

KÖZLÉS A KOLOZSVÁRI M. KIR. FERENCZ JÓZSEF TUDOMÁNY-
EGYETEM ÉLETTANI INTÉZETÉBŐL.

Igazgató: DR. UDRÁNSZKY LÁSZLÓ egyet. ny. r. tanár.

A szarvasmarha-vér fibrinjének hydrolysises elemzése.*

Írta: REINBOLD BÉLA dr. egyetemi magántanár, élet- és körvegytani adjunctus.

A fehérjeféle anyagok chemiai szerkezetének felderítése és ezzel kapcsolatosan ezen anyagok élettani szerepének biztos alapokra fektetett megismerése tetemes nehézségbe ütközik.

Az elementaris elemzés módszere alapján felállítható tapasztalati képletek távoli bepillantást sem engednek a fehérje-molekula szerkezetébe. Természetes, hogy az olyan nagy atomtömegekben, mint a milyeneknek a fehérjék molekuláit képzelnünk kell, ugyanaz a tapasztalati képlet az isomeriák szinte végtelen sorát engedi meg. Az ilyen molekula-óriások belső szerkezetének megismerése céljából arra kell törekednünk, hogy belőlük valamilyen bontás útján lehetőleg nagy, jellegző és szerkezetileg ismert atomcsoportokat nyerjünk és hogy ezeknek mennyiségét, továbbá egymáshoz való viszonyát meghatározzuk.

A fehérjéről rég tudjuk, hogy hydrolysisálás révén olyan nagyobb jellemző atomcsoportokra bonthatók, melyeknek legjelentékenyebb része a mono-aminomonocarbonsavak sorozába tartozik. Ezeken kívül a fehérje N-tartalmú hydrolysises termékei között a monoaminodicarbonsavaknak és a diamino-monocarbonsavaknak és származékaiknak néhány képviselője, valamint a monoaminosavak néhány substituált származéka

* Előadatott az E. M. E. orvostudományi szakosztályának 1909. évi februárius hó 13.-án tartott szakülésén.

(serin, cystin, tyrosin, phenylalanin-tryptophan, histidin), két pyrrolidin származék (prolin és oxyprolin), végül az ammoniak is megtalálható.

Az arginin, histidin és lysin mennyiségének meghatározására KOSSEL és KUTSCHER¹ dolgoztak ki megbízható módszert, mely lényegében változatlanul ma is használatos. A monoaminosavak pontos különválasztása és mennyiségüknek megközelítő meghatározása FISCHER EMIL-nek 1901-ben közölt² „ester-módszere“ által vált lehetővé. A FISCHER-féle módszer ismertetése után ugyancsak FISCHER intézetében ABDERHALDEN EMIL vezetése alatt, nagy arányokban indult meg a legkülönbözőbb fehérjék ilyen irányú megvizsgálása. FISCHER és ABDERHALDEN, részben maguk, részben tanítványaikkal közösen, továbbá OSBORNE és munkatársai (CLAPP és HEYL) és mások egész sorát közölték a fehérjék monoaminosavaira vonatkozó quantitativ vizsgálatoknak.³ Ezen vizsgálatok a fehérjékre vonatkozó ismereteinket

¹ Zeitschr. f. physiol. Chemie XXXI. k. 165. l. 1900.

² Berichte d. Deutsch. chem. Ges. XXXV. évf. 433. l. 1901.

³ FISCHER EMIL (Ber. d. deutsch. chem. Gesellschaft XXXIX. évf. 602. l. 1906. évf. elején megjelent összefoglaló értekezésében 32 ilyen elemzésről emlékezik meg, mely intézetéből származik. Azóta a következő hasonló tárgyú közlemények jelentek meg:

ABDERHALDEN és BABKIN. Zeitschrift f. physiol. Chemie 47 k. 354 l. 1906.

OSBORNE és CLAPP. American Journ. of Physiol. 17 k. 231 l. 1906.

„ „ ref. Chemisches Zentralblatt 1907. I. 485.

ABDERHALDEN és STRAUSS. Zeitschrift f. physiol. Chem. 48 k. 49. l. 1906.

„	HUNTER.	„	„	„	„	„	505	„	„
„	MALANGREAN.	„	„	„	„	„	513	„	„
„	EBSTEIN.	„	„	„	„	„	530	„	„
„	STRAUSS.	„	„	„	„	„	535	„	„
„	BERGHAUSEN.	„	„	„	„	49 k.	15 l.	„	„
„	BAUMANN.	„	„	„	„	51 k.	397	„	1907.
„	TAKAOKI SASAKI.	„	„	„	„	„	404	„	„
„	PRIBRAM.	„	„	„	„	„	409	„	„
„	VOITINOVICI.	„	„	„	„	52	348	„	„
„	„	„	„	„	„	„	368	„	„
HOEMANN K. B. és PREGL FR.	„	„	„	„	„	„	448	„	„
ABDERHALDEN és HÄMÄLÄINEN.	„	„	„	„	„	„	515	„	„
FISCHER E.	„	„	„	„	„	53 k.	126	„	„
KLEINSCHMITT.	„	„	„	„	„	54 k.	110	„	„

kétségtelenül jelentékenyen kibővítették. Kiderült, hogy míg néhány monoaminosav mindenféle fehérjében felfedezhető, csupán mennyisége mutat többé-kevésbé jelentékeny ingadozást, addig mások bizonyos fehérjeféleségekből teljességgel hiányoznak, vagy csak nyomokban mutathatók ki. Ezen az alapon, különösen, ha adatainkat az arginin-, lysin-, histidin-csoport mennyiségének megismerésével is kibővítjük, kísérletet lehet tenni a fehérje-féle anyagoknak egységes chemiai szempontból való osztályozására.

Sajnos, hogy az „ester-módszer“ — bármennyire felülmúlja a régebbi eljárásokat — még mindig nem nyújt eléggé

- OSBORNE és CLAPP. Journ. of Biol. Chem. 3 k. 219 l. 1907. (ref. Chem. Zbltt. 1907. II. 615.)
- HUGOUNEQ C. R. Acad. Sc. Paris. 143. k. 693 l. (ref. Chem. Zbltt 1907. I. 122.)
- OSBORNE és CLAPP. Americ. Journ. of Physiol. 18 k. 295 l. 1907.
- „ „ „ „ „ „ 19 „ 53 „ „ (ref. Chem. Zbltt. 1907. II. 1799.)
- OSBORNE és CLAPP. Americ. Journ. of Physiol. 19 k. 117 l. 1907. (ref. Chem. Zbltt. 1907. II. 1799.)
- OSBORNE és CLAPP. Americ. Journ. of Physiol. 19 k. 468 l. 1907. (ref. Chem. Zbltt. 1908. I. 50.)
- OSBORNE és CLAPP. Americ. Journ. of Physiol. 19 k. 475 l. 1907. (ref. Chem. Zbltt. 1908. I. 50.)
- OSBORNE és CLAPP. Americ. Journ. of Physiol. 20 k. 470 l. 1907. (ref. Chem. Zbltt 1908. I. 1188.)
- OSBORNE és CLAPP. Americ. Journ. of Physiol. 20 k. 477 l. 1907. (ref. Chem. Zbltt 1908. I. 1189.)
- OSBORNE és CLAPP. Americ. Journ. of Physiol. 20 k. 494 l. 1907. (ref. Chem. Zbltt 1908. I. 1189.)
- ABDERHALDEN. Zeitschrift f. physiol. Chemie 55 k. 236 l. 1908.
- PREGL. „ „ „ „ 56 „ 1 „ „
- OSBORNE és HEYL. Americ. Journ. of Physiol. 22 k. 362. 1908 (ref. Chem. Zbltt. 1908. II. 1188.)
- OSBORNE és HEYL. Americ. Journ. of Physiol. 22 k. 423. 1908 (ref. Chem. Zbltt. 1908. II. 1368.)
- OSBORNE és HEYL. Americ. Journ. of Physiol. 22 k. 433. 1908 (ref. Chem. Zbltt. 1908. II. 1368.)
- OSBORNE és HEYL. Journ. of Biol. Chem. 5 k. 187. 1908. (ref. Chem. Zbltt. 1908. II. 1937.)
- OSBORNE és HEYL. Journ. of Biol. Chem. 5 k. 197 1908. (ref. Chem. Zbltt. 1908. II. 1937.)

megbízható mennyiségi eredményeket ahhoz, hogy a fehérje bomlástermékei között bizonyos stöchiometriás viszonyt lehessen megállapítani. A szabad aminosavesterek ugyanis igen könnyen bomlanak, úgy, hogy kisebb-nagyobb részük már a lepárolás előtt elszappanosodik. A felszabaduló aminosavak a lepárolás befejezése után a maradékban, a többi le nem párolható anyaggal együtt, tapadós barna tömeget alkotnak, melyből csak az elesterítés és a lepárolás ismétlése útján válaszíthatók külön. Az egész eljárásnak ez a megismétlése azonban körülményessége miatt nem nyerhet általános alkalmazást.

Bár az estereknek az elszappanosodás útján veszendőbe menő része esetről-esetre különböző lehet, pontosan azonos kísérleti feltételek betartásával összehasonlítható eredményekhez lehet jutni.

A phaseolint pl. egyfelől *ABDERHALDEN* és *BABKIN*,¹ másfelől *OSBORNE* és *CLAPP*² egymástól teljesen függetlenül elemezték és igen jól egybevágó eredményekhez jutottak. Ezzel a biztató eredménnyel szemben azonban éppen *ABDERHALDEN* és *FUNK* tollából olyan megjegyzést olvashatunk, hogy a hydrolysis termékei között csak a tyrosin, a glutaminsav, az arginin, a lysin és a histidin határozható meg némi pontossággal.³ Ebből az ellentmondásból eléggé kitűnik, hogy az „ester-módszer“ bizonyos kísérleti feltételek pontos betartásával használható ugyan a különböző fehérjék összetételének összehasonlító megvizsgálására, az eredmények felhasználása körül azonban a legnagyobb óvatossággal kell eljárunk.⁴

Ha sikerül is a hydrolysis termékeinek pontos mennyi-leges meghatározását végrehajtani, még akkor is szemben állnánk azzal a kérdéssel, hogy a szóba jövő aminosavak milyen módon, milyen sorrendben fűződnek össze. Hiszen nem lehetetlen, hogy az azonos, vagy a közel azonos összetételű fehérjék jellegét

¹ Zeitschr. f. physiol. Chemie 47 k. 354 l. 1906.

² Americ. Journ. of Physiol. 18 k. 295 l. 1907.

³ „Einigermassen genau lassen sich nur Tyrosin, die Glutaminsäure, Arginin, Lysin und Histidin bestimmen“. Zeitschr. f. physiol. Chemie 53 k. 20 l. 1907).

⁴ Nem kicsinylendő hátránya a módszernek az, hogy nagy és költséges berendezést igényel.

az aminosavak összefüződésének milyenségéből eredő isomeria szabja meg.

Közelebb juthatunk valamely fehérje összetételének ismeretéhez, ha molekulájából az aminosavaknál is nagyobb atomcsoportokat sikerül lehasítanunk és jellegeznünk. FISCHER és BERGELL¹ a selyemfibroinnak rendszeres fokozatos hydrolysisével a vizsgált anyag és a végtermékek között még közbeneső, közelebbről nem jellemzett terméket mutattak ki. Ezek a nagyobb atomcsoportok a FISCHER-féle polypeptidek sorába tarthatnak.

FISCHER-nek és ARDERHALDEN-nek² csakugyan sikerült néhány fehérje óvatos bontásával több ilyen polypeptidhez jutni. Ezen eredmény nagy elvi fontosságát fölöslegcs külön hangsúlyozni. Gyakorlatilag azonban még ez sem vezetett a fehérjék belső szerkezetének teljes megismeréséhez és ennél fogva a chemiai osztályozás lehetőségét sem adta meg és pedig főleg azért, mert az így feltalált polypeptidek száma eddigelé igen csekély.

A fibrin a fehérjék azon hosszú sorozatában, melyet FISCHER és ABDERHALDEN tanítványaikkal monoaminosavaik szempontjából megvizsgált, meglehetősen háttérbe szorult; összetételét illetőleg ugyanis mindössze két vizsgálattal rendelkezünk.

¹ Ber. d. deutsch. chem. Gesellschaft 36 k. 2192 l. 1903.

² FISCHER és ABDERHALDEN. Bildung eines Dipeptids bei der Hydrolyse des Seidenfibroins. Berichte d. deutsch. chem. Gesellschaft 39 k. 752 l. 1906. Bildung von Dipeptiden bei der Hydrolyse der Proteine. U. o. 39 k. 2315 l. 1906. Bildung von Polypeptiden bei der Hydrolyse der Proteine. U. o. 40 k. 3544 l. 1907.

P. A. LEVENE és W. A. BEATTY. Über das Vorkommen von Prolylglycin anhydrid bei der tryptischen Verdauung der Gelatine. Berichte d. deutsch. chem. Ges. 39 k. 2060, 1906.

ABDERHALDEN és FUNK. Beitrag zur Kenntniss der beim Kochen von Casein mit 25%-iger Schwefelsäure und mit starker Salzsäure entstehenden Spaltungsproducte. Zeitschr. f. physiol. Chem. 53 k. 19 l. 1907.

OSBORNE és CLAPP. A new decomposition product of Gliadin. Americ. Journ. of Physiol. 18 k. 123 l. 1907.

P. A. LEVENE és G. B. WALLACE. Über die Spaltung der Gelatine. — Zeitschr. f. physiol. Chemie. 47 k. 143 l. 1906.

V. ö. ABDERHALDEN. Handbuch der physiologischen Chemie 1909. évi kiadás 258—259 l.

BRUNNER¹ valamint ABDERHALDEN és VOITINOVICI² elemzésének eredményeit a következő összeállítás tünteti fel. A számok az illető aminosavnak %-ban kifejezett mennyiségeit jelzik a teljeseen száraz és hamumentes anyagra számítva.

	BRUNNER	ABDERHALDEN
		ÉS VOITINOVICI
Glykokoll	2·2	3·0
Alanin	3·1	3·6
Valin (α -aminovaleriana-sav) ..	jelen van	1·0
Leucin	13·0	15·0
α -Prolin	2·4	3·6
Phenylalanin	1·2	2·5
Glutaminsav	6·6	10·4
Asparaginsav	1·7	2·0
Serin	jelen van	0·8
Tyrosin	3·2	3·5
Tryptophan	kimutatható	—

A különbség a két elemzés eredménye között nem nagy és annál is inkább érthető, mert két elemző különböző eredetű, bár esetleg ugyanattól az állatfajtól származó anyagot vizsgált. A megvizsgálásra került anyag a kémiai egységességnek semmiféle jelét sem viselte magán. A fibrint ugyanis kristályos alakban előállítani nem sikerül. Sőt, minthogy mélyreható megváltozás nélkül nem oldható fel, kénytelenek vagyunk az ismételt feloldás és kiesapás útján való tisztításáról is lemondani és csupán a vérből kivált rostok mosására szorítkozni.

A fibrin, illetőleg a fibrinogen eredetéről semmi bizonyosat sem tudunk. Vannak azonban adatok, melyek némi valószínűséget kölesönöznek azon föltevésnek, hogy a fibrinogen felépítésében az emésztőcsatornából felszivódó emésztési termékeknek is szerepük van.³ Ennek a viszonynak kémiai úton való bebizo-

¹ ARN. BRUNNER. Hydrolyse des Blutfibrins Inaug. Diss. Berlin 1905. BRUNNER eredeti értekezését nem kaptam meg, a referatumokból pedig nem tűnik ki, hogy milyen eredetű volt a fibrin, a mit megvizsgált.

² Zeitschrift f. physiol. Chemie 52 k. 1907. 368 l. ABDERHALDEN és VOITINOVICI lóvérből előállított fibrinnel dolgozott.

³ A. MATHEWS. The Origine of fibrinogen. The American Journ. of Physiology III k. 53 l. 1900.

nyítására szolgálna az, ha a fibrinogen, illetve az ebből képződött fibrin és a tápláló anyag összetétele között összefüggést lehetne kimutatni. Ilyen természetű összefüggésre gondolhatnánk, ha pl. a jelentékenyen eltérő táplálékon élő állatfajok véréből előállított fibrinkészítmények összetételében megfelelő különbségeket látnánk. Az összefüggést bebizonyítottnak lehetne tekinteni, ha valamely kísérleti állat táplálkozásának alkalmas megváltoztatása után azt látnók, hogy az állat véréből nyerhető fibrin összetétele a táplálék ismert összetételű fehérjéje után igazodik.

Ilyen tekintetek indítottak arra, hogy a kérdés megmunkálásának első szakasza gyanánt a szarvasmarha véréből előállítható fibrint vegyem vizsgálat alá.

A fibrin előállítása és tisztítása.

A vágóhídon frissen kibocsátott szarvasmarhavér defibrinálása útján nyert véres fibrint vezeték vízzel és konyhasós vízzel változtatva addig mostam, míg halvány rózsaszínű lett; ezután húsvágó gépen felaprítottam és a teljes vértelenségig kimostam. Miután a vezetéki vizet lepárolt vízzel mosás útján eltávolítottam, a már teljesen vértelen fibrint alkohollal előbb hidegen, később forrón ismételten kivontam, majd külön erre a célra módosított SOXHLET-készülékben egy napig aetherrel kezeltem. Ily módon gyengén sárgás színű, törékeny czafatokat nyertem, melyeket könnyű volt darálással finom porrá zúzni. Ezt a port forró alkohollal és aetherrel újból kivontam és megszáritottam.

A most már kész fibrin egyenletes halvány sárga por, melynek egyes megvizsgált részletei 2·73—2·69% vizet és 0·53—0·69% hamu alkatrészt tartalmaztak. A hamuban natriumot, calciumot, magnesiumot és ferrumot lehetett találni és pedig részben sósavas, túlnyomó részben azonban phosphorsavas és kénsavas sók alakjában.

A készítmény 14·14% nitrogeniumot tartalmazott, mi a víz és hamumentes anyagra átszámítva 14·45%-nak felel meg.

A tyrosin meghatározása.

100 g. marhafibrint, mely az előbbieket szerint 96·58 g. víz- és hamumentes anyagnak felelt meg, 300 cm.³ füstölő sósavval leöntve, 6 órán át főztem. A sötétbarna folyadékot ABDERHALDEN és TEROUCHI¹ előírását követve, alacsony hőmérséken légritkított térben ismételten bepároltam, mi által belőle a fölös sósav jelentékeny része eltávozott. A maradékot 250 cm.³ vízben feloldva tömény Na OH oldattal csaknem teljesen közömbösítettem. A folyadékból egy napi állás közben erősen szennyezett tyrosin vált ki, melyhez az anyalúg bepárolása után újabb nyers tyrosin fractiók csatlakoztak. A nyers tyrosint forró vízből átkristályosítottam és megszáritás után jégezzel mostam. Minthogy a tyrosin jégezzetben csak csekély fokban bár, de mégis oldódik, veszteségek eikerülése céljából ajánlatos a mosáshoz tyrosinnal előzetesen telített jégezzetet használni. Az így előkészített jégezzet a tyrosinhoz keveredett idegen aminosavakat, nevezetesen a leucint jól oldja, ellenben a tyrosint magát oldatlanul hagyja.

Miután meggyőződtem arról, hogy az anyalúgok MILLON-reagenssel nem adnak számbavehető színreactiót, a jégezzel megtisztított tyrosinnak súlyát megszáritása után meghatároztam. Találtam összesen 3·2949 tyrosint, mi a fibrinkészítmény hamu- és víztartalmának leszámításával 3·411%-nak felel meg.

A tyrosin-készítményt forró vízből még egyszer átkristályosítva elemeztem²: 0·1038 g. anyag az elégetéskor adott 0·2256 g. CO₂-t és 0·0598 g. H₂O-t.

C₉H₁₁NO₃ tartalmaz

számítás szerint:

59·67% C-t

6·08% H-t

elemzés szerint:

59·27% C-t

6·40% H-t.

Minthogy a különböző eredetű fibrinkészítmények össze-

¹ Zeitschrift f. phys. Chemie 484. 528 l. 1906.

² Ezt, valamint az itt közölt valamennyi elemzést FABINYI tanár úrnak szíves engedelmével az egyetem vegytani intézetében végeztem. FABINYI tanár úrnak, ki intézetének eszközeit és berendezését ebből a célból szíves volt rendelkezésemre bocsátani, e helyen is hálás köszönetemet fejezem ki.

tételének tervbe vett összehasonlítása kívánatosná tette, hogy a meghatározást minél kisebb mennyiségű anyaggal lehessen megejteni, a tyrosin quantitativ leválasztását ugyanezen eljárás szerint egyszer 10·1396, másszor 10·3800 g. fibrinnel megismételtem. Az első esetben 0·3410 g., a másodikban 0·3264 g. tyrosint nyertem, ennek mennyiségét tehát a víz- és hamumentes anyagban 3·35, ill. 3·14%-nak találtam.

A glutaminsav mennyiségének meghatározása.

Mint hogy a tyrosinnak a leírt módon véghezvitt leválasztása után az aminosavak főtömegét tartalmazó anyalúgban bőven van NaCl, mi a glutaminsavnak chlorhydratja alakjában való leválasztását zavarná, a glutaminsav mennyiségének megállapítása ezéjából új fibrinadagot hydrolysáltam. Ugyanezt az anyagot használtam fel a többi monoaminosavak és az ammoniak mennyiségének meghatározására is.

200 g. fibrint, mely 2·69% vizet és 0·53% hamualkatrészt tartalmazott, tehát 193·56 g. víz- és hamumentes anyagnak felelt meg, füstölgő sósavval 6 órán át főztem.

Hydrolysis közben gázbuborékok szálltak el, melyek Ba(OH)₂ oldaton átvezetve, ebben bőséges csapadékot okoztak, az eltávozó gáz tehát szénsavnak bizonyult. Megjegyzendő, hogy a CO₂ fejlődés a sav hozzáadása után nem indul meg azonnal. Ha elég híg sávval öntjük le a fibrint és a keveréket szobahőmérséken tartjuk, a gázfejlődés csak egy nap múlva, kb. a keverék teljes elfolyósodásával egyidejűleg válik észrevehetővé.¹

A sötétbarna színű hydrolysált keveréket alacsony hőmérséken, légritkított térben kb. felére besűritettem, erősen lehűtöttem és néhány glutaminsav-chlorhydrat kristálykával beoltottam. A sűrű folyadékból egy napi állás közben bőséges fekete

¹ A fibrin-sósavkeverék főzése közben a visszafolyó hűtő hideg részein kevés kénsárga, vízben, eczetsavban, sósavban teljesen oldhatatlan csapadék rakódott le. Ez az anyag lúgban barnára színeződve feloldódott és aethyl-sulfidra emlékeztető szagot nyert. A lúgos oldat eczetsavas ólommal fekete csapadékot adott. Sajnos, hogy ennek az anyagnak mennyisége oly csekély volt, hogy részletesebb megvizsgálásáról le kellett mondanom.

esapadék vált ki. Az anyalúg besűrítése útján sikerült még egyszer ilyen esapadék kiválását elérni. Mindkét erősen szennyezett glutaminsav-chlorhydrat fractiót forró vízben feloldottam és a hozzákeveredett vízben oldhatatlan fekete porszerű anyagtól megszabadítottam. Az oldatot besűrítettem, száraz sósavgázzal telítettem, lehűtöttem és glutaminsav-chlorhydrat néhány kristálykájával beoltottam. Egy nap alatt bőven vált ki a most már meglehetősen tiszta glutaminsav-chlorhydrat, melyet a kis mennyiségű anyalúgtól szűrés és leszívás útján megszabadítván, Ca O fölött megszáritottam és megmértem. Kaptam összesen 23·60 g. nyers glutaminsav-chlorhydratot, mi 18·85 g. glutaminsavnak felel meg. 100 g. víz- és hammentes anyagban tehát 9·74 g. glutaminsavat sikerült megtalálni.

A nyers glutaminsavchlorhydrat 5 g.-ját vízben oldva és állati szénnel derítve aequivalens mennyiségű Na OH oldatával kezeltem. Az oldat bepárolása közben szép tiszta, átlátszó glutaminsav kristályok váltak ki három fractióban, melyek közül az elsőt elemeztem. 0·0938 g. anyag adott 0·1394 g. CO₂-t és 0·0538 g. H₂O-t.

C₅H₉NO₄ tartalmaz

számítás szerint:	elemzés szerint:
40·82% C-t	40·53% C-t
6·12% H-t	6·37% H-t.

A hydrolysis rendén felszabaduló NH₃, továbbá a glykokoll, alanin, valin, leucin, phenylalanin és asparaginsav meghatározása.

A glutaminsavchlorhydrat kiválása és különválasztása után kapott anyalúgot a megfelelő mosófolyadékokkal egyesítve, csekély nyomás alatt és alacsony hőmérséken sűrűre bepároltam; a maradékot vízmentes alkoholban felvettem és a víznek lehetőleg teljes eltávolítása céljából ismét bepároltam. Miután ezt még egyszer ismételttem, a sötétbarna maradékot lehetőleg kevés vízmentes alkoholban felkevertem és száraz sósavgáz bevezetése útján elesteresítettem. Az elesteresítést a keveréknek újabb besűrítése és alkoholban való feloldása után ismételttem. Az esterchlorhydratok keverékét most erősen lehűtve glykokoll-

esterechlorhydrat kristálykával beoltottam és hidegkeverékben állani hagytam. Egy napi állás közben fekete csapadék vált ki, melyet asbest-szűrőre gyűjtöttem és forróvízzel kivontam. A forróvízes oldatot teljesen bepároltam és szénfekete maradékát előbb vízmentes alkohollal, azután hideg vízzel kivonva, ilyen módon

- a) vízben és alkoholban oldható,
- b) vízben oldható, alkoholban nem oldható és
- c) hideg vízben és alkoholban oldhatatlan

részre osztottam.

a) Az alkoholos oldatból 0.4 g.-nyi fehér kristályos anyag vált ki, mely a minőleges elemzés rendén NH_4Cl -nak bizonyult. A leszűrt folyadékából bepárolás és újabb elesteresítés után erős lehűtésre és glykollisterechlorhydrattal való oltásra sem vált ki semmiféle csapadék, miért is ezt az anyalúgot a tovább feldolgozandó esterkeverékhez adtam.

b) A vízben oldott részletet szárazra bepároltam, a maradék 7.24 g.-nyi fehér kristályos anyag, mely Pt-lemezen, vagy csőben hevítve nem szenesedett el, LASSEIGNE-próbát nem adott, lúggal főzve alkaliás gőzöket fejlesztett, és oktaederek alakjában kristályosodó PtCl_6 vegyületet adott, melynek Pt-tartalmát 43.23, illetőleg 43.54%-nak találtam. Minthogy az $(\text{NH}_4)_2\text{PtCl}_6$ -nek Pt-tartalma 43.90%, a kapott kristályos anyag kétségtelenül NH_4Cl .

Az „a” és „b” részletből összesen 7.64 g. NH_4Cl vált ki, mi 100 g. víz- és hamumentes fibrinre vonatkoztatva 1.25 g. NH_3 -nak felel meg.

c) A hideg vízben és alkoholban oldhatatlan fekete por igen kifejezett LASSEIGNE-próbát adott. Részletes megvizsgálását csekély mennyisége miatt nem lehetett végrehajtani.

A hydrolysis többi termékeit tartalmazó folyadékot alacsony hőmérséken, k. b. 11 mm. nyomás alatt a sósavnak lehetőleg teljes eltávolítása céljából, vízmentes alkohollal ismételtelen bepároltam. A maradékot vízmentes alkoholban újólág feloldván, mérő lombikban vízmentes alkohollal pontosan 1000 cm^3 -re hígítottam. Az oldat 40 cm^3 -ét, az egész anyagnak tehát $\frac{1}{100}$ részét, a benne foglalt chloridáknak meghatározására fordítottam.¹

¹ Mindazok a mennyiségi adatok tehát, melyeket a megmaradt 960 cm^3 -nyi folyadék feldolgozása útján nyertem, 185.8 g. víz- és hamumentes fibrinre vonatkoznak.

A MOHR szerint végzett chlorid meghatározás útján kapott értéket a maga egészében sósavra számítottam át és a folyadék megmaradt $\frac{96}{100}$ részét jég között lehűtvén, annyi frissen készült Na-aethylattal kezeltem, a mennyi a talált sósav közömbösítésére éppen elég volt. A keverékből, mely most már az aminosavak szabad estereit tartalmazta, bőven csapódott ki a képződött NaCl. A folyadékot erről a csapadékról szivattyú segítségével leszűrtem és pedig oly módon, hogy a szivattyúzás közben eltávozó gázokat tömény sósavon vezettem át. Tényleg sikerült a sósavban 0.08 g. NH_4Cl -nak megfelelő ammoniákat felfogni.

Miután a csapadékot jól kisajtoltam és vízmentes alkohollal kimostam, az egyesített folyadékokat légritkított térben lényegileg a FISCHER EMIL előírása szerint fractionálva lepároltam. Az előírástól csupán annyiban tértem el, hogy az alacsonyabban forró részletek lepárolásakor a párlatot közvetlenül tömény sósavban fogtam fel, hogy a még jelenlevő NH_3 elillanását megakadályozzam. A lepárolással a következő fractiókat állítottam elő:

- I. 40° C-ig (vízfürdő hőmérséke) 11 mm. Hg nyomás alatt.
Hűtés vízszugárral.
- II. 60° C-ig (vízfürdő hőmérséke) 11 mm. Hg nyomás alatt.
Hűtés hidegkeverékkel.
- III. 110° C-ig (olajfürdő hőmérséke) 11 mm. Hg nyomás alatt.
Hűtés hidegkeverékkel.
- IV. 110° C-ig (olajfürdő hőmérséke) 0.2 mm.¹ Hg nyomás alatt.
Hűtés szilárd szénsavval és aetherrel.
- V. 180° C-ig (olajfürdő hőmérséke) 0.2 mm. Hg nyomás alatt.
Hűtés szilárd szénsavval és aetherrel.

I. fractió (40° C, 11 mm. Hg).

A párlatot tömény sósavban fogtam fel. Ez a részlet tartalmazta az esterkeverék mellett jelenvolt alkohol főtömegét. A sósavas párlatot alacsony hőmérséken kis nyomás alatt bepároltam és a maradékot három fractióban gyűjtöttem össze,

¹ A GAEBDE-féle higanyos szivattyú alkalmazásával.

Ezek közül csak az utolsó tartalmazott csekély mennyiségű szerves anyagot, a két első teljesen az ammoniumchlorid tulajdonságait mutatta. Pt_2Cl_6 vegyületeik 42·98, illetve 43·40% Pt-t tartalmaztak. Ezen fractióban hozzászámítva a szűrés alkalmával felfogott 0·08 g.-nyi NH_4Cl -t is, összesen 3·04 ammoniumchloridot találtam, mi 100 g. víz- és hamumentes fibrinre vonatkoztatva 0·520 g. NH_3 -nak felel meg.

II. fractió (60° C; 11 mm. Hg).

A párlat felét sósavval megsavanyítva, vízfürdön teljesen bepároltam. Az így nyert víztiszta szörpöt vízmentes alkoholban feloldottam és száraz sósavgázzal telítettem. Erős lehűtésre és glykokollesterchlorhydrattal oltásra előbb 0·62 g.-nyi, majd az anyalúg óvatos bepárolása és az előbbi kezelés ismétlése után 0·35 g.-nyi fehér csapadék vált ki tűalakú kristályokban. További kristályos kiválást a különben is alig néhány cm^3 -nyi anyalúgból nem sikerült elérni. Az anyalúg teljes bepárolás után olyan csekély maradékot hagyott hátra, hogy ennek feldolgozása nem látszott érdemesnek. Az összegyűjtött kristályok egyszeri átkristályosítás után elemzésre alkalmasok voltak.

Olvadáspont: 144° C (jav.) 0·0972 g. anyag adott 0·1210 g. CO_2 -t és 0·0599 H_2O -t.

A glykokollaethylesterchlorhydrat ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{NO}_2\text{Cl}$) tartalmaz

számítás szerint:	elemzés szerint:
34·28% C-t	33·95% C-t
7·14% H-t	6·84% H-t.

A kapott 0·97 g.-nyi glykokollesterchlorhydrat 100 g. víz- és hamumentes anyagra átszámítva 0·564 gramm glykokollnak felel meg.

A párlat másik felét háromszoros térfogatnyi vízzel visszafolyó hűtő alkalmazása mellett főztem. Minthogy a folyadék lúgos kémhatása hosszas főzés után sem tűnt el, a folyadékot k. b. 10 órai forralás után lepárolásnak vettem alá oly módon, hogy a párlatot tömény sósavban fogtam fel.

A sósavtól savanyú párlatot vízfürdön teljesen beszárítván, 0·05 g.-nyi kristályos fehér maradékot kaptam, mely lúggal főzve, ammoniakos gőzöket fejlesztett, LASSEIGNE-próbát nem

adott, PtCl_6 -dal kezelve pedig az (NH_4) , PtCl_6 jellemző kristályai váltak le oldatából. Ez a 0.05 g.-nyi ammoniumchlorid 160 g. víz- és hamumentes fibrinre számítva, 0.02 g. NH_3 -nak felel meg.

Az ammoniak lepárolása után a lombikban közömbös kémhatású folyadék maradt, melyet teljesen bepároltam és vízmentes alkohollal kivontam. Ily módon 1.54 g.-nyi kristályos anyagot nyertem, melyet vízben feloldva és szakaszosan bepárolva, a következő fractiókra osztottam:

- a) 0.240 g. Olvadáspont 289—290° gázfejlődéssel (jtl.)
- b) 0.634 g. „ 241—243° „ „
- c) 0.431 g. „ 232—235° „ „
- d) 0.235 g. az átkristályosítás rendén elveszett.

Ez a kristályos anyag aminosavakból és pedig alaninból, leucinból és valinból (aminovalerianasav) állott, melyeket a quantitativ meghatározás céljából egymástól szakaszos átkristályosítás útján külön kellett volna választani. Azon nehézségek következtében azonban, melyek az egyes aminosavaknak keverékeiből kristályosítás útján történő különválasztása elé gördülnek, a keverékben foglalt egyes aminosavak mennyiségeinek megismerésére igyekeztem más eljárást találni. Különösen szükségesnek látszott ez a jelen esetben, midőn félnem kellett, hogy az átkristályosítás közben el nem kerülhető anyagvesztés a különben is kis mennyiségű anyag jelentékeny részét veszélyeztetné. Nem is törekedtem tehát a leucin, valin és alanin mennyileges különválasztására, hanem csak arra, hogy olyan fractiókhoz jussak, melyek részben csak egy aminosavat tartalmaznak, vagy a melyekről feltehető, hogy csupán két aminosav keverékéből állanak. Ezen keverékeknek a szokott módon, t. i. nedves rézoxiddal való főzés útján, réz-sóját állítottam elő, különösen ügyelve arra, hogy a réz-só képzésében a keverék a maga egészében részt vegyen és a nehezebben oldható réz-sóból semmit se veszítsek el.

Ebből a célból a megvizsgálandó anyagnak 0.1 g.-ját a várható réz-sók oldhatóságához mérten több, vagy kevesebb, rendszeren azonban igen bő mennyiségű, kétszer lepárolt vízben

oldottam; az oldatot nedves Cu O esekély fölöslegével 1—2 per-
czig főztem és kettős réteg jó minőségű szűrőpapiroson forrón
megszűrtem. A kék színű kristálytisza oldatot vízfürdön teljesen
bepároltam. A maradékot gondosan összekaparva és egyenletesen
eldörzsölve, 125° C-ra hevített szárítószekrényben megszáritottam
és Cu tartalmát elégetés útján meghatároztam.

Ha a réz-sókeverék 100 gr.-jában jelen levő két aminosav
réz-sómennyiségeit „a”-val és „b”-vel jelöljük, ezeket a meny-
nyiségeket a réz-sókeverék Cu-tartalma alapján

$$a = 100 \cdot \frac{\% \text{ Cu}-\beta}{\alpha-\beta}, \text{ és } b = 100 - 100 \cdot \frac{\% \text{ Cu}-\beta}{\alpha-\beta}$$

képletekkel fejezhetjük ki. Tekintetbe véve, hogy két molekula
aminosav 1 atom Cu-mal 1 molekula réz-sót ad,

$$A = \frac{100}{1 + \frac{k_a}{k_b} \left(\frac{\alpha-\beta}{\% \text{ Cu}-\beta} - 1 \right)} \text{ és } B = 100 - A$$

képletbe juthatunk, a melynek segítségével kiszámíthatjuk,
hogy abban a két aminosavból álló keverékben, melyből „% Cu”
réztartalmú réz-sókeveréket kapunk, A és B aminosav hány
%-nyi mennyiségben van képviselve.¹

¹ Ha az „a” mennyiségben jelenlévő réz-só Cu tartalma α és a „b” meny-
nyiségben jelen levő aminosav Cu tartalma β , továbbá $a + b = 100$, akkor

$$\begin{aligned} \text{a keverék Cu tartalma: } \% \text{ Cu} &= \frac{a\alpha + b\beta}{100}. \text{ Ebből} \\ a &= \frac{100 (\% \text{ Cu} - \beta)}{\alpha - \beta} \\ b &= 100 - a. \end{aligned}$$

Az „a” réz-sónak megfelelő „A” aminosav mennyiségét a $\times k_a$ képlet
fejezi ki, melyben

$$k_a = \frac{2 M_A}{M_a}.$$

M_A az „A” aminosav, M_a az „a” réz-sónak molekulatömegét jelenti;
 $b \times k_b$ = ugyanez a „B” aminosavra, illetve „b” réz-sóra vonatkozólag.

Abban a keverékben tehát, melyből a $+ b$ réz-sót előállítottuk, az „A”
aminosav $a \times k_a$ a „B” aminosav $b \times k_b$ mennyiségben volt jelen. Ebből
A és B %-os mennyiségét a következőleg számíthatjuk ki:

$$(a k_a + b k_b) : a k_a = 100 : A$$

Ez a közvetett eljárás gondos kivittel elég pontos eredményeket ad. Különös gond fordítandó azonban arra, hogy a reagensül használt Cu O teljesen tiszta legyen, hogy az oldásra használt lepárolt víz nagyobb mennyisége se hagyjon teljes bepároláskor maradékot és végül, hogy a nehezebben oldható réz-sókat (ilyen különösen a leucinréz), a Cu O fölöslegéből teljesen kioldjuk.

Ezt az eljárást követve, a fennebb jelzett kristályos fraktiók egy-egy 0.1 g.-nyi részletéből réz-sókat állítottam elő és ezeknek Cu-tartalmát meghatároztam a következő eredménnyel:

- a) 21.06% Cu,
- b) 23.57% Cu,
- c) 26.44% Cu.

Míthogy a leucinréz 19.63, a valinréz 21.49, az alaninréz 26.52% Cu-t tartalmaz vízmentes állapotban, az a) fraktiót

$$A = \frac{100 a k_a}{a k_a + b k_b} = \frac{100 a k_a}{a k_a + (100-a) k_b} = \frac{100 a k_a}{k_a + k_b \left(\frac{100}{\alpha} - 1 \right)} =$$

$$= \frac{100}{1 + \frac{k_b}{k_a} \left(\frac{100}{\alpha} - 1 \right)} = \frac{100}{1 + \frac{k_b}{k_a} \left(\frac{\alpha - \beta}{\% \text{ Cu} - \beta} - 1 \right)}$$

Míthogy $A = \frac{100}{1 + \frac{k_b}{k_a} \left(\frac{\alpha - \beta}{\% \text{ Cu} - \beta} - 1 \right)}$ képletben, ha valin (A) és leu-

cin (B) keverékére vonatkoztatjuk

$\frac{k_b}{k_a} = \frac{k_1}{k_v} = \frac{295.9 \times 262.4}{234.2 \times 323.9}$, ennek logaritmususa pedig 0.01010, továbbá $\alpha - \beta = 1.86$, ennek logaritmususa pedig: 0.26951, végül $\beta = 19.63$, a képlet ebben az esetben így alakul:

$$2 - \log (\text{num} \mid \log (\text{num} [0.26951 - \log (\% \text{ Cu} - 19.63)] - 1) + 0.01010 \mid + 1) = \log \% \text{ valin}$$

Alaninra (a) és valinra (b) vonatkoztatva pedig

$\frac{k_b}{k_a} = \frac{224.2 \times 239.8}{295.9 \times 178.2}$, ennek logaritmususa 0.02739, $\alpha - \beta = 5.03$, ennek logaritmususa: 0.70157, $\beta = 21.49$.

Ennélfogva:

$$2 - \log (\text{num} \mid \log (\text{num} [0.70157 - \log (\% \text{ Cu} - 21.49)] - 1) + 0.02739 \mid + 1) = \log \% \text{ alanin.}$$

leucin és valin, a *b)* és *c)* fractiót pedig valin és alanin keverékének foghatjuk fel annyival is inkább, mert a *b)* fractió réz-sójának Cu-tartalma meglehetősen megközelíti a valinréz Cu-tartalmát, míg a *c)* fractió réz-sója csaknem ugyanannyi Cu-t tartalmazott, mint az alaninréz.

A fennebbi képletek segélyével megállapíthatjuk, hogy

az <i>a)</i> fractió	76·45%,	vagyis	0·18 g. valint és
	23·55%,	„	0·06 g. leucint,
a <i>b)</i> fractió	60·16%,	vagyis	0·38 g. valint és
	39·84%,	„	0·25 g. alanint,
a <i>c)</i> fractió	1·67%,	vagyis	0·03 g. valint és
	98·33%,	„	0·40 g. alanint tartalmazott.

Ezen ester-fractió második felében tehát az átkristályosítás alkalmával bekövetkezett veszteségtől eltekintve

0·06 g. leucint,

0·59 g. valint és

0·65 g. alanint találtam, mi 100 g. víz- és

hamumentes fibrinre átszámítva

0·06 g. leucinnek,

0·63 g. valinnak és

0·70 g. alaninnak felel meg.

III. fractió (110° C, 11 mm. Hg).

A párlatot kb. ötszörös térfogatnyi vízzel visszafolyó hűtő alkalmazásával 10 órán át főztem, mi közben a folyadék lúgos kémhatása tetemesen gyengült, de nem tűnt el teljesen. A főzés útján elszappanosított keveréket teljesen bepároltam és vízmentes alkohollal kivontam. Ily módon négy fractióban 12·72 g. kristályos anyagot nyertem.

Az egyes fractióknak a fennebb leírt módon réz-sóit állítottam elő és ezeknek Cu-tartalmát meghatároztam.

<i>a)</i> 1·114 g. olv. pont 270° C. (gázfejlődés, jvlt.) Réz-sójának Cu-tartalma	20·60%.
<i>b)</i> 6·438 g. olv. pont 260° C.	„ „ „ „ 21·58%.
<i>c)</i> 2·419 g. olv. pont 260° C.	„ „ „ „ 22·15%.
<i>d)</i> 2·753 g. olv. pont 231° C.	„ „ „ „ 26·57%.

Az *a)* fractió réz-sójának Cu-tartalma a leucinréz és

valinréz Cu-tartalma között áll. Biztosabb tájékozódás céljából azonban ezen fractió kis részletét átkristályosítás útján megint 3 fractióra osztottam és pedig úgy, hogy ezek elseje és utolsója lehetőleg kicsiny legyen, tehát a legnehezebben és legkönnyebben oldódó anyagnak legalább egy kis részlete lehetőleg szennyezés nélkül váljék ki. Az egyes fractiók réz-sói 19·70, 19·82, 20·15%, Cu-t tartalmaztak. Minthogy tehát az ismételt átkristályosítással sem sikerült oly anyagot kapni, melynek réz-sója több Cu-t tartalmazott volna, mint a valinréz, joggal feltételezhető, hogy az *a*) fractió tényleg leucinből és valinból áll. Réz-sójának Cu tartalmából (20·60%) kiszámítható, hogy

51·55%, 0·574 g. valint és
48·45%, 0·540 g. leucint tartalmazott.

A *b*) fractióból 2 g.-t lemérvén, ezt vízből átkristályosítás útján 5 részre osztottam. Ezeknek réz-sóit előállítván, bennük a Cu-mennyiségét meghatároztam.

	Az átkristályosított anyag hány %-a	A Cu-só Cu-tartalma %	A Cu-tartalomból számított %-os összetétel			Az egész <i>b</i>) fractió hány %-a			
			leucin	valin	alanin	leucin	valin	alanin	elvesztett
α) 0·11 g.	5·50	19·76	77·28	22·72	—	4·25	1·25	—	—
β) 0·53 g.	26·50	20·97	28·42	71·58	—	7·53	18·97	—	—
γ) 0·53 g.	26·50	20·92	32·15	67·85	—	8·52	17·98	—	—
δ) 0·43 g.	21·50	21·74	—	99·81	0·19	—	21·46	0·04	—
ϵ) 0·21 g.	10·50	22·59	—	81·97	18·03	—	8·61	1·89	—
Anyagvesztés 0·19 g.	9·50	—	—	—	—	—	—	—	9·50
						20·30	68·27	1·93	9·50
						100			

A *b*) fractióban tehát találtam:

20·30 % 1·31 g. leucint

68·27 % 4·40 g. valint és

1·93 % 0·12 g. alanint; az anyag

9·50 %-a, 0·61 g. az elemzés előtti átkristályosítás

rendén elveszett.

A *c)* fractió egy részletét átkristályosítás útján két részre osztván, ezek réz-sóinak Cu-tartalmát 21·86, ill. 23·50 %-nak találtam. Minthogy ezek az értékek az ismételt fractionálás után is a valinréz és alaninréz Cu-tartalmát mutató számok között maradtak, a *c)* fractiót joggal tekinthetjük valin és alanin keverékének, mely a réz-só 22·15% Cu-tartalmából számítva,

87·58 %, 2·12 g. valint és

12·42 %, 0·30 g. alanint tartalmaz.

A *d)* fractió réz-sójának Cu-tartalma (26·57 %) igen közel áll az alanin-réz Cu-tartalmához, minélfogva ez a fractió tiszta alaninnak tekintendő.

Az esterek egész III. fractiójában tehát a három aminosavnak következő mennyiségeit találtam:

	leucin	valin	alanin
<i>a)</i>	0·594 g.	0·520 g.	—
<i>b)</i>	1·601 g.	4·081 g.	0·145 g.
<i>c)</i>	—	1·147 g.	1·272 g.
<i>d)</i>	—	0·049 g.	2·704 g.
Összesen	2·195 g.	5·797 g.	4·121 g.

Ezek a mennyiségek 100 g. víz- és hamumentes anyagra vonatkoztatva 1·181 g. leucinnak

3·120 g. valinnak és

2·218 g. alaninnak felelnek meg.

IV. fractió (110° C, 0·2 mm. Hg).

A 8·7 g.-nyi párlatot kb. ötszörös térfogatnyi vízzel visszafolyó hűtő alkalmazásával mintegy 10 órán át főztem. A lúgos kémhatás eltünése után az egész folyadékot szárazra bepároltam és forró vízmentes alkohollal kivontam. Az alkoholban oldhatatlan maradékot 100°-on megszáritva megmértem. Súlyát 4·22 g.-nak találtam.

Az előbbi eljárást követve, az egész anyagot átkristályosítás útján három részre osztottam és ezek réz-sójának Cu-tartalmát meghatároztam:

<i>a)</i>	1·355 g. olv. pont	280—281° C (gázfejlődés, jvlt)	Rézsójának Cu-tart.	20·46%
<i>b)</i>	2·063 g. " "	280—286° C " "	" "	21·11%
<i>c)</i>	0·486 g. " "	264° C " "	" "	21·08%
	0·316 g. veszteség.			

Mindhárom fractiót tehát leucin és valin keveréke gyanánt foghatjuk fel, annyival is inkább, minthogy az utolsó, szándékosan igen kicsinyre mért fractió réz-sójának Cu-tartalma sem haladja meg a valinréz Cu-tartalmát.

Az egyes fractiók réz-sóinak Cu-tartalmából a következő összetétel számítható ki:

	valin	leucin
a) 42·45%, 0·575 g.		57·55%, 0·780 g.
b) 79·18%, 1·634 g.		20·82%, 0·329 g.
c) 77·52%, 0·377 g.		22·40%, 0·109 g.

Összesen 2·586 g. valin és 1·218 g. leucin, mi 100 g. víz- és hamumentes fibrinre számítva, 1·392 g. valinnak és 0·656 g. leucinnek felel meg.

A III. és IV. fractió alkoholos kivonatai.

Az esterek elszappanosított és szárazra bepárolt III. és IV. fractióját a benne foglalt pyrrolidin carbonsav különválasztása céljából forró vízmentes alkohollal kivontam. Az alkoholos kivonatokot egyesítve, alacsony hőmérséken légritkított térben óvatosan szárazra bepároltam és a maradékot vízmentes alkohollal újból kivontam, mi közben 1·5 g.-nyi fehér kristályos anyag oldatlanul maradt. Ennek az anyagnak 1 g.-ját vízből átkristályosítás útján három részletre osztottam és ezeknek réz-sóját állítottam elő. A réz-sók Cu-tartalmából számítottam ki a keverék összetételét.

	Az átkristályosított anyag hány %-a	A réz-só Cu-tartalma %	A Cu-tartalomból számított %-os összetétel			Az egész b) fractió hány %-a			
			leucin	valin	alanin	leucin	valin	alanin	elvésett
a) 0·19 g.	19	19·93	90·58	9·42	—	17·25	1·75	—	—
b) 0·22 g.	22	22·01	—	92·85	7·15	—	20·43	1·57	—
c) 0·50 g.	50	24·78	—	39·31	60·69	—	19·66	30·34	—
Elvésett 0·09 g.	9	—	—	—	—	—	—	—	9
						17·25	41·84	31·91	9

Az egész 1·5 g.-nyi anyagban tehát volt:

17·25%, 0·26 g. leucin

41·84%, 0·63 g. valin és

31·91%, 0·48 g. alanin,

9·00%, 0·13 g. az anyag átkristályosítása

folyamán elveszett.

100 g. víz- és hamumentes fibrinre vonatkoztatva a III. és IV. fractio alkoholos kivonatában tehát

0·14 g. leucint,

0·34 g. valint és

0·26 g. alanint találtam.

A II., III. és IV. fractióból tisztán előállított leucin 0·1350 g.-ja elemzéskor adott 0·2711 g. CO₂-t és 0·1204 g. H₂O-t.

A leucin (C₆H₁₃NO₂) tartalmaz

számítás szerint:

elemzés szerint:

54·96% C-t

54·77% C-t

9·92% H-t

9·91% H-t.

Az alanin 0·0598 g.-ja adott 0·0871 g. CO₂-t és 0·0406 g. H₂O-t.

Az alanin (C₃H₇NO₂) tartalmaz

számítás szerint:

elemzés szerint:

40·45% C-t

39·72% C-t

7·87% H-t

7·54% H-t.

Aminovalerianasavat elemzésre alkalmas állapotban nem sikerült előállítani; a legtisztábbnak tartott készítmény is jelentékeny mennyiségű leucinnal volt szennyezve.

Az *alkoholos kivonatokat* óvatosan bepároltam, a maradékot vízben oldottam és fölös mennyiségű nedves CuO-dal főztem. A réz-só megszűrt oldatát csekély nyomás alatt, alacsony hőmérséken teljesen bepároltam, kénsav fölött megszáritottam és vízmentes alkohollal kivontam. Ily módon 1·45 g. alkoholban oldhatatlan és 4·14 g. alkoholban oldható réz-sót kaptam.

Az alkoholban oldhatatlan réz-só 130°-ra melegítve, 10·86% kristályvizet veszített, miközben sötétkék színét vöröses ibolyára változtatta. A vízmentes só 22·00% Cu-t tartalmazott. Minthogy

a r.-prolinréz számítás szerint 10·99% kristályvizet, a vízmentes só pedig 21·92% Cu-t tartalmaz, a készítmény a r.-prolinrézzel azonosítható.

Az alkoholban oldott réz-sót az alkohol elpárologtatása után vízben feloldottam és H_2S -nel bontottam. A megszárt oldat bepároláskor rosszul kristályosodó maradékot adott, melyet autoklavban $Ba(OH)_2$ -dal $140^\circ C$ -ra melegítve racemizáltam. Miután az oldatot a bariumtól kénsavval megszabadítottam, szén-nel szintelenítettem és óvatosan bepároltam. Jól kristályosítható, de kissé barnás maradékot kaptam, melyet tisztítás céljából vízből még egyszer átkristályosítottam, majd vízmentes alkoholban feloldottam és vízmentes aetherrel kicsaptam. Az így nyert anyagnak réz-sója teljesen a r.-prolinréz tulajdonságait mutatta.

Az 1·45 g.-nyi alkoholban oldhatatlan réz-só tehát 0·97 g. r.-prolinnak, a 4·14 g.-nyi alkoholban oldható réz-só pedig 3·24 g. optikailag aktív prolinnak felelt meg.

A kapott prolin mennyisége ezek szerint összesen 4·21 g.-ot, illetve 100 g. víz- és hamumentes anyagra számítva 2·27 g.-ot tett ki.

V. fractió ($180^\circ C$, 0·2 mm. Hg).

A 20 g.-nyi párlatot vízzel hígítva aetherrel ismételtlen kiráztam.

1. Aetheres kivonat.

Az aetheres kivonatot lepárolt vízzel kimosván, sósav hozzáadása után teljesen bepároltam. A maradékot CaO fölött légüres térben megszáritva, 8·2 g. nyers phenylalanin-chlorhydratot kaptam, mi 6·69 g., illetve 100 g. víz- és hamumentes anyagra számítva 3·60 g. phenylalaninnak felel meg.

A nyers anyagot tömény sósavból egyszer átkristályosítottam. A kristályokat a hozzájuk tapadt sósavtól lehetőleg teljesen megszabadítván, vízben feloldottam és az oldatot fölös ammóniákkal teljesen szárazra bepároltam. A száraz maradékot jég-hideg vízzel kivontam és ezen az úton az ammoniumchloridtól megszabadítottam. Az így megtisztított phenylalanint lehetőleg

kevés meleg vízben feloldottam és alkohollal több fractióban kicsaptam. A fractiók közül a legtisztább szolgált az elemzés céljára.

0·1013 g. anyag adott 0·2387 g. CO₂-t és 0·0603 g. H₂O-t.

A phenylalanin (C₉H₁₁NO₂) tartalmaz

számítás szerint:	elemzés szerint:
65·45% C-t	64·26% C-t
6·66% H-t	6·61% H-t.

2. A vizes oldat.

A vizes oldatokat egyesítvén, Ba(OH)₂ hozzáadása után visszafolyó hűtő alkalmazása mellett 10 órán át főztem. A folyadékából állás közben a fölös Ba(OH)₂ mellett organicus anyag is vált ki. Ezt az anyagot az anyalúgtól különválasztva, vízben feloldottam és kénsavval kezeltem a barium teljes eltávolításáig. A kénsavas bariumról leszűrt folyadékot a csapadék gondos kimosására használt lepárolt vízzel egyesítvén, bepároltam. Ily módon 0·7 g. asparaginsavat nyertem, melyet egyszeri átkristályosítás után elemeztem.

0·1053 g. anyag adott 0·1408 g. CO₂-t és 0·0526 g. H₂O-t.

Az asparaginsav (C₄H₇NO₄) tartalmaz

számítás szerint:	elemzés szerint:
36·09% C-t	36·46% C-t
5·26% H-t	5·55% H-t.

A kapott 0·7 g.-nyi asparaginsav 100 g. víz- és hamu-mentes anyagra vonatkoztatva 0·39 g.-nak felel meg.

Az asparaginsavas barium anyalúgjából a barium eltávolítása után több asparaginsav nem vált ki. Az oldat bepároláskor szörpszerű maradékot adott, melyet lehetőleg kevés vízben oldva, száraz sósavgázzal telítettem és lehülés után glutaminsav-chlorhydrat kristálykával beoltottam. Glutaminsav-chlorhydrat nem vált ki.

Az oldatot bepárolás és ólomoxyddal kezelés útján a sósavtól megszabadítottam, H₂S-nel kezeltem, megsűrtem és bepároltam. A maradék vízben lúgos kémhatással oldódott. Az oldatot fölös CuO-dal főztem, mire sötétkék oldatot kaptam,

melyből fractionált kristályosítás útján igen nehezen oldódó szennyeszöld színű anyag vált ki, melynek Cu-tartalmát 19.09%-nak találtam. Az anyag javarésze vízben igen könnyen oldódó, alkohollal kicsapható réz-sót adott. Az alkohollal kicsapott és megszáritott réz-só Cu-tartalmát 22.88%-nak találtam, mi kb. a serinréz Cu-tartalmának felel meg. A réz-sóból H_2S -nel kezelés útján előállított anyag 0.0838 g.-ja 0.1067 g. CO_2 -t és 0.0523 g. H_2O -t adott, tehát 34.73% C-t és 6.93% H-t tartalmazott. A megvizsgált anyag összetétele tehát elég jól egyezik a serin ($C_3H_7NO_3$) összetételével, ez ugyanis 34.29% C-t és 6.67% H-t tartalmaz. Az anyag mennyisége azonban a részletesebb elemzésre sajnos, igen kicsiny volt, úgy, hogy a serin jelenlétét biztosan megállapítani nem sikerült.

3. Az arginin, lysin, histidin csoport meghatározása.

A lombikban az esterek lepárolása után 107 g.-nyi, forró állapotban sűrűn folyó, hideg állapotban teljesen merev sötétbarna anyag maradt. Ennek az anyagnak legnagyobb részét $Ba(OH)_2$ oldat és alkohol keverékével melegítve sikerült feloldani. Nehány g.-nyi részlet oldatlanul maradt, néhány g. pedig az oldat lehülése után kicsapódott. Az oldatot $Ba(OH)_2$ csekély fölöslegével kezeltem és a kicsapódott $BaSO_4$ -ról leszűrtem. A $BaSO_4$ -ot lepárolt vízzel ismételtén kivontam és a kivonatot az előbbi szüredékkal egyesítettem. Az egész folyadékot, melynek mennyisége kb. 3 litert tett ki, mintegy 300 g. phosphorwolframsav tömény oldatával kezeltem, mire bőséges csapadék képződött. A csapadékot összegyűjtve, jól kisajtoltam, levegőn megszáritottam és megmértem. Mennyiségét 217 g.-nak találtam.

A phosphorwolframatokról leszűrt folyadékot előbb $Ba(OH)_2$ fölöslegével, aztán kénsavval kezelve a phosphorwolframsavtól és a $(BaOH)_2$ fölöslegétől megszabadítottam. A csapadékokat minden esetben jól kimostam és a megfelelő szüredékkal egyesítettem. A Ba-mentes szüredék teljesen bepárolva sűrű, barnás szörpszerű anyagot adott, mely MILLON reagenssel főzve vörösre, Cu O-dal főzve, sötétkékre színeződött. Ezt a maradékot 100 cm^3 vízben feloldván, az oldat 2—2 cm^3 -ében a N mennyiségét

KJELDAHL szerint meghatároztam. A maradékban 2·491 g. N-nek, illetve 100 g. víz- és hamumentes anyagra vonatkoztatva 1·341 g. N-nek megfelelő phosphorwolframsavval ki nem csapható N-vegyület volt. Ezek a N-vegyületek a monoaminosavak át nem párolt estereinek, illetve az elpárolással egyidejűleg lefolyó elszappanosodás által szabaddá vált monoaminosavaknak felelnek meg. Minthogy azonban ezek között a tyrosin is szerepel, melynek N-tartalma 100 g. víz- és hamumentes fibrinre vonatkoztatva 0·26 g., a meghatározatlan aminosavakra 1·08 g. N esik, mi önkényesen leucin gyanánt számítva, 10·09 g.-nak felel meg.

A phosphorwolframatok 1·2646, illetőleg 1·2267 g.-jában a N-t KJELDAHL szerint meghatároztam. A csapadék egész 217 g.-nyi mennyiségében 6·293 g. N.-t találtam, melyet a maga egészében argininra, lysinre és histidinre vonatkozathatunk, mert a phosphorwolframatokat oly hydrolysált keverékből nyertem, melyből a monoaminosavak jelentékeny részét már előbb eltávolítottam és a kicsapást igen híg oldatban végeztem.

Régebbi tapasztalatok és LEVENE és BEATTY¹ újabb keletű vizsgálódásai alapján pedig tudjuk, hogy a monoaminosavak csak tömény oldataikból csaphatók ki, igen tömény phosphorwolframsavas oldatokkal.

A phosphorwolframatokban foglalt N mennyisége 100 g. víz- és hamumentes fibrinre vonatkoztatva 3·387 g.-nak felel meg. Ha ezt a N. mennyiséget önkényesen argininre vonatkoztatjuk, 100 g. víz- és hamumentes anyagnak arginin tartalmát 13·25 g.-ra értékelhetjük.

A phosphorwolframsavas csapadékban, annak Ba(OH)₂-dal való felbontása után sikerült arginint, histidint és lysint qualitative kimutatni.

Összefoglalás.

100 g. víz- és hamumentes szarvasmarha fibrinből a következő termékeket nyertem:

¹ Zeitschr. f. physiol. Chemie 47 k. 148. 1. 1906.

	Anyag mennyisége	N. g-okban
Ammoniak	1·790	1·47
Glykokoll	0·564	0·10
Alanin	1·18	0·18
Valin	5·48	0·66
Leucin	1·98	0·21
α -prolin	2·27	0·27
Serin	jelen van	—
Tyrosin	3·41	0·26
Phenylalanin	3·60	0·30
Glutaminsav	9·74	0·93
Asparaginsav	0·39	0·04
Meghatározatlan aminosavak .	10·09 ¹	1·08
Arginin-lysin-histidin-csoport	13·25 ²	3·39
Összesen	53·74	8·89

Az elemzésnek a prolinra, a glutaminsavra és a tyrosinra vonatkozó adatai meglehetősen megegyeznek az ABDERHALDEN-BRUNNER és az ABDERHALDEN-VOITINOVICI-féle adatokkal. Jelentékeny eltérést látunk azonban a glykokoll mennyiségében, valamint az alanin, valin és leucin mennyiségeiben, főleg pedig ezeknek egymás közötti viszonyában. Feltűnő a leucin csekély mennyisége és ezzel szemben a valinnak túlnyomó mennyiségben való jelenléte. A glykokollnak, az alaninnak és a leucinnak, valamint az asparaginsavnak mennyiségét jelentékenyen csekélyebbnek találtam, mint a fentemlített vizsgálók. A phenylalanin és aminovaleriansav azonban nagyobb mennyiségben voltak jelen.

Ezeknek az eltéréseknek okát egyfelől a kiindulási anyag különböző voltában, másfelől a követett módszer különbségeiben kereshetjük.

Míg ABDERHALDEN, BRUNNER és VOITINOVICI az aether chlorhydrátjaiból az estereket K_2CO_3 -al tették szabaddá, addig én erre a célra — ABDERHALDEN-től eredő előírás szerint — natriumaethylatot használtam. Az alanin, a leucin és a valin viszony-

¹ A tyrosin mennyiségének megfelelő N levonása után megmaradó 1·08 gr. N tartalomról önkényesen leucin gyanánt számítva. (l. 38. l.).

² 3·39 g. N tartalomról önkényesen arginin gyanánt számítva. (l. 38. l.).

lagos mennyiségében mutatkozó különbség okát abban kereshetjük, hogy ezen aminosavak mennyiségét az eddigi szokástól eltérően a réz-sók Cu-tartalmából számítottam ki. A fractionált kristályosítás útján történő különválasztás, illetőleg az egyes fractiók elhatárolása nem történhetik meg bizonyos önkényesség nélkül. Az aminosavak különösen szívesen csatlakoznak a szomszédos fractiókhoz és hogy ezektől mennyire nehéz különválasztani, kitűnik abból, hogy ezt az anyagot elemzésre alkalmas állapotban nem is sikerült előállítanom. Könnyen elképzelhető tehát az az eshetőség, hogy az aminosavak egy része a fractionált kristályosítás során a felismerést elkerüli.

Ezzel szemben ama módszer, melyet követtem, esetleges idegen anorganikus szennyeződések révén éppen a valin mennyiségeit tünteti fel a valódinál nagyobbak, a leucin rovására.

Feltűnő az arginin-histidin-lysinre vonatkoztatandó N jelentékeny mennyisége. Ha ezt a N-t mind argininre vonatkoztatjuk, ez a csoport akkor is 13·25%-al van képviselve. Ez a szám 17·56%-ra emelkednék, ha a phosphorwolframát N-át mind histidinre vonatkoztatnók.

A fibrinben foglalt arginin-histidin-lysin-csoport mindaddig nem részesült a kellő figyelemben. Ez az adat, mely még további részletezést igényel, a fibrin kémiai jellegzése szempontjából azért fontos, mert a fibrint a histonok csoportjával hozza közeli vonatkozásba.

Tekintettel ama jelentékeny eltérésre, melyet a vizsgált anyagnak leucin-, alanin- és valintartalmában a régebbi elemzésekkel szemben találtam, továbbá arra, hogy az a módszer, melylyel ezekhez az eredményekhez jutottam, megbízhatósága szempontjából még rendszeres ellenőrzést igényel, a közölt elemzés adataiból a fibrin kémiai jellegére végérvényes következtetést vonni még nem lehet. Ama befolyás tanulmányozására pedig, melyet a táplálék anyagai a fibrin összetételére gyakorolhatnak, a fibrin valamennyi hydrolysisis termékének figyelembe vétele nem nyújt módot. A kívánt célhoz talán könnyebben elérhetünk, ha a számos bomlástermék közül csupán néhányat, olyant veszünk tekintetbe, melynek meghatározása kevesebb körülménnyel és aránylag nagyobb pontossággal hajtható végre.