

Ueber Oxydation von krystallisirtem Eiereiweiss mit Wasserstoffsperoxyd.

Von
Fr. N. Schulz.*)

Aus dem physiologischen Institut zu Jena. Chemische Abtheilung.
Der Redaction zugegangen am 28. November 1899.

I. Oxydation von Eiweiss mit Kaliumpermanganat.

Die Oxydation von Eiweiss mit Kaliumpermanganat ist vielfach Gegenstand eingehender Untersuchungen gewesen. Die letzte Arbeit hierüber, von Bernert,¹⁾ hat uns gezeigt, dass bei dieser Oxydation ganz analoge Vorgänge sich abspielen, wie bei der Bildung von Albumosen und Peptonen durch Einwirkung der verdauenden Fermente auf Eiweiss. Das zunächst entstehende Produkt, der Maly'schen Oxyprotosulfonsäure entsprechend, erleidet im weiteren Verlaufe Veränderungen, die man, in Uebereinstimmung mit der Bildungsweise der gewöhnlichen Verdauungsprodukte, als hydrolytische Spaltungen aufzufassen berechtigt ist. Dieselben verdanken ihren Ursprung der bei der Oxydation aus dem Kaliumpermanganat sich bildenden Kalilauge, welche auch unter anderen Bedingungen peptonisirend wirkt; dieselbe ist also auch diesmal für die Entstehung der albumose- und peptonartigen Spaltungsprodukte der Oxyprotosulfonsäure verantwortlich zu machen, zumal sie hierbei in statu nascendi zur Wirkung gelangt.

*) Die Untersuchung habe ich in Gemeinschaft mit Herrn Apotheker Heinrich Couvreur ausgeführt.

1) R. Bernert, Ueber Oxydation von Eiweiss mit Kaliumpermanganat. Diese Zeitschrift Bd. XXVI, S. 272—307. Dortselbst ist die einschlägige Litteratur ersichtlich.

Aber nicht allein diese Nebenwirkung des Kaliumpermanganates kommt bei der Beurtheilung der Oxyprotosulfonsäure und ihrer Umwandlungsprodukte in Betracht, sondern es ist mit Sicherheit anzunehmen, dass die entstehende Kalilauge auch anderweitige Abspaltungen hervorruft. So glaubt auch Bernert der Anschauung Maly's und anderer Forscher, wonach die Oxyprotosulfonsäure ein reines Oxydationsprodukt ist, entgegentreten zu müssen.

Wegen dieser störenden Nebenwirkungen des Kaliumpermanganates haben wir die Einwirkung von Wasserstoff-superoxyd auf Eiweiss einer Untersuchung unterworfen, in der Hoffnung, zu reinen Oxydationsprodukten gelangen zu können.

II. Darstellung des Ausgangsmaterials.

Als Ausgangsmaterial benutzten wir bei unseren Versuchen, abgesehen von einigen Vorversuchen, krystallisirtes Eiereiweiss. Dasselbe wurde dargestellt nach dem von Krieger¹⁾ angegebenen Verfahren: Eiereiweiss wurde mit dem gleichen Volumen concentrirter Ammonsulfatlösung versetzt, filtrirt, zu dem Filtrat wurde verdünnte Schwefelsäure (ca. $\frac{1}{10}$ normal) bis zur starken Trübung hinzugegeben. Der Krystallbrei, der sich nach einiger Zeit in reichlicher Menge abschied, wurde abfiltrirt und in der üblichen Weise mehrmals umkrystallisirt. Beim Umkrystallisiren unterblieb der Schwefelsäurezusatz: die filtrirte Lösung des Krystallbreis wurde einfach mit concentrirter Ammonsulfatlösung bis zur beginnenden Ausscheidung versetzt. Auch wir geben nach unseren Erfahrungen der von Krieger empfohlenen Schwefelsäure gegenüber der Essigsäure, welche Hopkins und Pinkus²⁾ zu einem analogen Darstellungsverfahren benutzten, den Vorzug.

Zur weiteren Verarbeitung wurde der abfiltrirte Krystallbrei in Wasser gelöst, das anhaftende Ammonsulfat durch

1) Hans Th. Krieger, Ueber Darstellung krystallinischer thierischer Eiweissstoffe. Inaug. Diss., Strassburg, 1899.

2) Observations on the crystallisation of Animal Proteids. Journ. of Physiology, XXIII, p. 132; 1898.

Dialyse nach Möglichkeit entfernt. Die so erhaltene Lösung wurde direkt zur Oxydation benutzt.

In einem aliquoten Theil wurde durch Fällung mit Alkohol und Erhitzen das Eiweiss zur quantitativen Bestimmung gefällt. Das so erhaltene Eiweisspräparat wurde, nachdem es mit Wasser, Alkohol, Aether gewaschen und bei 105° getrocknet war, der Elementaranalyse unterworfen. Es war dies nothwendig, da weder Krieger noch Hopkins und Pinkus ihr krystallisirtes Eiweiss analysirt hatten.

Das von uns analysirte Präparat hatte (aschefrei berechnet) die Zusammensetzung:

C 52.26, H 7.4, N 15.19, S 1.23, O 23.92 %¹⁾

Der Aschegehalt betrug 0.2 %.

Das nach dem alten Hofmeister'schen Verfahren gewonnene Eiweiss enthält:

C 53.28, H 7.26, N 15.00, S 1.18, O 23.28 %²⁾

Es findet sich also eine nennenswerthe Differenz im Kohlenstoffgehalt.

Es wurde daher ein zweites Präparat nach dem Säureverfahren hergestellt; dasselbe war viermal umkrystallisirt und im Uebrigen in derselben Weise behandelt, wie vorher beschrieben. Dies Präparat wies denselben C- und H-Gehalt auf.

b) Aschebestimmung:

0.2993 g Substanz lieferten 0.0007 g Asche = 0.2 %.

C- und H-Bestimmungen:

0.2253 g Substanz lieferten 0.4321 g CO_2 = 52.41 % C (aschefrei).

0.1400 g H_2O = 7.00 % H,

0.3870 g " " 0.7381 g CO_2 = 52.12 % C,

0.2722 g H_2O = 7.81 % H.

N-Bestimmungen (Kjeldahl):

0.2491 g Substanz lieferten 0.03794 g N = 15.27 %.

0.1920 g " " 0.02866 g N = 14.96 %.

0.1975 g " " 0.02935 g N = 14.89 %.

0.2218 g " " 0.03462 g N = 15.63 %.

S-Bestimmung (mit Soda-Salpeter nach Hammarsten):

0.7918 g Substanz lieferten 0.0741 g BaSO_4 = 1.29 % S.

0.6490 g " " 0.0558 g BaSO_4 = 1.18 % S.

²⁾ Diese Zeitschrift Bd. XXIV, S. 169.

wie das zuerst analysirte: es enthielt **C 52.22, H 7.44**.¹⁾ Also auch hier findet sich dieselbe Differenz gegenüber dem Hofmeister'schen Eieralbumin. Da gleichzeitig der Wasserstoffgehalt etwas erhöht ist, so kann man an die Möglichkeit denken, dass bei dem Säureverfahren ein Hydrat des Hofmeister'schen Eieralbumins krystallisirt.

Die Menge des durch Alkali als Schwefelwasserstoff abspaltbaren Schwefels wurde nach der Zinkmethode²⁾ bestimmt: es liessen sich 0.5% Schwefel abspalten, also circa die Hälfte des Gesamtschwefels.³⁾ Aus dem Hofmeister'schen Eieralbumin liessen sich nach der Analyse von Schulz 0,49% Schwefel durch Alkali abspalten.⁴⁾ Auch dieser Umstand zeigt, dass die beiden krystallisirten Albumine im Wesentlichen identisch sind.

Diese Zahlen sind für die vorliegende Untersuchung von besonderem Interesse, da nach der Annahme von Maty der Hauptvorgang bei der Bildung der Oxyprotosulfonsäure in der Oxydation gerade dieses abspaltbaren Schwefels besteht, ein Umstand, dem die Oxyprotosulfonsäure ja ihren Namen verdankt.

III. Litteratur über Einwirkung von Wasserstoffsperoxyd auf Eiweiss.

Ueber die Einwirkung von Wasserstoffsperoxyd auf Eiweiss liegen bisher nur wenige Untersuchungen vor, die noch

1) Aschebestimmung:

0.54 g Substanz = 0.0021 g Asche = 0,4%

C- und H-Bestimmung:

0.2809 g Substanz lieferten 0.5369 g CO₂ = 52,34% C. (aschefrei).

0.1786 g H₂O = 7,31% H.

0.2945 g 0.5604 g CO₂ = 52,10% C.

0.2000 g H₂O = 7,57% H.

2) Fr. N. Schulz. Die Bindungsweise des Schwefels im Eiweiss. Zeitschrift f. physiolog. Chemie, Bd. XXV, S. 16—35; 1898.

3) 0,5213 g Substanz lieferten 0,019 g BaSO₄ = 0,00261 g S = 0,50%

1,011 g 0,037 g BaSO₄ = 0,00508 g S = 0,50%

4) l. c.

dazu in den neueren Lehrbüchern keine Beachtung gefunden haben.

Der Einfluss des Wasserstoffsperoxyds auf Fäulniss und Gährungs Vorgänge ist vielfach untersucht worden; ebenso ist über die Fähigkeit des Fibrins, sowie vieler Gewebsstoffe, H_2O_2 in H_2O und O zu zerlegen, eine umfangreiche Litteratur vorhanden. Ob und in welcher Weise die hierbei beteiligten Eiweisskörper durch das Wasserstoffsperoxyd chemisch verändert werden, darüber finden sich jedoch nur wenige gelegentliche Bemerkungen. So glaubte Thénard,¹⁾ dass das Fibrin bei der Zerlegung des Wasserstoffsperoxyds nicht verändert wurde. Demgegenüber wies Béchamp²⁾ nach, dass 30 g Fibrin, welche mit H_2O_2 bis zur Erschöpfung ihrer Wirksamkeit in Berührung blieben, 0.16 g organische Substanz an die Flüssigkeit abgaben.

Die ersten etwas specielleren Angaben über den fraglichen Gegenstand rühren von Bert u. Regnard her.³⁾ Dieselben beobachteten, dass sowohl aus gelösten als ungelösten Albuminstoffen durch neutrale oder schwach mit Schwefelsäure angesäuerte Lösungen von Wasserstoffsperoxyd diffusible Substanzen gebildet werden, welche die Eigenschaft von Pepton haben, übrigens durch Gerbsäure nicht gefällt werden; in anderen Fällen finden sich Körper mit den Reactionen der gewöhnlichen Peptone neben durch Salpetersäure fällbaren Uebergangsprodukten.

Späterhin hat Chandelon⁴⁾ die durch diese Untersuchungen angeregte Frage wieder aufgenommen.

Die gewagten und unhaltbaren theoretischen Betrachtungen, die Chandelon aus seinen Beobachtungen über die Einwirkung des Wasserstoffsperoxyds auf Eiweiss über die Peptonisation im Allgemeinen und speciell über die Wirkungsweise des Pepsins gezogen hat,⁵⁾ haben im Verein mit der ungünstigen Kritik, welche Maly aus anderen Gründen an der Arbeit Chandelon's geübt hat,⁶⁾ diese Untersuchungen anscheinend in Misscredit gebracht; wenigstens haben die Versuche in den neueren

1) Thénard, s. Maly's Jahresbericht Bd. 12, S. 58; 1882.

2) Maly's Jahresbericht Bd. XII, S. 58.

3) T. Bert u. P. Regnard, Comptes rendues 1883, S. 133—135.

4) Chandelon, Beitrag z. Studium der Peptonisation, Chem. Ber. Bd. XVII, 2143—2151. 1884.

5) Chandelon, Beitrag z. Studium der Peptonisation, Chem. Ber. Bd. XVIII, 1999—2011. 1885.

6) Maly's Jahresbericht für Thierchemie Bd. XV, S. 244. 1885.

Lehrbüchern keinen Platz gefunden. Nichtsdestoweniger bieten die tatsächlichen Beobachtungen manches Beachtenswerthe.

Chandelon verwandte nicht fertiges H_2O_2 , sondern er liess dasselbe in nascirendem Zustand einwirken, indem er in der Eiweisslösung Baryumsuperoxyd fein vertheilte, aus welchem er durch einen CO_2 -Strom das Wasserstoffsuperoxyd frei machte. Er erhielt hierbei im Wesentlichen 3 verschiedene auf das Eiweiss zurückzuführende Körper: 1. Eine Proteinsubstanz (Albuminat), welche in ihren Eigenschaften sich sehr dem Casein näherte. 2. Eine albumoseartige Substanz. 3. Einen Körper mit allen Reactionen der Peptone. Das caseinähnliche Protein ist in seinen Löslichkeitsverhältnissen, sowie in seinem Verhalten gegenüber den gewöhnlichen Eiweissfällungsmitteln mit der kurze Zeit später (1885) von Maly beschriebenen Oxyprotsulfonsäure im Wesentlichen identisch. Ob dasselbe im Gegensatz zur Oxyprotsulfonsäure die Millon'sche Reaction gibt oder nicht, ist nicht angegeben, aber wahrscheinlich, da das gleichzeitig entstandene Propepton und Pepton diese Reaction gibt.

Die Einwirkung des Wasserstoffsuperoxyds gestaltete sich also bei der gegebenen Versuchsanordnung im Wesentlichen analog der des Kaliumpermanganats, wie sie die spätere Untersuchung von Bernert klar gelegt hat. Eine genaue Charakterisirung der gebildeten Stoffe fehlt, so dass wir keine Anhaltspunkte dafür haben, ob wir es hier mit einem Spaltungsvorgang oder einer Combination von Oxydation und Spaltung zu thun haben. Chandelon selbst fasst die Wirkung des Wasserstoffsuperoxyds als reine Spaltung, analog der Bildung der Verdauungsprodukte durch das Pepsin, auf.

Diese Befunde Chandelon's wurden im Wesentlichen bestätigt und durch Einzelnes erweitert von Wurster.¹⁾ Wurster versetzte das nicht filtrirte Weisse des Eies mit dem gleichen Volumen H_2O_2 (käuflisches?), schüttelte gut durch,

1) C. Wurster, Ueber das Verhalten von Wasserstoffsuperoxyd gegen Eiweiss. Chem. Ber. Bd. XX. 263-267. 1887.

Derselbe, Ueber die Einwirkung oxydirender Agentien auf Hühnerweiss. Chem. Ber. Bd. XX. 1030-1033.

setzte dann auf 100 ccm. Eiweiss 1—2 ccm. künstliche Milchsäure und 1—2 g Kochsalz hinzu. Bei Bruttetemperatur schied sich bald eine feste, geronnene, käseähnliche Masse aus, die identisch ist mit dem von Chandelon beschriebenen caseinähnlichen Protein. Die Mutterlauge enthält eine geringe Menge mit Alkohol fällbaren Peptons, jedoch nur so wenig, dass die Fällung des Hühnereiweisses beinahe als eine quantitative betrachtet werden darf. Diese Angabe steht im Widerspruch mit der Chandelon's, der grosse Mengen Pepton, unter Umständen sogar fast ausschliesslich Pepton, erhält. Wurster glaubt dies dadurch erklären zu können, dass nach der Versuchsanordnung Chandelon's (s. vorher) das H_2O_2 durch die CO_2 zersetzt worden sei; Chandelon habe also gar nicht die Einwirkung von H_2O_2 untersucht, sondern nur die des sich zersetzenden H_2O_2 . Wir müssen noch weiterhin auf diesen Punkt zurückkommen.

Ueber die caseinähnliche Substanz macht Wurster die Bemerkung, dass der gefällte Eiweisskörper eine alkalische Bleilösung schwärzt und sich nicht in essigsäurem oder weinsäurem Natron löst, also nicht die Oxyprotsulfonsäure Maly's und Brücke's ist. Ob dieser Körper die Millon'sche Reaction gibt, darüber liegt auch hier keine Angabe vor.

Des Weiteren theilt Wurster Versuche mit, quantitativ zu bestimmen, ob und wie viel Sauerstoff von dem Wasserstoff-superoxyd an die Eiweisslösung abgegeben wird. Es zeigte sich immer eine, wenn auch geringe Aufnahme von Sauerstoff durch das Eiweiss.

Wurde das von Wurster Eicasein genannte Produkt bei Gegenwart von H_2O_2 einer künstlichen Verdauung durch Pepsinsalzsäure unterworfen, so verlief die Spaltung des Peptons ohne weitere Sauerstoffaufnahme.

Auch diese Angaben Wurster's haben in die neueren Lehrbücher keine Aufnahme gefunden; aus diesem Grunde auch dies etwas ausführliche Citat.

Bei der Unvollständigkeit der vorliegenden Beobachtungen und dem erhöhten Interesse, welches dieselben durch die Untersuchungen Bernert's über die Oxydation mit Kaliumpermanganat

gewonnen haben, hielten wir es für lohnend, diesen Gegenstand etwas eingehender zu untersuchen. Hierbei waren es zunächst zwei Gesichtspunkte, welche uns hauptsächlich interessirten. Erstens: in welcher Beziehung zu dem Ausgangsmaterial einerseits und der Oxyprotosulfonsäure andererseits steht der erhaltene caseinähnliche Körper, den wir vorgreifend Oxyprotein nennen möchten? Zweitens: ist die beobachtete Bildung von Pepton eine reine Wirkung des Wasserstoffsperoxyds, oder ist sie als Nebenwirkung aufzufassen?

IV. Beziehung des Oxyproteins zum Protein und zur Oxyprotosulfonsäure.

Zur Oxydation der oben beschriebenen Lösung von krystallisirtem Eiereiweiss wurde von Merck bezogenes Wasserstoffsperoxyd verwendet. Dasselbe reagirte gegen Lackmuspapier und gegen Cochenille sauer: 25 cem. brauchten zur Neutralisation 2 cem. $\frac{1}{10}$ Normalnatronlauge (Indicator Cochenille). Da ganz reines H_2O_2 sauer reagirt¹⁾ und überdies die Acidität, wenn durch eine verunreinigende Säure bedingt, nur eine minimale war,²⁾ so glaubten wir vorderhand von einer weiteren Reinigung des Wasserstoffsperoxyds absehen zu können. Verwendet man durch Destillation (nach Wolfenstein) gereinigtes Wasserstoffsperoxyd (25 cem. brauchten für Neutralisation 0.3 cem. $\frac{1}{10}$ Normalnatronlauge), so erfolgt die Abscheidung des Oxyproteins so viel langsamer, trotz Anwendung von Brüttemperatur und Platinrohr, dass wir auch aus diesem Grunde für die Darstellung des Oxyproteins uns vorläufig auf die Verwendung des nicht destillirten Wasserstoffsperoxyds beschränkten. (Näheres in Abschnitt V).

Versetzt man eine Eiweisslösung mit käuflicher Wasserstoffsperoxydlösung und erhitzt zum Sieden, so coagulirt das Eiweiss. Lässt man eine Eiweisslösung mit diesem Wasser-

1) R. Wolfenstein, Concentration und Destillation von H_2O_2 . Chem. Ber. Bd. XXVII, 3307—3312, 1894.

2) Hierbei ist zu berücksichtigen, dass durch Zusatz zu der wässrigen Eiweisslösung eine weitere Verdünnung eventuell vorhandener Säure statt hat.

stoffsuperoxyd bei Zimmertemperatur stehen, so tritt bald eine Opalescenz und milchige Trübung ein, es dauert jedoch mehrere Wochen, bis sich ein Niederschlag absetzt. Bei genügend langem Stehen wird auch unter diesen Bedingungen die Ausscheidung eine vollständige, was sich daraus ergibt, dass dann eine abfiltrirte Probe beim Sieden nicht mehr gerinnt.

Bei Bruttemperatur erfolgt diese Ausscheidung wesentlich rascher und ist durchschnittlich innerhalb 8 Tagen vollendet. Setzt man zu einer mit Wasserstoffsuperoxyd beschickten Eiweisslösung Platinnohr, so erfolgt unter langsamer, sichtbarer Sauerstoffentwicklung auch bei Zimmertemperatur die Ausscheidung des Oxyproteins ziemlich rasch und ist ebenfalls in ca. 8 Tagen beendet. Wendet man Platinnohr und Bruttemperatur an, so dauert die vollständige Ausscheidung nur 2—3 Tage. Bei unseren Hauptdarstellungen des Oxyproteins wandten wir diese letzteren Versuchsbedingungen an. Wir verwandten einen grossen Ueberschuss von Wasserstoffsuperoxyd und setzten die eine Hälfte erst am zweiten Tage hinzu. Von der Vollständigkeit der Ausfällung überzeugten wir uns durch den negativen Ausfall der Kochprobe.¹⁾ Gegen Schluss der Oxydation ist es zweckmässig, zu der Kochprobe etwas Kochsalzlösung hinzuzugeben, da dann die Coagulation leichter erfolgt. Die ausgeschiedenen Massen werden abfiltrirt, gewaschen mit Wasser, dem eine Spur Natronlauge hinzugesetzt war (1/100 Normalnatronlauge genügte zum Lösen), gelöst, durch Neutralisiren mit 1/10 Normalsalzsäure ausgefällt: diese Procedur wurde wiederholt. Der so erhaltene Niederschlag wurde mit Wasser, Alkohol, Aether gewaschen, getrocknet und zur Analyse verwandt. Selbstverständlich haben wir uns davon überzeugt, dass wir es nicht mit einer gefällten Chlorverbindung zu thun hatten: die Substanz mit Sodasalpeter geschmolzen erwies sich als fast chlorfrei.²⁾

1) Chromsäureprobe ergab noch einen Ueberschuss von H_2O_2 .

2) Die Spuren von Chlor sind auf unvollständiges Auswaschen zurückzuführen: man darf das Auswaschen nicht zu lange fortsetzen, da sonst erhebliche Mengen des Niederschlags sich lösen. Der nicht quantitativ bestimmte Chlorgehalt betrug sicher unter 0,1%.

Es wurden 2 vollständig getrennte Darstellungen vorgenommen.

Die Zusammensetzung des Präparates I war aschefrei berechnet:

C 50.85, H 6.74, N 14.62, S 1.2, O 26.61

Die Zusammensetzung des Präparates II war aschefrei berechnet:

C 50.85, H 6.9, N 14.6, S 1.2, O 26.45

Der analysirte Körper gibt, im Gegensatze zur Oxypropylsulfonsäure, alle Gruppenreactionen der Eiweissstoffe.

Zunächst gibt er, wie nach den Befunden Chandelon's an den albumose- und peptonartigen Produkten, welche er bei Oxydation mit Wasserstoffsperoxyd beobachtete, zu vermuthen war, in schönster Weise die Millon'sche Réaction. Selbst-

1. C- und H-Bestimmung:

0.2454 g Substanz lieferten 0.4575 g CO₂ = 50.84% C

0.1420 g H₂O = 6.43% H

0.3280 " " " 0.6093 CO₂ = 50.66% C

0.2118 g H₂O = 7.14% H

2. Stickstoffbestimmung (Kjeldahl):

0.2001 g Substanz lieferten 0.0295 g N = 14.74% N

0.1770 " " " 0.0256 g N = 14.47% N

3. Schwefelbestimmung (mit Soda-Salpeter nach Hammarsten):

0.4317 g Substanz lieferten 0.0386 g BaSO₄ = 1.2% Schwefel

4. Aschebestimmung:

0.3111 g Substanz lieferten 0.0007 g Asche = 0.2%

2) 1. C- und H-Bestimmung:

0.2788 g Substanz lieferten 0.5177 g CO₂ = 50.61% C

0.1660 g H₂O = 6.6% H

0.4029 " " " 0.7521 CO₂ = 50.90% C

0.2615 g H₂O = 7.2% H

2. Stickstoffbestimmungen (nach Kjeldahl):

0.4021 g Substanz lieferten 0.0595 g N = 14.8% N

0.3544 " " " 0.05012 g N = 14.2% N

0.2403 " " " 0.0350 g N = 14.6% N

0.1766 g " " " 0.02632 g N = 14.9% N

3. Schwefelbestimmung (mit Soda-Salpeter nach Hammarsten):

0.7050 g Substanz lieferten 0.0616 g BaSO₄ = 1.2% Schwefel

4. Aschebestimmung:

0.3723 g Substanz lieferten 0.0008 g Asche = 0.2%

Man hat bisher den als SH_2 abspaltbaren Schwefel der Eiweissstoffe für leicht oxydirbar gehalten. Derselbe ist aber nur dann leicht oxydirbar, wenn er abgespalten ist. Die einzigen direkten Versuche über die Oxydirbarkeit des nicht abgespaltenen Schwefels beziehen sich gerade auf die Oxyprotosulfonsäure.

Nach den Erfahrungen des einen von uns lag es nahe, zu prüfen, ob die Differenz zwischen dem Oxyprotein und Maly's sog. Oxyprotosulfonsäure wirklich auf einer Differenz in der oxydirenden Wirkung beruhe, oder ob dieselbe nicht vielmehr auf die Einwirkung der nascirenden Kalilauge bei der Verwendung des Kaliumpermanganates zurückzuführen sei. Wir kamen zu dem Ergebniss, dass auch die Oxyprotosulfonsäure, nach der Zinkmethode untersucht, noch reichliche Mengen abspaltbaren Schwefels enthält.

Zur Untersuchung gelangte eine genau nach den Vorschriften Maly's dargestellte Oxyprotosulfonsäure. Die Zusammensetzung derselben ist nach den zahlreichen Analysen Maly's C 51,21, H 6,89, N 14,59, S 1,77, O 25,54.

Eine derartige Oxyprotosulfonsäure enthält noch 0,33 % durch Alkali abspaltbaren Schwefel.¹⁾ Die Erklärung hierfür ist die, dass durch die Einwirkung der Lauge bei der Oxydation so viel Schwefel abgespalten wurde (und dann natürlich zu H_2SO_4 weiterhin oxydirt wurde), dass der noch verbleibende Rest abspaltbaren Schwefels in der Oxyprotosulfonsäure durch weiteres Einwirken von Lauge so langsam abgespalten wird, dass er bei einfachem Kochen mit alkalischer Bleilösung nicht bleischwärend wirken kann, da die Oxydation des PbS zu PbSO_4 mit der Abspaltung gleichen Schritt hält.²⁾

Auffallend bleibt der hohe Gehalt an Gesamtschwefel,

1) 0,9270 g lieferten 0,024 g BaSO_4 0,0033 g S = 0,35 %.
 1,25 g 0,0285 g BaSO_4 = 0,00391 g S = 0,31 %.

2) Näheres hierüber lässt sich aus der Arbeit von Schulz über die Bindungsweise des Schwefels im Eiweiss entnehmen.

welchen die Oxyprotosulfonsäure aufweist.¹⁾ Hierbei ist zunächst zu berücksichtigen, dass Maly (ebenso wie auch wir) bei der Darstellung der Oxyprotosulfonsäure von nicht gereinigtem Eiereiweiss ausging. Das nicht gereinigte Eiereiweiss enthält fast doppelt so viel Schwefel, wie das krystallisirte Eiereiweiss. Sodann ist vorläufig nicht abzusehen, ob und inwieweit bei der Oxydation mit Permanganat eine Abspaltung schwefelfreier Complexe statt hat.

Die hier bestehende Lücke soll später ausgefüllt werden.

In Betreff der übrigen Gruppenreactionen der Eiweissstoffe können wir uns kürzer fassen. Das Oxyprotein gibt die Reaction von Adamkiewicz sowie die Reaction von Molisch in schönster Weise. Die Oxyprotosulfonsäure gibt nur die Reaction von Molisch mit α -Naphthol und Schwefelsäure, was wohl mit dem Fehlen der Millon'schen Reaction im Zusammenhang steht. Die Bedingungen für das Zustandekommen dieser beiden Reactionen sind zu wenig präcisirt, um für den vorliegenden Fall bestimmte Schlüsse ziehen zu können.

Die Liebermann'sche Reaction (Blaufärbung beim Kochen mit concentrirter Salzsäure) fehlt vollständig. Behandelt man Oxyprotein am Rückflusskühler mit concentrirter HCl, so condensirt sich im Kühlrohr eine blauviolette Masse, die sich allen versuchten Lösungsmitteln gegenüber indifferent verhielt. Auch hier können wir bestimmte Schlüsse aus den gemachten Beobachtungen nicht ziehen.

Das Verhalten gegenüber den gewöhnlichen Eiweissfällungsmitteln ist kurz folgendes:

Die frisch gefällte Substanz ist in sehr verdünnter Natronlauge (1:100 normal), Natriumcarbonat, Ammoniak leicht und vollständig löslich. Durch Kochsalz, Ammoniumsulfat, Magnesiumsulfat wird das Oxyprotein aus seiner, durch ein Minimum von Alkali erzeugten Lösung leicht gefällt; ebenso durch Neutralisiren mit Salzsäure, Salpetersäure, Schwefel-

1) Bondzynski und Zoja, welche von krystallisirtem Eiealbumin ausgehend Oxyprotosulfonsäure darstellten und analysirten, bestimmten leider nicht den Schwefelgehalt. (Diese Zeitschrift, Bd. XIX, S. 225—238.)

säure, Essigsäure. Die Fällung ist im Ueberschuss von Mineralsäure nicht löslich; erst bei hoher Concentration an Mineralsäure tritt Lösung ein unter tiefgreifender Veränderung des Oxyproteins. Die Säurefällung löst sich im Gegensatz zur Oxyprotosulfonsäure (wie schon Wurster bemerkte, l. c.) nicht in Natriumacetat oder Natriumtartratlösung. Beim Fällen mit Säure bleiben für gewöhnlich Spuren von Eiweiss in Lösung, so dass das eventuell eingengte Filtrat die Biuretreaction gibt. (Das Oxyprotein zeichnet sich durch ganz besonders intensive Biuretreaction aus.) Je mehr Natronlauge man zur Lösung des Oxyproteins benutzt und je länger man mit Natronlauge in Berührung lässt, um so mehr Eiweiss entgeht bei Säurezusatz der Fällung. Bei raschem Arbeiten mit sehr verdünnter Natronlauge ist die Säurefällung eine vollständige.

Essigsäure und Ferrocyankalium, Phosphorwolframsäure, Trichlor-essigsäure, Pikrinsäure fällen naturgemäss in saurer Lösung. Die Pikrinsäurefällung löst sich beim Erwärmen nicht.

Die Substanz wird durch CuSO_4 , HgCl_2 , AgNO_3 nicht gefällt.

Die Lösung des Oxyproteins in Alkali gibt mit Alkohol, auch im grössten Ueberschuss, keine Fällung. Die durch Säure gefällte Substanz ist jedoch in Alkohol unlöslich.

Ueber die Natur des Oxyproteins möchten wir nach dem Vorstehenden hervorheben, dass dasselbe kein gewöhnliches Acidalbumin bezw. Alkalialbuminat ist, da erstens die Säurefällung sich im Ueberschuss von Säure nicht löst, und da zweitens die durch Säure oder auch durch Neutralsalz gefällte Substanz weder durch Siedehitze, noch durch Alkohol und Aether coagulirbar ist.

Wir haben den erhaltenen Körper als Oxyprotein bezeichnet. Dass es sich in der That um ein Oxydationsprodukt handelt, geht am deutlichsten aus der elementaren Zusammensetzung hervor. Der Sauerstoffgehalt ist durch den Einfluss des oxydirenden H_2O_2 von 23,9% auf 26,5% gestiegen, also um 2,6%.

Das Verhältniss der übrigen Elemente zu einander ist genau dasselbe geblieben, wie in dem Ausgangsmaterial; wir haben also allen Grund zu der Annahme, dass es sich hier thatsächlich um ein reines Oxydationsprodukt handelt ohne wesentliche Abspaltungen. Hierfür spricht namentlich auch, dass alle Gruppenreactionen des Eieralbumins mit dem Oxyprotein noch zu Stande kommen.

Eine Erhöhung des Sauerstoffgehaltes unter gleichzeitiger Herabsetzung des Kohlenstoffgehaltes wäre natürlich auch möglich durch einfache Wasseraufnahme. Da aber im H_2O 11 % H enthalten ist, müsste gleichzeitig der H-Gehalt erhöht sein. Derselbe ist aber im Oxyprotein in demselben Maasse gesunken, wie der Kohlenstoff- bzw. Stickstoffgehalt.

Die Frage, an welchem Punkte des Eiweissmoleküls die Oxydation einsetzt, können wir nicht beantworten: es hat vorläufig den Anschein, als ob eine vorher indifferente Gruppe durch Oxydation zu einer stärker sauren Gruppe geworden sei, wodurch der Gesamtscharakter des Eiweisses der einer starken Säure geworden ist. Eine genauere Untersuchung der Salzungsverhältnisse steht noch aus.

Den sauren Charakter hat das Oxyprotein mit der Oxyprotosulfonsäure gemeinsam: die Unterschiede gegenüber der Oxyprotosulfonsäure sind nicht Unterschiede in der Oxydation (weder quantitativ, noch qualitativ), sondern durch die Wirkung der nascirenden Kalilauge bedingt.

Leider ist das Verständniss unserer Versuche dadurch erschwert, dass die Wirkungsweise des H_2O_2 auf organische Verbindungen zur Zeit nur wenig bekannt ist. Ein genaues Studium dieser Verhältnisse würde nicht nur für die Kenntniss des Oxyproteins, sondern auch des Eiweisses überhaupt sehr lehrreich sein: speciell die Bindungsweise des Schwefels im Eiweiss dürfte hierdurch dem Verständnisse wesentlich näher gerückt werden. Hier dürfte es gerade von Vortheil sein, dass wir es in dem H_2O_2 mit einem gelinden Oxydationsmittel zu thun haben, namentlich wenn dasselbe bei neutraler Reaction zur Anwendung gelangt.¹⁾

V. Die Peptonbildung durch Einwirkung von Wasserstoffsperoxyd.

Für die Beurtheilung des Oxyproteins ist es von Interesse, zu erfahren, ob die sowohl von Chandeton, als auch von Wurster beobachtete Peptonbildung eine reine Wirkung des

¹⁾ Wolfenstein citirt eine Angabe von Harden (Proceedings Chem. Soc. 15, 158), wonach selbst das so leicht oxydirbare Formaldehyd nur in alkalischer Lösung mit H_2O_2 reagirt.

Wasserstoffsperoxyds ist oder nicht. Selbst wenn bei Einwirkung von reinem H_2O_2 diese Peptonbildung beobachtet würde, so würde allerdings das Oxyprotein doch, nach dem vorher Mitgetheilten, als reines Oxydationsprodukt aufzufassen sein, wobei dann die Fällbarkeit durch Säure eine genaue Abtrennung von den albumose- und peptonartigen Substanzen gestattete. Wir setzten von vorne herein Zweifel darein, dass durch reines H_2O_2 Peptonisirung des Oxyproteins erfolge. Wir waren hierzu berechtigt, da Chandelon selbst angibt, dass er bei alkalischer Reaction gearbeitet habe, und Wurster bei seinen Versuchen 1—2% Milchsäure anwandte. Nach den Erfahrungen bei der Oxydation mit Kaliumpermanganat war es ausserdem wahrscheinlich, dass die Oxydation die peptonisirende Wirkung der Lauge (also auch wohl von Säuren) wesentlich unterstützte. Wir konnten unsere Vermuthung dann auch durch Versuche bestätigen.

Bei unseren Hauptdarstellungen des Oxyproteins verwandten wir kühliches, also schwach saures Wasserstoffsperoxyd. Hierbei bildeten sich jedesmal relativ reichliche Mengen von Pepton. Der zweite Hauptversuch wurde, soweit angängig, quantitativ durchgeführt. Wir erhielten aus 86 g krystallisirtem Eiereiweiss 3.2 g Pepton.

86 g Eiereiweiss wurden mit H_2O_2 und etwas Platinmohr bei Brüttemperatur behandelt, bis eine abfiltrirte Probe beim Sieden keine Coagulation mehr zeigte. Dann wurde abfiltrirt und kurz mit Wasser ausgewaschen. Das Filtrat gab eine ausserordentlich intensive rothviolette Biuretreaction. Mit Säure war in demselben keine Fällung hervorzurufen; bei Zusatz von viel concentrirter Ammonsulfatlösung trat eine geringfügige Fällung auf. Das mit dem Waschwasser vereinigte Filtrat wurde eingedampft. Es hinterblieb ein nach dem Trocknen leicht pulverisirbarer Rückstand, der 3.2 g verbrennbare Substanz enthielt. Der Rückstand war in Wasser ausserordentlich leicht löslich. Aus der wässrigen Lösung konnte durch Alkohol der peptonartige Körper gefällt werden. Die Lösung des Rückstandes, sowie auch der Alkoholfällung gab schöne Biuretreaction und Millon'sche Reaction.

Ein Versuch, in der Lösung des Rückstandes durch Fällung mit Ammonsulfat (nach dem Pick'schen Verfahren)¹⁾ Albumosen nachzu-

1) E. P. Pick. Ein neues Verfahren zur Trennung von Albumosen und Peptonen. Diese Zeitschrift Bd. XXIV. 1897.

weisen und zu charakterisiren. führte zu keinem greifbaren Ergebniss. Es entstanden nur geringe Trübungen, und bei hoher Concentration an Ammonsulfat ein minimaler Niederschlag, der jedoch so gering war, dass sich nicht einmal seine Eiweissnatur feststellen liess. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass vielleicht erst secundär durch das Einengen bei Siedetemperatur die Peptonisation so vollständig geworden ist. Reichlichere Mengen von Albumosen waren jedoch sicher auch von vorne herein nicht vorhanden, da schon das ursprüngliche Filtrat (wie erwähnt beim Sättigen mit Ammonsulfat nur geringfügige Fällung gezeigt hatte.

Wurde dagegen durch Destillation nach Wolfenstein¹⁾ gereinigtes Wasserstoffsuperoxyd (25 cem. wurden durch 0.3 cem. $\frac{1}{10}$ Normal-Alkali neutralisirt, s. auch Seite 93) verwandt, so bildete sich keine Spur von albumose- oder peptonartigen Substanzen. Bei Anwendung von Bruttemperatur und Platinmohr war die Ausfällung nach drei Wochen eine vollständige, so dass selbst das eingeengte Filtrat keine Biuretreaction mehr gab.

Nach 8-, sowie nach 14tägiger Oxydation hatte das Filtrat noch Biuretreaction gegeben. Das gelöste Eiweiss war jedoch durch Ammonsulfat vollständig fällbar, und ausserdem auch noch durch Alkohol coagulirbar, denn der Ammonsulfatniederschlag, mit heissem Alkohol behandelt, gab an Wasser kein Eiweiss ab (Biuretprobe).

Die bei Verwendung des schwach sauren käuflichen H_2O_2 beobachtete Peptonisation ist also als Nebenwirkung der Säure aufzufassen. Da 25 cem. unseres käuflichen H_2O_2 zur Neutralisation 2 cem. $\frac{1}{10}$ Normal-Alkali gebrauchten, so entspricht die angewandte Säure (wenn man die Verdünnung durch die wässrige Eiweisslösung nicht berücksichtigt) ca. $\frac{1}{100}$ Normalsäure. Nach den Untersuchungen von Goldschmidt²⁾ bewirkt $\frac{1}{16}$ Normal-Salzsäure in 48 Stunden bei 40° deutliche Bildung von primären und secundären Albumosen aus ungereinigtem Eiereiweiss: bis zur Bildung von Pepton schreitet die Einwirkung in 48 Stunden nicht fort.

Wenn wir bei Anwendung einer vielfach schwächeren Säure und im übrigen gleichen Versuchsbedingungen bei Gegenwart von H_2O_2 reichliche Peptonbildung beobachten konnten.

¹⁾ Wolfenstein, l. c.

²⁾ F. Goldschmidt, Ueber die Einwirkung von Säuren auf Eiweissstoffe. Inaug.-Dissert. Strassburg 1898. Tabelle I.

so geht daraus unzweifelhaft hervor, dass die Wirkung der Säure durch das Wasserstoffsperoxyd wesentlich unterstützt worden ist. Dies kann in zweierlei Weise geschehen sein. Einmal dadurch, dass das durch reine Oxydation gebildete Oxyprotein leichter hydrolytischer Spaltung unterliegt. Dafür spricht der Umstand, dass das Oxyprotein auch durch sehr verdünnte Lauge ($1/100$ normal) leicht angegriffen wird. Sodann könnte aber auch das H_2O_2 selbst die hydrolytische Spaltung unterstützt haben, indem das beim Zerfall in $H_2O + O$ nascirende Wasser in Reaction getreten wäre. Dass eine derartige Wirkungsweise des H_2O_2 möglich ist, geht aus den Untersuchungen von Bumke und Wolffenstein¹⁾ hervor, wonach das Wasserstoffsperoxyd auf Cellulose ausschliesslich hydrolysirend und nicht oxydirend wirkt, indem es den von ihnen Hydracellulose genannten Körper erzeugt. Möglicher Weise spielen beide Punkte eine Rolle. Der Umstand, dass Chandelon, der bei alkalischer Reaction arbeitete, so reichliche Peptonbildung beobachtete, ist wohl darauf zurückzuführen, dass bei alkalischer Reaction das Oxyprotein in Lösung blieb, also secundärer Spaltung leichter zugänglich war.

VI. Zusammenfassende Schlussbetrachtungen.

1. Durch Einwirkung von H_2O_2 auf Eiereiweiss entsteht ein neuer Körper (Oxyprotein), von dem allgemeinen Charakter der Oxyprotsulfonsäure, der nach seiner elementaren Zusammensetzung als Oxydationsprodukt aufzufassen ist.

2. Das Oxyprotein ist ein reines Oxydationsprodukt und stellt ein nicht durch Abspaltungen verändertes Eiweiss dar.

3. Die Oxyprotsulfonsäure steht auf derselben Oxydationsstufe wie das Oxyprotein. Die Unterschiede beruhen auf der abspaltenden Wirkung der Kalilauge. Dies geht hauptsächlich daraus hervor, dass der durch Alkali abspaltbare Schwefel des Eiweisses nicht oxydirt ist (wie Maly annahm), sondern nur so verringert ist, dass er erst durch feinere Methoden zum Nachweis gelangen kann.

¹⁾ G. Bumke u. R. Wolffenstein, Ueber Cellulose. Chem. Ber. Bd. XXXII. 2493--2507.

4. Die früher beobachtete Bildung von Pepton durch Einwirkung von Wasserstoffsperoxyd auf Eiweiss ist keine reine Wirkung des H_2O_2 , sondern beruht darauf, dass das H_2O_2 die hydrolysirende Wirkung von Säuren, bezw. Alkalien unterstützt und verstärkt.

5. Das nach dem Säureverfahren hergestellte krystallisirte Eiereiweiss unterscheidet sich in seiner elementaren Zusammensetzung von dem nach dem alten Hofmeister'schen Verfahren dargestellten, und zwar so, dass die Annahme einer Hydratbildung bei dem Säureverfahren naheliegt.

Unser gemeinschaftliches Arbeiten wurde durch den Weggang des Herrn Couvreur beendet. Auch aus diesem Grund habe ich mich schon jetzt zur Mittheilung unserer Untersuchungen entschlossen. Die Untersuchung wird fortgesetzt.

F. Schulz.

Jena, im November 1899.