  
 — Carotin 439.  
 — Cerebroside 390.  
 — Cholin, Darst. 195.  
 — Glucosamin 138.  
 — Glucose 114.  
 — Glycerinphosphorsäure 359.  
 — Inosit 284.  
 — Kreatinin 160.  
 — Lecithin, Darst. 365, 366, 367.  
 — Lipochrom, s. Carotin und Lutein.  
 — Lutein 437, 438.  
 — Neuridin 213.  
 — Phosphatidgemisch 362, 372.  
 — Sphingomyelin 371.  
 — Vitellin 541, 546.  
 Eiereiweiß, Albamingehalt 146.  
 — Glucosegehalt 114.  
 — Lysalbinsäure 458.  
 — Rhamnosegehalt 113.  
 — Oxydation zu Oxyprot-sulfonsäure 514.  
 — — Bildung von Guanidin 156.  
 Eierstock, vgl. Corpora lutea.  
 Eigelblecithin, Linolsäure 74.  
 Eihäute, Substanz der E. von Hühnereiern 482, 484.  
 — — Gehalt an Aminosäuren 598.  
 — Substanz der Eihäute von Scyllium stellare 482, 484.  
 — — Gehalt an Aminosäuren 598.  
 — Substanz der Eihäute von Testudo graeca 482, 484.  
 — — Gehalt an Aminosäuren 598.  
 Eikosylalkohol 53.  
 — Isol. aus Talgdrüsen und ähnlichen Sekreten 930.  
 Eintauchcolorimeter nach Bürker 20.  
 Eintauchrefraktometer 31.  
 Eisen, Vork., Eigenschaften 38.  
 — — in Zähnen 851.

- Eisen, Vork. in Muskeln und Organen 858.  
 — Ferriionennachweis 39.  
 — Nachw. in organischen Stoffen 51.  
 — — in Aschen 655.  
 — Best. in Aschen 660.  
 — — jodometrisch nach A. Neumann 661.  
 — — oxydimetrisch 663.  
 — — colorimetrisch 663.  
 — Nachw. u. Best. in Blut 660, Mikrobest. 830.  
 — — — in Faeces 935, 940.  
 — — — in Galle 911, 914.  
 — — — in Gallensteinen 917.  
 — — — im Harn 682, 688.  
 — — — in Milch 922.  
 — — — in Muskeln und Organen 858, 870.  
 — — — in Sputis 898.  
 — Best. in Knochen 853.  
 Eisenablagerungen 436.  
 — in Zähnen 850.  
 Eisenhydroxyd, kolloidales zur Eiteiweißung 785.  
 Eisenphosphat, Nachw. u. Best. in Harnsteinen 766, 768.  
 — — in Galle 914.  
 — — in Knochen 853.  
 Eisensulfidablagerungen 437.  
 Eiter, allgemeine Eigenschaften 824.  
 — Bestandteile 824.  
 — Untersuchung 825.  
 — Trennung von Eiterserum und Körperchen 824.  
 — Nachw. im Harn 761.  
 — Bernsteinsäure, Vork. 96.  
 — Cholesterin, Vork. 323.  
 — Fettsäuren, Vork. 69.  
 — Glutarsäure, Vork. 96.  
 — Glycerinphosphorsäure, Vork. 359.  
 — Leucin, Vork. 235.  
 — Milchsäure, Best. 791.  
 — Proteasen, Vork. 615.  
 — Pyocyanin, Isol. 444.  
 Eiterkörperchen, Cerebrosid 390.  
 Eiweißstoffe 445.  
 — Übersicht 445.  
 — einfache 445.  
 — gekoppelte 445, s. Proteide.  
 — Zusammensetzung und allgemeine Eigenschaften 446.  
 — Gehalt an Glucosamin 138.  
 — Zersetzungen 447.  
 — totale Hydrolyse 560.  
 — Isol. der Aminosäuren 560 ff.  
 — Nachweis 448.  
 — Refraktometrie 775.  
 — Fällungsreaktionen 448.  
 Eiweißstoffe, Farbenreaktionen 449.  
 — Formoltitration 582.  
 — Stickstoffverteilung nach v. Slyke 587.  
 — — nach Hausmann 587.  
 — Einzelne native Eiweißstoffe 452.  
 — Umwandlungsprodukte der nativen Eiweißstoffe 445, 446, 494.  
 — Intermediäre Spaltungsprodukte 445, 447, 495.  
 — Gehalt an Aminosäuren 596 bis 599.  
 — koagulierte 445, 446, 448, 468.  
 — oxydierte 445, 514.  
 — halogensubstituierte 516.  
 — acylierte 516.  
 — methylierte 516.  
 — nitrosubstituierte 515.  
 — desamidierte 515.  
 — Abscheidung aus Flüssigkeiten 448, 450.  
 — — aus Serum 773.  
 — — aus Blut 826.  
 — Entfernung aus Harn 681.  
 — des Bindegewebes, Nachw. 856.  
 — des Bluts, Best. 795, 807.  
 — des Colostrums 919.  
 — des Dünndarminhalts 932.  
 — der Faeces, Vork. 933, Nachweis 935.  
 — der Galle, Nachw. 913.  
 — des Gehirns, Isol. u. Nachw. 889.  
 — des Glaskörpers 893.  
 — des Harns, Nachw. 746, 747.  
 — — Bestimmung 748.  
 — des Humor aqueus 893.  
 — der Knochen, Nachw. u. Isol. 852.  
 — des Knochenmarks, Nachw. 854.  
 — der Leber 858.  
 — der Linse 892.  
 — des Mageninhalts, Nachw. 906.  
 — der Milch, Nachw. u. Best. 918, 919, 923.  
 — des Muskels, Isol. 857.  
 — des Pankreassafts 907.  
 — des Schweißes 918.  
 — des Sekrets der Talgdrüse 930.  
 — des Serums, Nachw. 771.  
 — — Bestimmung 795.  
 — — Mikrobestimmung 839.  
 — des Speichels 893, 895.  
 — des Sputums 897, Best. 898.  
 — des Spermas 931, 932.  
 Eiweißstoff von Bence-Jones 467.  
 — — Gehalt an Aminosäuren 596.  
 Elaidinsäure 73.  
 Elastin 482, 485.  
 — Gehalt an Aminosäuren 598.  
 — Isol. von Polypeptiden 505, 507, 508, 509, 510.  
 — Nachw. in Bindegewebe 856.  
 — Isol. aus Bindegewebe 485.  
 Elastinpepton 486.  
 Elastosen 485.  
 Eledone moschata, Arginin 259.  
 — Isol. der Basen 864.  
 Eledonin, Isol. 868.  
 Elefantenhaut, Gehalt an Aminosäuren 597.  
 Elektrolyt. Nachw. von Kupfer und Blei 41.  
 Elemente, Atomgewichte 946.  
 Ellagsäure, Vork. in Bezoarsteinen 944.  
 Elution von Fermenten 605.  
 Empirische Lösungen 10.  
 Emulsin, Spaltung von gepaarten Glucuronsäuren 353.  
 — — von Milchzucker 127.  
 Emulsion von Fett 99.  
 Endotryptase der Hefe, Verhalten zu Protaminen 481.  
 Enterokinase 615.  
 — im Darmsaft 908.  
 Enzyme, s. Fermente 600.  
 Epidermis, s. Haut.  
 Epidermisschuppen, Cholesterinester 324.  
 Epiguanin 169, 182, 184.  
 — Darst. aus Harn 186.  
 — Trennung von Adenin, Hypoxanthin und Paraxanthin 187.  
 Epinephrin, s. Adrenalin.  
 Episarkin 182, 185.  
 Epithellager, Globuline 892.  
 Erdalkalimetalle 37.  
 Erepsin 620.  
 — Isolierung 621.  
 — Wirkung 621.  
 — Nachweis 621.  
 — — im Harn 756.  
 — — in Faeces 935.  
 — im Darmsaft 908.  
 — Verhalten zu Polypeptiden 505.  
 — — zu Protaminen 476, 481.  
 — — zu Deuterokeratose 500.  
 — — zu Histon aus Thymus 471.  
 — Verhalten zu Desaminoproteinen 515.  
 — — zu Amyloid 557.  
 Erucasäure 73.

Erythroextrin 132.  
 Erythronsäure aus Glucose 117.  
 Erythroprotein 441, siehe Sepurpur.  
 Esocin 478.  
 Essigsäure 60, 63.  
 — Trennung von anderen Fettsäuren 78.  
 — Nachw. im Mageninhalt 901.  
 — — im Dünndarminhalt 932.  
 — aus Eiweiß durch Zersetzung 447.  
 — Verhalten des Harns zu E. 725.  
 Estermethode von E. Fischer 560.  
 — Hydrolyse 560.  
 — Fraktionierung mit Butylalkohol nach Dakin 561.  
 — Verarbeitung des in Butylalkohol Löslichen 562, 563.  
 — Herstellung der Esterchlorhydrate 564, 566.  
 — — der freien Ester 565, 567.  
 — Fraktionierte Destillation der Ester 567.  
 — Verarbeitung der Einzelaktionen 569.  
 — Isol. der Dicarbonsäuren 574.  
 Esterzahl 103.  
 Euglobulin 463.  
 Euglobulin aus Serumalbumin 454.  
 Euxanthinsäure 135, 353, 355.  
 Euxanthon 135.  
 Euxanthonglucuronsäure 135, s. Euxanthinsäure.  
 Excretin 332, s. Koprosterin.  
 Exkrement, s. Faeces 933.  
 Exsiccator 6.  
 Exspirationsluft, Aceton 59.  
 — Kohlendioxyd 148.  
 Exsudate, Untersuchung, siehe seröse Flüssigkeiten 768.  
 — Aminosäuren, Vork. 218.  
 — Fibrinogen, Vork. 461.  
 — pleuritische (Serosamucin) 557.  
 Extrahieren 2.  
 Extrakte, Herstellung für Fermentversuche 604.  
 Extraktionsapparat nach Dakin für Aminosäuren 561.  
 Extraktivstoffe des Muskels, vgl. Fleischextrakt.  
 — — Isolierung 860, 864, 868.  
 — der Milch, Best. des Stickstoffgehalts 928.  
 — des Serums, Best. 795.  
 Extravasate, Methämoglobin 528.

## F.

Faeces, Untersuchung 933.  
 — Allgemeine Eigenschaften 934.  
 — Herstellung lufttrockner F. 940.  
 — Best. des Trockenrückstandes 940.  
 — — des Gesamtstickstoffs 940.  
 — — der einzelnen Aschenbestandteile 940.  
 — — des Nucleinbasenstickstoffs 941.  
 — Darmkonkremente, Darmsteine 943.  
 — Meconium 944.  
 — Nachw. anorganischer Stoffe 934.  
 — — von Schwefelwasserstoff 939.  
 — Organische Einzelbestandteile:  
 — Adenin, Vork. 180.  
 — Aminosäuren, Vork. 218.  
 — Ammoniak, Nachw. 939.  
 — Amylum, Nachw. 937.  
 — — Bestimmung 942.  
 — Bilirubin, Nachw. 938.  
 — Blutfarbstoff, Nachw. 938.  
 — Buttersäure, Vork. 64.  
 — Cadaverin, Isol. u. Nachw. 203, 939.  
 — Caprinsäure, Vork. 68.  
 — Capronsäure, Vork. 67.  
 — Caprylsäure, Vork. 68.  
 — Cellulose, Nachw. u. Best. 937, 942.  
 — Chlorophyllderivate 427.  
 — Cholesterin, Nachw. 936.  
 — Dextrine, Nachw. u. Best. 937, 942.  
 — 1, 1-Dimethylguanidin, Vorkommen 204.  
 — Eiweißstoffe, Nachw. 935.  
 — Essigsäure, Vork. 306.  
 — Fermente, Nachw. 935.  
 — Fett, Nachw. u. Best. 936, 942.  
 — Fettsäuren, flüchtige, Nachweis 936.  
 — — höhere, Nachw. u. Best. 936, 942.  
 — Gallenfarbstoff, s. Bilirubin.  
 — Gallensäuren, Vork. 335.  
 — — Nachw. 937.  
 — Glucose, Vork. 114.  
 — — Nachw. 936.  
 — Guanin, Vork. 176.  
 — — Best., s. Nucleinbasenbestimmung.  
 — Hämatoporphyrin, Vork. 407.

Faeces, Histamin, Vork. 209.  
 — Hypoxanthin, Vork. 178.  
 — Indol, Vork. 306.  
 — — Nachw. 936.  
 — Isobuttersäure, Vork. 65.  
 — Isovaleriansäure, Vork. 66.  
 — Koproporphyrin, Nachw. 415.  
 — Koprosterin, Isol. 332.  
 — Leucin, Nachw. 939.  
 — Methylmercaptan, Vork. 56.  
 — Milchsäure, Vork. 83.  
 — — Nachw. 939.  
 — Nucleinbasen, Nachw. 935.  
 — Ölsäure, Vork. 72.  
 — Oxalsäure, Vork. 93.  
 — Oxysäuren, aromatische, Nachw. 936.  
 — Palmitinsäure, Vork. 69.  
 — — Nachw., s. Fettsäuren.  
 — Phenole, Nachw. 936.  
 — Phosphatide, Nachw. 939.  
 — Putrescin, Vork. u. Isol. 201, 203.  
 — — Nachw. 939.  
 — Skatol, Vork. u. Nachw. 308, 936.  
 — Stärke, Nachw. u. Best. 937, 942.  
 — Stearinsäure, Vork. 69.  
 — — Nachw., s. Fettsäuren.  
 — Tyrosin, Vork. u. Nachw. 296, 939.  
 — Urobilin, Nachw. 937.  
 — — Isol. 430.  
 — Urobilinogen, Nachw. u. Best. 938, 943.  
 — Xanthin, Vork. 175.  
 — Zucker, Nachw. 936.  
 Fällungsanalyse 12.  
 Faltenfilter 4.  
 Fäulnisbasen, siehe Ptomaine 212.  
 Fäulnisprodukte, Isol. nach E. und H. Salkowski (ohne Berücksichtigung der Ptomaine) 319.  
 — Best. im Blut 791.  
 Farbstoffe, anorganische 436.  
 — organische 397.  
 — Farbstoffgruppe der Blutfarbstoffe 397.  
 — — Hämochromogen 397.  
 — — Hämatin 399.  
 — — Hämin 402.  
 — — Hämatoporphyrin 407.  
 — — Reduzierte Porphyrine 411.  
 — — Uroporphyrin 414.  
 — — Koproporphyrin 415.  
 — Blutfarbstoffe 519.  
 — — Oxyhämoglobin 519.  
 — — Hämoglobin 523.

- Farbstoffe, Blutfarbstoffe:  
 Kohlenoxydhämoglobin 526.  
 — — Methämoglobin 527.  
 — — Weitere Umwandlungsprodukte 530.  
 — — Hämocyanin 531.  
 — — Best. im Blut 808.  
 — — Nachw. im Blut 807.  
 — — — in Faeces 938.  
 — — — im Harn 758.  
 — — — in serösen Flüssigkeiten 794.  
 — — — in Sputis 898.  
 — — — im Muskel 859.  
 — — — in Galle 913.  
 — — Untersuchung mit dem Spektralapparat 19, 525.  
 — Gallenfarbstoffe 417.  
 — — Bilirubin 417.  
 — — Urobilinogen 423.  
 — Verwandte Farbstoffe 425.  
 — — Phylloerythrin 425.  
 — — Nachw. im Harn 757.  
 — — — in Galle 910, 913.  
 — — — in Gallensteinen 917.  
 — — — im Dünndarminhalt 933.  
 — — — in Faeces 938.  
 — — — im Meconium 944.  
 — — — u. Best. im Serum 793.  
 — Harnfarbstoffe 427:  
 — — Urochrom 427.  
 — — Urobilin 429.  
 — — Uroerythrin 431.  
 — — Urorosein 433.  
 — — Nephrorosein 433.  
 — — Nachw. im Harn 756.  
 — Braune und schwarze Pigmente 434.  
 — — Melanine 434.  
 — — Melanoidine 436.  
 — Lipochrome 437.  
 — — Lutein aus Eigelb 438.  
 — — Carotin 439.  
 — — Weitere Lipochrome 440.  
 — — Nachw. im Serum 794.  
 — Andere Farbstoffe:  
 — — Schneckenpurpur 441.  
 — — Schildlausfarbstoffe 442.  
 — — Sehpurpur 444.  
 — — Turacin 444.  
 — — Pyocyanin 444.  
 Federn, Kieselsäure 47.  
 — Cholesterinester 324.  
 — Pigment 434, 444.  
 — Keratin 482, 597.  
 Fehlingsche Lösung, Titration von Zucker im Harn 729.  
 — Herstellung der Lösung 729.  
 Fehlings Probe, s. Trommers Probe 106.  
 Fellensäure 341.  
 Fermente, Allgemeines 600.  
 — Definition 600.  
 — Einteilung 600.  
 — Eigenschaften 600.  
 — — kolloidale 600.  
 — Einfluß äußerer Faktoren 601.  
 — Antifermente, Kofermente, Kinasen 602.  
 — Profermente 602.  
 — Arbeiten mit Fermenten 602.  
 — Einzelfermente 606.  
 — Pepsin 606.  
 — Trypsin 614.  
 — Erepsin 620.  
 — Proteolytische F. der Gewebe 621.  
 — Labferment 625.  
 — Lipase 628.  
 — diastatisches 631.  
 — der Polysaccharide 635.  
 — der Disaccharide 635.  
 — Invertin, Maltase, Lactase 636.  
 — Arginase 637.  
 — Phosphatasen 637.  
 — Nuclease 639.  
 — auf Purinbasen wirkende 641.  
 — uricolytisches 642.  
 — oxydierende und reduzierende 642.  
 — der Melaninbildung 647.  
 — Vork. im Serum 622, 769.  
 — — in roten Blutkörperchen 805.  
 — — in Blutplättchen 807.  
 — — im Eiter 623, 824.  
 — — in Galle 910.  
 — — in Leber 858.  
 — — in Milch 919.  
 — — im Meconium 944.  
 — — im Muskel 857, 858.  
 — Nachw. im Harn 756.  
 — — im Serum 624.  
 — — im Speichel 895.  
 — — im Mageninhalt 904.  
 — — im Pankreassaft 907.  
 — — im Darmsaft 908.  
 Ferratin 540, s. Nucleoproteid der Leber.  
 Ferrihydroxyd in Leber 436.  
 Ferriphosphat, s. Eisenphosphat.  
 Ferrocyanwasserstoff, Eiweißprobe 448.  
 Fett, Allgemeines 97.  
 — Isol. aus Geweben und Flüssigkeiten 98.  
 Fett, Emulgierung 99.  
 — Abtrennung von Fettsäuren, Phosphatiden, Cholesterin 99.  
 — Glyceride, Isol. 101.  
 — Isol. von Cholesterin aus verseiftem 792, 796, 886.  
 — Säurezahl 102.  
 — Verseifungszahl 103.  
 — Köttstorfersche Zahl 103.  
 — Jodzahl 103.  
 — Wasserstoffzahl 104.  
 — Esterzahl 103.  
 — Hehnersche Zahl 103.  
 — Reichert-Meißlsche Zahl 103.  
 — Hüblsche Jodzahl 103.  
 — Verseifung 99, 104.  
 — Lipochromgehalt 437, 440.  
 — Glycerinbestimmung 105.  
 — Vork. in Darmsteinen 943.  
 — — in Eiter 824.  
 — — im Glaskörper 893.  
 — — in Leber 858.  
 — — in Linse 892.  
 — — im Meconium 944.  
 — — in Pankreassaft 907.  
 — — in Pankreassteinen 907.  
 — — in Schweiß 918.  
 — — in Sputis 897.  
 — Nachw. im Bindegewebe 856.  
 — — im Eiter 825.  
 — — u. Best. in Faeces 936, 942.  
 — — — in Galle 912, 915.  
 — — — in Knochen 852, 854.  
 — — — in Milch 922, 924, 925, 926.  
 — — — — nach Soxhlet 926, Tabelle 952.  
 — Best. in Muskeln und anderen Organen 885.  
 — Nachw. im Sperma 931.  
 Fettgemenge, Untersuchung auf seine Bestandteile 99, 105.  
 Fettgewebe, Lipochrom 437, 440.  
 — Lipase 628.  
 Fettkonkremente im Harn 762, 764.  
 Fettsäuren 60.  
 — gesättigte, Vork. und allgemeine Eigenschaften 61.  
 — ungesättigte 72.  
 — Trennung von Butter-, Capron-, Capryl- u. Caprinsäure 77.  
 — Trennung von Palmitin-, Stearin- und anderen gesättigten höheren 81.

- Fettsäuren, Abscheidung der niederen 76.  
 — — der höheren 79.  
 — Trennung der höheren gesättigten und ungesättigten F. aus einem Fettsäuregemisch 79.  
 — — von Fett 99.  
 — des Butterfetts 918.  
 — Isol. aus verseiften Fetten 105.  
 — — aus Fäulnisgemisch 320.  
 — — aus Organen 76, 860.  
 — Vork. in Darmsteinen 943.  
 — — im Dünndarminhalt 932.  
 — — im Eiter 824.  
 — — in Leber 858.  
 — — in Muskel 857.  
 — — in Pankreassteinen 907.  
 — — als Ester im Talgdrüsensekret 930.  
 — — im Sputum 897.  
 — — im Schweiß 918.  
 — Nachw. u. Best. im Harn 718.  
 — — — im Mageninhalt 900, 901, 906.  
 — — — in Galle 915.  
 — — — in Faeces 936, 942.  
 — — — in Muskeln und anderen Organen 885.  
 — Mikrobest. im Blut 848.  
 Fibrin 462, 468.  
 — für Pepsinnachweis 610.  
 — für Trypsinnachweis 618.  
 — Spaltung durch Pepsin 613.  
 — Best. des Gehaltes im Blut oder Plasma 816.  
 Fibrinferment 462, 468, 801.  
 Fibrinoglobulin 462.  
 — Verunreinigung mit Fibrinogen 461.  
 Fibrinogen 461, 468, 801.  
 — Eigenschaften 462.  
 — Spaltungen 462.  
 — Gerinnung 462.  
 — Verunreinigung mit Fibrinoglobulin 461.  
 — Gehalt an Aminosäuren 596.  
 — Nachw. u. Best. in serösen Flüssigkeiten 772, 775.  
 — Best. refraktometrisch 816.  
 — Nachw. im Knochenmark 854.  
 Fibrinoplastische Substanz 462, s. Serumglobulin.  
 Fibrinokyrin 505.  
 Fibroin 482, 491.  
 — Gewinnung von Polypeptiden 505, 507, 508.  
 — Gehalt an Aminosäuren 598.  
 Fichtenspanreaktion 96, 275, 279, 280, 309.  
 Filterplatten nach Witt 5.  
 Filtrieren 4.  
 Fischbein, Pigment 434.  
 — Gehalt an Aminosäuren 597.  
 — Keratin 482.  
 Fischblase, Guanin 176.  
 — Kollagen 487 Anm.  
 Fischeierschalen, Elastin 485.  
 H. Fischers Probe (Koprotophyrin) 417, 939.  
 Fischfett, Fettsäuren 68, 69, 72, 73, 74, 75, 76.  
 Fischfleisch, Bestandteile 857.  
 — Alanin 229.  
 — Aminosäuren 857.  
 — Arginin 259.  
 — Betain 198.  
 — Histidin 265.  
 — Leucin 235.  
 — Lysin 262.  
 — Methylguanidin 203.  
 — Prolin 277.  
 — Taurin 857.  
 — Tryptophan 313.  
 — Tyrosin 857.  
 Fischleberöle, Spinacen und Squalen 322.  
 Fischrogen, Ichthuline 547, 548, 549.  
 — Mucin 558.  
 — Percaglobulin 465.  
 — Taurin 249.  
 — Trimethylamin 190.  
 Fischeschuppen, Guanin 176.  
 — Ichthylepidin 486, 598.  
 — Glutin 488.  
 — Kollagen 486.  
 Fischsperma, vgl. auch Lachs-sperma und Heringssperma.  
 — Untersuchung 932.  
 — Cerebrosid 390.  
 — Histone 469.  
 — Nucleoprotamin 534.  
 — Protamin 469, 474.  
 — Sphingomyelin 371.  
 — Thymonucleinsäure 379.  
 Fleisch und Fleischextrakt, vgl. auch Muskel, Untersuchung.  
 —  $\alpha$ -Alanin 229.  
 —  $\beta$ -Alanin 192.  
 — Ameisensäure 62.  
 — Aminosäuren 857.  
 — Äthylalkohol, Isol. 869.  
 — Base  $C_6H_{14}N_2O_2$  213.  
 — Bernsteinsäure 94.  
 — Betain 196, 857.  
 — Buttersäure 64.  
 — Carnin 185.  
 — Carnitin 199.  
 — — Isolierung 863.  
 — Carnosin 210, 862.  
 — Cholesterin 857.  
 Fleisch und Fleischextrakt, Diastase 857.  
 — Dipeptidanhydrid 506.  
 — Essigsäure 63.  
 — Fumarsäure 96.  
 — Glucose 114.  
 — Glutathion 511, 857.  
 — Glycerinphosphorsäure 359.  
 — Glykogen 128.  
 — Glykokoll 225.  
 — Glutaminsäure 244.  
 — Harnstoff 150.  
 — Histamin 209.  
 — Homobetain 199.  
 — Ignotin 210, 215.  
 — Inosinsäure 376.  
 — Inosit 284, 857.  
 — Katalase 645.  
 — Kreatin, Darst. 158.  
 — Kreatinin 160.  
 — Kreatosin 215.  
 — Lactacidogen 358.  
 — — Ferment 638.  
 — Lipase 857.  
 — Maltose 857.  
 — Methylguanidin 203.  
 — d-Milchsäure 84.  
 — Mirgelin, Isol. 215, 867.  
 — Myokinin 200.  
 — Neosin 214.  
 — Neurin 197.  
 — Novain 199.  
 — Oblithin 200.  
 — Oxalsäure 93.  
 — Phosphatide 857.  
 — Phosphorfleischsäure 550, 857.  
 — Proteasen 622, 857.  
 — Purinbasen 857.  
 — Purinfermente 858.  
 — Taurin 249.  
 — Trimethylamin 190.  
 — Trimethylaminoxid 191.  
 — Vitiatin 205.  
 Fleischextrakt, Isol. von Kreatin, Kreatinin, Nucleinbasen, Milchsäure, Taurin, Inosit 860.  
 Fleischmilchsäure 84, s. Milchsäure.  
 Fleischsäure 502.  
 Fliegenpilz, Muscarin 197.  
 Florences Spermaprobe 196.  
 Flüssigkeiten, Best. des spez. Gew. 15.  
 — — des Brechungsindex 31.  
 — — des Siedepunkts 17.  
 — Eindampfen 1.  
 Fluorescenz, Untersuchung 33.  
 — Reaktion auf Gallensäuren 336, 912.  
 Fluornatrium, Aufhebung der Gerinnung 802.

- Fluorwasserstoff, Vork., Eigenschaften 43, Nachw. 43.  
 — Nachw. u. Best. in Knochen und Zähnen 851, 853.  
 Folin-Denis Probe (Harnsäure) 173, (Oxyprolin) 280, (Oxytryptophan) 317, (Phenole) 282, (Tryptophan) 316, (Tyrosin) 301.  
 Formoltitration 225, **582**, 584.  
 — für Fermentstudien 614, 619.  
 — im Harn 755.  
 Formylhämin 402.  
 Fosses Probe (Harnstoff) 152, 701.  
 Fraktionierung von Aminosäurenestern 567.  
 Frauenmilch, Untersuchung 919, 920, 921, 923, 924, 925.  
 Fraunhofersche Linien 19.  
 Froscheier, Galaktosegehalt 120.  
 — Ranovin 549.  
 Frommers Probe (Aceton) 60.  
 Fruchtzucker, Eigenschaften 119.  
 — Vorkommen 119.  
 — Verbindungen 119.  
 — optische Eigenschaften 120.  
 — Nachweis 120.  
 — — im Harn 734.  
 — Unterscheidung von Aldosen 107, 734.  
 — Ammoniakderivate 139.  
 Fruchtwasser 154.  
 Fructose 119, s. Fruchtzucker.  
 Fumarase 644, 645, 646.  
 Fumarsäure 96.  
 — Vork. im Muskel 857.  
 — Oxydation im Muskel 646.  
 — bei der Zersetzung des Eiweißes 448.  
 Fundusdrüsen, Pepsinsekretion 606.  
 Furfurol aus Eiweiß 447.  
 — aus Glucuronsäure 108, 354.  
 — aus Inosit 285.  
 — aus Pentosen 108.  
 — aus Thyminosäure 384.  
 Furfurolprobe 108, 354, 388.  
 Fuscine 435.
- G.**
- Gadenin 214.  
 Gadoleinsäure 73.  
 Gadushiston 471.  
 — Gehalt an Aminosäuren 596.  
 Gärungsmilchsäure 83.  
 Gärungsprobe 107.  
 — Traubenzuckernachweis im Harn 727.
- Gärungsprobe, Traubenzuckerbest. im Harn durch volumetrische Messung der Kohlensäure 733.  
 — — durch Abnahme des spez. Gew. 733.  
 — durch Best. der Kohlensäure als Gewichtsverlust 733.  
 — zur Zuckerbest. im Serum 787.  
 — bei Mageninhalt 906.  
 — bei Faeces 940.  
 Galaktosamin 141.  
 d-Galaktose 120.  
 — Trennung von Traubenzucker 121.  
 — aus Cerebrosiden 390, 395, 397.  
 Galaktosazon 121.  
 Galle, Untersuchung 908.  
 — normale, Bestandteile 909, 911.  
 — pathologische, Bestandteile 910, 913.  
 — Verhalten zu Alkohol 910.  
 — — zu Salzen 910, 911.  
 — — zu Säuren und Alkalien 910.  
 — Fäulnis 911.  
 — Best. des Trockenrückstandes 913.  
 — — des Gesamtstickstoffs 914.  
 — — des Ammoniaks 914.  
 — — einzelner Aschenbestandteile 914.  
 — quantitative Analyse 914.  
 — anorganische Bestandteile, Nachw. u. Best. 911, 913.  
 — organische Bestandteile:  
 — Ätherschwefelsäure, Best. 915.  
 — Aminosäuren, Nachw. 913.  
 — Bilirubin, Nachw. 913.  
 — Blut, Nachw. 913.  
 — Cholesterin, Nachw. 912.  
 — Cholsäure, Isol. 335.  
 — diastatisches Ferment, Vorkommen 632.  
 — Eiweiß, Nachw. 911.  
 — Essigsäure, Vork. 63.  
 — Fett, Nachw. 912.  
 — Gallenfarbstoff, Nachw. 913  
 — Gallensäuren, Isol. 343.  
 — — Nachw. u. Best. 912, 914, 915.  
 — Gallenschleim, Nachw. 911, 914.  
 — Glucose, s. Zucker.  
 — Glucoproteid, Nachw. 911.  
 — Glykocholsäure, Best. 914, 915.
- Galle, Glykocholsäure, Isolierung 342.  
 — Harnstoff, Nachw. 912.  
 — Milchsäure, Isol. 84.  
 — Myristinsäure, Vork. 68.  
 — Nuclealbumin, Vork. 549.  
 — Ölsäure, Vork. 72.  
 — Oxalsäure, Vork. 93.  
 — Palmitinsäure, Vork. 69.  
 — Phosphatide, Nachw. 912.  
 — Phosphorprotein, Nachw. 911.  
 — Phylloerythrin, Darst. 426.  
 — Propionsäure, Vork. 64.  
 — Stearinsäure, Vork. 69.  
 — Taurin, Isol. 250.  
 — Taurocholsäure, Isol. 345.  
 — — Bestimmung 914, 915.  
 — Urobilin, Nachw. 913.  
 — Zucker, Nachw. 913.  
 — Nachw. im Mageninhalt 905.  
 — kristallisierte G. von Plattner 343.  
 — der Selachier, Harnstoffgehalt 150.  
 Gallenfarbstoffe 417.  
 — Harnfarbe 680.  
 — Nachw. im Harn 757.  
 — — in serösen Flüssigkeiten 793.  
 — — im Mageninhalt 905.  
 — — in der Galle 910, 913.  
 — — in Gallensteinen 917.  
 — — in Faeces 938.  
 — — im Dünndarminhalt 933.  
 — — im Meconium 944.  
 — Isol. aus Serum 419.  
 — s. auch Bilirubin.  
 Gallensäuren 334.  
 — gepaarte 334, **342**.  
 — hämolytische Wirkung 798.  
 — Trennung von Phosphatiden 916.  
 — Nachw. und annähernde Best. im Harn 760.  
 — — in serösen Flüssigkeiten **347, 795**.  
 — — im Mageninhalt 336, **343, 905**.  
 — — in Faeces 937.  
 — — u. Best. in Galle 912, 914, 915.  
 — Vork. in Darmsteinen 943.  
 — — im Dünndarminhalt 932.  
 — — im Meconium 944.  
 Gallenschleim, Nachw. u. Best. in der Galle 911, 914.  
 Gallensedimente 916.  
 Gallensteine 916.  
 — Verarbeitung auf Cholesterin 324.  
 — — auf Bilirubin 417.  
 — Vork. in Faeces 943.



- Gallensteine, qualitative Untersuchung 917.  
 — quantitative Untersuchung 917.  
 — stearinsaurer Kalk 69.  
 — Carotin, Vork. 437, 439.  
 Gallois' Probe (Inosit) 286.  
 Gallussäure 306.  
 Gase, Nachweis im Magen 906.  
 — — im Darm 940.  
 Gastropoden, Tauringehalt im Muskel 857.  
 — Hemicellulase 635.  
 Gehirn 888.  
 — Bestandteile 888.  
 — Isol. u. Nachw. der anorganischen Salze 889.  
 — — — der Proteine 889.  
 — Trennung einzelner Gruppen organischer Stoffe 890.  
 — Alkohol, Vork. 51.  
 — Arginin, Vork. 259.  
 — Amyloid, Vork. 558.  
 — Arachidonsäure, Vork. 76.  
 — Bernsteinsäure, Vork. 94.  
 — Cerebroside, Isol. u. Nachw. 390, 891.  
 — — Bestimmung 891.  
 — Cholesterin, Isol. u. Nachw. 323, 324, 891.  
 — — Bestimmung 892.  
 — Cholin, Vork. 195.  
 — Cytosin, Vork. 166.  
 — Fermente, Vork. 622, 639.  
 — Glycerinphosphorsäure, Vorkommen 359.  
 — Harnstoff, Isol. u. Nachw. 777, 891.  
 — Inosit, Isol. u. Nachw. 284, 891.  
 — Kephalin, Isol. u. Nachw. 362, 369, 891.  
 — Keratingehalt 484.  
 — Kreatin, Isol. u. Nachw. 158, 860, 891.  
 — Lecithin, Isol. u. Nachw. 362, 368, 891.  
 — Linolsäure, Vork. 74.  
 — Milchsäure, Isol. u. Nachw. 84, 861, 891.  
 — Myristinsäure, Vork. 68.  
 — Neurokeratin, Isol. u. Nachweis 484, 890.  
 — Neuridin, Vork. 213.  
 — Nucleoproteide, Isol. u. Nachw. 540, 890.  
 — Oxycholesterin, Vork. 331.  
 — Phosphatide 362, 368, 370, 891.  
 — Protagon, Isol. und Nachw. 391, 891.  
 — Serin, Vork. 231.  
 Gehirn, Spingomyelin, Isol. und Nachw. 371, 891.  
 — Uracil, Vork. 168.  
 Gelatine 487, s. Glutin.  
 Gelatinepepton 489.  
 Gelatose 489.  
 Gepaarte Gallensäuren 324, 342.  
 — Glucuronsäuren 281, 353.  
 — Schwefelsäuren 349.  
 Gerhardts Probe auf Acetessigsäure 738.  
 Gerinnung von Fibrinogenlösung 462.  
 — von Blut 801.  
 — von Milch 921.  
 — von Eiweiß, s. Koagulation.  
 Gerontin 213, s. Cadaverin.  
 Gespinnstfaser, Fibroin 491.  
 Gewebe, elastisches 540.  
 Gewebnucleoprotein 540.  
 Gewebsoxydasen 645, 646.  
 Gewebsproteasen 621.  
 Gewicht, Best. des spez. Gew. von Flüssigkeiten 15.  
 — — — von Blut 797.  
 — — — von Serum 769.  
 — — — von Milch 920.  
 — spez. Tabellen 947.  
 Gewichtsanalyse 8.  
 Gewichtskonstanz 7.  
 Glaskörper, Untersuchung 893.  
 — Harnstoff 150.  
 — Mucoid 555, 893.  
 Gliadin, Isol. von Polypeptiden 505, 507.  
 Globin 397, 473, 533.  
 — Stickstoffverteilung 474.  
 — Gehalt an Aminosäuren 596.  
 Globinokyrin 505.  
 Globuline 445.  
 — allgemeine Eigenschaften 446, 459.  
 — Zusammensetzung 446.  
 — einzelne 460.  
 — Myosin 460.  
 — Fibrinogen 461.  
 — Serumglobulin 462.  
 — Glutolin 464.  
 — Percaglobulin 465.  
 — Ovoglobulin 465.  
 — Lactoglobulin 465.  
 — krystallisierendes, aus Harn 465.  
 — der Krystallinse 466.  
 — Thyreoglobulin 466.  
 — Vork. im Pankreassaft 907.  
 — — im Colostrum 920.  
 — Nachw. im Knochenmark 854.  
 — — in Tränen 897.  
 — — u. Best. im Harn 748.  
 — — in serösen Flüssigkeiten 774, 776.  
 Globuline, Nachw. in Milch 922.  
 — Best. in Milch 924, 925.  
 Glucoheptosazon 120.  
 Glucoproteide 445, 550.  
 — Gehalt an Glucosamin 138, 550.  
 — — an Chondrosamin 141, 550.  
 — Einteilung 550.  
 — Nachw. in serösen Flüssigkeiten 772.  
 — — im Speichel 895.  
 — — in Galle 911.  
 — — im Magen 906.  
 — — im Knochenmark 854.  
 — — in Faeces 935.  
 — — im Knorpel 855.  
 — — im Bindegewebe 856.  
 — s. auch Mucine und Mucoide.  
 Glucosamin, Vork. 138.  
 — Darst. aus Hummerschalen 138.  
 — — aus Mucoitinschwefelsäure 357.  
 — aus Sputum oder Submaxillarmucin 138, 146.  
 — Eigenschaften 139.  
 — optische Eigenschaften 140.  
 — Verhalten zu Alkalien, Reduktionsvermögen 139.  
 — Verbindungen 140.  
 — Oxydationsprodukte 140.  
 — Nachweis 141.  
 — aus Conalbumin 458.  
 — aus Eiweiß 447.  
 — aus Glucoproteiden 550.  
 — aus Ovalbumin 457.  
 — aus Ovoglobulin 465.  
 — aus Serumalbumin 454.  
 — aus Serumglobulin 464.  
 — aus Sperma 931.  
 Glucosaminsäure 140.  
 Glucosazon 109.  
 Glucose, Vork. 114.  
 — Darst. aus Harn 114.  
 — — aus Flüssigkeiten 114.  
 — Eigenschaften 115.  
 — optische Eigenschaften 117.  
 — Verh. zu Alkalien 115.  
 — Verbindungen 115.  
 — Einwirkung von Alkalien 117.  
 — — von Säuren 118.  
 — — Hefen und Bakterien 118.  
 — Oxydation 118.  
 — Nachweis 118.  
 — Bildung aus Fructose 120.  
 — Unterscheidung von Fructose 107, 120.  
 — Bestimmung neben Maltose 895.

- Glucose, Vork. im Darminhalt 114, 932.  
 — — in Leber 858.  
 — — im Muskel 858.  
 — — im Humor aqueus 893.  
 — — in Sputis 898.  
 — — im Glaskörper 893.  
 — — im Hühnerei 114.  
 — Nachw. im Harn 725.  
 — Best. im Harn 728.  
 — — — durch Polarisation 728.  
 — — — durch Titration nach Bertrand 731.  
 — — — — nach Bang 732.  
 — — — — nach Knapp 732.  
 — — — durch Gärung 733.  
 — — bei kleinen Mengen 728, 733.  
 — Nachw. u. Best. in serösen Flüssigkeiten 784, 787.  
 — Mikrob. im Blut 844.  
 — — — nach Folin-Wu 844.  
 — — — nach Bang 845.  
 — — — nach Hagedorn-Jensen 846.  
 — Nachw. in Organen 869.  
 — Tabellen zur Berechnung aus Kupferoxydulmenge 949.  
 Glucothionsäure 358.  
 Glucuronsäure 134.  
 — Vorkommen 134.  
 — Synthese 134.  
 — Darstellung 135.  
 — Eigenschaften 135.  
 — optische Eigenschaften 136.  
 — Verbindungen 135.  
 — Umwandlungen 137.  
 — Nachweis 137.  
 — gepaarte Glucuronsäuren 353.  
 — — Nachw. u. Best. im Harn 736.  
 — — Vork. im Blutplasma 134.  
 Glühen 7.  
 d-Glutamin 248.  
 — Phenyllessigsäurederivat 248.  
 Glutaminsäure 222, 244, 251.  
 — Vorkommen 244.  
 — Darstellung 244, 579.  
 — — der optisch aktiven 244.  
 — Eigenschaften 244.  
 — — optische 246.  
 — Nachweis 247.  
 — Umwandlungen 246.  
 — Verbindungen 245.  
 — Vork. im Muskel 857.  
 — Muttersubstanz des Carnitins 199.  
 — Ninhydrinreaktion 219.  
 Glutaminsäure, Carbaminat 224.  
 — Verhalten zu Oxydasen 646.  
 — Isol. aus Eiweißhydrolysat 568, 571, 572, 573, 574, 575, 576, 579.  
 — Gehalt einiger Proteine daran 596—599.  
 Glutaminylcystein 511, s. Glutathion.  
 Glutarsäure 96.  
 — aus Lysin 264.  
 — Isol. aus Eiter 96, 825.  
 Glutathion 505, 511.  
 — Vork. im Muskel 857.  
 — Isol. aus Hefe 511.  
 Gluteine 489.  
 Glutin 486.  
 — Bildung aus Kollagen 487.  
 — Gelatinierung 487.  
 — Reinigung von käuflichem Leim 487.  
 — Zusammensetzung 488.  
 — Eigenschaften 488.  
 — Verhalten zu Chondrin 490.  
 — Verwandlung, angeblich in Kollagen 489.  
 — — in Glutose 489.  
 — Hydrolyse 489.  
 — — Isol. von Polypeptiden 509.  
 — Verdauung 489.  
 — Zersetzung, bakterielle 489.  
 — Oxydation 489.  
 — Gehalt an Aminosäuren 598.  
 — Nachw. in Knochen 852.  
 — — in Knorpel 855.  
 — — in Bindegewebe 856.  
 — in Muskeln 860.  
 Glutinpepton 489.  
 Glutolin 464.  
 Glutokyrin,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Form 504.  
 — Aufspaltung in Peptide 504.  
 Glutose 488, 489.  
 Glyceride 100.  
 — des Milchfetts 918.  
 Glycerin 54.  
 — Best. in Fett 105.  
 — — in serösen Flüssigkeiten 790.  
 Glycerinphosphorsäure 359.  
 — Vorkommen 359.  
 —  $\alpha$ -Form 360.  
 —  $\beta$ -Form 360.  
 — natürliche 361.  
 — Eigenschaften 361.  
 — — optische 360.  
 — Spaltung durch Fermente 638.  
 — aus Phosphatiden 359.  
 — aus Lecithin 368.  
 — aus Kephalin 369.  
 — aus Jecorin 373.  
 l-Glycerinsäure aus Serin 232.  
 Glycerophosphatase 638.  
 Glycin 225, s. Glykokoll.  
 Glycyl-d-alaninhydrat 492, 507, 508, 514.  
 Glycyl-d-valinhydrat 507, 508.  
 Glycyl-l-leucin 508.  
 Glycyl-l-leucinhydrat 507, 508.  
 Glycyl-l-phenylalanin 509.  
 Glycyl-l-phenylalaninhydrat 509.  
 Glycylprolinhydrat 509.  
 Glycyl-l-tyrosinhydrat 402, 507, 509, 514.  
 Glykcholeinsäure 343, 344, 909.  
 — Eigenschaften 345.  
 — Spaltungen 345.  
 — Darst. aus Rindergalle 344.  
 — Trennung von Glykcholsäure 343.  
 Glykcholsäure 335, 342, 909.  
 — s. auch Gallensäuren.  
 — Vorkommen 342.  
 — Darstellung 342.  
 — — aus Rindergalle 343.  
 — Isol. aus Flüssigkeiten 347.  
 — Eigenschaften 343.  
 — optische Eigenschaften 344.  
 — Salze 344.  
 — Spaltung 344.  
 — Umwandlung 344.  
 — Vork. in Faeces 934.  
 — Nachweis neben Taurochol- und Cholsäure 347.  
 Glykodesoxycholsäure 344, s. Glykcholeinsäure.  
 Glykogen 128.  
 — Vorkommen 128.  
 — Darstellung reinen 128.  
 — — nach Brücke 129.  
 — Eigenschaften 129.  
 — optische Eigenschaften 131.  
 — Fällungsmittel 130.  
 — Verhalten zu Jod 130.  
 — Methylierung 130.  
 — Verhalten zu Alkalien, Säuren und Fermenten 131.  
 — Oxydationen 131.  
 — Nachweis 131.  
 — Umwandlung in Zucker 882.  
 — Spaltung durch diastatisches Ferment 633.  
 — Nachw. in weißen Blutkörperchen 807.  
 — Vork. im Eiter 824.  
 — Isol. aus Knorpel 855.  
 — Vork. in Leber 858.  
 — — in Zähnen 851.  
 — — im Muskel 857.  
 — Best. in Muskeln und Organen 881.

- Glykogenartige Körper 132.  
 Glykohyocholsäure 345.  
 Glykokoll 173, **225**.  
 — Vorkommen 225.  
 — Darst. aus Hippursäure 226, 289.  
 — Eigenschaften 226.  
 — Verbindungen 227.  
 — Umwandlungen und Zersetzungen 228.  
 — Nachweis 228.  
 — Carbaminat 224.  
 — Ninhydrinreaktion 219.  
 — Ester, Flüchtigkeit mit Äther 567.  
 — Vork. in gepaarter Gallensäure 342.  
 — Aminostickstoffbest. 587.  
 — Trennung von Alanin 227.  
 — — von anderen Aminosäuren 227, 228.  
 — Isol. aus Eiweißhydrolysat 560, 561 Anm., 562, **564**, 568, 569, 574, 576.  
 — Abscheidung als Esterchlorhydrat 564.  
 — Gehalt einiger Proteine daran 596—599.  
 — Vork. im Muskel 857.  
 — Isol. aus Harn 751.  
 Glykol, Oxydation durch Fermente 646.  
 Glykolsäure aus Glucose 117.  
 — aus Glykokoll 228.  
 Glyoxalase 644.  
 Glyoxylsäure aus Kreatin 159.  
 — aus Glykokoll 228.  
 Glyoxylsäurereaktion (Adamkiewicz) 156, **449**.  
 Glyoxylsäurelösung, Reagens, Darstellung 945.  
 Gmelins Probe (Bilirubin) 421.  
 — roter Vanessenfarbstoff 531.  
 — Biliverdin 425.  
 — Mesobilirubin 423.  
 — Ausführung im Harn 757.  
 Goldschmiedts Probe (Glucuronsäure) 137.  
 Goochtiegel 8.  
 Gorgonidenachsenskelett, Jodgorgosäure 301, 493.  
 Gorgonin 492, s. Cornein.  
 — Bromgorgosäure 302.  
 Gregarinen, Kohlenhydrat 132.  
 Guanase 641.  
 Guanidin 156.  
 — in „Histidinfraktion“ 579.  
 — Verhalten bei Aminostickstoffbest. 586.  
 — bei der Oxydation von Thymonucleinsäure 382.  
 — — des Eiweiß 447, 490, 553.  
 — — von Melanin 436.  
 Guanidin, Isol. aus autolysierten Organen 868.  
 Guanidinderivate 203.  
 — Abtrennung 205.  
 $\delta$ -Guanido- $\alpha$ -Aminovaleriansäure 259, s. Arginin.  
 Guanidobutylamin 204, siehe Agmatin.  
 Guanidobuttersäure 261.  
 Guanin 169, **176**.  
 — Vorkommen 176.  
 — Darstellung 177.  
 — — aus Guano 177.  
 — Eigenschaften 177.  
 — Verbindungen 177.  
 — Umwandlungen 178.  
 — Methylderivate 182.  
 — Nachweis 178.  
 — fermentative Umwandlung 641.  
 — aus Thymonucleinsäure 380.  
 — aus Guanylsäure 375, 378.  
 — und Adenin, quantitative Gewinnung aus Nucleinsäure 382, 385.  
 — Best. in Muskeln und anderen Organen 875.  
 — Vork. in Milch 919.  
 Guano, Harnsäure 170.  
 — Guanin 176.  
 — Guaningewinnung 177.  
 Guanogallensäure 345.  
 Guanosin 112, 375, 378, **379**.  
 — fermentative Umwandlung 641.  
 — Vork. im Dünndarminhalt 932.  
 Guanosinhexosid 388.  
 Guanylnucleinsäure 378, 388, 538.  
 Guanylsäure 375, **377**.  
 — Pentose 112.  
 — Gewinnung aus Hefenucleinsäure 386.  
 — Vork. im Dünndarminhalt 932.  
 Guajakharzprobe für Blutnachweis im Harn 759.  
 — in Faeces 938.  
 Gulonsäure 137.  
 Gummi, tierisches 145.  
 Gunningsche Probe auf Aceton 60.  
 Gynasin 216.  
 — Isol. aus Harn 717.
- H.**
- Haare, Cholesterinester 324.  
 — Darst. von Cystin 253.  
 — Pigment 434.  
 — Keratin 482, 597.  
 Hämatin 397, **399**.  
 — Vorkommen 399.  
 Hämatin, Darst. aus Oxyhämoglobin 399.  
 — — aus Hämin 400.  
 — Zusammensetzung 400.  
 — Eigenschaften 400.  
 — Spektrum 401.  
 — Veränderung des Spektrums durch Reduktionsmittel und Cyankalium 401.  
 — Umwandlungen 401.  
 — Reduktion, Oxydation 402.  
 — Nachweis 402.  
 — Beziehung zum Bilirubin 417.  
 — — zum Hämin 400, 402.  
 — aus Oxyhämoglobin 519, 523.  
 — aus Methämoglobin 399, 530.  
 — Trennung von Hämoglobin und Oxyhämoglobin 525.  
 — aus Kohlenoxydhämoglobin 527.  
 — Unterschied spektroskopischer gegen Methämoglobin 529.  
 — Nachw. in serösen Flüssigkeiten 402, 794.  
 — — im Mageninhalt 906.  
 — — in Galle 913.  
 — — in Faeces 938.  
 — reduziertes, s. Hämochromogen.  
 Hämatinsäure, Anhydrid der dreibasischen 271.  
 — — der zweibasischen 271.  
 — Imid der dreibasischen 270.  
 — — der zweibasischen 271.  
 — aus Bilirubin 421.  
 — aus Biliverdin 425.  
 — aus Hämatin 402.  
 — aus Hämatoporphyrin 270, 411.  
 — aus Hämin **271**, 407.  
 — aus Mesobilirubinogen 424.  
 — aus Uroporphyrin 415.  
 — carboxylierte, aus Uroporphyrin 415.  
 Hämatogen 547.  
 Hämatoidinkristalle 417, siehe Bilirubin.  
 — Nachw. in Sputis 899.  
 Hämatoporphyrine vgl. auch Porphyrine.  
 Hämatoporphyrin 270, 402, **407**.  
 — Entstehung 407.  
 — Vorkommen 407.  
 — Darstellung 408.  
 — Zwischenglieder der Bildung 409.  
 — Zusammensetzung und Eigenschaften 409.

- Hämatoporphyrin, Spektrum 410.  
 — Umwandlungen 411.  
 — Ester und Äther 411.  
 — Oxydation 270, 411.  
 — Reduktion 411.  
 — Nachweis 411.  
 — aus Hämin 408.  
 — aus Hämoglobin 524.  
 — Trennung von Hämoglobin und Oxyhämoglobin 525.  
 — Vork. im Harn 407, 408.  
 Hämidoporphyrin 409.  
 Hämin 270, 397, 402.  
 — Darstellung 402.  
 —  $\alpha$ -Form 403.  
 —  $\beta$ -Form 404.  
 — Reinigung 403.  
 — Umscheidung 403.  
 — Zusammensetzung 405.  
 — Beziehungen zum Hämatin 400, 402.  
 — Eigenschaften 405.  
 — Ester 406.  
 — Bromderivate 406.  
 — Oxydationsprodukte 270.  
 — Reduktionsprodukte 272.  
 — aus Oxyhämoglobin 523.  
 — ameisensaures 402.  
 — Bromhämin 404.  
 — Rhodanhämin 402.  
 Häminoporphyrin 409.  
 Häminprobe, Teichmannsche 402, 808.  
 Hämochromogen, Vork., Darst. 397, 401.  
 — Spektrum 398.  
 — Umwandlung 399.  
 — aus Hämatin 401.  
 — aus Hämoglobin 519, 524.  
 Hämocyanin 531.  
 Hämoglobin 519, 522, 523.  
 — Darstellung 523.  
 — Eigenschaften 523.  
 — Spaltungen 524.  
 — Spaltung in Kyrine 505.  
 — Beziehung zum Oxyhämoglobin 522.  
 — spektroskopisches Verhalten 524.  
 — Nachweis 525.  
 — Trennung (mit Oxyhämoglobin) von Methämoglobin, Hämatin, Hämatoporphyrin 525.  
 — aus Methämoglobin 529.  
 — Nachw. in serösen Flüssigkeiten (s. auch Blutfarbstoffe) 525, 794.  
 Hämolysen 798.  
 Hämomometer von Sahli 812.  
 Hämphyllin 413.  
 Hämporphyrin 411, 413.  
 Hämpyrrol 275.  
 Hämpyrrolcarbonsäuren, s. Phonopyrrolcarbonsäuren.  
 Hämpyrrole 272, 275.  
 — Gewinnung 272.  
 — Trennung des Gemischs 273.  
 — — von Phonopyrrolcarbonsäuren 273.  
 — aus Hämin 407.  
 — aus Hämatin 402.  
 — aus Hämatoporphyrin 411.  
 Hämotricarbonsäure 272.  
 Häußlers Probe (Citronensäure) 97.  
 Haifisch, Leberöl, Oleinalkohol 53.  
 — — Spinacene und Squalene 98 Anm., 322.  
 — Isol. von Basen 846.  
 — Scyllit 286, 858.  
 — Harnstoff im Muskel 857.  
 — — in Galle 909.  
 — Scymnolschwefelsäure 348, 909.  
 Halbschattenpolarimeter 25.  
 Haliotis, Taurin, Isol. 250.  
 Halogen, Nachw. in organischen Stoffen 51.  
 Halogensubstituierte Eiweißstoffe 516.  
 Hammarstens Probe auf Gallenfarbstoff 422, 425.  
 — Ausführung im Harn 757.  
 Hanföl, Linolsäure 74.  
 Harn, Untersuchung 677.  
 — Allgemeines 677.  
 — Konzentrieren 1.  
 — Konzentrieren größerer Mengen zur Veraschung 652.  
 — Entfernung von Eiweiß 681.  
 — Diazoprobe 681.  
 — Bestandteile 678.  
 — — normale 678, 682.  
 — — pathologische 678, 725.  
 — Geruch 678.  
 — Menge 678.  
 — Acidität 680.  
 — Gefrierpunkt 678.  
 — spez. Gew. 678.  
 — Konsistenz 678.  
 — Klarheit 679.  
 — Nubecula 679.  
 — Sedimentum lateritium 679.  
 — ammoniakalische Gärung 679.  
 — optische Drehung 679.  
 — Fluorescenz 679.  
 — Farbe 679.  
 — Reaktion 680.  
 — Ionenacidität 680.  
 — Titrationsacidität 680.  
 — Best. der Acidität 680.  
 Harn, Trockenrückstand, Best. 683.  
 — Veraschung 652.  
 — Stickstoffbest. nach Kjeldahl 697.  
 — Verhalten zu Essigsäure 725.  
 — Anorganische Bestandteile:  
 — Nachw. u. Best. von Ammoniak 694.  
 — Asche, Best. 683.  
 — Calcium, Nachw. u. Best. 682, 685, 687.  
 — Chlor, Best. des Gesamtchlors 689.  
 — Eisen, Nachw. u. Best. 682, 688.  
 — Kalium, Nachw. u. Best. 682, 684, 687.  
 — Kieselsäure, Nachw. 683.  
 — Magnesium, Nachw. u. Best. 682, 685, 686, 687.  
 — Natrium, Nachw. u. Best. 682, 684, 687.  
 — Phosphorsäure, Nachw. u. Best. 682, 693.  
 — — Mikrobest. 833.  
 — Salpetersäure, Nachw. u. Best. 682, 694.  
 — salpetrige Säure, Nachw. 683.  
 — Salzsäure, Nachw. u. Best. 682, 688.  
 — — Titration nach Mohr 688.  
 — — — nach Volhard 688.  
 — Schwefelsäure, Nachw. u. Best. 682, 690, 691.  
 — Best. des Gesamtschwefels 690, 692.  
 — Stickstoffbest. nach Kjeldahl 697.  
 — Wasserstoffsuperoxyd, Nachweis 683.  
 Harn, Organische Bestandteile:  
 — Acetaldehyd, Isol. 58.  
 — — Nachweis 745.  
 — Aceton, Nachw. u. Best. 738, 744.  
 — Acetessigsäure, Nachw. u. Best. 738, 744.  
 — Adenin, Isol. 186.  
 — Ätherschwefelsäure, Nachweis u. Best. 682, 690, 691, 692.  
 — Äthylalkohol, Vork. 51.  
 — Äthylsulfid, Isol. aus Hundeharn 56.  
 — Alanin, Vork. 229.  
 — Albumin, Best. 748.  
 — Albumosen, Nachw. 749.  
 — Allantoin, Isol. u. Best. 154, 706.

- Harn, Organische Bestandteile:
- Alloxyproteinsäure, Isol. 517.
  - Ameisensäure, Vork. 62.
  - Aminosäuren, Vork. 218.
  - — Nachw. 750.
  - — Isol. als  $\beta$ -Naphthalinsulfverbindungen 751.
  - — Isol. als  $\beta$ -Naphthalinsulfverbindung 751.
  - — — als Hydantoine 752.
  - — — als Ester 752.
  - — Best. nach Krüger-Schmid 754, 755.
  - Antoxyproteinsäuren 517.
  - Arabinose, Vork. 110, siehe auch Pentosen.
  - aromatische Oxy Säuren, Nachw. 724.
  - — Schwefelsäuren, Nachw. u. Best. 682, 690, 691, 692.
  - Basen, organische, Isol. 716.
  - — unbekannter Konstitution 212, 213, 214, 215, 216.
  - Bence-Jonesscher Eiweißkörper, Isol. 467.
  - Benzoesäure, Nachw. u. Best. 722.
  - Betain 198.
  - Bilirubin, Nachw. 757.
  - Blut, Nachw. 758.
  - Blutfarbstoffe, Nachw. 758.
  - Brenzcatechin, Nachw. u. Best. 720.
  - — Darstellung 283.
  - Buttersäure 64.
  - Butyrobetain 199.
  - Cadaverin, Isol. 203, 756.
  - Carbaminsäure, Isol. 149.
  - Cholesterin, Vork. 323.
  - Cholin 195.
  - Cholsäure 335.
  - Chondroitinschwefelsäure, Nachw. u. Best. 725.
  - Citronensäure 96.
  - Coffein, Vork. 183.
  - Cystin, Isol. u. Best. 751, 753.
  - diastatisches Ferment, Nachweis 756.
  - Diäthylmethylsulfoniumhydroxyd 56.
  - Diamine, Isol. 203.
  - Dimethylamin 189.
  - Dimethylguanidin, Isol. 717.
  - Eiter, Nachw. 761.
  - Eiweiß, Nachw. u. Best. 746, 748.
  - — annähernde Best. 749.
  - — Entfernung 681.
  - Eiweißkörper von Bence-Jones, Isol. 467.
- Harn, Organische Bestandteile:
- Epiguanin, Darst. 186.
  - Episarkin, Vork. 182.
  - Erepsin, Nachw. 756.
  - Erythroextrin 132.
  - Essigsäure 63.
  - Farbstoffe, Nachw. 756.
  - Fermente, Nachw. 756.
  - Fett, Nachw. 746.
  - Fettsäuren, Nachw. u. Best. 718.
  - — niedere, Abscheidung 76.
  - Fruchtzucker, Isol. u. Nachweis 119, 734.
  - Galaktose, Vork. 120.
  - Gallenfarbstoff, Nachw. 757.
  - Gallensäuren, Nachw. u. Best. 760.
  - Gallussäure 306.
  - Globulin, Best. 748.
  - — kristallisiertes 465.
  - Glucose, Isol. 114.
  - — Nachw. u. Best. 725, 728.
  - Glucuronsäure, gepaarte, Nachweis 353.
  - Glycerinphosphorsäure 359.
  - Glykokoll, Isol. 752.
  - Guanidobutylamin 205.
  - Gummi, tierischer 146.
  - Gynesein, Isol. 717.
  - Hämatoporphyrin 407, 414.
  - Harnsäure, Nachw. u. Best. 170, 709.
  - — Isolierung 170.
  - Harnstoff, Isol. 150.
  - — Nachw. u. Best. 700, 701 ff.
  - Heptose (Leoscher Zucker) 120.
  - Heteroxanthin, Darst. 186.
  - Hexonbasen, Isol. 751.
  - Hippursäure, Isol. 288.
  - — Nachw. u. Best. 722.
  - Histamin, Vork. 209.
  - Histidin und Homologe, Isolierung 717, 751.
  - Homogentisinsäure, Nachw. u. Best. 760.
  - Isolierung 303.
  - Hydrochinon, Darst. 284.
  - Hydro-p-Cumarsäure, Isol. 296.
  - — Nachweis 724.
  - Hypoxanthin, Darst. 186.
  - Imidazolderivate 681.
  - Indigblau 317.
  - Indirubin 318.
  - Indol-Pr.-3-Essigsäure 310.
  - Indoxyl, Vork. 310.
  - Indoxylschwefelsäure, Darstellung 352.
  - — Nachw. u. Best. 720, 721.
- Harn, Organische Bestandteile:
- Inosit, Nachw. 725.
  - Isoamylamin 191.
  - Isomaltose 124.
  - Kohlenhydrate, Best. 737, vgl. auch Glucose, Fruchtzucker, Pentosen.
  - Koproporphyrin, Vork. 415.
  - Kreatin, Best. 708.
  - — Überführung in Kreatinin 708.
  - Kreatinin, Nachw. u. Best. 706.
  - — Mikrobest. 708.
  - — Darstellung 160.
  - Kresol, Isol. 281.
  - — Nachw. u. Best. 719.
  - Kynosin 216.
  - Kynurensäure, Nachw. u. Best. 795.
  - — Isolierung 321.
  - Labferment, Vork. 756.
  - Lactose, Nachw. 735.
  - Leoscher Zucker 120.
  - Leucin, Isol. 750, 752.
  - Lipase, Nachw. 756.
  - Lysin, Isol. 751.
  - Maltose 123.
  - Melanine, Vork. 434, 759.
  - Mesobilirubinogen 423, siehe Urobilinogen.
  - Methämoglobin 528.
  - Methylamin 189.
  - Methylguanidin, Isol. 717.
  - Methylmercaptan, Vork. 56.
  - Methylpyridin, Isol. 632.
  - Methylpyridiniumhydroxyd 211.
  - 1-Methylxanthin, Darst. 186.
  - 3-Methylxanthin, Vork. 183.
  - 7-Methylxanthin, Isol. 186.
  - Milchsäure, Nachw. u. Best. 746.
  - Milchzucker, Nachw. 735.
  - Mingin, Isol. 717.
  - Mucoid 558.
  - Nephroresein 435.
  - Neurin 197.
  - Novain, Isol. 717.
  - Nucleinbasen, Isol. 186.
  - Ölsäure, Vork. u. Isol. 72, 718.
  - Ornithursäure 289.
  - Oxalsäure, Nachw. u. Best. 718, 719.
  - Oxalursäure, Isol. u. Nachw. 154, 706.
  - $\beta$ -Oxybuttersäure, Nachw. u. Best. 741, 744.
  - — Isolierung 88.

- Harn, Organische Bestandteile:
- p-Oxyphenacetursäure, Vorkommen 295.
  - p-Oxyphenylelessigsäure, Isol. 296.
  - — Nachweis 724.
  - Oxyproteinsäure 517.
  - Palmitinsäure, Vork. u. Isol. 69, 718.
  - Paraxanthin, Darst. 186.
  - Pentose, Vork. 109, 110.
  - — Nachw. u. Best. 735, 736.
  - — Isolierung 111.
  - Pepsin, Nachw. 756.
  - Peptide 517.
  - — Nachw. u. Best. 749, 755.
  - Phenacetursäure, Isol. 291.
  - Phenole, Isol. 281.
  - — Verhalten zu Diazo-reagens 681.
  - Phenol, Nachw. u. Best. 719.
  - Phenylalanin 292.
  - — Isolierung 752.
  - $\gamma$ -Picolin, Vork. 211.
  - Porphyrine 407, 414, 415.
  - — Nachweis 759.
  - Proteasen, Vork. 615, 622.
  - — Nachweis 756.
  - Purinbasen, Darst. 186.
  - — Bestimmung 714.
  - Putrescin, Isol. 203, 756.
  - Reductonovain, Isol. 717.
  - reduzierende Substanzen, Bestimmung 738.
  - Rhamnose, Vork. 114.
  - Rhodanwasserstoff, Nachw. u. Best. 717.
  - Rohrzucker, Vork. 122.
  - — Nachw. 737.
  - Saccharose, s. Rohrzucker.
  - Säure  $C_{12}H_{26}O_3$ , Isol. 90.
  - Serumalbumin, Nachw. u. Best. 746, 748.
  - Serunglobulin, Nachw. u. Best. 746, 748.
  - Skatolrot 434.
  - Sphingosin, Vork. 194.
  - Stearinsäure, Vork. u. Isol. 69, 718.
  - Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl 657.
  - — — Modifikation nach Folin-Wright 697.
  - — — Mikrobest. nach Pregl 700, 836.
  - — — — nach Folin-Farmer 699.
  - — — — nach Folin 836, 837.
  - — nach Liebig-Pflüger 697.
  - Taurocarbaminsäure, Isol. 251.
- Harn, Organische Bestandteile:
- Theobromin, Vork. 183.
  - Theophyllin, Vork. 183.
  - Traubenzucker, Nachw. u. Best. 725, 728.
  - — Isolierung 114.
  - Trimethylamin 190.
  - Trypsin, Nachw. 756.
  - Tyrosin, Isol. u. Nachw. 750, 752.
  - Tyrosinhydantoin, Vork. 299 Anm.\*
  - Urinod 283.
  - Urobilin, Isol. u. Nachw. 429, 757.
  - Urobilinogen, Isol. u. Nachweis 423, 757.
  - Urocaninsäure, Darst. 269.
  - Urochrom, Isol. 427.
  - Urochromogen, Isol. u. Nachweis 428, 756.
  - Uroerythrin, Isol. 431.
  - Urofuscocohämatin 432.
  - Urogon 282.
  - Uroleucinsäure 305.
  - Uroporphyrin, Isol. 414.
  - — Leukoverbindung 414.
  - Urorosein, Isol. 433.
  - Urorubrohämatin 432.
  - Valin, Isol. u. Nachw. 750, 752.
  - Vitiatin, Isol. 717.
  - Wasserstoffsperoxyd, Nachweis 683.
  - Xanthin, Darst. 186.
- Harnfarbstoffe 427.
- aus Chromogen entstehend 432.
  - Nachw. im Harn 756.
- Harnindican 351, s. Indoxylschwefelsäure.
- Harnkonkremente, s. Harnsteine 761.
- Harnmucoïd 558.
- Harnpentose, Darst. 110.
- Nachw. u. Best. im Harn 735, 736.
- Harnsäure, Vorkommen 169.
- Darst. aus Harn 170.
  - — aus Guano und Schlangengexkrementen 170.
  - Krystallformen 170.
  - Eigenschaften 170.
  - Fällungsmittel 171.
  - Salze 171.
  - Bildung aus Xanthin und Hypoxanthin 641.
  - Umwandlungen 172.
  - — in Hypoxanthin 178.
  - — durch Fermente 641, 642.
  - Nachweis 173.
  - Best. im Harn 709.
- Harnsäure, Best. nach Sal-kowski-Ludwig 709.
- — nach Folin-Shaffer 710.
  - — nach Folin-Wu 712.
  - — nach Hopkins-Wörner 711.
  - — nach Moris 712.
  - — nach Krüger-Schmid 712.
  - — nach Benedict-Franke 713.
  - Nachw. in Harnsteinen 764, 765.
  - Best. in Harnsteinen 767.
  - Nachw. in serösen Flüssigkeiten und Blut 782.
  - Mikrobest. im Blut, nach Folin 842.
  - — — nach Benedict 843.
  - Nachw. im Speichel 782, 893, 896.
  - — in Nierenkonkrementen 767.
  - — u. Best. in Muskeln und anderen Organen 876.
  - Vork. in Leber 858.
  - — im Meconium 944.
  - — in Milch 919.
  - Best. in Milch 928.
- Harnsäureribosid 388.
- Harnsedimente, s. Harnsteine 761.
- Harnsteine 761.
- Allgemeines 761.
  - mikroskopische Untersuchung 762.
  - — Formen 762.
  - Verhalten gegen Reagentien unterm Mikroskop 763.
  - Kurze Charakterisierung der in H. vorkommenden Verbindungen 763.
  - Vork. von Cystin 252.
  - Isol. von Cystin 253.
  - Vork. von Harnsäure 169.
  - — von Oxalsäure 93.
  - — von Xanthin 175.
  - qualitative Analyse 764.
  - quantitative Analyse 767.
- Harnstoff, Vork. 150.
- Darstellung 150.
  - — aus Harn 150.
  - Eigenschaften 150.
  - Verbindungen 151.
  - Zersetzungen 152.
  - Nachweis 153.
  - Verhalten bei Aminostickstoffbest. 584, 587.
  - Einwirkung auf Eiweiß 495.
  - — auf Aminosäuren 223, s. Uraminosäuren.
  - Nachw. im Harn 150, 153, 700.

- Harnstoff, Best. im Harn 701.  
 — — nach Henriques-Gammeltoft 705.  
 — — nach Fosse 701.  
 — — mit Ureasemethode 701.  
 — — nach Pflüger-Bleibtreu 704.  
 — — nach Hüfner 705.  
 — Mikrobestimmung 703.  
 — Nachw. u. Best. in seröser Flüssigkeit 777.  
 — — — nach Hoppe-Seyler 778.  
 — — — nach Salkowski 778.  
 — — — nach Fosse 779.  
 — indirekte Best. 780.  
 — Mikrobest. im Serum 840, 874.  
 — — im Speichel 893, 894, 896.  
 — — im Mageninhalt 906.  
 — — in Galle 912.  
 — — im Schweiß 918.  
 — Nachw. u. Best. in Muskeln 777, 860, 874.  
 — Best. in Milch 928.  
 — Vork. im Glaskörper 893.  
 — — in Humor aqueus 893.  
 — — in Leber 858.  
 — — in Sputis 898.  
 — Isol. aus Gehirn 891.  
 Harnstoff-Glucuronsäure 353.  
 Harze, Vork. in Faeces 933.  
 Hausenblase, Kollagen 487 Anmerkung.  
 Haut, Cholesterinester 324.  
 — Keratin 482.  
 — Kollagen 486.  
 — Pigment 434, 437.  
 — des Elefanten, Gehalt an Aminosäuren 597.  
 — der Boa constrictor, Gehalt an Aminosäuren 597.  
 Hauttalg, Bestandteile und Untersuchung 929.  
 — Oxycholesterin 331.  
 — Phosphorprotein 542.  
 Hefe, Isol. von Glutathion 511.  
 Hefeautolyse, Asparaginsäure 242.  
 — Bernsteinsäure 94.  
 — Isoleucin 239.  
 — Leucin 235.  
 Hefegärung der Kohlenhydrate 107, vgl. Gärprobe.  
 — der Aminosäuren 225.  
 Hefenucleinsäure 112, 166, 167, 375, 385.  
 — Vorkommen 385.  
 — Darstellung 385.  
 — Zusammensetzung, Eigenschaften 386.  
 — Hydrolyse 386, 387, 388.
- Hefenucleinsäure, fermentative Umwandlung 639.  
 Hefepreßsaft, Polypeptide 510.  
 Hehnersche Zahl 103.  
 Helicoprotein 559.  
 Helix pomatia, Hämocyanin 532.  
 — Hemicellulase 635.  
 — Inulinase 635.  
 — Lactase 637.  
 — Lichenase 635.  
 — Mucin 557.  
 — Protein 559.  
 — Sinistrin 133.  
 Hellers Probe auf Eiweiß 448.  
 — im Harn 747.  
 — auf Blut im Harn 759.  
 Hemibilirubin 423, s. Mesobilirubinogen.  
 Hemicellulase 635.  
 Hemicollin 489.  
 Hemielastrin 485.  
 Hemiprotein 494.  
 Hepatopankreas von Octopus, Nucleoprotein 540.  
 — von Helix pomatia, Fermente 635.  
 Heptadecansäure 70.  
 Heptose 120.  
 Heringseier, Ichthulin 549.  
 Heringslake, Monamine 189, 190.  
 Heringsperma, Agmatin, Isol. 204.  
 — Clupein 474, 478.  
 — Cytosin 166.  
 — Histon 472.  
 — Nucleoclupein 534.  
 — Taurin 249.  
 — Thymindarstellung 164.  
 — Thymonucleinsäure 379.  
 Herz, Glykogen 128.  
 — Inosit 284.  
 — Linolensäure 75.  
 — Linolsäure 74.  
 — Ölsäure 73.  
 — Phosphatid 372.  
 — Sphingomyelin 371.  
 Herzogs Probe (Milchsäure) 87.  
 Heteroalbumose 496, 499, 500.  
 — aus Fibrin, Gehalt an Aminosäuren 599.  
 Heterokeratinose 482.  
 Heterosponginoase 493.  
 Heteroxanthin 169, 182, 183.  
 — Darst. aus Harn 186.  
 — Trennung von Xanthin und Methylxanthin 186.  
 — aus Epiguanin 185.  
 Hexaamylosen aus Stärke 133.  
 Hexabromstearinsäure 75.  
 Hexahydrohexaoxybenzol 284, s. Inosit.
- Hexamethyldiamin 203.  
 Hexaoxystearinsäure 75.  
 Hexocytidin-diphosphorsäure 384.  
 Hexonbasen, Isol. aus Eiweißhydrolysat 574, 577.  
 — — nach Kossel u. Kutscher 577.  
 — — aus Organen 865, 868.  
 — — aus Harn 751.  
 — Gehalt einiger Proteine daran 597—599.  
 Hexosen 114.  
 — Vork. in Phosphatiden 375.  
 — — in Cerebrosiden 390, 396.  
 Hexosephosphorsäure 358.  
 Hexothymidin-diphosphorsäure 384.  
 Hexylamin 191, 277.  
 Hippokoprosterin 333.  
 Hippomelanin 157, 435.  
 Hippursäure 226 287, 288.  
 — Vorkommen 288.  
 — Darstellung 228.  
 — — aus Pferde- oder Rinderharn 288.  
 — — aus Menschenharn 288.  
 — Eigenschaften 288.  
 — Umwandlung 289.  
 — Hydrolyse 226.  
 — fermentative Spaltung 623.  
 — Ausgangsmaterial zur Tyrosinsynthese 297.  
 — Nachweis 289.  
 — — im Harn 722.  
 — Best. im Harn 722.  
 — — durch Formoltitration 755.  
 — — nach Bunge-Schmiedeburg 722.  
 — — nach Hryntschak 723.  
 — — nach Völker 723.  
 — — nach Folin-Flanders 724  
 — Best. in serösen Flüssigkeiten 724, 795.  
 — Vork. im Schweiß 918.  
 Hirudin, Aufhebung der Gerinnung 802.  
 Histamin 209, 268.  
 — Best. im Blut 791.  
 — aus Eiweiß 447.  
 Histidin 210, 264.  
 — Vorkommen 264.  
 — — im Muskel 857.  
 — Darst. aus Blut 265, 581.  
 — Eigenschaften 266.  
 — optische Eigenschaften 267.  
 — Verhalten bei Aminostickstoffbestimmung 587.  
 — — — Ninhydrinreaktion 219.  
 — Verbindungen 266.  
 — Umwandlungen 267.

- Histidin, Nachweis 268.  
 — Unterscheidung von Tyrosin 268.  
 — Diazoreaktion im Eiweiß 450.  
 — aus Eiweiß durch Zersetzung 447.  
 — Gehalt einiger Proteine daran 596–599.  
 — Isol. aus Eiweißhydrolysat 577, 581.  
 — Best. im Eiweißhydrolysat 590, colorimetrisch 593, titrimetrisch 594.  
 — Isol. aus Harn 717, 751.  
 — — aus Organen 867, 868.  
 — Beziehung zu Urocaninsäure 269.  
 — — zum Histamin 209, 210.  
 — — zu Carnosin 210, 265.  
 Histidinanhydrid 267.  
 Histidinfraktion bei Trennung von Basen aus Organen nach Kutscher 866, 868.  
 Histidol 268.  
 Histone 445, 469.  
 — Vorkommen 469.  
 — allgemeine Eigenschaften 469.  
 — Spaltung durch Pepsin 469, 472, s. a. Histozepton.  
 — Hydrolyse 469.  
 Histon aus roten Blutkörperchen der Vögel 470.  
 — aus Nucleohiston 470.  
 — — Gehalt an Aminosäuren 596.  
 Histon von *Arbacia* 474.  
 — von *Astropekten aurantiacus* 472.  
 — von *Centrophorus* 471, s. *Centrophorushiston*.  
 — von *Echinodermen* 472.  
 — von *Echinus acutus* 472.  
 — von *Hering* 472.  
 — von *Kabeljau* 471, s. *Gadushiston*.  
 — von *Lota vulgaris* 471, s. *Lotahiston*.  
 — von *Makrelen* 471, s. *Scomberhiston*.  
 — von *Quappen* 472.  
 — von *Strongylocentrotus* 472.  
 Histozepton 472.  
 Histozym 623.  
 Hoden, Arginin 259.  
 — Basen, Isol. 864.  
 — Cholin 195.  
 — Ferment des *Lactacidogens* 638.  
 — Kreatin 158.  
 — Nuclease 640.  
 Holzgummi, 1-Xylose 113.  
 Homobetain 199.  
 Homoeledonin, Isol. 868.  
 Homogentisinsäure 303.  
 — Vorkommen 303.  
 — Darstellung 303.  
 — — aus Harn 303.  
 — Eigenschaften 303.  
 — Verbindungen 304.  
 — Umwandlungen 304.  
 — Nachweis 305.  
 — Nachw. u. Best. im Harn 760.  
 Hopkins Probe (Indol) 308, (Skatol) 310, (Tryptophan) 316, (Oxytryptophan) 317.  
 Hopkins-Fletchers Probe (Milchsäure) 87.  
 Hoppe-Seylers Probe auf Mangan 40.  
 — auf Kohlenoxydhämoglobin 527.  
 Hoppe-Seyler, G., Traubenzuckernachweis im Harn 727.  
 Horn, Pigment 434.  
 — Keratin 482.  
 — — Gehalt an Aminosäuren 597.  
 — — Albumosen 500.  
 Hornhaut, Untersuchung 892.  
 — Glutin 488.  
 — Kollagen 486.  
 — Mucin, Glucosamingehalt 138.  
 — Mucoid 555.  
 — Mucoitinschwefelsäure 357.  
 Hüblsche Zahl 103.  
 Hühnerblut, Harnsäure 169.  
 Hühnereier, Eihautprotein 484.  
 Hühnereiweiß, Conalbumin 458.  
 — Ovalbumin 455.  
 — Ovoglobulin 465.  
 — Ovomucoid 554.  
 Hühnermuskelmagen, Koilin 485.  
 Huf, Gehalt an Cholesterinestern 324.  
 Huminstickstoff 587, 588.  
 Huminsubstanzen aus Hexosen 118.  
 — aus Eiweiß 447.  
 Hummelwachs, Psyllaalkohol 53.  
 Hummerfleisch, Aminosäuren 857.  
 — Tyrosin 297.  
 Hummerschalen, Darst. von Glucosamin 138.  
 Humor aqueus, Untersuchung 893.  
 — Milchsäure, Vork. 84.  
 — Harnstoff, Vork. 150.  
 Humor vitreus, Glucosamingehalt 138.  
 Hundeharn, Allantoin 154.  
 — Kynosin 216.  
 — Kynurensäure 321.  
 — Urocaninsäure 269.  
 — Salzsäurebestimmung 689.  
 Hundemagensaft, Gewinnung und Untersuchung 899.  
 Hundeplocenta, Biliverdin 424.  
 Hupperts Probe auf Gallenfarbstoff im Harn 758.  
 — in Faeces 938.  
 Hyaenasäure 71.  
 Hyaloidin 146, 551, 559.  
 Hyalomucoid 555.  
 — im Glaskörper 893.  
 Hydantoine der Aminosäuren 223, 563.  
 Hydrazone der Zucker 109.  
 Hydrobilirubin 423.  
 — Verhältnis zu Urobilin 423.  
 Hydroceleflüssigkeit 768, s. Untersuchung seröser Flüssigkeiten.  
 — Bernsteinsäure, Vork. 94.  
 — Serosamucin 557.  
 — Mucinalbumose 557.  
 Hydrocephalus, Bernsteinsäure 94.  
 Hydrochinon 284.  
 — und Brenzkatechin, Darst. aus Harn 283.  
 Hydrochinonessigsäure 303, s. Homogentisinsäure.  
 Hydrochinonmilchsäure 305.  
 Hydrochinonschwefelsäure 351.  
 Hydrocollidin 215, s. Base  $C_8H_{13}N$ .  
 Hydrocorindin 215.  
 Hydro-p-Cumarsäure 295.  
 — aus Tyrosin 300.  
 — aus Eiweiß 447.  
 — Isolierung aus Harn 296.  
 — — aus Fäulnisgemisch 311.  
 — Nachw. im Harn 724.  
 — Nachw. in Faeces 936.  
 Hydrogenotransportase 644.  
 Hydrokephalin 364, 370.  
 Hydroklastische Reaktion 643.  
 Hydroleicithin 368.  
 Hydrolyse von Eiweißstoffen 560.  
 Hydrotropismus 287, 291.  
 Hydroxydase 643.  
 Hydrozimsäure 290, siehe  $\beta$ -Phenylpropionsäure.  
 Hyocholsäure 340, 345.  
 Hyoglykocholsäure 345.  
 Hypobronchialdrüsen der Prosobranchier, Farbstoff 441.  
 Hypophyse, Histamin 209.



- Hypoxanthin 169, 174, **178**, 375.  
 — aus Harnsäure 173.  
 — aus Adenin 182.  
 — in Carmin 377.  
 — aus Inosinsäure 375, 376.  
 — aus Thymoncleinsäure 382.  
 — Darst. aus Harn 186.  
 — Trennung von Epiguanin, Adenin, Paraxanthin 187.  
 — — von Xanthin 876.  
 — Isol. aus Muskeln und Organen 866.  
 — Best. in Muskeln und anderen Organen 876.  
 Hypoxanthisin 375.
- I.**
- Ichthuline 542.  
 Ichthulin aus Barscheiern 547.  
 — Lecithinverbindung aus Barscheiern 548.  
 — aus Kabeljaueiern 548.  
 — aus Karpfeneiern 548.  
 — aus Lachseiern 548.  
 — aus Eiern von *Torpedo marmorata* 549.  
 — aus Heringsrogen 549.  
 Ichthylepidin 486.  
 — Gehalt an Aminosäuren 598.  
 Ichthyosisschuppen, Leucin 335.  
 Ignotin 215, vgl. auch Carnosin 210.  
 Imidazolacrylsäure 269.  
 Imidazol-äthylamin 209, s. Histamin.  
 $\beta$ -Imidazol- $\alpha$ -Aminopropionsäure 264, s. Histidin.  
 Imidazolcarbonsäure 118, 267.  
 Imidazolderivate, Trennung 211.  
 — Verhalten bei Aminostickstoffbestimmung 586.  
 Imidazolessigsäure 267.  
 Imidazolglykokoll, Isolierung aus Harn 717.  
 Imidazolglyoxylsäure 267.  
 — aus Eiweiß 448.  
 Imidazolmilchsäure 267.  
 Imidazolpropionsäure 267.  
 Indigblau 317.  
 — Best. im Harn 720.  
 Indigblausulfosäuren 318.  
 Indigo, spektrophotometrische Untersuchung 20.  
 Indigolösung, entfärbte, Reagens auf Wasserstoffsuperoxyd 683.  
 Indigotin 317, s. Indigblau.  
 Indigpurpurin 318, s. Indirubin.  
 Indigrot 318, s. Indirubin.
- Indigweiß 317, 318.  
 Indikan 310.  
 Indikatoren 11.  
 — zur Best. des  $p_H$  von Blut 799.  
 Indirubin 318.  
 — Bildung aus Indoxyl 310.  
 — Nachw. u. Best. im Harn 722.  
 — Trennung von Urorosein 433.  
 Indirubinweiß 319.  
 Indischgelb 355.  
 Indol 306.  
 — Vorkommen 306.  
 — — in Sputis 897.  
 — Darstellung 307.  
 — Eigenschaften 307.  
 — Verbindungen 307.  
 — Zersetzung 307.  
 — Nachweis 307.  
 — Unterschied von Skatol 307.  
 — aus Molluskenfarbstoff 425.  
 — aus Eiweiß 447, 486.  
 — aus Tryptopan 315.  
 — aus Melanin 436.  
 — Isolierung aus Fäulnisgemisch 320.  
 — Trennung von Skatol 307.  
 — Nachw. u. Best. in Faeces 936.  
 Indolacetsäure 443.  
 Indoläthylalkohol 315.  
 Indoläthylamin 212, 316.  
 — aus Eiweiß 447.  
 Indolalanin 312, s. Tryptophan.  
 $\beta$ -Indolaldehyd aus Tryptophan 315.  
 Indol-Pr.-3-Aminopropionsäure, s. Tryptophan 312.  
 Indolbrenztraubensäure, Beziehung zur Kynurensäure 321.  
 Indolderivate 306.  
 — Verhalten bei Aminostickstoffbest. 586.  
 Indol-Pr.-3-Essigsäure 310.  
 — Chromogen des Uroroseins 310.  
 — aus Eiweiß 447.  
 — aus Tryptophan 316.  
 — Isol. aus Fäulnisgemisch 320.  
 — Isol. aus Harn 310.  
 Indolmilchsäure 315.  
 Indol-Pr.-3-Propionsäure 311.  
 — aus Tryptophan 315.  
 — aus Eiweiß 447.  
 — Isol. aus Fäulnisgemisch 311, 321.  
 Indophenolreaktion auf Oxydasen 646.  
 Indoxyl **310**, 317.
- Indoxyl, Best. im Blut 791.  
 Indoxylglucuronsäure 310, 317, 318.  
 Indoxylschwefelsäure 310, 317, 318, **351**.  
 — Nachw. im Harn 720.  
 — Best. im Harn 721.  
 — — nach Obermayer 721.  
 — — nach Bouma 722.  
 — — colorimetrisch 722.  
 Inkrustationen im Darm 943.  
 Inosin 375, 376, **377**.  
 — aus Adenosin 377, 387.  
 Inosinsäure 375, **376**.  
 — Pentose 112.  
 i-Inosit 284.  
 — Vorkommen 284.  
 — Isolierung 284.  
 — Eigenschaften 285.  
 — Umwandlungen 285.  
 — Nachweis 285.  
 — Isol. aus Gewebe 284.  
 — Nachw. u. Isol. aus Harn 725.  
 — — u. Darst. aus serösen Flüssigkeiten 284, 795.  
 — — in Muskeln **284**, 860, 861.  
 — Isol. aus Gehirn 891.  
 — Vork. in Leber 858.  
 Inulin 119.  
 Inulinase 635.  
 Invertin (Saccharase) 635.  
 — Vorkommen 635.  
 — Wirkung 636.  
 — Nachweis 636.  
 — im Darmsaft 907.  
 — Nachw. in Faeces 935.  
 Isoamylamin 191, 236, 238.  
 Isobuttersäure 65.  
 — Vorkommen 65.  
 — Eigenschaften, Verbindungen 65.  
 — Nachw. 66.  
 — Abscheidung und Trennung 76.  
 — aus Valin 235.  
 — aus Eiweiß 447.  
 Isobutylaldehyd aus Valin 235.  
 Isocasein aus Casein 544.  
 Isocholesterin 333.  
 — Isol. aus Talgdrüsen und ähnlichen Sekreten 930.  
 Isocholesterinester 323, 333, 930.  
 Isohämopyrrol 275.  
 — Abtrennung aus Hämopyrrolgemisch 273.  
 Isoleucin 239.  
 — Vorkommen 239.  
 — Darst. von d-1-Isoleucin 240.

- Isoleucin, Darst. von d-Isoleucin aus Melasseschlempe 240.  
 — Trennung von l-Leucin 240.  
 — Eigenschaften 240.  
 — — optische 241.  
 — Verbindungen 240.  
 — Umwandlungen 241.  
 — aus Eiweiß 447.  
 — Isolierung aus Eiweißhydrolysat 563, 568, 569, 570, 571.  
 — Gehalt einiger Proteine daran 596—599.  
 Isomaltose 124.  
 — Nachw. in Organen 869.  
 — — neben Glucose und Maltose 895.  
 Isophonopyrrolcarbonsäure 276.  
 — Gewinnung aus Hämin 273.  
 — Trennung von anderen Reduktionsprodukten des Hämins 274.  
 — aus Bilirubin 421.  
 — aus Bilirubinsäure 422.  
 Isovaleraldehyd aus Eiweiß 490.  
 Isovaleriansäure 66.  
 — aus Valin 235.  
 — aus Leucin 238.  
 — aus Eiweiß 447.  
 — Trennung von anderen niederen Fettsäuren 76, 78.  
 Ioszuckersäure 141.
- J.**
- Jaffes Reaktion (Kreatinin) 163, (Kynurensäure) 322, (Porphyrine) 431, (Urobilin) 431.  
 Jecocerinsäure 75.  
 Jecorin 373.  
 Jecorine von abweichendem Verhalten 373.  
 Jod, Nachweiß 42.  
 — — in organischen Stoffen 51.  
 — Best. des Gesamtjods 667.  
 Jodeiweiße 516.  
 Jodgorgosäure 301, 493.  
 Jodmucoid 516.  
 Jodoformprobe 52, 58, 59, 87, 89, 92, 93, 97.  
 Jodometrie 13.  
 Jodosponglin 493.  
 Jodothylin 467.  
 Jodoalbumin 516.  
 Jodreaktion der Stärke 128.  
 — des Glykogens 130.  
 — des Amyloids 558.  
 — der Amylosen 133.  
 Jodserumalbumin 516.
- Jodwasserstoff, Vork., Nachw. 42.  
 Jodzähl der Fette 103.  
 Jolles Probe (Indoxyl im Harn) 721.  
 — (Pentosen im Harn) 736.
- K.**
- Kabeljaueier, Ichthulin 548.  
 Käse, Agmatin 205.  
 — Base  $C_{16}H_{24}N_2O_4$  216.  
 — Bernsteinsäure 94.  
 — Cadaverin 202.  
 — Caprinsäure 68.  
 — Capronsäure 67.  
 — Caprylsäure 68.  
 — Citronensäure 96.  
 — Histidin 265.  
 — Isoleucin 239.  
 — d-l-Leucin 236.  
 — Lysin 262.  
 — Neuridin 213.  
 — Ornithin 257.  
 — Oxyprolin 279.  
 — Paracasein 544.  
 — Phenylalanin 292.  
 — Prolin 277.  
 — Putrescin 201.  
 — Trimethylamin 190.  
 — Tryptophan 313.  
 — Tyramin 206.  
 — Valin 233.  
 Kalilauge, spez. Gewicht, Tabelle 947.  
 Kalium, Vork., Eigensch. 35.  
 — Vork. in Muskel und anderen Organen 878.  
 — Nachweis 36.  
 — — u. Best. in Aschen 654, 655.  
 — Mikrobestimmung in Aschen 657.  
 — — im Harn 682.  
 — Best. von Kalium + Natrium im Harn 684.  
 — — von Kalium im Harn 684, 687.  
 — Nachw. u. Best. in Harnsteinen 765, 767.  
 — Mikrobestimmung im Blut 826.  
 — Nachw. u. Best. in Knochen 852, 853.  
 Kanirin 214, 264.  
 Kaolin zur Entfernung von Eiweiß aus Fermentlösungen 605.  
 — — — — — aus serösen Flüssigkeiten 785.  
 Karbonate, s. Kohlensäure und Calciumcarbonat.  
 Karpfeneier, Ichthulin 548.  
 Kartoffelknollen, Histidin 265.
- Kartoffelknollen, Lysin 262.  
 Katalase 643.  
 — des Bluts, Isol. u. Nachw. 644.  
 — der Galle, Vork. 910.  
 — der Gewebe, Nachw. 645.  
 — des Muskels, Vork. 857.  
 — des Harns, Vork. 756.  
 Kataphorese von Fermenten 601.  
 Kathämoglobin 530.  
 Keimpflanzen, Arginin 259.  
 — Asparagin 248.  
 — Betain 198.  
 — Glutamin 248.  
 — Histidin 265.  
 — Isoleucin 239.  
 — Leucin 235.  
 — Lysin 262.  
 — Phenylalanin 292.  
 — Prolin 277.  
 — Tryptophan 313.  
 — Tyrosin 297.  
 Kephalin 359, 362, 365, 369, 372, 373.  
 — Zusammensetzung 369.  
 — Darst. aus Gehirn 369.  
 — — aus Eigelb und Organen 365.  
 — Eigenschaften, Spaltung 370.  
 — Glycerinphosphorsäure 359.  
 — Linolsäure 369.  
 — Nachw. u. Isol. aus Gehirn 370, 891.  
 Kerasin 390, 392, 393, 396, 891.  
 — Lignocerinsäure 71.  
 — Trennung von Cerebron 392.  
 — Unterscheidung von Cerebron 395.  
 Keratine 396, 482.  
 — Vorkommen 482.  
 — Zusammensetzung 482.  
 — Schwefelgehalt 482.  
 — Eigenschaften 482.  
 — Hydrolyse, Bildung von albumose- und peptonartigen Körpern 482.  
 — vollständige 483.  
 — Cytingehalt 483.  
 — Cystin, Isol. 253.  
 — Stickstoffverteilung 483.  
 — Oxydation 483.  
 — Gehalt an Aminosäuren 597.  
 Keratinoide Substanz 485, s. Koilin.  
 Keratinokyrin 505.  
 Kermes 443.  
 Kermessäure 442, 443.  
 $\beta$ -Ketobuttersäure 92.  
 Ketofettsäuren 92.  
 $\alpha$ -Ketoglutarsäure 94.  
 Ketone 57.

- $\alpha$ -Ketopropionsäure 92, siehe Brenztraubensäure.  
 Ketosen, Nachw. neben Al-  
 dosen 107.  
 Kiemen, Scyllit 286.  
 Kieselgur bei Fermentprozes-  
 sen 603, 605.  
 Kieselsäure 47.  
 — Nachw. u. Best. in Aschen  
 654, 673.  
 — — im Harn 683.  
 — — in Harnsteinen 766.  
 — Vork. im Muskel 858.  
 Kinase 602.  
 Kjeldahls Stickstoffbestim-  
 mung 675, vgl. Stickstoff,  
 Best. des Gesamtstickstoffs.  
 Knäueldrüsen, Fett 929.  
 Knappsche Zuckertitration im  
 Harn 732.  
 Knochen, Untersuchung 851.  
 — Bestandteile 851.  
 — — Nachweis 851.  
 — Herstellung des Unter-  
 suchungsmaterials 851.  
 — Nachw. von Kohlensäure  
 851.  
 — — von Fluorwasserstoff 851.  
 — — von Eiweiß-, Extraktiv-  
 stoffen 852.  
 — — von Fett, Cholesterin,  
 Phosphatid 852.  
 — — anorganischer Salze 852.  
 — — von Osseomucoid 556,  
 852.  
 — — von Osseoalbumoid 491,  
 852.  
 — — von Glutin 487, 852.  
 — Best. des Stickstoffs 852.  
 — — der Kohlensäure 852.  
 — — der Gesamtasche und  
 einzelner Aschenbestand-  
 teile 852, 853.  
 — Isol. u. Best. des Kollagens  
 486, 854.  
 — Harnsäureablagerung 169.  
 — Albumoid, Vork. 491.  
 — Milchsäure, Vork. 84.  
 Knochenmark, Untersuchung  
 854.  
 — Isolierung 85.  
 — Best. der Einzelbestandteile  
 854.  
 — Fettgehalt 97.  
 — Fett, Isolierung 851.  
 — Gehalt an Oxycholesterin  
 331.  
 — Fibrinogen 461.  
 — Nucleoproteid 539, 549.  
 Knochtumor, Albuminoid  
 491.  
 — Jodwasserstoffgehalt 42.  
 Knoop's Probe (Histidin) 268.  
 Knorpelgewebe, Bestandteile  
 854.  
 — Untersuchung 855.  
 — Chondroitinschwefelsäure  
 141, 356.  
 — Glutin 488.  
 — Kollagen 486.  
 — Mucoid 555.  
 — Phosphatase 638.  
 Koalbumosen 503.  
 Koagulation von Eiweißstoffen  
 448, 450.  
 Koagulationstemperatur, Best.  
 16.  
 Koagulosen 503.  
 Koapeptide 503.  
 Kobaltihexaminchlorid als  
 Reagens auf Pyrophosphor-  
 säure 47.  
 Kochen von Flüssigkeiten 1.  
 Kottstorf'sche Zahl 103.  
 Kofermente 602.  
 Kohle in Lunge und Bron-  
 chialdrüsen 436.  
 — Nachw. im Sputum 898.  
 Kohlendioxyd 148, s. Kohlen-  
 säure.  
 Kohlenhydrate, Allgemeines  
 106.  
 — Reduktionsproben 106.  
 — Gärprobe 107.  
 — annähernde Best. der Ge-  
 samt-K. im Harn 737.  
 Kohlenhydratkomplex im Ei-  
 weißmolekül 550.  
 — in Phosphatiden 373.  
 Kohlenoxydhämochromogen  
 399.  
 — aus Kohlenoxydhämoglobin  
 527.  
 Kohlenoxydhämoglobin 526.  
 — Bildung 526.  
 — Darstellung 526.  
 — Eigenschaften 526.  
 — — optische 526.  
 — Spektrum 526.  
 — Spaltungen 527.  
 — Verhalten gegen Fäulnis-  
 keime 527.  
 — Nachweis 527.  
 Kohlenoxydsulfohäemoglobin  
 531.  
 Kohlensäure 148.  
 — aus Eiweiß 443.  
 — Nachw. u. Best. in Aschen  
 653, 674.  
 — Best. in Harnsteinen 768.  
 — Nachw. u. Best. in Knochen  
 851, 853.  
 Kohlenstoffbestimmung, nasse  
 677.  
 Kohlenstoffverbindungen, s.  
 organische Stoffe.  
 Koilin 482, 485.  
 — Gehalt an Aminosäuren 598.  
 Kollieren 4.  
 Kollagene 482, 486.  
 — Darstellung 486.  
 — Eigenschaften 486.  
 — Übergang in Glutin 487.  
 — Best. in Organen 872.  
 Kollidin 214, s. Base  $C_8H_{11}N$ .  
 Kolloide 3, 5.  
 — und Fermente 600.  
 Kombinations-Gallensteine 916.  
 Kondos Probe (Indol) 308,  
 (Skatol) 310.  
 Kongopapier zum Nachw. freier  
 Salzsäure 900.  
 Konstitutionswasser, Best. in  
 Knochen 854.  
 Koproporphyrin 271, 408, 415.  
 — Isol. aus Faeces 417.  
 — Nachw. in Faeces 939.  
 Koprosterin 330.  
 — Nachw. in Faeces 936, 939.  
 Koßels Probe (Adenin und  
 Hypoxanthin) 182.  
 Kot, s. Faeces.  
 Krabbenextrakt, Alanin 229.  
 — Arginin 259.  
 — Crangitin, Crangonin 216.  
 — Glykokoll 226.  
 — Kanirin 214.  
 — Leucin 235.  
 — Lysin 262.  
 — Methylpyridiniumhydro-  
 xyd 211.  
 — Neosin 214.  
 — Isol. verschied. Basen 864.  
 Krauts Reagens (Natriumwis-  
 mutjodidlösung), Herstel-  
 lung 863.  
 Kreatin 158.  
 — Vorkommen 158.  
 — — in Milch 919.  
 — Umwandlung in Kreatinin  
 159.  
 — Isol. aus „Lysinfraktion“  
 866.  
 — Best. im Harn 708.  
 — — in Milch 928.  
 — Isol. u. Nachw. in serösen  
 Flüssigkeiten 158, 795.  
 — Best. in serösen Flüssig-  
 keiten 781.  
 — Nachw. im Bindegewebe  
 856.  
 — Nachw. u. Best. in Muskeln  
 860, 874.  
 — Mikrobest. im Blut 841.  
 — Isol. aus Gehirn 891.  
 — Vork. in Leber 858.  
 — Beziehung zu Methylguanidin  
 und Dimethylguanidin  
 201, 204.

- Kreatinin, Vorkommen 160.  
 — — in „Argininfraktion“ 579.  
 — — in „Histidinfraktion“ 866.  
 — — in „Lysinfraktion“ 866, 867.  
 — — in Leber 858.  
 — — in Milch 919.  
 — Darstellung 160.  
 — — aus Kreatin 159, 160.  
 — — aus Harn 160.  
 — Eigenschaften 161.  
 — Verbindungen 161.  
 — Umwandlung in Kreatin 162.  
 — Verhalten 162.  
 — Zersetzung 162.  
 — Nachweis 163.  
 — Best. in Milch 928.  
 — — in Serum und Blut 781.  
 — Mikrob. im Blut 841.  
 — — im Harn 708.  
 — Nachw. u. Best. im Harn 706.  
 — — in Muskeln und Organen 860, 874, 875.  
 Krebs, Betain 198.  
 — Chitin, Darst. 143.  
 — Leucin 235.  
 Kresole **281**, 300.  
 — Isol. u. Nachw. 281, 282.  
 — aus Eiweiß 447.  
 — Vork. im Schweiß 918.  
 — — in Sputis 897.  
 — Isol. aus Fäulnisgemisch 320.  
 — Nachw. u. Best. im Harn 719.  
 o-Kresol, Abtrennung von p-Kresol 282.  
 p-Kresol, Abtrennung von Phenol- und o-Kresol 281.  
 Kresolschwefelsäuren 350.  
 — Nachw. u. Best. im Harn 719.  
 Kristalloide nach Graham 3.  
 Kropf der Taube, Casein 542.  
 Kryptopyrrol 272, **275**, 421, 422.  
 — aus Hämopyrrolgemisch 273.  
 Kryptopyrrolcarbonsäure 276, s. Isophonopyrrolcarbonsäure.  
 Kristalle, Untersuchung 14.  
 Krystallin **466**, 892.  
 — Gehalt an Aminosäuren 596.  
 Krystallinse, Untersuchung 892.  
 — Globuline 466.  
 Krystallwasser in Knochen, Best. 854.  
 Kürbissamen, Phenylalanin 292.  
 Kuhharn, Allantoin 154.  
 Kuncels Probe (Kohlenoxydhämoglobin) 527.  
 Kupfer, Vork., Eigenschaften 40.  
 — — in Galle 911.  
 — Nachw. in Aschen 654, Anm. †.  
 — Best. in Gallensteinen 917.  
 Kupferhydroxydbrei, zur Best. des Gesamtproteingehaltes der Milch, Herstellung nach Stutzer 923, Anm. \*\*.  
 Kynosin 216.  
 Kynurensäure 321.  
 — Vorkommen 321.  
 — Darstellung 321.  
 — — aus Hundeharn 321.  
 — Eigenschaften 321.  
 — Umwandlungen 322.  
 — Nachweis 322.  
 — aus Tryptophan 316.  
 — Nachw. u. Best. im Harn 725.  
 — — Verfahren nach Jaffe 725.  
 — — — nach Capaldi 725.  
 Kynurin 322.  
 Kyrine 445.  
 Kyrine 503, s. Protokyrine.  
 Kyroprotsäure 514.
- L.**
- Labferment 625.  
 — Vorkommen 625.  
 — Darst. von Chymosin 625.  
 — — von Parachymosin 626.  
 — — von Zymogen 625.  
 — Unterschiede 626.  
 — Eigenschaften 626.  
 — Wirkung 626.  
 — — auf Casein 544.  
 — Prüfung auf Labwirkung 627.  
 — Best. der Größe der Labwirkung 627.  
 — Verhalten zu Albumosen, Plasteinbildung 503.  
 — — zu Casein 544.  
 — — zu Milch 921.  
 — Vork. im Meconium 944.  
 — Nachw. im Mageninhalt 905.  
 — — im Pankreassaft 907.  
 — — im Harn 756.  
 Laccainsäure 442, **444**.  
 Lachseier, Ichthulin 548.  
 Lachsmilch, s. Lachssperma.  
 Lachssperma, Untersuchung 931.  
 — Albuminose 472.  
 — Nucleoprotamin 534.  
 Lachssperma, Salmin 474.  
 — Thymonucleinsäure 379.  
 Lacmoidindikator 11.  
 Lackmuslösung 11.  
 Lactacidogen 358.  
 — Phosphorsäurebest. 857, 871.  
 — fermentative Spaltung 638.  
 Lactalbumin 458.  
 — Gehalt an Aminosäuren 596.  
 Lactase 636.  
 Lactimidprobe auf Hippursäure 289.  
 Lactobionsäure 127.  
 Lactodensimeter 920.  
 Lactoglobulin 465.  
 Lactose 125, s. Milchzucker.  
 Lävoglucosan 128.  
 Lävulinsäure **93**, 108, 118, 124, 127, 358, 382.  
 Lävulose 119, s. Fruchtzucker.  
 — aus Traubenzucker 117.  
 Lamellibranchiaten, Glykokollgehalt des Muskels 857.  
 — Tauringehalt des Muskels 857.  
 Lanocerinsäure 91.  
 Lanolin 929, s. Wollschweiß.  
 Lanopalminsäure 90.  
 Lasseignes Probe (Stickstoff in organischen Substanzen) 50.  
 Laurinsäure 68.  
 — Abscheidung und Trennung von höheren Fettsäuren 68, 80.  
 Leber, Untersuchung 856, siehe drüsige Organe.  
 — Bestandteile 858.  
 — und Leberautolyse:  
 — Äthylalkohol 51.  
 — Ameisensäure 62.  
 — Aminosäuren 858.  
 — Amyloid 558.  
 — Arachidonsäure 76.  
 — Arginase 637.  
 — Bernsteinsäure, Isol. 95.  
 — Buttersäure 858.  
 — Cerebrosid 390.  
 — Cholesterin 858.  
 — Cholesterinester 858.  
 — Cystin 252.  
 — Cytosin, Isol. 868.  
 — diastatisches Ferment 632.  
 — Eiweißstoffe 858.  
 — Eisenablagerungen 436.  
 — Erucasäure 73.  
 — Fettsäuren 858.  
 — Gerontin 213.  
 — Globulin 858.  
 — Glucosamin, Vork. 138.  
 — Glucose, Vork. 114.

- Leber, Glucuronsäureverbindungen 134.  
 — Glycerophosphatase 638.  
 — Glykogen 128.  
 — — Isolierung 129.  
 — Harnsäure 169.  
 — Jecorin 373.  
 — Inosit 284.  
 — Katalase, Isol. 645.  
 — Kreatin, Vork. 158.  
 — Kreatinin, Vork. 160.  
 — Laurinsäure 68.  
 — Leucin 235.  
 — Linolensäure 75.  
 — Linolsäure 74.  
 — Lipase 628.  
 — Lipochrom 437.  
 — Milchsäure, Best. 878, 880.  
 — Myristinsäure 68.  
 — Nuclease 382, **640**.  
 — Nucleoproteid 540.  
 — Nucleosiddesamidase, Darst. 642.  
 — Nucleosidoxydase, Darst. 646.  
 — Ölsäure 72, 73.  
 — Oxalsäure 93.  
 — Phenylalanin 292.  
 — Phosphatase 639.  
 — Phosphatide 858.  
 — Phosphorproteid 549.  
 — Proteasen 622.  
 — Reticulin 490.  
 — Scyllit 286.  
 — Serumalbumin 858.  
 — Serumglobulin 858.  
 — Sphingomyelin 371.  
 — Taurin 858.  
 — Tyrosin 297.  
 — Uricolytisches Ferment, Darst. 642.  
 — Urobilin 429.  
 — Valin 233.  
 Lebercirrhose, Allantoin 155.  
 Lebergalle 908.  
 Lebertran, Asellin 216.  
 — Butylamin 191.  
 — Fett 98.  
 — Hexylamin 191.  
 — Morrhuin 216.  
 — Trimethylamin 190.  
 Lecithine 190, 359, 362, 365, **366**.  
 — s. auch Phosphatide.  
 — Vorkommen 362.  
 — Zusammensetzung 366.  
 — Darst. aus Eigelb 366.  
 — — aus Gehirn und anderen Organen 368.  
 — + Kephalin, Darst. aus Eigelb und Organen 365.  
 — Eigenschaften 368.  
 — optische Eigenschaften 364.  
 Lecithine, Hydrolecithin 364, 368.  
 — Verbindungen 363.  
 — Autooxydation 364.  
 — Umwandlungen 364.  
 — Spaltung 368.  
 — Vork. in Galle 910.  
 — Best. in Galle 915.  
 — aus Knochenmark 854.  
 — Nachw. u. Best. im Gehirn 368, 891.  
 Lecithinfäulnis 364.  
 Lederhaut, Kollagen 486.  
 Légalsche Probe (Acetaldehyd) 58, (Aceton) 60, (Skatol) 309, (Indol) 308.  
 Leichengifte 187, s. Ptomaine.  
 Leichenwachs 69, 70.  
 Leim 486, s. Glutin.  
 Leimsäure 249, 489.  
 Leinöl, Linolsäure 74.  
 Leinwandfilter 4.  
 Leoscher Zucker 120.  
 Leuceine 239.  
 l-Leucin 235.  
 — Vorkommen 235.  
 — Darst. durch Synthese 236.  
 — — des aktiven 236.  
 — Eigenschaften 236.  
 — — optische 238.  
 — Ninhydrinreaktion 219.  
 — Verbindungen 237.  
 — Carbaminat 224.  
 — Uraminosäure 564.  
 — Zersetzungen, Oxydation 238.  
 — Nachweis 238.  
 — Trennung von Isoleucin und Valin 570.  
 — — von Tyrosin 237, 239.  
 — aus Eiweiß 447.  
 — Isol. aus Eiweißhydrolysat 563, 564, 568, 569, 570, 571, 581.  
 — Gehalt einiger Proteine daran 596—599.  
 — Isol. aus Harn 750, 572.  
 — Nachw. in seröser Flüssigkeit 783.  
 — — im Pankreassaft 907.  
 — — im Eiter 824.  
 — — im Muskel 857.  
 — — im Schweiß 918.  
 — — im Talgdrüsensekret 930.  
 — — in Faeces 933.  
 d-l-Leucin 235.  
 d-Leucin 236.  
 l-Leucinanhydrid 506, s. auch Leucinimid 237.  
 l-Leucinimid **237**, 506, 508, 510.  
 — Isol. aus Eiweißhydrolysat 506, 573.  
 l-Leucinsäure 238.  
 l-Leucyl-d-Alaninanhydrid 507, s. Alanylleucinanhydrid.  
 l-Leucyl-Glycin 510.  
 l-Leucyl-glycin-anhydrid 507, s. Glycyl-l-leucinanhydrid.  
 l-Leucyl-d-Glutaminsäure 510.  
 — — Isolierung 507.  
 l-Leucyl-Prolinanhydrid 511, s. Prolyl-l-Leucinanhydrid.  
 l-Leucyl-d-Valinanhydrid 508, **510**.  
 Leukocyten 806, s. Blutkörperchen, weiße.  
 Leukonsäure 285.  
 Leukopoliin 372.  
 Lichenase 635.  
 Licht, Herstellung von Natriumlicht 25.  
 Lieben-Gunnings Probe (Aceton) 60.  
 Liebensch Jodoformprobe (Äthylalkohol) 57, (Acetaldehyd) 58, (Aceton) 59, (Milchsäure) 87, ( $\beta$ -Oxybuttersäure) 89, (Brenztraubensäure) 92, (Lävulinsäure) 93, (Citronensäure) 97.  
 Lieberkühns Alkalialbuminat 457, 495.  
 Liebermanns Probe (sekundäre Amine) 188.  
 — — (Eiweiß) 449.  
 Liebermann-Burchards Probe (Sterine) **327**, 330, 331, 333.  
 — — im Blutextrakt 849.  
 Lieferschütz' Probe (Ölsäure) 73.  
 Lienoprotease, s. Proteasen der Milz 623.  
 Ligamentomucoïd 556.  
 — Verhalten zu Verdauungssäften 556.  
 Ligamentum nuchae, Untersuchung 855.  
 — — Elastin 485.  
 — — Myelin 371.  
 Lignocerinsäure 70.  
 — aus Sphingomyelin 371.  
 — aus Kerasin 396.  
 Linolensäure 75.  
 — Abtrennung von anderen ungesättigten Säuren 83.  
 Linolensäurehexabromid 75.  
 Linolsäure 74.  
 — Abtrennung aus Fettsäuregemischen 83.  
 Linolsäuretetrabromid 74.  
 Linse, Zusammensetzung 892.  
 — Albumoid 490.  
 — Krystalline 466.  
 — Membranin **491**, 982.

- Lipase 628.  
 — Vorkommen 628.  
 — Eigenschaften 629.  
 — Darstellung 628.  
 — Wirkung 629.  
 — — Beeinflussung 630.  
 — Nachw. u. Best. 630.  
 — Vork. im Muskel 857.  
 — — in Leber 858.  
 — — im Duodenalsaft 908.  
 — — im Meconium 944.  
 — Nachw. im Mageninhalte 905.  
 — — im Harn 756.  
 — — im Pankreassaft 907.  
 — — im Darmsaft 908.  
 — — in Faeces 935.  
 Lipliawsky-Arnolds Probe  
 (Acetessigsäure im Harn)  
 738.  
 Lipochrome, Vorkommen 437.  
 — Vork. im Serum 792.  
 — Zusammenhang mit pflanzlichen Carotinoiden 437, 792.  
 — allgemeine Eigenschaften 438.  
 — einzelne Lipochrome 438ff.  
 — Nachw. u. Best. im Serum 794.  
 Lipom, Caprinsäure 68.  
 Lithium 36.  
 — Nachw. in Aschen 654.  
 Lithobilinsäure 341.  
 Lithocholsäure 339.  
 Lithofellinsäure 341.  
 Löslichkeit, Bestimmung 17.  
 Lösungen, empirische 10.  
 Lohnsteins Apparat, Gärungs-saccharimeter 733.  
 Lotahiston 471.  
 — Gehalt an Aminosäuren 596.  
 Lota- (vulgaris-) Sperma,  
 Histon 471.  
 Lückesche Probe (Benzoesäure) 287, (Phenylpropionsäure) 291, (Hippursäure) 289, (Phenylelessigsäure) 291.  
 Lunge, Cerebrosid 390.  
 — Glycerophosphatase 638.  
 — Inosit 284.  
 — Pigment 434, 436.  
 — Protease 622.  
 — Taurin 249.  
 Lutein aus Eigelb 438.  
 Luteine 437, s. Lipochrome.  
 Luteocobaltchlorid, Reagens auf Pyroxyphosphorsäure 47.  
 Lycoperdin 142, 145.  
 Lymphdrüsen, Protease 622.  
 — Reticulin 490.  
 Lymph, Untersuchung 768, s. seröse Flüssigkeiten.
- Lymph, Cholesterinester** 323.  
 — diastatisches Ferment 631.  
 — Fibrinogen 461.  
 — Glucose, Vork. 114.  
 — Harnsäure 169.  
 — Harnstoff 150.  
 — Serumalbumin 452.  
 — Seroglobulin 462.  
 Lysalbinsäure aus Eiereiweiß 458.  
 Lysatin 264.  
 Lysatinin 264.  
 Lysin 262.  
 — Vorkommen 262.  
 — Darstellung 262.  
 — — aus Eiweißhydrolysat, abgekürztes Verfahren 262.  
 — Eigenschaften 262.  
 — — optische 264.  
 — Umwandlungen 264.  
 — Verbindungen 262.  
 — Verhalten bei Aminostickstoffbestimmung 586.  
 — Nachweis 264.  
 — isomere Verbindungen 264.  
 — Isol. aus Eiweißhydrolysat 578.  
 — Gehalt einiger Proteine daran 596—599.  
 — Vork. in serösen Flüssigkeiten 769.  
 — Isol. aus Harn 751.  
 — Isol. aus Muskeln und Organen 868, 869.  
 — — — Trennung von Diaminen 202.  
 — Isomere des 264.  
 Lysinfraktion bei Isol. von Basen aus Organen nach Kutscher 866.  
 Lysinstickstoff, Best. 590.  
 Lysokephalin 365, Anm.  
 Lysolecithin 365 Anm.  
 Lysursäure 263.
- M.**
- Mageninhalt, Nachw. der Säuren** 899.  
 — Gesamtacidität 899.  
 — freie Salzsäure 900.  
 — Milchsäure 901.  
 — flüchtige Fettsäuren 901.  
 — saure Phosphate 901.  
 — Best. der Gesamtacidität 901.  
 — — der Gesamtsäure 902.  
 — — der Gesamtsalzsäure 902.  
 — — der Säuren nebeneinander 904.  
 — — der freien Salzsäure 903.  
 — — der Wasserstoffionen-Konzentration 904.  
 — Nachw. der Fermente 904.
- Mageninhalt, Nachw. u. Best. des Pepsins** 610, 611, 904.  
 — Nachw. u. Best. des Labferments 625, 905.  
 — Nachw. der Lipase 628, 905.  
 — — von Galle 905.  
 — — von Blut 906.  
 — — von Eiweiß 906.  
 — — der freien Fettsäuren 906.  
 — — der Gase 906.  
 — — des Harnstoffes 906.  
 — — des Ammoniaks 906.  
 — — des Zuckers 906.  
 — Gehalt an Buttersäure 64.  
 — — an Essigsäure 63.  
 — — an Hämatoporphyrin 407.  
 — — an Indol 306.  
 — — an Milchsäure 83.  
 — — an Phenylelessigsäure 290.  
 — — an Phenylpropionsäure 290.  
 — — an Propionsäure 64.  
 — — an Rhodan 147.  
**Magensaft** (s. auch Mageninhalte), Allgemeines 899.  
 — reiner, Eigenschaften 899.  
 — Bildung von Plasteinen 503.  
**Magenschleimhaut, Diastase** 632.  
 — Glucosamingehalt 138.  
 — Mucin 552.  
 — Mucoitinschwefelsäure 357.  
 — Pepsin, Darst. 607.  
**Magenwand der Vögel, Keratin** 485.  
**Magnesiämischung, Reagens, Darst.** 945.  
**Magnesium, Vork., Eigenschaften** 37.  
 — Nachw. u. Best. in Aschen 654, 655, 659.  
 — Best., titrimetrisch 660.  
 — Nachw. im Harn 682.  
 — Best. im eiweißfreien Harn 686.  
 — — im eiweißhaltigen Harn 685 Anm., 687.  
 — Best. in Harnsche 687.  
 — Mikrobest. im Blut 828, 829.  
 — Nachw. u. Best. in Knochen 852, 853.  
 — Best. in Gallensteinen 917.  
 — Vork. in Muskeln u. Organen 858.  
**Magnesiumcarbonat, Nachw. in Aschen** 655.  
 — in Harnsteinen 766.  
**Magnesiumphosphat, Nachw. in Aschen** 655.  
 — in Harnsteinen 764, 765, 766.

- Maikäfer, Isol. von Basen 864.  
 — Arginin 259.  
 — Cholin 195.  
 — Leucin 235.  
 — Lysin 262.  
 — Melolonthin 213.  
 — Putrescin 209.  
 — Tyramin 206.  
 Maja squinado-Eier, Lutein 439.  
 Makrelensperma, Scomberhiston 471.  
 — Scombrin 471.  
 — Scombron 481.  
 Maleinsäure 277.  
 Maltase 636.  
 — Vorkommen 636.  
 — Nachweis 636.  
 — Nachw. im Speichel 895.  
 — im Pankreassaft 907.  
 — im Darmsaft 908.  
 Maltobionsäure 124.  
 Maltose 123.  
 — Entstehung 123.  
 — Vork. im Muskel 857.  
 — Eigenschaften 123.  
 — optische Eigenschaften 124.  
 — Verbindungen 123.  
 — Umwandlungen 124.  
 — Oxydation 124.  
 — Nachweis 124.  
 — — in Organen 869.  
 — Best. der durch Speichelferment gebildeten neben Glucose 895.  
 Maltoseanhydrid 127 Anm.  
 Mandel-Neubergs Probe (Glycerin) 55.  
 Mangan, Vork., Eigenschaften 39.  
 — Nachweis 40.  
 — — in Aschen 655.  
 Mannose aus Traubenzucker 117.  
 — aus Fruchtzucker 120.  
 Marcitin 215.  
 — Isol. aus Fäulnisgemisch 218.  
 Martamsäure 382.  
 Maschkes Probe (Kreatinin) 163.  
 Maßanalyse 10.  
 Mastixsuspension, zur Entfernung von Eiweiß aus seröser Flüssigkeit 774.  
 Meconium, Untersuchung 944.  
 — Harnsäure 169. }  
 Melanin 434.  
 — Vorkommen 434.  
 — allgemeine Eigenschaften 435.  
 — isolierte Melanine 435.  
 — — Melanogene 436.  
 Melanin, Umwandlungen 436.  
 — Fermentative Bildung 434, 647.  
 Melanogen im Harn, Nachw. 759.  
 Melanoidine 436.  
 Melanoidinsäuren 436.  
 Melissylalkohol 53.  
 Melolonthin 213.  
 Membranfilter 5.  
 Membranine, tierische 482, 491, 892.  
 Mentholglucuronsäure 135, 355.  
 Mephitis mephitis 56, s. Stinktier.  
 Mercaptane 55.  
 — aus Eiweiß 486.  
 Mesenteriallymphdrüsen, Ablagerung von Ferrihydroxyd 436.  
 Mesobilinrubin 422, 423, 424.  
 Mesobilirubinogen 422, 423.  
 — Übergang in Urobilin 423, 424, 429.  
 Mesohämin 406, 412.  
 Mesoporphyrin 270, 406, 411.  
 — Salzsäurezahl 413.  
 Mesoporphyrinogen 411, 412.  
 Metacholesterin 331, s. Cholesterin.  
 Metalbumin 552, s. Pseudomucin.  
 Metaproteine 446, 494.  
 Methämoglobin 527.  
 — aus Oxyhämoglobin 523.  
 — aus Kohlenoxydhämoglobin 526.  
 — Trennung von Hämoglobin und Oxyhämoglobin 525.  
 — Bildung und Vork. 527.  
 — Darstellung 528.  
 — Zusammensetzung 528.  
 — Eigenschaften 529.  
 — Spektrum 529.  
 — Umwandlung in Hämoglobin 529.  
 — — in Cyanhämoglobin 530.  
 — Nachweis 530.  
 — Unterschied gegen Hämatin 529.  
 — Nachw. im Harn 758.  
 — — in serösen Flüssigkeiten 794.  
 Methan in Faeces 940.  
 d-Methyläthyllessigsäure 66.  
 Methyläthylmaleinsäureanhydrid 271.  
 Methyläthylmaleinsäureimid 271, 275, 276, 424.  
 d- und l-β-Methyl-β-äthylpropionsäure 67.  
 3,4-Methyläthylpyrrol 272, 276.  
 — Abtrennung aus Hämopyrrolgemisch 273.  
 Methylamin 189.  
 — aus Kreatin 159.  
 — aus Glykokoll 228.  
 — Verhalten bei Aminostickstoffbest. 587.  
 — Isol. aus Fäulnisgemisch 217.  
 — Verwechslung mit Äthylsulfid 57.  
 7-Methyl-2-Amino-6-Oxypurin 169, s. Epiguanin.  
 α-Methylantracen aus Carmin und Kermessäure 443, 444.  
 Methylchinolin 212.  
 Methylderivate der Eiweißstoffe 516.  
 Methylidibutyllessigsäure 436.  
 1-Methyl-2,6-Dioxypurin 169, s. 1-Methylxanthin.  
 7-Methyl-2,6-Dioxypurin 169, s. Heteroxanthin.  
 Methylenblau, Verhalten zu Oxydasen 644, 647.  
 Methylglyoxal, fermentative Umwandlung 644.  
 Methylguanidin 203.  
 — aus Kreatin 159.  
 — aus Kreatinin 162.  
 — Isol. aus Fäulnisgemisch 217.  
 — aus „Argininfraktion“ 579, 866.  
 — Isol. aus Harn 717.  
 — — aus Muskeln 863.  
 — Vork. in Leber 858.  
 Methylguanidinpropylamin 205.  
 7-Methylguanin 169, s. Epiguanin.  
 Methylhexylpyrrol 277, siehe Chitopyrrol.  
 Methylhydantoin aus Kreatinin 163.  
 Methylimidazol aus Traubenzucker 117.  
 — aus Maltose 124.  
 — aus Milchzucker 126.  
 — aus Pentose 112, 113.  
 Pr.-3-Methylindol 308, siehe Skatol.  
 Methylmercaptan 55.  
 — aus Cystin 256.  
 — aus Eiweiß 447, 489.  
 — aus Keratin 482,  
 — in Faeces 934.  
 Methylglykogen 130.  
 Methylorange als Indikator 11.  
 Methylornithin 264.  
 Methylstärke 128.  
 Methylphenylhydrazin als Zuckerreagens 108.  
 Methylpyridin, Isol. aus Harn 717.

- Methylpyridiniumhydroxyd 211.  
 — Isol. aus Muskeln und Organen 868.  
 N-Methylpyrrolidonoxy-carbon-säure 436.  
 — im Harn nach Tryptophan-gaben 436.  
 Methylrot als Indikator 11.  
 Methylsulfosäure aus Eiweiß 448.  
 5-Methyluracil 164, s. Thymin.  
 Methylviolett zum Nachw. freier Salzsäure 900.  
 — Färbung mit Amyloid 558.  
 1-Methylxanthin 169, 182, 183.  
 — Darst. aus Harn 186.  
 — Trennung von Hetero-xanthin und Xanthin 186.  
 3-Methylxanthin 183.  
 7-Methylxanthin 169, 183, s. Heteroxanthin.  
 Metts Verfahren zur Pepsin-bestimmung 611.  
 Miesmuschel, s. *Mytilus edulis*.  
 Mikroanalytische Methoden, Allgemeines 825.  
 — Best. von Acetonkörpern im Blut 847.  
 — Alkalireserve im Blut 830  
 — Ammoniak im Blut 838.  
 — — im Harn 696.  
 — Calcium in Aschen 658.  
 — — im Blut 827, 830.  
 — Chloride im Blut 832.  
 — Cholesterin im Blut 792, 848.  
 — Eisen in Aschen 663.  
 — — im Blut 830.  
 — Eiweißkörper im Blut 838.  
 — Fettsäuren im Blut 848.  
 — Glucose im Blut 844.  
 — — im Harn 734.  
 — Harnsäure im Blut 842.  
 — Harnstoff im Blut 840.  
 — — im Harn 703.  
 — — in Organen 874.  
 — Kalium in Aschen 657.  
 — — im Blut 826.  
 — Kreatin im Blut 842.  
 — Kreatinin im Blut 841.  
 — — im Harn 708.  
 — Magnesium im Blut 828, 829.  
 — Natrium im Blut 826.  
 — Phosphor im Blut 832, 833, 834, 835.  
 — Schwefelsäure 670.  
 — Stickstoff, Gesamtstickstoff 699, 700, 836.  
 — — Reststickstoff im Blut 839.  
 Mikronephelometrie 24.  
 Mikropolarisation 30.  
 Mikrorespirometer 647.  
 Milch, Untersuchung 918.  
 — Bestandteile der Milch-kügelchen 918.  
 — — des Milchplasmas 919.  
 — Zusammensetzung 919.  
 — — des Colostrums 919.  
 — spez. Gewicht 920.  
 — Reaktion 920.  
 — Verhalten verschiedenen Einwirkungen gegenüber 920.  
 — Gerinnung durch Mikro-organismen 921.  
 — — durch Labferment 921.  
 — qualitative Untersuchung 921.  
 — Isol. von Casein 542.  
 — Nachw. von Casein 922.  
 — — von Albumin + Globu-  
 lin 922.  
 — — von Fett, Phosphatid,  
 Cholesterin 922.  
 — — von Milchzucker, Salzen  
 922.  
 — Best. des Trockenrück-  
 standes 922.  
 — — des Gesamtstickstoffs  
 676, 922.  
 — — einzelner anorganischer  
 Bestandteile 922.  
 — — des Gesamtproteinge-  
 halts 923.  
 — — von Casein, Albumin  
 + Globulin, Fett 924.  
 — — von Casein, der übrigen  
 Proteinstoffe, Fett 925.  
 — — von Casein (+ Globulin)  
 und Albumin 925.  
 — — des Fettes 926, Tabelle  
 dazu 952.  
 — — des Milchzuckers 927.  
 — — des Stickstoffs und der  
 Extraktivstoffe 928.  
 — — der Citronensäure 96,  
 929.  
 — Essigsäuregärung 63.  
 — Einzelbestandteile,  
 Vorkommen:  
 — Adenin 180.  
 — Allantoin 155.  
 — Aminosäuren 218.  
 — Asparaginsäure 242.  
 — Cholesterin 323, Best. 924.  
 — Citronensäure 96, Isol. 96,  
 Best. 929.  
 — Dehydrase, Isol. 644.  
 — Fett 98.  
 — Glutaminsäure 244.  
 — Glykokoll 225.  
 — Guanin 176.  
 — Gummi, tierischer 146.  
 — Harnsäure 169.  
 Milch, Einzelbestandteile:  
 — Harnstoff 150.  
 — Inosit 284.  
 — Kreatinin 160.  
 — Lactalbumin, Isol. 458.  
 — Lactoglobulin, Isol. 465.  
 — Lactose, Isol. 125, Best. 927.  
 — Leucin 235.  
 — Nuclease 640.  
 — Orotsäure 168.  
 — Oxydase, Isol. 644.  
 — Phosphatide 362.  
 — Phosphorproteide 541.  
 — Protamin 469.  
 — Rhodan 147.  
 — Serumglobulin 462.  
 — Tyrosin 297.  
 — Vitamin 216.  
 Milchdrüse, Nuclease 640.  
 — Nucleoproteid 540.  
 Milchwett, Lipochrom 437.  
 Milchsäure 83.  
 — Vorkommen 83.  
 — — in Dünndarminhalt 932.  
 — — in Eiter 824.  
 — — in Glaskörper 893.  
 — — in Humor aqueus 893.  
 — — in Leber 858.  
 — — in Muskel 857.  
 — Darst. der d-l-Säure 84.  
 — Isol. aus Muskel 84.  
 — Trennung von Bernstein-  
 säure 86.  
 — Darst. der aktiven Säure 85.  
 — Bildung, fermentative, aus  
 Lactacidogen 638.  
 — — fermentative, durch Gly-  
 oxalase 644.  
 — — durch Oxydase 646.  
 — — aus Alanin 230.  
 — — aus Glucose 117.  
 — — aus Inosit 285.  
 — Eigenschaften 85.  
 — Oxydationsprodukte 87.  
 — Reaktionen 87.  
 — Nachw. u. Best. in Harn 746.  
 — Best. in serösen Flüssig-  
 keiten 790.  
 — — im Eiter 791.  
 — Isol. aus Speichel 84, 893,  
 894, 896.  
 — — aus Organen 84, 860.  
 — Nachw. im Mageninhalt  
 900, 901.  
 — — in Faeces 939.  
 — — in Knochen 852.  
 — — u. Best. in Muskeln und  
 Organen 861, 878, 880.  
 — Mikrobest. in Blut und Or-  
 ganen 649.  
 Milchsäuregärung 84, 127.  
 Milchserum 921.  
 Milchzucker 125.



- Milchzucker, Vorkommen 125.  
 — Darst. aus Milch 125.  
 — Isol. aus Harn 125.  
 — Reduktionsvermögen 126.  
 — Verbindungen 126.  
 — Umwandlungen 126.  
 — optisches Verhalten 126.  
 — Nachweis 127.  
 — — im Harn 734.  
 — — in der Milch 922.  
 — Best. in der Milch 927.  
 — — durch Polarisierung 928.  
 — — durch Titration 928.  
 — — durch Colorimetrie 928.  
 Millons Probe (Eiweiß) 449,  
 (Oxysäuren) 295, 296, (Phe-  
 nole) 280, 282, (Tryptop-  
 han) 316, (Tyrosin) 282,  
 301, (Dioxyphenylalanin)  
 306, (Homogentisinsäure)  
 304.  
 Millons Reagens, Darst. 945.  
 Milz, Vork. von Ameisensäure  
 62.  
 — — von Amyloid 558.  
 — — von Arginin 259.  
 — — von Bernsteinsäure 94,  
 858.  
 — — von Buttersäure 64.  
 — — von Cerebrosid 390.  
 — — von Cholin 195.  
 — — von Essigsäure 63.  
 — — von Inosit 284.  
 — — von Kreatin 158.  
 — — von Nuclease 382, 640.  
 — — von Nucleinsäure 389.  
 — — von Nucleoproteid 538.  
 — — von Phosphatase 639.  
 — — von Protease 622.  
 — — von Purindesamidase  
 und -oxydase, Isol. 642.  
 — — von Reticulin 490.  
 — — von Scyllit 286.  
 — — von Thymin 164.  
 — — von Tryptophan 313.  
 Mingin 216.  
 — Isol. aus Harn 717.  
 Mirgelin 215.  
 — Isol. aus Muskeln 867.  
 Mörners Probe (Tyrosin) 301,  
 (Chondroitinschwefelsäure)  
 357.  
 Molischs Probe (Kohlenhydrat)  
 106; (Eiweiß) 450.  
 Molken 921.  
 — Orotsäure 168.  
 Molkeneiweiß 544.  
 Mollusken, Farbstoffe 441, 531.  
 — Taurin 249.  
 Molybdänsaures Ammonium,  
 Reagens, Darst. 945.  
 Monamine 187, vgl. Amine.  
 Monaminodiphosphatide 372.  
 Monaminomonophosphatide  
 362.  
 Monaminosäuren, s. auch  
 Aminofettsäuren.  
 — Trennung von Diamino-  
 säuren 574, 577.  
 — — von Aminodicarbon-  
 säuren 560.  
 Monaminosäurenstickstoff,  
 Best. 582, s. Aminostick-  
 stoffbestimmung.  
 Monoacetyldiglucoamin aus  
 Chitin 144.  
 Monobenzoylornithin 258, 259,  
 290.  
 Monobromcoccin 443.  
 Monobutyryn für Lipasenach-  
 weis 631.  
 Monosaccharide 106, vgl. auch  
 Hexosen und Pentosen.  
 Mooresche Probe (Kohlenhy-  
 drate) 106.  
 Morrhuin 216.  
 Mucinähnliche Substanz im  
 Harn, Nachw. 725.  
 Mucinalbumose 551.  
 Mucine und Mucoide, s. auch  
 Glucoproteide 550.  
 — Natur des Kohlenhydrats  
 356, 357.  
 — Nachw. u. Best., s. Gluco-  
 proteide.  
 — Einteilung 550.  
 — glucosaminhaltige Gluco-  
 proteide 551.  
 — — chondrosaminhaltige  
 Glucoproteide 555.  
 — Glucoproteide mit unbe-  
 kanntem Kohlenhydrat  
 557.  
 Mucin der Barscheier 558.  
 — des Darmsafts, Nachw.  
 908.  
 — des Dünndarminhalts 932.  
 — des Mageninhalts, Nachw.  
 906.  
 — der Magenschleimhaut 552.  
 — des Nabelstrangs 552.  
 — des Nasensekrets, Isol. 896,  
 898.  
 — der Ovarialcysten, Pseudo-  
 mucin 552, Paramucin 553.  
 — der Schleimhaut der Luft-  
 wege 552.  
 — der Schnecken 557.  
 — des Speichels, Nachw. 895.  
 — der Submaxillardrüse 551.  
 — der Synovia, Serosamucin  
 557.  
 — in Faeces, Nachw. 935.  
 — in Galle, Nachw. 911.  
 — in Knochenmark, Nachw.  
 854.  
 Mucin in serösen Flüssigkeiten,  
 Nachweis 772.  
 — in Sputis, Nachw. u. Best.  
 898.  
 Mucinogen, Schneckenmucin  
 558.  
 Mucoid aus Aorta 557.  
 — aus Bindegewebe, Nachw.  
 856.  
 — aus Blutserum 554.  
 — aus Cornea 555.  
 — aus Glaskörper 555, 893.  
 — aus Harn 558.  
 — aus Hühnereiweiß, Ovo-  
 mucoid 554.  
 — aus Knochen, Osseomucoid  
 556.  
 — aus Knorpel, Chondro-  
 mucoid 555, Nachw. 855.  
 — aus Ligamentum nuchae  
 556.  
 — aus Sehnen, Tendomucoid  
 555.  
 Mucoitin 357.  
 Mucoitinschwefelsäure 138, 147,  
 357, 550.  
 Mucosin 357.  
 Murexarten, Farbstoff 441.  
 Murexeierschalen, Conchiolin  
 492.  
 Murexid 173.  
 Murexidprobe 173.  
 Muscarin 197.  
 Muschelbyssus 492.  
 — Gehalt an Aminosäuren 598.  
 Muscheln, s. auch Mytilus  
 edulis.  
 — Basen, Isolierung 864.  
 — Betain, Vork. 198, 857.  
 — Methylpyridiniumhydroxyd  
 211.  
 Muschelschalen, Conchiolin  
 492.  
 Muskel, Allgemeines 856.  
 — Bestandteile 857.  
 — Einzelbestandteile, vgl.  
 Fleisch und Fleischextrakt.  
 — Best. des Ammoniaks 873.  
 — — des Harnstoffs 874.  
 — — der Nucleinbasen 875.  
 — — der Gesamtphosphor-  
 säure 870.  
 — — der Phosphorsäure in  
 den verschiedenen Bin-  
 dungsformen 870.  
 — — der Lactacidogenphos-  
 phorsäure 871.  
 — — der Nichtlactacidogen-  
 phosphorsäure 872.  
 — — der Phosphatidphos-  
 phorsäure 872.  
 — — des Gesamtkreatins 874,  
 860.

- Muskel, Best. des Kreatinins 875, 861.  
 — — des Carnosins 877.  
 — — der Aminosäuren 877.  
 — — des Alkohols 878.  
 — — von Cholesterin + Cholesterinestern 888.  
 — Isol. von Lactacidogen 358.  
 — — des Ferments des Lactacidogens 638.  
 — — von Myogen 459.  
 — — von Myosin 460.  
 — — von Myokynin 867.  
 — glatte, Globulin 461.  
 Muskel und drüsige Organe, Nachw. der Proteinstoffe 858.  
 — Isol. der Proteinstoffe 858.  
 — Nachw. d. anorganischen Salze 858.  
 — — des Harnstoffes 860.  
 — — u. Isol. der Milchsäure 84, 860, 861.  
 — Best. der Milchsäure 878, 880.  
 — — — Mikrobest. 849.  
 — — der flüchtigen Fettsäuren 860.  
 — — des Inosits 860, 861.  
 — — der Bernsteinsäure, Fumarsäure, Oxalsäure 860.  
 — Isol. von Kreatin, Nucleinbasen 860.  
 — — von Kreatinin, Taurin 861.  
 — — von Carnosin, Carnitin 861.  
 — Best. von Carnosin 877.  
 — Isol. von Methylguanidin 858, 863.  
 — — von Inosinsäure 376.  
 — — u. Best. von Glykogen 128, 881.  
 — — von Basen nach Kutscher 864.  
 — — u. Best. der Purinbasen 860, 865.  
 — — von Basen aus autolytierten drüsigen Organen nach Kutscher 868.  
 — — u. Best. von Monoaminosäuren 869, 877.  
 — — u. Nachw. von Alkohol 869.  
 — Nachw. von Zucker 869.  
 — — von Oxydasen 646, 647.  
 — — von Phosphatiden 870.  
 — — von Proteasen 624.  
 — — u. Best. der gebundenen Pentose 869, 880.  
 — Best. von Alkohol 878.  
 — — der Harnsäure 876.  
 — — von Kollagen 872.
- Muskel und drüsige Organe, Best. der Nucleinbasen, freie + gebundene 875.  
 — Best. von Trockenrückstand, Gesamtstickstoff, einzelnen anorganischen Bestandteile 870.  
 — — der Acetonkörper 877.  
 Muskelfarbstoff 519.  
 — Beziehung zum Blutfarbstoff 519.  
 Muskelnucleoproteid 540.  
 Musophagiden, Turacin 444.  
 Mutarotation 27.  
 Mydatoxin 213.  
 Mydin 215, s. auch Tyramin 207.  
 Myelin 370.  
 Myelinformen in Sputis 897 Anmerkung.  
 Mykosin 144.  
 Mylius'Jodreaktion (Cholsäure) 336.  
 Myogen 459.  
 — Darst. aus Muskelpreßsaft 459, 858.  
 — Unterschied gegen Myosin 459.  
 — Nachw. in Muskeln 858.  
 Myogenfibrin 459.  
 — lösliches 459.  
 Myokynin 200.  
 — Isol. aus Muskel 867.  
 Myoprotein 459, s. Myogen.  
 Myosin 460.  
 — Isol. aus Muskel 460, 858, 859.  
 Myosinfibrin 460.  
 Myosinogen, s. Myogen 459.  
 Myricylalkohol 53.  
 Myristinsäure 68.  
 — Vork. in Leber 858.  
 Mytilit 286, 858.  
 Mytilotoxin 214.  
 Mytilus edulis, Arginin 259.  
 — Betain 198.  
 — Conchiolin 492.  
 — Mytilit 286.  
 — Mytilotoxin 214.  
 — Taurin 249.  
 Myxom, Glucosamingehalt 138.
- N.
- Nabelstrang, Mucin 552.  
 Nackenband des Rindes, siehe Ligamentum nuchae.  
 Nägel, Keratin 482.  
 $\beta$ -Naphthalinsulfoverbindung, der Aminofettsäuren 222.  
 — der Dipeptide 507.  
 $\beta$ -Naphthalinsulfoglycyld-Alanin, Darst. 507.  
 — Eigenschaften 508.
- $\beta$ -Naphthalinsulfoglycyl-l-tyrosin 509.  
 $\alpha$ -Naphthylisocyanatverbindungen der Aminofettsäuren 223.  
 Nasenknorpel, s. Knorpelgewebe.  
 Nasensekret, Untersuchung 896.  
 — Bestandteile 896.  
 — Rhodanwasserstoff 147.  
 Nasensteine, Untersuchung 897.  
 Natrium, Vork. Eigenschaften 36.  
 — Nachweis 36.  
 — — u. Best. in Aschen 654, 655.  
 — — im Harn 682.  
 — Best. im Harn 684, 687.  
 — — im Blut 656.  
 — Mikrobest. im Blut 826.  
 — Nachw. u. Best. in Harnsteinen 765, 767.  
 — — in Knochen 852, 853.  
 — Vork. in Muskeln und Organen 858.  
 Natriumlampe 25.  
 Natriumlicht, Herstellung 25.  
 Natriumphosphat für Pufferlösungen 602.  
 Natriumpresse von Koßel 12.  
 Natriumwismutjodidlösung, Herstellung nach Kraut 863.  
 Natronlauge, spez. Gew., Tabelle 947.  
 Nebennieren, Adrenalin, Isol. 207.  
 — — Bestimmung 878.  
 — Basen, Isol. nach Autolyse 864.  
 — Cerebrosid 390.  
 — Cholin 195.  
 — Inosit 284.  
 — Jecorin 373.  
 — Lipochrom 437.  
 — l-Methylxanthin 183.  
 — Neurin 197.  
 — Nucleoproteid 539.  
 — Phosphatide 362, 372.  
 — protagonartige Stoffe 374.  
 — Proteasen 622.  
 — Sphingomyelin 371.  
 Neosin 214, 866, 868.  
 Neottin 372.  
 Nephelometer nach Kleinmann 22.  
 Nephila madagascariensis, Seide 492.  
 Nephrorosein 432, 433.  
 Nerven, s. Gehirn 888.  
 Neßlers Reagens, Darst. 945.  
 Netzhaut, Guanin 176.

- Netzhaut, Pigment 434.  
 — Sehpurpur 444.  
 Neumanns Veraschungs-  
 methode 652.  
 Neuridin 213, s. auch Cadaverin  
 202.  
 — Isol. aus Fäulnisgemischen  
 217.  
 Neurin 197.  
 — Isol. aus „Lysinfraktion“  
 867.  
 Neurokeratin 484.  
 — Gehalt an Aminosäuren 598.  
 — Isol. u. Nachw. im Gehirn  
 890.  
 Nichtaminostickstoff im Ei-  
 weiß, Best. 590.  
 Nichtlactacidogenphosphor-  
 säure im Muskel, Best. 872.  
 Nicolsches Prisma 26.  
 Nicotinsäure 215.  
 Niederschläge, Auswaschen 5.  
 Niere, Amyloid 558.  
 — Betain 198.  
 — Cerebrosid 390.  
 — Cholesterin 323.  
 — Cholesterinester 324.  
 — Chondroitinschwefelsäure  
 356.  
 — Cystin 252.  
 — Ferment des Lactacidogens  
 638.  
 — Glycerophosphatase 638,  
 — Harnsäure 169.  
 — Inosit 284.  
 — Kreatin 158.  
 — Linolensäure 75.  
 — Linolsäure 74.  
 — Nuclease 640.  
 — Phosphatase 638, 639.  
 — Phosphatide 372.  
 — Phosphorproteide 549.  
 — Protease 622.  
 — Reticulin 490.  
 — Scyllit 286.  
 — Sphingomyelin 371.  
 — Taurin 249.  
 Nierensteine 761, vgl. auch  
 Harnsteine.  
 — Harnsäure 169.  
 — Oxalsäure 93.  
 Ninhydrinreaktion 139, 219,  
 625.  
 Nitrile bei der Zersetzung des  
 Eiweißes 447.  
 Nitroarginin 515.  
 Nitrobenzoesäure aus Eiweiß  
 448.  
 — aus Keratin 484.  
 — aus Spongin 493.  
 Nitrobenzol aus Benzoesäure  
 287.  
 Nitroclupein 515.  
 Nitrofibroin 492, 515.  
 Nitrohiston 515.  
 Nitroimidazolcarbonsäure aus  
 Eiweiß 448.  
 Nitrokokkussäure 443.  
 Nitroprussidnatriumreaktion  
 44, 93, 252, 309, 450, s. auch  
 Legals und Weils Probe.  
 — im Eiweiß 450, 468.  
 Nitrosalmin 515.  
 Nitrosokreatinin 163 Anm.  
 Nitrosturin 480, 515.  
 Nitrosubstituierte Eiweißstoffe  
 515.  
 — Nitrotyrosin 300, 515.  
 4-Nitrotoluol-2-sulfoverbindingen  
 der Aminofettsäuren 222.  
 Norizuckersäure 141.  
 Norleucin 241, 447.  
 Normallauge, Herstellung 12.  
 Normallösungen 10.  
 Normalnatronlauge 12.  
 Normaloxalsäure 12.  
 Normalsäure, Herstellung 12.  
 Normalschwefelsäure 12.  
 Novain 214, s. auch Carnitin  
 199.  
 — Isol. aus Harn 717.  
 Nubecula, Mucoid 558.  
 Nuclease, Bezeichnung 639.  
 — Vorkommen 640, 858.  
 — Isol. u. Nachw. 640.  
 Nucleinbasen 174, s. auch  
 Purinbasen.  
 — Isol. aus Organen 865.  
 — und Pyrimidinbasen, Isol.  
 aus der Thymonucleinsäure  
 384.  
 — Isol. aus Harn 186.  
 — Best. in serösen Flüssig-  
 keiten 783.  
 — Nachw. u. Best. in Faeces  
 935, 941.  
 — — — in Muskeln 860, 875.  
 Nucleine 541.  
 — im Eiterserum, Isol. 825.  
 Nucleinsäuren, einfache 375.  
 — gekoppelte 376, 388.  
 — Kohlenhydratgehalt 375.  
 — Phosphorgehalt 375.  
 — Purinbasengehalt 375.  
 — Pyrimidinkörpergehalt  
 375.  
 — Verhalten zu Fermenten  
 639, s. Nuclease.  
 — — zu Protaminen 535, 536.  
 — Bindung in Nucleoproteiden  
 533.  
 — Nachw. der Purinbasen 383.  
 — Isol. der Nuclein- und Pyri-  
 midinbasen aus Thymo-  
 nucleinsäure 384.  
 Nucleinsäuren, Isol. von Nu-  
 cleosiden und Nucleotiden  
 aus Hefenucleinsäure 386,  
 387, 388.  
 — Nachw. im Sperma 932.  
 — Weiteres vgl. die einzelnen  
 Nucleinsäuren.  
 Nucleoalbumine, s. Phosphor-  
 proteide 541.  
 — aus Rindergalle 549.  
 Nucleohiston aus Thymus 535.  
 — Histon, Darst. 470.  
 Nucleon 550.  
 — aus Fleisch 550, s. Phosphor-  
 fleischsäure.  
 — Nachw. in Milch 922.  
 — Vork. im Sperma 931.  
 Nucleoprotamin 534.  
 Nucleoproteide 445, 518, 533.  
 — Vorkommen 381, 533.  
 — Darstellung 533.  
 — allgemeine Eigenschaften  
 533.  
 — Veränderlichkeit 534.  
 — Phosphorgehalt 533.  
 — Eisengehalt 533.  
 — künstliche Darst. 535, 536.  
 — Nachweis 534.  
 — Nachw. in seröser Flüssig-  
 keit 772.  
 — — im Eiter 824, Isol. 825.  
 — — in Faeces 935.  
 — — in Muskeln 857.  
 — — in Knochenmark 854.  
 — Vork. in Sputis 897.  
 Nucleoproteid der Pankreas-  
 drüse, Darst. von Guanyl-  
 säure 377.  
 — Vork. in Sputis 897.  
 — — im Pankreassaft 907.  
 — — im Meconium 944.  
 — — im Sperma 931.  
 — aus Thymus, Isol. 535.  
 — aus lymphatischen Organen  
 538.  
 — aus Milz 538.  
 — aus Gänseblutkörperchen  
 538.  
 — aus Knochenmark 539.  
 — aus Nebennieren 539.  
 — aus Thyreoidea 539.  
 — aus Leber 540, 858.  
 — aus Pankreas 536, 907.  
 — aus Trockenpankreas 537.  
 — aus Hepatopankreas (Oc-  
 topus) 540.  
 — aus Submaxillardrüse 540.  
 — aus Milchdrüse 540.  
 — aus Placenta 540.  
 — aus Muskeln 540, Nachw.  
 859.  
 — aus Gehirn, Isol. u. Nachw.  
 540, 890.

- Nucleoprotein aus elastischem Gewebe 540.  
 — aus Blutserum 540, Nachw. 772.  
 Nucleosidasen 639.  
 Nucleoside 375, 387.  
 — fermentative Veränderung 641, 642.  
 Nucleothyminsäure 383, siehe Thymosinsäure.  
 Nucleotidase 639.  
 Nucleotide 375, 387.  
 — Vork. in Leber 858.  
 — Best. in Serum 783.  
 Nucleotolphosphorsäure 383, s. Thymosinsäure.
- O.**
- Obermayers Reagens 721.  
 Obermüllers Probe(Cholesterin) 327.  
 Oblitin 200, 867, s. auch Carnitinäthylester.  
 Octadekylalkohol 53.  
 — Isol. aus Talgdrüsen und ähnlichen Sekreten 930.  
 Octopus, Häemocyanin 532.  
 — Hepatopankreas, Nucleoprotein 540.  
 — Melanin 434.  
 — Taurin 249.  
 Öl der Seetiere 98 Anm., 322.  
 Ölsäure 72.  
 — Ölsäuredibromid 73.  
 — Abscheidung und Trennung aus Fettsäuregemisch 83.  
 — in Lecithinen 366.  
 — in Kephalin 369.  
 — isomere 73.  
 Ohrenschmalz, Bestandteile und Untersuchung 930.  
 Olein 101.  
 Oleinalkohol 53.  
 Oleinsäure, s. Ölsäure 72.  
 Onuphis tubicola, Wohnröhren, Kohlenhydrat 132.  
 Opalisin 546, 919.  
 Ophrydium versatile, Cellulose 134.  
 Ophthalmolithin, Guanin 176.  
 Optische Aktivität 24.  
 Optisch aktive Substanz, Best. des Gehaltes einer Flüssigkeit 27.  
 Optische Methoden 17.  
 Orcin, Salzsäurereaktion 108, 137, 354, 375.  
 — im Harn 737.  
 Organe, s. auch Muskel und drüsige Organe.  
 — Reinigen 856.  
 — Zerkleinern 603, 856.  
 — Isol. der Zellen 857.
- Organe, Trocknung 603.  
 — Allgemeines 856.  
 — Muskeln 857.  
 — drüsige 858, vgl. auch Leber, Pankreas, Thymus usw.  
 — Gehirn, Rückenmark, Nerven 888.  
 — Hornhaut, Linse, Glaskörper, Humor aqueus 892.  
 Organextrakte, Gewinnung für Fermentversuche 603.  
 — Bildung von Plasteinen 503.  
 Organpreßsaft, Darst. 603.  
 Organische Stoffe, Allgemeines 49.  
 — Untersuchung auf Stickstoff 49.  
 — — auf Schwefel 50.  
 — — auf Phosphor 50.  
 — — auf Eisen 51.  
 — — auf Halogen 51.  
 — — auf Jod 51.  
 Ornithin 257.  
 — Übergang in Putrescin 201.  
 — Vork. in „Lysinfraktion“.  
 Ornithinbetain 200, s. Myokynin.  
 Ornithursäure 258, 289.  
 Orotsäure 168, 919, 922.  
 Osazone der Zucker 109.  
 Ossealbumoid 491.  
 — Nachw. in Knochen 852.  
 Osseomucoid 556, 852.  
 — Verhalten zu Verdauungssäften 556.  
 — Nachw. in Knochen 852.  
 Ovalbumin 455.  
 — Darst. von kristallisiertem 455.  
 — Zusammensetzung 456.  
 — Molekulargewicht 446.  
 — Phosphor- und Schwefelgehalt 456.  
 — Glucosamingehalt 138, 457.  
 — Koagulation 456, 468.  
 — optische Eigenschaften 457.  
 — Verhalten gegen Säuren und Alkalien 457, 495.  
 — — gegen Nitroprussidnatrium 468.  
 — Reduktionsvermögen 457.  
 — Oxydation zu Oxyprotein 515.  
 — Hydrolyse 457.  
 — Bildung von Hyaloidin 146.  
 — Unterschied von Serumalbumin 457.  
 — Gehalt an Aminosäuren 596.  
 Ovarialcysten, Untersuchung 768.  
 — Allantoin 155.  
 — Buttersäure 64.  
 — Mucoitschwefelsäure 357.
- Ovarialcysten, Pseudomucin 552.  
 — Paramucin 553.  
 Ovarienprotease 622.  
 Ovoglobulin 465.  
 Ovomucin 465, s. Ovoglobulin.  
 Ovomuroid 139, 146, 357, 455, 554.  
 — Gehalt an Aminosäuren 599.  
 Oxalatsteine im Harn 762.  
 — Krystallformen im Harn 718.  
 Oxalsäure 93.  
 — als Urteritersubstanz 12.  
 — aus Eiweiß 447, 448, 490, 493.  
 — Nachw. u. Best. im Harn 718.  
 — Isol. aus Organen 93, 860.  
 — Normallösung 12.  
 — Aufhebung der Blutgerinnung 802.  
 Oxaluramid aus Eiweiß 490.  
 Oxalursäure 154.  
 — Isol. u. Nachw. im Harn 154, 706.  
 Oxamid aus Eiweiß 447, 490.  
 Oxaminsäure aus Eiweiß 490.  
 Oxyaminobernsteinsäure 249.  
 Oxyaminokorksäure 249.  
 Oxyaminosäuren, Abtrennung von Monaminocarbonsäuren 567.  
 — — von Monaminodicarbon-säuren 560.  
 p-Oxybenzoesäure aus Tyrosin 300.  
 — aus Eiweiß 447.  
 p-Oxybenzylhydantoin 299.  
 — zur Abtrennung von Tyrosin aus Aminosäuregemisch 564.  
 Oxybufotalin, s. Bufotalidin 342.  
 $\beta$ -Oxybuttersäure 88.  
 — Isolierung 88.  
 — Verhalten zu Oxydasen 646.  
 — Nachw. u. Best. im Harn 741.  
 — — — nach Magnus-Levy 742.  
 — — — nach Pribram-Schmitz 742.  
 — — — nach Shaffer-Mariott 743.  
 — Best. neben Aceton und Acetessigsäure 744, 745.  
 $\gamma$ -Oxychinolin 322, s. Kynurin.  
 $\gamma$ -Oxy- $\beta$ -Chinolinecarbonsäure 321, s. Kynurensäure.  
 Oxycholesterin 331.  
 Oxydasen, Bezeichnung 642.  
 — Vorkommen 644.

- Oxydasen der Gewebe **645**, 858.  
 — des Bluts 645.  
 — der Milch 644.  
 — der Galle 910.  
 — der Leber 645, 858.  
 Oxydesaminohistidin 267, siehe Imidazolmilchsäure.  
 Oxydiaminosebacinsäure 249.  
 — aus Lebernucleoproteid 249.  
 6-Oxy-2, 8-Dichlorpurin 178.  
 Oxydierte Eiweißstoffe **445**, **514**.  
 Oxydimetrie mittels Peranganat 13.  
 Oxydone 646.  
 Oxydoreduktase 643.  
 Oxyfettsäuren 83.  
 Oxygenase 643.  
 $\beta$ -Oxyglutaminsäure 247.  
 — aus Eiweiß 447.  
 — Isol. aus Eiweißhydrolysat 575, 576.  
 — Gehalt einiger Proteine daran 596—599.  
 Oxyglutarsäuren 137, 247, 513.  
 Oxyhämocyanin 531.  
 Oxyhämoglobin 519.  
 — Darst. nach Hoppe-Seyler 519.  
 — nach Heidelberg 520.  
 — Krystalle 521.  
 — Zusammensetzung 521.  
 — Eigenschaften 522.  
 — Umwandlungen und Spaltungen 523.  
 — Beziehung zum Hämoglobin 523.  
 — — zum Methämoglobin 529.  
 — — zum Muskelfarbstoff 519.  
 — optisches Verhalten 524.  
 — Nachweis 525.  
 — — im Blut 807.  
 — Trennung (mit Hämoglobin) von Methämoglobin, Hämatin, Hämatoporphyrin 525.  
 — Gehalt an Aminosäuren 596.  
 Oxyisobuttersäure 233.  
 — aus Eiweiß 448.  
 $\alpha$ -Oxyisobutyllessigsäure 238.  
 Oxymandelsäure 296, s. Oxyphenylmilchsäure.  
 Oxynitrohydrothymine 384.  
 4-Oxy-3-Nitrophenylalanin 515.  
 Oxyphenacetursäure 295.  
 Oxyphenylacrylsäure 300.  
 p-Oxyphenylalanin, s. Tyrosin 296.  
 p-Oxyphenyläthylalkohol 300, s. Tyrosol.  
 p-Oxyphenyläthylamin **206**, 447.  
 — Isol. aus Muskeln und drüsen Organen 868.  
 Oxyphenylbrenztraubensäure, Verfütterung 303.  
 p-Oxyphenyllessigsäure **295**, 300.  
 — Isol. aus Harn 296.  
 — — aus Fäulnisgemisch 321.  
 — Nachw. im Harn 724.  
 — — in Faeces 936.  
 — aus Tyrosin 300.  
 — aus Eiweiß 447.  
 l-Oxyphenylmilchsäure 296.  
 — aus Tyrosin 300.  
 p-Oxyphenylpropionsäure 295, s. Hydro-p-Cumarsäure.  
 Oxyprolin 279.  
 — aus Eiweiß 447.  
 l-Oxyprolin, Isol. aus Eiweißhydrolysat 563, 571, **573**, 574.  
 — — — mit Hilfe von Methylalkohol 563.  
 — — — mit Hilfe von Propylalkohol 562.  
 — Gehalt einiger Proteine daran 596—599.  
 — Verhalten bei Aminostickstoffbestimmung 587.  
 Oxypropionsäure 83, s. Milchsäure.  
 Oxyprotein 515.  
 Oxyproteinsäure 517.  
 Oxyprotosulfonsäure 489, 514.  
 6-Oxypurin 169, s. Hypoxanthin.  
 $\gamma$ -Oxy- $\alpha$ -Pyrrolidincarbonsäure 279, s. Oxyprolin.  
 Oxyssäuren, aromatische, Nachweis im Harn 724.  
 — Isol. aus Fäulnisgemischen 321.  
 — Nachw. in Faeces 936.  
 — — in Schweiß 918.  
 Oxytryptophan 317.
- P.**
- Palmitin 101.  
 Palmitinsäure 69.  
 — und Stearinsäuregemisch, Erstarrungspunkt 69.  
 — Abscheidung und Trennung 81.  
 — in Lecithinen 366.  
 — krystallisierte Abscheidung in Sputis 897.  
 $\alpha$ -Palmitodistearin 102.  
 Pankreas und Pankreasautolyse, Adenin 180.  
 — Ameisensäure 62.  
 — Cadaverin 202.  
 — diastatisches Ferment 631.  
 — Erepsin 615.  
 — Guanidin 157.  
 — Guanylsäure 373.  
 Pankreas und Pankreasautolyse, Kreatin 158.  
 — Lactase 637.  
 — Lipase 628.  
 — Maltase 636.  
 — Nuclease 382, 640.  
 — Nucleinsäure, gekoppelte 388.  
 — Nucleoproteid 536.  
 — Oxycholesterin 331.  
 — Pentose 112, 113.  
 — Phenylalanin 292.  
 — Phosphatase 639.  
 — Phosphatide 372.  
 — Ribose 112.  
 — Skatosin 215.  
 — Trypsin 614.  
 — Valin 233.  
 — Xylose 113.  
 Pankreas, Trockenpräparat 537, 628.  
 Pankreassaft, Untersuchung 907.  
 — Bestandteile 907.  
 — Nachw. der Fermente 907.  
 — Nachw. u. Best. anderer Stoffe 907.  
 Pankreassteine 907.  
 Papayotin, Bildung von Plastinen 503.  
 — Verhalten zu Protaminen 481.  
 Papierfilter 4.  
 Parabansäure 178.  
 Paracasein 544.  
 Parachymosin 625, s. Labfermente.  
 Paraglobulin 462, s. Serumglobulin.  
 Paraglykocholsäure **343**, **344**.  
 Parahiston 474.  
 Paralbumin von Scherer 552 Anm.  
 Paramilchsäure 84.  
 Paramucin 553.  
 — Glucosamingehalt 138, 146, 553.  
 — Hyaloidingehalt 147.  
 Paramucosin **146**, 553.  
 Paramyelin 370.  
 Paramyosinogen 460, s. Myosin.  
 Paranucleine 542.  
 — aus Casein 545.  
 — aus Ichthulin 548.  
 — aus Vitellin 547.  
 — aus Helicoproteid 559.  
 — Vork. in Faeces 933.  
 Paranucleinsäuren 542.  
 — aus Casein 545, **546**.  
 — aus Vitellin 547.  
 Paranucleoprotagon 375.  
 Paranucleoproteide 541, siehe Phosphorproteide.

- Paraxanthin 169, 182, 184.  
 — Darst. aus Harn 186.  
 — Trennung von Epiguanin, Adenin, Hypoxanthin 187.  
 Parotisspeichel 894.  
 Parvolin 215.  
 Paulys Probe (Histidin) 268, (Eiweiß) 450, (Tyrosin) 301.  
 — im Harn 681.  
 Pecten irradians, Glykokoll 226.  
 — opercularis, Glykokoll 226,  
 — — Taurin 249.  
 Pelamys sarda, Protamin 479.  
 Pennatulaceenachsenskelett 493.  
 Pennatulin 493.  
 Pentamethyldiamin 201, s. Cadaverin.  
 Pentosane bei der Amylumbest. in Faeces 942.  
 Pentosen, Vork. 109.  
 — Eigenschaften 109.  
 — Reaktionen 108.  
 — Arabinose 110.  
 — d-Ribose 112.  
 — l-Xylose 113.  
 — Rhamnose 113.  
 — Nachw. u. Best. im Harn 735.  
 — — — der gebundenen P. in Organen 869, 880.  
 — Best. nach Tollens 880.  
 Penzoldts Probe (Aceton im Harn) 738.  
 Pepsin 606.  
 — Vorkommen 606.  
 — Zymogen 606.  
 — Darst. des Pepsins aus Magenschleimhaut 607.  
 — — — aus Magensaft 608.  
 — Zusammensetzung 608.  
 — Eigenschaften 607, 608.  
 — Veränderung durch Wärme 609.  
 — Fermentwirkung 609.  
 — — Einfluß äußerer Faktoren 609.  
 — Nachweis 610.  
 — Best. der eiweißverdauenden Kraft 610.  
 — Darst. einer peptischen Verdauungsflüssigkeit 613.  
 — Untersuchung eines peptischen Verdauungsgemisches, qualitativ 612.  
 — — — quantitativ 614.  
 — Produkte der Pepsinverdauung 612.  
 — Bildung von Acidalbuminen 494.  
 — — von Albumosen und Pepton 495.  
 — Verhalten zu Bence-Jones' Eiweißkörper 467.  
 Pepsin, Verhalten zu Fibrin 468.  
 — — zu Polypeptiden 505.  
 — — zu Histonen 469, 472.  
 — — zu Protaminen 476.  
 — — zu Keratinen 482.  
 — — zu Koilin 485.  
 — — zu Elastin 485.  
 — — zu Ichthylepidin 486.  
 — — zu Kollagen und Glutin 487, 489.  
 — — zu Reticulin 490.  
 — — zu Knorpelalbumoid 491.  
 — — zu Membranin 492.  
 — — zu Conchiolin 492.  
 — — zu Cornein 492.  
 — — zu Pennatulin 493.  
 — — zu Albumosen 503.  
 — — zu Deuterokeratose 500.  
 — — zu Oxyhämoglobin 523.  
 — — zu Nucleoproteiden 541.  
 — — zu Phosphorproteiden 542.  
 — — zu Desaminoproteiden 515.  
 — — zu Casein 545.  
 — — zu Opalisin 546.  
 — — zu Vitellin 547.  
 — — zu Vitellin-Lecithinverbindung 547.  
 — — zu Ichthulin 548, 549.  
 — — zu Gallennucleoalbumin 550.  
 — — zu Submaxillarmucin 551.  
 — — zu Ovomucoid 554.  
 — — zu Chondro-, Tendo-, Ligamento- und Osseomucoid 556.  
 — — zu Amyloid 559.  
 — — zu Helicoproteid 559.  
 — Nachw. im Harn 756.  
 — — im Mageninhalt 904.  
 — quantitative Schätzung der verd. Kraft 610, 614.  
 — Vork. in Faeces und Meconium 934, 944.  
 Pepsinfibrinpepton  $\alpha$  und  $\beta$  501.  
 Pepsinglutinpepton 501.  
 Pepsinogen 606.  
 Peptide 505.  
 — des Harns 517.  
 — — Nachw. u. Best. 749, 755.  
 Peptidstickstoff, Best. im Harn, Serum 755, 784.  
 Peptine 506.  
 Peptone 445, 447, 495, 500, 502.  
 — Verhalten zu Proteasen 609, 616, 621, 624.  
 — — zu eiweißfällenden Mitteln 451.  
 — bei Oxydation von Eiweiß 514.  
 Peptone, Isol. aus Verdauungsgemischen 500, 614.  
 — Darst. nach Siegfried 500.  
 — — nach Hofmeister 502.  
 — Vork. im Pankreassaft 907.  
 — — im Dünndarminhalt 932.  
 Percaglobulin 465.  
 Percin 478.  
 Pergamentschlauch 4.  
 Perikardialflüssigkeit, Untersuchung, s. seröse Flüssigkeit 768.  
 Perikardialmilchsäure 84.  
 Peritonealflüssigkeit, Untersuchung, s. seröse Flüssigkeit 768.  
 Permanganat, Titration mit 13.  
 Peroxydase 643.  
 Peroxyprotsäure 514.  
 Pettenkofers Probe (Gallensäure) 337.  
 Pflanzen, Phosphatide 373.  
 — Phosphorproteide 541.  
 Phaseomannit 284, s. Inosit.  
 Phenacetornithursäure 291.  
 Phenacetursäure 291.  
 — Darst. aus Pferdeharn 291.  
 Phenacetylglutamin 248, 291.  
 Phenacyl ester der Fettsäuren 61.  
 Phenolase der Gewebe 646.  
 Phenole 281.  
 — Isol. aus Flüssigkeiten 281.  
 — Abtrennung von p-Kresol 281.  
 — Eigenschaften 282.  
 — Nachweis 282.  
 — aus Eiweiß 447, 486.  
 — Isol. aus Fäulnisgemisch 320.  
 — Best. im Blut 791.  
 — Nachw. u. Best. im Harn 719.  
 — — in Faeces 936.  
 — Vork. in Sputis 897.  
 Phenolglucuronsäure 353, 354.  
 Phenolphthalein als Indikator 11.  
 Phenolschwefelsäure 350.  
 — Vorkommen 350.  
 — Darst., synthetische 350.  
 — — aus Harn 350.  
 — Eigenschaften 350.  
 — Vork. im Wollschweiß 930.  
 — Nachw. u. Best. im Harn 719.  
 Phenylacetaldehyd aus Phenylalanin 294.  
 Phenylacetylglutamin 248.  
 Phenyläthylalkohol, Bildung aus Phenylalanin 294.  
 Phenyläthylamin 206, 215, 294.  
 — Trennung von Tyramin 208.

- Phenyläthylamin aus Eiweiß 447, 489.
- Phenylalanin 206, 221, **292**.  
 — Vorkommen 292.  
 — Darstellung 292.  
 — — des aktiven 292.  
 — Eigenschaften 292.  
 — — optische 294.  
 — Umwandlungen 294.  
 — Ninhydrinreaktion 219.  
 — Verbindungen 293.  
 — Carbaminat 224.  
 — Nachweis 294.  
 — aus Eiweiß 447.  
 — Isol. aus Harn 752.  
 — — aus Eiweißhydrolysat 563, 568, 571, **572**.  
 — — als Uraminosäure 569.  
 — Gehalt einiger Proteine daran 596—599.
- l-Phenylalanyl-d-Alanin-anhydrid 506, 508, 511.
- l-Phenylalanylglycinanhydrid 509, s. Glycyl-Phenylalanin-anhydrid.
- Phenylalkylamine 206.
- Phenyl- $\alpha$ -Aminopropionsäure 292, s. Phenylalanin.
- Phenylbrenztraubensäure, Verfütterung 303.
- p-Phenylendiamin zum Nachw. von Oxydasen 646, 647.
- Phenylelessigsäure 290.  
 — aus Phenylalanin 294.  
 — aus Eiweiß 447, 480.  
 — Kuppelung im Körper 248.  
 — Trennung von Phenylpropionsäure 291.  
 — Darst. u. Isol. aus Fäulnisgemisch 320.
- Phenylglucosazon 109, 116.
- Phenylhydrazinprobe auf Zucker 108, 109.  
 — im Harn **727**, 735.
- Phenylisocyanatverbindung der Aminofettsäuren 223.  
 — des Glucosamins 140.
- Phenylmaltosazon, Darst. 123.
- Phenylmilchsäure 294.  
 — Verfütterung 303.
- Phenylpropionsäure 290.  
 — aus Eiweiß 447, 489.  
 — aus Phenylalanin 294.  
 — Darst. u. Isol. aus Fäulnisgemischen 320.  
 — Trennung von Phenylelessigsäure 291.
- Phenylthiohydantoine der Aminosäuren 223.
- Phloroglucin-Salzsäure-Reaktion **108**, 137, 354.  
 — im Harn 737.
- Phloroglucin-Vanillin, Nachw. der freien Salzsäure im Mageninhalt 901.
- Phocaecholalsäure 340.
- Phocaetaurocholsäure 348.
- Phönicinschwefelsäure 318.
- Phonopyrrolcarbonsäuren 276.  
 — Darstellung 273.  
 — Trennung 274.  
 — aus Blutfarbstoffen 402, 407, 411.  
 — aus Gallenfarbstoffen 421, 422, 424.  
 — aus Harnfarbstoffen 415, 424.
- Phosphatasen 637.
- Phosphatide, Allgemeines 362.  
 — Eigenschaften 363.  
 — — optische 364.  
 — Verbindungen 363.  
 — Darstellung 365.  
 — Isol. aus Eigelb 365.  
 — — aus Gehirn 368, 370, 891.  
 — Trennung von Fetten 99.  
 — Hydrierung 364.  
 — Verseifung zur Cholindarstellung 195.  
 — Nachw. u. Best. in serösen Flüssigkeiten 791, 792, 795.  
 — — in roten Blutkörperchen 805.  
 — — im Bindegewebe 856.  
 — — im Eiter und Eiterserum 825.  
 — — in Sputis 897.  
 — — im Sperma 931.  
 — — im Pankreassaft 907.  
 — — in Galle 910, 912.  
 — — in Eisbäregalle 912.  
 — Trennung von gallensauren Salzen 916.  
 — Nachw. u. Best. in der Milch 922, 924, 925.  
 — — in Faeces 939.  
 — — in Knochen 852.  
 — — im Knochenmark 854.  
 — — in Muskeln 857.  
 — — in drüsigen Organen 870.  
 — Vork. in Linse 892.  
 — — im Glaskörper 893.  
 — — in Leber 858.  
 — — im Sekret der Talgdrüse 930.
- Phosphatide, kohlenhydrathaltig, aus Pflanzen 373.
- Phosphatidphosphorsäure, Best. in Organen 872.
- Phosphatsteine im Harn 762.
- Phosphonuclease 639.
- Phosphor, Nachw. in organischen Stoffen 50.
- Phosphorfleisssäure 502, 550.  
 — Nachw. in Muskeln 859.
- Phosphorgehalt der Nucleoproteide 533.  
 — der Nucleinsäuren 375.  
 — der Phosphatide 362.  
 — der Phosphorproteide 541.  
 — des Lactacidogens 358.
- Phosphorglucopeptide 559.
- Phosphorhaltige Proteide, Nachw. in serösen Flüssigkeiten 772.
- Phosphoribonsäure 377.
- Phosphorproteide 445, 518, **541**.  
 — der Galle 909.  
 — der Sputa 897.  
 — der Milch, s. Casein 542.  
 — der Faeces 935.  
 — der Fischeier, s. Ieithuline 547.  
 — der Hühnereier, s. Vitellin 546.  
 — Nachw. u. Best. in serösen Flüssigkeiten 772.
- Phosphorsäure, Vork. 46.  
 — — in Muskeln und Organen 858.  
 — Eigenschaften 46.  
 — Nachweis 47.  
 — — in Aschen 654.  
 — Best. in Aschen 671.  
 — — gewichtsanalytisch 673.  
 — — alkalimetrisch 673.  
 — Mikrobest. 673.  
 — — im Blut, 833, 834, 835.  
 — Nachw. im Harn 682.  
 — — in Harnsteinen 765.  
 — Best. im Harn 693.  
 — Mikrobestimmung im Harn 833.  
 — Best. in Knochen 852, 853.  
 — — in Gallensteinen 917.  
 — — der in Muskeln organisch gebundenen 870, 871, 872.
- Phosphorsulfatide 373.
- Phosphorwolframate der Aminofettsäuren 221.
- Phosphorwolframsäure, Reagens, Darst. 946.
- Photomethämoglobin 530, siehe Cyanhämoglobin.
- Phrenosin 390, s. Cerebron.
- Phthalyldikreatin 159.
- Phylloerythrin 425.  
 — Abhängigkeit vom Chlorophyllgehalt der Nahrung 426.
- Phyllopyrrol 272, **275**.  
 — durch Reduktion von Blutfarbstoff-Derivaten 272.  
 — durch Reduktion von Gallenfarbstoff 421.

- Phyllopyrrol, Abscheidung aus Hämopyrrolgemisch 273.
- Phyllopyrrolcarbonsäure 272, 276.
- Abtrennung aus Hämopyrrolgemisch 274.
- aus Bilirubin 421.
- Phyllopyrrolidin 276.
- Phylloxanthin 427.
- Phymatorhusin 435.
- Physikalische Methoden 14.
- Phytin 284.
- Phytosterin 323.
- Picolin 211.
- Pigmente, s. unter Farbstoffe.
- Pigmentsteine der Galle 916.
- Pigmentzellen, Nachw. in Sputis 898.
- Pikrinsäure aus Eiweiß 448.
- Pinna nobilis Conchiolin 492.
- Byssus, Gehalt an Aminosäuren 598.
- Piperidin, Überführung in Cadaverin 202.
- Einwirkung auf Eiweiß 495.
- Pirias Probe (Tyrosin) 301.
- Piuri 355.
- Placenta, Nucleoproteid 540.
- Inosit 284.
- Phosphatide 372.
- Protease 622.
- Plasma, Untersuchung, vgl. seröse Flüssigkeiten 768.
- Abtrennung aus Blut 803.
- Best. im Blut 817.
- Plasteine 503.
- Gehalt an Aminosäuren 599.
- Platingefäße 7.
- Plattners kristallisierte Galle 343, 912.
- Pleuraflüssigkeit, Untersuchung 768, s. seröse Flüssigkeit.
- Polarisationsapparate 25, 27.
- Polarisationsprobe auf Zucker 107.
- Traubenzuckerbest. im Blut 788.
- Traubenzuckernachw. u. Best. im Harn 728.
- Ausführung der Best. bei sehr geringem Zuckergehalt 728.
- Polarisator nach Lippich 27.
- Polariskop 26.
- Polaristrobometer nach Wild 26.
- Polyoxysäuren aus Zuckern 117, 122.
- Polypeptide 445, 505.
- allgemeine Eigenschaften 505.
- Auftreten bei der Säurehydrolyse von Eiweiß 505, 506.
- Polypeptide, Auftreten bei tryptischer Verdauung von Eiweiß 506.
- Darst. aus schwach hydrolysiertem Eiweiß als Diketopiperazine 506.
- Darst. als  $\beta$ -Naphthalinsulfo-Verbindung 507.
- — als Polypeptide 507.
- Best., alkalimetrisch 582.
- — durch Formoltitration 582.
- — nach v. Slyke 587.
- Erepsinverdauung 621.
- Trypsinverdauung 619.
- Verdauung durch Gewebsproteasen 623.
- s. auch Dipeptidanhidride.
- Polypeptidphosphorsäure 545, 546.
- Polyphenolasen 643.
- Polysaccharide 127.
- Porphyrine, Vork. 407, 408, 414.
- Giftwirkung 409, 412, 416.
- Nachw. im Harn 759.
- — s. auch Koproporphyrin 415 und Uroporphyrin 414.
- Pregls Substanzen aus Harn 518.
- Preßsaft aus Organen 604.
- Primäre Albumosen 496, 498.
- Primnoa lepodifera, Bromgorgosäure 493.
- Probe von:
- Adamkiewicz (Allantoin) 156.
- — (Eiweiß) 449.
- Baeyer (Indol) 307.
- Barfoed (Zucker) 118.
- Barrenscheen u. Weltmann (Harnstoff) 153.
- — (Allantoin) 156.
- Beilstein (Halogen in organischen Substanzen) 51.
- Bial (Pentosen im Harn) 736.
- Boettger (Zucker) 107.
- — im Harn 726.
- Dakin-Kondo (Skatol) 310.
- Denigés (Citronensäure) 97, (Harnsäure) 173, (Tyrosin) 301.
- Edlbacher (Tryptophan) 316.
- — in Eiweiß 449.
- Ehrlich, vgl. unter Ehrlichs Aldehydprobe und Diazo-reaktion.
- Ehrlich-Neubauer (Tryptophan im Eiweiß) 450.
- Fehling (Zucker im Harn) 729.
- — s. auch Trommer.
- Probe von:
- H. Fischer (Koproporphyrin in Faeces) 417, 939.
- Florence (Sperma) 196.
- Fosse (Harnstoff) 152, 701.
- Frommer (Aceton) 60.
- Gallois (Inosit) 286.
- Gerhardt (Acetessigsäure im Harn) 738.
- Gmelin (Bilirubin) 421.
- Goldschmiedt (Glucuronsäure) 137.
- Gunning (Aceton) 60.
- Hammarsten (Gallenfarbstoff) 422, 425.
- Häußler (Citronensäure) 97.
- Heller (Eiweiß) 448, 747, 759.
- Herzog (Milchsäure) 87.
- Hopkins (Indol) 308, (Skatol) 310, (Tryptophan) 316, (Oxytryptophan) 317.
- Hopkins-Fletcher (Milchsäure) 87.
- Hoppe-Seyler (Glucose im Harn) 727, (Kohlenoxydhämoglobin) 527, (Mangan) 40.
- Huppert (Gallenfarbstoff im Harn) 758, (in Faeces) 938.
- Jaffe (Kreatin) 163, (Kynurensäure) 322, (Porphyrine) 431, (Urobilin) 431.
- Jolles (Indoxyl im Harn) 721, (Pentosen im Harn) 736.
- Knoop (Histidin) 268.
- Kondo (Indol) 308, (Skatol) 310.
- Koßel (Adenin und Hypoxanthin) 182.
- Kunckel (Kohlenoxydhämoglobin) 527.
- Lasseigne (Stickstoff in organischen Substanzen) 50.
- Légal (Acetaldehyd) 58, (Aceton) 60, (Indol) 308, (Skatol) 309.
- Lieben (Aceton) 59, (Acetaldehyd) 58, (Äthylalkohol) 52, (Milchsäure) 87, ( $\beta$ -Oxybuttersäure) 89, (Brenztraubensäure) 92, (Lävulinsäure) 93, (Citronensäure) 97.
- Lieben-Gunning (Aceton) 60.
- Liebermann (sekundäre Amine) 188, (Eiweiß) 449.
- Liebermann-Burchard (Sterine) 327, 330, 331, 333, 849.
- Liebschütz (Ölsäure) 73.



## Probe von:

- Liplawsky-Arnold (Acetessigsäure im Harn) 738.
- Lücke (Benzoesäure) 287, (Hippursäure) 289, (Phenyl-essigsäure) 291, (Phenylpropionsäure) 291.
- Mandel-Neuberg (Glycerin) 55.
- Maschke (Kreatinin) 163.
- Millon (Eiweiß) 449, (Dioxyphenylalanin) 306, (Homogentisinsäure) 304, (Oxysäuren) 295, 296, (Phenole) 280, 282, (Tryptophan) 316, (Tyrosin) 282, 301.
- Mörner (Tyrosin) 301, (Chondroitinschwefelsäure) 357.
- Moore (Kohlenhydrate) 106.
- Mylius (Jodreaktion der Gallensäuren) 336.
- Obermüller (Cholesterin) 327.
- Pauly (Histidin) 268, (Tyrosin) 301, (Eiweiß) 450.
- — im Harn 681.
- Penzoldt (Aceton im Harn) 738.
- Pettenkofer (Gallensäure) 337.
- Piria (Tyrosin) 301.
- Reichl (Eiweiß) 450.
- Reynold-Gunning (Acetaldehyd) 58, (Aceton) 60.
- Rimini (Acetaldehyd) 58.
- Röhmann-Spitzer (Oxydasen) 647.
- Rosenheim-Tebb (Cerebron und Kerasin) 395, 396.
- Rosin (Gallenfarbstoff im Harn) 757.
- Rubner (Zucker) 118, 127.
- — im Harn 727.
- Salkowski (Allantoin) 156, (Cholesterin) 327, (Skatol) 309.
- Sasaki (Skatol) 309.
- Scherer (Inosit) 286, 287.
- Schiff (Allantoin) 156, (Harnstoff) 153.
- Schlesinger (Urobilin in Faeces) 937.
- Schmidt (Urobilin in Faeces) 937, (Bilirubin in Faeces) 938.
- Schumm (Blutfarbstoff in Faeces) 938.
- Seidel (Inosit) 286.
- Seliwanoff (Fructose) 107.
- — im Harn 734.
- Snaper (Blutfarbstoff in Faeces) 938, (Kopropropyryrin) 939.

## Probe von:

- Spiro (Hippursäure) 289.
- Steensma (Bilirubin) 938.
- Teichmann (Blut) 405, 808.
- Tollens (Pentose) 108, (Glucuronsäure) 137, 354.
- Trommer (Zucker) 106, 729.
- Uffelmann (Milchsäure) 86.
- — im Mageninhalt 901.
- Voisinet (Tryptophan) 592.
- Weber-Schunn (Blutfarbstoff in Faeces) 938.
- Weidel (Purinkörper) 176, (Histidin) 268.
- Weyl (Kreatinin) 163.
- Wheeler-Johnson (Cytosin und Uracil) 167, 168.
- Windaus (Cholesterin) 326.
- Wiechowski (Allantoin) 155.
- Wöhlke (Zucker) 124, 127.
- Wurster (Tyrosin) 301.
- Probefrühstück 900.
- Probemahlzeit 900.
- Prochymosin 626.
- Darstellung 606.
- Profermente 602, 606, 615, 626.
- Prolamine 445, 469.
- Prolin 277.
- Darstellung 277.
- Vork. im Muskel 857.
- aus Eiweiß 447.
- Verhalten bei Aminostickstoffbest. 587, 589.
- Isol. aus Eiweißhydrolysat 560, 562, 563, 568, 569.
- Gehalt einiger Proteine daran 596—599.
- Propylalanin-anhydrid, siehe Alanylprolinanhydrid 510.
- Propylglycinanhydrid, s. Glycylprolinanhydrid 509.
- l-Propyl-l-leucinanhydrid 511.
- l-Propyl-l-phenylalanin 511.
- Propepsin 606.
- Darstellung 606.
- Trennung von Prochymosin 606.
- Propionsäure 64.
- aus Eiweiß 447.
- Trennung von anderen Fettsäuren 78.
- Propylalkohol zur Trennung von Aminosäuren 560.
- fermentative Oxydation 646.
- Propylamin 191.
- Prostatateine, Amyloid 558.
- Prosthetische Gruppe der Proteide 518.
- Protagon 374.
- Vork. und Zusammensetzung 374.

- Protagon, Darst. aus Gehirn 374, 391.
- Eigenschaften 374.
- Spaltung 375.
- Vork. im Eiter 824, Isol. 825.
- — in Sputis 897.
- Nachw. im Gehirn 891.
- Protagonartige Stoffe in Leukocyten, Sputum, Nebenniere, Blut 324.
- in Galle 912.
- Protalbinsäure 458.
- Protalbumose 496, 497, 498, 499.
- aus Fibrin, Gehalt an Aminosäuren 599.
- Protamine 445, 474.
- Vorkommen 474.
- Darstellung 475, 932.
- allgemeine Eigenschaften 475.
- Salze 476.
- andere Verbindungen 476.
- Verhalten zu Fermenten 476, 481, 621.
- Hydrolyse durch Säuren 476, s. auch Protone 481.
- Best. der Hexonbasen 577.
- Cypriningruppe 476.
- Salmingruppe 476.
- Nachw. im menschlichen Sperma 931.
- Proteasen, s. auch Erepsin 620, Pepsin 606, Trypsin 614.
- der Gewebe 621.
- — Bezeichnung 622.
- — Vorkommen 622.
- — Darstellung 623.
- — Wirkung 623.
- — Einfluß äußerer Faktoren 624.
- — Nachweis 624.
- des Eiters 824.
- der Faeces, Nachw. 935.
- der Galle 910.
- des Harns 622.
- — Nachw. 756.
- der Leber 858.
- der Milch 919.
- der Milz, Isol. 623.
- des Muskels 857.
- des Serums 622.
- — Nachweis 624.
- der Sputa 898.
- Proteide 445, 518.
- Proteinochromogen 312, siehe Tryptophan.
- Proteinstoffe 445, s. Eiweißstoffe.
- Protelastose 485.
- Proteolytische Fermente der Gewebe, s. Proteasen 621.

- Protocatechusäure aus Dioxyphe-  
 nylalanin 306.  
 Protokeratinose 482.  
 Protokyrine 495, **503**.  
 Protone 481.  
 Protospongiose 493.  
 Protrypsin 215.  
 Pseudoglobulin 463.  
 — aus Serumalbumin 454.  
 — Best. in seröser Flüssigkeit  
 775.  
 Pseudomucin 552.  
 — Gehalt an Aminosäuren 599.  
 — — an Glucosamin 138.  
 — Guanidin bei Oxydation  
 157.  
 — Lävulinsäure bei Hydrolyse  
 93.  
 — Nachw. in seröser Flüssigkeit  
 772.  
 — Vork. in Galle 910.  
 Pseudonucleine 542.  
 Pseudopepton von Neumeister  
 554, s. Ovomuroid.  
 Psyllaalkohol 53.  
 Psyllasäure 72, s. Psyllostearyl-  
 säure.  
 Psyllostearylsäure 72.  
 Ptomaine 187.  
 — einzelne 212ff.  
 — Isolierung aus Fäulnisge-  
 mischen 217.  
 — — aus autolytierten Orga-  
 nen 869.  
 Ptyalin 631, s. diastatisches  
 Ferment.  
 Puffersysteme, für Fermente  
 602, 617, 627, 631.  
 — für  $p_{\text{H}}$ -Best. im Blut 799  
 Anm.  
 Punicin 441.  
 Punktionsflüssigkeit, Best. von  
 Bilirubin 793.  
 Purin 169.  
 Purinbasen, Darst. aus Harn  
 186.  
 — — aus Thymonucleinsäure  
 384.  
 — Best. d. P. und Harnsäure  
 im Harn 714.  
 — — im Harn 715.  
 — — nach Salkowski 715.  
 — — indirekte Verfahren 716.  
 — Isol. aus Organen 865, 868.  
 — Trennung und Best. in  
 Organen 875.  
 — Best. im Serum 783.  
 — Nachw. u. Best. in Faeces  
 935, 941.  
 — Nachw. im Muskel 860,  
 875.  
 — Vork. in Leber 858.  
 Purinderivate 169.
- Purinfermente 640, **641**, 643,  
 645.  
 — Darst. u. Nachw. 642.  
 Purpur, antiker 441.  
 Purpurin 441.  
 Putrescin 200.  
 — aus Arginin 261.  
 — Isol. von P. und Cadaverin  
 aus Harn 202.  
 — — aus Harn, Faeces und  
 faulenden Substanzen 203.  
 — — aus Fäulnisgemisch 218.  
 — Trennung von Cadaverin  
 202, 203.  
 — Nachw. im Harn 756.  
 — — — in Faeces 939.  
 — Isol. aus Organen 868, 869.  
 Putrin 215.  
 — Isol. aus Fäulnisgemisch  
 218.  
 Pyknometer 15.  
 Pyocyanin 444.  
 — im Eiter 824.  
 Pyoxanthose 445.  
 Pyridin, aus Melanoidinen 436.  
 Pyrimidin 164.  
 Pyrimidinbasen 164.  
 — in Nucleinsäuren 375.  
 — Isol. von P. und Nuclein-  
 basen aus der Thymo-  
 nucleinsäure 384.  
 — — aus autolytierten Orga-  
 nen 868.  
 Pyrimidinderivate 164.  
 Pyromucinornithursäure 257.  
 Pyrophosphorsäure 47.  
 Pyrrol, Verhalten zu Xanthyl-  
 drol 701.  
 Pyrrole aus Hämatin 402.  
 — aus Glutaminsäure 246.  
 — aus Melaninen 436.  
 — aus Molluskenfarbstoff 425.  
 — aus Oxyprotsulfosäure 514.  
 — bei der Zersetzung des Ei-  
 weiß 447, 489.  
 — ähnliche Körper aus Me-  
 lanoidin 436.  
 Pyrrol-derivate 270.  
 Pyrrol-Reaktion, s. Fichten-  
 spahn-R.  
 Pyrrolidin aus Ornithin 259.  
 $\alpha$ -Pyrrolidincarbonsäure 217,  
 s. Prolin.  
 Pyrrolidinderivate 277.  
 — Verhalten bei Aminostick-  
 stoffbest. 586.  
 Pyrrolidonicarbonsäure aus  
 Glutaminsäure 246.
- Q.**
- Quadriurate 172.  
 Quantitative Methoden 8.  
 Quallen, Taurin 249.
- Quappensperma, Histon 472.  
 Quecksilberkaliumjodid-Rea-  
 gens 945, s. Neßlers Rea-  
 gens.
- R.**
- Ranovin 549.  
 Racemisation von Eiweiß-  
 stoffen 447, 455 Anm., 463,  
 495, 544.  
 Raupen, Vork. von Ameisen-  
 säure 62.  
 Reduktase 642, 643.  
 — der Milch 644.  
 Reduktonovain 199, 214.  
 — Isol. aus Harn 717.  
 Reduzierende Substanzen im  
 Harn, Best. 738.  
 Refraktometer 31.  
 Refraktometrie im Serum 775.  
 Regenwurm Cholin 195.  
 — Betain 198, 857.  
 Reichert-Meißlsche Zahl 103.  
 Reichls Probe (Eiweiß) 450.  
 Reptilieneierschalen, Keratin  
 485.  
 Resorcin, Seliwanoffs Reak-  
 tion 107.  
 Reststickstoff, Best. in seröser  
 Flüssigkeit 777.  
 — Mikrobest. im Blut 839.  
 — Best. in Milch 928.  
 — — in Sputis 898.  
 Rete Malpighi, Pigmente 434.  
 Reticulin 490.  
 Retina, s. Netzhaut.  
 Reynold-Gunnings Probe (Acet-  
 aldehyd) 58, (Aceton) 60.  
 Rhamnose 113.  
 Rhodanhämin 402.  
 Rhodanwasserstoff 147.  
 — Entfernung aus Hundeharn  
 bei Chlorbestimmung 689.  
 — Nachw. u. Best. im Harn  
 717.  
 — — — im Speichel 895.  
 — — — im Nasensekret 896.  
 — — im Conjunctivasekret  
 897.  
 — Vork. in Milch 919.  
 Rhodizonsäure aus Inosit 286.  
 Rhodopsin 441, s. Sehpurpur.  
 Ribonsäure 377.  
 d-Ribose **112**, 375, 376, 378.  
 — Darst. aus Guanotin 377.  
 Ribosephosphorsäure 376, **377**,  
 378.  
 Ricinprobe auf Pepsin 612.  
 — auf Trypsin 618.  
 Riminis Probe (Acetaldehyd)  
 58.  
 Rindergalle, s. Galle.  
 Rinderharn, s. Harn.

- Rinderhorn, s. Keratin.  
 Rippentrichter 4.  
 Rochen, Harnstoff im Muskel 857.  
 — Oleinalkohol 53.  
 — Scymnolschwefelsäure 909.  
 — Scyllit 286, 858.  
 — Selachylalkohol 55.  
 Röhmann-Spitzers Probe (Oxydase) 647.  
 Rohrzucker 112.  
 — Nachw. im Harn 737.  
 Rosenheim-Tebbs' Probe (Cerebron und Kerasin) 395, 396.  
 Rosen von Auerhähnen, Tetronerythrin 440.  
 Rosige Säure 431, s. Uroerythrin.  
 Rosins Probe (Gallenfarbstoff im Harn) 757.  
 Rubners Probe (Zucker) 118, 127.  
 — im Harn 727.  
 Rüben, Arginin 259.  
 — Asparaginsäure 242.  
 — Betain 198.  
 — Carnin 185.  
 — Glutamin 248.  
 — Glutaminsäure 244.  
 — Guanidin 157.  
 — Heteroxanthin 183.  
 — Isoleucin 239.  
 — Leucin 235.  
 — Tyrosin 297.  
 Rückenmark 888, s. Gehirn.
- S.
- Saccharimeter 30.  
 Saccharose 112, s. Rohrzucker.  
 Säuren, anorganische 42.  
 — der Fettreihe 60.  
 — mehrbasische 93.  
 — Aminofettsäuren 218.  
 — aromatische 287.  
 — ungesättigte 72, 74.  
 — des Mageninhalts, Nachw. u. Best. 899, 901.  
 —  $C_2H_6N_2O_2$  257.  
 —  $C_5H_{11}SNO_2$  256.  
 —  $C_{12}H_{26}N_2O_5$  248.  
 —  $C_{14}H_{26}O_2$  72.  
 —  $C_{16}H_{30}O_2$  72.  
 —  $C_{18}H_{28}O_2$  75.  
 —  $C_{18}H_{36}O_3$  90.  
 —  $C_{20}H_{40}O_3$  90.  
 —  $C_{20}H_{30}O_2$  76.  
 —  $C_{21}H_{32}O_2$  76.  
 —  $C_{22}H_{34}O_2$  76.  
 —  $C_{22}H_{40}O_3$  90.  
 Säureamide, Einwirkung auf Eiweiß 495.  
 Säuremethämoglobin 528, siehe auch Acidhämoglobin 530.
- Säurezahl der Fette und Fettsäuren 102.  
 Sahidin 372.  
 Salamandra maculosa, Samandarin 216.  
 — Samandarin 216.  
 — Samandarinidin 216.  
 — Samandatrין 216.  
 Salicylase 643.  
 — der Milch 644.  
 — der Gewebe 646.  
 Saligenin, Einwirkung von Oxydase 646.  
 Salkowskis Probe (Cholesterin) 327, (Allantoin) 156, (Skatol) 309.  
 Salmin 474, 477.  
 — Isol. u. Nachw. 475, 932.  
 — Gehalt an Aminosäuren 597.  
 Salmingruppe der Protamine 476.  
 Salpetersäure, Nachw. u. Best. im Harn 682, 694.  
 — spez. Gew., Tabelle 948.  
 Salpetrige Säure, Nachw. im Harn 683.  
 — — im Speichel 896.  
 Salzsäure 42.  
 — Nachw. in Aschen 654.  
 — Best. in Aschen 664.  
 — — gewichtsanalytisch als Chlorsilber 664.  
 — titrimetrisch nach Mohr 664.  
 — — bei Stoffwechselanalysen nach A. Neumann 664.  
 — Nachw. im Harn 682.  
 — Best. im Harn nach Mohr 688.  
 — — nach Volhard 688.  
 — — im eiweißhaltigen Harn 689.  
 — — im Hundeharn 689.  
 — gebundene, im Mageninhalt 899.  
 — freie, im Mageninhalt 900.  
 — Nachw. u. Best. der freien S. im Mageninhalt 900, 903.  
 — Best. der Gesamtsalzsäure 689.  
 — — — im Mageninhalt 901.  
 — — nach Sjöqvist 902.  
 — — nach Lüttke 903.  
 — — nach Leo 902.  
 — Nachw. u. Best. in Knochen 853.  
 — gebundene, Vork. in Muskeln und Organen 858.  
 — spez. Gew., Tabelle 948.  
 Samandarinidin 216.  
 Samandarin 216.  
 Samandatrין 216.  
 Saponinsubstanzen, hämolytische Wirkung 798.
- Saprin 213, 217, s. auch Cadaverin 202.  
 Sargdeckelkristalle (Harn) 762.  
 Sarkin 178, s. Hypoxanthin.  
 Sarkom, Pigment 434.  
 Sarkomelanin 435.  
 Sarkosin aus Kreatin 158, 159.  
 — aus Heteroxanthin 182.  
 Sasakis Probe (Skatol) 309.  
 Sauerstoffbindungsvermögen des Hämoglobins 522.  
 — des Bluts 813.  
 Schalenhaut der Vogeleier, Keratin 484.  
 Schardingers Reaktion der Milch 644, 920.  
 Scherers Probe (Inosit) 286, 287.  
 Schiffs Probe (Allantoin) 156, (Harnstoff) 153.  
 Schilddrüse, s. Thyreoidea.  
 Schildlaus, Farbstoff 442.  
 Schildpatt, Keratin 482.  
 — Gehalt an Aminosäuren 597.  
 Schilfschlauch zum Dialysieren 4.  
 Schlangenexkreme, Harnsäure 170.  
 Schleim der Froscheier, Galaktose 120.  
 Schleimhaut der Luftwege, Mucin 552.  
 Schleimsäure aus Galaktose 122.  
 — aus Lactose 127.  
 Schlesingers Probe (Urobilin in Faeces) 937.  
 Schmelzpunkt, Best. 16.  
 — bei hochschmelzenden Substanzen 16.  
 Schmetterlinge, Pigmente 434.  
 — Oxydase 647, 648.  
 Schmidts Probe (Urobilin und Bilirubin in Faeces) 937, 938.  
 Schnecken, Betain 198, 857.  
 — Mucine 557.  
 — Mucinogen 558.  
 — Mantelmucin 557.  
 — Fußmucin 558.  
 — Purpurfarbstoff 441.  
 Schneckenschalen, Conchiolin 492.  
 Schützs Regel 611.  
 Schumms Probe (Blutfarbstoff in Faeces) 938.  
 Schumms Spektroskop 18.  
 Schuppen von Manis japonica, Gehalt an Aminosäuren 597.  
 Schwämme, s. Badeschwamm.  
 Schweineschmalz, Heptadecansäure 70.  
 Schwefel, Nachw. in organischer Substanz 50.

- Schwefel, Best. des Gesamtschwefels 669, 670.  
 — — des bleischwärenden 50, 671.  
 — — des Gesamtschwefels im Harn 690.  
 — — in Gallen 915.  
 Schwefelbleiprobe im Eiweiß 450.  
 Schwefelecyansäure, s. Rhodanwasserstoff.  
 Schwefelhaltige Aminosäuren 249.  
 Schwefelmethämoglobin 531.  
 Schwefelsäure, Vork., Eigenschaften 44.  
 — Nachw. u. Best. in Aschen 654.  
 — — im Harn 682.  
 — Mikrobest. im Harn 671.  
 — Best. im Harn 690.  
 — — der Gesamtschwefelsäure 690.  
 — — der Sulfatschwefelsäure 690.  
 — Mikrobest. im Blut 831.  
 — Normalschwefelsäure 12.  
 — gepaarte 281, 349.  
 — — Nachw. u. Best. im Harn 682, 690.  
 — — Best. in Galle 915.  
 — — Nachw. in Schweiß 918.  
 Schwefelwasserstoff, Vorkommen, Eigenschaften, Nachweis 43.  
 — aus Cystin 255.  
 — aus Eiweiß 447.  
 — in Sputis 897.  
 — Nachw. in Faeces 940.  
 Schweiß, Bestandteile 917, 918.  
 — allgemeine Eigenschaften 918.  
 — Untersuchung 918.  
 — Gewinnung des Untersuchungsmaterials 918.  
 — Alanin 231.  
 — Ameisensäure 62.  
 — Buttersäure 64.  
 — Caprylsäure 68.  
 — Citronensäure 96.  
 — Essigsäure 63.  
 — Harnstoff 150.  
 — Hippursäure 228.  
 — Kreatin 160.  
 — Milchsäure 84.  
 — Propionsäure 64.  
 — Tyrosinase 647.  
 — Abscheidung der niederen Fettsäuren 76.  
 Schwermetalle 38.  
 — Verhalten zu Fermenten 602.  
 Scomberhiston 471.  
 Scombrin 471.  
 Scombron 481.  
 Scyllit 286.  
 — Vork. in Organen 858.  
 Scyllium stellare, Eihaut 484.  
 Scymnol 341.  
 Scymnolschwefelsäure 348, 909.  
 Sedimente, s. Harnsteine bzw. Gallensteine.  
 Sedimentum lateritium 172, 431, 679.  
 Seehasensperma, Cyclopterin 480.  
 Seehundfett, Säure aus 72.  
 Seeigelsperma, Arbacin 474.  
 Seetiere, Fett 98.  
 Seewalze, Isol. von Basen 864.  
 Sehnen, Untersuchung 855.  
 — Chondroitinschwefelsäure 356.  
 — Elastin 485.  
 — Kollagen 486.  
 — Polysaccharide 146.  
 — Tendomucoïd 555.  
 — Ligamentomucoïd 556.  
 Sehpurpur 444.  
 Seide, Alanin, Darst. 229.  
 — Fibroin 491.  
 — Sericin 491.  
 — Serin 231.  
 — Gehalt an Aminosäuren 598.  
 Seidels Probe (Inosit) 286.  
 Seidenleim 492, s. Sericin.  
 Seife 70, s. auch Fettsäure.  
 — Best. in seröser Flüssigkeit 796 Anm.  
 — in Galle, Vork. 909.  
 — — Bestimmung 915.  
 — Vork. in Faeces 933.  
 — — in Muskeln 857.  
 — — im Pankreassaft 907.  
 — — in Pankreassteinen 907.  
 — — in Schweiß 918.  
 Sekrete, Untersuchung 893.  
 — — Speichel 893.  
 — — Speichelstein, Zahnstein 896.  
 — — Nasensekret 896.  
 — — Nasensteine 897.  
 — — Tränen 897.  
 — — Sputa 897.  
 — — Magensaft und Mageninhalt 899.  
 — — Pankreassaft 907.  
 — — Pankreassteine 907.  
 — — Darmsaft 907.  
 — — Galle 908.  
 — — Gallensteine 916.  
 — — Schweiß 917.  
 — — Milch 918.  
 — — Talgdrüsen und ähnliche Sekrete 927.  
 — — Sperma 931.  
 Selachierorgane, Harnstoff 150.  
 Selachylalkohol 55.  
 Seliwanoffsche Zuckerreaktion 107.  
 — im Harn 734.  
 Semiglutin 489.  
 Sepiamelanin 435.  
 Sepsin 213.  
 Sericin 491, 492.  
 — Gehalt an Aminosäuren 598.  
 Sericoïn 491.  
 Serin 231.  
 — Darst. durch Synthese 231.  
 — — des optisch aktiven 231.  
 — Eigenschaften 231.  
 — — optische 232.  
 — Nachweis 232.  
 — Oxydation und Reduktion 232.  
 — Umwandlungen 232.  
 — Überführung in Alanin 232.  
 — — in Cystin 232.  
 — Verbindungen 231.  
 — Vorkommen 231.  
 — — im Schweiß 918.  
 — aus Eiweiß 447.  
 l-Serin, Isol. aus Eiweißhydrolysat 563, 567, 568, 571, 572, 573.  
 — Überführung in d-Alanin 229, 232.  
 — Gehalt einiger Proteine daran 596—599.  
 Seröse Flüssigkeit, Allgemeines 768.  
 — Bestandteile 769.  
 — allgemeine Eigenschaften 769.  
 — Konsistenz 769.  
 — Drehungsvermögen 769.  
 — Reaktion 769.  
 — Farbe 769.  
 — Klarheit 769.  
 — Best. des Trockenrückstandes 770.  
 — Nachw. u. Best. der anorganischen Salze 770, 795.  
 — Ammoniak, Nachw. u. Best. 777.  
 — Calcium, Mikrobest. 827, 830.  
 — Chloride, Best. 666.  
 — — Mikrobest. 832.  
 — Kalium, Mikrobest. 826.  
 — Magnesium, Mikrobest. 828, 829.  
 — Natrium, Best. 656.  
 — — Mikrobest. 826.  
 — Phosphate, Mikrobest. 833 bis 835.  
 — Schwefelsäure, Mikrobest. 671, 831.  
 — Stickstoff, Best. 676.

- Seröse Flüssigkeit, Stickstoff, Mikrobest. 777.  
 — Nachw. der Proteinstoffe 771.  
 — — der Glucoproteide, phosphorhaltigen Proteide 772.  
 — — des Serumalbumins, Serumglobulins, Fibrinogens 772.  
 — — der Albumosen 773.  
 Best. der gerinnbaren Eiweißstoffe 774, 795, Mikrobest. 839.  
 — — des Albumins + Globulins 774.  
 — — des Albumins, Globulins 774.  
 — — des Fibrinogens 775.  
 — — des Gesamtstickstoffs und Reststickstoffs 676, Mikrobest. 777.  
 — Refraktometrie der Eiweißstoffe 775.  
 — Best. des freien und gebundenen Purinkörpers 783.  
 — — des Amino- und Peptidstickstoffs 784.  
 — — der Amino- und Diaminosäuren 783.  
 — Nachw. u. Best. des Zuckers 784, 787.  
 — Entfernung von Eiweiß 785.  
 — Nachw. u. Best. der ätherlöslichen Substanzen (Fett, Phosphatide, Cholesterin) 791.  
 — Best. von Cholesterin und Cholesterinestern 886.  
 — Nachw. von Farbstoffen 792.  
 — Abscheidung und Nachw. von Fettsäuren 76, 795.  
 — Best. der höheren Fettsäuren 885.  
 — Isol. u. Nachw. von Gallensäuren 347, 795.  
 — quantitative Analyse 795.  
 — Best. des Eiweiß, der Extraktivstoffe, Fett, Phosphatide, Cholesterin, Salze 795.  
 — organische Bestandteile, s. Blut, Einzelbestandteile.  
 Serolin 330.  
 Serosamucin 557.  
 Serum, s. Blut und seröse Flüssigkeiten.  
 — Gewinnung aus Blut 804.  
 — Best. im Blut 817.  
 Serumalbumin 452.  
 — Vorkommen 452.  
 — — in Leber 858.  
 Serumalbumin, Darst. aus Blutserum oder pathologischen Transsudaten 452.  
 — — von kristallisiertem 452.  
 — — Zusammensetzung 453.  
 — Koagulation 453.  
 — optische Eigenschaften 453.  
 — Verhalten zu Säuren 454.  
 — — zu Alkalien 454, 495.  
 — Hydrolyse 454.  
 — Unterschied von Ovalbumin 454.  
 — Oxydation mit Kaliumpermanganat 514.  
 — Gehalt an Glucosamin 138, 454.  
 — — an Aminosäuren 596.  
 — Nachw. und Best. in seröser Flüssigkeit 772, 774.  
 — — im Muskel 859.  
 Serumglobulin 462.  
 — Darstellung 462.  
 — Trennung von Albumin 452.  
 — Einheitlichkeit 463.  
 — Gehalt an Kohlenhydratkomplex 138, 463.  
 — — an Aminosäuren 596.  
 — Nachw. u. Best. im Harn 746.  
 — — — in seröser Flüssigkeit 772, 774.  
 — — im Muskel 859.  
 Serummucin, Glucosamin 138.  
 Serumplatte für Proteasenachweis 618, 935.  
 Siedepunkt, Best. 17.  
 Silicium 47.  
 Silurius glanis, Protamin 474.  
 Sinistrin, tierisches 133, 559.  
 Skatocyanin 427.  
 Skatol 308.  
 — Darst. aus Fäulnisgemisch 320.  
 — Trennung von Indol 309.  
 — Nachweis 309.  
 — — u. Best. in Faeces 936.  
 — aus Tryptophan 315, 316.  
 — aus Melaninen 436.  
 — aus Eiweiß 447, 486.  
 — aus Skatolrot 434.  
 — Verhalten zu Xanthhydrol 701.  
 — Vork. in Sputis 897.  
 Skatolcarbonsäure, s. Indol-essigsäure 310.  
 Skatolelessigsäure, s. Indolpropionsäure 311.  
 Skatolfarbstoffe 431.  
 Skatolrot 432, 439.  
 Skatosin 215.  
 Skatoxyl 310.  
 Skatoxylglucuronsäure 353.  
 Skatoxylschwefelsäure 352.  
 Skleromuroid 557.  
 — Chondrosamingehalt 141.  
 Skleroproteide 445, 482.  
 Smegma, Bestandteil und Untersuchung 930.  
 Snapers Probe (Blutfarbstoff in Faeces) 938, (Koproporphyrin) 939.  
 Soxhlets Extraktionsapparat 3.  
 — Fettbest. in Milch 926.  
 — — Tabelle dazu 952.  
 Speckhaut 803.  
 Speichel, Allgemeines 893.  
 — Bestandteile 893.  
 — allgemeine Eigenschaften 893.  
 — pathologische Veränderungen 894.  
 — Sekrete der einzelnen Speicheldrüsen 894.  
 — Nachw. der Proteinstoffe 895.  
 — — der Fermente 895.  
 — — u. Best. des Rhodanwasserstoffs 895.  
 — — der salpetrigen Säure 896.  
 — — des Ammoniaks 896.  
 — — des Harnstoffs 777, 896.  
 — — der Harnsäure 782, 896.  
 — — der Milchsäure 84, 896.  
 — — der anorganischen Salze 770, 795, 896.  
 — Vork. von Cholin 195.  
 — — von Diastase 631.  
 — — von Harnsäure 169.  
 — — von Maltase 636.  
 Speichelkörperchen 894.  
 Speichelsteine 896.  
 Spektralanalyse 17.  
 — quantitative 20.  
 Spektrophotometrie 20.  
 Spektroskop nach Schumm 18.  
 — nach Browning 18.  
 — nach Bürker 18.  
 Sperma 931.  
 — Cholin 195.  
 — Inosit 284.  
 — Phosphatide 362.  
 — Spermin 213.  
 — Trennung in Zwischenzellenflüssigkeit und Spermatozoen 931.  
 — — der Spermatozoen in Köpfe und Schwänze 932.  
 — Untersuchung 932.  
 Spermaöl, Fettsäure 72.  
 Spermareaktion von Florence 196.  
 Spermin 213, s. auch Cadaverin 202.  
 Spezifische Drehung 27.

- Spezifisches Gewicht 15.  
 — Tabellen 947—949.  
 Sphingol 371.  
 Sphingomyelin 194, 371, 891.  
 — Sphingosin 371, 374.  
 — Lignocerinsäure 71.  
 Sphingosin 194, 390, 395, 397.  
 Spinacen 98 Anm., 322.  
 Spinnenexkrement, Guanin 176.  
 Spinnenseide 482, 492.  
 — Gehalt an Aminosäuren 598.  
 Spiros Probe (Hippursäure) 289.  
 Sponggin 482, 493, 516.  
 — Gehalt an Aminosäuren 598.  
 Spongosterin 334.  
 Sputa 897.  
 — Bestandteile 897.  
 — allgemeine Eigenschaften 898.  
 — Nachw. u. Best. des Mucins 898.  
 — — — der Fettsäuren 898.  
 — — — der Farbstoffe 898.  
 — Phosphatide 362.  
 — protagonähnlicher Körper 374.  
 — Mucin, Glucosamingehalt 138, 147.  
 Squalen 98 Anm., 322.  
 Stalagmometrie 630.  
 Stärke 127.  
 — Vorkommen 127.  
 — Darst., Trennung von Amylopectin und Amylose 127.  
 — Umwandlungen 128.  
 — — durch Bac. macerans 133.  
 — Spaltung durch Fermente 633.  
 — Nachw. u. Best. in Faeces 933, 937, 942.  
 — Vork. im Dünndarminhalt 932.  
 Steapsin, s. Lipase.  
 Stearin 101.  
 Stearinsäure 69.  
 — in Lecithinen 366.  
 — aus Kephalin 369.  
 — aus Lysolecithin 365.  
 — aus Lysokephalin 365.  
 — in Sputis 897.  
 — Stearin- und Palmitinsäuregemisch, Erstarrungspunkt 69.  
 — Abscheidung und Trennung 81.  
 Stearodipalmitin 108.  
 Steensmas Probe (Bilirubin) 938.  
 Steincystin 256.  
 Stellasterin 334.  
 Stercobilin 429, s. Urobilin.  
 Sterine, Allgemeines 323.  
 Stickoxydhämocyanin 533.  
 Stickoxydhämoglobin 527, 529.  
 Stickstoff, Nachw. in organischen Substanzen 49.  
 — — nach Lasseigne 50.  
 — Best. des Gesamtstickstoffs nach Kjeldahl 675.  
 — Mikrobest. nach Pregl 836.  
 — — nach Folin 836.  
 — Best. im Harn 675, 696.  
 — — — vereinfachte Methode 697.  
 — — — Mikrobest. 699.  
 — — im Serum 777.  
 — — — Mikrobest. 831.  
 — — bei eiweißhaltigen Substanzen 676.  
 — — bei starkem Stoßen 677.  
 — — des Gesamtstickstoffs im Harn nach Liebig-Pflüger 697.  
 — ungefähre Best. der Verteilung in Proteinen nach Hausmann 587.  
 — — — — nach v. Slyke 587.  
 Stierhoden, Cerebrosid 390.  
 Stinktief, Butylmercaptan 56.  
 —  $\alpha$ -Methylchinolin 212.  
 Stizostedion vitreum, Protamin 478.  
 Störsperma, Cytosindarst. 166.  
 — Sturin 480.  
 — Sturon 481.  
 Stokessche Lösung, Reagens Darst. 946.  
 Stromata der Blutkörperchen, Darst. und Eigenschaften 805.  
 Strontium 37.  
 Strungilocentrotus cividus, Glykokoll 226.  
 Stützgewebe, Knochen, Zahnsubstanzen und Verkalkungen 851.  
 — Knorpelgewebe 854.  
 — Bindegewebe 855.  
 Sturin 480.  
 — Gehalt an Aminosäuren 597.  
 Sturon 481.  
 Sublingualspeichel 894, siehe Speichel.  
 Submaxillardrüse, Nucleoproteid 540.  
 — Mucin 551.  
 Submaxillarisspeichel 894, siehe Speichel.  
 Submaxillarmucin 138, 147, 551.  
 — Glucosamingehalt 138.  
 — Gehalt an tierischem Gummi 145.  
 Sulfatide 373.  
 Sulfate, s. Schwefelsäure.  
 Sulfatschwefelsäure, Best. im Harn 690.  
 Sulfhämoglobin 531.  
 Sulfoxyansäure, s. Rhodanwasserstoff.  
 Sulfosäurederivate der Aminosäuren 222.  
 — der Proteine 516.  
 Suprarenin, s. Adrenalin 207.  
 Suspensionsinstabilität von Blutkörperchen 803.  
 Suspensionsstabilität von Blutkörperchen 803.  
 Synovia, Untersuchung 768, s. seröse Flüssigkeit.  
 — pathologische, Phosphorproteid 549.  
 Synovialflüssigkeit, Serosamucin 557.  
 Synovin 557.  
 Syntonine, siehe Acidalbumine 494.  
 — Gehalt an Aminosäuren 599.
- T.**
- Taiffleisch, Kanirin 214.  
 Talg, s. Fett.  
 Talgdrüsensekret, Bestandteile und Untersuchung 929.  
 Taschenspektroskop nach Browning 18.  
 Taurin 219, 249.  
 — Darst. aus Galle 250.  
 — Best. in der Galle 915.  
 — Nachw. in Muskeln 861.  
 — Vork. in Leber 858.  
 — — in gepaarten Gallensäuren 345 ff.  
 Taurocarbaminsäure 251.  
 Taurochenocholsäure 340, 348, 909.  
 Taurocholeinsäure 346, 348, 909.  
 Taurocholsäure 342, 345, 909.  
 — Vorkommen 345.  
 — — in Faeces 934.  
 — Darstellung 345.  
 — — aus Dorschgalle 346.  
 — — aus Hundegalle 346.  
 — — aus Rindergalle 345.  
 — Isol. der Gallensäuren aus tierischen Flüssigkeiten (Harn, seröse Flüssigkeiten) 347.  
 — Eigenschaften 346.  
 — — optische 346.  
 — Salze 346.  
 — Spaltung 346.  
 — Nachweis 347.  
 — — neben Glykochol- und Cholsäure 347.

- Taurodesoxycholsäure, s. Taurocholsäure 348.  
 Teelauge, Adenin, Darst. 180.  
 Teichmannsche Häminkristalle 402, **405**.  
 — Hämprobe 808.  
 Temperatur, Einfluß auf Fermente 601.  
 Tendomucoid 555.  
 — Verhalten zu Verdauungssäften 556.  
 Terephthalsäure aus Eiweiß 448.  
 Terpene, Cholesterin, Farbenreaktionen 326.  
 Testudo graeca, Eihaut 484.  
 — — Gehalt an Aminosäuren 598.  
 Tetanin 226.  
 Tetanotoxin 213.  
 — hämolytische Wirkung 798.  
 $\alpha$ -Tetraamylose 133.  
 Tetrabenzoylglucosamin 140.  
 Tetrabromstearinsäure 74.  
 Tetramethylammoniumhydroxyd 194, s. Tetramin.  
 Tetramethylendiamin, s. Putrescin 200.  
 Tetramin 194.  
 — Isol. aus Muskel und Organen 868.  
 1, 3, 4, 6-Tetraoxy-2-acetyl-8-methylanthrachinon-5-carbonsäure, s. Kermessäure 443.  
 Tetraoxyaminocapronsäure 249.  
 Tetraoxystearinsäure 74.  
 Tetrapeptid aus Seidenfibroin 514.  
 Tetronerythrin 441.  
 Theobromin 167, 182.  
 — aus Xanthin 176.  
 Theophyllin 169, 183.  
 Therapiesäure 76.  
 Thermometer nach Zincke 16.  
 $\alpha$ -Thiomilchsäure aus Cystin 256.  
 — aus Keratin 483.  
 $\beta$ -Thiomilchsäure aus Cystin 256.  
 Thioschwefelsäure 45.  
 Thiosulfatlösung, Titerstellung nach Volhard 104.  
 Thymin 164.  
 — Vorkommen 164.  
 — — in „Histidinfraktion“ 579, 868.  
 — Darstellung 164.  
 — — aus Nucleinsäure 164, 380, 384.  
 — — aus Heringstestikeln 164  
 — Eigenschaften 165.  
 Thymin, Verbindungen 165.  
 — Umwandlung 165.  
 — Nachweis 165.  
 — Isol. aus autolytierten Organen 868.  
 Thyminhexosediphosphorsäure 384.  
 Thyminhexosephosphorsäure 384.  
 Thyminsäure 383, s. Thyminosäure.  
 Thymonucleinsäure 379.  
 — Darst. aus Thymus nach A. Neumann 380.  
 — — der a- und b-Form 380.  
 — Konstitution 380.  
 — Eigenschaften 381.  
 — — optische 381.  
 — partielle Hydrolyse 380, 383.  
 — vollständige Hydrolyse 382.  
 — Einwirkung von Fermenten 382, 639.  
 — sekundäre Spaltungsprodukte 382.  
 — Oxydation 382.  
 — Nachweis 382.  
 — — mikroskopischer 383.  
 — Isol. der Nuclein- und Pyrimidinbasen 384.  
 — Lävulinsäure 93, 382.  
 — Thymin 164, 385.  
 — Cytosin 166.  
 — Adenin, Isol. 385.  
 — Guanin, Isol. 385.  
 — Bindung in Nucleoproteiden 533.  
 — Verhalten zu Protamin 535, 536.  
 Thyminosäure 380, 382, **383**.  
 Thymus, Ameisensäure 62.  
 — Bernsteinsäure 94, 858.  
 — Histon 470.  
 — Kreatin 158.  
 — Nuclease 382, 640.  
 — Nucleoproteide 535.  
 — Parahiston 474.  
 — Protease 622.  
 — Thymonucleinsäure 379.  
 — Untersuchung, s. Muskel und Organe 856.  
 Thymusleukocyten, Valin 233.  
 Thynnin 479.  
 Thyreoglobulin **466**, 516, 539.  
 Thyreoidea, Untersuchung, s. Muskel und Organe 856.  
 — Bernsteinsäure 94, 858.  
 — Jod 42.  
 — Kreatin 158.  
 — Nuclease 640.  
 — Nucleoproteid 539.  
 — Phenyläthylamin 206.  
 — Thyreoglobulin 466.  
 — Thyreojodin 467.  
 Thyreoidea, Thyroxin **312**, 467.  
 — Tyramin 207.  
 — Valin 193.  
 — Isol. von Basen 864.  
 Thyreojodin 467.  
 Thyroxin **312**, 467.  
 Tierfarbstoffe 392, vgl. Farbstoffe.  
 Tierische Membranine 491.  
 Tierisches Dextran 133.  
 — Gummi, s. Gummi, tierisches 145.  
 — Sinistrin **133**, 559.  
 Tintenfisch, Sepiamelanin 435.  
 Titrationsalkalescenz im Blut, Bestimmung 800.  
 Titrierflüssigkeiten 10.  
 Tollens' Probe (Pentosen) 108, (Glucuronsäure) 137, 354.  
 Tollens' Reaktion zur Unterscheidung von Pentosen und Glucuronsäure im Harn 137, 735.  
 p-Toluolsulfoverbindungen der  $\alpha$ -Aminofettsäuren 222.  
 Torpedo marmorata, Ichthulin 549.  
 Tränen 897.  
 — Harnstoff 150.  
 Transsudate, Untersuchung 768, s. seröse Flüssigkeiten.  
 — Cholesterin 323.  
 — Fibrinogen 461.  
 — Glycerinphosphorsäure 359.  
 — Harnsäure 169.  
 — Harnstoff 150.  
 — Kreatin 158.  
 — Palmitinsäure 69.  
 — Phosphatide 362.  
 — Phosphorproteide 549.  
 — Serumalbumin 452.  
 — Serumglobulin 462.  
 — Stearinsäure 69.  
 Traubensaft, Inosit 284.  
 Traubenzucker 114, s. Glucose.  
 Trennungsmethoden 2.  
 Triäthylamin 191.  
 Triamylose 133.  
 Triarachin 101.  
 Tribromcoccin 443.  
 Tributyrin **101**, 630.  
 Tricapronin 101.  
 Tricaprylin 101.  
 Trichloräthylalkoholglucuronsäure 134.  
 Trichlorpurin 175, 177, 178, 180.  
 Triindylmethane 433.  
 Triketohydrindenhydrat, s. Ninyhydrin 219.  
 Trilaurin 101.  
 Trimethylamin 190.  
 Trimethylaminoxid 189, **191**.

- Trimethylaminoxid, Isolierung 868.
- Trimethyläthylpyrrol 275, siehe Phyllopyrrol.
- 1, 3, 7-Trimethyl-2, 6-Dioxy-purin, s. Coffein 169.
- Trimethyloxäthylammoniumhydroxyd 195, s. Cholin.
- γ-Trimethyloxybutyrobetain 199, s. Carnitin.
- Trimethylpyrrolpropionsäure 276, s. Phyllopyrrolcarbon-säure.
- Trimethylvinylammoniumhydroxyd, s. Neurin 197.
- Trimyristin 101.
- Triolein 101.
- Trioxybenzoesäure 306, s. Gal-lussäure.
- Trioxymethylanthrachinon 444.
- 2, 6, 8-Trioxypurin 167, siehe Harnsäure.
- Tripalmitin 101.
- Tripeptide 513.
- Triphosphonucleinsäure 388.
- Tristearin 101.
- Tritonium nodosum, Asparagin-säure 242.
- Trockengläschen 6.
- Trockenpankreas 537, 628.
- Trockenschrank 6.
- Trocknen 6.
- von Organen 603, 605, 870.
- von Milch 922.
- von serösen Flüssigkeiten 770.
- Trommers Probe (Zucker) 106.
- im Harn 729.
- bei geringem Zuckergehalt 730.
- Trypsin 614.
- Vorkommen 614.
- Zymogen 615.
- Darstellung 615.
- Absorbierbarkeit 605.
- Reinigung 616.
- Fermentwirkung 616.
- — Einfluß äußerer Fak-toren 617.
- Nachweis 618.
- — im Harn 756.
- — in Faeces 935.
- Bestimmung 619.
- Darst. tryptischer Ver-dauungsflüssigkeit 620.
- Untersuchung tryptischen Verdauungsgemisches 620.
- Produkte der tryptischen Verdauung 620.
- — Vork. von Dipeptid-anhydriden darin 506.
- Bildung von Albumose und Peptonen 495.
- Trypsin, Verhalten zu nativen Eiweißkörpern 447.
- — zu Fibrin 468.
- — zu Polypeptiden 505, 509, 510, 619.
- — zu Protaminen 476, 481.
- — zu Keratinin 482.
- — zu Koilin 485.
- — zu Elastin 485.
- — zu Ichthyloepidin 486.
- — zu Kollagen und Glutin 487, 489.
- — zu Reticulin 490.
- — zu Membranin 491.
- — zu Conchiolin 492.
- — zu Oxyhämoglobin 523.
- — zu Hämoglobin 524.
- — zu Kohlenoxydhämo-globin 527.
- — zu Nucleoproteiden 536.
- — zu Casein 545.
- — zu Vitellin-Lecithinver-bindung 547.
- — zu Submaxillarmucin 551.
- — zu Ovomuroid 554.
- — zu Chondro-, Tendo-, Ligamento- und Osseo-muroid 556.
- — zu Amyloid 557.
- — zu Deuterokeratose 500.
- — zu Pepsinfibrinpepton 501, 502.
- — zu Desaminoproteinen 515.
- Vork. in Duodenalsaft 908.
- — im Meconium 944.
- — in Sputis 898.
- Trypsincaseinpepton 502.
- Trypsinfibrinpepton 502.
- Trypsinglutinpepton 502.
- Überführung in Kyrin 504.
- Trypsinogen 615.
- Nachw. im Pankreassaft 907.
- Tryptophan 212, 312.
- Darstellung 313.
- — aus Casein 313.
- Trennung von anderen Aminosäuren 313, 591.
- Eigenschaften 314.
- — optische 315.
- Verhalten bei Aminostick-stoffbest. 587.
- Best. colorimetrisch 591, 592.
- Nachweis 316.
- Umwandlungen 315.
- Verbindungen 314.
- Vorkommen 312.
- aus Eiweiß 447.
- Isol. aus tryptischer Ver-dauungsflüssigkeit 313, 580.
- Tryptophan, Gehalt einiger Proteine daran 596—599.
- Beziehung zur Kynuren-säure 316, 321.
- — zu schwarzen Farbstof-fen 434, 436.
- — zu Harnfarbstoffen 433.
- — zur Xanthoproteinprobe im Eiweiß 449.
- — zu Adamkiewicz' Probe im Eiweiß 449.
- — zur Furfurolprobe im Eiweiß 449.
- — zu Reichls Probe im Eiweiß 459.
- — zu Edlbachers Probe im Eiweiß 449.
- — zu Ehrlich-Neubauers Probe im Eiweiß 450.
- Vork. im Muskel 857.
- Tryptophanreaktionen 316, 449.
- Tuberkelbac., Phosphatide 372.
- Tumoren, Protease 622.
- Melanine 434.
- Tunicin 134.
- Turacin 40, 408, 414, 415, 444.
- Turacoporphyrin 444.
- Tussaseide, Unterschied von Fibroin 492.
- Typhotoxin 214.
- Tyramin 206.
- Trennung von Phenyläthyl-amin 208.
- Bildung aus Tyrosin 206, 300.
- Verhalten zu Oxydasen 647.
- Tyroleucin 239.
- Tyrosin 295, 296, 303.
- Vorkommen 296.
- Nachweis 301.
- Darstellung 297.
- — aus Seide 298.
- Eigenschaften 298.
- — optische 300.
- Verhalten bei Formoltitra-tion 584.
- Umwandlungen 300.
- Verbindungen 299.
- Carbaminat 224.
- Hydantoin 299, 752.
- Uraminosäure 299.
- aus Eiweiß 447.
- Gehalt einiger Proteine daran 596—599.
- Isol. aus Eiweißhydrolysat 298, 561, 563, 579.
- Best. im Eiweißhydrolysat, colorimetrisch 591.
- Isol. aus tryptischen Ver-dauungsgemischen 620.
- — aus Harn 750, 752.
- Nachw. in Harnsteinen 764, 765.



Tyrosin, Nachw. in serösen Flüssigkeiten 783.  
 — — in Atherombälgen 930.  
 — — Beziehung zu Tyramin 206, 300.  
 — — zur Millonschen Probe im Eiweiß 449.  
 — — zu Paulys Diazoreaktion im Eiweiß 450.  
 — — zu schwarzen Farbstoffen 434, 647.  
 — aus Melanin 434.  
 — Vork. im Eiter 824.  
 — — in Faeces 933.  
 — — in Linse 892.  
 — — in Muskel 857.  
 — — im Schweiß 918.  
 Tyrosinase 641, **647**.  
 — Darst. 300 Anm.  
 — Einwirkung auf Dioxyphenylalanin 306.  
 — — auf Homogentisinsäure 305.  
 — — auf Oxytryptophan 317.  
 — — auf Phenole 282.  
 — — auf Tryptophan 316.  
 — — auf Tyrosin 300, 434, 647.  
 Tyrosol aus Tyrosin 300.  
 Tyrosylglycinanhydrid 509, s. Glycyltyrosinanhydrid.

## U.

Uffelmannsche Reaktion (Milchsäure) 86.  
 — — im Mageninhalte 901.  
 Uhrglasapparat 6.  
 Ultrafiltration 5, 604.  
 — zur Best. anorganischer Stoffe im Serum 721.  
 — von Fermentlösungen 604.  
 Umikoffs Reaktion in Frauenmilch 920.  
 Unterschwellige Säure 45.  
 — aus Cystin 256.  
 — Entfernung aus Hundeharn bei Titration nach Volhard 689.  
 Uracil 164, 167.  
 — aus Thymonucleinsäure 382, **384**.  
 — aus Uracilsäure 375.  
 — Isol. aus autolytierten Organen 868.  
 — Vork. in „Histidinfraktion“ 579.  
 — Trennung von Thymin 165, 384.  
 Uracilcarbonsäure 168, s. Orotsäure.  
 Uracilcytosindinucleotid 388.  
 Uracilsäure 375, **387**.  
 — Abspaltung aus Hefenucleinsäure 387.

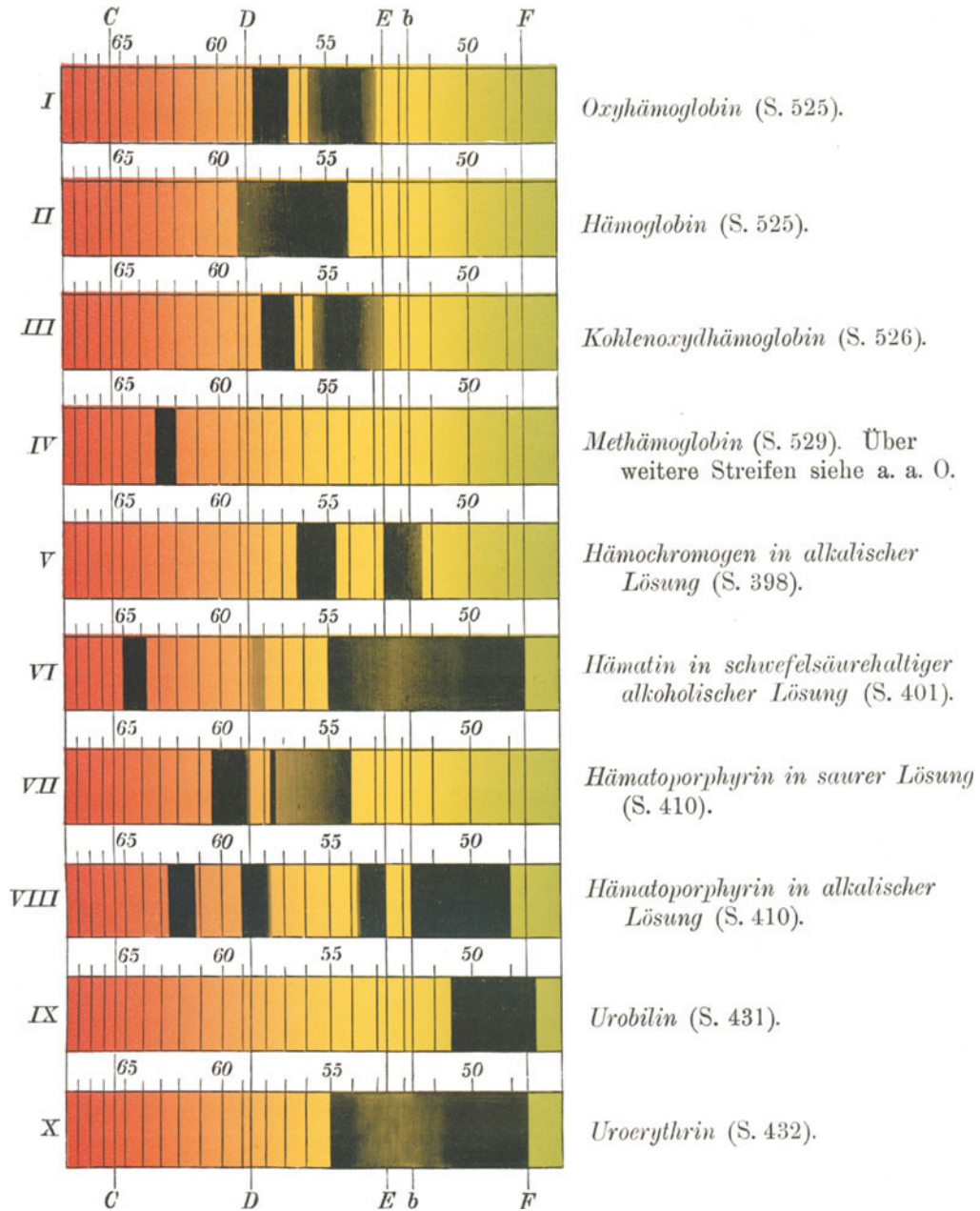
Uraminosäuren **223**, 563, 564, 752.  
 Urate, s. Harnsäure.  
 — Nachw. in Harnsteinen 764.  
 Uratsteine im Harn 762.  
 Urease, Darst. 702.  
 — Einwirkung auf Harnstoff 153.  
 — zur Harnstoffbest. im Harn 701.  
 — — Mikrob. 703.  
 Ureid der Glucose 116.  
 — anderer Zucker 152.  
 Urein 517.  
 Uricolytisches Ferment 641.  
 Uridin 375, **388**.  
 Urinod 283.  
 Urobilin 429.  
 — Vorkommen 429.  
 — Entstehung 429.  
 — Zusammensetzung 430.  
 — Uneinheitlichkeit 423.  
 — Darst. aus Harn 429, 430.  
 — — aus Faeces 430.  
 — aus Mesobilirubinogen 423.  
 — aus Urobilinogen 423, 429.  
 — Eigenschaften 430.  
 — Spektrum 431.  
 — Nachweis 431.  
 — Verhältnis zu Mesobilirubin 423.  
 — Harnfarbe 680.  
 — Nachw. im Harn 757.  
 — — in Galle 913.  
 — in Gallensteinen 917.  
 — Nachw. neben Bilirubin im Dünndarminhalt 933.  
 — — in Faeces 937.  
 — — im Mageninhalte 905.  
 — Vork. in Galle 910.  
 — — in Duodenalsaft 908.  
 Urobilinogen 422, **423**, 429, s. auch Mesobilirubinogen.  
 — in Galle 910.  
 — Isol. aus Harn 432.  
 — Nachw. im Harn 757.  
 — — u. Best. in Faeces 938, 943.  
 Urobutylchloralsäure 134.  
 Urocanin 269.  
 Urocaninsäure 268, **269**.  
 Urocaninähnliche Verbindung von Swain 279.  
 Urochloralsäure 134, **355**.  
 Urochrom 427.  
 — Vorkommen 427.  
 — Darst. aus Harn 427.  
 — Trennung von Oxyproteinsäuren 517.  
 — Zusammensetzung 428.  
 — Eigenschaften 428.  
 — Umwandlung 428.  
 — Verhalten zu Aldehyd 428.  
 — Bestimmung 428.

Urochromogen 428.  
 — Nachw. im Harn 756.  
 Uroerythrin 431.  
 — Trennung vom Urobilin 432.  
 — — von Hämatoporphyrin 432.  
 Uroferrinsäure 518.  
 Urofoscohämatin 432.  
 Urogen 282.  
 Urogol 282.  
 Urogon 282.  
 Uroleucinsäure 305.  
 Uromelanin 429.  
 Uroporphyrin 408, **414**.  
 — Überführung im Koproporphyrin 415.  
 — Giftwirkung 416.  
 Uroprotsäure 518.  
 Urorosein 310, 432, **433**.  
 — Harnfarbe 680.  
 — Chromogen 433, s. auch Indolelessigsäure 320.  
 Urorubrohämatin 432.  
 Ursocholeinsäure **341**, 909.  
 Uterus, Ferment des Lactacidogens 638.  
 Uvitinsäure aus Cystin 255.

## V.

Vakuumtrocknung 7.  
 n-Valeriansäure 66.  
 d-Valeriansäure 66.  
 — aus Leucin 291.  
 — aus Eiweiß 447, 486.  
 Valeriansäure, aus Valin 235.  
 — aus Prolin 279.  
 Valin 191, **233**.  
 — Vorkommen 233.  
 — Darstellung 234.  
 — — des aktiven 234.  
 — — Eigenschaften 234.  
 — — optische 235.  
 — Trennung von Leucin 570.  
 — Verbindungen 234.  
 — Ninhydrinreaktion 219.  
 — Zersetzung 235.  
 — — Nachweis 235.  
 — aus Eiweiß 447.  
 — aus Harn 750, 752.  
 — Isol. aus Eiweißhydrolysat 563, 568, 570, 571.  
 — Gehalt einiger Proteine daran 596—599.  
 Valylleucinanhydrid, s. Leucylvalinanhydrid 510.  
 Valylglycinanhydrid, s. Glycylvalinanhydrid 508.  
 Vanadin 41.  
 Vanessenfarbstoffe 531.  
 Veraschung 649, s. Aschen.  
 Verkalkungen 851, s. Knochen.  
 Vernin 375, s. Guanosin.

- Vernix caseosa, Bestandteile und Untersuchung 929.  
 — Cholesterinester 324.  
 Verseifung der Fette 99.  
 Verseifungszahl 103.  
 Vesalthin 370.  
 Viridin 215.  
 Vitamin **216**, 437.  
 Vitellin 542, 546.  
 — Gehalt an Aminosäuren 599.  
 Vitellin-Lecithinverbindung 546, **547**.  
 Vitellinsäure 547, 548.  
 Vitellolutein 439.  
 Vitellorubin 439.  
 Vitiatin 205.  
 — Isol. aus Harn 717.  
 — — aus Muskel u. Organen 857.  
 Vivianit 39.  
 — im Darminhalt 944.  
 — in Knochen 851.  
 Vogelblut, Nucleoproteide 538.  
 — Histon 470.  
 Voisinets Probe (Tryptophan) 592.
- W.**
- Wachs 106.  
 — der Bienen 53, 71, 106.  
 — chinesisches 53, 71, 106.  
 — der Blattläuse 53, 72, 106.  
 Wage, Benutzung 9.  
 Walrat 69, 71, **106**.  
 — Cetylalkohol 52.  
 — Gadolinsäure 73.  
 — Laurin 68.  
 — Myristinsäure 68.  
 — Octadekylalkohol 53.  
 — Palmitinsäure 69.  
 — Säure  $C_{16}H_{30}O_2$  73.  
 — Stearinsäure 69.  
 Walroßgalle, Phosphatide 372.  
 — Gallensäure 340, 348.  
 Wasser, spez. Gew. bei verschiedenen Temperaturen Tabelle 949.  
 Wasserstoff, aus Eiweiß 447.  
 — in Faeces 934, 940.  
 Wasserstoffionenkonzentration und Fermente 601, 602.  
 — Best. im Blut 799.  
 — — im Mageninhalt 904.  
 Wasserstoffsperoxyd, Nachw. im Harn 683.  
 — im Speichel 893.  
 Wasserstoffzahl der Fette 104.  
 Wasserstrahlpumpe 5.  
 Weber-Schumms Probe (Blutfarbstoff in Faeces) 938.
- Weidels Probe (Purinkörper) 176, (Histidin) 268.  
 Weizenkleie, Tyrosinase 282.  
 Wespenbrutzellendeckel, Fibroin 491.  
 Weyls Reaktion (Kreatinin) 163.  
 Wheeler und Johnsons Reaktion (Cytosin und Uracil) 167, 168.  
 Wiechowskis Probe (Allantoin) 155.  
 Windaus' Probe (Cholesterin) 326.  
 Wittepepton 496.  
 — Gehalt an Aminosäuren 599.  
 Wöhlkes Probe (Zucker) 124, 127.  
 Wolle, Keratin 483, 597.  
 — Cystindarstellung 253.  
 Wollschweiß, Bestandteile und Untersuchung 929.  
 — Bernsteinsäure 94.  
 — Carnaubasäure 71.  
 — Carnaubylalkohol 53.  
 — Cerotinsäure 71.  
 — Cerylalkohol 53.  
 — Cholesterinester 323.  
 — Hyänasäure 71.  
 — Glutarsäure 96.  
 — Lanocerinsäure 91.  
 — Lanopalminsäure 90.  
 — Isocholesterin 333.  
 — Leucin 235.  
 — Myristinsäure 68.  
 — Oxycholesterin 331.  
 — Palmitinsäure, Stearinsäure 69.  
 Wursters Probe (Tyrosin) 301.
- X.**
- Xanthin, Vork. 169, 174, **175**.  
 — Darstellung 175.  
 — — aus Thymonucleinsäure 382.  
 — — aus Xanthylsäure 375, 379.  
 — Eigenschaften 175.  
 — Verbindungen 175.  
 — Methylierung 176.  
 — Umwandlungen 176.  
 — Nachweis 176.  
 — aus Guanin 178.  
 — aus Harnsäure 173.  
 — Trennung von Heteroxanthin und 1-Methylxanthin im Harn 186.  
 — Nachw. in Harnsteinen 764, 766.
- Xanthin, Best. im Muskel 876.  
 — Trennung von Hypoxanthin 876.  
 Xanthinoxidase 641.  
 Xanthinprobe 176.  
 Xanthinsteine im Harn 762, 764.  
 Xanthobilirubinsäure 422.  
 Xanthophyll 437, 438, 439.  
 — Nachw. u. Best. im Serum 794.  
 — Vork. in Milchfett 918.  
 Xanthoprotein 515.  
 Xanthoproteinreaktion 300, 449.  
 Xanthoproteinsäure 515.  
 Xanthosin 375.  
 — fermentative Spaltung 641.  
 Xanthosis, Lipochrome 437.  
 Xanthydrol zur Harnstoffbest. 152, 701, 779.  
 Xanthydrol, Darst. 779 Anm.  
 Xanthylsäure 375.  
 Xiphiin 479.  
 Xyliton aus Melanin 436.  
 l-Xylose 113.
- Z.**
- Zahnstein 896.  
 Zahnschmelz 851, s. Knochen.  
 Zahnzement, Zahnschmelz 851.  
 Zellen, Isol. aus Organen 857.  
 Zellkerne, Nucleinsäuren 375.  
 — Protamine 474.  
 — Histone 469.  
 — Nucleoproteide 533.  
 Zentrifugieren 4.  
 Ziegelmehl sediment 172, 431, **679**.  
 Zinckes abgekürztes Thermometer 16.  
 Zink, Vork., Eigenschaften 38.  
 Zirkumpolarisation 24.  
 Zucker 106, s. auch Glucose, Fructose usw.  
 — von Leo 120.  
 — Vork. in Dünndarminhalt 932.  
 — — in Faeces 933.  
 — — im Schweiß 918.  
 — Nachw. u. Best. in Galle 913.  
 — — — im Mageninhalt 906.  
 — — in Organen 869.  
 Zuckergärung, Glycerin 54.  
 — s. auch Gärungsprobe 107.  
 Zuckersäure 118, 128, 137, 358.  
 Zuckerschlempe, s. Rüben.  
 Zymogene 602, s. Profermente.



# Biochemisches Handlexikon

Herausgegeben von

**Emil Abderhalden**

Professor Dr. med. et phil. h. c.

Direktor des Physiologischen Instituts der Universität Halle a. S.

- I. Band, 1. Hälfte**, enthaltend: Kohlenstoff, Kohlenwasserstoff, Alkohole der aliphatischen Reihe, Phenole. 1911. 44 Goldmark; gebunden 46.50 Goldmark 10.50 Dollar; gebunden 11.10 Dollar
- I. Band, 2. Hälfte**, enthaltend: Alkohole der aromatischen Reihe, Aldehyde, Ketone, Säuren, Heterocyclische Verbindungen. 1911. 48 Goldmark; gebunden 50.50 Goldmark 11.55 Dollar; gebunden 12.05 Dollar
- II. Band**, enthaltend: Gummisubstanzen, Hemicellulosen, Pflanzenschleime, Pektinstoffe, Huminsubstanzen, Stärke, Dextrine, Inuline, Cellulosen, Glykogen, Die einfachen Zuckerarten, Stickstoffhaltige Kohlenhydrate, Cyklosen, Glucoside. 1911. 44 Goldmark; gebunden 46.50 Goldmark 10.55 Dollar; gebunden 11.10 Dollar
- III. Band**, enthaltend: Fette, Wachse, Phosphatide, Protagon, Cerebroside, Sterine, Gallensäuren. 1911. 20 Goldmark; gebunden 22.50 Goldmark 4.80 Dollar; gebunden 5.40 Dollar
- IV. Band, 1. Hälfte**, enthaltend: Proteine der Pflanzenwelt, Proteine der Tierwelt, Peptone und Kyrine, Oxydative Abbauprodukte der Proteine, Polypeptide. 1910. 14 Goldmark / 3.35 Dollar
- IV. Band, 2. Hälfte**, enthaltend: Polypeptide, Aminosäuren, Stickstoffhaltige Abkömmlinge des Eiweißes und verwandte Verbindungen, Nucleoproteide, Nucleinsäuren, Purinsubstanzen, Pyrimidinbasen. 1911. 54 Goldmark / 13 Dollar  
Mit der 1. Hälfte zus. geb. 71 Goldmark / 17 Dollar
- V. Band**, enthaltend: Alkaloide, Tierische Gifte, Produkte der inneren Sekretion, Antigene, Fermente. 1911. 38 Goldmark; gebunden 40.50 Goldmark 9.10 Dollar; gebunden 9.65 Dollar
- VI. Band**, enthaltend: Farbstoffe der Pflanzen- und der Tierwelt. 1911. 22 Goldmark; gebunden 24.50 Goldmark 5.25 Dollar; gebunden 5.85 Dollar
- VII. Band, 1. Hälfte**, enthaltend: Gerbstoffe, Flechtensstoffe, Saponine, Bitterstoffe, Terpene. 1910. 22 Goldmark / 5.25 Dollar
- VII. Band, 2. Hälfte**, enthaltend: Ätherische Öle, Harze Harzalkohole, Harzsäuren, Kautschuk. 1912. 18 Goldmark / 4.30 Dollar  
Mit der 1. Hälfte zus. geb. 43 Goldmark / 10.25 Dollar
- VIII. Band (1. Ergänzungsband)**: Gummisubstanzen, Hemicellulosen, Pflanzenschleime, Pektinstoffe, Huminstoffe, Stärke, Dextrine, Inuline, Cellulosen, Glykogen. Die einfachen Zuckerarten und ihre Abkömmlinge. Stickstoffhaltige Kohlenhydrate. Cyklosen. Glucoside. Fette und Wachse. Phosphatide. Protagon. Cerebroside. Sterine. Gallensäuren. Unveränderter Neudruck 1920. Gebunden 36.50 Goldmark / Gebunden 8.70 Dollar
- IX. Band (2. Ergänzungsband)**: Proteine der Pflanzenwelt und der Tierwelt. Peptone und Kyrine. Oxydative Abbauprodukte der Proteine. Polypeptide. Aminosäuren. Stickstoffhaltige Abkömmlinge des Eiweißes unbekannter Konstitution. Harnstoff und Derivate. Guanidin. Kreatin, Kreatinin. Amine. Basen mit unbekannter und nicht sicher bekannter Konstitution. Cholin. Betaine. Indol und Indolabkömmlinge. Nucleoproteide. Nucleinsäuren. Purin und Pyrimidinbasen und ihre Abbaustufen. Tierische Farbstoffe, Blutfarbstoffe, Gallenfarbstoffe. Urobilin. Unveränderter Neudruck 1922. Gebunden 30.85 Goldmark / Gebunden 7.35 Dollar
- X. Band (3. Ergänzungsband)**: Tierische Farbstoffe: (Blutfarbstoffe, Hämine, Porphyrine, Gallenfarbstoffe. Pyrrolderivate). Nucleoproteide und Nucleinsäuren. Purinsubstanzen. Pyrimidine. Sterine. Gallensäuren. Kohlenhydrate. Polysaccharide und Monosaccharide. Stickstoffhaltige Kohlenhydrate. Cyclosen. Glucoside.) (949 S.) 1923. 45 Goldmark; gebunden 50 Goldmark 10.75 Dollar; gebunden 12 Dollar
- XI. Band (4. Ergänzungsband)**: Polypeptide. Aminosäuren. Stickstoffhaltige Abkömmlinge des Eiweißes unbekannter Konstitution. Harnstoff und Derivate. Guanidin, Kreatin, Kreatinin. Amine. Basen mit unbekannter und nicht sicher bekannter Konstitution. Cholin, Betain, Neurine, Muscarin. Indol und Indolabkömmlinge. Biologisch wichtige Aminosäuren, die im Eiweiß nicht vorkommen. Gerbstoffe. Mit Generalregister der Bände I—XI. Erscheint im Herbst 1924

Verlag von Julius Springer in Berlin W 9

# Handbuch der experimentellen Pharmakologie

bearbeitet von

**J. Bock**-Kopenhagen, **R. Boehm**-Leipzig, **E. Bürgi**-Bern, **M. Cremer**-Berlin, **Arthur R. Cushny**-Edinburgh, **Walter E. Dixon**-Cambridge, **A. Ellinger**-Frankfurt a. M., **Ph. Ellinger**-Heidelberg, **E. St. Faust**-Basel, **F. Flury**-Würzburg, **H. Fühner**-Leipzig, **R. Gottlieb**-Heidelberg, **O. Gros**-Kiel, **F. Haffner**-München, **A. Heffter**-Berlin, **W. Heubner**-Göttingen, **P. Heymann**-Wiesbaden, **R. Höber**-Kiel, **Reid Hunt**-Boston, **Martin Jacoby**-Berlin, **G. Joachimoglu**-Berlin, **A. Jodlbauer**-München, **E. Keeser**-Berlin, **R. Kobert**-Rostock †, **M. Kochmann**-Halle a. S., **A. Loewy**-Davos, **R. Magnus**-Utrecht, **J. Pohl**-Breslau, **E. Poulsson**-Christiania, **E. Rohde**-Heidelberg †, **E. Rost**-Berlin, **A. Schnabel**-Berlin, **R. W. Seuffert**-Berlin, **E. Sieburg**-Hamburg, **K. Spiro**-Basel, **E. Starkenstein**-Prag, **W. Straub**-München, **P. Trendelenburg**-Freiburg i. Br.

Herausgegeben von

**A. Heffter**

Professor der Pharmakologie an der Universität Berlin

In drei Bänden

Erster Band: Kohlenoxyd — Kohlensäure — Stickstoffoxydul — Narkotica der aliphatischen Reihe — Ammoniak und Ammoniumsalze — Ammoniakderivate. Aliphatische Amine und Amide. Aminosäuren — Quartäre Ammoniumverbindungen und Körper mit verwandter Wirkung — Muscaringruppe — Guanidingruppe — Cyanwasserstoff. Nitrilglukoside Nitrile. Rhodanwasserstoff. Isocyanide — Nitritgruppe — Toxische Säuren der aliphatischen Reihe — Aromatische Kohlenwasserstoffe — Aromatische Monamine — Diamine der Benzolreihe — Pyrazolonabkömmlinge — Camphergruppe — Organische Farbstoffe.

Mit 127 Textabbildungen und 2 farbigen Tafeln. (1299 S.) 1923

48 Goldmark / 11.45 Dollar

Zweiter Band, 1. Hälfte: Pyridin, Chinolin, Chinin, Chininderivate — Cocaingruppe, — Curare und Curarealkaloide — Veratrin und Protoveratrin — Aconitingruppe — Pelletierin — Strychningruppe — Santonin — Pikrotoxin und verwandte Körper — Apomorphin, — Apocodein, Ipecacuanha — Alkaloide — Colchicingruppe — Purinderivate

Mit 98 Textabbildungen. (598 S.) 1920

21 Goldmark / 5 Dollar

Zweiter Band, 2. Hälfte: Atropingruppe — Nikotin, Coniin, Piperidin, Lupetidin, Cytisin, Lobelin, Spartein, Gelsemin — Quebrachoalkaloide — Pilocarpin, Physostigmin, Arecolin — Papaveraceenalkaloide — Kakteenalkaloide — Cannabis (Haschisch) — Hydrastisalkaloide — Adrenalin und Adrenalinverwandte Substanzen — Solanin — Mutterkorn — Digitalisgruppe — Phlorhizin — Saponingruppe — Gerbstoffe — Filixgruppe — Bittermittel Cotoin, Aristolochin — Anthrachinonderivate — Chrysarobin — Phenolphthalein — Koloquinten (Colocynthin) — Elaterin, Podophyllin, Podophyllotoxin, Convolvulin, Jalapin (Scammonin), Gummi-Gutti, Cambogiasäure, Euphorbium, Lärchenschwamm, Agaricinsäure — Pilzgifte — Ricin, Abrin, Crotin — Tierische Gifte — Bakterientoxine. Mit 184 zum Teil farbigen Textabbildungen. (S. 599—1974) 1924.

87 Goldmark, 20.75 Dollar

Dritter Band: Die osmotischen Eigenschaften der Gewebe (Wasser- und Salzwirkung) — Schwer resorbierbare Salze — Die Wasserstoff-Ionen (Säurewirkung) — Die Hydroxyl-Ionen (Alkalien, Carbonate) — Lithium, Kalium, Natrium, Magnesium, Calcium, Strontium, Baryum — Fluor, Chlor, Brom, Jod — Schwefelwasserstoff, Sulfide — Borsäure, Chlorsäure, Schweflige Säure — Phosphor, Arsen, Antimon — Die schweren Metalle.

In Vorbereitung

**Beilsteins Handbuch der organischen Chemie.** Vierte Auflage. Die Literatur bis 1. Januar 1910 umfassend. Herausgegeben von der **Deutschen Chemischen Gesellschaft**. Bearbeitet von Bernhard Prager, Paul Jacobson†, Paul Schmidt und Dora Stern. **Erster Band: Leitsätze für die systematische Anordnung. — Acyclische Kohlenwasserstoffe, Oxy- und Oxo-Verbindungen.** (1018 S.) 1918.

Gebunden 42 Goldmark / Gebunden 12.50 Dollar  
Zweiter Band: **Acyclische Monocarbonsäuren und Polycarbonsäuren.** (928 S.) 1920.

Gebunden 38 Goldmark / Gebunden 11.50 Dollar

Dritter Band: **Acyclische Oxy-Carbonsäuren und Oxo-Carbonsäuren.** (948 S.) 1921.

Gebunden 40 Goldmark / Gebunden 12 Dollar

Vierter Band: **Acyclische Sulfinsäuren und Sulfonsäuren. Acyclische Amine, Hydroxylamine, Hydrazine und weitere Verbindungen mit Stickstoff-Funktionen. Acyclische C-Phosphor-, C-Arsen-, C-Antimon-, C-Wismut-, C-Silicium-Verbindungen und metallorganische Verbindungen.** (750 S.) 1922. Gebunden 31 Goldmark / Gebunden 9.50 Dollar

Fünfter Band: **Cyclische Kohlenwasserstoffe.** (802 S.) 1922.

Gebunden 33 Goldmark / Gebunden 10 Dollar

Sechster Band: **Isocyclische Oxy-Verbindungen.** (1295 S.) 1923.

Gebunden 74 Goldmark / Gebunden 22.50 Dollar

**Lehrbuch der organisch-chemischen Methodik.** Von Dr. **Hans Meyer**, o. ö. Professor der Chemie an der Deutschen Universität zu Prag.

**Erster Band: Analyse und Konstitutions-Ermittlung organischer Verbindungen.** Von Dr. **Hans Meyer**, o. ö. Professor der Chemie an der Deutschen Universität zu Prag.

Vierte, vermehrte und umgearbeitete Auflage. Mit 360 Figuren im Text. (1227 S.) 1924.

56 Goldmark; gebunden 60 Goldmark / 13.35 Dollar; gebunden 14.30 Dollar

**Inhaltsverzeichnis:**

Erster Teil: Reinigungsmethoden für organische Substanzen und Kriterien der chemischen Reinheit. Elementaranalyse. Ermittlung der Molekulargröße. Erstes Kapitel: Vorbereitung der Substanz zur Analyse. Reinigungsmethoden für organische Substanzen. Zweites Kapitel: Kriterien der chemischen Reinheit und Identitätsproben. Bestimmung der physikalischen Konstanten. Drittes Kapitel: Elementaranalyse. Viertes Kapitel: Ermittlung der Molekulargröße.

Zweiter Teil: Ermittlung der Stammsubstanz. Erstes Kapitel: Abbau durch Oxydation. Zweites Kapitel: Alkalischnmelze. Drittes Kapitel: Reduktionsmethoden.

Dritter Teil: Qualitative und quantitative Bestimmung der wichtigsten Abbauprodukte.

Vierter Teil: Qualitative und quantitative Bestimmung der organischen Atomgruppen. Erstes Kapitel: Nachweis und Bestimmung der Hydroxylgruppe. Zweites Kapitel: Nachweis und Bestimmung der Carboxylgruppe. Drittes Kapitel: Nachweis und Bestimmung der Carboxylgruppe. Viertes Kapitel: Methoxygruppe und Äthoxygruppe. Höhere Alkoxye. Methylenoxygruppe. Brückensauerstoff. Fünftes Kapitel: Primäre, sekundäre und tertiäre Amingruppen. Ammoniumbasen. Nitrilgruppe. Isonitrilgruppe. An den Stickstoff gebundene Alkyl. Betaingruppe. Säureamide. Säureimide. Sechstes Kapitel: Diazogruppe. Azogruppe. Hydrazingruppe. Hydrazogruppe. Siebentes Kapitel: Nitroso- und Isonitrosogruppe. Nitrogruppe. Jodo- und Jodosogruppe. Peroxyde und Persäuren. Achtes Kapitel: Schwefelhaltige Atomgruppen. Neuntes Kapitel: Doppelte und dreifache Bindungen. Gesetzmäßigkeiten bei Substitutionen.

**Die quantitative organische Mikroanalyse.** Von **Fritz Pregl**, Dr. med. und Dr. phil. h. c., o. ö. Professor der Medizinischen Chemie und Vorstand des Medizinisch-Chemischen Instituts an der Universität Graz, korrespondierendes Mitglied der Akademie der Wissenschaften in Wien. Zweite, durchgesehene und vermehrte Auflage. Mit 42 Textabbildungen. (226 S.) 1923. Gebunden 12 Goldmark / Gebunden 2.90 Dollar

**Die Arzneimittel-Synthese** auf Grundlage der Beziehungen zwischen chemischem Aufbau und Wirkung. Für Ärzte, Chemiker und Pharmazeuten. Von Dr. **Sigmund Fränkel**, a. o. Professor für Medizinische Chemie an der Wiener Universität. Fünfte, umgearbeitete Auflage. (914 S.) 1921. 42 Goldmark / 10 Dollar

**Die neueren chemotherapeutischen Präparate aus der Chininreihe** (Optochin, im besonderen Eukupin und Vuzin) **und aus der Akridinreihe** (Trypaflavin, Rivanol). Eine kritische Besprechung des bisherigen Erfolges und der Grundlagen der Therapie. Von **Ernst Laqueur**, Direktor des Pharmakologischen Instituts Amsterdam. Unter Mitwirkung von A. Grevenstuk, Assistent am Pharmakologischen Institut Amsterdam, A. Sluyters, I. Assistent am Pharmakologischen Institut Amsterdam, L. K. Wolff, I. Assistent am Hygienischen Institut Amsterdam. (91 S.) 1923. 3 Goldmark / 0.75 Dollar

**Protein-Therapie und unspezifische Leistungssteigerung.** Von **F. William Petersen**, M. D. associate professor of pathology and bacteriology, university of Illinois, college of medicine Chicago. Übersetzt von Luise Böhme. Mit einer Einführung und Ergänzungen von Professor Dr. med. **Wolfgang Weichardt**, Erlangen. Mit 7 Abbildungen im Text. (315 S.) 1923. 10 Goldmark; gebunden 12.50 Goldmark / 2.40 Dollar; gebunden 3 Dollar

**Die Digitalis und ihre therapeutische Anwendung.** Im Auftrage des Niederländischen Reichsinstitutes für pharmakotherapeutische Untersuchungen. Bearbeitet von Dr. **U. G. Bijlsma**, Professor Dr. **A. A. Hijmans van den Bergh**, Professor Dr. **R. Magnus**, Dr. **J. S. Meulenhoff**, Dr. **M. J. Roessingh**. Autorisierte deutsche Übersetzung von Professor Dr. **P. Neukirch**. Mit 32 Abbildungen und einem Bildnis. (123 S.) 1923. 5.65 Goldmark / 1.35 Dollar

## Emil Fischer, Gesammelte Werke

Herausgegeben von

**M. Bergmann**

- Untersuchungen aus verschiedenen Gebieten.** Vorträge und Abhandlungen allgemeinen Inhalts. Herausgegeben von **M. Bergmann.** (924 S.) 1924.  
40.50 Goldmark; gebunden 42 Goldmark / 9.65 Dollar; gebunden 10 Dollar
- Untersuchungen über Triphenylmethanfarbstoffe, Hydrazine und Indole.** Von **Emil Fischer.** Herausgegeben von **M. Bergmann.** (889 S.) 1924.  
39 Goldmark; gebunden 40.50 Goldmark / 9.30 Dollar; gebunden 9.65 Dollar
- Untersuchungen über Kohlenhydrate und Fermente I.** (1884—1908.) Von **Emil Fischer.** (920 S.) 1909.  
22 Goldmark / 5.30 Dollar
- Untersuchungen über Kohlenhydrate und Fermente II.** (1908—1919.) Von **Emil Fischer.** Herausgegeben von **M. Bergmann.** (543 S.) 1922.  
19 Goldmark; gebunden 22 Goldmark / 4.55 Dollar; gebunden 5.25 Dollar
- Untersuchungen über Aminosäuren, Polypeptide und Proteine I.** (1899—1906.) Von **Emil Fischer.** (782 S.) 1906. Vergriffen
- Untersuchungen über Aminosäuren, Polypeptide und Proteine II.** (1907—1919.) Von **Emil Fischer.** Herausgegeben von **M. Bergmann.** (932 S.) 1923.  
29 Goldmark; gebunden 32 Goldmark / 7 Dollar; gebunden 7.65 Dollar
- Untersuchungen über Depside und Gerbstoffe.** (1908—1919.) Von **Emil Fischer.** (547 S.) 1919.  
21.80 Goldmark; gebunden 25 Goldmark / 5.20 Dollar; gebunden 6 Dollar
- Untersuchungen in der Puringruppe.** (1882—1906.) Von **Emil Fischer.** (616 S.) 1907.  
15 Goldmark; gebunden 19 Goldmark / 3.60 Dollar; gebunden 4.55 Dollar
- Organische Synthese und Biologie.** Von **Emil Fischer.** Zweite, unveränderte Auflage. (28 S.) 1912.  
1 Goldmark / 0.25 Dollar
- Neuere Erfolge und Probleme der Chemie.** Von **Emil Fischer.** (30 S.) 1911.  
0.80 Goldmark / 0.20 Dollar
- Aus meinem Leben.** Von **Emil Fischer.** Mit drei Bildnissen. Herausgegeben von **M. Bergmann.** (210 S.) 1922.  
Gebunden 9.50 Goldmark / Gebunden 2.30 Dollar  
In Pappband 7.50 Goldmark / 1.80 Dollar
- Untersuchungen über die Assimilation der Kohlensäure.** Aus dem Chemischen Laboratorium der Akademie der Wissenschaften in München. Sieben Abhandlungen von **Richard Willstätter** und **Arthur Stoll.** Mit 16 Textfiguren und einer Tafel. (456 S.) 1918.  
20 Goldmark / 4.80 Dollar
- Untersuchungen über die natürlichen und künstlichen Kautschukarten.** Von **Carl Dietrich Harries.** Mit 9 Textfiguren. (267 S.) 1919.  
14.50 Goldmark / 3.45 Dollar
- Festschrift der Kaiser Wilhelm Gesellschaft** zur Förderung der Wissenschaften zu ihrem zehnjährigen Jubiläum dargebracht von ihren Instituten. Mit 19 Textabbildungen und einer Tafel. (288 S.) 1921.  
12 Goldmark / 2.90 Dollar