

Quantitative Untersuchungen über den Gehalt von Aminostickstoff in den Oxyproteinsäuren des Menschenharns.

Von

Josef Browiński und Stefan Dombrowski.

(Aus dem med.-chemischen Institut der Universität Lwów [Lemberg]. Vorgelegt der Akademie der Wissenschaften in Krakau.)

(Der Redaktion zugegangen am 17. Januar 1912.)

Die Oxyproteinsäuren, welche im Harn von Menschen und Tieren von Bondzynski und seinen Mitarbeitern¹⁾ entdeckt wurden, stellen eigentümliche Verbindungen dar, welche sowohl auf Grund ihrer Zusammensetzung und zwar hauptsächlich des Schwefelgehaltes, wie auch auf Grund der Unfähigkeit zu dialysieren resp. ihrer schweren Dialysierbarkeit als dem Eiweißmolekül noch ziemlich nahestehende Produkte des Abbaues von Eiweiß im tierischen Organismus zu betrachten sind. Diese Betrachtungen ließen vermuten, daß in den Oxyproteinsäuren, unabhängig davon, ob sie als Polypeptide zu betrachten sind oder nicht — denn wohl nicht alle organische Verbindungen, welche durch Aminosäurereste substituierte Aminogruppen enthalten, sind zu den Polypeptiden zu rechnen — Stickstoff in Form von durch Säurereste substituierten Aminogruppen oder *sit venia verbo* in polypeptidartigen Bindungen enthalten sein müssen und aus der leichten Zersetzlichkeit der Oxyproteinsäuren, besonders unter dem Einfluß von verdünnten Mineralsäuren selbst in der Kälte, was bei ihrer Darstellung bereits beobachtet wurde, ließ sich erwarten, daß in denselben die Aminosäuregruppen mit besonderer Leichtigkeit durch Hydrolyse in Freiheit gesetzt werden können, oder daß solche Gruppen

¹⁾ Bulletin internat. de l'Acad. de Scienc. de Cracovie, Juillet 1905, und Diese Zeitschrift, Bd. 46, S. 83.

in ihren Molekülen vielleicht bereits enthalten sind. Diese Frage einer experimentellen Prüfung zu unterziehen, war besonders an der Zeit, seitdem von verschiedenen Autoren¹⁾ nach der Gegenwart von Aminosäuren und Polypeptiden im Harn und im Blute geforscht wurde und zwar umsomehr, als diese Forschungen zu verschiedenen und oft sogar zu kontroversen Resultaten geführt hatten.

Die Bestimmung der Aminosäuregruppen haben wir mittels der Formolmethode von Sørensen²⁾ an reinen Präparaten von Baryumsalzen von allen bekannten Oxyproteinsäuren, welche nach der Methode von Bondzynski, Dombrowski und Panek,³⁾ sowie an einem reinen Präparat des Calciumsalzes von Urochrom, welches nach der Methode von Dombrowski⁴⁾ gewonnen wurde — und zwar sowohl direkt, wie nach vorhergegangener Hydrolyse — ausgeführt.

Die Hydrolyse jeder von diesen Verbindungen wurde mit Salzsäure unter verschiedenen Bedingungen, nämlich bei verschiedener Wirkungsdauer und bei verschiedener Temperatur, sowie mit Fluorwasserstoffsäure bewerkstelligt. Fluorwasserstoffsäure zur Hydrolyse von Oxyproteinsäuren zu benutzen, bewogen uns die von Morel und Hugounenqu⁵⁾ mit dieser Säure bei der Hydrolyse von Eiweiß erlangten Resultate. Von diesen Autoren wurde nämlich beobachtet, daß die Spaltung von Eiweiß mit Fluorwasserstoffsäure (40—50 %) bei Wasserbadtemperatur ohne Verkohlung und ohne Oxydation, sowie ohne Bildung von Ammoniak vor sich geht und doch vollständig sein kann.

¹⁾ Frey und Gigon, *Biochem. Zeitschrift*, Bd. 22, S. 209. Yoshida, *Biochem. Zeitschrift*, Bd. 23, S. 239. Henriques, *Diese Zeitschrift*, Bd. 60, S. 1. Malfatti, *Diese Zeitschrift*, Bd. 61, S. 5, Bd. 66, S. 152. De Jager, *Diese Zeitschrift*, Bd. 62, S. 333, Bd. 65, S. 189. Sørensen und Henriques, *Diese Zeitschrift*, Bd. 63, S. 27, Bd. 64, S. 120.

²⁾ *Biochem. Zeitschrift*, Bd. 7, S. 45 u. 407, Bd. 21, S. 131, Bd. 22, S. 345.

³⁾ l. c.

⁴⁾ *Bull. de l'Acad. de Scienc. de Crac.*, Octobre 1907, und *Diese Zeitschrift*, Bd. 54, S. 118.

⁵⁾ *Bull. Soc. chim.*, 4^e s., Bd. III, C. R. 1908.

Auf die Anwendung von Schwefelsäure zur Hydrolyse haben wir verzichtet, weil damit angestellte Versuche ergaben, daß mit dem bei Neutralisation der Schwefelsäure mit Baryumhydroxyd ausfallenden Baryumsulfat reichliche Mengen von Spaltungsprodukten ausgefällt oder mitgerissen wurden.

Da die Ammoniakbestimmung einen wichtigen Punkt der Formolmethode bildet, so wurden vorerst einige Versuche angestellt, um die Wahl einer Methode der Ammoniakbestimmung zu erleichtern. Es kamen hier nämlich zwei Methoden der Vertreibung von Ammoniak in Betracht: nämlich diejenige von Berthelot und Folin¹⁾ der Destillation mit frisch ausgeglühter Magnesia beim gewöhnlichem Druck, sowie die Methode der Destillation unter vermindertem Druck mit Baryumhydroxyd in methylalkoholischer Lösung, welcher Sörensen²⁾ bei seiner Untersuchung sich bedient hatte. Mit Hilfe dieser zwei Methoden wurde, wie aus der Tafel I ersichtlich ist, in Lösungen sowohl von Urochrom wie von Alloxyproteinsäure Ammoniak immer in gleicher Menge in Freiheit gesetzt.

Tafel I.

Substanz. Anzahl von ccm Lösung	Anzahl der zur Bindung von Ammoniak verbrauchten ccm $n/5$ -H ₂ SO ₄	
	Destillation mit MgO	Destillation mit Ba(OH) ₂ in methylalkoholischer Lösung
Urochrom		
10	0,15	0,15
25	1,0	0,8
5	0,25	0,3
20	1,1	1,0
Alloxyproteinsäure		
10	0,6	0,7

Auf diese Ergebnisse gestützt, haben wir mit besonderer Rücksicht auf die labile Natur der Oxyproteinsäuren in den meisten Versuchen das Vertreiben von Ammoniak mit Magnesia vorgezogen.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 32, S. 515.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 64, S. 120.

Der Aminosäurestickstoff läßt sich jedoch, wie wir uns überzeugt haben, nicht allein aus der Differenz zwischen dem durch Formoltitration ermittelten und dem Stickstoff des Ammoniaks erhalten; er läßt sich auch direkt durch Formoltitration des nach Abtreiben des Ammoniaks zurückgebliebenen Destillationsrückstandes bestimmen. Wir haben uns nämlich überzeugt, was die Tafel II veranschaulicht, daß die direkte Formoltitration des in Salzsäure gelösten Destillationsrückstandes nach der Methode von Sörensen¹⁾ mit den auf indirektem Wege, aus Differenz erhaltenen, genau übereinstimmende Resultate liefert.

Tafel II.

Substanz. Anzahl von ccm Lösung	Bestimmung von Aminogruppen aus Differenz in ccm $\frac{n}{5}$ -NaOH	Bestimmung von Amino- gruppen durch direkte Formoltitration des Destillationsrückstandes in ccm $\frac{n}{5}$ -NaOH
10 ccm von Uro- chromlösung	0,9	1,0
10 ccm von Alloxy- proteinsäurelösung	1,2	1,1

Die eigentlichen Versuche mit Oxyproteinsäuren wurden mit 2—3 g der betreffenden Baryumsalze angestellt. Die Substanz wurde zu dem Zweck in 150—200 ccm Wasser gelöst,

10 ccm von dieser Lösung wurden zur Bestimmung von Gesamtstickstoff, 10—20 ccm zur Formoltitrierung und dieselbe Quantität zur Ammoniakbestimmung verwendet.

Zur Hydrolyse mit Salzsäure wurden 40—50 ccm der betreffenden Lösung in einem Kolben mit 50 ccm konzentrierter Salzsäure versetzt und 7—9 Stunden mit Rückflußkühler damit gekocht; von gebildetem Melanin wurde abfiltriert und der Stickstoffgehalt desselben nach Kjeldahl ermittelt, das Filtrat vom Melanin fast bis zur Trockne abgedampft, die noch zurückgebliebene Salzsäure mit Baryumcarbonat abgestumpft und die Lösung vom überschüssigen Baryumcarbonat filtriert. Das Filtrat wurde auf 100 ccm gebracht und die eine Hälfte (50 ccm) davon zur Formoltitrierung, die andere zur Ammoniakbestimmung genommen.

¹⁾ l. c.

Zur Hydrolyse mit Fluorwasserstoffsäure wurden 50 ccm der Lösung einer Oxyproteinsäure in einem nach Morel aus Blei gefertigten und mit einem eine Rückflußröhre aus Blei enthaltenden Kühler versehenen Apparat 24 Stunden lang mit 50 ccm Fluorwasserstoffsäure (40%) auf dem Wasserbade erwärmt. Nach dem Abkühlen wurde das Produkt der Hydrolyse mit Natronlauge neutralisiert und filtriert. Das Melanin hatte sich bei Anwendung von Fluorwasserstoffsäure nur bei Hydrolyse von Urochrom gebildet. Das Filtrat wurde auf 100 ccm aufgefüllt und zur Bestimmung von Ammoniak, sowie von Stickstoff der Aminogruppen verwendet. Vor der Formoltitrierung wurde jedoch aus der Flüssigkeit das darin in Spuren enthaltene Blei mit Schwefelwasserstoff entfernt, worauf der Schwefelwasserstoff mittels Durchleitung von Luft ausgetrieben wurde.

Die Lösungen von Urochrom und von Alloxyproteinsäure wurden auch der Hydrolyse mit Salzsäure bei Zimmertemperatur unterworfen. Nach Verlauf bestimmter Zeitabschnitte wurden 25 ccm der Lösung entnommen, mit Baryumcarbonat neutralisiert, vom Überschuß desselben filtriert, auf 50 ccm aufgefüllt und zur Bestimmung von Ammoniak und Aminogruppen verwendet. Bei Formoltitrierung betrug die Flüssigkeitsmenge in den ersten Versuchen ca. 30 ccm, in späteren 60 ccm. Es wurde immer nach Sörensen¹⁾ mit Lackmus neutralisiert, und nach Formolzusatz mit Phenolphthalein zur stark roten Farbe titriert. Auch die Kontrollösung wurde nach Sörensen dargestellt. Obwohl aber die Flüssigkeit nach der Hydrolyse immer mehr oder weniger dunkel gefärbt war, konnten wir die von Sörensen empfohlene Entfärbung mit Silbersalzen nicht anwenden, weil der Silberniederschlag beträchtliche Mengen von Stickstoffsubstanzen mit sich riß. Wir zogen in diesen Fällen vor, eines anderen Behelfes von Sörensen für solche Fälle, nämlich der mit Tropäolin und Bismarckbraun bereiteten Kontrollösung uns zu bedienen.

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen haben wir in den vorliegenden Tafeln zusammengestellt.

¹⁾ Biochem. Zeitschrift, Bd. 7, S. 45, u. Diese Zeitschrift, Bd. 63.

Urochrom.

Tafel III.

Substanz	Art der Bindung von N	Milligramme von Stickstoff					
		Vor der Hydrolyse	Nach der Hydrolyse mit HCl bei Zimmertemperatur				Nach 7 stünd. Kochen mit HCl
			3 Tage	6 Tage	14 Tage	30 Tage	
Calciumsalz des Urochroms mit 196 mg G.-N in 100 ccm Lösung	$\text{NH}_3 + \text{NH}_2$	11,2	30,8	30,8	33,6	36,4	36,4
	NH_3	6,4	16,8	16,8	19,6	19,6	11,2
	NH_2	4,8	14	14	14	16,8	25,2
	N des Melanins	0	0	0	0	—	5,23

Tafel IV.

Substanz	Art der Bindung von N	Milligramme von Stickstoff		
		Vor der Hydrolyse	Nach 9stün- digem Kochen mit HCl	Nach 24stün- digem Erwär- mem HF
Calciumsalz des Urochroms mit 151,2 mg G.-N in 100 ccm Lösung	$\text{NH}_3 + \text{NH}_2$	—	47,6	53,2
	NH_3	4,2	28,0	13,2
	NH_2	—	19,6	40,0
	Melanin	—	12,6	15,68

Tafel V.

Art der Bindung von N	% des Gesamtstickstoffs					
	Vor der Hydrolyse	Hydrolyse bei Zimmer- temperatur		Nach 7stündigem Kochen mit HCl	Nach 9stündigem Kochen mit HCl	Nach 24stünd. Erwärmen mit HF
		14 Tage	30 Tage			
NH ₃	3,26—2,77	10		5,7	18,52	8,74
NH ₂	2,44	7,14	8,57	12,86	12,96	26,44
Melanin	—	0		2,67	8,3	10,38
Zusammen	—	17,1	18,5	21,43	39,78	45,56

Aus obigen Tafeln fällt uns zunächst auf, daß aus reinem Calciumsalz des Harnfarbstoffs mittels gebrannter Magnesia sich Ammoniak austreiben läßt. Da es ausgeschlossen ist, daß das zur Untersuchung angewandte Präparat, welches sofort nach der Darstellung in einen Exsikkator gebracht und darin aufbewahrt wurde, etwa eine Zersetzung erleiden konnte, so müssen wir annehmen, daß im Urochrom ein geringer Teil von Stickstoff in Form von Säureamidogruppen etwa so locker wie in Carbaminsäure gebunden ist; ferner bemerken wir, daß das Urochrom freie Aminogruppen nur in sehr geringer Menge enthält.

Die Zersetzung des Urochroms mit Salzsäure bei Zimmertemperatur verlief nach 3 Tagen beinahe so weit wie nach 30 Tagen. Nach Verlauf von 15 Tagen nahm die Hydrolyse nämlich schon gar nicht zu. Vor der Hydrolyse betrug der mit Magnesia als Ammoniak abspaltbare Stickstoff in dem untersuchten Präparate 3% des Gesamtstickstoffs; der Aminostickstoff 2,5%, nach 3-tägiger Hydrolyse wurden also 7% des Gesamtstickstoffs als Ammoniak, 6% in Form von Aminogruppen abgespalten. Durch 7stündiges Kochen mit Salzsäure wurde weniger (2,7%) Ammoniakstickstoff als bei Zimmertemperatur, dagegen mehr (10,4%) Aminostickstoff und außerdem 2,7% Stickstoff in der Form von Melanin abgespalten. Unter diesen Umständen wurde also im ganzen 16% Stickstoff abgespalten, während beim Einwirken von Salzsäure bei Zimmertemperatur der abgespaltene Stickstoff 13% des Gesamtstickstoffs betrug. Nach 9 Stunden langem Kochen mit Salzsäure war die Gesamtmenge des abgespaltenen Stickstoffs gleich 34,3% des Gesamtstickstoffs, wovon 15,5% auf Ammoniak, 10,5% auf Aminostickstoff und 8,3% auf Uromelaninstickstoff fielen.

Beim Erwärmen des Urochroms mit Fluorwasserstoffsäure auf dem Wasserbade ging die Hydrolyse etwas tiefer. Die Gesamtmenge des abgespaltenen Stickstoffs betrug dann 40% des Gesamtstickstoffs, woran Ammoniak mit 5,7%, der Aminostickstoff mit 24% und der Melaninstickstoff mit 10,38% beteiligt war. Der Verlauf der Fluorwasserstoffhydrolyse war also milder, gleichzeitig jedoch tiefer als derjenige der Salzsäurehydrolyse. Die Menge des abgespaltenen Aminostickstoffs hat sich im

Vergleich mit den Ergebnissen der HCl-Hydrolyse verdoppelt, während der Ammoniakstickstoff bis zur Hälfte sich vermindert hatte.

Die Alloxyproteinsäure.

Tafel VI.

Sub- stanz	Art der Bin- dung von N	Milligramme von Stickstoff								
		Vor der Hy- dro- lyse	Nach Hydrolyse mit HCl					Sub- stanz	Vor der Hy- dro- lyse	Nach 24stünd. Er- wärmen mit HF
			bei Zimmer- temperatur				Nach 9stünd. Kochen			
			3 Tage	10 Tage	24 Tage	31 Tage				
Alloxy- protein- saures	NH ₃ + NH ₂	14,0	19,6	22,4	22,4	22,4	50,4	Alloxy- protein- saures Natrium	7,8	56
	NH ₃	4,2	5,6	5,6	5,6	5,6	19,6	65,8 mg	2,1	2,8
	NH ₂	9,8	14,0	16,8	16,8	16,8	30,8	G.-N in 100 ccm	5,7	53,2
	Melanin	0	0	0	0	0	7,56	Lösung	0	0
Baryum 154 mg		% des Gesamtstickstoffs								
G.-N in 100 ccm Lösung	NH ₃ + NH ₂	9,09	12,73	14,59	—	—	32,73		11,8	81,1
	NH ₃	2,73	3,6	3,63	—	—	12,73		3,1	4,2
	NH ₂	6,36	9,13	10,96	—	—	20,00		8,7	76,9
	Melanin	—	—	—	—	—	4,9		—	—

Aus Alloxyproteinsäure ließ sich ebenfalls durch Kochen mit gebrannter Magnesia ein geringer Teil von Stickstoff als Ammoniak abspalten und diese Säure enthielt auch freie Amino-
gruppen. Die Hydrolyse der Alloxyproteinsäure mittels Salzsäure bei Zimmertemperatur erlangte schon nach 10 Tagen fast ihr Maximum, denn nach 24 und sogar 31 Tagen blieb die Menge des gebildeten Aminostickstoffs (4,6% des Gesamtstickstoffs) und des Ammoniakstickstoffs gegenüber der nach 10 Tagen gefundenen unverändert und die Gesamtmenge des abgespaltenen Stickstoffs hat 5,6% des Gesamtstickstoffs nicht überschritten.

Nach 9 Stunden langem Kochen mit Salzsäure ist die Gesamtmenge des abgespaltenen Stickstoffs auf 23,7% gestiegen,

wovon entfielen auf Ammoniak 10%, auf Aminostickstoff 13,6%, auf melaninoide Körper 4,9% des Gesamtstickstoffs.

Die Anwendung von Fluorwasserstoffsäure zur Hydrolyse änderte die Spaltung: Dieselbe wurde tiefer, es spalteten sich 69,3% des Gesamtstickstoffs, also 3 mal so viel Stickstoff ab, als nach dem Kochen mit Salzsäure, wovon nur 1,1% als Ammoniak und 68,2% in der Form von Aminogruppen abgespalten wurden. Die Hydrolyse mit Fluorwasserstoffsäure verlief also auch hier milder und tiefer als die Salzsäurehydrolyse; die Menge des gebildeten Ammoniakstickstoffs war um das 10fache geringer als bei der Spaltung mit HCl, die Menge des Aminosäurestickstoffs dagegen 5 mal größer und es entstanden dabei auch keine melaninoide Produkte.

Die Antoxyproteinsäure.

Tafel VII.

Substanz	Art der Bindung von N	Milligramme von Stickstoff		
		Vor der Hydrolyse	Nach 9stünd. Kochen mit HCl	Nach 24stünd. Erwärmen mit HF
Antoxy-proteinsaures Baryum 173,6 mg G.-N in 100 ccm Lösung	$\text{NH}_3 + \text{NH}_2$	19,6	61,6	64,4
	NH_3	0	30,8	5,6
	NH_2	19,6	30,8	58,8
	Melanin	0	7,28	0
	% des Gesamtstickstoffs			
	$\text{NH}_3 + \text{NH}_2$	11,29	36,1	37,09
	NH_3	0	18,05	3,2
	NH_2	11,29	18,05	33,89
	Melanin	—	4,29	0
	Zusammen	—	40,39	37,09

Aus der Antoxyproteinsäure ließ sich mit gebrannter Magnesia Ammoniak nicht abspalten. Die freien Aminogruppen enthielt diese Säure jedoch in größerer Menge als die Alloxyproteinsäure. Die Hydrolyse dieser Säure verlief sowohl beim Kochen mit Salzsäure wie auch beim Erwärmen mit Fluorwasserstoffsäure auf dem Wasserbade bis zu derselben Grenze.

Die Gesamtmenge des abgespaltenen Stickstoffs betrug in beiden Fällen 29%. Die Salzsäure wirkte jedoch energischer, sie rief offenbar sekundäre Zersetzungen hervor, denn unter ihrer Wirkung wurde nur 6,76% des Gesamtstickstoffs in Gestalt von Aminogruppen, dagegen 18% als Ammoniak und 4,29% in Form eines melaninoiden Stoffes abgespalten, während nach der Hydrolyse mit Fluorwasserstoffsäure im Gegensatz dazu 22,6% des Gesamtstickstoffs Aminosäurestickstoff und 3,2% Ammoniakstickstoff waren. Melaninoide Produkte sind bei Einwirkung von Fluorwasserstoffsäure nicht entstanden.

Die Oxyproteinsäure.

Tafel VIII.

Substanz	Art der Bindung von N	Milligramme von Stickstoff		
		Vor der Hydrolyse	Nach der Hydrolyse	
			9 stünd. Kochen mit HCl	24 stünd. Erwärmen mit HF
Oxyprotein-saures Baryum	$\text{NH}_3 + \text{NH}_2$	39,2	70,56	89,6
	NH_3	0	25,2	8,4
	NH_2	39,2	45,36	81,2
	Melanin	0	4,48	0
100,8 mg	% des Gesamtstickstoffs			
G.-N	$\text{NH}_3 + \text{NH}_2$	38,8	70,0	88,8
in 100 ccm Lösung	NH_3	0	25	8,3
	NH_2	38,8	45	80,5
	Melanin	—	4,4	—
	Zusammen	—	74,4	88,8

Die Oxyproteinsäure ließ ebenso wie Antoxyproteinsäure vor der Hydrolyse keinen Stickstoff in Ammoniakform mit Magnesia abspalten. Die Formoltitration ergab dagegen, daß diese Säure als solche freie Aminogruppen in beträchtlicher Menge enthielt: Mehr als ein Drittel ihres Stickstoffs bildete offenbar in ihrem Molekül solche Gruppen. Bei der Hydrolyse mit Salzsäure wurden 35,6% ihres Stickstoffs abgespalten, wovon 6,2% in Form von Aminosäuren, 25% als Ammoniak und 4,4% in melaninoiden Stoffen. Bei Anwendung von Fluor-

wasserstoffsäure war die Hydrolyse hier ebenso wie in Versuchen mit anderen Oxyproteinsäuren tiefer, indem die Menge des abgespaltenen Stickstoffs 50% des Gesamtstickstoffs betrug, woran Ammoniak nur mit 8,3% (3mal weniger als bei Salzsäurehydrolyse) beteiligt waren. Melaninoide Produkte sind dabei nicht entstanden.

Tafel IX.
% des Gesamtstickstoffs.

	Art der Bindung von N	Urochrom	Alloxyproteinsäure		Autoxyproteinsäure	Oxyproteinsäure
Vor der Hydrolyse	NH ₃	2,77	2,73	3,1	0	0
	NH ₂	2,4	6,36	8,7	11,29	38,8
Nach der Hydrolyse durch 9stünd. Kochen mit HCl	NH ₃	18,52	12,73		18,05	25
	NH ₂	12,96	20,00		18,05	45
	Melanin	8,3	4,90		4,29	4,4
	Zusammen	39,78	37,63		40,39	74,4
Nach der Hydrolyse durch Erwärmen in 24 Stunden mit HF	NH ₃	8,74	4,2		3,2	8,3
	NH ₂	26,44	76,9		33,89	80,5
	Melanin	10,38	0		0	0
	Zusammen	45,56	81,1		37,09	88,8

Die quantitativen Untersuchungen von Urochrom, sowie von Oxyproteinsäuren auf die Gegenwart von freien Aminogruppen resp. auf die Bildung von Aminosäuren bei der Hydrolyse gestatten uns, folgendes zu schließen:

1. Die mit Bleiessig nicht fällbaren Oxyproteinsäuren weisen vor der Hydrolyse keinen mit Magnesia in Ammoniakform abspaltbaren Stickstoff auf, sie enthalten dagegen beträchtliche Mengen von freien Aminogruppen. In der Antoxyproteinsäure entfällt 11,3, in der Oxyproteinsäure sogar 38,8% des Gesamtstickstoffs auf diese Gruppen. Die mit Bleiessig fällbaren Oxyproteinsäuren enthalten vor der Hydrolyse Aminogruppen in bedeutend geringerer Menge. In der Alloxyproteinsäure bildete nämlich der Stickstoff dieser Gruppen nur 6—8%, im Urochrom sogar nur 2% des Gesamtstickstoffs.

Die Gegenwart in Oxyproteinsäure und Antoxyproteinsäure von freien Aminogruppen, welche formoltitriert werden können, weist darauf hin, daß diese Säuren einer tieferen Spaltung von Eiweiß ihre Entstehung verdanken als die Alloxyproteinsäure und besonders als das Urochrom, und daß sie demzufolge weniger zusammengesetzte einfachere Körper sind als die letzteren Säuren.

2. Gleichzeitig geht aus diesen Untersuchungen hervor, daß im normalen Menschenharn in der Gestalt von Oxyproteinsäuren zusammengesetzte Aminosäuren enthalten sind, deren freie Aminogruppen unmittelbar im Harn mit Formol sich titrieren lassen. In den Untersuchungen von Henriques und Sörensen¹⁾ entfiel im nach einer gemischten Kost entleerten Harne eines gesunden Menschen auf formoltitrierbaren Aminostickstoff 1,6—2,0 % des Gesamtstickstoffs. Der Befund von Aminogruppen im normalen Menschenharn wurde meistens auf einfache Aminosäuren, wie Glykokoll, bezogen. Jetzt ist einleuchtend, daß dieser Aminostickstoff im größeren Teil oder vielleicht im Ganzen den Oxyproteinsäuren gehört. In kürzester Zeit werden wir übrigens den Anteil von Oxyproteinsäuren an dem formoltitrierbaren Aminostickstoff eines normalen Menschenharns quantitativ bestimmen.

3. Weiter geht aus unseren Versuchen hervor, daß alle Oxyproteinsäuren und das Urochrom bei Einwirkung von hydrolytischen Agenzien, und zwar bei einem mäßigen Gehalt derselben schon bei Zimmertemperatur Aminosäuren abspalten. An der Hand dieser Beobachtung ist man zu zweifeln berechtigt, ob die von verschiedenen Autoren im Harn sowie auch im Blute und Transsudaten gefundenen Aminosäuren darin wirklich präexistiert hatten, und nicht etwa unter der Wirkung der Reagenzien (Natronlauge oder Salzsäure bei Anwendung von Naphthalinsulfochlorid) aus den Oxyproteinsäuren entstanden sind.

4. Ferner ist ersichtlich, daß der Verlauf der Hydrolyse verschieden sich gestaltet, je nachdem dieselbe mit Salzsäure

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 60, S. 1.

oder Fluorwasserstoffsäure ausgeführt wird. Beim Kochen mit Salzsäure werden große Mengen von Ammoniak gebildet, wahrscheinlich infolge der sekundären Wirkung dieses hydrolytischen Agens auf die freiwerdenden Aminosäuren, daneben finden Oxydations- und Kondensationerscheinungen statt, was die Bildung von melaninoiden Substanzen aus allen Oxyproteinsäuren beweist. Die Hydrolyse mit Fluorwasserstoffsäure verläuft trotz niedriger Temperatur tiefer unter Bildung von größerer Menge von Spaltungsprodukten und darunter bedeutend geringerer Menge von Ammoniak, als die Hydrolyse mit Salzsäure.

Die Menge des abgespaltenen Aminostickstoffs betrug: im Fall von Oxyproteinsäure 41,7% des Gesamtstickstoffs bei Anwendung von HF, statt 6,2% bei Anwendung von HCl; im Fall von Antoxyproteinsäure 22,6% bei HF, statt 6,8% bei HCl; im Fall von Alloxyproteinsäure 68,2% bei HF, statt 13,64% bei HCl; im Fall von Urochrom 24% bei HF, statt 10,5% bei HCl.

Außerdem entsteht bei der Hydrolyse mit Fluorwasserstoffsäure, trotzdem daß sie tiefer verläuft, ein Melanin nur aus Urochrom. Die melaninoiden Substanzen, welche bei der Hydrolyse von Antoxy-, Oxy- und Alloxyproteinsäure entstehen, stellen mehr Produkte einer mit Oxydation verbundenen Kondensation dar — Körper, welche mit jenen Melaninoiden- sowie Huminsubstanzen vergleichbar sind —, welche Samuely¹⁾ bald durch Hydrolyse von Proteinen, bald künstlich aus Aminosäuren und Kohlenhydraten erhalten hatte.

5. Die Bildung von Melanin ausschließlich aus Urochrom bei der Hydrolyse mit Fluorwasserstoffsäure und seine Abwesenheit unter den Abbauprodukten anderer Oxyproteinsäuren kann als Beweis gelten, wenn eines solchen es bedürfte, daß keine von den Oxyproteinsäuren Muttersubstanz des Urochroms (Urochromogen) sein kann.

Wir bemerken dies deshalb, weil Moritz Weiß²⁾ in jener Gruppe von Oxyproteinsäuren, welche mit Bleiessig nicht fällbar sind, sogar zwei Urochromogene, welche er mit α und β be-

¹⁾ Beitr. zur chem. Physiol. u. Pathol., Bd. 2, S. 355.

²⁾ Biochemische Zeitschrift, Bd. 30, S. 333.

zeichnet, zu finden glaubt. «Echtes Urochrom» nennt Moritz Weiß jene Verbindung, welche nach der Fällung mit Kupferacetat in Lösung unter Gelbfärbung derselben bleibt und dann beim Zusatz von Bleiessig mit der Alloxyproteinsäure sich niederschlägt. Mit Nachdruck müssen wir hervorheben, daß Moritz Weiß die von einem von uns¹⁾ festgestellte Tatsache außer acht gelassen hat, daß das Urochrom eine außerordentlich leicht zersetzliche und besonders leicht oxydierbare Verbindung ist. Seine Fällung mit Kupferacetat aus dem Harn sowie aus reinen Lösungen beruht auf der Bildung einer wasserunlöslichen Cuproverbindung, sie kann somit nur unter Reduktion des Kupferacetats erfolgen. Im Harn können an dieser Reduktion auch andere Körper mitwirken, in einigermaßen reinen Lösungen wird dieselbe auf Kosten des Harnfarbstoffs selbst geschehen müssen. Die Fällung des Urochroms mit Kupferacetat, und zwar insbesondere aus einigermaßen reinen Lösungen ist deshalb unvollständig, weil sie notwendigerweise mit der Oxydation eines Teiles des Urochroms verbunden ist. Das in Lösung zurückbleibende Oxydationsprodukt des Harnfarbstoffs erteilt den Filtraten von Kupferniederschlägen die schwach gelbe Farbe, welche denselben noch eigen ist. Die Bezeichnung des mit Kupferacetat fällbaren stickstoff- und schwefelhaltigen Körpers als Urochrom geschah bekanntlich auf Grund einer sehr eingehenden Untersuchung dieser Verbindung: ihrer Reinigung, Ermittlung ihrer Zusammensetzung, Erforschung ihrer Eigenschaften und einiger ihrer wichtigsten Spaltungsprodukte, sowie Erkennung ihrer Beziehungen einerseits zu dem schwefelreichen Pigment vom Harn und von melanotischen Geschwülsten, anderseits zum Proteinochromogen. Hätte Herr Weiß aus dem Kupferniederschlag die Verbindung rein dargestellt und ihre Eigenschaften studiert, so wäre er, wenn nicht aus anderen Gründen, so wenigstens durch die Erkenntnis, daß das Problem sehr schwierig ist, von seinen Schlußfolgerungen abgehalten. Statt dessen hat er jedoch vorgezogen, die Farbe von Lösungen und Niederschlägen, welche er bei der Behand-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 54, S. 188 (1907).

lung eines Gemenges von Proteinsäuren mit Quecksilberacetat und Kupferacetat erhalten hat, zu verfolgen, und zwar offenbar von dem Standpunkt aus, daß eine Lösung oder ein Niederschlag, welcher gelb ist, Urochrom, und welcher nach der Oxydation erst gelb wird, Urochromogen enthalten muß. Auf diese Weise bezeichnet er als α - und β -Urochromogene Substanzen, welche er weder isoliert noch irgendwie genauer untersucht hatte und welche nach unseren Erfahrungen ein Gemenge von Alloxyproteinsäure und einer oder mehreren mit Bleiessig sowie auch mit Quecksilberacetat aus saurer Lösung fällbaren Säuren war. Endlich hat er sich auch über die wichtigste Tatsache, welche der neuen Auffassung von Urochrom zugrunde liegt, nämlich über den Schwefelgehalt des Harnfarbstoffs ohne weiteres hinweggesetzt und sich der Annahme von Hohlweg, Salomonsen und Mancini angeschlossen, daß dasselbe eine schwefelfreie Verbindung wäre ungeachtet dessen, daß von einem von uns¹⁾ bewiesen wurde, daß diese Behauptung irrig ist.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 62, S. 358.