

## Physiologisch-chemische Notizen.

Von  
**E. Salkowski.**

(Aus der chemischen Abteilung des pathologischen Instituts der Universität zu Berlin.)

(Der Redaktion zugegangen am 20. September 1908.)

### 1. Über die Isolierung des Cholesterins aus den Fetten.

In einem kürzlich erschienenen Sammelreferat «Über Cholesterin und verwandte Stoffe» bespricht W. Glikin<sup>1)</sup> u. a. eingehend die Einzelheiten der von verschiedenen Autoren zur Isolierung des Cholesterins aus den Fetten angewendeten Verfahren, so auch dasjenige, das ich in einer Arbeit «Beiträge zu den Untersuchungsmethoden des Lebertrans und der Pflanzenöle»<sup>2)</sup> angewendet habe. Glikin sagt über dasselbe l. c. S. 294: «An Stelle der zeitraubenden Salkowskischen Methode empfehlen Forster und Reichelmann usw.»

Glikin hat mit der Charakterisierung des Verfahrens — das ich übrigens nicht als das meinige bezeichnet wissen möchte, da es das allgemein angewendete ist — als «zeitraubend» unzweifelhaft recht. Ich habe indessen vor zwei Jahren ein äußerst schnell ausführbares Verfahren angegeben, das Glikin entgangen und auch sonst wohl wenig bekannt geworden ist. Glikin ist aus diesem Übersehen kein Vorwurf zu machen, da meine Angaben sich in einer Festschrift<sup>3)</sup> befinden — Festschriften werden erfahrungsgemäß in der Literatur wenig berücksichtigt — und noch dazu in Petitdruck und ohne Hervorhebung des daran Neuen.

---

<sup>1)</sup> Biochem. Zentralblatt VII, Nr. 8 u. 9 (1908).

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. analyt. Chem., Bd. XXVI, S. 557 (1887).

<sup>3)</sup> Arbeiten aus dem pathologischen Institut zu Berlin, Festschrift Berlin, Verlag von Hirschwald, 1906, S. 579.

Um nun das Verfahren der allgemeinen Kenntnisnahme zugänglicher zu machen, möchte ich es an dieser Stelle noch einmal anführen mit den Erfahrungen, die sich seitdem ergeben haben.

Die Verseifung selbst geschieht so, wie ich es in meinem Practicum der physiologischen Chemie<sup>1)</sup> unter Berücksichtigung der Anmerkungen beschrieben habe.

Man löst ca. 15 g Kalihydrat unter Erwärmen in 10 ccm Wasser, gießt die Lösung in einen Kolben von 400—500 ccm Inhalt und spült mit Anteilen — höchstens 50 ccm — von bereitgestellten 100 ccm Alkohol von ca. 95 % Tr. nach. Andererseits schmilzt man 50 g Fett in einer Schale auf dem Wasserbad, gießt das geschmolzene Fett in einen zweiten Kolben und spült die Schale mit dem Rest des bereitgestellten Alkohols in einzelnen Anteilen nach. Man erhitzt beide Kolben auf dem Wasserbad bis zum Sieden des Inhalts und vereinigt dann die Lösungen, indem man die Kalilösung in die Fettlösung gießt oder umgekehrt — das scheint keinen Unterschied zu machen. Nachdem die mitunter recht stürmische Reaktion abgelaufen ist, kühlt man die alkoholische Seifenlösung durch Einsetzen des Kolbens in Wasser ein wenig ab und gießt dann die noch etwas warme Lösung in 500 ccm Äther, der sich in einem großen Scheidetrichter befindet; es entsteht eine klare Lösung. Nun setzt man  $\frac{1}{2}$  Liter Wasser hinzu und schwenkt gelind um; es tritt eine glatte Schichtenbildung ein, die Ätherlösung trennt sich aus der Seifenlösung sofort und ohne jede Zwischenschicht scharf ab. Starkes Schütteln ist zu vermeiden, da es unnötig ist und zu lästiger Emulsionsbildung führen kann. Man trennt nun sehr sorgfältig ab und wäscht die Ätherlösung durch sanftes Durchschütteln mit 300 ccm Wasser. Das abgelassene Waschwasser reagiert bei richtigem Arbeiten nur ganz schwach alkalisch. Es steht natürlich nichts im Wege, die Ätherlösung noch einmal in derselben Weise zu waschen. Will man die unverseifbaren Bestandteile des Fettes quantitativ gewinnen, so wird man zweckmäßig die abgetrennte Seifen-

---

<sup>1)</sup> 1. Aufl. S. 271 (1893), 2. S. 203 (1900), 3. S. 217 (1906).

lösung noch ein- bis zweimal mit annähernd dem gleichen Volumen Äther sanft durchschütteln; die Trennung erfolgt nicht so gut, ist aber doch bei einigem Zuwarten, eventuell unter Zusatz von etwas Alkohol, leicht zu erreichen. Handelt es sich nicht um genaue quantitative Bestimmung, so kann man die nochmalige Ausschüttelung mit Äther unterlassen. Was der Äther bei der zweiten Ausschüttelung an Cholesterin aufnimmt, ist minimal.

Auch Bömer (1898) wendet, wie ich aus der Arbeit von Glikin (l. c. S. 295) ersehe, auf 50 g Fett 100 ccm Alkohol (mit 20 g Kalihydrat) und 500 ccm Äther an, versetzt aber die Seifenlösung mit 200 ccm Wasser und muß dann natürlich mit Äther schütteln; bei meinem Verfahren wird dagegen zunächst alles in Äther gelöst — das ist das Charakteristische desselben —, dann erst durch Wasserzusatz eine Scheidung bewirkt; das Schütteln fällt ganz fort und damit auch die lästige Emulsionsbildung.

An der zitierten Stelle aus den «Arbeiten aus dem pathologischen Institut» habe ich das angegebene Verfahren bei einer unvollständigen Verseifung angewendet, die auf den Nachweis von Cholesterinestern gerichtet war. Die Verseifung bleibt nämlich stets unvollständig, wenn man sich mit dem spontanen Ablauf der Reaktion begnügt, die beim Zusammengießen der siedendheißen Lösungen eintritt. Es fragte sich, ob das Verfahren auch für den Fall gilt, daß man die Verseifung durch nachträgliches längeres Erhitzen zu einer vollständigen macht. Das ist nicht ohne weiteres als selbstverständlich anzunehmen; es war wohl denkbar, daß die Gegenwart einer gewissen Quantität ätherlöslichen Fettes für die Lösung der Seife in dem Gemisch von Alkohol und Äther Bedingung ist. Dafür schienen im Laboratorium bei vollständiger Verseifung gemachte Erfahrungen zu sprechen; es wurde nämlich öfters beim Eingießen der alkoholischen Seifenlösung in den Äther keine klare Ätherlösung erhalten, die Seife schied sich vielmehr in klumpigen Massen aus. Allerdings lösten sich diese Klumpen sehr bald bei Zusatz von 300 ccm Wasser und die Abtrennung der Schichten war leicht zu erreichen, aber die Erscheinungen verliefen doch eben

anders, und das oben betonte Prinzip des Verfahrens war nicht innegehalten.

Bei den von mir angestellten Nachuntersuchungen schien sich diese Vermutung zunächst zu bestätigen; bei vollständiger Verseifung erhielt auch ich beim Eingießen der Seifenlösung in den Äther, ebenso wie andere Beobachter im Laboratorium, keine klare Lösung, sondern eine klumpige Ausscheidung von Seifen. Als ich nun aber den Gegenversuch mit 50 g unvollständig verseiftem Fett machte, blieb auch hier der Erfolg aus, ich konnte also meine früheren Beobachtungen nicht bestätigen, das Verfahren versagte aus mir vorläufig unbekanntem Gründen.

Die weitere Untersuchung zeigte nun bald, daß die Ursache hiervon ein wechselnder Gehalt des Äthers an Wasser ist. Sobald der Äther eine gewisse Quantität Wasser enthält, treten die Erscheinungen in der beschriebenen Weise ein, gleichgültig, ob die Verseifung vollständig oder unvollständig ist. Den nötigen Wassergehalt des Äthers erreicht man leicht, wenn man in den Scheidetrichter außer dem Äther noch 30—50 ccm Wasser eingießt und den Äther vor dem Eingießen der Seifenlösung tüchtig mit dem Wasser durchschüttelt. In meinen früheren Versuchen muß zufällig der Äther stärker wasserhaltig gewesen sein.

Ein Punkt bedarf dabei noch der Erwähnung. Der Alkoholgehalt der Seifenlösung darf sich nicht ändern. Man muß also die Erhitzung zur Erzielung der vollständigen Verseifung am Rückflußkühler ausführen oder, wenn man das nicht will, vor dem Eingießen der Lösung in Äther soviel Alkohol hinzufügen, als beim Erhitzen verloren gegangen ist. Dabei läßt man sich am einfachsten von dem Volumen der Seifenlösung leiten. Das Gemisch beträgt etwa 165 ccm, man setzt also soviel Alkohol hinzu, daß dieses Volumen wieder erreicht wird. Erhitzt man ohne Rückflußkühler und versäumt auch den nachträglichen Alkoholzusatz, so bleibt der beschriebene Erfolg aus; er tritt nur bei genauer Innehaltung der angegebenen Versuchsbedingungen ein.

Daß die Ätherlösungen beim Abdestillieren etwas Seife hinterlassen, der Verdampfungsrückstand daher mit Petroläther

zu bearbeiten ist, bedarf kaum der Erwähnung, indessen habe ich doch öfters beobachtet, daß, wenn man nicht ganz bis zur Trockene abdestilliert, der Inhalt des Kolbens direkt zu einem dünnen Brei glänzender Cholesterinkristalle erstarrte, die sich wohl auf einem gewogenen Filter sammeln, auswaschen und wägen ließen.

Ich bemerke noch, daß meine neueren Versuche ausschließlich mit Schweinefett angestellt sind — die älteren außerdem mit Palmfett, sog. Palmöl (nicht Palmkernfett) —, es ist möglich, daß andere Fette, die minder reich an Triolein sind, sich anders verhalten.

## 2. Zum Nachweis des Indikans im Harn.

Für den Nachweis physiologisch, namentlich aber klinisch interessierender Verbindungen, besonders im Harn, werden in steigender Zahl neue Reaktionen angegeben, für welche ein Bedürfnis kaum vorliegt. Meistens wird als Begründung die größere Schärfe der Reaktion angegeben, ein Vorzug, der für klinische Untersuchungen oft von recht zweifelhaftem Wert ist, denn unter Umständen kann ja die übergroße Feinheit einer Reaktion für klinische Zwecke geradezu ein Fehler sein. Für diese kommt die Einfachheit und Sicherheit, d. h. die möglichste Unabhängigkeit von besonderen Bedingungen weit mehr in Betracht als äußerste Feinheit. Es liegt ferner auf der Hand, daß für ein Unterrichtslaboratorium die Fülle neuer Reagenzien eine sehr unangenehme Belastung darstellt, umsomehr, als dieselben meistens recht teuer sind. Aber dieser Nachteil ist nicht der einzige, weit wesentlicher ist, daß die Anforderungen an das Gedächtnis des studierenden Mediziners dadurch fort-dauernd gesteigert werden; er soll vielfach mit Substanzen operieren, die er in den Vorlesungen über organische Chemie kaum erwähnen gehört hat, er kann die Bedingungen verwickelter Reaktionen nicht übersehen und lernt sie nicht beherrschen, ebensowenig vermag er sie zu behalten. Aus diesen Gründen führe ich neue Reaktionen, welche neue Reagenzien erfordern, nicht ein, wenn sie nicht ganz unzweifelhafte Vorzüge vor den alten haben, mein Bestreben geht im Gegenteil

dahin, die Zahl der erforderlichen Reagenzien zu beschränken. In diesem Sinne möchte ich auf die Anwendung von Kupfersulfatlösung zum Nachweis des Indikans aufmerksam machen.

Versetzt man ca. 8 ccm eines indikanhaltigen Harns mit ca. 1 ccm der gewöhnlich gebrauchten Kupfersulfatlösung (1 : 10), setzt dazu das gleiche Volumen Salzsäure von 1,19 D, dann ein bis einige Kubikzentimeter Chloroform und mischt durch gelindes Hinundherneigen, so färbt sich das Chloroform blau. Vor der Chlorkalklösung hat die Anwendung der Kupfersulfatlösung den großen Vorzug, daß ein Überschuß nicht schadet, während man die Chlorkalklösung bekanntlich sorgfältig bemessen muß. Mehr als die Chlorkalklösung wird jetzt wohl das Obermayersche Reagens, die eisenchloridhaltige Salzsäure, angewendet; aber auch von diesem hat Ellinger<sup>1)</sup> nachgewiesen, daß es stets aus Indoxyl Isatin bildet und so zu Verlusten an Indigblau führt, welche durch die Bildung von Indigrot nur teilweise ausgeglichen werden.

Ob diese Überoxydation auch bei Verwendung von Kupfersulfat und Salzsäure eintritt, bleibt noch zu untersuchen. Wenn aber auch das Kupfersulfat — was nur wenig wahrscheinlich ist — mit demselben Fehler behaftet sein sollte, so hätte die Anwendung von Kupfersulfat an Stelle des Obermayerschen Reagens immer noch den Vorzug, daß ein für einen speziellen Zweck gebrauchtes Reagens in Fortfall käme.

Ich knüpfe hieran noch eine Bemerkung. In neuerer Zeit wird es, namentlich von französischen Autoren, als sichere Tatsache angesehen, daß der Harn von reichlich mit Weißkohl gefütterten Kaninchen kein Indikan enthält. So sagt Cl. Gautier,<sup>2)</sup> «On sait, que le lapin, nourri à volonté de choux n'excrète pas de chromogène indoxylique».

Diese Angaben haben eine gewisse Bedeutung. Wenn sie sich bestätigen, so würde daraus wenigstens mit Wahrscheinlichkeit hervorgehen, daß die allgemein angenommene Vorstellung, daß unter allen Umständen ein gewisser Teil des

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXXVIII, S. 186 und Bd. XLI, S. 22 u. ff.

<sup>2)</sup> Compt. rend. de la soc. de Biologie, Bd. XLIV (1908), Nr. 30, S. 1022.

Eiweißes im Darmkanal der bakteritischen Zersetzung unterliegt, daß diese Vorstellung nicht richtig ist. Man kann sich nun aber leicht überzeugen, daß das Dogma vom Fehlen des Indikans in dem Harn überreichlich mit Kohl gefütterter Kaninchen unbegründet ist.

Allerdings, wenn man den Harn direkt prüft, sei es mit Obermayerschem Reagens, sei es mit Kupfersulfat, bekommt man keine Indikanreaktion, dennoch fehlt das Indikan nicht.

Der 24stündige Harn eines solchen Kaninchens wurde eingedampft und mit Alkohol extrahiert, der Alkoholauszug verdunstet und zu 25 ccm in Wasser gelöst. Je 2,5 ccm =  $\frac{1}{10}$  der Tagesquantität gab sowohl mit Salzsäure + Kupfersulfat, als auch mit Obermayerschem Reagens — beidemal unter Anwendung von Chloroform — eine ganz starke Indikanreaktion.

Für die quantitative Bestimmung dürfte daraus folgen, daß sie nach zwei Richtungen einer Revision bedürftig ist: 1. ob man auch fernerhin den Harn direkt, d. h. ohne vorgängiges Eindampfen, nach Fällung mit Bleiacetat oder -subacetat anwenden darf, 2. ob nicht dem Obermayerschen Reagens das Kupfersulfat + Salzsäure zu substituieren ist.

### 3. Über den Gehalt der Rindergalle an Cholesterin.

Im Handel kommt unter der Bezeichnung *Fel tauri depuratum siccum sive Natrum choleinicum* ein früher offizinell gewesenes Präparat vor, das sich als Ersatz frischer Galle, wenn solche grade nicht zur Verfügung steht, für manche Zwecke gut brauchen läßt. Dasselbe stellt ein gelbliches Pulver dar, das beim Aufbewahren unter Anziehen von Wasser zu einer harten Masse zusammenbackt.

Über die Darstellung dieses Präparates entnehme ich dem Handbuch der pharmazeutischen Chemie von Hager (1887), Bd. I, S. 1026 folgendes:

Gleiche Volumina frische Galle und Weingeist werden durch Schütteln gemischt, nach 2 Tagen filtriert, der Alkohol durch Eindampfen auf dem Wasserbad entfernt<sup>1)</sup> und der Rückstand unter häufigem Umschütteln mit soviel feuchter Tierkohle,

<sup>1)</sup> Das dürfte jedenfalls nur unvollständig gelingen.

die vorher mit Salzsäure gereinigt worden ist, nach und nach versetzt, bis eine der Flüssigkeit entnommene und filtrierte Probe nur noch schwach gelb gefärbt erscheint. Alsdann filtriert man und dampft zur Trockene.

Es war mir nun schon lange aufgefallen, daß beim Auflösen des Präparates in lauwarmem Wasser weiße Körnchen ungelöst bleiben. Dieselben wurden durch Abfiltrieren, Waschen mit Wasser, teils durch Dekantieren, teils auf dem Filter, und Trocknen an der Luft isoliert. Die Körnchen schmolzen beim Erhitzen auf dem Platinblech und verbrannten mit leuchtender Flamme unter Hinterlassung einer minimalen Quantität Asche. Die alkoholische Lösung gab bei freiwilliger Verdunstung (mikroskopisch) rhombische Tafeln, vielfach mit einspringenden Winkeln, mit einer geringen Beimischung von lanzettförmigen, in verdünnter Natronlauge löslichen Blättchen. Beim Erhitzen im Kapillarrohr trat völlige Schmelzung bei  $145^{\circ}$  ein, ein Teil der Substanz erweichte jedoch schon bei etwa  $60^{\circ}$ . Die Chloroformlösung gab mit Schwefelsäure Cholesterinreaktion, die rhombischen Blättchen Blaufärbung mit  $\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{J}$ . Es handelt sich somit um Cholesterin mit einer geringen Beimischung von hochschmelzenden Fettsäuren.

Der Nachweis des Cholesterins in diesem Präparat ist nicht ohne Interesse. Er konnte bisher in der Galle mit Sicherheit nicht ohne Verseifung geführt werden. Dabei werden etwa vorhandene Cholesterinester gespalten. Wenn man also Cholesterin findet, so bleibt es unsicher, ob es als solches in der Galle vorhanden gewesen ist, oder als Cholesterinester. Streng genommen ist also Cholesterin als solches, abgesehen von den Gallensteinen, überhaupt noch nicht in der Galle nachgewiesen worden. Von dem beim Auflösen des *Fel tauri depuratum* sich abscheidenden Cholesterin kann es aber nicht zweifelhaft sein, daß es wirklich als solches in der Galle vorhanden war.

Von Interesse wären schließlich noch die Mengenverhältnisse, ich muß indessen davon absehen, hierüber Angaben zu machen, da es sich gezeigt hat, daß das Cholesterin in dem zu einem festen Klumpen verbackenen Präparat ganz ungleichmäßig verteilt ist. So erhielt ich aus einer Probe von 5 g beim



Auflösen 0,0414 g Substanz, dagegen aus einer anderen Probe von 40 g nur einige Körnchen. Bei näherer Betrachtung des aus dem Glase nach Zerschlagen desselben herausgenommenen Klumpen zeigte sich übrigens, daß die Masse an der Oberfläche direkt sichtbare weiße Körnchen in ganz unregelmäßiger Verteilung eingesprengt enthielt.

Bemerkt sei noch, daß das Präparat ein jahrelang aufbewahrtes war, das Verhalten anderer, frischer Präparate habe ich nicht untersucht.

Ich schließe hieran noch eine Bemerkung bezüglich einer Ausführungsform der Reaktion des Cholesterins mit Schwefelsäure, die mir gute Dienste geleistet hat.

Löst man einige Stäubchen Cholesterin in Chloroform, tropft die Lösung auf Filtrierpapier oder tränkt dieses damit, und übergießt das inzwischen durch freiwillige Verdunstung getrocknete, in eine Porzellanschale gelegte Filtrierpapier mit Schwefelsäure, so färbt es sich, (resp. die getränkte Stelle) zitronengelb. Gießt man die Schwefelsäure ab, so geht die gelbe Farbe sehr bald in rötlich bis rosenrot über, verschwindet bei Wasserzusatz sofort. Die Farbenerscheinungen traten nur dann gut ein, wenn die Chloroformlösung recht verdünnt war.

#### 4. Zur Ausführung der Kjeldahl-Bestimmung.

Im Laufe der Jahre haben sich mir bei dieser Methode einige Handgriffe als nützlich erwiesen, die vielleicht auch für Andere von Interesse sein möchten.

1. Der Zusatz von Quecksilberoxyd<sup>1)</sup> ist unbequem, weil man dasselbe jedesmal abwägen muß; außerdem bilden sich beim Übergießen desselben mit Schwefelsäure durch Umhüllung der einzelnen Partikelchen mit Quecksilbersulfat leicht harte Brocken, welche der Auflösung hartnäckig widerstehen, auch wohl Stoßen verursachen können.

Diesen Unbequemlichkeiten gehe ich aus dem Wege, indem ich einige Kubikzentimeter einer Lösung von Mercuriacetat von annähernd bekanntem Gehalt anwende, z. B. 5—6 ccm einer

---

<sup>1)</sup> Über die Anwendung von metallischem Quecksilber habe ich keine Erfahrungen.

ohne Erwärmen hergestellten 10%igen Lösung. Daß dadurch Wasser in die Mischung gelangt, ist ohne Bedeutung, ja meiner Ansicht nach unter Umständen förderlich. Ich pflege bei der Analyse trockener Substanzen stets etwas Wasser hinzuzusetzen, da ich den Eindruck gewonnen habe, daß der Prozeß dann schneller verläuft. Aus diesem Grunde halte ich es auch für ganz überflüssig, rauchende Schwefelsäure oder Phosphorsäureanhydrid anzuwenden, wie es in manchen Laboratorien sogar beim Harn geschieht, bei dem dieser Zusatz augenscheinlich zwecklos ist. Man kommt in allen Fällen mit Schwefelsäure von 1,84 D aus.

Wendet man Quecksilber bei der Kjeldahlbestimmung an, so empfiehlt es sich, die Bestimmung ohne Unterbrechung zu Ende zu führen. Ist man genötigt, sie zu unterbrechen, so fördere man sie wenigstens soweit, daß die schwefelsaure Lösung mit Wasser verdünnt werden kann. Tut man das nicht, sondern läßt die unverdünnte Lösung bis zum nächsten Tage stehen, so scheiden sich oft weiße, äußerst fest am Glase haftende Niederschläge, vermutlich Mercuriammonsulfat, aus, welche auch durch Kochen mit Wasser nur sehr schwer oder überhaupt nicht vollständig vom Glase abzulösen sind. Es bleibt auch zweifelhaft, ob sie beim nachfolgendem Kochen mit Natronlauge + Natriumsulfid oder Natriumthiosulfat vollständig zersetzt werden, man ist also meines Erachtens selbst dann nicht vor Fehlern geschützt, wenn man den Aufschlußkolben selbst zum Abdestillieren des Ammoniaks benutzt.

2. Bei der Analyse von Nahrungsmitteln und Faeces setzen sich nicht selten in dem gewölbten oberen Teil des Kolbens halbverkohlte Massen an, welche auch durch Umschütteln nicht zu lösen sind und der Verbrennung hartnäckig widerstehen. Es bleibt dann nichts anderes übrig, als den Kolben völlig erkalten zu lassen, die anhängenden Massen mit Wasser herunterzuspülen und aufs neue zu erhitzen.

3. Der Zusatz von Kaliumpermanganat wird jetzt wohl ziemlich allgemein unterlassen. Es kommen indessen doch Fälle vor, in denen die Verbrennung gar zu lange dauert und kaum anders als durch Zusatz von Kaliumpermanganat zu beenden ist. Der Zusatz stört die Stickstoffbestimmung im

allgemeinen auch nicht, unzulässig ist er aber bei irgend erheblich chlorhaltigen (und auch wohl brom- und jodhaltigen) Substanzen, sowie bei starkem Gehalt der zu analysierenden Substanz an Chlornatrium oder anderen Chloriden, weil in diesem Falle ein Ammoniakverlust durch freiwerdendes Chlor entstehen kann.

4. Beim Übertreiben des Ammoniaks wird, falls man mit Quecksilberzusatz gearbeitet hat, jetzt wohl allgemein an Stelle von Natriumsulfid oder -Hydrosulfid das von Neuberg empfohlene Natriumthiosulfat angewendet. Dabei ist die Art des Vorgehens — dasselbe gilt übrigens auch für das Schwefelnatrium — nicht ganz klargestellt. Vielfach wird zuerst die Natronlauge hinzugesetzt, dann ca. 2 g Natriumthiosulfat in Substanz hineingeworfen. Dadurch tritt eine Verzögerung ein, welche leicht zu Ammoniakverlust führen kann. Man hat früher die Gefahr des Verlustes von Ammoniak bei Zusatz von Natronlauge zu der Ammonsalzlösung überschätzt und den Zusatz von Natronlauge resp. Magnesiamilch erst nachträglich bei geschlossenem Kolben mit Hilfe einer entsprechenden Vorrichtung bewirkt. Es hat sich gezeigt, daß bei dem üblichen Vorgehen ein Verlust von Ammoniak nicht zu befürchten ist, hauptsächlich wohl darum nicht, weil sich die Flüssigkeiten im Destillierkolben schichten (vorausgesetzt, daß man nicht unnötig schüttelt), die Natronlauge sich der Hauptsache nach unten ablagert, die schwefelsaure Lösung oben, bei unnötiger Verzögerung könnte indessen doch wohl Ammoniak entweichen. Ich ziehe es deshalb vor, die Natronlauge und Thiosulfatlösung nicht in 2 Tempi hinzuzusetzen, sondern beide gleichzeitig. Zu dem Zweck halte ich eine ca. 20%ige Lösung von Natriumthiosulfat (bezogen auf das krystallisierte Salz) vorrätig und mische 40 ccm Natronlauge von 1,34 D (bei Verwendung von 10 ccm Schwefelsäure) mit 10 ccm dieser Lösung. Die gute Durchmischung der Lösungen erfolgt sehr leicht von selbst, wenn man die spezifisch leichtere Thiosulfatlösung zuerst in den Meßzylinder bringt, dann die Natronlauge hinzusetzt. Dasselbe gilt natürlich auch für die Anwendung von Schwefelnatriumlösung; daß man nachträglich, nachdem der Kolben am Destillierapparat

angesetzt ist, für gute Durchmischung sorgen muß, ist selbstverständlich, indessen habe ich auch daran schon Analysen scheitern sehen, daß die Durchmischung unterlassen wurde und nun beim Erhitzen explosionsartiges Stoßen eintrat.

##### 5. Über das Verhalten von Leim und Albumose zu Bromwasser.

Als charakteristische Reaktion des Leimes (Glutin) wird allgemein sein Verhalten zu Bromwasser angegeben; versetzt man eine Gelatinelösung mit Bromwasser, so erhält man einen zähen klebrigen Niederschlag. Indessen Albumoselösungen verhalten sich nicht viel anders. Hält man nicht besondere Bedingungen ein, so geben auch sie — wenn sie nicht zu dünn sind — mit Bromwasser Niederschläge. Man darf also keineswegs die Gegenwart von Leim annehmen, wenn man in eiweißfreien Auszügen von Organen mit Bromwasser Niederschläge bekommt. Dennoch sind wesentliche Unterschiede in dem Verhalten beider Körper zu Bromwasser zu konstatieren, wenn man Lösungen bestimmter Konzentration anwendet und bestimmte Mengen Bromwasser hinzusetzt, wie aus den folgenden Versuchen hervorgeht.

Zur Anwendung kam eine 1 %ige Lösung von bester Handlungsgelatine einerseits — konzentrierte Lösungen gelatinieren zu leicht — und 1 %ige Lösung von Albumosepepton aus Fibrin, d. h. das Gemisch der Pepsinverdauungsprodukte mit Ausschluß des Syntonins und des beim Sieden sich ausscheidenden Eiweißes, durch Alkohol gefällt. Das Bromwasser war gesättigt.

Setzt man zu 10 ccm der Lösung 1 ccm Bromwasser, so entsteht in der Albumoselösung im Moment des Eintropfens ein Niederschlag, beim Umschütteln wird die Flüssigkeit ganz klar und farblos, die Leimlösung gibt eine bleibende Trübung und färbt sich gelb. Erhitzt man die Reaktionsgemische, so gibt die Leimlösung Brom ab, die Albumoselösung nicht. Man erkennt dieses ohne weiteres bei der Betrachtung der Reagenzgläser von oben: die Luft über der Flüssigkeit erscheint gelb gefärbt und riecht nach Brom. Bei der Albumoselösung ist eine solche Färbung nicht wahrzunehmen. Benutzt man mit Jodkaliumkleister getränktes Filtrierpapier, so färbt sich dieses

beim Einführen in das Reagenzglas mit der Leimlösung sofort schwarzblau, bei der Albumoselösung tritt nur schwache Bläue ein, herrührend von dem Bromdampf, der noch vom Eingießen des Bromwasser her im Reagenzglas war. Trägt man durch Einblasen von Luft in das Reagenzglas für Entfernung dieses Bromdampfes Sorge, sodaß ein eingeführtes Jodkaliumkleister-Papier sich nicht mehr bläut, so geschieht das auch nicht bei oder nach dem Erhitzen, es wird also beim Erhitzen kein Brom abgegeben.

Ähnlich sind die Erscheinungen bei Steigerung des Bromwasserzusatzes auf 2 ccm. Hierbei gibt die Albumoselösung eine leichte Trübung, die Leimlösung einen Niederschlag. Erwärmt man beide Reagenzgläser durch Eintauchen in 60° warmes Wasser, so wird die Albumoselösung ganz klar, die Leimlösung bleibt trüb. Durch stärkeres Erhitzen, auch wohl bei längerem Verweilen bei 60°, wird auch sie klar und zwar unter reichlicher Abgabe von Brom, die bei diesem Verhältnis des Bromzusatzes auch bei der Albumoselösung erfolgt. Läßt man die bis zur Klärung erhitzten Lösungen stehen, so erscheint die Albumoselösung farblos, die Leimlösung gelb. Käufliche Albumose u. a. «Pepton Witte» verhält sich ebenso, andere Handelssorten ähnlich, nur werden die Lösungen nicht ganz klar beim Erhitzen.

Man kann wohl die Frage aufwerfen, ob dieser Unterschied in dem Verhalten beider Körper nicht darauf beruht, daß das Brom bei der Albumose an die aromatische Gruppe<sup>1)</sup> gebunden wird, während dieses beim Leim nicht möglich ist, da ihm diese ja bis auf sehr geringe Mengen von Phenylalanin fehlt.

Eine Überschlagsrechnung zeigt, daß dieses nicht so undenkbar ist. 1 Teil Brom löst sich bei Zimmertemperatur in etwa 33 Teilen Wasser, 1 ccm Bromwasser enthält also etwa 0,03 Brom. Bei Zusatz von 1 ccm Bromwasser zu 10 ccm 1%iger Albumoselösung beträgt das Brom 30% der Albumose. Nimmt man an, daß das Brom nur substituierend wirkt, so würde das eintretende Brom 15% des Eiweißmoleküls aus-

---

1) Im Sinne von Benzolderivaten.

machen, es ist indessen im höchsten Grade wahrscheinlich, daß ein Teil desselben nicht substituierend, sondern oxydierend wirkt, in der Tat also weniger als 15 % eintreten. Zieht man in Betracht, daß sich eventuell Di- und Tribromverbindungen bilden, so erscheint es recht wohl denkbar, daß das Brom bei der Albumose ausschließlich an den aromatischen Teil des Albumosemoleküls gebunden ist und deshalb nicht durch Erhitzen abgespalten wird, während man beim Leim notwendig Bindung an den aliphatischen Teil des Moleküls annehmen muß. Ich will durchaus nicht behaupten, daß diese Erklärung die einzig denkbare ist, mir scheint sie aber die nächstliegende zu sein.

Es ist vielleicht nicht überflüssig, zu bemerken, daß die Bindung des Broms durch die Albumose nicht etwa auf der häufig bei den Albumosen anzutreffenden alkalischen Reaktion beruht. Meine Lösungen reagierten nur äußerst schwach alkalisch und die Erscheinungen blieben auch ungeändert, wenn die Lösungen vorher schwach mit Essigsäure angesäuert wurden.

Setzt man mehr als 2 ccm Bromwasser zu 10 ccm der 1 % igen Albumoselösung, so erhält man auch bei ihr einen bleibenden Niederschlag.

Leimalbumose (Pepsinverdauung) verhält sich, wie zu erwarten war, ganz so wie Leimlösung selbst.

