

Die Oxydation des Leims mit Permanganaten.

Von

G. Zickgraf.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Marburg.)

(Der Redaktion zugegangen am 11. Februar 1904.)

Eine Frage von großer Wichtigkeit für die Physiologie ist jene, die sich mit der Bildung des Harnstoffs aus Eiweiß im Organismus des Tieres beschäftigt. Da im tierischen Organismus die Oxydationsprozesse vorherrschen, nahm man schon sehr frühzeitig an, daß auch die Überführung von Eiweiß in Harnstoff im Tierkörper hauptsächlich auf Oxydationsvorgänge zurückzuführen sei. Dieser Voraussetzung entsprechend suchte man im Reagensglase die im Tierleibe sich abspielenden Vorgänge nachzuahmen.

In der Tat berichtete denn auch der französische Chemiker Béchamp¹⁾ als erster über Experimente, nach denen es ihm gelungen war, durch Oxydation mit Kaliumpermanganat aus Eiweiß Harnstoff zu erhalten.

Die Arbeit Béchamps erschien im Jahre 1856. Es war dies gerade eine Zeit, in der sich das allgemeine Interesse der Chemiker infolge der glänzenden Arbeiten Liebig's und seiner Schüler auf die Abbauprodukte des Eiweißes richtete. Durch die Liebig'sche Schule war hauptsächlich in den Arbeiten von Schlieper und Guckelberger²⁾ eine ganze Reihe von Oxydationsprodukten des Eiweißes sicher analysiert worden. Zu diesen bekannten Substanzen fügte Béchamp nun noch den Harnstoff. Als Oxydationsmittel benutzte Béchamp das Kaliumpermanganat, und zwar ließ er dies im Verhältnis von 7,5:1 auf das gelöste Eiweiß bei Zimmertemperatur einwirken. Die positive Beantwortung der viel erörterten Frage, ob es möglich sei, durch Oxydation von Ei-

¹⁾ Thèse Strasbourg 1856; Journal de Pharmacie, Série III, Tome XXI u. XXXI.

²⁾ Liebig's Annalen, Bd. 59 u. Bd. 64.

weiß direkt zum Harnstoff zu gelangen, erregte damals berechtigtes Aufsehen.

Die Angaben Béchamps haben denn auch den Anstoß zu einer Anzahl von Versuchen gegeben, die alle das gleiche Ziel, nämlich die Darstellung von Harnstoff aus Eiweiß verfolgten. Die Ergebnisse, die von den verschiedenen Forschern dabei erzielt wurden, lasse ich im nachstehenden in gedrängter Form folgen. Bei meiner kurzen Zusammenstellung habe ich mich hauptsächlich an die gute Übersicht gehalten, die von Dr. E. Bénech über dieses Gebiet in der *Revue générale des Sciences* gegeben worden ist.

Bereits im Jahre 1857 erfolgte eine Nachprüfung der Arbeit Béchamps durch C. Stödeler¹⁾ in Zürich. Allerdings wählte derselbe nicht ganz die gleichen Verhältnisse, da Béchamp auf 1 g Eiweiß 7,5 g Permanganat, Stödeler aber nur 3,5 g einwirken ließ. Das Resultat der Untersuchung Stödelers war negativ. Er konnte keinen Harnstoff erhalten. Auch Subbotin,²⁾ der seine Versuche 1865 veröffentlichte, kam zu einem negativen Ergebnis. Im übrigen wählte dieser Forscher die Verhältnisse wie Stödeler, operierte aber mit viel zu geringen Eiweißmengen, als daß es ihm gelingen konnte, irgend ein Endprodukt genau zu analysieren, weshalb seiner Arbeit kein zu großer Wert beigelegt werden darf.

Diesen Angriffen gegenüber veröffentlichte Béchamp³⁾ erst im Jahre 1870 eine neue Mitteilung über die Bildung von Harnstoff bei der Oxydation mit Kaliumpermanganat. In derselben verbessert er seine Methode und behauptet von neuem regelmäßig, aus der Oxydationsflüssigkeit Harnstoff isoliert zu haben. Daneben fand er Oxalsäure, eine Tatsache, die bis dahin noch nicht bekannt war. Ebenso schnell wie seiner ersten Veröffentlichung über diese Frage folgte auch diesmal wieder eine Arbeit, die das Resultat Béchamps negierte. Es war O. Loew,⁴⁾ der genau wie Stödeler und Subbotin die Ver-

¹⁾ Journal für prakt. Chemie, Bd. 72, S 251.

²⁾ Chemisches Zentralblatt 1865, S. 593.

³⁾ Journal für prakt. Chemie 1870. N. F. Bd. 2, S. 289.

⁴⁾ C. R. Académie des Sciences, Bd. 70, S. 866. 1870.

hältnisse zwischen Eiweiß und Kaliumpermanganat wählte und als Resultat nicht wie Béchamp salpetersauren Harnstoff, sondern Baryumnitrat erhielt.

In dieser 14jährigen Periode des Streites war es bis dahin noch keinem Forscher gelungen, zu dem gleichen Resultat wie Béchamp zu kommen. Erst im Jahre 1871 fand derselbe in E. Ritter,¹⁾ einem Franzosen, einen Genossen für seine Ansicht. Ritter prüfte Béchamps Versuche mit der größten Sorgfalt nach und vermochte ebenfalls Harnstoff als Endprodukt der Eiweißoxydation zu erhalten. In seiner Arbeit gibt Ritter all die Vorsichtsmaßregeln an, die zu dem Gelingen des Versuchs gehören. In Deutschland beschäftigte sich um diese Zeit Tappeiner²⁾ mit der nämlichen Frage, ohne aber zu einem brauchbaren Ergebnis nach der einen oder andern Seite zu gelangen. In demselben Jahre erschien von Kolbe³⁾ eine zusammenfassende Darstellung, in der sämtliche Arbeiten erwähnt und einer eingehenden Kritik unterworfen werden. Kolbe stellt den beiden Franzosen, die Harnstoff gefunden hatten, vier Forscher, die dies bestritten, gegenüber. Es schien also die Frage zu Ungunsten Béchamps entschieden zu sein, und beinahe 10 Jahre vergingen, bevor eine neue Publikation über diese Frage erschien.

Im Jahre 1880 veröffentlichte Lossen⁴⁾ eine Arbeit mit dem Titel «Guanidin, ein Oxydationsprodukt des Eiweißes», die wie die vorigen durch die Beobachtungen Béchamps angeregt war. Diese Arbeit ist von besonderem Interesse, weil Lossen zu dem Resultat gelangt, daß wohl nicht Harnstoff, aber Imidoharnstoff bei der Oxydation des Eiweißes mit Permanganat sich bildet. Es ist nötig, die Methode Lossens näher zu skizzieren, weil dieselbe von der Béchamps wesentlich abweicht. Lossen ließ auf 500 g gereinigtes Eiweiß 375 g Kaliumpermanganat und 294 g Magnesiumsulfat einwirken. Diese

¹⁾ Bulletin de la Société chimique 1871. Sér. II. Bd. 16, S. 32.

²⁾ Berichte über die Verhandlungen der K. Sächs. Gesellschaft der Wissenschaften zu Leipzig.

³⁾ Journal für prakt. Chemie, N. F. Bd. 4.

⁴⁾ Liebigs Annalen, Bd. 201, S. 369.

Mischung blieb bei Zimmertemperatur 12 Stunden stehen; der nicht entfärbte Teil des Kaliumpermanganats wurde durch zugefügten Alkohol zersetzt. Die Lösung reagierte schwach alkalisch und gab mit Säuren starke Fällung. Sie wurde daher mit Schwefelsäure ausgefällt, filtriert, im Filtrat die überschüssige Schwefelsäure mit Kali neutralisiert. Sodann wurde abgedampft und Kaliumsulfat und Magnesiumsulfat auskristallisieren gelassen. Die Mutterlauge wurde mit Alkohol gefällt, der Alkohol verdunstet und der bleibende Rest nochmals mit absolutem Alkohol gefällt. Aus der alkoholischen Lösung wurde der Alkohol wieder verjagt und der Rückstand von Lossen auf Harnstoff verarbeitet. Es gelang ihm auch, daraus durch Salpetersäure eine Substanz zu isolieren, die grosse Ähnlichkeit mit salpetersaurem Harnstoff zu besitzen schien. Aber er vermißte vor allem an den Kristallen derselben den für salpetersauren Harnstoff charakteristischen Winkel von 82° . Nachdem sich dann Lossen eine größere Menge des fraglichen Körpers dargestellt hatte, konnte er mit Sicherheit durch Elementaranalyse etc. feststellen, daß der Körper, den er unter Händen hatte, nicht Harnstoff, sondern Guanidin war. Jetzt endlich hatte der fast 30 Jahre dauernde Streit eine befriedigende Lösung gefunden. Béchamp hatte nach den Ausführungen Lossens einen leicht entschuldbaren Irrtum begangen, indem er wahrscheinlich Guanidin isoliert hatte und, durch die ähnlichen Reaktionen dieses Körpers verführt, denselben mit Harnstoff verwechselte. Um so mehr muß man dies annehmen, als Béchamp selbst angibt, daß die Vergleichung der für Stickstoff und Kohlenstoff gefundenen Zahlen seiner Substanz nicht ganz mit denen von Harnstoff übereinstimmte. Außerdem waren die Proben, die Béchamp angegeben hatte, nicht eindeutig.

Man konnte also nach Lossen durch Oxydation von Eiweiß zwar nicht direkt zum Harnstoff, aber zu dem dem Harnstoff naheverwandten Guanidin gelangen. Die Angaben Lossens sind lange unwidersprochen geblieben. Aber im Jahre 1902 erschien eine Mitteilung von Pommerenig,¹⁾ in der sich der genannte Autor zu der Arbeit Lossens mit folgenden Worten

¹⁾ Beiträge zur chem. Physiolog. u. Pathol., Bd. 1, S. 561.

äußert: «Hier sei auch kurz angeführt, daß es mir nicht gelang, im Sinne der Angaben von F. Lossen durch Oxydation von Eiereiweiß oder Casein mit Permanganat auch nur eine Spur Guanidin zu erhalten.»

Durch die Beobachtungen Pommerenigs wurde die ganze Frage nach der direkten Bildung von Harnstoff bzw. Guanidin aus Eiweiß, die man durch Lossen endgültig entschieden glaubte, von neuem eröffnet.

Die einander widersprechenden Angaben von Lossen und Pommerenig haben abgesehen von dem physiologischen Interesse einen recht beträchtlichen Wert für die Eiweißchemie, da sie unsere Ansichten über den Bau des Eiweißmoleküls in ganz bestimmter Weise beeinflussen müssen. Um dieses zu erklären, muß ich etwas weiter ausholen. Durch die Arbeiten von E. Schulze, Drechsel, Hedin und Kossel war die Eiweißchemie, die seit den bekannten Untersuchungen von Hlasiwetz und Habermann¹⁾ geruht hatte, von neuem zur Aufnahme gekommen. Man hatte unter den Spaltungsprodukten, die durch die Einwirkung starker siedender Säuren aus den verschiedenen Eiweißkörpern entstehen, namentlich eine Reihe bisher unbekannter organischer Basen aufgefunden. Unter anderem zeigte sich, wie die Untersuchungen von Hedin, Kossel und Kutscher ergaben, allgemein verbreitet das von Schulze und Steiger entdeckte Arginin. Für diese starke organische Base war von Schulze und Winterstein auf Grund ausgezeichneter Untersuchungen eine Formel angenommen, nach der das Arginin ein Guanidinderivat sein mußte. In der Tat gelang es dann Bénech und Kutscher, durch Oxydation von Arginin mit Baryumpermanganat zum Guanidin zu kommen und die Annahmen von Schulze und Winterstein völlig zu bestätigen. Kein anderes der zahlreichen aus Eiweiß gewonnenen Zersetzungsprodukte liefert noch bei der Oxydation Guanidin. Ziehen wir diese Tatsache in Betracht und nehmen die Angaben Lossens als richtig an, so ergeben sich ohne weiteres folgende Schlußfolgerungen. Erstens im Eiweißmolekül muß sich Arginin präformiert vorfinden, das bei der Oxydation

¹⁾ Liebigs Annalen, Bd. 159, S. 304 u. Bd. 169, S. 240.

des Eiweißes durch Permanganat das entsprechende Oxydationsprodukt, nämlich Guanidin, liefert. Zweitens die Bindung des Arginins im Eiweißmolekül muß eine sehr einfache sein, da bei der Einwirkung des Permanganats auf Eiweiß das Oxydationsmittel so wirkt, als wenn es direkt freies Arginin angreift. Zu der Annahme der zweiten Schlußfolgerung sind wir namentlich durch die Untersuchungen von Bénech¹⁾ berechtigt, nach denen die Bildung von Arginin als Zwischenprodukt bei der Oxydation von Eiweiß mit Permanganaten auszuschließen ist.

Diese beiden Schlußfolgerungen sind denn auch bereits von Bénech-Kutscher²⁾ und Kutscher-Zickgraf³⁾ gezogen worden.

Ganz anders gestalten sich dagegen die Verhältnisse, wenn wir die Angaben von Pommerenig als richtig betrachten, nach denen das Eiweiß bei der Oxydation mit Permanganaten kein Guanidin liefern kann. Aus diesen würde sich entweder das Arginin als ein sekundäres Kunstprodukt, das für die Konstitution des Eiweißmoleküls nicht von irgend welcher Wichtigkeit zu sein brauchte, ergeben, oder man müßte, wenn man das Arginin als notwendigen Bestandteil des Eiweißmoleküls voraussetzte, eine Bindung desselben annehmen, die imstande wäre, es der Einwirkung des Oxydationsmittels zu entziehen.

Um all diese Fragen zur Entscheidung zu bringen, sind durch Kutscher-Zickgraf⁴⁾ von neuem Oxydationsversuche mit Permanganaten an Eiweißstoffen, namentlich aber an Leim, vorgenommen worden, über deren Ergebnisse von Herrn Dr. Kutscher bereits an anderer Stelle berichtet worden ist. Das Fazit unserer Arbeit gipfelte darin, daß sich in der Tat aus Eiweiß und Leim durch Oxydation mit Permanganaten Guanidin abspalten läßt.

Das Verfahren, das sich namentlich bei der Herstellung des Guanidins aus Leim bewährte, war folgendes: 10 g Gelatine wurden im Literkolben in 250 ccm siedenden Wassers gelöst. Der siedenden Lösung wurde aus einem Tropftrichter langsam

¹⁾ Revue générale d. scienc. du 30 juin 1900.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXII, S. 278.

³⁾ Sitzungsb. d. Königl. preuß. Akad. d. Wissensch., 28. Mai 1903.

⁴⁾ l. c.

eine 10%ige Lösung von Calciumpermanganat zugefügt, bis das Calciumpermanganat langsam und erst nach längerem Sieden entfärbt wurde. Nachdem die Reaktionsflüssigkeit abgekühlt war, wurde der Manganschlamm abgesaugt, mehrmals mit Wasser ausgekocht und die auf diese Weise erhaltenen Waschwässer dem ersten Filtrat zugefügt. Darauf wurde die ganze Flüssigkeit auf ein kleines Volumen gebracht. Aus derselben schieden sich bald die schwerlöslichen Substanzen ab. Nach 24 Stunden wurden sie abfiltriert, mit wenig Wasser gewaschen. Das neugewonnene Filtrat wurde mit Natriumkarbonat vom Calcium vollkommen befreit und mit Natriumpikrat ausgefällt. Das auf diese Weise abgeschiedene Guanidinpikrat wurde abgesaugt und entweder direkt oder nach einmaliger Umkristallisation zur Wägung gebracht.

In der eben beschriebenen Oxydationsmethode ist das früher übliche Oxydationsmittel, das Kaliumpermanganat, nach dem Vorgange von Steudel, dem das Verdienst gebührt, die Permanganate der alkalischen Erden in die physiologische Chemie eingeführt zu haben, durch Calciumpermanganat ersetzt. Es wird dadurch zweierlei erreicht. Man hat in der verbleibenden Reaktionsflüssigkeit nicht mit dem schwer zu entfernenden Kali zu tun und kann deshalb das gesuchte Guanidin ohne weiteres durch Pikrinsäure in Form des sehr wenig löslichen Pikrates nahezu quantitativ abscheiden.¹⁾ Da ferner das bei der Oxydation frei werdende Calciumoxyd sofort durch die infolge der Oxydation entstehende Kohlensäure und Oxalsäure unschädlich gemacht wird, erreicht man bei Benutzung des Calciumpermanganats gleichzeitig, was Lossen durch Zugabe von Magnesiumsulfat zu seiner Reaktionsflüssigkeit erstrebte. Durch die Oxydation des Eiweißes in siedender Flüssigkeit wird schließlich eine schnelle und vollkommene Spaltung des Moleküls erlangt, und es entziehen sich nicht beträchtliche Mengen der Reaktion, indem sie in wenig veränderte Körper wie die Oxyprotsulfonsäure etc. übergehen.

Nachdem so die Darstellung des Guanidins aus Leim eine handliche Form angenommen hatte, habe ich sie im folgenden

¹⁾ Siehe Emich, Monatsh. f. Chemie 1891, S. 23.

namentlich benutzt, um Aufschluß zu erhalten, ob im Leim die Biuretreaktion an den intakten Bestand des Arginins im Leimmolekül gebunden ist oder nicht. Bekanntlich wird von Kossel in den Eiweißstoffen ein Protaminkern, d. h. eine Atomgruppierung angenommen, wie sie in den Protaminen — den einfachsten Eiweißstoffen — sich findet. Von diesem Protaminkern hängt nach Kossel die Biuretreaktion der Eiweißkörper ab. Nun sind wir durch die eingehenden Arbeiten Kossels über die Protamine sehr gut unterrichtet. Wir wissen, daß beim Salmin und Clupein z. B. das Arginin als hauptsächlich hydrolytisches Spaltungsprodukt auftritt, — es macht 84,3% resp. 82,2% des zersetzten Protamins aus — und man geht sicher nicht fehl, wenn man beim intakten Salmin und Clupein die Biuretreaktion von Atomgruppierungen abhängig macht, die durch Verkettung verschiedener Argininmoleküle untereinander oder mit dem einen resp. andern der an Menge zurückstehenden Spaltungsprodukte entstanden sind. Bei den komplizierten Eiweißstoffen dagegen sind die Verhältnisse nicht so durchsichtig. Die Zahl der endgültigen hydrolytischen Spaltungsprodukte, die sie liefern können, und die wir als die Komponenten des Eiweißmoleküls betrachten müssen, ist sehr groß. Das Arginin überwiegt hier nicht, sondern andere Körper wie das Leucin, Phenylalanin, Glykokoll usw. Gemeinsam ist allerdings diesen Stoffen mit dem Arginin das Fehlen der Biuretreaktion und wir müssen uns wohl oder übel bei den komplizierteren Eiweißstoffen ähnlich wie beim Salmin denken, daß die Biuretreaktion abhängig ist von Komponenten, die an sich die Biuretreaktion nicht geben, die aber miteinander zu Atomgruppierungen zusammentreten können, welchen die Biuretreaktion eigentümlich ist. Die Zahl derartiger möglichen Atomgruppierungen wächst aber mit der Zunahme der Komponenten, die an dem Aufbaue eines Eiweißmoleküls teilnehmen, und man kann von vornherein auch solche annehmen, in die das Arginin nicht eingetreten zu sein braucht.

Um die Frage zu entscheiden, ob beim Leim die Biuretreaktion in der Tat von einer eigenartigen Verkettung des Arginins im Molekül abhängig ist, standen zwei Wege offen. Man konnte entweder auf bestimmte Gewichtsmengen Leim

eine siedende Säure wechselnde Zeit einwirken lassen, das gebildete Arginin jedesmal quantitativ bestimmen nach dem Verfahren von Kossel-Kutscher und so feststellen, ob gerade die Maximalausbeute von Arginin mit dem Verschwinden der Biuretreaktion zusammenfiel. Mit dieser Methode löst man die Verkettung des im Eiweiß steckenden Arginins und man dürfte als höchst wahrscheinlich die Abhängigkeit der Biuretreaktion von dieser Verkettung annehmen, wenn die Maximalausbeute an Arginin und Aufhören der Biuretreaktion sich deckten.

Man konnte aber auch die Oxydation des Eiweißes resp. Leims mit Permanganaten benutzen. Diese Agentien greifen, wie ich ausgeführt habe, das im Eiweißmolekül präformiert vorhandene Arginin direkt an und zerstören es. Als charakteristisches und quantitativ isolierbares Oxydationsprodukt geht dabei aus dem Arginin das Guanidin hervor, das durch Permanganate nur wenig leidet. Bei dieser Methode mußte, wenn die Biuretreaktion von dem Bestande des im Eiweißmolekül präformierten Arginins abhängig ist, das Verschwinden der Biuretreaktion mit der völligen Zerstörung des Arginins oder, was dasselbe ist, mit der Maximalausbeute an Guanidin zusammentreffen. Ich habe die Oxydationsmethode der hydrolytischen Spaltung des Leims vorgezogen, weil die Reaktionsflüssigkeit dabei ungefärbt bleibt, was für die Anstellung der Biuretreaktion erforderlich ist, und weil die quantitative Gewinnung des Guanidins leichter ist wie diejenige des Arginins.

Meine Versuche lasse ich nunmehr folgen:

I. 10 g lufttrockene Gelatine,¹⁾ entsprechend 8 g trockener Gelatine, wurden in 250 cem Wasser gelöst und der siedenden Flüssigkeit langsam Calciumpermanganatlösung zugefügt. Es wurden zur Oxydation 20 g Calciumpermanganat verwandt. Die Biuretprobe in der Reaktionsflüssigkeit fiel stark positiv aus. Das Guanidinpikrat wurde aus der Reaktionsflüssigkeit nach dem auf Seite 264 und 265 angegebenen Verfahren dargestellt. Ausbeute an Guanidinpikrat: 0,33 g.

II. 10 g der gleichen Gelatine wurden mit 30 g Calcium-

¹⁾ Es wurde beste deutsche Handelsgelatine benutzt, die ohne vorhergehende Reinigung zur Verwendung kam.

permanganat oxydiert. Biuretprobe in der Reaktionsflüssigkeit stark positiv; Ausbeute an Guanidinpikrat: 0,47 g.

III. 10 g der gleichen Gelatine wurden mit 40 g Calciumpermanganat oxydiert. Biuretprobe in der Reaktionsflüssigkeit stark positiv; Ausbeute an Guanidinpikrat: 0,61 g.

IV. 10 g der gleichen Gelatine wurden mit 50 g Calciumpermanganat oxydiert. Biuretprobe in der Reaktionsflüssigkeit stark positiv; Ausbeute an Guanidinpikrat: 0,65 g.

V. 10 g der gleichen Gelatine wurden mit 60 g Calciumpermanganat oxydiert. Biuretprobe in der Reaktionsflüssigkeit stark positiv; Ausbeute an Guanidinpikrat: 0,64 g.

VI. 10 g der gleichen Gelatine wurden mit 70 g Calciumpermanganat oxydiert. Biuretprobe in der Reaktionsflüssigkeit schwach positiv; Ausbeute an Guanidinpikrat: 0,75 g.

VII. 10 g der gleichen Gelatine wurden mit 73 g Calciumpermanganat oxydiert. Biuretprobe in der Reaktionsflüssigkeit negativ; das Kupfer wurde mit rein blauer Farbe gelöst; Ausbeute an Guanidinpikrat: 0,80 g.

VIII. 10 g der gleichen Gelatine wurden mit 80 g Calciumpermanganat oxydiert. Biuretprobe in der Reaktionsflüssigkeit negativ; Ausbeute an Guanidinpikrat: 0,67 g.

IX. 10 g der gleichen Gelatine wurden mit 80 g Calciumpermanganat oxydiert. Biuretprobe in der Reaktionsflüssigkeit negativ; Ausbeute an Guanidinpikrat: 0,65 g.

Der Übersicht wegen fasse ich die bei der Oxydation des Leims erhaltenen Resultate in nachstehender Tabelle zusammen:

Versuchs-Nr.	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
Angewandte Gelatinemenge	8 g trockene Gelatine	8 g trockene Gelatine	8 g trockene Gelatine	8 g trockene Gelatine	8 g trockene Gelatine	8 g trockene Gelatine	8 g trockene Gelatine	8 g trockene Gelatine	8 g trockene Gelatine
Zur Oxydation benutzte Menge an Calciumpermanganat	20 g	30 g	40 g	50 g	60 g	70 g	73 g	80 g	80 g
Ausfall der Biuretreaktion	stark positiv	stark positiv	stark positiv	stark positiv	stark positiv	schwach positiv	negativ	negativ	negativ
Ausbeute an Guanidinpikrat	0,33 g	0,47 g	0,61 g	0,65 g	0,64 g	0,75 g	0,80 g	0,67 g	0,65 g

Ein Blick auf die Tabelle zeigt, wie in der Tat beim Leim die Maximalausbeute an Guanidin oder was, wie bereits gesagt, dasselbe heißt, die Zerstörung des Arginins mit dem Verschwinden der Biuretreaktion genau zusammenfällt. Mir scheint daher die Schlußfolgerung durchaus gerechtfertigt, daß beim Leim die Biuretreaktion von dem Bestand des Arginins im Molekül abhängig ist.

Die von mir erhaltenen Resultate lassen sich durch die Angaben Harts,¹⁾ der quantitativ die Menge des Arginins bestimmte, die von gereinigter Handelsgelatine bei hydrolytischer Spaltung geliefert werden kann, kontrollieren. Das gewonnene Guanidin läßt sich ohne weiteres auf Arginin umrechnen. Theoretisch müßte nun eigentlich das aus dem ausschlaggebenden Versuch VII berechnete Arginin genau mit dem von Hart aus der Handelsgelatine wirklich dargestellten der Menge nach übereinstimmen. Die 0,8 g Guanidinpikrat im Versuch VII entsprechen 0,483 g Arginin, nach Hart müssen 8,0 g Gelatine 0,610 g Arginin liefern. Es sind nach der Oxydationsmethode 20,7% zu wenig Arginin gefunden worden. Die Ursache für das Defizit geben uns die Versuche VIII und IX an, die zeigen, daß das Guanidin nicht absolut widerstandsfähig gegen Calciumpermanganat ist, sondern schließlich auch angegriffen und weiter verändert wird. Diese deletäre Wirkung des Calciumpermanganats scheint allerdings erst dann besonders stark sich geltend zu machen, nachdem die leicht oxydablen Bestandteile des Leims zerstört worden sind. Wir müssen aber wohl annehmen, daß auch vorher bereits geringe Mengen von Guanidin weiter gespalten werden, wodurch sich das Minus des aus dem Guanidin berechneten Arginins erklärt. Außerdem ist auch wohl die von mir gebrauchte nicht gereinigte Handelsgelatine ärmer an Arginin gewesen als das gereinigte Präparat Harts.

Isolierung eines weiteren Oxydationsproduktes.

Geht man bei der Verarbeitung der Reaktionsflüssigkeit auf Guanidin vor, wie dies Seite 264 und 265 näher geschildert worden ist, dann scheiden sich aus der eingeengten Reaktions-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXIII, S. 347.

flüssigkeit schwer lösliche Kristallmassen ab, die reichliche Mengen von Calcium enthalten. Die aus den verschiedenen Versuchen gesammelten Massen betrug 2,46 g. In der Annahme, daß das Calciumsalz einer organischen Säure vorlag, wurde zur Gewinnung der freien Säure die ganze Menge in konzentrierte Salzsäure gebracht, der ungelöste Rest abgesaugt und aus verdünnter Salzsäure umkristallisiert. Dabei schied sich in feinen glänzenden makroskopischen Nadeln eine scheinbar völlig einheitliche Substanz ab. Dieselbe wurde abgesaugt, mit Wasser, Alkohol und Äther gewaschen. Sie war in kaltem Wasser sehr schwer, in heißem Wasser leicht löslich, in Alkohol und Äther schien sie völlig unlöslich. Ihre wässrige Lösung reagierte gegen Lakmus sauer. Die trockene Substanz sublimierte beim Erhitzen im Reagensröhrchen vollkommen und setzte sich in den kälteren Teilen des Reagensgläschens wieder in schönen Kristallen ab. Der Lassaigneschen Probe nach enthält der Körper große Mengen von Stickstoff. Übergoß man ihn mit starker kalter Natronlauge, dann begann er nach ca. 15 Minuten reichlich Ammoniak abzuspalten. Ich habe schließlich noch versucht, den Sublimationspunkt und den Schmelzpunkt des von mir isolierten Körpers zu bestimmen. Es zeigte sich dabei, daß er aus dem offenen Schmelzröhrchen bei 260° C. zu sublimieren begann, ohne vorher zu schmelzen. Im zugeschmolzenen Schmelzröhrchen konnte ich ihn bis 308° C. erhitzen, ohne ihn zum Schmelzen zu bringen oder sonst merklich zu verändern.

Die Oxydation des Leims mit Baryum- und Kaliumpermanganat.

Ursprünglich hatte ich die Absicht, nach dem Vorgange von Steudel die Oxydationen des Leims mit Baryumpermanganat auszuführen. Ich habe aber nur einen Versuch angestellt, indem ich 10 g der auch sonst benutzten Gelatine mit einer Lösung von Baryumpermanganat bis zum Verschwinden der Biuretreaktion oxydierte. Ich brauchte dazu ca. 65 g Baryumpermanganat. Bei der Darstellung des Guanidins aus der Reaktionsflüssigkeit ver-

fuhr ich wie bei den andern Versuchen. Das Guanidin-pikrat, das ich gewann, zeigte sich aber stark durch Kalium-pikrat verunreinigt. Erst durch häufiges Umkristallisieren vermochte ich 0,43 g analysenreines Guanidin-pikrat zu gewinnen. Ich lasse die Analysenzahlen folgen:

0,154 g Substanz gaben 38,6 ccm N, T. = 13° C., Ba = 750 mm.

Für $\text{CH}_5\text{N}_3 \cdot \text{C}_6\text{H}_3\text{N}_3\text{O}_7$

Berechnet N = 29,20%

Gefunden N = 29,36%

Das Kali, das in diesem Versuch die Isolierung des Guanidin-pikrats so erschwert und die Ausbeute vermindert hatte, entstammte dem Baryumpermanganat. Da kalifreies Baryumpermanganat schwer im Handel zu haben ist, verdient das Calciumpermanganat, welches sich stets kalifrei erwies, sicher in manchen Fällen den Vorzug.

Zum Schlusse habe ich noch zwei Versuche mit dem ungünstigsten, aber gebräuchlichsten der Permanganate, nämlich dem Kaliumpermanganat, angestellt. Ich löste 20 g Gelatine in 400 ccm Wasser, erhitzte zum Sieden und fügte dazu langsam eine konzentrierte Lösung von Kaliumpermanganat. Es wurden im ganzen 84,2 g Kaliumpermanganat verbraucht. Die Reaktionsflüssigkeit war am Ende des Versuches stark alkalisch gegen Lakmus. Sie wurde mit verdünnter Schwefelsäure neutralisiert und eingeengt. Aus der stark eingeengten Lösung kristallisierte beim Erkalten ein großer Teil des Kalis als Kaliumsulfat aus, das abgesaugt wurde. Das Filtrat wurde mit Natriumpikrat ausgefällt. Die abgeschiedenen schwerlöslichen Pikrate wurden abfiltriert, mit Salzsäure zersetzt und die Pikrinsäure durch Äther entfernt. Die wässrige salzsaure Lösung wurde zur Trockne verdampft und mit heißem Alkohol extrahiert. Die alkoholische Lösung wurde abgedampft, der Rückstand von neuem mit Alkohol aufgenommen. Dieses Verfahren wurde so oft wiederholt, bis nach dem Verdunsten des Alkohols ein Rest hinterblieb, der sich glatt und leicht durch Alkohol aufnehmen ließ. Er wurde weiterhin so verarbeitet, daß seine alkoholische Lösung mit alkoholischer Pikrinsäure gefällt wurde. Das sich ausscheidende Pikrat war der Analyse nach Guanidin-pikrat. Es wurden davon 0,46 g gewonnen.

Die Analyse ergab folgende Zahlen:

0,1374 g Substanz gaben 35,2 ccm N bei 752,5 mm Ba und 15,75° C.

Berechnet N = 29,20% Gefunden N = 29,96%.

Bei einer zweiten Oxydation mit Kaliumpermanganat versuchte ich während der Oxydation das Freiwerden von Kali und mithin eine Einwirkung des Alkali auf den Oxydationsvorgang auszuschließen. Dies wurde dadurch erreicht, daß bei den nämlichen Verhältnissen wie bei der ersten Oxydation während des Oxydierens ein kräftiger Strom von Kohlensäure durch die Oxydationsflüssigkeit geleitet wurde. Die Reaktion nach dem Beenden der Oxydation war schwach alkalisch. Es gelang mir, auch in diesem Versuch nach dem oben geschilderten Verfahren zum Guanidin zu gelangen. Die Ausbeute war 0,52 g Guanidinpikrat aus 20 g lufttrockner Gelatine.

Vorstehende Arbeit ist von mir im physiologischen Institut zu Marburg unter Leitung des Herrn Privatdozenten Dr. Kutscher ausgeführt worden, dem ich auch an dieser Stelle für seine lebenswürdige Unterstützung mit Rat und Tat meinen wärmsten Dank ausspreche.
