

# **Der basische Charakter des Proteinmoleküls und das Verhalten des Edestins zu bestimmten Mengen von Säure und Alkali.**

Von

**Thomas B. Osborne.**

**Mit zwei Curventafeln.**

---

(Aus dem Laboratorium der Connecticut Agricultural Experiment Station,  
New Haven, Conn. U. S. A.)

(Der Redaction zugegangen am 10. Mai 1901.)

## **I. Einleitung.**

### **Der basische Charakter der Proteinmoleküle.**

Dass die Proteine ionisirt und sehr reactionsfähige Körper sind, zeigt sich in der Schnelligkeit, mit welcher sie sich sowohl mit Basen als Säuren verbinden, in der Leichtigkeit, mit der sie in vielen Fällen auf Veränderungen in der Ionisirung ihrer Lösungen reagiren, endlich auch darin, dass sie in chemischer Hinsicht die eigentlich thätigen Grundbestandtheile des Protoplasmas sind.

Die Annahme, dass sie neutrale Körper wie die Kohlehydrate sind, stimmt nicht mit dem, was über sie bekannt ist, überein.

Dennoch scheint im Allgemeinen angenommen zu werden, dass eine Proteinsubstanz enthaltende Lösung, die weder saure noch alkalische Reaction auf Lackmus zeigt, chemisch neutral ist.

Zuverlässige Beobachtungen zeigen, dass einige Proteinlösungen, wenn sie auch neutral gegen Lackmus sind, sich sauer gegen Phenolphthalin und alkalisch gegen Laemoid verhalten. Es ist ebenfalls bekannt, dass einer Proteinlösung eine beträchtliche Menge von Säure hinzugesetzt werden kann, che

eine Säurereaction auf Tropäolin, Alizarin, Phloroglucin und Vanillin erscheint.

Die Thatsache, dass Säuren sich mit Proteinkörpern verbinden, ist daher wohl bekannt, und es gilt daher als Regel, bei der Darstellung von Eiweisspräparaten Säuren fernzuhalten. Dies hat man scheinbar bewirkt, indem man Kalium- oder Natriumhydrat oder -Carbonat hinzugesetzt hat, bis die Reaction auf Lackmus neutral wurde. Meines Wissens hat indessen Niemand irgend einen Beweis dafür beigebracht, dass dieses Verfahren wirklich zum Ziele führt. Es ist daher von Wichtigkeit, zu wissen, ob Lackmus gebraucht werden kann, um den Punkt zu bestimmen, wann alle mit dem Eiweiss in Verbindung stehende Säure in neutrales Salz von Kalium oder Natrium verwandelt und alle Proteinsubstanz in Freiheit gesetzt worden ist, oder ob noch Säure in Verbindung mit Eiweiss bleibt. Letzteres ist nun bekanntlich der Fall, wenn Tropäolin oder Lackmus als Indicator gebraucht wird.

Wenn wässrige Lösungen krystallisirtem Ovalbumin, oder kochsalzhaltige Lösungen von Excelsin, Amandin, Vignin, Konglutin, Glycinin, Phaseolin und Legumin, oder alkoholische Lösungen von Zein, Gliadin und Hordein<sup>1)</sup> (in 75—90%igem Alkohol) neutral gegen empfindliches neutrales Lackmuspapier (das geeignet war, deutlich die Gegenwart von 0,25 ccm. n 100 Salzsäure in 10 ccm. Wasser zu zeigen) gemacht wurden, so waren sie doch in jedem Falle noch sauer gegen Phenolphthalein. Mit Ausnahme von Ovalbumin waren diese Präparate nach den gewöhnlich angewendeten Methoden bereitet worden und waren mit keiner Säure in Berührung gekommen, ausgenommen diejenige, welche von vornherein in den Samen enthalten ist, aus denen sie gewonnen wurden. Die Ovalbuminpräparate wurden sowohl nach Hopkins' wie nach Hofmeister's Methode bereitet, der Säuregehalt aller dieser Präparate war der gleiche.

1. Diese Proteinkörper sind von dem Verfasser beschrieben in den Berichten der Connecticut Agricultural Experiment Station für 1890 bis 1899; ebenso Amer. Chem. Jour. 13, 14 und 15; Jour. Amer. Chem. Soc. 16, 17, 18, 19, 20, 21; auch Die Proteide etc., Heidelberg, 1897.

Um Mengen von etwa 1 Gramm dieser verschiedenen Proteinpräparate neutral gegen Lackmus zu machen, war in den meisten Fällen von 0,1 cem. bis 1,5 cem. Decinormalalkali erforderlich, während ein weiterer Zusatz von 0,7 bis 1,0 cem. Decinormalalkali nöthig war, um dieselben Mengen neutral gegen Phenolphthalein zu machen; ausgenommen war Legumin, welches 2,0 cem. erforderte.

Diese Reaction auf Phenolphthalein ist scharf und bestimmt, wie diejenige auf starke Mineralsäuren, und ist unabhängig von der Verdünnung; denn dasselbe Ergebniss wird erreicht bei einer Verdünnung auf 10 cem. oder auf 100 cem.

Es erhebt sich nun die Frage, ob die vollständige Neutralisation der gesammten Säure durch Phenolphthalein oder durch Lackmus angezeigt wird.

Präparate von Edestin, die sich neutral oder sauer gegen Lackmus verhalten, werden, wenn sie in Wasser suspendirt und durch Zusatz von Kaliumhydrat neutral gegen Phenolphthalein gemacht sind, in durchaus keinem bemerkenswerthen Grade aufgelöst, sondern geben an die Lösung Kaliumsalze von einfachen Säuren ab, die durch Verdunstung daraus gewonnen werden können. Wenn das Edestin so von diesen Säuren befreit ist, fängt es sogleich an sich aufzulösen, sobald mehr Alkali hinzugefügt wird.

Gegen Phenolphthalein neutral gemachtes Edestin, das in einer Natriumchloridlösung aufgelöst ist, reagirt deutlich alkalisch gegen Lackmus. Diese alkalische Reaction wird durch das Edestin selbst verursacht und nicht durch organische Salze des Alkalis, da solche Präparate eine nur sehr geringe Menge von Asche enthalten, weniger als 0,05 %, die sowohl gegen Lackmus als gegen Phenolphthalein neutral reagirt.

Krystallinische Präparate von Excelsin, aus der brasilianischen Nuss, *Bertholletia excelsa*, gewonnen, bleiben ungelöst, wenn sie in Wasser suspendirt und gegen Lackmus neutral gemacht werden: aber sie lösen sich vollständig auf, wenn genügend Alkali, entweder Kali oder äquivalente Mengen von Ammoniak, hinzugesetzt wird, um die Lösung gegen Phenolphthalein neutral zu machen. Mit weniger Alkali ist

die Lösung nicht vollständig, indem die ungelöste Menge von der Menge des hinzugesetzten Alkali abhängt.

Ebenso werden Präparate von Legumin aus der Erbse, Saubohne oder aus der Wicke, wenn sie in Wasser suspendirt werden, nur dann vollständig aufgelöst, wenn genügend Kalium oder ein Aequivalent von Ammoniumhydrat hinzugefügt wird, um ihre Säurereaction auf Phenolphthalin zu neutralisiren. Es ist höchst unwahrscheinlich, dass Excelsin und Legumin lösliche Verbindungen mit Kalium bilden können, die neutral gegen Phenolphthalein sind, und die Thatsache, dass eine genau äquivalente Menge von Ammoniak eine Lösung herbeiführt, ist auch ein Beweis gegen diese Annahme, da eine viel grössere Menge von Ammoniumhydrat als von Kaliumhydrat erforderlich ist, um Edestin aufzulösen. So wurde ein Gramm von einem Präparat von Edestin, welches durch 1 ccm. zehntelnormaler Kalilauge vollständig gelöst wurde, durch 13 ccm. zehntelnormalen Ammoniumhydrats nicht völlig aufgelöst. Da überdies die Proteine sehr schwache Säuren sind, so ist es höchst unwahrscheinlich, dass sie mit Kalium Salze bilden können, die gegen Phenolphthalein neutral reagiren. Sicherlich ist dies nicht mit Edestin der Fall, da der geringste Ueberschuss von Kalihydrat über die zur Neutralisation der Gesamtsäure erforderliche Menge, Phenolphthalein sogleich roth färbt.

Lösungen von allen den anderen Proteinkörpern, die ich untersucht habe, reagiren, wenn sie in ähnlicher Weise neutral gemacht sind, entschieden alkalisch auf Lackmus.

Nach diesen Thatsachen erscheint es sicher, dass die Proteine wirkliche Basen sind, wie ich es früher bewiesen habe (Osborne, Jour. Amer. Chem. Soc. 21, 486; Report of the Conn. Agricul. Expt. Station for 1899; ebenso Jour. Amer. Chem. Soc. 22, 402), und dass sie nicht Pseudoammoniumbasen sind, wie Cohnheim und Krieger annehmen (Cohnheim und Krieger, Zeitschr. f. Biologie, n. F. 22, 95).

## II. Verbindungen von Edestin mit Säuren.

Da Edestin, wenn neutral gegen Phenolphthalein, unlöslich im Wasser ist, so bietet es die Möglichkeit, den Säure-

gehalt seiner nach den gebräuchlichen Methoden dargestellten Präparate zu studiren; eine solche Möglichkeit wird durch kein anderes mir bekanntes Protein geboten. Ich habe daher das Edestin einem ausgedehnten Studium unterworfen, dessen Einzelheiten in den folgenden Seiten mitgetheilt sind.

Dieses Studium erschien wichtig, da Edestin eine wahre Proteinsubstanz ist, die alle wesentlichen Merkmale dieser Körper darbietet, so dass die Reactionen, welche sie mit Basen und Säuren darbietet, ohne Zweifel für diejenigen der Proteine im Allgemeinen typisch sind.

### 1. Die Acidität der Edestinpräparate.

Um die saure Reaction einer Kochsalzlösung von je einem Gramm zwanzig verschiedener, nach den gebräuchlichen Methoden dargestellter Edestinpräparate gegen Phenolphthalein zu neutralisiren, war es nöthig, von 0,85 bis 1,5 ccm.  $n/10$  Kalilauge hinzuzusetzen. Acht von diesen Lösungen erforderten 0,2 bis 0,5 ccm., um gegen Lackmus neutral zu werden, während die übrigen zwölf von vornherein neutral gegen Lackmus waren: der Unterschied in der Acidität der verschiedenen Präparate gegen diese beiden Indicatoren entsprach 0,85 bis 1,10 ccm.  $1/10$  Normalalkali.

Der Grad der Acidität gegen Phenolphthalein ist sehr leicht durch direkte Titrirung zu bestimmen, da die Endreaction unverzüglich erscheint. Dasselbe Ergebniss wird erreicht, wenn man die salzhaltige Lösung direkt titrirt oder wenn man das Präparat in einem Ueberschuss von Alkali auflöst und darauf zurücktitrirt oder wenn man das Edestin in Wasser in einer zugestöpselten Flasche suspendirt und Alkali hinzufügt, bis eine rothe Farbe erscheint. Im letzteren Falle wird der Endpunkt langsamer erreicht, da die Reaction auf eine Substanz im festen Zustande stattfindet.

### 2. Die Natur der mit Edestin verbundenen Säuren.

Wenn an der Luft getrocknete Präparate von Edestin in Wasser suspendirt und mit genügend verdünnter Kaliumhydratlösung behandelt werden, um eine eben merkliche

alkalische Reaction auf Phenolphthalein zu geben, so lösen sie sich nicht auf, wie schon gesagt, sondern bilden beim Stehen dichte Niederschläge von zersetzten Krystallen, über welchen sich eine massige, flockige Schicht amorpher Materie ablagert. Einige so behandelte Proben trennen sich gänzlich von der Lösung, indem sie diese klar und leicht filtrirbar zurücklassen; andere bilden eine milchige, collodiale Halblösung, die nicht filtrirt werden kann. Wenn diese letzteren Präparate in 50<sup>o</sup> oigem Alkohol suspendirt und mit Alkali auf Phenolphthalein neutralisirt werden, geben sie klare Lösungen, die leicht zu filtriren sind. Der beim Verdunsten des Filtrats und des Waschwassers vom neutralisirten Edestin verbleibende Rückstand entspricht bei 110<sup>o</sup> getrocknet gewöhnlich ungefähr 1,25% von dem bei derselben Temperatur getrockneten Edestin. Das Verhältniss des von verschiedenen Präparaten erhaltenen Rückstandes wurde, wie folgt, befunden:

Präparat:	4	7	9	10	11	12	13	15	18
Procente:	1,30	1,05	1,27	1,21	1,40	1,26	1,41	1,15	1,44
				1,26	1,41			1,17	

Um die Zusammensetzung dieser Rückstände zu finden, wurden 75 g des Präparats 19<sup>1)</sup> mit grossen Mengen von 75<sup>o</sup> oigem Alkohol gewaschen, bis das letzte Waschwasser beim Verdunsten keinen bemerkenswerthen Rückstand hinterliess. Der beim Verdunsten des Gesamtwaschwassers bleibende Rückstand wog 0,2833 g, 0,38% des Proteins entsprechend. Seine Lösung in Wasser wurde durch 3,4 ccm.  $\frac{1}{10}$  Normalkalilauge gegen Phenolphthalein neutral gemacht und gab einen Niederschlag, hauptsächlich Protein ab, der 0,1159 g wog. Das Filtrat von diesem liess beim Verdunsten einen Rückstand von 0,1674 g zurück, wovon 0,0133 g Kalium war, das beim Neutralisiren der Lösung hinzugesetzt worden war. Wenn wir dieses abziehen, finden wir, dass nur 0,1541 g nicht eiweissartiger Substanz durch das Waschen aus 75 g Edestin

1) Dies wurde dargestellt durch Behandlung von Hanfsaat mit 3<sup>o</sup> oiger Kochsalzlösung, die auf 60<sup>o</sup> erhitzt wurde, und durch Abkühlen des klaren Auszuges. Das Protein, das sich gänzlich in achtflächigen Krystallen abschied, ist somit als ein Rohprodukt von Edestin anzusehen.

entfernt worden war. Nach Verbrennung verblieb ein Ascherückstand von 0,0600 g, wovon wieder 0,0133 g abgerechnet werden müssen, entsprechend dem in den 3,4 ccm. der hinzugefügten  $\frac{1}{10}$  Normallösung enthaltenen Kali, so dass die gesammte anorganische Substanz, die durch erschöpfende Waschung aus den 75 g Edestin entfernt wurde, sich nur auf 0,0467 g oder 0,06% belief. Nachdem somit nachgewiesen war, dass nicht mehr als Spuren von Aschebestandtheilen in diesem Edestinpräparat vorhanden sein konnten, wurde das Präparat in reinem Wasser suspendirt und nach und nach mit 90,0 cc.  $\frac{n}{10}$  Kalilauge und viel Wasser versetzt, bis zur genauen Neutralisation der Mischung gegen Phenolphthalein. Nachdem das ungelöste Edestin einige Stunden in einer geschlossenen Flasche geschüttelt worden war, wurde es abfiltrirt und 6 Mal mit je 1 Liter 65volumprocentigem Alkohol durch Decantiren gewaschen. Das Filtrat und Waschwasser wurden getrennt verdunstet und liessen, nachdem sie bei  $110^{\circ}$  getrocknet waren, folgende Rückstände:

## Tabelle I.

Bei der Neutralisation von Edestin 19 mit Kaliumhydrat in Lösung gegangen:

In den wässerigen Filtraten . . . . .	0,2542 g
» dem ersten Liter 65% Alkohol . . .	0,1225 »
» » zweiten » 65% » . . .	0,0680 »
» » dritten » 65% » . . .	0,0750 »
» » vierten » 65% » . . .	0,0725 »
» » fünften » 65% » . . .	0,0480 »
» » sechsten » 65% » . . .	0,0308 »

Gesammte lösliche Materie 0,6710 g.

Diese Rückstände wurden vereinigt und mit starkem Alkohol ausgezogen, in welchem ein Theil sich auflöste. Der in Alkohol lösliche Theil war auch in Wasser löslich, indem er eine gelbe Flüssigkeit bildete, die 0,3 ccm.  $\frac{n}{10}$  Salzsäure zur Neutralisation gegen Lackmus und 0,7 ccm. gegen Phenolphthalein erforderte.

Als diese alkoholische Lösung verdunstet und der Rückstand bei niedriger Temperatur verbrannt wurde, entwickelten sich alkalische Dämpfe in geringer Menge.

Das Gewicht der in starkem Alkohol löslichen Menge betrug 0,1514, das der unlöslichen 0,6173 g. Die Analyse ergab folgende Bestandtheile:

Tabelle II.

Zusammensetzung der durch Neutralisirung eines rohen Präparats von krystallisirtem Edestin 19 mit Kalihydrat gebildeten Kaliumsalze.

	In starkem Alkohol löslich		In starkem Alkohol unlöslich	
	Gewicht	Procente	Gewicht	Procente
Organische Materien . . .	0,0825 g	54,42	0,1429 g	23,15
Kaliumcarbonat . . . . .	0,0400 »	26,38	0,0600 »	9,72
Kaliumsulphat . . . . .	0,0200 »	13,33	0,0766 »	12,41
Kaliumchlorid . . . . .	0,0052 »	3,43	0,2750 »	44,55
Kaliumphosphat . . . . .	—	—	0,0235 »	3,74
Natriumchlorid . . . . .	—	—	0,0091 »	1,47
Unbestimmt und Verlust .	0,0037 »	2,44	0,0302 »	4,96
	0,1514 g	100,00	0,6173 g	100,00

Die Summe der anorganischen Substanz, die in den zwei Portionen enthalten ist, betrug 0,5433 g und hatte folgende Zusammensetzung:

Tabelle III.

Zusammensetzung der bei Neutralisation des rohen Präparats von krystallisirtem Edestin mit Kaliumhydrat erhaltenen anorganischen Salze.

	Gewicht	Procente
Kaliumcarbonat . . . . .	0,1000 g	18,40
Kaliumsulphat . . . . .	0,0966 »	17,81
Kaliumchlorid . . . . .	0,2802 »	51,54
Kaliumphosphat . . . . .	0,0235 »	4,32
Natriumchlorid . . . . .	0,0091 »	1,67
Unbestimmt und Verlust .	0,0399 »	6,26
	0,5433 g	100,00

Aus diesen Zahlen ersehen wir, dass der grössere Theil der löslichen Substanzen, die durch Neutralisation dieses Präparates gebildet waren, aus Kaliumsalzen von anorganischen Säuren besteht und dass 60% des Kaliums in diesen Salzen als Chlorid vorhanden ist.

Wir finden auch, dass Alkohol einen grossen Antheil der organischen Substanz auflöst, die hauptsächlich aus den Kaliumsalzen einer oder mehrerer organischer Säuren besteht, da die Menge von Kaliumcarbonat, die sich nach der Verbrennung bildet, ungefähr der Hälfte der verbrennbaren Materie gleich ist. Die Summe dieser letzteren und des Kaliumcarbonats ist 0,1225 g, wovon 0,021 g Kalium und 0,1014 g organisch ist. Das hiernach zu berechnende Molekulargewicht kann im Maximum auf ungefähr 188 gesetzt werden, woraus hervorgeht, dass kein beträchtlicher Theil des Kaliumcarbonats aus Kaliumeiweissverbindungen hervorgegangen ist.

Wegen des erschöpfenden Auswaschens dieses Präparates vor der Neutralisation ist es unwahrscheinlich, dass diese organische Materie eine beigemischte Verunreinigung war, auch war sie keine freie organische, in Wasser unlösliche Säure, weil die Lösung ihres Kaliumsalzes auf den Zusatz von ein wenig Salzsäure klar blieb, wodurch die organische Säure als eine in Wasser leicht lösliche charakterisirt wurde.

Wir müssen daher schliessen, dass diese organische Materie aus einer oder mehreren der organischen Säuren des Samens besteht, die sich mit dem Edestin verbunden hatten.

Zur Bestätigung dieser Ergebnisse wurde dieses Experiment wiederholt mit Probe 20, die aus einem Kochsalzextract des Hanfsamens bereitet war, der mit Kalihydrat gegen Lackmus neutralisirt und dialysirt wurde, bis das Edestin in Krystallen niedergeschlagen war. Dieser Niederschlag wurde wieder aufgelöst in 10%iger Kochsalzlösung, die auf 50° erhitzt wurde: die bei derselben Temperatur mit drei Volumen Wasser verdünnte Lösung filtrirte vollkommen klar und wurde dann auf 12° abgekühlt. Der schön krystallisirte Niederschlag wurde gründlich gewaschen, zuerst mit 1%iger, dann mit 0,5%iger Kochsalzlösung und zuletzt mit 50%igem Alkohol, bis alles

Salz entfernt war. Diese Methode des Waschens mit verdünnter Salzlösung und Alkohol war nothwendig, weil beim Waschen mit Wasser allein sich ein grösser Theil des Präparats auflöste, wovon der Grund später erklärt wird.

30 g von dem an der Luft getrockneten Präparat wurden in reinem, frisch ausgekochtem Wasser suspendirt und mit 24,0 ccm.  $n/10$  Kaliumhydratlösung gleichfalls mit Wasser verdünnt, versetzt. Die gegen Phenolphthalein vollständig neutrale Mischung wurde filtrirt, einige Zeit stehen gelassen und das unlösliche Edestin gründlich mit verdünntem Alkohol gewaschen.

Das Filtrat und Waschwasser wurden verdunstet, der Rückstand bei  $110^{\circ}$  getrocknet, gewogen und analysirt mit den folgenden Ergebnissen:

Tabelle IV.

Zusammensetzung der Kaliumsalze, die durch Neutralisirung eines umkrystallisirten Präparats von Edestin mit Kaliumhydrat gebildet wurden:

	Gramm	In Procenten der unorganischen Materie
Organische Stoffe . . . . .	0,0315	—
Kaliumcarbonat . . . . .	0,0083	5,7
Kaliumsulphat . . . . .	0,0095	6,5
Kaliumchlorid . . . . .	0,1081	73,9
Natriumchlorid . . . . .	0,0108	7,4
Unbestimmt und Verlust .	0,0095	6,5
Summe . . . . .	0,1777	100,0

Diese Zahlen bestätigen im Allgemeinen die vorher gegebenen, ergeben jedoch eine grössere procentische Menge von Kaliumchlorid und eine kleinere von organischen Salzen und Sulphat. Dies ist zweifellos das Ergebniss des Umkrystallisirens, wodurch dieses Präparat schliesslich aus einer Lösung abgeschieden wurde, die an negativen, von denen des Chlor verschiedenen Ionen ein viel kleineres Verhältniss enthielt, als diejenige, aus der Präparat 19 krystallisirt wurde.

Wie bereits festgestellt wurde, löst sich von vielen Edestin-Präparaten ein Theil in Wasser auf, sobald die begleitenden Salze zum grössten Theil herausgewaschen sind. Um zu bestimmen, ob diese Löslichkeit einem Unterschied in der Natur der mit den löslichen und unlöslichen Theilen des Präparats verbundenen Säuren zuzuschreiben ist oder nicht, wurden 30 g von dem Präparat 20 erschöpfend mit reinem Wasser gewaschen und die filtrirte Lösung wurde mit 10,6 ccm.  $n/10$  Kaliumhydratlösung neutralisirt, wodurch das Edestin völlig niedergeschlagen wurde. Das klare Filtrat und das Waschwasser von diesem Niederschlag wurden verdunstet, der Rückstand bei  $110^\circ$  getrocknet und mit folgenden Ergebnissen analysirt:

Tabelle V.

Zusammensetzung der durch Neutralisirung des in Wasser löslichen Theils des Edestinpräparats gebildeten Kaliumsalze.

	Gramm	In Procenten der unorganischen Stoffe
Organische Stoffe . . . . .	0,0902	—
Kaliumcarbonat . . . . .	0,0021	1,4
Kaliumsulphat . . . . .	0,0096	6,6
Kaliumchlorid . . . . .	0,0721	49,8
Natriumchlorid . . . . .	0,0585	40,4
Unbestimmt und Verlust .	0,0025	1,8
Summe . . . . .	0,2350	100,0

Das Vorhandensein von Natriumchlorid, welches einen so grossen Theil dieser Salze bildet, ist zweifellos der unvollständigen Waschung des ursprünglichen Präparats zuzuschreiben, welches mehrere Male aus verdünnter Kochsalzlösung umkrystallisirt worden war, und welches zuerst mit 0,5%iger Kochsalzlösung und dann mit 50%igem Alkohol gewaschen worden war, damit die in Wasser lösliche Edestinverbindung nicht daraus entfernt würde.

Der auf Seite 253 beschriebene, in einem ähnlichen

Experiment gewonnene unorganische Rückstand enthielt nur 11,41% Kochsalz, woraus hervorgeht, dass dies in dem gegenwärtigen Falle nur als eine zufällige Verunreinigung zu betrachten ist und nicht als ein Produkt des Neutralisationsvorganges.

Das zum Neutralisiren des Edestins gebrauchte Kaliumhydrat entsprach 0,0791 g Kaliumchlorid, von welchem Salz 0,0721 g bei der Analyse erscheint, selbst nachdem man alle andern Säuren als Kaliumsalze berechnet hat. Daraus ergibt sich, dass das in Wasser lösliche Edestin grösstentheils mit Salzsäure in Verbindung stand. Bemerkenswerth ist, dass in diesem Fall die Gesamtmenge des hinzugesetzten Alkalis wiedergewonnen wurde, wohingegen bei den oben beschriebenen Experimenten nur 70% in Lösung gefunden wurde. Dies ist zweifellos dem Umstande zuzuschreiben, dass in den ersten Experimenten die neutralisirte Säure reichlich im Kern der Krystalle<sup>1)</sup> enthalten war, und da sich diese Krystalle bei der Neutralisation nicht auflösten, so konnten die Kaliumsalze, die sich in ihnen bildeten, nur mit grosser Schwierigkeit herausgewaschen werden. Bei diesem letzten Experiment war das Edestin völlig aufgelöst zu der Zeit, als das Alkali hinzugesetzt wurde, und folglich wurden die Kaliumsalze, die sich bildeten, leicht davon getrennt.

Der Theil des Präparats 20,4, welcher sich bei der Behandlung mit Wasser nicht auflöste, wurde zunächst in reinem kochenden Wasser suspendirt und durch sorgfältigen Zusatz von 16,6 ccm. n/10 Kaliumhydratlösung gegen Phenolphthalein neutralisirt. Nachdem die Lösung etwas gestanden hatte, wurde sie filtrirt und das ungelöste Edestin gründlich mit 75%igem Alkohol gewaschen. Beim Verdunsten liess das Filtrat und das Waschwasser einen Rückstand zurück, der, bei 110° getrocknet, mit folgenden Ergebnissen analysirt wurde:

1) Unter dem Mikroskop sieht man, dass der grössere Theil des ungelösten Edestins aus Bruchstücken von Krystallen besteht, wovon die meisten von verhältnissmässig beträchtlicher Grösse sind, man muss also schliessen, dass die in diesen Fragmenten entstehenden Kaliumsalze nur schwer in Lösung gehen.

Tabelle VI.

Zusammensetzung der Kaliumsalze, die durch Neutralisierung desjenigen Theils des Edestinpräparats, welcher in Wasser unlöslich war, gebildet wurden.

	Gramm	In Procenten der unorganischen Stoffe
Organische Stoffe . . . . .	0,0574	—
Unlösliche mineralische Materie .	0,0067	5,8
Kaliumcarbonat . . . . .	0,0121	10,5
Kaliumsulfat . . . . .	0,0117	10,1
Kaliumchlorid . . . . .	0,0710	61,5
Natriumchlorid . . . . .	0,0085	7,4
Unbestimmt und Verlust . . . .	0,0055	4,7
Summe . . . . .	0,1729	100,0

Bei diesem Versuch wurde 75% von dem hinzugesetzten Kalium wiedergewonnen, wovon 76% Chlorid und 11% Sulfat ist.

Bei dem ähnlichen, auf Seite 254 zu beschreibenden Versuch wurde 85% von dem hinzugesetzten Kalium wiedergefunden, wovon 47,6% Chlorid und 52,4% Sulfat ist. Aus dem jetzt besprochenen Versuch, der einen so kleinen Bruchtheil an Sulfat ergibt, geht hervor, dass die Unlöslichkeit des Edestins in Wasser nicht einfach der Natur der mit ihm verbundenen Schwefelsäure, sondern, wie wir es später zeigen werden, hauptsächlich den Mengenverhältnissen der Säure zuzuschreiben ist. Der lösliche Theil enthält mehr Säure.

Um ein Präparat zu bereiten, das bei der Neutralisation nur Chlorid abgibt, wurden 3000 g Hanfsamenmehl mit 9 Liter Kochsalzlösung von 60° C., die 3% fast chemisch reines Kochsalz enthielt, ausgezogen. Der filtrirte Auszug wurde auf 8° abgekühlt und über Nacht stehen gelassen, bis der reiche Bodensatz von Krystallen sich abgelagert hatte. Diese Krystalle wurden dann auf einem Filter gesammelt, einmal mit Wasser gewaschen, in einem Liter Kochsalzlösung wieder gelöst, die Lösung voll-

ständig klar filtrirt, auf 50° erhitzt, mit drei Volumen Wasser derselben Temperatur verdünnt und rasch auf 0° abgekühlt.

Der krystallinische Niederschlag, welcher sich abschied, wurde in Wasser suspendirt, auf ein Filter gebracht und dieses Verfahren wurde wiederholt, bis alles in Wasser lösliche Edestin herausgewaschen war. Die drei zuerst gewonnenen Waschwässer waren fast proteinfrei, das vierte enthielt fast die Hälfte des ursprünglichen Präparats, das fünfte viel weniger und das sechste sehr wenig.

Der vierten Portion wurde genug reines Natriumchlorid hinzugesetzt, um eine 10%ige Lösung zu bilden. Dieser Zusatz bewirkte zuerst einen reichlichen Niederschlag, von dem sich aber das meiste auflöste, als mehr Salz in die Lösung kam, die dann filtrirt und 40 Stunden dialysirt wurde, wobei ihr Salzgehalt auf 2% herabgesetzt und das Edestin in schönen Krystallen niedergeschlagen wurde. Diese wurden abfiltrirt, und nachdem sie mit 50%igem Alkohol und zuletzt mit absolutem Alkohol gewaschen und über Schwefelsäure getrocknet waren, gaben sie 37 g eines vollkommen krystallisirten, blendend weissen Präparats, 22, welches grösstentheils in reinem Wasser löslich und gänzlich löslich in Kochsalzlösung war.

Um eine Quantität dieses Präparats, welche einem Gramm trockener und aschefreier Substanz entsprach, gegen Phenolphthalein zu neutralisiren, war 1,22 ccm. n/10 Kaliumhydratlösung erforderlich, einem Säuregehalt entsprechend, der, wie wir später sehen werden, einer Mischung eines kleinen Theils der in Wasser unlöslichen, mit einem grossen Theil von der im Wasser löslichen Edestinverbindung entspricht.

20 g dieses lufttrockenen Präparats wurden dann mit 600 ccm. reinen Wassers behandelt, 22 ccm. n/10 Kalilauge mit 200 ccm. Wasser gemischt hinzugefügt, der voluminöse Niederschlag abfiltrirt und mit 250 ccm. Wasser gewaschen. Filtrat und Waschwasser hinterliessen beim Verdunsten einen Rückstand, der die folgende Zusammensetzung hatte:

#### Tabelle VII.

Durch Neutralisirung des Edestinpräparats 22 gebildete Kaliumsalze.

	Gramm	In Procenten der unorganischen Stoffe
Organische Stoffe . . . . .	0,0185	—
Kaliumcarbonat . . . . .	0,0020	1,19
Kaliumsulphat . . . . .	0,0065	3,89
Kaliumchlorid . . . . .	0,1398	83,51
Natriumchlorid . . . . .	0,0191	11,41
Summe . . . . .	0,1859	100,00

Obgleich das freie Edestin nur oberflächlich gewaschen worden war, finden wir über 85% des hinzugesetzten Kaliums in diesen Salzen enthalten, wovon 95% als Chlorid gegenwärtig ist. Das Verhältniss von Sulphat zu Chlorid in diesen Salzen entspricht weniger als zwei Molekülen des ersteren zu 100 des letzteren. Obschon dieses Präparat fast frei von Sulphat war, konnte dennoch ein vollkommen reines Chlorid auf diese Weise nicht erlangt werden.

20 g des in Wasser unlöslichen Theils vom Edestin wurden in 600 ccm. Wasser suspendirt und durch Zusatz von 12 ccm. n/10 Kalilauge neutralisirt. Die von dem ungelösten Edestin abfiltrirte Lösung wurde zusammen mit dem Waschwasser verdunstet und der Rückstand mit dem folgenden Resultat analysirt:

Tabelle VIII.

Zusammensetzung der Kaliumsalze, die durch Neutralisiren des in Wasser unlöslichen Theils vom Edestin gebildet wurden.

	Gramm	In Procenten der unorganischen Stoffe
Organische Stoffe . . . . .	0,0340	—
Kaliumcarbonat . . . . .	—	—
Kaliumsulphat . . . . .	0,0479	49,6
Kaliumchlorid . . . . .	0,0373	38,7
Natriumchlorid . . . . .	0,0079	8,2
Unbestimmt und Verlust .	0,0034	3,5
Summe . . . . .	0,1305	100,0

In diesem Rückstand haben wir eine grössere Menge Sulphat als in irgend einem vorher analysirten. Wir werden später zeigen, dass Edestinsulphat weniger löslich in Wasser ist als das entsprechende Chlorid, und so ist es erklärlich, dass das Edestinsulphat sich in diesem in Wasser unlöslichen Bruchtheil angesammelt hat. Ob Edestinsulphat ein ursprünglicher Bestandtheil des Samens ist, oder ob es aus Sulphaten herkommt, die in dem Natriumchlorid und in dem Flusswasser enthalten waren, in welchem die Lösungen dialysirt wurden, wurde nicht festgestellt; aber das Letztere erscheint wohl möglich, weil diese Substanz vor ihrer letzten Fällung völlig löslich in Wasser war.

Aus diesen Ergebnissen würde hervorgehen, dass Edestinpräparate, die durch Köhlen oder Dialysiren von Salzlösungen gewonnen wurden, gewöhnlich aus Mischungen von verschiedenen Verbindungen der Proteine mit Säuren bestehen, indem das Verhältniss der verschiedenen gebildeten Verbindungen von dem Säuregehalt der Lösung und der Natur der Säureionen abhängt, welche gegenwärtig sind, wenn das Edestin herauskrystallisirt wird.

Wegen der Schwierigkeit, Edestinchlorid frei von Sulphat zu gewinnen, schien es möglich, Sulphat frei von anderen Säureverbindungen zu gewinnen.

4 kg Hanfsamenmehl wurde demgemäss mit 15%iger Ammoniumsulphatlösung ausgezogen, der Auszug mit demselben Salze gesättigt, das so gefällte Protein abfiltrirt und in der verdünnten Sulphatlösung, die sich bei Hinzusetzen von Wasser ergab, aufgelöst. Die klare Lösung setzte, dialysirt, relativ grosse achtflächige Krystalle ab, die, mit Wasser und Alkohol gewaschen und getrocknet, 440 g wogen — Präparat 23.

50 g dieses Präparats wurden in Wasser suspendirt und durch Zusatz von 45 cem. n<sup>10</sup> Kalilauge, die mit viel Wasser verdünnt war, genau neutral gegen Phenolphthalein gemacht. Da das neutrale Edestin sich nicht in einem filtrirbaren Zustand aus der Lösung abschied, so wurde ein gleiches Volumen Alkohol allmählich hinzugesetzt. Das dann gewonnene

Filtrat und Waschwasser wurden verdunstet und der Rückstand mit den folgenden Ergebnissen analysirt:

Tabelle IX.

Zusammensetzung der durch Neutralisation des Edestinpräparats 23 gewonnenen Kaliumsalze.

	Gramm	In Procenten der unorganischen Stoffe
Organische Stoffe . . . . .	0,2269	—
Kaliumcarbonat . . . . .	0,0480	18,98
Kaliumsulphat . . . . .	0,1956	77,34
Kaliumchlorid . . . . .	0,0066	2,61
Unbestimmt und Verlust .	0,0027	1,07
Summe . . . . .	0,4798	100,00

Aus diesen Zahlen ist deutlich zu ersehen, dass bei dieser Behandlungsweise des Präparats an Stelle des Chlorids das Sulphat erhalten wird, da über 75% des wiedergewonnenen Kaliums Sulphat ist, und weniger als 3% Chlorid. Von dem beim Neutralisiren hinzugesetzten Kalium wurden 66% in den obigen Salzen wiedergewonnen, was gut übereinstimmt mit den 70%, die in den vorher beschriebenen Experimenten erlangt wurden, in welchen die Edestinkrystalle sich nicht auflösten, sondern beim Neutralisiren in relativ grosse Bruchstücke zerfielen.

Um, wenn möglich, Edestinsulphat in Chlorid zu verwandeln, wurden 50 g des Präparats 23 in 70%igem Alkohol suspendirt und 50 ccm. n/10 Kalilauge hinzugesetzt. Dieses so neutral gemachte Edestin wurde abfiltrirt, in 500 ccm. 10%iger Kochsalzlösung aufgelöst und sorgfältig mit einem gleichen Volumen derselben Lösung gemischt, welche 55 ccm. n/10 Salzsäure enthielt. Die Lösung wurde klar filtrirt, dialysirt, der krystallinische Niederschlag mit Wasser gewaschen, bis alles lösliche Edestin entfernt wurde; der in Wasser suspendirte, gegen Phenolphthalein neutralisirte Rückstand und die ge-

wonnenen Kaliumsalze wurden mit den folgenden Resultaten analysirt:

Tabelle X.

Zusammensetzung der durch Neutralisation des aus dem Edestinsulphat gewonnenen Edestinchlorids gebildeten Salze.

	Gramm	In Procenten der unorganischen Stoffe
Organische Stoffe . . . . .	0,0192	—
Kaliumcarbonat . . . . .	0,0016	2,01
Kaliumsulphat . . . . .	0,0130	16,31
Kaliumchlorid . . . . .	0,0587	73,65
Unbestimmt und Verlust .	0,0064	8,03
Summe . . . . .	0,0989	100,00

Diese Zahlen zeigen, dass über 82% von dem Kalium als Chlorid und weniger als 16% als Sulphat wiedergewonnen wurde.

Die vielen hier beschriebenen Versuche können keinen Zweifel zurücklassen, dass der Säuregehalt der Edestinpräparate hauptsächlich durch Salzsäure und Schwefelsäure verursacht wird, und dass durch Neutralisation gegen Lackmus nur ein Theil der gebundenen Säuren entfernt wird.

Was die Natur der organischen Säure anbetrifft, die in allen beschriebenen Salzen vorhanden war, so ist keine Auskunft darüber erlangt worden, da zu wenig vorhanden war, um sie zu erkennen.

Um zu bestimmen, ob diese organische Säure in Wirklichkeit eine mit der Proteinsubstanz verbundene Säure oder das Ergebniss übermässiger Alkaliwirkung auf das Edestin war, zog ich Hanfsamenmehl mit 10%iger Kochsalzlösung aus, die genügend Baryt enthielt, um zu bewirken, dass das Extract sich gerade neutral gegen Lackmus verhielt, und fällte dann das Edestin aus dem filtrirten Extract durch Dialyse gegen destillirtes Wasser aus.

Das so erlangte krystallinische Produkt wurde gründlich

mit Wasser gewaschen, in Kochsalzlösung gelöst, wieder durch Dialyse gefällt und in ausgiebigem Maasse mit Wasser gewaschen. Das feuchte Produkt wurde dann in Wasser suspendirt, gegen Phenolphthalein durch Zusatz von sehr verdünnter Kalilauge neutral gemacht, abfiltrirt und in 10%iger Kochsalzlösung wieder aufgelöst. Die so erhaltene Lösung wurde mit einem gleichen Volumen derselben Kochsalzlösung gemischt, die Salzsäure enthielt, welche dem vorhin zum Neutralisiren gebrauchten Kaliumhydrat äquivalent war, und die Lösung dialysirt. Der krystallisirte Niederschlag wurde abfiltrirt, gewaschen und wie vorher neutralisirt, und das ganze Verfahren nochmals wiederholt. Die drei Lösungen, die von den drei aufeinander folgenden, durch Neutralisation bewirkten Edestinpräcipitaten abfiltrirt waren, wurden verdunstet und die Rückstände analysirt:

Tabelle XI.

Zusammensetzung der Salzmengen, welche durch drei aufeinander folgende Neutralisationen eines Edestinpräparats erhalten wurden.

	I. Procent	II. Procent	III. Procent
Kaliumcarbonat . . . . .	7,4	5,1	0,8
Kaliumsulphat . . . . .	4,4	2,6	23,0
Kaliumchlorid . . . . .	82,8	80,6	71,3
Natriumchlorid . . . . .	—	5,2	3,6
Unbestimmt . . . . .	5,4	6,5	1,3
Summe . . . . .	100,0	100,0	100,0

Diese Zahlen zeigen, dass die organische Kaliumverbindung thatsächlich nach der dritten Fällung verschwand, und daher ist es höchst wahrscheinlich, dass dies ein Salz einer vorher mit dem Edestin verbundenen Säure ist und kein Zersetzungsprodukt des Eiweisskörpers selbst.

### 3. Die Mengenverhältnisse der mit Edestin verbundenen Säure.

Seite 244 habe ich gezeigt, dass von einer grossen Anzahl von Edestinpräparaten alle ohne Ausnahme sauer gegen

Phenolphthalein sind und dass viele von ihnen auch gegen Lackmus sauer reagiren. Einige von diesen Präparaten sind entschieden saurer als andere. Die meisten von den saureren enthalten mehr in Wasser lösliche Substanz als die weniger sauren. Einige jedoch von den sauersten sind in Wasser gänzlich unlöslich. Diese letzteren waren immer diejenigen, welche aus ammonsulphathaltigen Lösungen ausgefällt waren und bei der Neutralisation auch Kaliumsulfat lieferten: wohingegen die andern, welche in Wasser lösliche Substanz enthielten, bei der Neutralisation hauptsächlich Kaliumchlorid abgaben.

Es ist aber auch in quantitativer Hinsicht, d. h. bezüglich des Säuregrades, ein Unterschied vorhanden zwischen dem wasserlöslichen und dem unlöslichen Antheil des Präparats. In über 100 Versuchen habe ich ausnahmslos gefunden, dass der Säuregehalt des in Wasser löslichen Theils sehr annähernd 1,4 cem.  $n/10$  Normal-säure auf das Gramm des gelösten Edestins entspricht, während der des ungelösten Theils nur halb so gross war, vorausgesetzt, dass das geprüfte Präparat ohne Anwendung von Ammoniumsulfat bereitet war. Zur Erläuterung mag das folgende Experiment angeführt werden.

Ein Edestinpräparat wurde durch Abkühlen eines warmen Kochsalzextracts aus Hanfsamen bereitet und das Präcipitat wiederholt aus warmer verdünnter Salzlösung umkrystallisirt. Die Substanz wurde dann durch Decantation mit Wasser gewaschen. Das erste, zweite und dritte Washwasser enthielten infolge ihres Salzgehalts kein Edestin, aber das vierte und fünfte enthielten etwas.

Es war nothwendig, 0,8 cem.  $n/10$  Kalilauge zu 10 cem. des vierten Washwassers hinzuzusetzen, um eine neutrale Reaction gegen Phenolphthalein zu erzielen, während genau die doppelte Menge für 20 cem. erforderlich war. 10 cem. der Flüssigkeit enthielt 0,5777 g Edestin, bei  $110^{\circ}$  getrocknet, so dass 1,0 g des löslichen Edestins 1,39 cem.  $n/10$  Alkali neutralisirte. Aehnlich erforderten 25 cem. des fünften Washwassers, welches 0,5320 g enthielt, zur Neutralisirung 0,7 cem.  $n/10$  Alkali, somit für das Gramm 1,32 cem.

18 g desjenigen Theils des Originalpräparats, welcher sich bei erschöpfender Behandlung mit Wasser nicht auflöste, wurde genau neutral gegen Phenolphthalein durch 12 ccm.  $n_{10}$  Alkali oder 0,66 ccm. auf das Gramm — das heisst, genau durch die Hälfte der Alkalimenge, die beim löslichen Theil erforderlich war.

Ferner erforderte ein anderes Edestinquantum, aus dem alle in Wasser löslichen Verbindungen entfernt worden waren, und welches endlich, bei  $110^{\circ}$  getrocknet, 21,27 g wog, wenn neuerdings gewaschen und nicht getrocknet, 16,6 ccm.  $n_{10}$  Alkali zur Neutralisation gegen Phenolphthalein oder 0,78 ccm.  $n_{10}$  Alkali für jedes Gramm Protein.

Auf Seite 256 ist die Methode beschrieben, durch welche ein Theil des Präparats 23, der, neutralisirt, hauptsächlich Sulphat abgibt, in ein krystallinisches Präparat verwandelt wurde, das hauptsächlich Chlorid abgibt. Das so dargestellte Produkt wurde erschöpfend mit Wasser behandelt, bis nichts mehr daraus entfernt wurde, sodann wurde derjenige Theil, welcher ungelöst blieb, gleichförmig in Wasser suspendirt, 10 ccm. der Flüssigkeit entnommen und in einer zugestöpselten Flasche mit 1,5 ccm.  $n_{10}$  Kalilauge und Phenolphthalein vermischt. Es bildete sich sogleich eine klare, rothe Lösung, die 0,95 ccm.  $n_{10}$  Salzsäure zur Neutralisation erforderte. Somit ergab sich, dass 0,55 ccm. von dem Alkali durch die mit dem Edestin verbundene Säure neutralisirt worden war. Durch Verdunsten und durch Trocknen des Rückstandes bei  $110^{\circ}$  wurde gefunden, dass die 10 ccm. 0,8152 g Edestin enthielten, woraus ersichtlich ist, dass ein Gramm der in Wasser unlöslichen Mischung einen Säuregehalt hatte, der 0,68 ccm.  $n_{10}$  Säure entspricht. Zwei andere ähnliche Versuche ergaben genau das gleiche Resultat. 10 ccm. der Mischung wurden mit 10 ccm. 20% iger Kochsalzlösung gemischt, nach Zusatz von Phenolphthalein wurde darauf  $n_{10}$  Kalilauge bis zur leichten rosa Färbung hinzugefügt, hierfür waren gleichfalls 0,55 ccm. erforderlich.

In Wasser aufgelöste Edestinpräparate, die mit einer zur Lösung ungenügenden Menge Salzsäure behandelt werden,

ergeben Lösungen mit einem Säuregehalt gleich 1,4 ccm.  $n_{10}$  Lösung auf das Gramm des gelösten Proteins.

Aus allen diesen Thatsachen ist klar ersichtlich, dass der Säuregehalt des in Wasser löslichen Edestinchlorids doppelt so gross ist wie der des unlöslichen Theils.

Wenn das Edestinmolekül zwei Atome Schwefel enthält, muss das Molekulargewicht 7250 oder ein Vielfaches davon tragen. Wenn der Säuregehalt des in Wasser löslichen Edestins gleich 1,4 ccm.  $n_{10}$  Säure auf das Gramm ist, und wenn ein Molekül Säure sich mit einem Molekül Edestin verbindet, um eine in Wasser lösliche Zusammensetzung zu bilden, würde das Molekulargewicht des Edestins 7129 sein. Aber da das in Wasser lösliche Edestin zweimal so sauer ist als das in Wasser unlösliche, so muss das erstere wenigstens 2 Moleküle Säure enthalten, so dass das Molekulargewicht des Edestins ungefähr 14258 oder ein Vielfaches davon sein muss.

Wir haben so in diesen 2 Säureverbindungen eine rationelle Erklärung für die von Ritthausen zuerst beobachtete Thatsache, dass ein Theil der meisten Edestinpräparate in Wasser löslich ist, während der Rest darin unlöslich ist. Dass dies einem chemischen Unterschiede zwischen diesen zwei Theilen zuzuschreiben ist, war höchst wahrscheinlich; trotzdem bestanden die Präparate, die dieses Verhalten zeigten, gänzlich aus gleichartig gestalteten Krystallen.

Dass diese zwei Verbindungen von verschiedener Zusammensetzung sowohl als die übrigen Salze und das freie Edestin in derselben Form krystallisiren, steht zu erwarten, da die Form des Krystalls durch das Proteinmolekül bestimmt wird, dessen Gewicht überaus gross ist im Vergleich mit dem von einem oder zwei damit verbundenen Säuremolekülen. Dasselbe Verhältniss findet sich bei den Verbindungen des Hämoglobins, da die Krystalle des Kohlenoxydhämoglobins denjenigen des Oxyhämoglobins gleich gestaltet sind. Dieselbe Isomorphie tritt uns auch bei Mineralien von hohem Molekulargewicht entgegen, wie es von Penfield und Foote (Penfield und Foote, Amer. Jour. Science, 8, 122, 1899) gezeigt wird, welche bemerken: «In Turmalin haben wir eine isomorphe

Verwandtschaft von sehr eigenthümlicher Natur; denn in der Säure  $H_9Al_3(BoH)_2Si_4O_9$  können die neun Wasserstoffe in weitgehendem Maasse durch das dreiwerthige Metall Aluminium oder durch die zweiwerthigen Metalle Magnesium und Eisen ersetzt werden, ohne irgend eine entschiedene Veränderung in der krystallinischen Form hervorzubringen. Dies lenkt die Aufmerksamkeit auf eine gewisse Art von Isomorphie, die, wie uns scheint, noch nicht mit genügender Sorgfalt beobachtet worden ist, nämlich die Massenwirkung der die Krystallisation beeinflussenden und prüfenden zusammengesetzten Radicalen.»

Wenn dies der Fall bei einer Mineralsäure ist, die nur (41) n Atome enthält, so dürfen wir sicher erwarten, dass der Masseneinfluss eines Moleküls, das annähernd (2000) n Atome enthält, durchaus massgebend ist.

#### 4. Verhalten des Edestins zu grösseren Säuremengen.

Es ist seit Langem bekannt, dass Proteinsubstanzen sich mit Säuren verbinden, und es ist allgemein gebräuchlich, die Menge der mit Produkten der gastrischen Verdauung verbundenen Säuren zu bestimmen. In diesen Produkten wird jedoch die Säure hauptsächlich durch Proteosen und Peptone in Verbindung gehalten, also durch Substanzen, die bekanntlich stärker basische Eigenschaften haben, als die natürlichen Proteine, von welchen sie herkommen. Panormoff<sup>1)</sup> hat vor Kurzem bestimmte Verbindungen von Ovalbumin mit verschiedenen Säuren beschrieben; aber diese enthalten eine viel grössere Menge Säure als die eben beschriebenen Edestinverbindungen und sind zweifellos Verbindungen anderer Ordnung. (Siehe vorstehende Abhandlung.)

Ich habe jedoch den Beweis geliefert, dass Edestin auch mit ähnlich grossen Säuremengen Reactionen eingeht.

Das Studium der Wirkung von Wasser und Säuren auf Edestin hat gezeigt, dass eine hydrolytische Zersetzung des Edestinmoleküls hervorgerufen werden kann, durch welche ein

<sup>1)</sup> Panormoff. Journ. der Russ. physiol.-chem. Gesellsch., 31, 556.

stärker basisches Derivat gebildet wird, welches mit Alkalien und Salzlösungen ein Verhalten zeigt, das von dem des ursprünglichen unzersetzten Edestins gänzlich verschieden ist. Es ist daher wahrscheinlich, dass diese säurereicheren Verbindungen nicht Edestinsalze, sondern Salze eines stärkeren basischen Zersetzungsproduktes sind, das eine Zwischenstufe in der Umwandlung darstellt und einen Uebergang zum sogenannten «Acidalbumin» bildet. Ob diese Verwandlung auch bei den anderen «genuinen Proteiden» stattfindet oder nicht, habe ich mit Sicherheit bis jetzt nicht feststellen können; aber es ist wahrscheinlich, dass es so ist.

Die zu der Auffindung dieses Produkts führenden Versuche sind in der vorangehenden Abhandlung mitgeteilt.

Die Edestinpräparate 11, 12 und 13 wurden in Mengen von je 1 g (lufttrocken) in Wasser suspendirt und nach und nach mit  $n/10$  Salzsäure versetzt, bis ein Tropfen der Lösung, auf Porzellan verdunstet, mit Tropäolin eine deutliche rothe Reaction zeigte: hierzu waren jedesmal 12 ccm. nöthig. Die Prüfungen wurden dann wiederholt, indem jeder Lösung 41 ccm. Säure zugesetzt und darauf diese Menge durch allmählichen Zusatz in Mengen von je 0,2 ccm. unter fortwährender Prüfung mit Tropäolin vermehrt wurde. Hierbei erforderte 1 g von Präparat 11 11,2 ccm., von Präparat 12 11,5 ccm. und von Präparat 13 11,3 ccm. Indem wir diese Zahlen für die bei  $110^{\circ}$  getrockneten und aschefreien Präparate berechneten und die ursprünglich in ihnen enthaltene Säure dazusetzten, fanden wir, dass 11 13,9 ccm. erfordert hatte, 12 13,7 ccm. und 13 14,1 ccm., eine Menge, die fast genau einer Verbindung von einem Edestinmolekül mit 20 Säuremolekülen entspricht; angenommen, dass dieses Protein ein Molekulargewicht von annähernd 14500 hat oder, in anderen Worten, genau zehnmal der Säuremenge entspricht, die erforderlich ist, eine lösliche Verbindung mit 1 g Edestin zu bilden. Ein schlagender Beweis für die Richtigkeit dieser Annahme wurde durch Prüfung mit Kaliumnitrat und Jod erlangt.

Eine Reihe von fünf Ein-Gramm-Portionen von Präparat 11 wurden in kleinen, glasgestöpselten Flaschen in Wasser suspen-

dirt und denselben je 4 ccm., 5 ccm., 6 ccm., 6,5 ccm. und 7,5 ccm.  $n/10$  Salzsäure hinzugesetzt, worauf noch jeder einzelnen Portion 7,5 ccm. einer Lösung von löslicher Stärke, die 1% Kaliumjod und 1% Kaliumnitrit enthielt, zugesetzt wurde.

Die 7,5 ccm. Säure enthaltende Portion wurde in 5 Minuten durch und durch blau, indem die Farbe zuerst an dem oberen Theil der Lösung erschien; diejenige mit 6,5 ccm. fing in  $1\frac{1}{2}$  Minuten an, am oberen Theil blau zu werden, und wurde innerhalb 12 Minuten ganz blau; diejenige mit 6 ccm. zeigte nach 5 Minuten an der Oberfläche eine Spur von blau, die selbst nach 30 Minuten nur sehr leicht war und sich auf die äusserste Oberfläche beschränkte; diejenige mit 5 ccm. zeigte nach 15 Minuten an der Oberfläche eine Spur von blau, die noch nach  $1\frac{1}{2}$  Stunden leicht war; diejenige mit 4 ccm. verhielt sich wie die mit 5 ccm., mit der Ausnahme, dass sich beim Hinzufügen der Nitritlösung ein starker, bleibender Niederschlag bildete, wohingegen alle anderen Lösungen fast ganz klar blieben. Nachdem sie über Nacht in den zugestopselten Flaschen stehen gelassen waren, war der Unterschied zwischen den einzelnen Portionen viel ausgesprochener; denn aus denen, zu welchen 4, 5 und 6 ccm. Säure hinzugefügt worden war, hatte sich eine undurchsichtige gelbliche Gallerte abgeschieden, über welcher sich eine klare, blaue Gallerte befand, wohingegen die Portion mit 6,5 ccm. eine dünne, blaue Gallerte bildete, die nur wenig von der undurchsichtigen Substanz enthielt und einen gänzlich verschiedenen Anblick gegenüber derjenigen mit 6 ccm. und weniger darbot.

Daraus würde hervorgehen, dass dieses Edestinpräparat sich inniger mit den Wasserstoffionen, die in 6 ccm.  $n/10$  Salzsäure enthalten waren, verband, als mit denjenigen, die in grösseren Mengen enthalten waren. Wenn wir die ursprünglich mit dem Edestin verbundene Säure hinzusetzen, können wir schliessen, dass die 7 ccm. Säure entsprechenden Wasserstoffionen inniger mit dem Edestin verbunden wurden als diejenigen, die in grösseren Mengen enthalten waren.

### 5. Löslichkeit des Edestins in Salzsäure.

Nachdem ich gefunden hatte, dass Edestin mit Salzsäure ein in Wasser lösliches Salz bildet, unternahm ich es, die durch bestimmte Mengen dieser Säure aufgelöste Quantität zu bestimmen. Hierzu war es nöthig, ein Präparat darzustellen, das gegen Phenolphthalein so neutral wie möglich war und das zugleich frei von irgend einem hydrolytischen Zersetzungsprodukt von Edestin (s. Seite 262) und so frei wie möglich von Asche war.

Dies wird erreicht durch Ausziehen von ölfreiem Hanfsamenmehl mit 3%iger Kochsalzlösung von 60°, der so viel gesättigte Barytlösung hinzugesetzt wurde, um den Auszug neutral gegen Lackmus zu machen. Die hierzu erforderliche Menge war durch ein einleitendes Experiment mit 100 g von dem Mehl bestimmt worden. Es ist wichtig, einen Ueberschuss von Baryt zu vermeiden, da sonst Verbindungen von Edestin mit basischen Bestandtheilen des Samens sich zu bilden scheinen, die man später nur mit Schwierigkeit entfernen kann.

Der heisse Auszug wird durch grobes Tuch colirt und der Rückstand abgepresst. Der sehr trübe Auszug wird auf grosse Papierfilter gebracht und ungefähr 2 Stunden ruhig stehen gelassen. Während dieser Zeit filtrirt ein Theil des Extractes durch und der Rückstand setzt sich in den Trichtern ab, so dass ungefähr zwei Drittel der Lösung als trübe Flüssigkeit abgezogen werden kann, welche letztere nur wenig suspendirte Materie enthält. Diese Lösung wird durch dicke Lagen von Filterstoff und perforirte, in weite Trichter gestellte Porzellanteller filtrirt, nachdem der ganze Apparat vorher mit 3%iger Salzlösung von 70° C. ausgewaschen war. Durch eine derartige Filtration kann dieser Theil der Lösung schnell vollkommen klar erhalten werden, auch kann das Filter mit heisser verdünnter Salzlösung ausgewaschen werden, da in 2 Stunden 2 Liter durch jedes Filter hindurchgehen. Während dieser Zeit geht das meiste von dem rückständigen Extract durch die Papierfilter, so dass der Filterrückstand ohne erheblichen Verlust fortgeworfen werden kann. Die klaren Auszüge werden in einer glasgestöpselten Flasche vereinigt und über

Nacht stehen gelassen, um auf  $5^{\circ}$  oder eine niedrigere Temperatur abzukühlen. Das Edestin scheidet sich in Gestalt eines dichten Bodensatzes von Krystallen aus, von welchem die Lösung mittels Hebers abgetrennt wird. Da bei weiterer Verdünnung und Abkühlung nur wenig ausfällt, so wird die abgeheberte Flüssigkeit weggegossen.

Das krystallisirte Edestin wird zunächst in 10%iger Salzlösung aufgelöst, am besten durch Zusatz eines Volumens 20%iger Lösung, welches der bei den Krystallen nach dem Abhebern zurückbleibenden Flüssigkeit gleich ist. Dann fügt man so viel 10%ige Salzlösung hinzu, dass die Lösung etwa 8% Edestin enthält, da stärkere Lösungen bei der weiteren Behandlung in der Regel nicht so gut krystallisirte Produkte liefern. Diese Edestinkochsalzlösung wird auf  $50^{\circ}$  erhitzt und nach und nach mit 2 Volumen Wasser derselben Temperatur verdünnt, wodurch eine vollkommen klare Lösung erzielt wird. Beim Wiederabkühlen auf  $5^{\circ}$  scheidet sich das Edestin krystallisirt aus. Durch Wiederholung dieses Verfahrens wird ein sehr reines krystallinisches Produkt gewonnen, welches wieder in genügend 10%iger Kochsalzlösung, die frei von Kohlensäure ist, aufgelöst wird, um eine 8%ige Edestinlösung herzustellen. Ein aliquoter Theil dieser Lösung wird mit  $n/10$  Natronlauge gegen Phenolphthalein neutralisirt und die zum Neutralisiren des Ganzen nöthige Menge Alkali bestimmt. Die Edestinlösung wird dann in einem mit Glasstöpsel versehenen Gefäss auf  $50^{\circ}$  erhitzt und das doppelte Volumen kohlenstoffreies Wasser derselben Temperatur, das 4 oder 5 cem. mehr als die berechnete Menge von  $n/10$  Alkali enthält, nach und nach hinzugesetzt. Die sorgfältig gegen Kohlensäure geschützte Mischung wird während der Nacht zum Abkühlen auf  $5^{\circ}$  stehen gelassen, die fast klare Lösung mittelst Stechheber entfernt und der krystallinische Niederschlag gesammelt auf ein Stück dicken gehärteten Filterpapiers von Schleicher und Schüll auf einen perforirten Teller gelegt. Das aus Krystallen bestehende Präcipitat wird sehr schnell nahezu trocken gesaugt und zwei- oder dreimal mit 1%iger kohlenstofffreier und auf  $0^{\circ}$  gekühlter Kochsalzlösung, dann dreimal

mit kohlenstoffreiem Wasser, zehnmal mit 70%igem Alkohol und oftmals mit absolutem Alkohol gewaschen, das Waschwasser und der Alkohol müssen eine Temperatur von 0° haben. Es ist nöthig, dass das Auswaschen vollständig und die Wasserentziehung mit absolutem Alkohol gründlich ist, so dass nach dem Trocknen über Schwefelsäure kein Wasser zurückbleibt, nachdem der Alkohol entfernt ist, da das Wasser einen Theil des Edestins in unlösliches Edestan verwandeln würde.

In Folge der physikalischen Beschaffenheit des krystallinischen Edestins kann die Filtration, das Waschen und die Trocknung von 50—100 g des Präparates innerhalb 20 Minuten vollendet werden. Auf diese Weise bereitete Präparate waren entweder ganz oder sehr annähernd neutral gegen Phenolphthalein und gänzlich löslich in Salzlösung, sie enthielten nicht mehr als 0,02—0,03% Asche und bestanden aus feinen, klumpenfreien Pulvern, welche gleichförmig in Wasser suspendirt werden können und sich fast augenblicklich durch die erforderliche Menge von Säure, Alkalien oder Salzen auflösen lassen.

Es ist sehr schwierig, zu verhindern, dass das Edestin sich mit geringen Spuren Kohlensäure verbindet, da es ohne Anwendung umständlicher und unbequemer Apparate unvermeidlich ist, dasselbe eine kurze Zeit der Luft auszusetzen. Zum Schluss waren 1 bis 2 ccm.  $n/100$  Alkali erforderlich, um 1 g der meisten so bereiteten Präparate zu neutralisiren.

Dieses Verfahren ist ausführlich beschrieben, da ich nicht im Stande war, ein passendes Edestin für die zunächst zu beschreibenden Experimente herzustellen, bis ich diese Darstellungsmethode in allen ihren Einzelheiten ausgearbeitet habe.

Eine Reihe Grammportionen von Präparat 28, wie soeben beschrieben, bereitete, wurden in glasgestöpselten Flaschen in genügend Wasser suspendirt, um mit der später hinzugefügten Säure ein Volumen von 20 ccm. auszumachen. Zu einer Portion wurde keine Säure hinzugesetzt, zu der nächsten 2 ccm.  $n/100$  Salzsäure, zu der nächsten 3 ccm. und dann 1 ccm. mehr zu jeder folgenden Portion, bis zu 14 ccm.

Eine zweite genau gleiche Reihe wurde ebenfalls, mit 6 ccm. beginnend, bereitete.

Nachdem der Inhalt der Flaschen während ungefähr zwei Stunden häufig umgeschüttelt war, wurden sie zwei weitere Stunden ruhig stehen gelassen, bis die suspendirte Substanz völlig abgelagert war. Von jeder Lösung wurden 10 ccm. mit einer Pipette entnommen, der Säuregehalt einer jeden solchen 10 ccm. betragenden Menge mit  $n/100$  Kalilauge bestimmt und dann alle getrennt auf einem Wasserbad bis zur Trockenheit verdunstet und die Rückstände bei  $110^{\circ}$  zu constantem Gewicht getrocknet. Auf diese Weise wurden die in der folgenden Tabelle gegebenen Resultate gewonnen.

Tabelle XII.

Durch  $n/100$  Salzsäure gelöstes Edestin.

	0 ccm.	2 ccm.	3 ccm.	4 ccm.	5 ccm.	6 ccm.	7 ccm.	HCl 100
I	0,0104	0,0082	0,0504	0,0526	0,0718	0,1400	0,1876	g
II	—	—	—	—	—	0,1460	0,1702	g
	8 ccm.	9 ccm.	10 ccm.	11 ccm.	12 ccm.	13 ccm.	14 ccm.	HCl 100
I	0,2576	0,3362	0,4358	0,5850	0,6816	0,7650	0,8406	g
II	0,2458	0,3378	0,4336	0,5636	0,6590	0,7350	0,8080	g

Der Säuregehalt der Lösungen und der Rückstände von Reihe I wurde durch Titrirung mit  $n/100$  Alkali und Phenolphthalein mit folgenden Resultaten bestimmt:

Tabelle XIII.

Vertheilung der Säure zwischen gelöstem und ungelöstem Edestin in  $n/100$  Säure ausgedrückt.

0 ccm.	2 ccm.	3 ccm.	4 ccm.	5 ccm.	6 ccm.	7 ccm.	HCl 100
ccm.							
0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	1,8	2,6	Gelöst.
1,3	2,9	3,6	4,5	5,0	4,25	4,4	Ungelöst.
1,3	2,9	3,6	4,5	5,5	6,02	7,0	Gesammtmenge.

8 ccm.	9 ccm.	10 ccm.	11 ccm.	12 ccm.	13 ccm.	14 ccm.	$\frac{\text{HCl}}{100}$
ccm.	ccm.	ccm.	ccm.	ccm.	ccm.	ccm.	
3,9	5,0	6,8	8,6	10,6	12,2	13,6	Gelöst.
4,4	4,0	3,6	2,4	1,9	1,0	0,8	Ungelöst.
8,3	9,0	10,4	11,0	12,5	13,2	14,4	Gesamtmenge.

Der Grad des Säuregehalts des gelösten und ungelösten Edestins — das heisst: der Betrag an n/100 Alkali, der neutralisirt wird von 1 g des in der Lösung und den Rückständen von jeder einzelnen dieser Portionen enthaltenen Edestins — ist in der folgenden Tabelle gegeben.

Tabelle XIV.

Der 1 g des gelösten und ungelösten Edestins von Tabelle XIII entsprechende Säuregehalt.

0 ccm.	2 ccm.	3 ccm.	4 ccm.	5 ccm.	6 ccm.	7 ccm.	$\frac{\text{HCl}}{100}$
ccm.							
0,0	0,0	0,0	0,0	6,0	11,8	13,0	Gelöst.
4,5	3,3	4,3	5,4	6,4	6,8	6,4	Ungelöst.

8 ccm.	9 ccm.	10 ccm.	11 ccm.	12 ccm.	13 ccm.	14 ccm.	$\frac{\text{HCl}}{100}$
ccm.	ccm.	ccm.	ccm.	ccm.	ccm.	ccm.	
14,4	14,3	15,1	14,0	15,1	15,6	16,0	Gelöst.
7,0	7,3	8,0	8,0	9,4	8,5	—	Ungelöst.

Aus dieser Tabelle geht hervor, dass 1 g der Substanz in den Lösungen, zu welchen von 7—13 ccm. Säure hinzugefügt worden war, fast dasjenige Quantum n/100 Alkali neutralisirte, welches für eine Verbindung von einem Molekül Edestin mit zwei Molekülen Salzsäure berechnet wird, vorausgesetzt, dass das Edestin ein Molekulargewicht von etwa 14500 hatte. Diese Menge beträgt 13,8 ccm.

Da die Edestinmenge in vielen von diesen Portionen klein war, so sind diese Bestimmungen meistens nur annähernd richtig. Wie schon festgestellt, wurde eine Hälfte von jeder dieser Lösungen bei diesen Experimenten mit der Pipette abgezogen und der Säuregehalt und die Menge der gelösten Materie wurde, wie oben gezeigt, gefunden.

Um bei Anwendung einer grösseren Substanzmenge den Säuregehalt des gelösten Edestins genauer zu bestimmen, wurde der Rest jener Lösungen von Reihe I, zu welchen 7—13 ccm. zugesetzt worden war, von dem ungelösten Edestin decantirt, vereinigt und durch 20 ccm.  $n/100$  Kalilauge neutralisirt. Durch Verdunsten und Trocknen des Rückstandes bei  $110^{\circ}$  wurde gefunden, dass diese Lösung 1,4459 g Edestin enthielt, einem Säuregehalt = 13,8 ccm.  $n/100$  Alkali auf das Gramm oder genau dem oben berechneten entsprechend. Aehnlich wurden die übrigen Lösungen von Reihe II durch 25 ccm.  $n/100$  Alkali neutralisirt und enthielten 1,6941 g Edestin, einem Säuregehalt von 14,7 ccm. auf das Gramm entsprechend.

Aus diesen Thatsachen geht hervor, dass die durch die Säure in Auflösung gebrachte Substanz den Säuregehalt eines Dichlorids hat.

Der Säuregehalt des ungelösten Edestins nimmt mit jeder Zunahme an zugesetzter Säure ebenfalls zu, bis er in der 6 ccm. enthaltenden Portion 6,8 ccm. auf das Gramm erreicht, welches der Bildung eines Monochlorids entspricht.

Wenn grössere Mengen Säure hinzugefügt werden, bleibt dieser Säuregehalt des ungelösten Edestins fast unverändert, nur eine sehr geringe Zunahme desselben ist bemerkbar. Dieser Ueberschuss an Säure über das Monochlorid wird durch die Bildung einer kleinen Menge eines hydrolytischen Umwandlungsproduktes vom Edestin, die ich als Edestan bezeichnet habe, hervorgerufen. Edestan hat eine höhere säurebindende Kraft als Edestin und bildet mit Säure ein Salz, das sehr schwer in Wasser löslich ist. Die Bildung und die Eigenschaften des Edestans sind eingehend in der vorhergehenden Abhandlung beschrieben.

Tabelle XII zeigt, dass eine kleine Menge Edestin an-

scheinend, sowohl von Wasser, welchem keine Säure hinzugesetzt wurde, als auch von einer solchen, der 2 ccm. zugesetzt worden waren, aufgelöst wurde. Dieses kleine Quantum ist einer geringen Menge an suspendirter Materie zuzuschreiben, die mit der Lösung abgezogen wurde, und ist nicht als gelöstes Edestin zu betrachten. In den 3, 4 und 5 ccm. Säure enthaltenden Portionen scheint etwas Edestin aufgelöst zu sein; aber da diese, im Gegensatz zu den anderen, opalisirend und neutral waren, so ist es höchst wahrscheinlich, dass sie collodiale oder falsche Lösungen waren, die durch Edestin verursacht wurden, welches durch einen localen grossen Ueberschuss an Säure in Auflösung versetzt wurde, wobei die Säure nachträglich durch die Berührung mit freiem Edestin wieder entfernt war.

Durch 6 ccm. wurde etwas Edestin aufgelöst; aber der geringere Säuregehalt dieser Portion zeigt, dass die ganze Menge nicht durch die Säure in Lösung gebracht war. Von 6 ccm. aufwärts ging eine gleichförmig zunehmende Menge Edestin in Lösung über, bis nur ein unmerklicher Betrag bei Anwendung von 14 ccm. ungelöst zurückblieb. Wenn Edestin ein Molekulargewicht von 14500 hat und mit einem Molekül Salzsäure ein unlösliches Chlorid bildet, so würden etwa 6 ccm.  $\frac{1}{100}$  Salzsäure 1 g eines lufttrockenen Präparats in dieses Chlorid verwandeln. Aus Tabelle XII ist ersichtlich, dass das Edestin sich mit weniger als 6 ccm. Säure nicht auflöst. Genau genommen, sollte sich mit weniger als 7 ccm. nichts auflösen, aber dieses Präparat hatte selbst einen Säuregehalt von ungefähr 1 ccm. für das Gramm, denn die Wasserstoffionen theilten sich in einer so verdünnten Lösung zugleich mit denen der Salzsäure an der Bindung des Edestins, daher wurde eine entsprechende Menge gelöst. Dass diese lösliche Säureverbindung von Edestin doppelt so viel Säuremoleküle enthält, als die unlösliche Säureverbindung, ergibt sich aus dem Verhältniss der in Lösung gegangenen Säure zu der gesammten hinzugefügten Säure. So neutralisirte die durch 10 ccm. Säure erhaltene Lösung 1,80 ccm. mehr Alkali als die durch 9 ccm. erhaltene, obgleich nur 1 ccm. mehr Säure hinzugesetzt worden war: die mit 11 ccm. versetzte ebenfalls 1,80 ccm. mehr

Alkali, als die mit 10 ccm. versetzte; nach Zusatz von 12 ccm. neutralisirte die Lösung 2 ccm. mehr Alkali, als die nach Zusatz von 11 ccm.; das heisst, nachdem alles Edestin in das unlösliche Chlorid verwandelt war, brachte jedes in der Folge hinzugesetzte Säuremolekül ein anderes Säuremolekül, das vorher mit dem Edestin als ein unlösliches Chlorid verbunden gewesen war, zur Auflösung.

Wenn das Edestin ein Molekulargewicht von etwa 14500 hat, so sollte jedes Cubikcentimeter  $n/100$  Säure 0,1450 g auflösen. Thatsächlich bleibt aber die aufgelöste Menge hinter dieser Zahl zurück, da sich ein stärker basisches Umwandlungsprodukt, das Edestan (s. Seite 270), bildet.

Edestan bildet mit grösseren Säuremengen Salze, die im Vergleich mit denen des Edestins weniger löslich sind. Bei diesen Experimenten wurde ungefähr 8% Edestan gebildet und folglich war der Betrag an gelöstem Edestin für jedes Cubikcentimeter Säure geringer als berechnet.

Aus diesen Ergebnissen ist zu entnehmen, dass Edestin wie eine richtige Basis, Ionenreactionen mit Salzsäure eingeht. Dass eine schwache Basis sich in solch vollständiger Reaction mit Salzsäure erkennen lässt, ist der Verdünnung der Lösung zuzuschreiben: denn wenn das Molekulargewicht des Edestins 14500 beträgt, so ist eine Lösung, die 5% dieser Substanz enthält, fast äquivalent einer  $1/300$  Normallösung.

Diese Methode zur Bestimmung der Menge des durch Salzsäure in Lösung gebrachten Edestins wurde weiterhin auf die salzsauren Verbindungen angewandt, die durch die früher angewandte Methode gewonnen waren. Der einzige Unterschied in der Ausführung dieser Versuche bestand darin, dass die sauren Lösungen durch kleine Filze von gewaschener Papiermasse mit Hülfe einer Pumpe filtrirt und jedes Filter nebst Rückstand mit 20 ccm. Wasser ausgewaschen wurde.

Da ein Theil jedes dieser Präparate in Wasser löslich war — das heisst, aus wasserlöslicher Säureverbindung von Edestin bestand —, so wurde der in Wasser allein lösliche Antheil von demjenigen abgezogen, der nach Säurezusatz löslich war. Die Differenz ergab die Menge Edestin, die von der

gegebenen Menge Säure gelöst worden war. Die so gewonnenen Resultate sind auf Tabelle XV gegeben.

Tabelle XV.  
Durch n/100 Salzsäure gelöstes Edestinchlorid.

Präparat	1 ccm.	2 ccm.	3 ccm.	4 ccm.	5 ccm.	6 ccm.
Nr. 2 I	0,1041	0,2306	0,3291	0,4726	0,5426	0,6301
II	—	0,2451	0,3279	—	0,5301	0,6025
Nr. 4	0,0920	0,2300	0,3260	0,4425	0,5681	0,6380
Nr. 11 I	0,1194	0,2540	0,3679	0,4445	0,4950	0,5085
II	0,0738	0,1969	0,3398	0,4498	0,5369	0,6068
Nr. 15 I	0,0916	0,2235	0,3250	0,4332	0,5528	0,5762
II	0,1015	0,2291	0,3455	0,4445	0,5365	—
Nr. 20 I	0,1295	0,2655	0,3761	0,4790	0,5115	—
II	0,1140	—	0,3484	—	—	—
III	0,0870	0,2095	0,3335	0,5125	0,6035	—
IV	0,0745	0,2055	0,2935	0,4030	0,4625	—

Mittleres Verhältniss obiger Zahlen.

Nr. 2	0,1041	0,2409	0,3285	0,4726	0,5364	0,6163
Nr. 4	0,0920	0,2300	0,3260	0,4425	0,5681	0,6380
Nr. 11	0,0966	0,2254	0,3539	0,4472	0,5160	0,5577
Nr. 15	0,0966	0,2263	0,3352	0,4388	0,5446	0,5762
Nr. 20	0,1012	0,2268	0,3379	0,4648	0,5258	—

Ogleich beträchtliche Unregelmässigkeiten unter diesen Zahlen bemerkbar sind, so sind die Resultate doch so gleichförmig, wie wir es von ihnen unter den gegebenen Versuchsbedingungen erwarten konnten. Es muss bemerkt werden, dass die grössten Unterschiede in den Fällen gefunden sind,

wo die kleinsten und die grössten Säuremengen angewandt wurden, das heisst, da, wo geringe Abweichungen in den Versuchsbedingungen naturgemäss die grösste Abweichung in den Resultaten hervorrufen mussten.

In der Tabelle wird nur etwa 60% Edestin, als durch die angewendete Säure gelöst, angegeben. Dies ist dem Umstande zuzuschreiben, dass die übrigen 40% aus Wasser, Asche, in Wasser löslichen Säureverbindungen von Edestin und aus einer geringen Menge des hydrolytischen Zersetzungsproduktes, Edestan, welches in Salzlösungen unlöslich ist, bestanden. Es war daher nöthig, nur ungefähr 6 ccm. Säure hinzuzusetzen, um alles in jedem Präparat enthaltene Edestinmonochlorid zur Auflösung zu bringen.

Die folgende Tabelle gibt das mittlere Gewicht in Grammen der auf den Cubikcentimeter  $n/10$  Salzsäure nach jeweiligem Säurezusatz in Lösung enthaltenen Edestinmenge.

Tabelle XVI.

Per Cubikcentimeter  $n/10$  Salzsäure gelöstes Edestinmonochlorid:

Präparat	1 ccm.	2 ccm.	3 ccm.	4 ccm.	5 ccm.	6 ccm.
Nr. 2 . . . . .	0,1041	0,1204	0,1095	0,1181	0,1073	0,1027
Nr. 4 . . . . .	0,0920	0,1150	0,1087	0,1106	0,1136	0,1063
Nr. 11 . . . . .	0,0966	0,1127	0,1179	0,1118	0,1032	0,0920
Nr. 15 . . . . .	0,0920	0,1131	0,1117	0,1097	0,1089	0,0960
Nr. 20 . . . . .	0,1012	0,1164	0,1126	0,1162	0,1052	0,1022

Diese Resultate, obschon nicht so übereinstimmend wie diejenigen, die mit reinem und neutralem Edestin gewonnen wurden, sind dennoch im Einklang mit denselben.

Um zu finden, welche Wirkung die Natur der mit dem Edestin verbundenen Säure auf die Löslichkeit des Edestins in Salzsäure hat, wurde eine ähnliche Reihe von Bestimmungen mit Präparat 13 gemacht, welches grösstentheils aus Edestinsulphat bestand, das durch Sättigung eines Auszugs mit Am-

moniumsulphat und durch Dialyse der Lösung des so erzeugten Niederschlages gewonnen war. Die erlangten Ergebnisse waren folgende:

Tabelle XVII.

Durch  $n/10$  Salzsäure gelöstes Edestinsulphat.

Präparat	0 ccm.	2 ccm.	3 ccm.	4 ccm.	5 ccm.	6 ccm.
Nr. 13 . . . . .	0,0000	0,0150	0,0420	0,0825	0,1500	0,3070
Präparat	7 ccm.	8 ccm.	9 ccm.	10 ccm.	11 ccm.	12 ccm.
Nr. 13 . . . . .	0,4435	0,4776	0,5616	0,6860	0,7521	0,8378

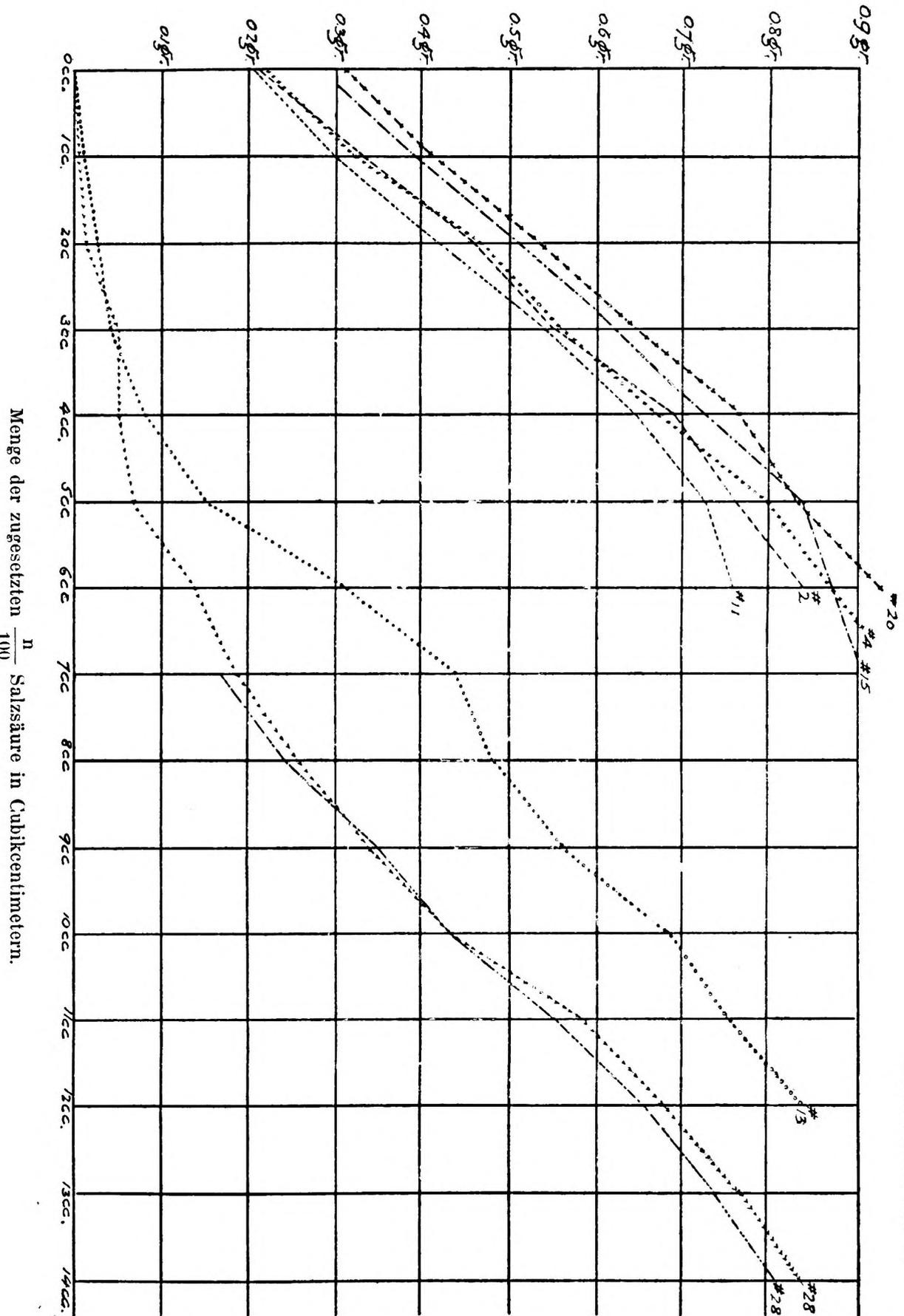
Aus diesen Zahlen ersehen wir, dass sich sehr wenig Edestin mit weniger als 6 ccm. Hydrochlorsäure auflöst — das heisst, es löst sich nicht eher auf, als bis das Sulphat in Chlorid verwandelt worden ist. Ueber 7 ccm. hinaus verhält sich die Lösung analog der des Edestinchlorids. Es ist augenscheinlich, dass die gebundene Schwefelsäure nur wenig zur Lösung des Edestins beiträgt, da das Sulphat dem Dichlorid entsprechend in Wasser unlöslich ist.

Umstehende Curventafel zeigt auf einen Blick die Löslichkeit dieser verschiedenen Edestinpräparate und ihrer Salze.

#### 6. Löslichkeit des Edestins in Schwefelsäure.

Präparat 23, das, wie ich auf Seite 256 gezeigt habe, fast reines Edestinsulphat ist, erforderte nahezu zehnmal so viel  $n/10$  Schwefelsäure zur Lösung, als Edestinchlorid an  $n/10$  Salzsäure erfordert hatte. Es war daher nöthig, eine  $n/10$  Säure anzuwenden, um ähnliche Experimente, wie die eben beschriebenen, auszuführen; aber in der folgenden Tabelle ist der Betrag an Säure, in  $n/100$  Lösung ausgedrückt, festgestellt, um beim Vergleichen der Zahlen mit denjenigen auf den vorhergehenden Tabellen einen Irrthum auszuschliessen. Dieses Präparat hatte einen ursprünglichen Säuregehalt, der 10 ccm.

Menge des gelösten Edestins.



Curventafel Nr. 1.

einer n/100 Lösung auf das Gramm gleich war, und da sich davon nichts in Wasser löste, so ist dieser Betrag an Säure zu demjenigen hinzuaddirt worden, welcher dem Präparat zugesetzt wurde, so dass alle vorhandene Säure, auf die das Edestin reagiren konnte, hier in Anschlag gebracht worden ist.

Tabelle XVIII.

Durch n/100 Schwefelsäure gelöstes Edestinsulphat.

Betrag des Edestinsulphats in Grammen:

Nr. 23	10 ccm.	20 ccm.	30 ccm.	40 ccm.	50 ccm.	60 ccm.	70 ccm.
	0,0000	0,0705	0,1750	0,4355	0,6245	—	0,9075
	0,0000	0,0510	0,2280	0,4740	0,6950	0,8680	0,9088

Betrag des per Cubikcentimeter n/100 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung gelösten Edestinsulphats:

0,0000	0,0035	0,0058	0,0109	0,0125	—	0,0130
0,0000	0,0026	0,0076	0,0118	0,0139	0,0145	0,0130

Säuregehalt der Edestinsulphatlösung:

| ccm. |
|------|------|------|------|------|------|------|
| 0,0  | 3,0  | 6,0  | 18,0 | 33,0 | —    | 67,0 |
| 0,0  | 2,0  | 8,5  | 21,5 | 37,5 | 57,0 | 64,0 |

Säuregehalt der Lösung per Gramm des gelösten Edestins:

| ccm. |
|------|------|------|------|------|------|------|
| 0,0  | 43,0 | 35,3 | 41,3 | 52,9 | —    | 73,7 |
| 0,0  | 32,2 | 37,3 | 45,4 | 54,0 | 65,7 | 71,0 |

Aus diesen Zahlen geht deutlich hervor, dass ein viel grösseres Quantum Schwefelsäure als Salzsäure erforderlich ist, um eine gegebene Menge Edestin aufzulösen. Das Edestinsulphat, welches dem Dichlorid entspricht, ist in Wasser unlöslich. Ob die mit einer genügenden Menge Schwefelsäure gebildete lösliche Verbindung ein Edestinsalz ist, oder ob zuerst ein hydrolytisches Umwandlungsprodukt erzeugt wird, welches

lösliche Verbindungen mit der grösseren Menge Schwefelsäure bildet, wurde nicht festgestellt: aber das Verhalten des Edestins mit Salzsäure spricht für letztere Auffassung.

### 7. Die Löslichkeit des Edestins in Phosphorsäure und Essigsäure.

Phosphorsäure reagirt auf Edestin wie eine einbasische Säure in Uebereinstimmung mit ihrer bekannten Zersetzung in die Ionen  $H^+$  und  $H_2PO_4^-$ .

Ein Gramm des lufttrockenen Präparats, in 6 ccm. Wasser suspendirt, wurde vollständig aufgelöst, als es mit 14 ccm. einer  $n/100$  Lösung von Phosphorsäure behandelt wurde. Mit 13 ccm. wurden 0,8920 g aufgelöst, was sehr annähernd die berechnete Menge, nämlich 0,9230 g ist.

Essigsäure reagirt gleichfalls auf nahezu den berechneten Betrag Edestin, da ich fand, dass 13 ccm.  $n/100$  Lösung 0,8804 g auflösten.

Diese beiden Säuren lösen etwas mehr Edestin auf, als es eine äquivalente Menge Salzsäure thut, von der 13 ccm.  $n/100$  Lösung ungefähr 0,7770 g lösen. Dieser Unterschied scheint der Bildung von verschiedenen Proportionen des basischeren Edestans zu verdanken zu sein, wie es die folgenden Experimente zeigen. Zu drei Grammportionen Edestin, in 6 ccm. Wasser suspendirt, wurden je 14 ccm. einer  $n/100$  Lösung von jeder dieser Säuren hinzugesetzt. Nach ungefähr zweistündigem Stehen bei  $25^\circ$  war die Säure in jeder genau neutralisirt, und ein gleiches Volumen 20%iger Kochsalzlösung wurde hinzugesetzt. Die in der Salzsäureportion gebildete Menge an unlöslichem Edestan betrug 0,1786 g, in der Phosphorsäureportion 0,1484 g und in der Essigsäureportion 0,0565 g. Diese Resultate sind annähernd in Uebereinstimmung mit dem Grade der Ionisirung dieser Säuren und scheinen die relative Unvollständigkeit der Reaction mit den betreffenden Säuren zu erklären.

### 8. Die Löslichkeit des Edestins in Salpetersäure.

Salpetersäure löst Edestinchlorid in fast demselben Verhältniss auf, wie Salzsäure: aber um das neutrale Edestin bei

ungefähr 20° aufzulösen, ist eine grössere Menge von der ersteren Säure erforderlich, als von der letzteren. Bei 35° wurde 1 g neutrales Edestin (lufttrocken, entsprechend 0,9300 g bei 110°) vollständig durch 14 ccm. n/100 Salpetersäure aufgelöst, aber mit 12 ccm. blieb bei dieser Temperatur viel ungelöst zurück. Bei 20° wurde 1 g durch 20 ccm. vollständig aufgelöst, alles mit Ausnahme von sehr wenigen Milligrammen wurde durch 19 ccm. gelöst, während mit 18 ccm. viel ungelöst blieb.

Dieses Säurequantum ist in so naher Uebereinstimmung mit dem für die Bildung eines Trinitrats erforderlichen, dass die Bildung eines solchen als sehr wahrscheinlich gelten muss; freilich steht ein unumstösslicher Beweis dafür noch aus.

Dass eine Verbindung mit zwei Molekülen Salpetersäure vorhanden ist, welche sich in warmem Wasser leichter löst als in kaltem, steht im Einklang mit dem bekannten Verhalten dieser Säure gegen Proteosen, einige andere Proteine und die Histone.

Ein ausgedehnteres Studium dieser Frage ist nöthig und ich werde dasselbe so bald als möglich in Angriff nehmen.

### III. Verbindungen von Edestin und Alkalien.

Es ist wohlbekannt, dass Proteinsubstanzen auf Alkalien ebensowohl wie auf Säuren reagiren, in welcher Hinsicht sie genau den Purinbasen gleichen, die, als ausgesprochene Basen, mit Säuren Salze bilden und auch im Stande sind, gleich schwachen Säuren, mit Basen bestimmte Verbindungen zu bilden.

Viele Versuche sind vergeblich gemacht worden, bestimmte Verbindungsverhältnisse der Proteine mit Basen, besonders mit den schweren Metallen, festzustellen. Die Hauptursache für das Misslingen dieser Versuche liegt darin, dass das kleine Säurequantum, welches diese Substanzen noch enthalten, wenn ihre Lösungen gegen Lackmus neutral gemacht werden, übersehen worden ist, und ferner darin, dass Salze der schweren Metalle hydrolytisch in einem solchen Umfange zersetzt werden, dass es schwierig oder unmöglich ist, die

geeigneten Bedingungen für die Bildung bestimmter definierter Metallverbindungen der Proteine zu verwirklichen.

Die zunächst zu beschreibenden Experimente zeigen, dass Edestin sich in bestimmten Mengenverhältnissen mit Kalium und Natrium verbindet.

### 1. Löslichkeit des Edestins in Natriumhydratlösung.

Präparat 31, welches streng neutral war, wurde benutzt, um die Löslichkeit des Edestins mit bestimmten Mengen von Natriumhydrat nach einem ähnlichen Verfahren festzustellen, wie oben die Löslichkeit des Edestins mit bestimmten Salzsäuremengen ermittelt war.

Grammportionen des lufttrockenen Präparats wurden in glasgestöpselten Flaschen in genügend kohlendioxidfreiem Wasser suspendiert, um mit der später hinzuzufügenden Alkalilösung ein Volumen von 20 ccm. auszumachen. Zu der ersten wurden 2 ccm., zu der zweiten 3 ccm. und so fort bis auf 7 ccm. n/100 Natronlauge hinzugesetzt. Nachdem während einer Stunde häufig umgeschüttelt war, wurden die Lösungen eine weitere Stunde zum Abklären stehen gelassen, während welcher Zeit sich die ungelöste Materie absetzte, die Lösung fast klar zurücklassend. Von jeder Portion wurden 10 ccm. mit einer Pipette abgezogen, bis zur Trockenheit verdunstet und der Rückstand bei 110° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die durch jedes einzelne Quantum hinzugesetzten Alkalis gelöste Menge ergibt sich aus der folgenden Tabelle:

Tabelle XIX.

Die durch eine n/100 Natronlauge gelöste Menge von Edestin 31.

2 ccm.	3 ccm.	4 ccm.	5 ccm.	6 ccm.	7 ccm.	$\frac{\text{NaOH}}{100}$
0.1244	0.2564	0.4358	0.6086	0.7834	0.8990	gelöstes Edestin

Die pro Cubikcentimeter mit jedem einzelnen hinzugesetzten Alkali quantum gelöste Menge Edestin war in Grammen die folgende:

## Tabelle XX.

Die pro Cubikcentimeter n/100 Natronlauge gelöste Menge von Edestin 31.

2 ccm.	3 ccm.	4 ccm.	5 ccm.	6 ccm.	7 ccm.	NaOH 100
0,0622	0,0855	0,1090	0,1217	0,1306	0,1283	gelöstes Edestin

Diese Zahlen zeigen, dass die pro Cubikcentimeter gelöste Menge regelmässig ansteigt, bis sie mit 6 und 7 ccm. ein Maximum erreicht. Dies liegt an der Schwierigkeit, mit welcher alles lösliche Natriumedestin von dem grossen Quantum ungelöst zurückbleibenden Edestins zu trennen ist. Dies ist besonders beim Zusatz kleinerer Alkalimengen der Fall, da die grosse Ausdehnung der Oberfläche, die das feine kristallinische Pulver darbietet, das lösliche Natriumedestin adsorbirt, und da es ausserdem eine nicht diffusible Substanz ist, so wird diejenige Menge Natriumedestin, das sich innerhalb der festen Partikeln bildet, nur mit Schwierigkeiten entfernt. Mit zunehmenden Alkalimengen vermindert sich der Antheil ungelösten Edestins und der auf jeden Cubikcentimeter entfallende gelöste Antheil vermehrt sich, bis er ein Quantum erreicht, das nur wenig hinter dem für eine vollständige Reaction zwischen einem Molekül Edestin und einem Molekül Natronlauge berechneten zurückbleibt.

Eine andere Reihe von Grammportionen von Präparat 30, wovon 1 g einen Säuregehalt hatte, der 2 ccm. n/100 Natronlauge zur Neutralisation erforderte, wurde in derselben Weise behandelt wie die vorhergehende und die folgenden Mengen wurden als gelöst ermittelt.

## Tabelle XXI.

Durch n/100 Natronlauge gelöste Menge vom Edestinpräparat 30.

1 ccm.	2 ccm.	3 ccm.	4 ccm.	5 ccm.	6 ccm.	7 ccm.	8 ccm.	9 ccm.	NaOH 100
0,0490	0,0940	0,1636	0,3208	0,4800	0,6060	0,7120	0,8188	0,8782	gel. Edestin

In diesem Falle ist die Wirkung der in diesem Präparat enthaltenen Kohlensäure klar zu erkennen, da 9 ccm. von dem Alkali erforderlich waren, denselben Betrag aufzulösen, den 7 ccm. von dem vollkommen neutralen Präparat 31 auflösen. Die kleine Menge, die durch 1 und durch 2 ccm. aufgelöst erscheint, bestand grösstentheils aus suspendirter Materie, welche unvermeidlich mit der Lösung abgezogen wird. Die Uebereinstimmung dieser Resultate mit denjenigen, die in dem ersten Experiment gewonnen wurden, wird am besten durch die Löslichkeitscurven auf Seite 286 gezeigt.

## 2. Löslichkeit des Edestins in Kaliumhydratlösung.

Präparat 28, von dem 1 g 2 ccm. n/100 Alkali zur Neutralisation gegen Phenolphthalein erforderte, wurde mit einer n/100 Kalilauge in derselben Weise wie bei den Versuchen mit Natronlauge behandelt. Tabelle XXII gibt in Grammen die durch die verschiedenen Mengen Alkali aufgelösten Gewichtsmengen an.

Tabelle XXII.

Durch n/100 Kalilauge gelöste Menge von Edestin 28.

1 ccm.	2 ccm.	3 ccm.	4 ccm.	5 ccm.	6 ccm.	7 ccm.	8 ccm.	KOH 100
—	0.0150	0.938	0.1944	0.3294	0.4772	0.7592	0.8500	gelöstes Edestin

Die für jeden Cubikcentimeter über 2 ccm. aufgelöste Menge war folgende:

Tabelle XXIII.

Für je 1 ccm. n/100 Kalilauge aufgelöste Menge:

3 ccm.	4 ccm.	5 ccm.	6 ccm.	7 ccm.	8 ccm.	KOH 100
0.0938	0.0972	0.1098	0.1193	0.1518	0.1417	ungelöstes Edestin

Bei diesem Versuch, ebensowie bei denen mit Natronlauge, nahm der Antheil des gelösten Edestins zu in dem

Maasse, wie der Antheil des ungelösten Edestins sich verminderte; indem der durch 8 ccm. gelöste Betrag demjenigen fast gleich war, welcher für eine vollständige Reaction zwischen einer gleichen Anzahl von Molekülen jeder der beiden Substanzen berechnet wurde. Die etwas höhere Zahl, die für 7 ccm. gefunden wurde, ist zweifellos einem Versuchsfehler zuzuschreiben. Man kann dies auch aus der plötzlichen Erhebung in der auf Seite 286 gegebenen Curve, welche die Resultate dieses Experiments angibt, entnehmen.

Eine andere Reihe von Grammportionen von Edestin 30, die in derselben Weise wie 28 mit  $n/100$  Kalilauge behandelt worden waren, gaben die folgenden Resultate:

Tabelle XXIV.

Durch  $n/100$  Kalilauge gelöste Menge von Edestin 30.

1 ccm.	2 ccm.	3 ccm.	4 ccm.	5 ccm.	6 ccm.	7 ccm.	8 ccm.	9 ccm.	10 ccm.	$\frac{\text{KOH}}{100}$
0,0586	0,0574	0,1146	0,2496	0,3984	0,5220	0,6292	0,7726	0,8120	0,8558	gelöstes Edestin

Diese Resultate sind fast dieselben wie die mit Präparat 28 gewonnenen, indem die durch weniger als 7 ccm. gelöste Gewichtsmenge ein wenig höher ist, als in der ersten Versuchsreihe, während die durch mehr als 7 ccm. gelöste Menge ein wenig niedriger ist.

Angenommen, dass eine richtige Lösung erst mit 3 ccm. beginnt, haben wir in der folgenden Tabelle die pro Cubikcentimeter mit jedem einzelnen Quantum hinzugesetzten Alkalis gelösten Mengen.

Tabelle XXV.

Per Cubikcentimeter  $n/100$  Kalilauge gelöstes Edestin 30.

3 ccm.	4 ccm.	5 ccm.	6 ccm.	7 ccm.	8 ccm.	9 ccm.	10 ccm.	$\frac{\text{KOH}}{100}$
0,1146	0,1248	0,1328	0,1305	0,1258	0,1288	0,1160	0,1060	gelöstes Edestin

Wie diese Tabelle zeigt, ist der pro Cubikcentimeter mit 5 bis 8 ccm. gelöste Betrag ungefähr 15 mg weniger als der für eine vollständige Reaction zwischen einer gleichen Anzahl Molekülen des Proteins und des Alkalis berechnete. Der Massstab, nach welchem dieses Präparat sich auflöste, ist gleichförmiger als derjenige, nach welchem Präparat 28 sich auflöste, indem die Wirkung der Adsorption bei diesen Experimenten mit Präparat 30 viel geringer war als bei Präparat 28. Wahrscheinlich ist dies dem Umstand zuzuschreiben, dass die Krystalle von 30 viel grösser waren als diejenigen von 28, und daher war bei dem ersteren eine viel kleinere Oberfläche für die Adsorption des löslichen Edestins vorhanden.

Ein ähnliches Experiment wurde mit einem andern Präparat — Nr. 25 — mit folgenden Resultaten angestellt:

Tabelle XXVI.

Der durch eine  $n/100$  Kalilauge gelöste Betrag von Edestin 25.

2 ccm.	3 ccm.	4 ccm.	6 ccm.	8 ccm.	9 ccm.	10 ccm.	12 ccm.	13 ccm.	$\frac{\text{KOH}}{100}$
0,0058	0,0048	0,1380	0,1588	0,2694	0,3594	0,5044	0,7790	0,8678	gel. Edestin

Es wurde gefunden, dass dieses Präparat, welches bei der ersten Fällung vollkommen neutral gegen Phenolphthalein war, zur Neutralisation von 1 g 4 ccm.  $n/100$  Alkali erforderte, nachdem es gewaschen und getrocknet war, jedoch ohne besondere Massregeln zum Abschluss der Kohlensäure. Diese waren nicht angewandt, da die Nothwendigkeit derselben zur Zeit, als das Präparat bereitet wurde, noch nicht erkannt worden war.

Aus den Lösungen, zu welchen 2 und 3 ccm. Alkali hinzugesetzt worden war, schied sich das unlösliche Edestin ab, die Lösung blieb fast ganz klar und ohne Opalescenz. Im Gegensatz zu Präparat 28 löste sich dieses Präparat zuerst langsam, indem nur 0,0200 g mehr durch 6,0 als durch 4,0 ccm. gelöst wurden. Von 6 ccm. aufwärts nahm die Löslichkeit nach fast demselben Massstab wie bei den andern Versuchen zu.

Dass durch das Kaliumcarbonat, welches sich erst aus der in dem Edestinpräparat vorhandenen Kohlensäure bildete, nicht mehr Edestin gelöst wurde, ist dem leichten Grad hydrolytischer Zersetzung dieses Salzes zuzuschreiben, da die Menge der Hydroxyl-Ionen nicht genügt, um eine merkliche Lösung des Edestins zu veranlassen.

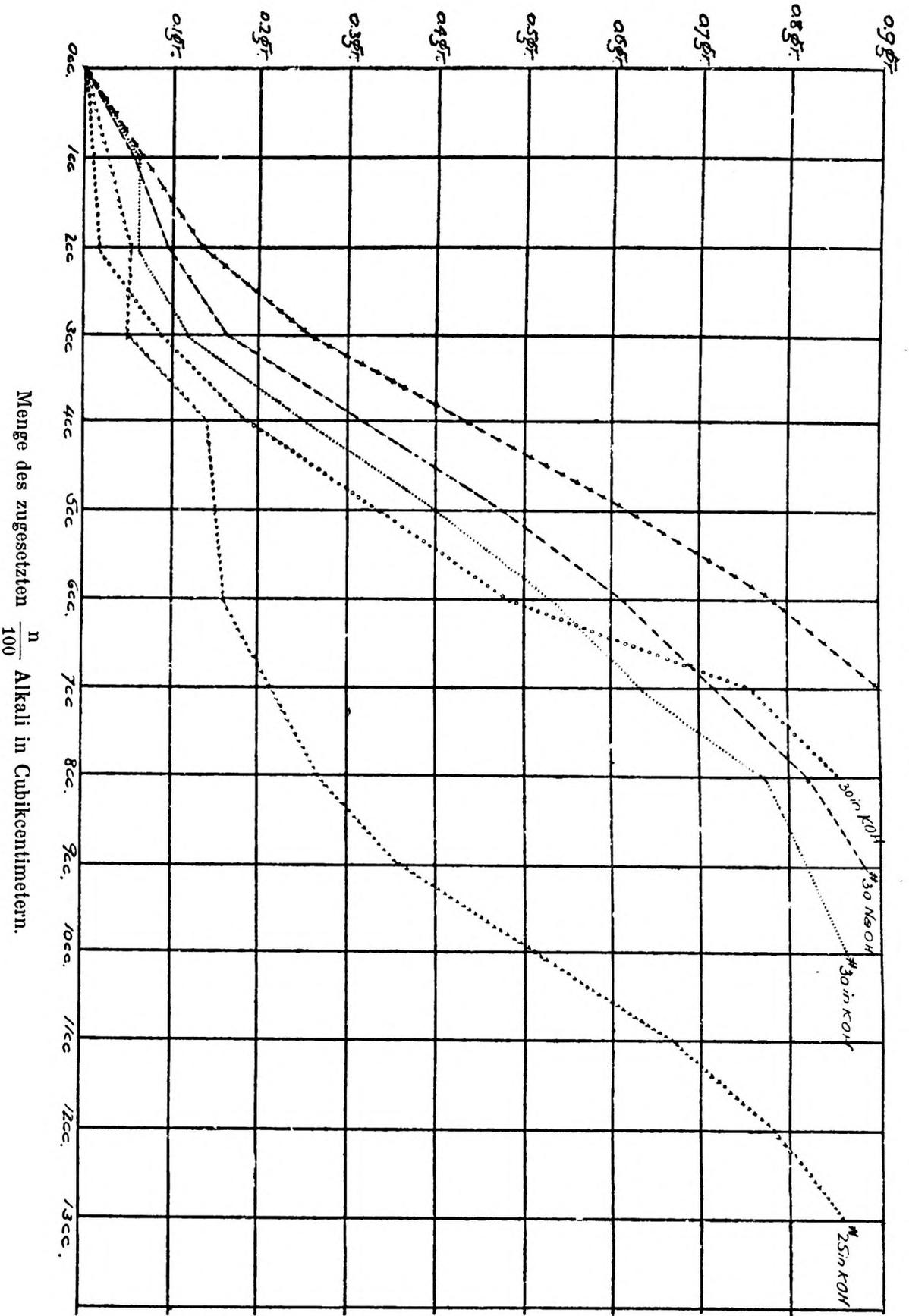
Umseitige Curventafel Nr. 2 zeigt die Ergebnisse der Alkaliversuche und macht die Wirkung der kleinen Menge Kohlensäure, welche einige von den Präparaten enthalten, sehr augenscheinlich.

Präparate, welche Edestin-Mono- und -Dichlorid gemischt enthalten, werden vollständig aufgelöst, wenn sie in Wasser suspendirt werden und ein Ueberschuss  $n/100$  Kali- oder Natronlauge zugesetzt wird, der gleichwerthig ist mit ungefähr 7 cem. auf das Gramm des Edestinchlorids. Die durch einen kleineren Ueberschuss Alkali gelöste Menge solcher Edestinpräparate kann nicht bestimmt werden, da die Lösung, aus welcher das ungelöste Edestinchlorid sich abscheidet, beim Stehen milchig wird und nicht filtrirt werden kann, weil sie mit freiem, aus dem wasserlöslichen Dichlorid herrührenden Edestin übersättigt ist.

Lösungen von Natrium- oder Kaliumedestin werden nach mehreren Stunden trübe und scheiden allmählich einen Theil des Proteins aus der so gebildeten übersättigten Lösung ab. Lösungen von Calcium- oder Baryumedestin, welche nur bei Gegenwart eines viel grösseren Ueberschusses dieser Basen gebildet werden, sind viel weniger haltbar als diejenigen von Natrium- oder Kaliumedestin und scheiden bald einen grossen Theil des gelösten Proteins zusammen mit einem beträchtlichen Theil des Erdalkalis ab. Wahrscheinlich ist die Substanz, welche sich aus den Lösungen dieser Verbindungen abscheidet, ein Umwandlungsproduct von Edestin; aber dies ist bis jetzt noch nicht festgestellt worden.

Lösungen von Natrium- oder Kaliumedestin werden durch äusserst kleine Mengen von neutralen Salzen gefällt; sie bleiben jedoch unverändert auf Zusatz von Nichtelektrolyten, wie Zucker oder Alkohol, es sei denn, dass der letztere in grosser Menge

Menge des gelösten Edestins in grm.



Prüf. 31 in NaOH.

Curventafel Nr. 2.

Menge des zugesetzten  $\frac{n}{100}$  Alkali in Cubikcentimetern.

zugesetzt werde. Der so erzeugte Niederschlag wird schnell und vollständig gelöst durch Zusatz einer genügenden Menge von Kochsalz. In dieser salzhaltigen Lösung zeigen diese Edestinverbindungen die Eigenschaften von Globulin.

Gegen Salze verhalten sich Kalium- und Natriumedestin wie Edestindichlorid. Bei Abwesenheit von Salzen sind die wässrigen Lösungen all dieser Verbindungen klar und ähneln in keiner Weise opalisirenden colloidalen Lösungen. Bei einem Ueberschuss an Kochsalz sind die Lösungen ebenfalls klar.

#### IV. Löslichkeit des Edestins in Natriumcarbonatlösung.

Eine Reihe von Grammportionen von Edestin 30 wurde in verschlossenen Gefässen suspendirt, in welchen sich genügend Wasser befand, um ein schliessliches Volumen von 20 ccm. mit der später hinzuzusetzenden  $n/10$  Natriumcarbonatlösung auszumachen. Nach dem Zusatz der in der Tabelle gegebenen Mengen  $n/10$  Natriumcarbonatlösung und nach häufigem Schütteln wurden die Lösungen stehen gelassen, bis die suspendirte Materie sich abgelagert hatte. Da die 0,2 ccm., 0,4 ccm. und 0,6 ccm. enthaltenden Portionen sich langsam abschieden, so wurden dieselben durch reines Papier filtrirt und 10 ccm. jeder Lösung der ganzen Versuchsreihe wurde verdunstet, der Rückstand bei  $110^{\circ}$  getrocknet und die folgenden Mengen wurden als gelöst ermittelt:

Tabelle XXVII.

Der durch eine  $n/10$  Natriumcarbonatlösung gelöste Betrag an Edestin.

0,2 ccm.	0,4 ccm.	0,6 ccm.	1 ccm.	1,4 ccm.	1,8 ccm.	2,2 ccm.	2,4 ccm.	2,5 ccm.	$\frac{\text{Na}_2\text{CO}_3}{10}$
0,090	0,0376	0,0580	0,2202	0,4722	0,6036	0,7510	0,8160	0,8618	g

Sehr wenig Edestin wird durch weniger als 0,6 ccm. der Natriumcarbonatlösung gelöst, ohne Zweifel wegen der geringen Mengen Kohlensäure, die in diesem Präparat enthalten ist.

Ueber 0,6 ccm. hinaus löste sich das Edestin nach einer fast gleichförmigen Zunahme, wie es durch die folgende Tabelle gezeigt wird, die in Grammen den in jeder Portion pro 0,1 ccm. im Ueberschuss von 0,6 ccm. gelösten Betrag angibt.

Tabelle XXVIII.

Pro 0,1 ccm. n/10 Natriumcarbonatlösung (über 0,6 ccm. hinaus) gelöstes Edestin.

1 ccm.	1,4 ccm.	1,8 ccm.	2,2 ccm.	2,4 ccm.	2,5 ccm.	$\frac{\text{Na}_2\text{CO}_3}{10}$
0,0405	0,0518	0,0455	0,0433	0,0421	0,0423	gelöstes Edestin.

Aus diesen Zahlen ist zu ersehen, dass der Betrag an gelöstem Edestin proportional ist der zugesetzten Menge Natriumcarbonatlösung, vorausgesetzt, dass diese mehr als 0,6 ccm. beträgt.

Ob das Edestin durch Natriumcarbonat nur in Folge der hydrolytischen Zersetzung dieses Salzes gelöst wird, oder ob dieses Salz auch als ein Lösungsmittel wirkt nach der Art neutraler Salze, wie z. B. Natriumchlorid, erfordert eine weitere Erforschung der Beziehungen der Globuline zu neutralen Salzen. Diese Untersuchung ist jetzt im hiesigen Laboratorium in Angriff genommen.

Um ein Präparat von Edestinchlorid zu neutralisiren, ist eine grössere Menge an Natriumcarbonat als Kaliumhydrat erforderlich. 5 g von Präparat 3 wurden in Wasser suspendirt und 5 ccm. n/10 Natriumcarbonatlösung hinzugesetzt, die Mischung wurde einige Zeit geschüttelt und das Edestin abfiltrirt, dann wurden zu dem Filtrat und dem Waschwasser 5 ccm. Salzsäure hinzugesetzt. Die Lösung wurde dann gekocht, abgekühlt und gegen Phenolphthalein durch 3,8 ccm. Kalilauge neutralisirt, woraus hervorgeht, dass nur 3,8 ccm. der Natriumcarbonatlösung durch die gebundene Säure des Edestinchlorids neutralisirt worden war, welche genügend war, um 5 ccm. freies Alkali zu neutralisiren.

## V. Schlussfolgerungen.

1. Die Proteine sind basische Körper und gehen Ionenreactionen mit Säuren ein, mit welchen sie echte Salze bilden.

2. Präparate von natürlichen Proteinen, wie sie gewöhnlich aus Lösungen gewonnen werden, die leicht sauer oder neutral gegen Lackmus sind, sind Salze der basischen Protein-substanz.

3. Die Säure dieser Salze kann von den in Wasser unlöslichen Proteinen abgetrennt werden, indem man sie mit Kalium- oder Natriumhydrat gegen Phenolphthalein neutral macht. Die mit dem Protein verbundene Säure kann in der wässrigen Lösung nachgewiesen werden, indem man das unlösliche Protein abfiltrirt, die Lösung verdunstet und die so gewonnenen Alkalisalze analysirt.

4. Durch die gewöhnlich angewendeten Methoden bereitete Präparate von Edestin enthalten hauptsächlich Chloride, wenn sie aus Natriumchloridlösungen krystallisirt sind; hauptsächlich Sulphate, wenn sie aus einer Ammoniumsulphat enthaltenden Lösung krystallisirt sind. Die Edestinsalze, welche herauskrystallisiren, sind die der negativen Ionen, welche in der Lösung vorhanden sind; wenn mehrere Arten von Ionen vorhanden sind, so ist das vorherrschende Salz das derjenigen negativen Ionen, die zur Zeit der Krystallisation am reichlichsten vorhanden sind.

5. Aus Natriumchloridlösungen wie gewöhnlich bereitete Edestinpräparate lösen sich im Allgemeinen in einem beträchtlichen Umfange auf, wenn sie mit reinem Wasser gewaschen werden. Der Theil, welcher sich löst, ist doppelt so sauer gegen Phenolphthalein, als der Theil, der ungelöst bleibt.

6. Der Grad des Säuregehalts des in Wasser unlöslichen Theils ist gleich demjenigen einer Verbindung von einem Molekül Edestin mit einem Molekül Salzsäure, angenommen, dass das erstere ein Molekulargewicht von etwa 14500 hat, welches zweimal so gross ist, als das einfachste, das aus seiner Analyse berechnet werden kann, wenn zwei Atome Schwefel in seinem Molekül sind.

Edestin bildet daher Salze, die einem Mono- und einem Dichlorid entsprechen.

7. Sowohl die Edestinkrystalle als auch die seiner verschiedenen Salze sind, soweit festgestellt worden ist, isomorph, da die Massenwirkung des Proteinmoleküls so gross ist, dass es den kleinen Betrag an gebundener Säure verhindert, einen Wechsel der krystallinischen Form zu bewirken. In dieser Hinsicht verhält sich Edestin wie Hämoglobin, dessen Verbindungen mit Sauerstoff und Kohlensäure auch isomorph sind.

8. Die freie Basis Edestin wird, wenn sie in reinem Wasser suspendirt ist, durch nahezu die berechnete Menge Salzsäure aufgelöst, die erforderlich ist für eine vollständige Reaction zwischen einem Molekül Edestin und zwei Molekülen Salzsäure. Bei Zusatz der Säure in aufeinander folgenden kleinen Mengen findet so lange keine Lösung statt, bis eine Hälfte des erforderlichen Betrags hinzugesetzt worden ist. Beim Hinzufügen der zweiten Hälfte der Säure findet die Lösung in einer der zugesetzten Säure proportionalen Weise statt. Der Säuregehalt der mit der zweiten Hälfte der Säure gewonnenen Lösung ist proportional dem zwiefachen der zugesetzten Säuremenge, in Uebereinstimmung mit der Verwandlung eines durch die erste Hälfte der Säure hervorgebrachten unlöslichen Monochlorids in ein durch die zweite Hälfte gebildetes lösliches Doppelchlorid.

9. Etwas mehr als die berechnete Menge Salzsäure ist erforderlich, eine gegebene Menge Edestin aufzulösen, weil ein basischeres hydrolytisches Umwandlungsprodukt von Edestin, das nur wenig in Wasser löslich ist, durch die Hydrogen-Ionen gebildet wird, welche durch die hydrolytische Zersetzung des Chlorids in Freiheit gesetzt werden.

10. Da Lösungen von Edestindichlorid durch hydrolytische Zersetzung nicht gefällt zu werden scheinen, so kann man annehmen, dass sich Edestinhydroxyd bildet und unter den Versuchsbedingungen in Lösung bleibt.

11. Edestinsulphate sind weniger löslich als die entsprechenden Chloride und folglich sind Präparate, die aus Ammoniumsulphate enthaltenden Lösungen gewonnen sind, in

Wasser nicht löslich. Zehnmal mehr Schwefelsäure als Salzsäure ist erforderlich, eine gegebene Menge Edestin aufzulösen. Bestimmte Verbindungen mit Schwefelsäure sind bis jetzt noch nicht erzielt worden.

12. Die zur Lösung von Edestin erforderliche Menge Essigsäure nähert sich mehr der berechneten, als dies bei Salzsäure der Fall ist, denn die erstere ist weniger ionisirt als die letztere und bildet deshalb in derselben Zeit nur den dritten Theil von dem basischeren Umwandlungsprodukt als die äquivalente Menge Salzsäure.

13. Phosphorsäure reagirt als einbasische Säure auf Edestin in Uebereinstimmung mit ihrer Zersetzung in die Ionen  $H^+$  und  $H_2PO_4^-$ . Nur wenig mehr als die berechnete Menge dieser Säure ist erforderlich, eine bestimmte Menge Edestin aufzulösen.

14. Edestin bildet mit Salpetersäure ein Salz, welches dem Dichlorid entspricht. Bei  $30^\circ$  ist Edestindinitrat in reinem Wasser viel löslicher als bei  $20^\circ$ , so dass eine klare Lösung, die 5% dieses Salzes enthält, nach dem Abkühlen eine beträchtliche Fällung abgibt.

15. Edestin sättigt Kalium- oder Natriumhydrat in einer Menge, die der Bildung des Monochlorids entspricht.

Zur Lösung einer bestimmten Menge Edestin ist so viel Kali- oder Natronlauge nöthig, wie dem Verhältniss eines Moleküls der Basis zu einem Molekül Protein entspricht.

Lösungen von Kalium- oder Natriumedestin werden, wahrscheinlich in Folge von Hydrolyse, trübe, nachdem sie einige Zeit gestanden haben, und lassen allmählich etwas von dem gelösten Protein ausfallen.

16. Um eine bestimmte Menge Edestin aufzulösen, ist ungefähr dreizehnmal so viel Ammoniumhydrat als Natrium- oder Kaliumhydrat erforderlich.

17. Ungefähr dreimal so viel Natrium in der Form von Carbonat als Natrium in der Form von Hydrat ist erforderlich, um eine gegebene Menge Edestin aufzulösen.

18. Die Löslichkeitsverhältnisse des Edestins entsprechen genau denen eines Globulins, insofern es in reinem Wasser

unlöslich, jedoch in neutralen Kochsalzlösungen von genügender Stärke löslich ist.

19. Edestinmonochlorid ist gleichfalls in Wasser unlöslich, jedoch leicht löslich in salzhaltigen Lösungen. Edestindichlorid und Natrium- oder Kaliumedestin sind in reinem Wasser löslich, jedoch unlöslich bei Gegenwart einer kleinen Menge eines neutralen Salzes. Bei Gegenwart einer grösseren Menge des neutralen Salzes sind sie löslich und zeigen in solchen Lösungen die Eigenschaften des Globulins.

20. Die Thatsache, dass sowohl Edestin wie auch seine mit starken Säuren gebildeten Salze in vollkommen neutralen Lösungen von Kochsalz löslich sind, zeigt, dass die Löslichkeit eines Globulins nicht von der Gegenwart eines Alkalis abhängt, wie Starke vor Kurzem angegeben hat.