

Ueber Darstellung von Harnstoff durch Oxydation von Eiweiss nach Jolles.

Von
Fr. N. Schulz.

(Aus der chemischen Abtheilung des physiol. Instituts zu Jena.)

(Der Redaction zugegangen am 24. Juli 1901.)

A. Jolles macht soeben Mittheilungen über quantitative Aufspaltung der Eiweissstoffe durch Kochen mit Permanganat in schwefelsaurer Lösung, die geeignet sind, uns die Eiweissstoffe in wesentlich anderem Lichte erscheinen zu lassen, wie bisher (Beiträge zur Kenntniss der Eiweisskörper; Diese Zeitschr., Bd. XXXII, S. 361—392).

Bei der grundlegenden Bedeutung dieser Angaben sah ich mich veranlasst, eine Wiederholung der Versuche von Jolles vorzunehmen. Hierbei fand ich jedoch, dass die Angaben von Jolles in verschiedenen nicht unwichtigen Punkten so gefasst sind, dass eine einfache Nachprüfung auf Schwierigkeiten stösst.

Jolles oxydirt Eiweiss durch Kochen mit Permanganat in schwefelsaurer Lösung. Er verwendet eine 0,4^o/_oige Lösung von Permanganat (S. 365). Zur Oxydation von 0,5 g Eiweiss, die zur Verwendung kommen, sind 300—400 ccm. dieser Permanganatlösung erforderlich, wie sich theoretisch berechnen lässt und wie ich auch in Versuchen fand. Jolles gibt aber an: «Zu Beginn des Erwärmens kann der Zusatz cubikcentimeterweise erfolgen; sobald sich die Lösung langsam zu entfärben beginnt, setzt man das Permanganat nur tropfenweise so lange zu, bis der letzte Permanganatzusatz nach 1/2stündigem Kochen nicht verschwunden ist.» Dass Jolles bei seinen zahl-

reichen Versuchen die 300—400 ccm. nicht einzeln zugesetzt haben kann, ist klar. Ein Nachprüfer muss also hier von der Angabe abweichen.

Dies mag unwichtig erscheinen, aber bei der jedenfalls in der Eiweisschemie fast beispiellosen Uebereinstimmung der von Jolles angegebenen analytischen Daten muss ein Nachprüfer die Gewissheit haben, dass er auch genau so wie Jolles selbst verfahren ist.

Die mit Permanganat zu Ende oxydirte Lösung wird mit «Lauge» neutralisirt, bis «Mangan auszufallen beginnt», und mit Wasser auf 500 ccm. aufgefüllt. 100—200 ccm. der Lösung sollen zur direkten Darstellung von Harnstoff benutzt werden. Hierzu wird zunächst mit dem gleichen Volumen destillirten Wassers verdünnt; zu welchem Zweck dies geschieht, ist mir nicht ersichtlich. Dann wird «mit etwas überschüssiger Salzsäure versetzt, am Wasserbade erwärmt, bis die Lösung farblos wird, dann die Lösung etwas eingedampft». Diese Procedures sollen wohl den Zweck haben, die bei dem vorhergehenden Neutralisiren mit Lauge ausgefallenen geringen Mengen Mangan wieder zu lösen.

Die Nachprüfung ergab mir, dass die Angaben von Jolles sich nicht durchführen lassen. Versetzt man eine Oxalsäurelösung heiss mit Permanganat in schwefelsaurer Lösung und neutralisirt dann mit Lauge, so erhält man einen weissen Niederschlag von Manganoxydul, der sich auf Zusatz von Säure sofort wieder löst.

Behandelt man dagegen Eiweiss in derselben Weise, so wird nicht alles Mangan in Oxydul übergeführt, sondern es bildet sich beim Neutralisiren ein brauner Niederschlag von Mangansuperoxyd, der sich auch durch reichlichen Ueberschuss von Säure nicht wieder lösen lässt, auch nicht beim Erwärmen. Auch hier ist es also nöthig, mit einer gewissen Willkür, unabhängig von den Angaben Jolles', zu verfahren. Ich bin z. Th. so verfahren, dass ich die neutralisirte Lösung mit einigen Cubikcentimetern verdünnter Salzsäure erwärmte und dann das ungelöste Mangansuperoxyd durch Filtration und Auswaschen entfernte. In anderen Versuchen habe ich das Mangansuper-

oxyd in Lösung gebracht, indem ich die salzsaure Flüssigkeit mit etwas Oxalsäure erwärmte.

Die Angaben von Jolles sind mir nur dann verständlich, wenn er zum Schlusse der Oxydation das überschüssige Permanganat mit reichlicheren Mengen Oxalsäure entfernt hat, was aber seinen Angaben (S. 365) widersprechen würde.

Jolles verfährt weiterhin so, dass er die nunmehr wieder «mit etwas überschüssiger Salzsäure» angesäuerte Lösung mit einer alkoholischen Natronlauge (ca. 3% in 95% Alkohol) unter Zusatz von Phenolphthalein bis zur schwachen Rothfärbung neutralisirt, die er dann mit einem Tropfen verdünnter Salzsäure wieder zum Verschwinden bringt. Auch hierbei konnte ich eine, wenn auch geringe Ausscheidung von Mangan-superoxyd nicht vermeiden. Nunmehr soll nach 2stündigem Stehen ein Theil der Salze sich ausscheiden. Woher diese hohe Concentration an Salz stammt, ist aus den Angaben von Jolles nicht ersichtlich. In meinen Versuchen, in denen ich, seiner Vorschrift entsprechend, mit «etwas überschüssiger Salzsäure» arbeitete und «etwas eindampfte», schieden sich beim Stehen keine Salze aus. Im weiteren Verlaufe wird dann immer wieder auf dem Wasserbad auf 20 ccm. eingengt und mit 100 ccm. absolutem Alkohol gefällt, bis eine absolut alkoholische Lösung erzielt ist, die, auf 20 ccm. eingengt, beim Erkalten keine Ausscheidung von Salzen mehr zeigt. Diese Lösung wird mit 100 ccm. ätherischer Oxalsäurelösung versetzt, wobei der Harnstoff als oxalsaure Harnstoff ausfällt. Der abgeschiedene oxalsaure Harnstoff wird abfiltrirt, mit Aether gewaschen, getrocknet, gewogen; die Gewichtsbestimmung wird durch eine Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl kontrollirt.

Auf diese Weise kommt Jolles zu Werthen für Harnstoff, die in ganz überraschender Weise mit den anderweitig gefundenen Zahlen übereinstimmen. Dies ist in hohem Grade auffällig, da die Darstellungsweise manche Fehlerquellen in sich einschliesst, von deren Vermeidung Jolles nichts erwähnt. In Versuchen, die ich anstellte, gehörte ein mindestens

7maliges Ausfällen dazu, um die alkoholische Lösung so salzarm zu bekommen, dass sie beim Einengen auf 20 ccm. keine Salzausscheidung mehr zeigt. Bei dem jedesmal mit dem Ausfällen verbundenen Abfiltriren, von Anfangs nicht unbeträchtlichen Salzmengen, sind trotz des Auswaschens Verluste unvermeidlich und es muss ein Zufall sein, wenn trotzdem eine Genauigkeit erzielt wird, wie wir sie sonst kaum von den feinsten analytischen Methoden erwarten dürfen.

Einigermassen verständlich ist mir noch das Ergebniss der Kjeldahlbestimmung. Die in den meisten Fällen fast absolute Uebereinstimmung der Stickstoffwerthe mit dem Gewicht des oxalsauren Harnstoffs¹⁾ ist dagegen sicher, wenn überhaupt, so nur durch ganz besondere Vorsichtsmassregeln erreichbar, von denen Jolles nichts angibt. Es ist bekannt, wie schwer es ist, durch Fällung mit Alkohol Lösungen so salzarm zu bekommen, dass sie durch einen grossen Ueberschuss von Aether nicht noch, wenn auch geringe Mengen von Salz verlieren. In einem von mir angestellten Versuche enthielt die Oxalsäurefällung noch 10% Asche, in einem anderen Versuche ca. 8%. In beiden Fällen war 7 Mal mit absolutem Alkohol ausgefällt nach den Angaben von Jolles. Jolles erwähnt nichts von einem Aschegehalt seines oxalsauren Harnstoffs; im Gegentheil, die Analysenwerthe für C, H und N ergeben meist sogar etwas höhere Werthe, wie die für reinen oxalsauren Harnstoff berechneten. Die Präparate müssen also frei von verunreinigendem Salz gewesen sein. Jolles gibt nichts von besonderen Vorsichtsmassregeln an, durch die er verhindert habe, dass der Alkohol Wasser anziehe und dadurch geringe Mengen von Salz lösen könne. Das einfache Verdunsten

1) Eieralbumin (S. 370) aus dem Gewicht des Harnstoffoxalats berechnete N-Menge = 0,0233 g, nach Kjeldahl gefunden 0,0237 g.
 Serunglobulin: berechnet 0,02397 g N, gefunden 0,0241 g N,
 Casein: » 0,0268 » » » 0,0270 » »
 Fibrin: » 0,0181 » » » 0,01823 » »
 Vitellin (Ei): » 0,02799 » « » 0,02805 » »

Die hier nicht mit aufgeführten Stoffe (Serumalbumin, Oxyhämoglobin, Vitellin [Pflanzen]) werden später noch besprochen.

auf dem Wasserbade ist jedenfalls in dieser Beziehung höchst gefährlich.

Wenn schon die hier angedeuteten Schwierigkeiten eine einfache Nachprüfung, ohne Abweichungen von den Angaben von Jolles, mir unmöglich erscheinen lassen, so sah ich mich vollends bewogen, von meinem ursprünglichen Vorhaben abzustehen, als ich bei genauerer Durchsicht der Jolles'schen Analysenzahlen auf mir unlösbare Räthsel stiess, für die ich Herrn Jolles um Aufklärung bitten möchte.

Auf die überraschende Uebereinstimmung der auf den verschiedensten Wegen gewonnenen Analysenzahlen, die z. Th. sicher Zufall ist, habe ich schon hingewiesen. Daneben finden sich Zahlen, die mir unerklärlich sind.

Für Serumalbumin (in der obigen Zusammenstellung weggelassen) fand Jolles, dass 0,2032 g Substanz 0,0556 g oxalsauren Harnstoff lieferten. Die Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl ergab 0,0265 g N, entsprechend 12,97% N, auf die verwandte Eiweissmenge berechnet. Diese Zahl stimmt genau zu dem auf volumetrischem Wege (in einem völlig verschiedenen Verfahren, siehe Original) zu 13,01% bestimmten Harnstoffstickstoff. 0,0556 g oxalsaurer Harnstoff würden aber, selbst aschefrei, nur 0,0148 g N enthalten = 7,28%.

Man könnte an einen Druckfehler denken, aber derselbe Fehler wiederholt sich noch 2 Mal.

Für Oxyhämoglobin (oben weggelassen) wird angegeben: 0,19644 g Substanz liefern 0,0532 g oxalsauren Harnstoff. Die Stickstoffbestimmung ergibt 0,03031 g N = 15,43%. Die volumetrische Stickstoffbestimmung hatte 15,44% N ergeben.

0,0532 g oxalsaurer Harnstoff (aschefrei) enthalten aber nur 0,142 g N = 7,23%, also nicht die Hälfte des gefundenen.

Zum dritten Mal findet sich derselbe Fehler beim Vitellin (aus Pflanzen). Hier wird angegeben: 0,24568 g Substanz lieferten 0,0670 g oxalsauren Harnstoff; die Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl ergab 0,02938 g N = 11,96%. 0,0670 g oxalsaurer Harnstoff enthalten aber nur 0,01786 g N = 7,27%.

Ich habe mir alle Mühe gegeben, zu eruiiren, wie dieser

dreimal wiederkehrende Fehler zu erklären ist, aber vergeblich.

Die Vermuthung, dass Jolles vielleicht einen mit Ammonsalzen verunreinigten Niederschlag analysirt habe, erwies sich als irrig ($(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4 = 22,6\%$ N). Der Niederschlag gab, nach Schlösing untersucht, kein Ammoniak ab.

Meine Niederschläge enthielten reichlich Mangansalze; ob Harnstoff überhaupt zugegen war, habe ich mit Sicherheit bis jetzt nicht feststellen können. Von Schmelzpunktbestimmungen, wie sie Jolles in idealer Uebereinstimmung mit den verlangten Werthen angibt, war in meinen Versuchen wegen der verhältnissmässig grossen Menge verunreinigender Salze überhaupt nicht die Rede.¹⁾ Versuche, nach entsprechendem Erwärmen Cyanursäure nachzuweisen, hatten ein völlig negatives Ergebniss, dagegen konnte ich eine geringe, zweifelhafte Biuret-färbung mit KOH und CuSO_4 erzielen.

Ob dieser Misserfolg ausschliesslich darauf zurückzuführen ist, dass es mir nicht gelungen ist, genau nach Jolles zu verfahren, möchte ich bezweifeln. Ich schliesse mich den soeben von Folin und Shafer²⁾ ausgesprochenen Zweifeln an, welche sagen: «Die Jolles'sche Angabe, dass Harnsäure durch kochendes Kaliumpermanganat und Schwefelsäure quantitativ in Harnstoff gespalten wird, und dass dabei kein Ammonsulfat entsteht, erscheint uns etwas zweifelhaft, denn selbst wenn auch nur Harnstoff ausschliesslich zuerst geformt wurde, so wird derselbe doch durch kochende, verdünnte Mineralsäure z. Th. in NH_3 und CO_2 gespalten.» Das hier von der Harnsäure Gesagte gilt natürlich vice versa auch für die Harnstoffbildung aus Eiweiss.

Bei dem Vitellin aus Pflanzen kommt noch ein weiterer Fehler hinzu. Die Stickstoffbestimmung im oxalsauren Harnstoff mit $11,96\%$ N stimmt in diesem Falle nicht zu der auf volumetrischem Wege ermittelten Zahl, welche $8,18\%$ N ergibt. Auch die dem Gewichte des oxalsauren Harnstoffs

1) Das Gewicht des Oxalatniederschlags war in meinen Versuchen wesentlich niedriger, wie ich nach Jolles hätte erwarten sollen.

2) Diese Zeitschrift, Bd. XXXII, S. 571.

entsprechende Zahl 7,27⁰/₀ ist nicht die richtige, wenigstens dann nicht, wenn man die von Jolles in den übrigen Versuchen erzielte genaue Uebereinstimmung zu Grunde legt. Mir ganz unerklärlicher Weise findet sich die (Seite 382) angegebene Zahl 11,96⁰/₀ in der Generaltabelle (S. 384) durch die Zahl 8,22⁰/₀ ersetzt, die in glänzender Uebereinstimmung ist mit dem auf volumetrischen Wege zu 8,18⁰/₀ bestimmten Harnstoffstickstoff.

Eine ähnliche, nicht motivirte Abweichung der Generaltabelle von den analytischen Daten findet sich auch beim Casein an anderer Stelle.

Seite 377 wird angegeben: 0,19464 g Casein liefern im Phosphorwolframsäureniederschlag (siehe Original) 0,0061 g N = 3,12⁰/₀. In der Generaltabelle (S. 384) findet sich statt dessen die Zahl 3,90, wodurch die Uebereinstimmung mit dem theoretisch verlangten Werthe sich wesentlich verbessert.

Herr Jolles wird wohl Aufklärung darüber geben können, wie diese auffallenden Differenzen in seinen Zahlen zu erklären sind. Um einfache Druckfehler kann es sich, wie schon erwähnt, nach Lage der Sache nicht handeln. Vorläufig ist auf diesen Zahlen basirten Schlüssen gegenüber natürlich Vorsicht am Platze. Auf eine Reihe weiterer Zweifel und theoretischer Bedenken gegen die Angaben von Jolles hier einzugehen, habe ich vorläufig nicht die Absicht, ehe nicht die principiell wichtigste Frage der Harnstoffbildung geklärt ist.
