

Ueber Proteinstoffe.

Von

J. Habermann und R. Ehrenfeld.

Aus dem Laboratorium für allgemeine und analytische Chemie der k. k. technische
Hochschule in Brunn.

(Der Redaction zugegangen am 17. Juli 1900.)

I.

Vor fast dreissig Jahren haben H. Hlasiwetz und J. Habermann zwei Abhandlungen über die Proteinstoffe erscheinen lassen, von welchen die erste die Ergebnisse der Untersuchung der Spaltung der Eiweissstoffe unter der Einwirkung von Brom und Wasser, die zweite die Zersetzung dieser Körper durch Salzsäure bei Gegenwart von Zinnchlorür zum Gegenstande haben. In Fortsetzung dieser Untersuchung waren, wie heute, wenn auch verspätet, gesagt werden muss, bei der Publication der zweiten der citirten Abhandlungen Versuche im Gange, bei welchen die Proteinstoffe der Einwirkung von Aetzbaryt in wässriger Lösung ausgesetzt wurden.

Diese Versuche waren schon ziemlich weit vorgeschritten, als 1875 die erste Arbeit von P. Schützenberger erschien, welche den gleichen Gegenstand betraf.

In Folge dieser Publication Schützenberger's wurden die damals von H. Hlasiwetz und J. Habermann ermittelten Thatsachen nicht veröffentlicht, obwohl gesagt werden kann, dass die von den Genannten damals experimentell festgestellten Thatsachen nicht unerheblich von denen verschieden waren, welche Schützenberger mitgetheilt hat.

Schützenberger hat seine diesbezüglichen Publicationen im Jahre 1879 abgeschlossen und sind dieselben, insbeson-

dere die von ihm an den experimentellen Theil geknüpften theoretischen Betrachtungen, von verschiedenen Forschern zum Gegenstande mehr oder weniger eingehender Erörterungen und Bemerkungen gemacht worden. Die theoretischen Anschauungen Schützenberger's haben, wenn auch nicht ganz unwidersprochen, vielfach Zustimmung gefunden, und mit Rücksicht darauf, sowie in Hinblick auf die grosse Bedeutung, welche seine Lehre für die Deutung der Constitution der Eiweissstoffe erlangt hat, und welche, wie uns scheinen will, mit dem experimentellen Werthe seiner Untersuchungen nicht ganz im Einklange steht, und welche weiter, wie erwähnt, mit den experimentellen Resultaten, zu denen der Eine von uns vor Jahren gelangt ist, nicht ganz übereinstimmen, schien es uns an der Zeit, den Gegenstand neuerdings aufzunehmen und die Arbeiten Schützenberger's vor Allem einer Ueberprüfung zu unterziehen.

Bevor wir nun die Resultate unserer diesbezüglichen Untersuchungen mittheilen, wird es zweckmässig sein, aus den Arbeiten Schützenberger's das Wesentlichste in Erinnerung zu bringen.

Die Einwirkung des Barythydrates auf Eiweissstoffe wurde zuerst von Theile¹⁾ im Jahre 1867 und sodann von Nasse²⁾ im Jahre 1872 studirt. Die Arbeiten Schützenberger's sind indessen die ersten, welche den Gegenstand, wenigstens dem Anscheine nach, mit einer Gründlichkeit erschöpfen, die weitere Arbeiten in gleicher Richtung für die Folge überflüssig erscheinen liess. Die eben citirten deutschen Autoren, die zuerst den Weg betraten, auf welchem ihnen der französische Forscher späterhin folgen sollte, hatten sich vorerst nur zum Ziele gesetzt, die bei der Einwirkung von Alkalien auf Proteinstoffe entstehenden Mengen von Ammoniak und Kohlensäure einem genauen, quantitativen Studium zu unterziehen. Beiden, und namentlich Nasse, war die Idee vorgeschwebt, auf diesem

1) Chemisches Centralblatt 1867, S. 385.

2) Pflüger's Archiv f. Physiologie, Bd. 6, 7, 8.

Wege einen tieferen Einblick in die Lagerung gewisser Atome des Eiweissmoleküles zu gewinnen. Und nun hat sich bezeichnender Weise weder Theile noch Nasse zu so weitgehenden Folgerungen bestimmt gefunden, um aus den gewonnenen Analysenzahlen ein so ziemlich complettes Bild über den Aufbau des Eiweissmoleküles zu construiren, wie es Schützenberger gethan hatte. Er allein unternahm es, aus den Resultaten seiner Analysen eine Theorie aufzubauen, welche bis auf den heutigen Tag ihren gewichtigen Platz unter den Constitutionsthesen beibehalten hat und in allen grösseren Lehrbüchern der physiologischen Chemie an erster Stelle figurirt. Diese Theorie ist bekannt. Auf dem Mengenverhältnisse der Oxalsäure, der Kohlensäure und des Ammoniaks aufgebaut, die sich alle bei der Einwirkung von Barythydrat auf die Proteinstoffe entwickeln, gewährt sie einem wenig kritischen Auge einen anscheinend frappanten Einblick in die Constitutionsverhältnisse des Eiweisskerns. Sie besagt in Kurzem, dass sich die drei genannten Körper in einem Mengenverhältnisse entwickeln, das die Zerlegung der Harnstoffgruppe einerseits und der Oxamidgruppe andererseits zur Voraussetzung hat. Beide Gruppen müssen also nach seiner Anschauung im Eiweissmolekül präformirt sein.

Gehen wir nun auf die Entstehungsgeschichte dieser Theorie des Näheren ein. Verfolgen wir sie Schritt für Schritt in der chronologischen Aufeinanderfolge der einzelnen Publicationen, wobei wir uns stets vor Augen halten, dass die Oxalsäure, die Kohlensäure und das Ammoniak in ihrem relativen Mengenverhältnisse gewissermassen die drei Grundpfeiler sind, auf welchen sich das Schützenberger'sche Lehrgebäude aufbaut.

Die erste Publication erfolgte im Band XXIII der Bulletins de la Société chimique de Paris. Auf Seite 193 lesen wir daselbst: M. Schützenberger communique à la Société la suite de ses recherches sur l'albumine. (Die ersten Arbeiten beziehen sich auf die Einwirkung von verdünnter Schwefelsäure auf Albumin.) D'après les résultats obtenus l'albumine se dédouble par l'hydrate de baryte en ammoniacque, carbonate

de baryte, acides amidés de la série $C^nH^{2n+1}AzO^2$

Der Oxalsäure wird also in dieser Notiz noch keine Erwähnung gethan. Wohl aber im Folgenden. Auf Seite 216 und ff. berichtet Schützenberger über eine Zersetzung von 100 g coagulirtem Albumin mit 200 g Barythydrat durch Kochen am Rückflusskühler, wobei er einen unlöslichen Rückstand erhält, den er folgendermassen beschreibt: «Il était formé principalement de carbonate de baryte, mélangé à un peu d'oxalate, de sulfite de baryte, à des phosphates alcalino-terreux et à de la silice provenant de l'attaque du verre pendant cette longue ébullition.» Dieser «Précipité insoluble» wird auch für unsere weiteren Darlegungen von grösster Wichtigkeit sein. Es sei daher ausdrücklich darauf hingewiesen, dass die Oxalsäure nun zum ersten Male auf den Plan tritt, wenn auch nur in sparsamer Menge.

Sehen wir nun zu, wie Schützenberger diesen unlöslichen Rückstand anfasst. Er berichtet im Folgenden: «Pour apprécier la dose de carbonate barytique qu'il renfermait, on a dissous le précipité dans l'acide chlorhydrique étendu, filtré, précipité la solution par le carbonate d'ammoniaque. Le carbonate de baryte ainsi obtenu représentait sensiblement ce qui se trouvait primitivement dans le dépôt.»

Zur Beurtheilung dieser Methode, den unlöslichen Rückstand zu prüfen, sei am passendsten erwähnt, dass Schützenberger selbst in seinen späteren Angaben über dasselbe Thema den Weg der indirecten Bestimmung der Kohlensäure besser durch den ihrer direkten Wägung ersetzt. Es sei davon noch später des Eingehenden die Rede sein. Nur soviel sei vorweg genommen: Wer den unlöslichen, schmierigen Rückstand, welcher bei der Aufschliessung der Eiweissstoffe, namentlich des Caseins und des Albumins durch Barythydrat resultirt, einer nur ganz flüchtigen Prüfung, ja selbst nur dem blossen Augenscheine unterzogen hat, kann sich unmöglich über die Fehlerhaftigkeit der von Schützenberger angewandten Untersuchungsmethode im Unklaren sein. Denn was er als $BaCO_3$ niederschlug, war sicher ein Gemenge von kohlensaurem Baryt mit den verschiedensten Barytseifen und

anderen organischen Baryumverbindungen. Von noch grösserer Wichtigkeit scheint uns aber der Umstand, dass Schützenberger sich mit der Erwähnung begnügt, die Oxalsäure sei in kleinen Mengen dem unlöslichen Rückstande beigemengt, und bei der quantitativen Analyse des Rückstandes sie ruhig ihrem Schicksale überlässt. Was folgt daraus? Zieht man in Betracht, dass von einer eingehenden, qualitativen Prüfung des unlöslichen Rückstandes an keiner Stelle der sämtlichen Schützenberger'schen Abhandlungen die Rede ist, so kann man sich des Gedankens nicht erwehren, dass er sich kaum die Mühe genommen haben dürfte, seine Oxalsäure im freien Zustand oder in Form ihres Calciumsalzes abzuscheiden und weiter zu prüfen. Er wäre dann wahrscheinlich zu anderen Ergebnissen gelangt. Im positiven Theil dieser Abhandlung mag dann weiterhin noch die Rede davon sein.

Verfolgen wir den von Schützenberger eingeschlagenen Weg nun weiter. Si l'on suppose, so berichtet Schützenberger weiter, que l'ammoniaque et l'acide carbonique proviennent du dédoublement du groupement de l'urée contenu dans l'albumine on aurait dû trouver pour 1,7 g d'ammoniaque 0,85 de carbonate de baryte. Damit ist nun die späterhin zu entwickelnde Theorie in ihren Grundzügen angedeutet. Interessant ist jedenfalls der Umstand, dass für Schützenberger's Arbeiten a priori die Idee der Anwesenheit der Harnstoffgruppe im Eiweissmolekül Richtung gebend ist.

Schützenberger berichtet nun weiter über eine Reihe von Anschliessungen des Albumins mittelst Barythydrats im geschlossenen Cylinder, von denen eine jede durch mehrere Tage, selbst durch eine Woche bei einer Temperatur von 150° fortgesetzt worden war. Er findet die Oxalsäure wiederum nur in Spuren dem unlöslichen Rückstande beigemengt, während dieser fast ausschliesslich aus Baryumcarbonat zusammengesetzt ist. Ammoniak und kohlensaurer Baryt müssen nun in dem Verhältnisse stehen, wie es die Zersetzung der Harnstoffgruppe erfordert. Die Menge des Baryumcarbonats weicht aber thatsächlich um 3—4% von derjenigen Menge ab, die nach dem Maassstabe der Zersetzung der Harnstoffgruppe be-

rechnet wurde. Kein Wunder. Denn Schützenberger, so scheint es wenigstens, hat bei dieser Versuchsreihe den unlöslichen Rückstand abfiltrirt, ihn mit kohlensäurefreiem Wasser gewaschen und gewogen. Nähere Angaben macht er darüber nicht le dépôt, récueilli avec soin, a été bien lavé à l'eau bouillante privée d'acide carbonique. Und weiter: Les résultats sont les suivants: Résidu insoluble resté sur le filtre (presque entièrement formé de carbonate de baryte, avec traces de sulfite et d'oxalate) 20 g.

Wie erklärt nun Schützenberger dieses auffällige Manko an Baryumcarbonat resp. den Ueberschuss an Ammoniak? Er sagt: «On voit que dans ces diverses expériences le poids de l'ammoniaque dégagée est toujours un peu plus fort par rapport à celui du carbonate de baryte précipité, que celui exigé par le dédoublement de l'urée.»

Ce fait s'explique en supposant, ce qui paraît probable d'après ce qui suit, que l'albumine renferme, en petite quantité, des groupements susceptibles de dégager de l'ammoniaque, sans fournir de l'acide carbonique (Groupement de la taurine, groupement d'une amide cellulosique).»

Néanmoins», so fährt er fort, «les nombres trouvés sont assez rapprochés pour justifier l'hypothèse que l'albumine contient les éléments de l'urée sous forme d'uréide complexe.»

Das Hemialbumin, das Schützenberger nun zur Aufschliessung heranzieht, scheint geeigneter zu sein, um ein günstigeres Resultat zu erzielen. CO_2 und NH_3 stehen im Verhältniss von 1,29, während das nach der Zusammensetzung des Harnstoffs berechnete Verhältniss 1,28 beträgt.

Wir lesen nun auf Seite 252 folgendes Resumé: Des nombreux résultats consignés dans ce mémoire nous croyons pouvoir dégager avec certitude les conclusions suivantes: L'albumine est une uréide complexe: elle contient les éléments de la taurine et de l'oxamide (en petites proportions): abstraction faite de ces parties constitutives, le reste de la molécule se dédouble par hydratation complète en tyrosine, acides amidés de la série $\text{C}_n\text{H}^{2n+1}\text{AzO}_2$: depuis $n = 7$ jusqu'à $n = 4$ et un ou deux acides amidés plus oxygénés dont le

plus important se rapproche de l'acide aspartique par sa composition. La molécule de l'albumine contient en outre une petite proportion d'une amide cellulosique. Ces divers produits représentent à très peu de chose près seuls, les dérivés formés par hydratation au dépens de l'albumine.

Wir verlassen nun den Band XXIII der Bulletins, nachdem wir von einer Notiz auf Seite 385 Kenntniss genommen haben, die für die Folge von Wichtigkeit ist und auch ihr scharfes Licht auf die eben besprochene Arbeit wirft. Sie lautet in ihrem für unsere Zwecke massgebenden Theile folgenderweise: «Il (Schützenberger) a aussi reconnu que certaines albumines fournissent beaucoup plus d'oxalate de baryum que d'autres, lorsqu'on les hydrate par la baryte. Cependant le rapport entre l'ammoniaque dégagée et la baryte précipitée sous forme d'oxalate et de carbonate, ne varie pas sensiblement dans ce cas: il en résulte que le groupement de l'oxamide peut remplacer plus ou moins le groupement de l'urée.»

Hierdurch ist die erste, grosse Arbeit Schützenberger's genügend gekennzeichnet, und es scheint uns nun nothwendig, an die Kennzeichnung der zweiten heranzutreten, die im Band XXIV der Bulletins de la Société chimique de Paris enthalten ist. Auf Seite 4 dieses Bandes berichtet Schützenberger nun nochmals, dass gewisse Albuminsorten, «certaines échantillons d'albumine», bei der Aufschliessung einen unlöslichen Rückstand liefern, welcher, anstatt fast ausschliesslich aus Baryumcarbonat, vermengt mit Spuren von Oxalat und Sulfit, zusammengesetzt zu sein, sich aus fast gleichen Theilen Baryumcarbonat und Oxalat zusammengesetzt fand, ein Umstand, der wohl der allgemeinen Fassung, welche Schützenberger den Ergebnissen seiner Arbeit verleiht, einigermassen zuwiderläuft.

Nachdem nun einmal die Oxalsäure sich über das Niveau der «quantité négligeable» erhoben hat und zum integrierenden Bestandtheil der «données fondamentales», wie der französische Forscher die Ergebnisse seiner Arbeit betitelt, geworden ist, legt er sich die Verhältnisse nun so zurecht, dass er die

Ammoniakmenge, welche dem BaCO_3 , sowie diejenige, welche dem $\text{C}_2\text{O}_4\text{Ba}$ theoretisch entspricht, berechnet, beide Mengen addirt und nun die Summe mit der thatsächlich gefundenen Ammoniakmenge in Vergleich setzt. Eine ganze Reihe von Eiweissstoffen, welche der Behandlung mit Aetzbaryt unterworfen worden waren, lieferten so für das Ammoniak Zahlen, welche von der theoretisch berechneten Menge um 0,2—0,5% im Durchschnitt abweichen.

Den beiden Arbeiten, die nun nach einer speciellen Richtung hin des Eingehenden beleuchtet worden sind, folgte im Jahre 1879 eine weitere, auf viel breiterer Basis aufgebaute Arbeit. Sie findet sich in den *Annales de Chimie et de Physique* XVI, V. Série. Im Wesentlichen bietet sie für unsere Zwecke nichts mehr Neues. Schützenberger hat das Versprechen, das er am Ende seiner zweiten Arbeit gibt: die Analysen auf der Grundlage der grössten Genauigkeit zu wiederholen, um scharfe und bestimmte Zahlen angeben zu können, einzulösen versucht. Die Resultate einer stattlichen Zahl von Aufschliessungen, die unter wechselnden Bedingungen, was Zeit, Temperatur und Menge des aufschliessenden Agens, durchgeführt worden waren, werden nun der Discussion unterzogen. Dabei stösst Schützenberger wiederum auf einen Punkt, der ihm bereits in der ersten Arbeit (Band XXIII der *Bulletins*) aufgefallen ist. Es ist die Menge Ammoniak, deren Entwicklung mit der Entbindung von Kohlen- und Oxalsäure durchaus nicht Schritt hält, vielmehr die letzteren bei Weitem überflügelt. Welche Bedeutung gab Schützenberger dieser auffallenden Thatsache im Band XXIII der *Bulletins*? Wie erinnerlich, sagte er dort: *que l'albumine renferme, en petite quantité des groupements susceptibles de dégager de l'ammoniacque (groupement de la taurine, groupement d'une amide cellulosique)*. Diesen Standpunkt hat er in den *Annales* verfasst und mit einem Sprung den folgenden gewonnen: *On explique tous ces résultats en admettant que la molécule d'albumine renferme un groupement oxamide et un autre carbamide. L'oxamide se scinderait d'abord, en perdant la moitié de son azote et en laissant un groupement oxamique, puis la*

carbamide se décomposerait en acide carbonique et ammoniaque, en même temps qu'une petite fraction du groupement oxamique. La température étant plus élevée, celui-ci se transformerait, à son tour, en ammoniaque et acide oxalique dont une partie se séparerait de suite et dont une autre resterait unie ou copulée aux composés du résidu fixe. Ce n'est que sous l'influence d'une action plus énergique que la majeure partie et le reste de l'acide oxalique apparaissent en liberté. Uns will scheinen, dass diese Sätze keine genügend einwandfreie Erklärung der experimentell festgestellten Thatsachen bilden und kaum ausreichen, um die Theorie Schützenberger's über die Constitution der Eiweissstoffe mit einiger Sicherheit zu stützen. Dass diese unsere Anschauung keine unbegründete ist, dafür mag als Beweis das Urtheil Drechsel's herangezogen werden, der sich darüber im Ladenburg'schen Handwörterbuch der Chemie III, S. 544, folgendermassen äussert: Die Menge des Ammoniaks beträgt Anfangs mehr als zwei Moleküle auf je ein Molekül Kohlensäure und Oxalsäure, in der III. Gleichung etwas weniger, ein Verhältniss, wie wir es auch bei der Zersetzung des Harnstoffs und des Oxamids kennen: doch darf hieraus noch nicht geschlossen werden, dass das Eiweiss ein complexes Ureid oder Oxamid sei, da alle Bemühungen, diese letzteren daraus zu erhalten, bisher gescheitert sind, da ferner die Abspaltung des Ammoniaks der Bildung von Kohlensäure und Oxalsäure durchaus nicht parallel geht, und endlich im fixen Rückstand Verbindungen vorkommen, welche bei der Zersetzung mit Kalihydrat Oxalsäure liefern, aber wahrscheinlich nicht dem Oxamid, sondern der Hippursäure analog constituirt sind.

Bevor wir nun die Besprechung der Schützenberger'schen Publicationen schliessen, seien noch einige Worte der direkten Bestimmung der Kohlensäure gewidmet, wie sie Schützenberger in den Annales angibt. Er sagt: «Dans le dépôt de sels barytiques insolubles, on a dosé l'acide carbonique par le procédé ordinaire, c'est-à-dire en décomposant un poids connu du dépôt par l'acide chlorhydrique dans l'appareil usité, et en pesant la perte due au dégagement d'acide carbonique.»

Zieht man nun in Erwägung, dass der unlösliche Rückstand Sulfite, fettsaure Salze und regelmässig auch Sulfide enthält, so wird man leicht zugeben, dass diese Methode, die Kohlensäure zu bestimmen, im vorliegenden Falle keine verlässlichen Resultate liefern kann.

Die vorstehende Uebersicht über den Entwicklungsgang, den die Schützenberger'sche Theorie genommen hat, wird genügen, um die widerspruchsvollen Züge aufzudecken, an denen das Bild krankt, das uns der französische Forscher von dem Bau des Eiweissmoleküls gezeichnet hat. Nicht die Thatsache allein, dass es bisher nicht gelungen sei, den Harnstoff unmittelbar aus den Eiweisskörpern abzuspalten, bringt die Theorie Schützenberger's ins Schwanken, es ist vielmehr die zum Theil experimentelle Unvollkommenheit seiner Arbeiten, die den Gedanken wachruft, dass seine Theorie zum Theile gewaltsam in die Analysenresultate hineininterpretirt ist. Und der Vorwurf der experimentellen Unvollkommenheit trifft, wie wir glauben, vor Allem die Anwendung des Baryhydrates als Aufschliessungsmittel, welches die genaue, quantitative Bestimmung der Kohlensäure, des Ammoniaks und der Oxalsäure sehr erschwert, wenn nicht unmöglich macht, was aus dem folgenden, positiven Theile dieser unserer Darlegungen hervorgehen dürfte.

Zweck und Ziel unserer positiven Arbeit schien uns klar vorgezeichnet. Es galt, die Schützenberger'schen Versuche im kleinen Massstabe so durchzuführen, dass thunlichst einwandfreie und exacte Resultate in den gewonnenen Zahlen zum Ausdruck gelangen sollten. Die Körper, welche der Aufschliessung mittelst Aetzbaryt unterworfen wurden, waren Eieralbumin und Casein. Nachdem Vorversuche, die Aufschliessung im Schiessrohre vorzunehmen, mit negativem Resultate geendigt hatten, da einerseits die Röhren zu häufig sprangen und andererseits die Aufschliessung nur sehr unvollkommen vor sich ging, wurde die Operation in einem Digestor aus Phosphorbronze mit verzinnten Innenwandungen vorgenommen, der genau nach den Angaben, die Schützenberger von seinem Aufschliessungscylinder in den *Annales*

macht, angefertigt war, und einem Rauminhalt von 100 ccm. entsprach. In diesem völlig gasdicht geschlossenen Bronzedigestor wurde das aufzuschliessende Material, nachdem es im Vacuumtrockenapparate in thunlichst zerkleinertem Zustande bis zur Gewichtsconstanz getrocknet worden war, mittelst Barythydratlösung durch 12 Stunden bei 100° erhitzt. Der Aetzbaryt wurde jedesmal in der doppelten Menge des aufzuschliessenden Materials im kochenden Wasser gelöst und die Lösung in den Digestor heiss hineinfltrirt. Zunächst sollte die entwickelte Ammoniak- und Kohlensäuremenge einer näheren Untersuchung unterzogen werden. Der Bronzedigestor wurde nach beendigter Operation mittelst einer Kältemischung von Schnee und Kochsalz auf eine Temperatur gebracht, bei welcher ein Entweichen von Ammoniak, wie es beim Oeffnen des Gefässes zu befürchten stand, möglichst ausgeschlossen erschien. Der Inhalt des Digestors wurde nun rasch in einen Erlenmeyer-Kolben mit aufgesetztem Trichter geleert und am Liebig'schen Kühler die Destillation des Ammoniaks sofort vorgenommen. Als Absorptionsflüssigkeit diente eine halb normale Schwefelsäure, als Indicator bei der folgenden Titration Methylorange. Zu erwähnen wäre, dass die titrirte Schwefelsäure mit der fortschreitenden Destillation einen intensiven Geruch annahm, der etwa an den des angebrannten Leims erinnerte, dabei aber stets klar blieb.

Die Destillation war jedesmal so weit getrieben worden, dass das Flüssigkeitsvolumen im Kochkolben sich etwa um zwei Dritttheile vermindert hatte. Nun wurde das Absorptionsgefäss entfernt und der Kühler luftdicht mit einem Natronkalkrohr in Verbindung gesetzt, so dass der Flüssigkeitsrest im Erlenmeyer-Kolben unter völligem Abschluss der atmosphärischen Kohlensäure erkalten konnte. Die Bestimmung der Kohlensäure wurde nun auf direkte Weise vorgenommen, so dass sie im Liebig'schen Kaliapparate aufgefangen wurde. Der gesammte Apparat hierzu bestand neben dem üblichen, aufsteigenden Kühler aus einer Waschflasche mit concentrirter Schwefelsäure gefüllt, hierauf folgte eine Waschflasche mit Kaliumpermanganatlösung, dann nochmals eine Waschflasche

mit concentrirter Schwefelsäure und ein U-Rohr mit Kupfer-
vitriolbimsstein, an welches sich der Kaliapparat anschloss.
Den Schluss bildete, wie gewöhnlich, ein Natronkalkrohr. Zu
diesen besonderen Vorsichtsmassregeln bewog uns einerseits
die Befürchtung, dass flüchtige organische Produkte, sowie
Schwefelwasserstoff und schweflige Säure in den Kaliapparat
gelangen könnten, andererseits musste ja neben Baryum, statt
der üblichen Schwefelsäure, Salzsäure als Kohlensäure ent-
bindendes Agens angewendet werden, daher das Kupfervitriol-
bimssteinrohr nicht entbehrlich war. Thatsächlich überzeugte
uns auch der Augenschein, dass unsere Befürchtungen wohl
begründet waren. Die erste Waschflasche, welche concentrirte
Schwefelsäure enthielt, war nach durchgeführter Operation
vollständig mit Schwefel erfüllt, der von der Zersetzung des
entbundenen Schwefelwasserstoffes herrührte, und wies einen
Geruch auf, der an schwere Kohlenwasserstoffe erinnerte.
Die zweite Waschflasche (Kaliumpermanganatlösung) hatte
einen reichlichen Niederschlag von Mangandioxyd aufzuweisen,
die concentrirte Schwefelsäure der dritten Waschflasche jedoch
war in allen Versuchsfällen klar geblieben. Der Nachtheil,
den dieses Waschflaschensystem der Genauigkeit der Be-
stimmung dadurch zufügen konnte, dass die Kohlensäure in
dem so gebildeten schädlichen Raume in empfindlichem Maasse
vielleicht zurückgehalten wurde, war durch eine gründliche
Lüftung mittelst eines Gasometers wett zu machen gesucht
worden.

Die folgende Tabelle bringt eine Zusammenstellung der
Resultate.

| | Angewandte Substanzmenge | NH ₃ | CO ₂ | |
|----|-----------------------------|-----------------|-----------------|---------|
| 1. | 7,1902 g | 2,75% | 1,30% |) Gasen |
| 2. | 13,7408 g | 2,88% | 0,88% | |
| 3. | 7,4581 g | 3,10% | 1,59% | |
| 4. | 9,2846 g | 3,01% | 0,97% | |

| | Angewandte Substanzmenge | NH ₃ | CO ₂ | |
|----|-----------------------------|-----------------|-----------------|-------------|
| 1. | 7.1902 g | 3.33° | 1.74° | Eieralbumin |
| 2. | 6.9774 g | 2.72° | 1.51° | |
| 3. | 2.4116 g | 3.26° | — | |
| 4. | 6.0088 g | 2.84° | — | |
| 5. | 6.0544 g | 2.86° | 1.38° | |

In dieser Tabelle — es lehrt dies wohl der erste Blick — ist das Beweismaterial aufgestapelt für die Behauptung, dass die Einwirkung des Barythydrats auf das Eiweiss keine gleichmässige ist, wenigstens unter den Versuchsbedingungen, wie sie, analog denen Schützenbergers, in unserem Falle gegeben waren. Die ganz bedeutenden Differenzen in den Resultaten, namentlich in denen der Kohlensäure, können nur auf diesem Wege und keinem anderen ihre Erklärung finden. Schon Nasse macht eine kurze Andeutung über diesen unregelmässigen Reactionsverlauf. Auf Seite 593 des Pflüger'schen Archivs, Bd. VI, sagt er hierüber: «Weiter können zu geringe Werthe von Q (bekanntlich des in Form von Ammoniak ausgeschiedenen Stickstoffs zum Gesamtstickstoff des untersuchten Eiweisskörpers) entstehen dadurch, dass kleine Partien der Eiweissstoffe an den von der Flüssigkeit nicht benetzten Wänden der Retorte hängen bleiben, oder auch wohl kleine Klümpchen sich mit einer undurchdringlichen Hülle von kohlen-saurem Baryt überziehen, und so die inneren Theile der Einwirkung des Barythydrats entzogen werden. Dieser Befürchtung möchten wir vielleicht nicht unbegründeter Weise noch hinzufügen, dass unter gewissen Umständen theilweise eine unlösliche Baryumeiweissverbindung entsteht, denn der unlösliche Rückstand hatte in jedem Falle eine schmierige Beschaffenheit, selbst nach dem sorgfältigsten Auswaschen bis zum Verschwinden der Baryumreaction, oft war er von Klumpen durchsetzt, und in einem Falle bildete der gesammte Rückstand einer Caseinaufschliessung sogar ein kompaktes, seifenartiges Stück. Zwei genau übereinstimmende Resultate zu erzielen,

war also trotz der sorgfältigsten Arbeit völlig unmöglich. Und dass die Fehlerquellen bei Mengen von 100 g lufttrockenem Eiweiss, wie sie Schützenberger anzuwenden pflegt, um so grösser sein müssen, liegt auf der Hand.

Es erübrigt nun noch, die Bestimmung der Oxalsäure des Näheren zu beschreiben. Sie in der Flüssigkeit zu fällen, welche nach der Bestimmung der Kohlensäure zurückgeblieben war, ging nicht mehr gut an, denn diese Flüssigkeit, ursprünglich gelb gefärbt, hatte sich unter dem Einflusse der Salzsäure in der Wärme zusehends dunkel, fast schwarz gefärbt; entweder war eine Humificirung durch den oxydirenden Einfluss der Luft bei Gegenwart von Salzsäure eingetreten, oder es hatte der frei gewordene Schwefelwasserstoff das Zinn, welches von der Innenwandung des Digestors stammen konnte, in Form von Zinnsulfür niedergeschlagen. Es wurden daher separate Aufschliessungen vorgenommen, um die Oxalsäure zu bestimmen. Anfänglich geschah dies in der Weise, dass der unlösliche Rückstand abfiltrirt, gewaschen und mit einer Sodalösung ausgekocht wurde, nachdem er quantitativ vom Filter heruntergespritzt worden war. Nun wurde filtrirt und das Filtrat mit Essigsäure im Ueberschuss versetzt und die Oxalsäure mit Chlorcalciumlösung in der Hitze gefällt; der erhaltene Niederschlag wurde nun nochmals mit Sodalösung gekocht und die ganze Procedur der Oxalsäurefällung wiederholt. Der Niederschlag wurde bis zur Gewichtskonstanz geglüht und als CaO gewogen. Thatsächlich wurde auf diese Weise je eine Bestimmung im Albumin und im Casein durchgeführt. Die Resultate waren folgende:

Angewandte Substanzmenge Albumin: 3.446 g.

CaO = 0.017 g = 0.02732 g $C_2H_2O_4$ = 0,79% $C_2H_2O_4$.

Angewandte Substanzmenge Casein: 9.991 g.

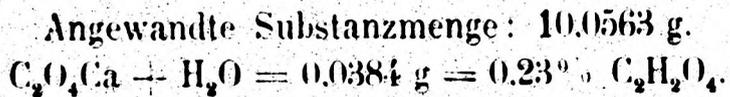
CaO = 0.0232 g = 0.03728 g $C_2H_2O_4$ = 0,37% $C_2H_2O_4$.

Diese Resultate sind erheblich kleiner als die Schützenberger'schen. So findet er beispielsweise im Albumin unter den gleichen Verhältnissen: 3,4 g BaC_2O_4 per 100 g, entsprechend einer Menge von 1,36% $C_2H_2O_4$. Dass wir aber auf die von uns gewonnenen Zahlen keinen allzu grossen

Werth legen können, wird durch den Umstand gerechtfertigt erscheinen, dass das Aussehen des Niederschlages und die Schwierigkeit seiner Isolirung von beigemengten, dunkel gefärbten, organischen Substanzen, sowie das Schäumen der nie ganz klar zu bekommenden Flüssigkeit, in welcher die Oxalsäure zur Fällung gebracht werden musste, dass alle diese Umstände in uns den Wunsch rege machten, einmal die Oxalsäure thatsächlich zu Gesicht zu bekommen. Und dieser Wunsch brachte uns in der Folge auf ein sehr merkwürdiges Resultat. Wir fanden nämlich, dass der Niederschlag, der als oxalsaurer Kalk angesprochen worden war, bei einer qualitativen Prüfung nur sehr geringe Mengen, ja fast nur Spuren von Oxalsäure enthält.

Diese qualitative Prüfung wurde folgendermassen vorgenommen: Der unlösliche Rückstand von der Aufschliessung wurde in verdünnter Salzsäure gelöst, abfiltrirt und das Filtrat mit Petroläther, der aus dem käuflichen, durch fractionirte Destillation unter 60° gewonnen worden war, gut ausgeschüttelt, um etwa vorhandene Fettsäuren in Lösung zu bringen. (Da keinerlei Litteraturangaben über die Löslichkeitsverhältnisse der Oxalsäure in Petroläther aufzufinden waren, wurde in einem aliquoten Antheile einer circa normalen Oxalsäurelösung der Gehalt an $C_2H_2O_4$ durch Titration mittelst einer gestellten n-Kalilauge festgestellt und hierauf ein zweiter aliquoter Antheil mit Petroläther von der gleichen Qualität durch längere Zeit und wiederholt ausgeschüttelt. Der Oxalsäuregehalt hatte sich dadurch — wie die nun folgende Titration zeigte — um nichts verändert. Die Oxalsäure ist daher im Petroläther als unlöslich zu betrachten, was auch durch weitere, analog geführte Versuche bestätigt wurde). Das mit Petroläther gründlich ausgeschüttelte Filtrat wurde nun mit Ammoniak neutralisirt, Essigsäure im Ueberschuss hinzugesetzt und die vermeintliche Oxalsäure durch Chlorcalciumlösung gefällt, der Niederschlag nochmals in Salzsäure gelöst und wiederum gefällt. Der nun resultirende Niederschlag wurde auf einem tarirten Filter gesammelt, bis zum Verschwinden der Salzsäurereaction gewaschen und bei 100° bis zur Gewichtscönanstanz getrocknet.

Wir erhielten so in einem Falle im Casein folgendes Resultat:



Dieser als oxalsaure Kalk gewogene Niederschlag wurde nunmehr in Salzsäure gelöst und durch Schütteln mit reichlichen Mengen von Aether, der sorgfältig gereinigt war, die Oxalsäure zu extrahieren versucht. Hierbei wurden, wie bereits erwähnt, stets nur sehr geringe Mengen, ja fast nur Spuren von Oxalsäure in Substanz abgeschieden. Selbst der unlösliche Aufschliessungsrückstand von je 100 g Casein und Albumin lieferte nach dem gleichen Verfahren nur Spuren von Oxalsäure.

Um punkto Löslichkeit der Oxalsäure in Aether völlige Klarheit zu schaffen, wurden analoge Versuche durchgeführt, wie sie früher betreffs der Unlöslichkeit der Oxalsäure in Petroläther unternommen worden waren. Hierbei zeigte sich, dass beim Wiederholen des Ausschüttelns mit Aether die Mengen der Oxalsäure in der wässerigen Lösung rasch um Vieles geringer wurden, ohne dass es jedoch gelang, die Oxalsäure der wässerigen Lösung durch Aether vollständig zu entziehen. Kann demnach gegen diese Methode, auf Oxalsäure zu prüfen, auch eingewendet werden, dass die Oxalsäure nur schwer und nur zum Theil in den Aether übergeht, so beweist sie doch mit hinlänglicher Sicherheit, dass es sich in jedem Falle doch nur um geringe Mengen von Oxalsäure handeln kann und diese Mengen ganz erheblich hinter jenen zurückbleiben, welche Schützenberger angibt.

II.

Im ersten Theile dieser Abhandlung hatten wir an der Zahlentabelle, welche uns die quantitativen Aufschliessungen der Eiweissstoffe mittels Barythydrats geliefert hatten, die Thatsache illustriert, dass im Einklange mit den Beobachtungen, die schon Nasse gemacht hatte, der Aetzbaryt ein für quantitative Untersuchungen der Eiweissstoffe nicht geeignetes Zersetzungsmaterial sei. Selbst die bekannte Annahme, dass der Aetzbaryt beim Abdestilliren der Zersetzungsflüssig-

keit, behufs Gewinnung des gebildeten Ammoniaks, einen weiteren Zerfall von Amidokörpern bewirke. könnte kaum ausreichen, um die bedeutenden Differenzen in den Ammoniakresultaten zu erklären, abgesehen von den überaus auffälligen Abweichungen in den Resultaten der Kohlensäurebestimmungen. Resultate von befriedigender Uebereinstimmung waren demnach mit seiner Hülfe nicht zu erzielen. Und so wurde dem das Kalihydrat zur Aufschliessung herangezogen, um die Grundlagen der Schützenberger'schen Theorie, d. i. die Menge an Ammoniak, Kohlen- und Oxalsäure, wie sie sich bei der alkalischen Spaltung der Eiweissstoffe entwickeln, einem näheren Studium unterwerfen zu können.

Die Anordnung der zu diesem Zwecke durchgeführten Versuche war in der Weise getroffen worden, dass zur Bestimmung eines jeden dieser drei Körper eine separate Aufschliessung vorgenommen wurde. Ca. 3 g Casein¹⁾ wurden mit 300 ccm. einer 10%igen Kalilauge in einem Erlenmeyer-Kolben durch zwölf Stunden am Rückflusskühler mit Hülfe eines Wasserbades erhitzt, und das Ammoniak sodann am umgelegten Kühler abdestillirt. Zur Vermeidung eines jeden Verlustes an Ammoniak trug der Rückflusskühler einen Schrötterschen Exsiccatorenaufsatz, der 5 ccm. einer genau titrirten, halbnormalen Schwefelsäure enthielt. Das Abdestilliren des Ammoniaks wurde in jedem Falle so weit getrieben, dass der Boden des Kolbens nur von einer dünnen Flüssigkeitsschicht noch bedeckt war, und ein weiteres Erhitzen die Integrität des Kolbens jedenfalls gefährdet hätte. Als Absorptionsflüssigkeit diente wie in den früheren Fällen eine halb normale Schwefelsäure, als Indicator Methylorange. Nicht unerwähnt soll bleiben, dass die $\frac{n}{2}$ Schwefelsäure, wie bei den Operationen mit Barythydrat, einen intensiven, unangenehmen Geruch erlangte sowie, die Absorption des Ammoniaks

¹⁾ Da es sich in diesem Falle nur um Verhältnisszahlen handelte, wurde das zeitraubende Trocknen des Caseins bis zur Gewichtconstanz weggelassen, obzwar es im ersten Theil der Arbeit vorgenommen worden war.

fortschritt. Es wurden nun folgende Resultate von befriedigender Uebereinstimmung gleich nacheinander erzielt¹⁾:

| Angewandte Substanzmenge Casein: | NH ₃ |
|----------------------------------|----------------------------------|
| 1. 3.0074 g | 3.58 ^o / _o |
| 2. 3.0116 g | 3.43 ^o / _o |

Zur Kohlensäurebestimmung wurden ca. 10 g lufttrockenen Caseins mit 200 ccm. einer 50^o/_oigen Kalilauge durch 12 Stunden am Wasserbade in einem Erlenmeyer-Kolben erhitzt, der ein Bunsen'sches Ventil trug, um den Zutritt der atmosphärischen Kohlensäure abzuhalten. Die Kohlensäure wurde sodann mit derselben Apparatur wie im ersten Theile unserer Arbeit direkt bestimmt: vorher war jedoch der Kohlensäuregehalt der Zersetzungslauge auf genau dieselbe Weise ermittelt worden. Auch geschah die Entnahme der Kalilauge mittelst einer Hebevorrichtung, wie sie bei Flaschen, deren Inhalt vor dem Zutritt der atmosphärischen Kohlensäure geschützt werden soll, als Verschluss üblich ist. Zur Entbindung der Kohlensäure wurde an Stelle der früheren Salzsäure nun Schwefelsäure verwendet, wodurch das U-Rohr, mit Kupfervitriol-Bimsstein gefüllt, entbehrlich geworden war, und der Liebig'sche Kaliapparat seinen Anschluss direkt an die zweite Waschflasche mit concentrirter Schwefelsäure erhielt. Es resultirten folgende zwei Zahlen:

| Angewandte Substanzmenge Casein: | CO ₂ |
|----------------------------------|----------------------------------|
| 1. 9.9932 g | 1.02 ^o / _o |
| 2. 9.9986 g | 1.08 ^o / _o |

Es erübrigt nun mehr noch, die Bestimmung der Oxalsäure zu besprechen. 10 g lufttrockenes Casein wurden mit 200 ccm. einer 50^o/_oigen Kalilauge durch 12 Stunden am Wasserbade erhitzt, nach dem Abkühlen mit verdünnter Salzsäure neutralisirt, mit Ammoniak versetzt, erwärmt und vom entstandenen Niederschlag, der sich hauptsächlich aus der Kieselsäure des Kolbenglases zusammensetzte, abfiltrirt. Nun wurde Essigsäure im Ueberschuss hinzugefügt und die

1) Es ist von Interesse, dass die Ammoniakresultate, welche Hausmann durch eine Säurespaltung des Caseins erhält, viel niedriger sind. (Siehe Zeitschrift f. physiol. Chem. Bd. XXIX.)

Flüssigkeit mit Chloreciumlösung versetzt, der entstehende Niederschlag nach dem Abfiltriren in verdünnter Salzsäure neuerlich gelöst und die Lösung mit Petroläther, der aus dem käuflichen durch fractionirte Destillation bei 60° gewonnen worden war, mehreremale ausgeschüttelt. Hierbei zeigte sich, dass der Petroläther gegenüber den organischen Verunreinigungen, welche die Flüssigkeit dunkel färbten, als Extractivmittel wirkte, denn die Flüssigkeit hatte nach dem Ausschütteln stets eine klare, weingelbe Farbe. Nun wurde die freie Salzsäure durch Ammoniak abgestumpft, das Ganze mit Essigsäure versetzt und durch Chlorecium die Oxalsäure in der Hitze zu fällen versucht. Der angestrebte Zweck wurde jedoch in keinem der wiederholten Fälle erreicht: die Flüssigkeit trübte sich zwar auf den Zusatz des Chloreciums, oder sie liess auch sofort einen flockigen, schmutzig braun gefärbten Niederschlag fallen, wurde aber weiter erhitzt, so trat an Stelle des erstrebten Körnigwerdens des Niederschlages ein Verkohlen desselben ein, und dies bei einer Temperatur, die unter der Kochhitze der Flüssigkeit lag und nur ein allmähliches Verdunsten des Wassers zu bewirken im Stande war. Von der quantitativen Bestimmung der Oxalsäure konnte also auf keinen Fall die Rede sein. Es war vielmehr eine organische, schmierige Kalkverbindung, die zum Herausfallen gebracht worden war. Ebenso wenig kann beim Zersetzen des Caseins durch Kalilauge von einem Auftreten der Oxalsäure in bemerkenswerther Menge die Rede sein; ihre Bildung kann höchstens spurenweise vor sich gehen.

Angesichts dieser Thatsache müssen wir nun auf das Verhältniss zwischen der Menge an Kohlensäure und Ammoniak, wie sie sich bei der Spaltung des Caseins durch Kalilauge bilden, zurückgreifen. Im Harnstoff beträgt dieses Verhältniss 1,28 ($\frac{\text{CO}_2}{2\text{NH}_3}$). In unserem Falle sind 0,28 und 9,31 die betreffenden Verhältnisszahlen, welche uns einen Fingerzeig über das Vorkommen der Harnstoffgruppe im Eiweissmolekül geben sollen. Dass sie diese Aufgabe nicht erfüllen, tritt augenscheinlich zu Tage.

Harnstoff und Eiweissmolekül in ihrem wechselseitigen

Zusammenhänge zu studiren, war und ist ein Problem, das in Folge seines hohen, nicht nur chemischen, sondern auch physiologischen Interesses eine Reihe Forscher, von Béchamp bis Drechsel lebhaft beschäftigte. Wir haben uns bemüht, unseren bescheidenen Antheil zur Lösung dieser Frage insofern beizutragen, als wir den Werdegang der Theorie Schützenberger's klar zu beleuchten versuchten und die Sonde der Prüfung an die Zuverlässigkeit jener Zahlen legten, welche das Material zum Aufbau des Schützenberger'schen Lehrgebäudes bildeten. Auf Grund dieser Prüfung war es uns jedoch unmöglich, einen genauen, quantitativen Ausdruck für das Vorhandensein der Harnstoffgruppe im Eiweissmoleküle zu gewinnen. Weder gelang dies mit Hülfe der Zersetzungsprodukte, wie sie durch Einwirkung von Baryhydrat auf Proteinstoffe entstehen, noch durch das Studium der Spaltung des Complexes mit Hülfe von Kalilauge. Namentlich in diesem letzteren Falle war das Verhältniss von Kohlensäure zu Ammoniak ein von der theoretischen Grösse nur allzu weit entferntes. Oxalsäure hatte sich in beiden Fällen höchstens nur spurenweise gebildet, ein Umstand, der mit der Annahme Schützenberger's über das Vorhandensein der Oxamidgruppe im Eiweisskerne nicht im Einklange steht.

Unsere nächste Aufgabe soll es nun sein, die übrigen Spaltungsprodukte des Eiweisskernes, wie sie sich bei der Zersetzung durch Alkalilaugen bilden, zu isoliren und einem näheren Studium zu unterwerfen, wobei die interessanten Glycoproteide Schützenberger's nicht ausser acht gelassen werden sollen.