

Einwirkung von Chlorwasserstoffgas auf Diastase.

I. Mitteilung.

Von

Theodor Panzer.

(Der Redaktion zugegangen am 11. Oktober 1912.)

Ohne auf andere Ansichten zu reflektieren, will ich annehmen, die Fermente seien chemisch wohl definierbare Stoffe und ihre Wirkung sei nur eine Funktion ihrer chemischen Konstitution. Das hieße mit anderen Worten: Wenn ein Stoff bestimmte Fermentwirkungen hervorbringen soll, dann muß er auch ein ganz bestimmtes chemisches Gefüge besitzen.

In der weiteren Verfolgung dieses Gedankens erscheint es durchaus nicht notwendig anzunehmen, daß das gesamte Gefüge eines Stoffes für die Fermentwirkung maßgebend wäre, es ist vielmehr auch ganz gut denkbar, daß die Fermentwirkung nur von bestimmten Atomgruppen ausgeht, während der ganze übrige Atomenkomplex des Fermentes für die Fermentwirkung irrelevant ist und eine beliebige Struktur besitzen kann.

Diese Gedanken sind nichts Neues, sie sind im wesentlichen eine Formulierung des Grundgedankens der Ehrlichschen Seitenkettentheorie auf die Fermente angewendet. Ich will jedoch, um mir möglichste Unabhängigkeit zu wahren, auf diese Theorie, insbesondere aber auf deren Nomenklatur weiter keine Rücksicht nehmen.

Um Aufschluß darüber zu erhalten, welche Atomgruppen für eine bestimmte Fermentwirkung notwendig sind, habe ich eine größere Anzahl von Versuchen angestellt, die ich fortzusetzen gedenke. Ich habe auf Fermente Reagenzien einwirken lassen, in der Absicht, dadurch gewisse kleinere Atomgruppen chemisch zu binden oder diese zu zerstören, und habe dann nachgesehen, ob durch diese Behandlung die Fermentwirkung geschädigt, bezw. aufgehoben wird, oder ob sie intakt bleibt.

Auch dieser Gedanke ist nicht neu, doch ist mir nicht bekannt, daß Versuche in gleicher oder ähnlicher Weise, wie ich sie angestellt habe, schon von anderer Seite durchgeführt worden wären.

Die praktische Ausführung dieses Gedankens stößt indes auf erhebliche Schwierigkeiten und gibt außerordentlich leicht zu Fehlschlüssen Anlaß.

Eine große Schwierigkeit besteht darin, daß die Reagenzien, welche wir zur Bindung oder Zerstörung einer Atomgruppe verwenden, in der Regel nicht eindeutig sind, indem sie auch auf andere Atomgruppen wirken können. Es können darum positive Schlüsse auf eine bestimmte Atomgruppe nur durch Vergleichung der Wirkung von verschiedenen Reagenzien gezogen werden.

Die Reagenzien, welche ich angewendet habe, sind keine Reagenzien, von denen man sich im allgemeinen «milde» Wirkungen verspricht. Da wir nun gewohnt sind, die Fermente sozusagen mit Handschuhen anzugreifen, so mögen eingreifende Reaktionen gerade bei den Fermenten auf den ersten Blick sinnlos erscheinen. Ich erinnere aber nur daran, daß auch die Eiweißstoffe seinerzeit als ein solches *Noli me tangere* betrachtet worden sind, und daß man über deren Konstitution erst dann Aufschluß bekam, als man sie mit konzentrierterer Salzsäure zerkochte. Dieses Bedenken gebot jedoch zwei Vorsichtsmaßregeln, welche ich bei meinen Versuchen beobachten zu müssen glaubte:

Wenn ein Reagens die Fermentwirkung schädigt, so kann die Schädigung entweder darauf beruhen, daß die für die Fermentwirkung notwendigen Atomgruppen gebunden, bezw. chemisch verändert worden sind, oder darauf, daß das gröbere Gefüge des Fermentes zerstört worden ist. Es müßte also in jedem einzelnen Falle erst nachgewiesen werden, daß die Schädigung nur auf der Bindung, bezw. Zerstörung einzelner Atomgruppen beruhte, nicht aber auf der Zerstörung des gröberen Gefüges der Substanz, die in den weitaus meisten Fällen wohl als Hydrolyse zu denken sein wird.

Ich mußte daher einerseits trachten, durch geeignete Be-

handlung die chemische Verbindung des Reagenses mit dem Fermente zu lösen, bezw. die angegriffene Atomgruppe wieder herzustellen und damit auch die Wirksamkeit des geschädigten Fermentes.

Andererseits mußten in meinen Versuchen hydrolytische Vorgänge vollständig ausgeschlossen werden. Dieser letzteren Forderung glaubte ich am wirksamsten dadurch entsprechen zu können, daß ich gasförmige Reagenzien in trockenem Zustande auf die sorgfältigst getrockneten Fermentpräparate einwirken ließ.

Trotzdem sollte aber noch der direkte Nachweis des Fehlens hydrolytischer Vorgänge versucht werden. Dieser Nachweis dürfte wohl bei unserer heutigen Kenntnis der Fermente kaum vollkommen einwandfrei erbracht werden können. Ich versuchte aber wenigstens den Wahrscheinlichkeitsbeweis, indem ich von folgender Überlegung ausging:

Wenn auch schon einzelne Fermentpräparate dargestellt worden sind, welche keinerlei Eiweißreaktionen mehr zeigten, so schwebt uns doch der Gedanke vor, es seien die Fermente doch Eiweißstoffe oder eiweißähnliche Stoffe. Es wäre ja auch ganz gut denkbar, daß die Fermente, und zwar auch diejenigen, welche keine Eiweißreaktionen zeigen, Produkte eines ganz spezifischen Abbaus von Eiweißstoffen sind, etwa in der Höhe der Albumosen, daß sie sich in gewissen Atomgruppierungen von den Verdauungsalbumosen unterscheiden, ohne die für Eiweißstoffe charakteristische säureamidartige Bindung —CO—NH— verloren zu haben. Sie wären also in dieser Beziehung eiweißähnliche Stoffe und brauchten trotzdem die meisten Eiweißreaktionen nicht zu zeigen.

In allen diesen Fällen ließe sich der Nachweis einer hydrolytischen Spaltung direkt erbringen durch die Formoltitrierung nach Sørensen und durch die Bestimmung des Amidstickstoffs mit salpetriger Säure nach van Slyke. Aber auch für den Fall, daß Fermente etwas ganz anderes wären, etwa kohlenhydratartige Stoffe, gestatten diese Methoden noch Schlüsse von größerer oder geringerer Wahrscheinlichkeit; denn wenn durch die Einwirkung eines Reagenses die in Fermentpräparaten ent-

haltenen Eiweißstoffe nicht gespalten worden sind, dann besteht auch einige Wahrscheinlichkeit, daß auch die darin enthaltenen anderen Stoffe nicht gespalten worden sind.

In diesem Sinne habe ich die unveränderten Fermentpräparate, sowie die durch Reagenzien veränderten Fermentpräparate stets der Kontrolle nach den Methoden von Sørensen und von van Slyke unterworfen und die erhaltenen Werte miteinander verglichen.

Gegen die kritiklose Verwendung der van Slykeschen Methode namentlich zur Kontrolle hydrolytischer Vorgänge sind kürzlich von Abderhalden Bedenken geäußert worden. Mir sind ähnliche Bedenken schon vor der genannten Publikation aufgestiegen. Auch mir hatte es sich gezeigt, daß die Menge des Stickstoffs, welcher bei der Einwirkung der salpetrigen Säure auf meine Präparate in Freiheit gesetzt wird, nicht ganz unabhängig ist von der Dauer der Einwirkung der salpetrigen Säure. Andererseits schien eine 5 Minuten dauernde Einwirkung bei meinen Präparaten nicht zu genügen. Bei länger dauernder Einwirkung mußte außerdem noch vermutet werden, daß auch andere Faktoren, wie Temperatur, Art des Schüttelns, vielleicht auch noch ganz unbekanntere Faktoren mit im Spiele seien. Ich verzichtete daher, um dieses wertvolle Hilfsmittel nicht ganz verlieren zu müssen, auf absolute Werte und wählte den Ausweg, daß ich die Gasentwicklung jedesmal so lange andauern ließ, bis das Gasgemenge in der Bürette (Stickstoff + Stickoxyd) 50 ccm betrug. Im übrigen wurden bei allen Versuchen tunlichst dieselben Bedingungen eingehalten. Da es mir nur darauf ankam, zu wissen, ob überhaupt ein nennenswerter Unterschied zwischen den vorbehandelten und den ursprünglichen Präparaten besteht, so glaube ich, daß die Methode in der von mir angewendeten Form für meine Zwecke brauchbar ist.

Wenn, wie ich es gemacht habe, feste Stoffe — und seien sie noch so fein gepulvert — der Einwirkung von Gasen ausgesetzt werden, so ist der Verdacht wohl gerechtfertigt, daß die Einwirkung des Gases nur auf der Oberfläche jedes Pulverteilchens stattfindet, während das Innere des Pulverteilchens unberührt bleibt. Dieser Einwand wurde in meinen Versuchen

durch die Tatsachen widerlegt. Es hat sich nämlich gezeigt, daß es anstandslos gelingt, die Wirkung eines Fermentes durch die Einwirkung eines bestimmten Gases vollständig zu vernichten und durch die Einwirkung eines anderen geeigneten Gases wieder vollkommen herzustellen.

Eine weitere Komplikation bei Versuchen über Einwirkung von Gasen auf feste Stoffe bilden Ab- und Adsorption. In der Tat war es auch bei meinen Untersuchungen nicht immer leicht zu beurteilen, wieviel von einem Gase chemisch gebunden war und wieviel durch physikalische Kräfte festgehalten wurde.

Im Anfange meiner Untersuchungen habe ich eine größere Menge eines Fermentpräparates mit einem Gase behandelt und dann von diesem veränderten Präparate einzelne Portionen für weitere Untersuchungen entnommen. Dieser Vorgang erwies sich nicht als praktisch, weil die durch Gase veränderten Fermentpräparate zumeist viel zu empfindlich gegen Luftfeuchtigkeit waren. Ich habe daher für jeden Versuch eine eigene Probe des Fermentpräparates mit dem Gase behandelt. Gewiß ergeben sich auch aus diesem Vorgange eigene Fehler, doch erschienen mir diese geringer als die durch den Einfluß der Luftfeuchtigkeit beim Abteilen einer größeren Menge eines vorbehandelten Fermentpräparates bedingten Fehler.

Die Fermentpräparate, welche ich zu meinen Versuchen verwendet habe, waren nicht gerade die reinsten Fermentpräparate, welche überhaupt dargestellt werden können. Abgesehen davon, daß die Herstellung solcher Präparate recht mühevoll und auch kostspielig ist, sind derartige Präparate häufig auch recht wenig haltbar. Andererseits brauchte ich für meine Versuche relativ große Mengen von Fermentpräparaten und es muß wohl bezweifelt werden, ob die Herstellung solcher Mengen tunlich ist. Ich habe daher entweder mit Handelspräparaten oder aber mit mehr oder weniger gereinigten Präparaten, zum Teil auch mit selbst hergestellten Präparaten, gearbeitet. Es hat sich übrigens ergeben, daß gewisse Gase auf unreinere Präparate etwas anders wirken als auf reinere.

Ich will diese allgemeinen Erörterungen nicht abschließen, ohne noch einen gewichtigen Einwand zu erörtern, der gegen

meine Versuche gemacht werden könnte. Meine Untersuchungen sind, streng genommen, Konstitutionsbestimmungen an Fermenten. Konstitutionsbestimmungen nimmt man nach den allgemeinen Arbeitsregeln der Chemie erst dann vor, wenn man einen Stoff in vollkommen reinem Zustande in Händen hat. Somit würden meine Untersuchungen einer Versündigung gegen diese goldene Regel gleichkommen; es müßte vielmehr mit derartigen Untersuchungen gewartet werden, bis man gelernt hat, Fermente als vollkommen reine, einheitliche Substanzen herzustellen.

Versuche, solche reinen, einheitlichen Fermentpräparate zu bekommen, sind schon oft gemacht worden und dürften bisher wohl noch niemals gelungen sein. Ein Grund für dieses Mißlingen liegt wohl darin, daß man über die chemische Natur der Fermente höchstens weiß, was sie nicht sind.

Übrigens ist auch hier ein schon eingangs geäußelter Gedanke nicht von der Hand zu weisen. Es wäre nämlich ganz gut denkbar, daß die natürlichen Fermente überhaupt keine einheitlichen Stoffe sind, sondern Gemenge von Stoffen. Dieses Gemenge könnte entweder aus Stoffen bestehen, von denen jeder die für die Fermentwirkung erforderlichen Atomgruppen enthält, während sie im übrigen Aufbau verschieden, vielleicht Homologe derselben Reihe oder ähnliches sind. Es könnten aber auch die für die Fermentwirkung erforderlichen Atomgruppen in diesem Gemenge auf verschiedene Stoffe verteilt sein, sodaß ein Ferment eine von der Natur gerade glücklich getroffene Mischung verschiedener Stoffe wäre. Diese letzte Möglichkeit ist nichts gar so ganz Absurdes. Kennen wir ja doch schon mehrere Fermentwirkungen, zu deren Zustandekommen die Anwesenheit von, soviel wir heute wissen, mindestens zwei Stoffen erforderlich ist. Man denke nur an die Kofermente, daran, daß zur Trypsinwirkung die Gegenwart der Enterokinase, zur Labwirkung die Anwesenheit von Calciumverbindungen gehört usw.

Gesetzt den Fall, die Fermente wären wirklich Gemenge dieser oder jener Art, dann gewänne die Frage ihrer Reindarstellung eine ganz andere Richtung und es erschiene vollkommen begreiflich, warum alle bisher dahin gerichteten Bestrebungen fehlschlagen mußten. Es scheint aber unter solchen

Umständen nicht aussichtslos, daß diesen Fragen näher getreten werden könnte, wenn es gelingt, einzelne für die Fementwirkung notwendige Atomgruppen nachzuweisen.

Untersuchungen von unreinen Fermentpräparaten haben gegenüber Untersuchungen an Gemengen anderer chemischer Stoffe einen großen Vorteil: man kann bei Fermentpräparaten leicht konstatieren, ob die Einwirkung eines Reagenses das Ferment betroffen hat oder nur eine Verunreinigung, weil man die Fermentwirkung prüfen kann. Bei anderen unreinen Substanzen fällt dieses Moment weg.

Aus all diesen Gründen darf bei den Fermenten wohl von der allgemeinen Regel Umgang genommen werden und es dürfen gewisse Konstitutionsfragen erörtert werden, ohne daß man reine, einheitliche Fermente zur Verfügung hat. Der von mir betretene Weg darf demnach als gangbar bezeichnet werden. Gewiß erscheint er schon auf den ersten Blick mühevoller als der über die beabsichtigte Reindarstellung der Fermente, und es erscheint mehr als fraglich, ob er zum letzten Ziele, nämlich zur Kenntnis der chemischen Natur und der Konstitution eines Fermentes führen kann. Aber auch der andere Weg hat bisher noch nicht zum Ziele geführt. Darum glaube ich: wenn es auf dem einen Wege nicht zu gehen scheint, soll man es auf dem anderen wenigstens versuchen.

Ein näher gestecktes Ziel dieses Weges mag übrigens erreichbar scheinen; man könnte vielleicht auf diesem Wege soviel über die chemische Natur der Fermente erfahren, daß deren Reindarstellung ermöglicht wird. Auch dieses Ziel allein scheint mir schon erstrebenswert genug, um wenigstens den Versuch zu seiner Erreichung zu machen, selbst wenn er viel Arbeit kostet.

Ich bin mir aber wohl bewußt, daß der von mir betretene Weg äußerste Vorsicht in jeder Beziehung erheischt, insbesondere äußerste Vorsicht in Schlußfolgerungen. Jede dieser Schlußfolgerungen kann sich nur auf die Vergleichung zweier Präparate stützen; sie kann sich leider nicht auf absolute Werte aufbauen. Darum habe ich mir weitgehende Reserve in meinen Schlußfolgerungen auferlegt und oft Schlüsse nicht gezogen, welche nach

den Untersuchungsergebnissen naheliegend erscheinen mögen. Daß hier selbst bei großer Vorsicht Fehlschlüsse unterlaufen können, erscheint nach dem Gesagten nur zu begreiflich. Übrigens halte ich die Zeit für weitgehende Schlußfolgerungen noch nicht für gekommen. Es handelt sich zunächst hauptsächlich nur um die Sammlung von Tatsachen.

In dem vorliegenden Aufsätze will ich über Versuche berichten, welche sich mit der Einwirkung von trockenem Chlorwasserstoff auf trockene Diastase befassen.

Verwendete Diastasepräparate.

Die Diastasepräparate, welche ich zu meinen Versuchen verwendet habe, waren zum einen Teile von Kahlbaum bezogen, zum anderen Teile habe ich Kahlbaumsche Präparate einer Reinigung unterworfen.

Die ursprünglichen Kahlbaumschen Präparate stammten von drei Sendungen, ich bezeichne sie mit «Diastase I, II und III». Diese Präparate enthielten größere Mengen von Milchzucker. Da dieser Milchzuckergehalt die Resultate meiner Versuche beeinträchtigen konnte, so habe ich einen Teil dieser Präparate vom Milchzucker ganz oder teilweise befreit.

10 g des Präparates Diastase I wurden mit 200 ccm Wasser angerührt und die trübe Flüssigkeit in 2 Liter 95%igen Alkohols gegossen. Nach dem Absitzen des Niederschlages wurde filtriert, der Niederschlag mit 95%igem Alkohol, darauf mit absolutem Alkohol und schließlich mit wasserfreiem Äther gewaschen und über Chlorcalcium getrocknet. Ich bezeichne dieses Präparat mit «Diastase gereinigt I»; es enthielt noch Spuren von Zucker und enthielt ferner auch die im Wasser unlöslichen Bestandteile des Kahlbaumschen Diastasepräparates.

Ein zuckerfreies Präparat wurde erhalten, indem 50 g Diastase II mit einem Liter Wasser angerührt wurden, die Lösung wurde filtriert und in 10 Liter 95%igen Alkohols gegossen. Nachdem der entstandene Niederschlag auf einem Filter gesammelt, mit 95%igem Alkohol gewaschen, durch Abpressen von Alkohol ziemlich befreit worden war, wurde er abermals in einem Liter Wasser gelöst, die Lösung von ein paar ungelösten Flocken abfiltriert und wieder in 10 Liter 95%igen

Alkohols gegossen. Der entstandene Niederschlag, mit 95⁰/₁₀₀igem, dann mit absolutem Alkohol, schließlich mit wasserfreiem Äther gewaschen und über Chlorcalcium getrocknet, bildete das Präparat «Diastase gereinigt III». Es löste sich in Wasser vollständig auf, die Lösung reduzierte beim Kochen Fehling'sche Flüssigkeit nicht einmal in Spuren.

In ganz analoger Weise wurde das Präparat «Diastase gereinigt IV» gewonnen, indem 100 g Diastase II in 1 Liter Wasser gelöst, die filtrierte Lösung in 10 Liter Alkohol gegossen und die Fällung wiederholt wurde. Auch dieses Präparat löste sich in Wasser vollständig auf und reduzierte Fehling'sche Flüssigkeit nicht im mindesten.

Alle Präparate reagierten auf Lackmusfarbstoff neutral. Wurden je 0,2 g der Präparate in Wasser gelöst, die Lösung mit neutraler Lackmustinktur versetzt, so genügte schon je ein Tropfen Zehntelnormallauge, um die violette Farbe der Lösung in Blau überzuführen. Gegen Phenolphthalein jedoch zeigten alle Präparate saure Reaktion.

Die quantitative Bestimmung des Stickstoffes nach Dumas in diesen Präparaten, ferner die quantitative Bestimmung der Asche, die Bestimmung der Acidität gegen Phenolphthalein durch Titrierung mit Lauge, die Formoltitrierung und die quantitative Bestimmung des Amidstickstoffes nach van Slyke ergab folgende Resultate, wobei die Präparate im Vakuum-exsikkator über Schwefelsäure bis zur Gewichtskonstanz getrocknet waren.

Diastase I.

Stickstoff: 0,2363 g lieferten 9,3 ccm N bei 19,0° C. und 751,3 mm, entsprechend 4,57⁰/₁₀₀ N;

0,2255 g lieferten 8,8 ccm N bei 19,0° C. und 753,1 mm, entsprechend 4,54⁰/₁₀₀ N;

im Mittel: 4,56⁰/₁₀₀ N.

Asche: 0,2143 g lieferten 0,0063 g Asche, entsprechend 2,94⁰/₁₀₀ Asche;

0,2308 g lieferten 0,0069 g Asche, entsprechend 2,99⁰/₁₀₀ Asche;

im Mittel: 2,97⁰/₁₀₀ Asche.

Amidstickstoff: 0,5579 g lieferten 4,4 ccm N bei 27,2° C. und 752,1 mm, entsprechend 0,43 % N;

0,4065 g lieferten 3,4 ccm N bei 20,2° C. und 738,1 mm, entsprechend 0,46 % N;

im Mittel: 0,45 % N.

Diastase II.

Stickstoff: 0,2924 g lieferten 11,6 ccm N bei 16,2° C. und 743,2 mm, entsprechend 4,60 % N;

0,2333 g lieferten 9,2 ccm N bei 20,8° C. und 744,8 mm, entsprechend 4,51 % N;

im Mittel: 4,56 % N.

Asche: 0,2572 g lieferten 0,0088 g Asche, entsprechend 3,42 % Asche;

0,2983 g lieferten 0,0108 g Asche, entsprechend 3,96 % Asche;

0,1923 g lieferten 0,0071 g Asche, entsprechend 3,69 % Asche;

im Mittel: 3,83 % Asche.

Amidstickstoff: 0,4563 g lieferten 2,9 ccm N bei 23,5° C. und 752,0 mm, entsprechend 0,35 % N;

0,4719 g lieferten 2,8 ccm N bei 20,9° C. und 739,7 mm, entsprechend 0,33 % N;

im Mittel: 0,34 % N.

Titrierung und Formoltitrierung: 0,9596 % verbrauchten zur Neutralisation 0,351 ccm Normallauge (entsprechend 36,6 ccm für 100 g Substanz), weiter nach Zusatz von Formol 0,115 ccm Normallauge, entsprechend 0,17 % N;

0,9782 g verbrauchten zur Neutralisation 0,339 ccm Normallauge (entsprechend 34,7 ccm für 100 g Substanz), weiter nach Zusatz von Formol 0,103 ccm Normallauge, entsprechend 0,15 % N;

im Mittel: zur Neutralisation 35,7 ccm Normallauge für 100 g Substanz und 0,16 % formoltitierbarer Stickstoff.

Diastase III.

Stickstoff: 0,2533 g lieferten 10,1 ccm N bei 17,8° C. und 744,1 mm, entsprechend 4,60 % N;

0,2225 g lieferten 8,4 ccm N bei 17,4° C. und 729,4 mm, entsprechend 4,28% N;

im Mittel: 4,44% N.

Asche: 0,3281 g lieferten 0,0100 g Asche, entsprechend 3,05% Asche;

0,2728 g lieferten 0,0082 g Asche, entsprechend 3,01% Asche;

im Mittel: 3,03% Asche.

Amidstickstoff: 0,5403 g lieferten 3,3 ccm N bei 19,1° C. und 744,1 mm, entsprechend 0,34% N;

0,5479 g lieferten 3,3 ccm N bei 19,2° C. und 743,8 mm, entsprechend 0,34% N;

im Mittel: 0,34% N.

Titrierung und Formoltitrierung: 0,5109 g verbrauchten zur Neutralisation 0,120 ccm Normallauge (entsprechend 23,5 ccm für 100 g Substanz), weiter nach Zusatz von Formol 0,074 ccm Normallauge, entsprechend 0,20% N;

0,5622 g verbrauchten zur Neutralisation 0,131 ccm Normallauge (entsprechend 23,7 ccm für 100 g Substanz), weiter nach Zusatz von Formol 0,079 ccm Normallauge, entsprechend 0,20% N;

im Mittel: zur Neutralisation 23,6 ccm Normallauge für 100 g Substanz und 0,20% formoltitrierbarer Stickstoff.

Diastase gereinigt I.

Stickstoff: 0,2555 g lieferten 14,7 ccm N bei 20,5° C. und 753,0 mm, entsprechend 6,66% N;

0,1767 g lieferten 10,2 ccm N bei 17,3° C. und 758,5 mm, entsprechend 6,80% N;

im Mittel: 6,73% N.

Asche: 0,2068 g lieferten 0,0084 g Asche, entsprechend 4,06% Asche;

0,2016 g lieferten 0,0082 g Asche, entsprechend 4,07% Asche;

im Mittel: 4,07% Asche.

Diastase gereinigt III.

Stickstoff: 0,1700 g lieferten 8,2 ccm N bei 20,5° C. und 747,5 mm, entsprechend 5,54% N;

0,1772 g lieferten 8,9 ccm N bei 24,0° C. und 745,3 mm, entsprechend 5,69% N;

im Mittel: 5,62% N.

Asche: 0,1654 g lieferten 0,0061 g Asche, entsprechend 3,69% Asche;

0,2342 g lieferten 0,0080 g Asche, entsprechend 3,41% Asche:

im Mittel: 3,55% Asche.

Amidstickstoff: 0,4486 g lieferten 3,4 ccm N bei 23,7° C. und 752,0 mm, entsprechend 0,42% N;

0,4972 g lieferten 3,3 ccm N bei 18,4° C. und 747,7 mm, entsprechend 0,38% N;

im Mittel: 0,40% N.

Diastase gereinigt IV.

Stickstoff: 0,1780 g lieferten 8,6 ccm N bei 20,8° C. und 741,0 mm, entsprechend 5,50% N;

0,2048 g lieferten 9,7 ccm N bei 20,3° C. und 742,4 mm, entsprechend 5,42% N;

im Mittel: 5,46% N.

Asche: 0,1632 g lieferten 0,0057 g Asche, entsprechend 3,50% Asche;

0,2327 g lieferten 0,0084 g Asche, entsprechend 3,61% Asche;

im Mittel: 3,56% Asche.

Amidstickstoff: 0,4647 g lieferten 3,2 ccm N bei 16,8° C. und 744,7 mm, entsprechend 0,39% N;

0,5386 g lieferten 4,6 ccm N bei 20,3° C. und 737,1 mm, entsprechend 0,47% N;

im Mittel: 0,43% N.

Titrierung und Formoltitrierung: 0,4575 g verbrauchten zur Neutralisation 0,158 ccm Normallauge (entsprechend 34,5 ccm für 100 g Substanz), weiter nach Zusatz von Formol 0,048 ccm Normallauge, entsprechend 0,15% N;

0,4727 g verbrauchten zur Neutralisation 0,143 ccm Normallauge (entsprechend 30,3 ccm für 100 g Substanz), weiter nach Zusatz von Formol 0,071 ccm Normallauge, entsprechend 0,21 % N;

im Mittel: zur Neutralisation 32,4 ccm Normallauge für 100 g Substanz und 0,18 % formoltitrierbarer Stickstoff.

Zu den Bestimmungen des Amidstickstoffs sei bemerkt, daß bei den angegebenen Stickstoffvolumina die Korrektur für den Gasgehalt des Lösungsmittels mit inbegriffen ist.

Zur Bestimmung der Acidität wurde die gewogene Substanz in 20 ccm Wasser gelöst, die Lösung nach Zusatz von Phenolphthalein mit einem etwas größeren Überschuß von $\frac{1}{5}$ -Normal-Barytwasser versetzt und dann eben bis zur Entfärbung mit $\frac{1}{5}$ -Normal-Salzsäure zurücktitriert. Dieses Verfahren hatte den Zweck, die in den Präparaten enthaltenen Phosphate für den scharfen Farbumschlag unschädlich zu machen. Nach beendeter Neutralisation wurden zur Lösung 10 ccm Formalinlösung zugesetzt und diese Flüssigkeit in üblicher Weise gegen eine Kontrollprobe bis zur schwachen Rosafärbung austitriert.

Die folgende Tabelle gibt eine Zusammenstellung der Mittelwerte in Prozenten:

	Stickstoff	Asche	Amidstickstoff	Formoltitrierbarer Stickstoff	Acidität in ccm Normallauge für 100 g Substanz
Diastase I	4,56	2,97	0,45	—	—
„ II	4,56	3,83	0,34	0,16	35,7
„ III	4,44	3,03	0,34	0,20	23,6
Diastase gereinigt I .	6,73	4,07	—	—	—
„ „ III .	5,62	3,55	0,40	—	—
„ „ IV .	5,46	3,56	0,43	0,18	32,4

Behandlung mit Chlorwasserstoffgas.

Ehe ich in die Beschreibung der Versuche eingehe, will ich deren Hauptergebnisse vorwegnehmend zusammenfassen.

Die Diastasepräparate nehmen relativ viel Chlorwasserstoff auf und binden diesen anscheinend zu einer lockeren chemischen Verbindung. Dadurch verlieren die Präparate ihre Wirksamkeit. Wird dieser Verbindung jedoch der Chlorwasserstoff wieder entzogen, so erlangen die Präparate ihre Wirksamkeit wieder.¹⁾

Zur Behandlung mit Chlorwasserstoffgas wurden die Präparate in Wägegläschen eingewogen und in diesen im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure bis zum konstanten Gewichte getrocknet. Das Wägegläschen samt dem trockenen Präparate wurde nun in einen kleinen weithalsigen Glaskolben hineingestellt und der Hals dieses Glaskolbens mit einem gut, mit Vaseline bestrichenen, eingeschliffenen Glasstöpsel verschlossen, durch welchen zwei Glasröhren eingeschmolzen waren. Das eine Rohr, welches zum Zuführen des Gases dienen sollte, reichte bis nahe an den Boden des Kolbens; es wurde so eingestellt, daß es in das eingesetzte Wägegläschen eintauchte und knapp über der Oberfläche des darin befindlichen Präparates mündete. Das zweite — abführende — Rohr begann an der Kuppe des Glasstöpsels.

Das zuführende Rohr stand zunächst mit einem Zweiweghahn in Verbindung, so daß nach Belieben in den Glaskolben trockener Chlorwasserstoff, oder trockene Luft eingeleitet werden konnte. Der Chlorwasserstoff wurde aus Kochsalz und konzentrierter Schwefelsäure entwickelt, mit konzentrierter Schwefelsäure gewaschen und zum Überflusse noch durch einen relativ großen, mit Chlorcalcium gefüllten Turm geleitet. Die aus einem Gasometer entnommene Luft wurde gleichfalls mit konzentrierter Schwefelsäure gewaschen und in einem ebensolchen Chlorcalciumturm getrocknet.

¹⁾ Die Gültigkeit des letzten Satzes wird in dem vorliegenden Aufsätze nur bis zu einem gewissen Grade nachgewiesen werden. Sie geht aber zweifellos aus einer in einem später folgenden Aufsätze. (Einwirkung von Chlorwasserstoff und Ammoniak) zu publizierenden Versuchsreihe hervor.

Das aus dem Glaskolben abführende Rohr leitete zuerst durch ein Quecksilberventil und dann in ein Gefäß, in welchem die abgeführten Gase über Wasser ausgebreitet wurden. Das letzte Gefäß, durch welches auch eine Belästigung durch Salzsäuredämpfe hintangehalten wurde, war hauptsächlich eingeschaltet worden, um am Ende des Versuches beurteilen zu können, ob wirklich ein großer Überschuß von Chlorwasserstoff über das Diastasepräparat geleitet worden war. Das Wasser in diesem Gefäße war tatsächlich am Ende jedes Versuches so weit mit Chlorwasserstoff gesättigt, daß es rauchte.

In jedem Versuche wurde der Kolben, welcher das gewogene Wägegläschen samt Substanz enthielt, zuerst durch Luftverdrängung mit Chlorwasserstoff gefüllt und dann noch weiter durch 18 Stunden Chlorwasserstoff in langsamem Strome hindurchgeleitet. Darauf wurde der Chlorwasserstoff durch Luft verdrängt und weiter noch 5 Liter Luft in mäßig raschem Strome durchgeleitet, um adsorbierten Chlorwasserstoff möglichst zu entfernen. Zuletzt wurde das Wägegläschen herausgenommen und wieder gewogen.

In einer besonderen Versuchsreihe wurde das mit Chlorwasserstoff behandelte Diastasepräparat beim Überleiten von trockener Luft auf 50° C. erwärmt. Zu diesem Zwecke wurde der Apparat ein wenig modifiziert: das Diastasepräparat befand sich in einem Porzellanschiffchen, welches in ein mit durchbohrten Gummistöpseln verschlossenes Glasrohr eingeführt wurde. Das Glasrohr war in einen mit Thermometer versehenen Kasten aus Kupferblech eingesetzt, welcher durch eine untergestellte Gasflamme auf 50° C. erwärmt werden konnte.

Es sei nochmals betont, daß bei allen Versuchen tunlichst auf den Ausschluß jedweder Feuchtigkeit gesehen wurde.

Die Präparate hatten bei der Behandlung mit Chlorwasserstoff ihr Aussehen nur wenig verändert. Sie waren um ein klein wenig dunkler geworden und rochen deutlich nach Chlorwasserstoff. Nur in jenen wenigen, als verunglückt ausgeschiedenen Versuchen, in welchen der Ausschluß der Feuchtigkeit nicht vollständig gelungen war, färbten sich die Prä-

parate dunkelbraun. Auch beim Aufbewahren an gewöhnlicher Luft, etwa in verschlossenen Präparatengläsern nahmen sie diese Farbe schon nach einem oder zwei Tagen an und zeigten dadurch, daß sie verdorben waren. Wenige Tage später zerflossen sie.

Die beiden folgenden Tabellen sollen nun zahlenmäßige Belege liefern für die Gewichtsmengen von Chlorwasserstoff, welche in einzelnen Versuchen durch die Diastasepräparate aufgenommen worden sind, und zwar zuerst in absolutem Gewichte und dann in Prozenten. Diese Prozentzahlen bedeuten, wieviel Teile Chlorwasserstoff 100 Teile Diastasepräparat aufgenommen haben.

Versuche mit Luftdurchleitung bei 50° C.

Bezeichnung des Diastasepräparates	Verwendete Menge des Diastasepräparates g	Aufgenommene Chlorwasserstoffmenge g	In Prozenten	
I	0,2166	0,0183	8,44	} 4,56% N = 11,87% HCl
	0,2289	0,0215	9,39	
	0,2334	0,0168	7,20	
	0,2616	0,0155	5,93	
	0,3293	0,0208	6,32	
Gereinigt I	0,2128	0,0157	7,38	} 6,73% N = 17,52% HCl
	0,2137	0,0178	8,33	

Aus diesen Versuchen ergibt sich, daß von den Diastasepräparaten relativ beträchtliche Mengen Chlorwasserstoff aufgenommen werden. Die Prozentzahlen hingegen zeigen keine gute Übereinstimmung, sie schwanken vielmehr bei ein und demselben Diastasepräparat innerhalb weiter Grenzen, sodaß an einfache stöchiometrische Verhältnisse kaum zu denken ist.

Nun spielt bei diesen Versuchen, wie schon früher erwähnt, als recht unliebsamer Faktor die physikalische Adsorption von Chlorwasserstoff durch das Diastasepulver mit. Betrachtet man indessen die großen Mengen von Chlorwasserstoff, welche aufgenommen worden sind, so wird man wohl

Versuche mit Luftdurchleitung bei Zimmertemperatur.

Bezeichnung des Diastase- präparates	Verwendete Menge des Diastase- präparates g	Auf- genommene Chlorwasser- stoffmenge g	In Prozenten	
II	0,4849	0,0291	6,00	4,56% N = 11,87% HCl
	0,6135	0,0428	6,98	
	0,9851	0,0748	7,59	
	0,9984	0,0660	6,71	
	1,0088	0,0778	7,71	
	1,0090	0,0727	7,20	
	1,0100	0,0699	6,92	
	1,0273	0,0709	6,90	
	1,0430	0,0718	6,89	
III	1,0700	0,0768	7,18	4,44% N = 11,55% HCl
	0,4982	0,0424	8,51	
	0,5421	0,0488	9,00	
Gereinigt III	0,5688	0,0501	8,81	5,62% N = 14,63% HCl
	0,3636	0,0364	10,01	
	0,4603	0,0463	10,06	
	0,4630	0,0471	10,17	
	0,4801	0,0498	10,37	
Gereinigt IV	0,4353	0,0461	10,59	5,46% N = 14,22% HCl
	0,4504	0,0484	10,75	
	0,4636	0,0543	11,71	
	0,4653	0,0547	11,54	
	0,4682	0,0548	11,71	
	0,4764	0,0480	10,08	
	0,4793	0,0560	11,68	
0,4963	0,0587	11,83		
	0,5096	0,0623	12,23	

sagen müssen, daß der größte Teil des aufgenommenen Chlorwasserstoffs chemisch gebunden sein mußte, und daß nur ein geringer Teil physikalisch adsorbiert sein konnte. Man hätte sogar vermuten können, daß durch das Überleiten der relativ großen Luftmenge derjenige Anteil des Chlorwasserstoffs, welcher physikalisch adsorbiert war, vollständig, oder bis auf geringe Spuren entfernt worden sei, oder daß dieser Anteil wenigstens beim Luftüberleiten unter Erwärmung beseitigt worden wäre. Die Versuche mit Erwärmung, welche in der eben erwähnten Absicht unternommen worden waren, lieferten aber Resultate, welche untereinander noch schlechter übereinstimmen. Ich stellte nun eine weitere Versuchsreihe an, bei welcher ich die mit Chlorwasserstoff behandelten Diastasepräparate andauernd evakuierte. Auch diese Versuchsreihe, die dann gleich beschrieben werden soll, lehrte über die adsorbierten Chlorwasserstoffmengen nichts.

Vielleicht kann aber ein approximatives Urteil darüber gewonnen werden, wenn ich auszugsweise über Versuche mit einem anderen Gase berichte, die in einer späteren Abhandlung ausführlich veröffentlicht werden sollen. Ich habe nämlich in ganz analoger Weise Diastasepräparate mit trockenem Ammoniak behandelt und dann ebenso, wie beschrieben worden ist, Luft übergeleitet. Die Diastasepräparate hatten unter diesen Bedingungen 1,70 bis 3,92% Ammoniak aufgenommen. Wurden nun diese mit Ammoniak behandelten Präparate andauernd evakuiert, so hatten sie schon am 4. Tage das ganze aufgenommene Ammoniak wieder abgegeben. Dabei möchte ich aber noch die Frage offen lassen, ob nicht wenigstens ein Teil dieses aufgenommenen und durch Luftüberleitung nicht entfernten Ammoniaks chemisch gebunden war.

Es muß daher auch beim Chlorwasserstoff vorzugsweise an eine chemische Bindung gedacht werden.

Die Evakuierungsversuche, nach Behandlung mit Chlorwasserstoff, wurden folgendermaßen angestellt. In der beschriebenen Weise wurden die Diastasepräparate getrocknet, gewogen, mit Chlorwasserstoff, dann bei Zimmertemperatur mit Luft behandelt und schließlich gewogen. Das Präparat kam

nun in einen mit konzentrierter Schwefelsäure beschickten Vakuumexsikkator, in welchen noch eine Petri-Schale mit Natronkalk eingestellt wurde, um den herausgepumpten Chlorwasserstoff chemisch zu binden. Dann wurde evakuiert. An jedem Tage (mit Ausnahme der Sonn- und Feiertage) zur selben Stunde wurde das Wäggläschen samt Präparat gewogen und wieder in den Exsikkator gebracht, der wiederum evakuiert wurde. Am 20. Tage wurde in der Regel der Versuch abgebrochen. Über den Verlauf dieser Versuche berichten die beiden folgenden Tabellen und zwar die erste in absoluten Gewichtszahlen, die zweite in Prozentzahlen, welche in derselben Weise berechnet sind, wie in den beiden früheren Tabellen, nämlich von 100 Teilen Diastasepräparat aufgenommene Chlorwasserstoffmenge.

Vor allem sei gleich hier bemerkt, wie später ausführlicher dargelegt werden wird, daß die mit Chlorwasserstoff behandelten Fermentpräparate durch das Evakuieren wieder wirksam wurden und unter geeigneten Bedingungen Stärke wieder in Zucker verwandelten.

Betrachtet man nun die Zahlenreihen der Auspumpungsversuche, so findet man ein überraschendes Ergebnis. Nach den vorher angestellten Betrachtungen hätte man erwarten sollen, daß der etwa adsorbierte Teil des Chlorwasserstoffs im Vakuumexsikkator über Natronkalk in einem oder wenigstens in einigen wenigen Tagen aus dem Präparate entfernt würde und daß der chemisch gebundene Anteil des Chlorwasserstoffs dann in dem Präparate bleibt, man hätte also am ersten oder in den paar ersten Tagen eine mehr oder minder große Gewichtsabnahme, von da ab aber Gewichtskonstanz erwarten sollen. Die rasche Gewichtsabnahme in den ersten Tagen ist allerdings vorhanden, sie ist sogar relativ groß, vielleicht sogar größer, als daß sie unter den eingehaltenen Versuchsbedingungen (Luftüberleitung vor dem Auspumpen) durch Adsorption allein erklärt werden könnte. Darauf folgt aber nicht die erwartete Gewichtskonstanz, sondern eine langsame, aber stetige Gewichtsabnahme. Die Zahlenwerte sind zwar nicht so beschaffen, daß sie sich leicht genau in eine einfache Kurve eintragen ließen. Es ist das wohl

In Gewichten:

Diastasepräparat	I.	II.	III.	IV.	V.	VI.
	Diastase II			Diastase gereinigt III	Diastase gereinigt IV	
Verwendete Menge des Diastasepräparates . .	g	g	g	g	g	g
Aufgenommene Chlor- wasserstoffmenge . . .	0,9984	1,0090	1,0700	0,4801	0,4764	0,4682
Das Präparat enthielt noch Chlorwasserstoff:						
am 1. Tage	0,0633	0,0667	0,0713	0,0421	—	—
„ 2. „	0,0621	0,0626	0,0656	0,0396	0,0332	0,0384
„ 3. „	0,0597	0,0597	—	0,0380	0,0301	0,0351
„ 4. „	0,0576	0,0566	0,0610	0,0369	0,0293	0,0324
„ 5. „	0,0557	—	0,0592	0,0360	0,0281	0,0313
„ 6. „	0,0545	0,0544	0,0572	0,0353	0,0273	0,0301
„ 7. „	0,0541	0,0536	0,0561	0,0348	0,0262	0,0292
„ 8. „	—	0,0524	0,0555	0,0339	—	—
„ 9. „	0,0528	0,0515	0,0541	0,0337	0,0259	0,0287
„ 10. „	0,0525	0,0510	—	0,0333	0,0253	0,0280
„ 11. „	0,0519	0,0505	0,0527	—	0,0252	0,0273
„ 12. „	0,0511	—	0,0522	0,0330	0,0250	0,0273
„ 13. „	0,0503	0,0486	0,0519	0,0328	0,0248	0,0268
„ 14. „	0,0493	0,0480	0,0512	0,0327	0,0247	0,0267
„ 15. „	—	0,0476	0,0506	0,0323	—	—
„ 16. „	0,0482	0,0470	0,0501	0,0319	0,0246	—
„ 17. „	0,0475	0,0454	—	0,0313	0,0242	0,0259
„ 18. „	0,0467	0,0444	0,0496	—	0,0241	0,0257
„ 19. „	0,0464	—	0,0492	—	0,0239	0,0253
„ 20. „	—	0,0421	0,0485	—	0,0237	0,0250
„ 21. „	0,0455	—	—	—	—	—
„ 22. „	—	—	—	—	—	—
„ 23. „	0,0450	—	—	—	—	—

In Prozenten:

Diastasepräparat	I.	II.	III.	IV.	V.	VI.
	Diastase II			Diastase gereinigt III	Diastase gereinigt VI	
Aufgenommener Chlorwasserstoff	6,71	7,20	7,18	10,37	10,08	11,71
Das Präparat enthielt noch Chlorwasserstoff:						
am 1. Tage	6,44	6,61	6,66	8,77	—	—
» 2. »	6,22	6,20	6,13	8,25	6,97	8,20
» 3. »	5,98	5,92	—	7,91	6,32	7,50
» 4. »	5,77	5,61	5,70	7,69	6,15	6,92
» 5. »	5,58	—	5,53	7,50	5,90	6,69
» 6. »	5,46	5,39	5,35	7,35	5,73	6,43
» 7. »	5,42	5,31	5,24	7,27	5,50	6,24
» 8. »	—	5,19	5,19	7,06	—	—
» 9. »	5,29	5,10	5,06	7,02	5,44	6,13
» 10. »	5,26	5,06	—	6,96	5,31	5,98
» 11. »	5,20	5,01	4,93	—	5,29	5,83
» 12. »	5,12	—	4,88	6,87	5,25	5,83
» 13. »	5,04	4,82	4,85	6,83	5,21	5,72
» 14. »	4,94	4,76	4,78	6,81	5,18	5,70
» 15. »	—	4,72	4,73	6,73	—	—
» 16. »	4,83	4,66	4,68	6,64	5,16	—
» 17. »	4,76	4,50	—	6,52	5,08	5,53
» 18. »	4,68	4,40	4,64	—	5,06	5,49
» 19. »	4,65	—	4,60	—	5,02	5,40
» 20. »	—	4,17	4,53	—	4,98	5,34
» 21. »	4,56	—	—	—	—	—
» 22. »	—	—	—	—	—	—
» 23. »	4,51	—	—	—	—	—

hauptsächlich darauf zurückzuführen, daß im Vakuumexsikkator nicht gut jeden Tag der gleiche Grad von Luftverdünnung hergestellt werden konnte. Im großen und ganzen betrachtet würde sich aber eine Kurve ergeben, welche in den ersten zwei oder drei Tagen steil abfällt und von da ab ungefähr die Gestalt einer

Geraden annimmt, welche sich langsam der Abszisse nähert. Dieser letztere Umstand hat mich auch bewogen, die Versuche nach etwa 20 tägiger Dauer zu unterbrechen, weil eine Gewichtskonstanz voraussichtlich erst nach mehreren Monaten zu erwarten gewesen wäre. Diese stetige Gewichtsabnahme nach den ersten Tagen geht so langsam vor sich, daß sie samt der großen Gewichtsabnahme der ersten Tage beim Abrechnen der Versuche erst die Hälfte der aufgenommenen Chlorwasserstoffmenge bedeutet.

Diese Art der Gewichtsabnahme kann wohl kaum anders erklärt werden, als daß man annimmt, die Diastasepräparate haben mit dem Chlorwasserstoff eine chemische Verbindung gebildet, welche sich allmählich zersetzt. Ich möchte aber auch die rasche Gewichtsabnahme der ersten Tage nicht so sehr auf physikalische Adsorption zurückführen; denn diese müßte ja wohl, wie schon früher dargelegt wurde, der Hauptsache nach durch das Überleiten der großen Luftmengen beseitigt worden sein. Ich möchte vielmehr auch diese rasche Gewichtsabnahme auf die Zersetzung einer chemischen Verbindung zwischen Diastasepräparat und Chlorwasserstoff zurückführen. Diese chemische Verbindung müßte aber anderer, jedenfalls leichter zu trennender Art sein, als die, welche der langsamen, stetigen Gewichtsabnahme zugrundeliegt. In diesem Falle müßte aber auch angenommen werden, daß diese Verbindung teilweise schon durch das Überleiten von Luft zerlegt worden war, und daß das Präparat nur solange chemisch mit Chlorwasserstoff gesättigt war, als es sich in der Chlorwasserstoffatmosphäre befunden hat. Kommt es nun an die Luft, so gibt es stetig Chlorwasserstoff ab, der auch durch den Geruch erkannt werden kann. Es haben übrigens Versuche, die ich nicht näher beschreiben will, gezeigt, daß die Präparate auch bei längerem Luftüberleiten fortgesetzt Chlorwasserstoff abgeben.

Damit finden wir nun aber auch eine Erklärung dafür, warum die Zahlen in den ersten Tabellen schlecht stimmen, d. h. warum von ein und demselben Diastasepräparate anscheinend unter Einhaltung derselben Bedingungen in verschiedenen Fällen verschiedene Chlorwasserstoffmengen aufgenommen werden. Die

Präparate waren eben, als sie zur Wägung kamen, nicht mehr mit Chlorwasserstoff gesättigt, sondern hatten schon einen größeren oder geringeren Anteil ihres Chlorwasserstoffs abgegeben.

Um Mißverständnissen vorzubeugen, will ich ausdrücklich betonen, daß ich durch das Gesagte durchaus nicht die Bedeutung der physikalischen Adsorption in Abrede stellen will. Im Gegenteil, ich bin davon überzeugt, daß die Präparate in jedem Stadium des Versuches physikalisch adsorbierten Chlorwasserstoff enthalten haben; denn wurde dieser durch Diffusion gegen Luft oder durch Auspumpen entfernt, so rückte an seine Stelle wieder neuer Chlorwasserstoff nach, welcher durch Abspaltung aus der chemischen Verbindung freigeworden war.

Wenn wir nun überlegen wollen, welcher Art wohl die chemischen Verbindungen sind, welche die Diastasepräparate mit Chlorwasserstoff eingehen, so haben wir zweifellos

1. damit zu rechnen, daß diese Präparate eiweißartige Stoffe enthalten, welche auch durch die gewöhnlichen Eiweißreaktionen nachgewiesen wurden. Ich sehe hier ganz davon ab, ob die wirksame Fermentsubstanz auch eine solche eiweißartige Substanz ist oder nicht.

Die charakteristische Atomgruppe der Eiweißstoffe ist die Gruppe -CO-NH- , hervorgegangen aus den Gruppen -COOH und -NH_2 , welche wie bei der Bildung von Säureamiden unter Wasseraustritt aneinander gebunden sind. Ich will daher im folgenden den in der Gruppe -CO-NH- enthaltenen Stickstoff säureamidartig gebundenen Stickstoff nennen.

Diese Gruppe kann durch Substitution von dem Ammoniak abgeleitet werden, es muß ihr also wie diesem auch ein gewisses Bindungsvermögen für Säuren, demnach auch für Chlorwasserstoff zugesprochen werden.

In der Literatur sind mehrfache Untersuchungen verschiedener Autoren niedergelegt, welche sich mit der Fähigkeit der Eiweißstoffe, Salzsäure zu binden, befassen. Ich kann diese Untersuchungen hier nicht mit hereinziehen, weil sie in wässriger Lösung, bzw. auch unter anderen Umständen durchgeführt sind, wobei die hydrolytische Dissoziation eine komplizierende Rolle spielt.

Spricht man nun dem säureamidartig gebundenen Stickstoff im Eiweiß ein gewisses Bindungsvermögen für Chlorwasserstoff zu, so muß man aus demselben Grunde wie diesem auch dem übrigen Stickstoff im Eiweiß dasselbe Vermögen zuerkennen. Mit anderen Worten: Eiweißstoffe müßten theoretisch die dem Stickstoffgehalte äquivalente Menge Chlorwasserstoff binden können.

Nehmen wir nun einen Augenblick an, der ganze Stickstoff der Diastasepräparate sei in eiweißartigen Stoffen enthalten, so müßten diese Präparate mindestens die dem Stickstoffgehalte äquivalente Chlorwasserstoffmenge aufnehmen. Diese Mengen habe ich berechnet und in den letzten Stab der beiden ersten Tabellen eingestellt. Die Chlorwasserstoffmengen, welche als von den Diastasepräparaten aufgenommen gewogen worden sind, liegen aber alle erheblich unter diesen berechneten Zahlen.

Dafür gibt es zwei Erklärungen. Entweder enthalten die Diastasepräparate erhebliche Mengen von Stickstoff in einer Bindungsform, welche nicht vom Ammoniak abgeleitet werden kann, bezw. nicht basischen Charakter besitzt, wie $-NO$, $-NO_2$ etc., oder die chemische Verbindung der eiweißartigen Stoffe mit Chlorwasserstoff ist, wie schon früher vermutet, bis zu einem gewissen Grade leicht zersetzlich. Die erste Möglichkeit, welche sich indes nicht nur auf Eiweißstickstoff bezieht, sondern auch die Beteiligung anderer stickstoffhaltiger Substanzen zuläßt, ist wohl als unwahrscheinlich zu bezeichnen. Es gewinnt damit die Erklärung, daß eine leicht zersetzliche Verbindung mit Chlorwasserstoff vorliegt und daß der Eiweißstickstoff diese Verbindung eingeht, an Wahrscheinlichkeit.

Weiters ist aus den Tabellen ersichtlich, daß die stickstoffreichen Diastasepräparate (gereinigt I, gereinigt III, gereinigt IV) auch erheblich mehr Chlorwasserstoff aufgenommen haben als die stickstoffärmeren. Die stickstoffreichen Präparate sind nun jene, welche durch Alkoholfällung gereinigt worden sind und dadurch auch zweifellos mit eiweißartigen Stoffen angereichert worden sind.

Endlich spricht auch die theoretische Überlegung für diese Ansicht. Die Hauptmenge des in Eiweißstoffen enthaltenen Stickstoffs ist jedenfalls säureamidartig gebundener Stickstoff

und in der Regel ist nur ein geringer Teil des Eiweißstickstoffs in anderer Form, z. B. in Form der Aminogruppe gebunden. Der säureamidartig gebundene Stickstoff der Eiweißstoffe kann in Parallele gestellt werden zu dem Stickstoff der gewöhnlichen Säureamide und diese zeigen in der Regel nur sehr schwach basischen Charakter.

Nach allem Angeführten glaube ich nicht fehlzugehen, wenn ich die bei den Auspumpversuchen in den zwei bis drei ersten Tagen zu beobachtende rasche Gewichtsabnahme der Präparate der Hauptsache nach darauf zurückführe, daß die Verbindung des säureamidartig gebundenen Stickstoffs der in den Präparaten enthaltenen eiweißähnlichen Stoffe mit Chlorwasserstoff gelöst wird.

Die Zersetzung dieser Verbindungsform dürfte wohl mit den ersten zwei bis drei Tagen bis auf Reste, welche nur mehr unwesentlich in die nächsten Tage hineinspielen, beendet sein. Die weitere Gewichtsabnahme, welche nunmehr gleichmäßig erfolgt, ist wohl auf die Zersetzung von andersartigen Verbindungen des Chlorwasserstoffs mit Bestandteilen der Diastasepräparate zurückzuführen. Ich schließe dies daraus, daß von diesem Zeitpunkte an die Zersetzungskurve eine andere Form annimmt, und zwar ungefähr die Form einer absteigenden Geraden; denn wären keine anderen Zersetzungsprozesse mit im Spiele, dann müßte sich die Zersetzungskurve allmählich einer horizontalen Geraden nähern.

2. Von jenen Verbindungsformen des Chlorwasserstoffs, welche hier noch in Betracht kommen können, sei zunächst die Verbindung mit jenem Stickstoff der eiweißartigen Stoffe, welcher nicht säureamidartig gebunden ist, erörtert. Ich lasse hier allen Eiweißstickstoff, welcher im Indol-, Pyrrolidin-, Imidazolringen oder als sekundär gebundener Stickstoff im Guanidinkomplexe enthalten ist, als numerisch zurückstehend beiseite und wende mich nur der intakten Aminogruppe zu.

Die im Eiweiß enthaltenen intakten Aminogruppen können zweifellos Chlorwasserstoff binden, ebenso wie die Aminogruppen der Aminosäuren selbst, und wenn man die Analogie noch weiter treiben darf, so muß man auch schließen, daß

diese Verbindung wie bei den Aminosäuren eine feste, nicht leicht zersetzliche ist. Sie kann daher zur Erklärung der Gewichtsabnahme der zweiten Periode der Auspumpversuche nicht herangezogen werden.

Dieselbe Überlegung würde auch für jene Aminogruppen gelten, welche nicht in eiweißartigen Bestandteilen der Diastasepräparate enthalten sind, sondern in anderen organischen Stoffen basischer Natur, falls solche in den Präparaten überhaupt enthalten sind.

Über die Menge des derart gebundenen Chlorwasserstoffs kann leicht Auskunft gegeben werden. Ich nehme zur Grundlage der Berechnung nicht die Resultate der Bestimmungen des Amidstickstoffs nach van Slyke, weil ich sie sonst als absolute Werte in Rechnung stellen müßte, während ich sie aus Gründen, die eingangs dargelegt wurden, nur als relative Werte zu Vergleichszwecken heranziehen will. Wohl aber darf ich die Resultate der Formoltitrierungen verwerten. Ich berechne aus diesen Werten jene Mengen von Chlorwasserstoff, welche durch intakte Aminogruppen gebunden worden sind, und stelle sie neben jene Chlorwasserstoffmengen, welche bei den Auspumpversuchen am 4. Tage, sowie beim Abbrechen der Versuche beobachtet worden sind.

Bezeichnung des Diastasepräparates	Formol- titrierbarer Stickstoff %	Chlorwasserstoff		
		an Amino- gruppen gebunden %	am 4. Tage	beim Abbrechen
			der Auspumpversuche	
			%	%
Diastase II	0,16	0,42	5,61—5,77	4,17—4,53
„ gereinigt IV	0,18	0,47	6,15—6,92	4,98—5,34

Aus dieser Zusammenstellung ist ersichtlich, daß jene Mengen von Chlorwasserstoff, welche durch intakte Aminogruppen gebunden worden sind, gegenüber den Gesamtmengen des noch vorhandenen Chlorwasserstoffs stark zurücktreten.

3. Auch unorganische Stoffe, welche in den Diastasepräparaten enthalten sind, können sich an der Bindung von Chlorwasserstoff beteiligen. Über die chemische Zusammensetzung dieser unorganischen Stoffe kann ich nichts aussagen. Da selbst eine quantitative Analyse der Asche für die anzu-

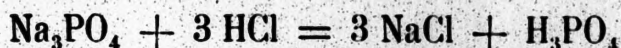
stellenden Betrachtungen kaum eingehendere Aufschlüsse über die Zusammensetzung der unorganischen Stoffe liefern kann, weil die Zusammensetzung der Asche nicht als Ausdruck und im vorliegenden Falle nicht einmal als ungefährer Ausdruck der chemischen Zusammensetzung der unorganischen Stoffe der Präparate betrachtet werden kann, so unterließ ich diese Analyse. Da unter diesen Umständen eine Untersuchung der unorganischen Stoffe recht schwierig würde, so müßte sie, wenn sie sich als notwendig herausstellen sollte, einer eigenen Arbeit vorbehalten bleiben.

Immerhin lassen sich gewisse Schätzungen, welche sogar nach oben hin begrenzt werden können, vornehmen, und das genügt für die weiteren Betrachtungen.

Unter den unorganischen Stoffen, deren Anwesenheit in den Diastasepräparaten angenommen werden kann, befinden sich jedenfalls solche, welche mit Chlorwasserstoff überhaupt nicht reagieren. Dahin gehören Chloride und Sulfate. Der Rest der unorganischen Stoffe sind wohl Salze von Säuren, welche schwächer sind als Chlorwasserstoff. Diese Säuren können natürlich auch organische Säuren sein. Auf diese Salze reagiert nun das Chlorwasserstoffgas zweifellos in der Weise, daß es die schwächere Säure in Freiheit setzt. Unter diesen schwächeren Säuren könnten wohl auch solche vorkommen, welche bei gewöhnlicher Temperatur flüchtig sind, doch kann deren Menge wohl vernachlässigt werden; denn so große Mengen flüchtiger organischer Säuren, wie Essigsäure, Ameisensäure u. dgl., daß nennenswerte Mengen davon bei Zimmertemperatur abdunsten würden, sind kaum zu vermuten, und Carbonate können deswegen nur eine untergeordnete Rolle spielen, weil die Diastasepräparate (gegen Phenolphthalein wenigstens) sauer reagieren.

Es ist daher nur damit zu rechnen, daß die freigewordene schwächere Säure in dem Gemenge verbleibt und nicht daraus entfernt wird. Ich greife als Beispiel für die folgende Schätzung von diesen Säuren die Phosphorsäure heraus, weil diese unter allen hier in Betracht kommenden Säuren das niederste Äquivalentgewicht (26) besitzt und damit einen Grenzfall darstellt.

Nehme ich nun weiter, wieder als äußerste Grenze, an, daß die ganze unorganische Substanz der Diastasepräparate aus einem normalen Phosphat, etwa normalem Natriumphosphate bestehe, so ergeben sich durch Berechnung aus dem Aschengehalte nach der Gleichung



jene Mengen von Chlorwasserstoff, welche im höchsten Falle durch die unorganischen Bestandteile der Diastasepräparate aufgenommen werden können. Ich stelle die so berechneten Werte in analoger Weise mit anderen zusammen, wie in der letzten Tabelle.

Diastasepräparat	Aschengehalt %	Chlorwasserstoff		
		von unorganischen Stoffen aufgenommen %	am 4. Tage beim Abbrechen der Auspumpversuche	
			%	%
II	3,69	2,46	5,61—5,77	4,17—4,53
Gereinigt III . .	3,55	2,37	7,69	6,52
IV . .	3,56	2,37	6,15—6,92	4,98—5,34

Die Möglichkeit, daß ein Teil des durch die unorganischen Stoffe derart aufgenommenen Chlorwasserstoffs beim Evakuieren wieder abgegeben wird etwa nach dem Typus



kann nicht rundweg geleugnet werden; denn es handelt sich hier nicht um wässrige Lösungen, sondern um feste Gemische. Und so könnte denn auch ein Teil der langsamen Gewichtsabnahme in den späteren Tagen bei den Auspumpversuchen auf derartige Reaktionen zurückgeführt werden.

Ziehe ich nun von den Chlorwasserstoffwerten der letzteren Tage in diesen Versuchen die Chlorwasserstoffmengen ab, welche durch Aminogruppen gebunden worden sind, ferner auch jene Mengen, welche höchstensfalls durch die unorganischen Bestandteile gebunden sein können, so bleibt immerhin ein ganz respektable Rest übrig, etwa um 1—2% Chlorwasserstoff. Berücksichtige ich nun weiter, daß in diesen Tagen der Versuche wohl kein Chlorwasserstoff mehr an säureamid-

artig gebundenen Eiweißstickstoff gebunden sein wird, so ergibt sich, daß Chlorwasserstoff noch von andern als den aufgezählten Atomgruppen gebunden sein muß und daß unter diesen Bindungsformen auch solche sind, welche durch das Auspumpen getrennt werden. Bedenke ich schließlich, daß durch das Auspumpen die Präparate wieder wirksam werden und daß, was später bewiesen werden wird, die Wiederkehr der Fermentwirkung nicht darauf beruht, daß der an den säureamidartig gebundenen Eiweißstickstoff gebundene Chlorwasserstoff entfernt wird, so ergibt sich, daß unter diesen anderen salzsäurebindenden Atomgruppen wenigstens eine sich befindet, welche für die Fermentwirkung notwendig ist.

Von jenen organischen Atomgruppen, welche etwa noch Chlorwasserstoff binden können, will ich nur noch zwei einer kurzen Erörterung unterziehen, nämlich

4. Die alkoholische Hydroxylgruppe



5. Doppelt gebundene Kohlenstoffatome



Alkoholische Hydroxylgruppen liegen jedenfalls in dem Milchzucker der Präparate I, II, und III. vor. Ob solche noch außerdem in meinen Präparaten enthalten sind, sowie ob doppelte Kohlenstoffbindungen darin vorkommen, darüber weiß ich noch nichts. Die erste Reaktion ist zwar nicht sehr wahrscheinlich, doch immerhin möglich.

Daß auch aus diesen Verbindungsformen Chlorwasserstoff wieder abgespalten werden könne, darf gleichfalls nicht ohne weiters geleugnet werden. Es würde dies nur die Umkehrung beider Reaktionen bedeuten und das Wasser, welches zur Wiederherstellung der alkoholischen Hydroxylgruppen notwendig ist, wäre einfach in der Feuchtigkeit der Luft zu suchen, welche bei den Wägungen mit den Präparaten in Berührung gekommen ist. Schließlich bleibt noch

6. eine Reihe von bisher noch nicht erörterten Atomgruppen, welche ebenfalls Chlorwasserstoff binden können.

Bestimmung der Acidität.

Nach der Behandlung mit Chlorwasserstoff hatten die Diastasepräparate alle stark saure Reaktion angenommen. Wären nun die chemischen Prozesse, welche bei der Behandlung mit Chlorwasserstoff vor sich gehen, nur Ionenreaktionen, d. h. würde der Chlorwasserstoff als Säure nur durch basische Gruppen gebunden, dann müßte die Acidität der mit Chlorwasserstoff behandelten Präparate oder, da die ursprünglichen Präparate schon von Hause aus schwach sauer reagierten, richtiger gesagt die Zunahme der Acidität genau äquivalent sein der aufgenommenen Chlorwasserstoffmenge. Dasselbe gilt für jenen Teil des Chlorwasserstoffs, welcher durch Adsorption festgehalten wird.

Wenn dagegen der Chlorwasserstoff auch noch andere Reaktionen eingegangen ist, sich z. B. an doppelt gebundene Kohlenstoffatome angelagert hat, oder dergleichen, dann muß die Aciditätszunahme kleiner sein.

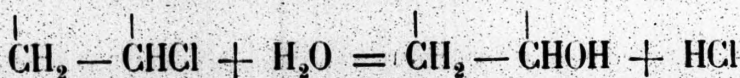
Von diesem Gesichtspunkte aus habe ich die Acidität von Präparaten, welche mit Chlorwasserstoff behandelt worden sind, durch Titration mit n-Lauge quantitativ bestimmt.

Die in der bereits beschriebenen Weise mit Chlorwasserstoff behandelten Präparate wurden mit 20 ccm Wasser übergossen und, nachdem entsprechende Lösung eingetreten war, wurde Phenolphthalein und darauf aus der Bürette $\frac{1}{5}$ -normal-Barytwasser im Überschusse zugesetzt. Schließlich wurde mit $\frac{1}{5}$ -normal-Salzsäure zurücktitriert. An diese Bestimmung habe ich in allen Fällen gleich die Formoltitrierung angeschlossen.

Über die Löslichkeit der mit Chlorwasserstoff behandelten Diastasepräparate in Wasser will ich im allgemeinen folgendes bemerken: Diejenigen Präparate, welche durch Fällung mit Alkohol gereinigt worden waren, lösten sich nach der Einwirkung des Chlorwasserstoffs ebenso leicht und vollständig in Wasser auf, wie vor dieser Einwirkung. Die Handelspräparate hingegen, welche sich schon in ursprünglichem Zustande etwas schwer und nie ganz vollständig aufgelöst hatten, lösten sich nach der Behandlung mit Chlorwasserstoff noch schwerer auf

und hinterließen einen zwar nicht sehr beträchtlichen, aber immerhin nennenswerten ungelösten Rückstand. Ich ließ daher, wofern dies nicht anders bemerkt ist, das Wasser immer längere Zeit, etwa eine Stunde lang auf die Präparate einwirken, ehe ich die Flüssigkeit weiter verarbeitete, und habe selbstverständlich immer die unfiltrierte Flüssigkeit verwendet. Um vergleichbare Bedingungen zu schaffen, habe ich auch die klaren Lösungen der mit Chlorwasserstoff behandelten gereinigten Präparate etwa eine Stunde lang ruhen lassen, ehe ich eine weitere Operation daran schloß.

Diese Vorsichtsmaßregel entsprang hauptsächlich der Überlegung, daß ja das Wasser nicht immer eine chemisch indifferente Substanz ist. Gerade hier, wo an die Bildung organischer chlorhaltiger Additionsprodukte, wie sie z. B. durch Anlagerung von Chlorwasserstoff an doppelt gebundene Kohlenstoffatome entstehen, gedacht wird, muß auch mit deren Zersetzung durch das Wasser, etwa nach dem Beispiele



gerechnet werden. Derartige Reaktionen wären gewiß auch geeignet, die Resultate der Aciditätsbestimmungen zu verschleiern. Sie können aber, weil bei ihnen Chlorwasserstoff entsteht, die Acidität nur vergrößern, nicht aber verkleinern.

Auch bei allen folgenden Betrachtungen über Versuche, bei welchen Wasser verwendet wurde, wird an derartige Zersetzungen zu denken sein. Alle Lösungen der mit Chlorwasserstoff behandelten Präparate zeigten eine braune Farbe.

Ich lasse nunmehr die Resultate der Aciditätsbestimmungen folgen und zwar der Kürze halber in tabellarischer Form und schließe aus demselben Grunde gleich die Ergebnisse der Formoltitrierung an. Die letzten 4 Versuche sind die im vorigen Abschnitte näher beschriebenen Auspumpversuche II, III, V und VI. Der bei diesen Versuchen angegebene Chlorwasserstoffgehalt ist natürlich der Gehalt beim Abrechnen des Auspumpens. Bei dem 3. Versuche dieser Tabelle wurde leider die Wägung des Präparates nach der Behandlung mit Chlor-

wasserstoff vergessen, dieser Versuch ist daher für die weitere Diskussion der Aciditätswerte nicht zu brauchen.

Bezeichnung des Diastase- präparates	Verwendete Menge des Diastase- präparates g	Chlor- wasserstoff- gehalt g	Normallauge verbraucht	
			zur Neutrali- sation ccm	zur Formol- titrierung ccm
II	1,0088	0,0778	2,192	0,095
II	1,0100	0,0699	1,946	0,219
Gereinigt IV . .	0,4757	?	1,449	0,110
> IV . .	0,4504	0,0484	1,350	0,129
Auspumpversuche :				
II	1,0090	0,0421	1,283	0,185
II	1,0700	0,0485	1,266	0,208
Gereinigt IV . .	0,4764	0,0237	0,692	0,104
> IV . .	0,4682	0,0250	0,650	0,126

In einer weiteren Tabelle stelle ich die Werte in prozentischer Berechnung zusammen und zwar berechne ich auch hier wieder alle Werte auf 100 Teile des ursprünglichen, mit Chlorwasserstoff nicht behandelten Diastasepräparates. Ich berechne die Acidität in Kubikzentimeter Normallauge und ziehe von diesem Werte denjenigen ab, welcher bei der Titration des ursprüng-

Diastase- präparat	Chlor- wasserstoff- gehalt %	Acidität		Aciditätszunahme	
		des be- handelten	des ursprüng- lichen	gefunden ccm	berechnet ccm
		Präparates			
		ccm	ccm		
II	7,71	217,3	35,7	181,6	211,4
II	6,92	192,7	35,7	157,0	189,8
Gereinigt IV	?	304,6	32,4	272,2	?
> IV	10,75	299,7	32,4	267,3	294,8
Auspumpversuche :					
II	4,17	127,2	35,7	91,5	114,3
II	4,53	118,3	35,7	82,6	124,2
Gereinigt IV	4,98	145,3	32,4	112,9	136,6
> IV	5,34	138,8	32,4	106,4	146,6

lichen Diastasepräparates beobachtet worden ist. Diese Differenz bedeutet demnach die durch Chlorwasserstoffbehandlung erzielte Aciditätszunahme. Ich berechne endlich aus dem Chlorwasserstoffgehalte diejenige Acidität, welche dem Chlorwasserstoffgehalte äquivalent wäre und stelle sie als «berechnete Aciditätszunahme» der wirklichen, «gefundenen Aciditätszunahme» gegenüber.

Der Vergleich zwischen den Zahlen für «gefundene» und «berechnete Aciditätszunahme» zeigt nun, daß die gefundene Aciditätszunahme in der Tat durchwegs kleiner ist, als die berechnete, und es wird zunächst zu untersuchen sein, ob die Differenzen zwischen beiden Zahlenreihen nicht nur auf Versuchsfehler zurückzuführen sind.

Nun ist es eine allbekannte, physikalisch-chemisch wohl erklärte Tatsache, daß man bei der Titration namentlich schwächerer organischer Säuren weniger Lauge verbraucht, als die theoretische Berechnung ergibt. Diese Fehlerquelle fällt aber hier weniger ins Gewicht, weil die fraglichen Differenzen durch Subtraktion der Resultate einer Versuchsreihe von denen einer ganz gleich durchgeführten Versuchsreihe gewonnen worden sind, bei welcher ungefähr dieselben Fehler gemacht worden sind. Es werden dadurch die derartigen Fehler der beiden Versuchsreihen ungefähr kompensiert und damit ausgeschaltet.

Die Frage, ob diese Differenzen nicht noch in die Grenzen der bei der praktischen Ausführung der Maßanalyse unvermeidlichen persönlichen Fehler fallen, möchte ich gleichfalls verneinen; denn auf die tatsächlich verwendeten Substanzmengen und auf $\frac{1}{5}$ -Normalflüssigkeit berechnet, würden diese Differenzen Fehler um etwa 0,5 bis 2 ccm Titerflüssigkeit bei einem Verbrauche von 4—10 ccm Titerflüssigkeit bedeuten, und so große Fehler macht man doch in der Regel nicht.

Es sprechen daher diese Differenzen dafür, daß nicht der ganze Chlorwasserstoff als Säure durch basische Atomgruppen der Diastasepräparate gebunden worden ist, sondern daß ein Teil davon auch durch andere Atomgruppen chemisch gebunden worden ist.

Formoltitrierungen.

Die im vorigen Abschnitte bereits angeführten Ergebnisse der Formoltitrierungen stelle ich nunmehr in prozentischer Berechnung als formoltitrierbaren Stickstoff, und zwar auch hier wieder auf 100 Teile unverändertes Diastasepräparat berechnet, in einer kleinen Tabelle zusammen und stelle diesen Zahlen die entsprechenden, bei der Formoltitrierung unveränderter Diastasepräparate gefundenen Werte gegenüber.

Diastasepräparat	Formoltitrierbarer Stickstoff	
	mit Chlorwasserstoff behandelte Präparate %	bei unveränderten Präparaten %
II	0,13	} 0,16
II	0,30	
Gereinigt IV	0,32	} 0,18
IV	0,40	
Auspumpversuche:		
II	0,26	} 0,16
II	0,27	
Gereinigt IV	0,31	} 0,18
IV	0,38	

Die Zahlen für die mit Chlorwasserstoff behandelten Präparate sind alle bis auf eine größer als die für die unveränderten Präparate. Die Differenzen zwischen beiden Zahlenreihen erscheinen sogar in Anbetracht der Kleinheit der Werte relativ hoch. Im praktischen Versuche aber bedeuten sie nur Differenzen von wenigen Zehntelkubikzentimetern Titerflüssigkeit (im Maximum 0,4 ccm). Sie liegen also noch innerhalb der Fehler, welche namentlich bei braungefärbten Flüssigkeiten, wie es die untersuchten waren, mit in Kauf genommen werden müssen. Diese Differenzen können daher nicht mit Sicherheit auf eine Hydrolyse der Eiweißstoffe bezogen werden. Jedenfalls aber geht aus diesen Zahlen das eine hervor, daß eine tiefgreifende hydrolytische Spaltung der eiweißartigen Stoffe der Diastasepräparate bei der

Einwirkung von Chlorwasserstoff nicht stattgefunden hat.

Es sei nur noch darauf verwiesen, daß die Zahlen für den formoltitrierbaren Stickstoff bei den Auspumpversuchen nicht wesentlich anders sind als bei den übrigen Versuchen, obwohl bei den ersteren die trockenen Präparate etwa 20 Tage mit Chlorwasserstoff beladen waren und bei den letzteren nur 20 Stunden. Wenn daher wirklich in geringem Grade hydrolytische Spaltungen stattgefunden haben, so haben sie jedenfalls nicht in dem trockenen Präparate stattgefunden, sondern erst von dem Zeitpunkte an, als das Präparat in Wasser gelöst wurde.

Bestimmung des Amidstickstoffs.

Ganz analoge Resultate ergaben auch die Versuche zur quantitativen Bestimmung des Amidstickstoffs nach van Slyke.

Bei diesen Versuchen wurden die Diastasepräparate in der bereits früher beschriebenen Weise mit Chlorwasserstoff behandelt, nach Überleitung von Luft gewogen, in wenigen Kubikzentimetern Wasser gelöst und die Lösung in den van Slykeschen Apparat eingetragen, genau so, wie dies bei den entsprechenden Bestimmungen an unveränderten Diastasepräparaten geschehen ist. In der folgenden Tabelle, welche die Resultate dieser Versuche wiedergibt, sind für die Gasvolumina gleichfalls die mit Rücksicht auf den Gasgehalt der Lösung korrigierten Zahlen eingesetzt.

Bezeichnung des Diastasepräparates	Verwendete Menge des Diastasepräparates g	Chlorwasserstoffgehalt g	Stickstoff in ccm	Temperatur in °C.	Barometerstand in mm Quecksilber
H	0,4849	0,0291	3,4	19,7	739,7
H	0,6135	0,0428	3,8	18,0	743,4
Gereinigt III	0,4630	0,0471	4,0	20,4	740,3
Gereinigt III	0,3636	0,0364	2,7	17,3	743,8

Ich stelle wieder in einer weiteren Tabelle diese Resultate in prozentischer Berechnung zusammen und zwar ebenso,

wie früher berechnet auf 100 Teile unveränderten Diastasepräparates, ich setze in den 3. Stab die Resultate der Einzelbestimmungen und in den 4. Stab die aus diesen gezogenen Mittelzahlen ein und füge in analoger Weise in den beiden letzten Stäben die Resultate der Amidstickstoffbestimmungen, welche bei den unveränderten Diastasepräparaten gefunden worden sind, bei.

Diastasepräparat	Chlorwasserstoffgehalt %	Amidstickstoff			
		bei mit Chlorwasserstoff behandelten Präparaten		bei unveränderten Präparaten	
		Einzelwerte %	Mittelwerte %	Einzelwerte %	Mittelwerte %
II	6,00	0,38) 0,37	0,33) 0,34
II	6,98	0,35		0,35	
Gereinigt III	10,17	0,48) 0,45	0,38) 0,40
Gereinigt III	10,01	0,42		0,42	

Die Differenzen zwischen den mit Chlorwasserstoff behandelten und den unveränderten Präparaten sind hier relativ kleiner, als bei der Formoltitrierung, sie kommen sogar hier nicht bei allen Einzelwerten zum Ausdrucke. Im praktischen Versuche bedeuten sie wieder nur Differenzen um einige Zehntelkubikzentimeter Gas. Für sie gilt daher genau dasselbe, wie bei der Formoltitrierung, nämlich daß diese Differenzen noch in die Grenzen der unvermeidlichen Versuchsfehler fallen und daß daher aus ihnen nicht mit Sicherheit auf eine hydrolytische Spaltung der eiweißartigen Stoffe geschlossen werden kann.

Anhangsweise sei hier noch über einen mißglückten Versuch berichtet, der indessen zeigt, welche außerordentlich wichtige Rolle der Ausschluß der Feuchtigkeit bei der Behandlung der Präparate mit Chlorwasserstoff spielt. Eines der Präparate (Diastase gereinigt III), welches bei dieser Behandlung braun geworden war, ohne zu zerfließen, und dadurch gezeigt hatte, daß der vollkommene Ausschluß der Feuchtigkeit nicht gelungen war, ohne daß gerade größere Feuchtigkeitsmengen

aufgenommen worden waren, habe ich der Kuriosität halber auf seinen Gehalt an Amidstickstoff untersucht.

0,4603 g Diastasepräparat nahmen 0,0463 g Chlorwasserstoff auf und lieferten 26,9 ccm Stickstoff bei 17,0° C. und 742,9 mm Barometerstand. In Prozenten: 10,06% Chlorwasserstoff und 3,31% Amidstickstoff, was bei einem Gesamtstickstoffgehalte von 5,62% gewiß einen sehr weitgehenden Grad der Hydrolyse bedeutet.

Prüfung der Fermentwirkung.

Bei der Prüfung der Fermentwirkung der mit gasförmigen Reagenzien behandelten Präparate kam es mir auf die Lösung zweier Fragen an: 1. besitzt das Präparat überhaupt Fermentwirkung? und 2. ist seine Wirksamkeit größer oder geringer als die eines anderen Präparates? Mit Rücksicht auf die zweite Frage habe ich bei jeder hierher gehörigen Untersuchung immer gleichzeitig das entsprechende ursprüngliche Präparat in ganz derselben Weise mitgeprüft und die Resultate miteinander verglichen. Dieses stetige Arbeiten in Vergleichen überhob mich bis zu einem gewissen Grade der Verpflichtung, bei der Auswahl der zu verwendenden Methoden besondere Vorsicht zu üben und auf noch nicht völlig entschiedene Streitfragen in der Lehre von den Fermenten Rücksicht zu nehmen. Schon bei der Auswahl der Methoden durfte ich daher auch deren Bequemlichkeit erheblich in die Wagschale fallen lassen.

Das Augenmerk bei der Prüfung der Wirkung der mit Chlorwasserstoff behandelten Diastasepräparate wurde einerseits auf das Verschwinden der Stärke und Dextrine, anderseits auf die Menge des gebildeten Zuckers gerichtet, wobei ich mir keine Rechenschaft darüber gab, ob dieser Zucker Maltose oder Traubenzucker sei. Das erstere prüfte ich qualitativ mit der Jodreaktion. Zur quantitativen Bestimmung der gebildeten Zuckermenge wählte ich als bequeme Methode die Methode der Zuckertitrirung nach Ivar Bang¹⁾ mit Rhodankupfer in Kaliumcarbonatlösung und Zurücktitrieren mit schwefelsaurem Hydroxylamin.

¹⁾ Biochemische Zeitschrift, Bd. 2, S. 271.

Selbstverständlich wurde auch am Beginne jedes Versuches die Reduktion bestimmt. Dies war insbesondere in jenen Versuchen von ganz besonderer Bedeutung, in welchen ungereinigte Diastasepräparate verwendet wurden, da diese, wie schon erwähnt wurde, Milchzucker enthielten. Aber auch die durch Alkoholfällung gereinigten Präparate zeigten eine allerdings nur geringe Reduktion der Bangschen Flüssigkeit. Dieselben Präparate, in viel größerer Menge verwendet, reduzierten Fehlingsche Lösung beim Kochen auch nicht spurenweise. Dagegen entfärbten diese Präparate allmählich Jodlösung und ich konnte unter anderem konstatieren, daß die Entfärbung der Jodlösung bei Präparaten, welche mit Chlorwasserstoff behandelt waren, in anderer Weise verlief als bei unveränderten Präparaten. obwohl in beiden Fällen dieselbe Acidität hergestellt worden war. Ich beabsichtige, dieses merkwürdige Verhalten in späterer Zeit näher zu studieren, und will vorläufig nur den Schluß ziehen, daß diese Präparate zuckerfrei waren.

Ich knüpfte aber an dieses merkwürdige Verhalten die Vorsichtsmaßregel, daß ich am Ende jedes Versuches das Versuchsgemisch noch qualitativ mit Fehlingscher Lösung prüfte, um zu beweisen, daß die mit der Bangschen Titration konstatierte Steigerung der Reduktionsfähigkeit wirklich auf die Bildung von Zucker zurückzuführen ist. Dies war allerdings deutlich nur bei der Verwendung zuckerfreier Diastasepräparate zu ersehen.

Als Angriffsobjekt für die Diastasepräparate wählte ich lösliche Stärke, weil deren Lösung eine homogenere Flüssigkeit bildet als Stärkekleister, so daß sicher dem Hauptversuch dieselbe Stärkemenge in derselben Verteilung zugeführt wurde, wie dem Kontrollversuch. In der Regel wurde sie in einer Konzentration von 0,2% verwendet. Ich möchte hier die Bemerkung nicht unterdrücken, daß verschiedene Handelspräparate von löslicher Stärke durch ein und dasselbe Diastasepräparat verschieden leicht angegriffen werden. Besonders leicht angreifbar erwies sich ein von Kahlbaum bezogenes Präparat, welches ich in den späteren Versuchen immer verwendete, während meine ersten Versuche mit einem weniger leicht an-

greifbaren Merckschen Präparate angestellt worden sind. Dieser Umstand spielt indessen bei meinen Versuchen keine wesentliche Rolle, weil ich immer in Vergleichen arbeitete.

Da, wie bekannt ist, die Acidität der Flüssigkeit die Wirkung der Diastase beeinflusst und die mit Chlorwasserstoff behandelten Diastasepräparate stark sauer reagierten, so mußte dieser Faktor ausgeschaltet werden. Ich habe dies auf verschiedene Weise versucht, insbesondere durch Reihen mit steigendem Säuregehalt, bin aber schließlich doch auf die einfache Neutralisation der Lösung des Diastasepräparates mit Lauge zurückgekehrt. Da die unveränderten Diastasepräparate gegen Phenolphthalein zwar saure Reaktion, gegen Lackmus aber neutrale Reaktion zeigten, so habe ich auch die mit Chlorwasserstoff behandelten Präparate durch möglichst genauen Zusatz von Lauge auf neutrale Reaktion gegen Lackmus gebracht. Es sind dies gewiß keine idealen Versuchsbedingungen, da wegen der Anwesenheit von Phosphaten die Neutralisation auf diesem Wege nicht ganz scharf durchgeführt werden kann, doch wollte ich auch nur aus groben Differenzen Schlüsse ziehen. Nach dem Resultate der Formoltitrierungen und der quantitativen Bestimmung des Amidstickstoffs konnten geringe Grade hydrolytischer Spaltungen nicht vollkommen ausgeschlossen werden. Mir lag aber daran, gerade bei den vorliegenden Versuchen auch solche geringe Grade tunlichst hintanzuhalten. Da, wie früher gezeigt wurde, die Hydrolyse erst in der wässerigen Lösung stattgefunden haben konnte und offenbar hauptsächlich durch die Anwesenheit relativ großer Mengen freier Säure bedingt war, so glaubte ich diesem Übelstand am besten zu begegnen, indem ich die Neutralisation sofort beim Zusammenbringen des Präparates mit Wasser vornahm.

Die Durchführung der Versuche gestaltete sich demnach folgendermaßen:

Gleich mit der Einwägung des zu prüfenden Diastasepräparates wurde unter denselben Bedingungen eine gleich große Menge desselben Präparates als Kontrollpräparat eingewogen und in einem Exsikkator bis zum Verzuckerungsversuche aufbewahrt. Das andere Präparat wurde indessen

in derselben Weise, wie schon beschrieben wurde, bis zum konstanten Gewichte getrocknet, mit Chlorwasserstoff, darauf mit trockener Luft behandelt und gewogen. Es wurde hierauf in einen Meßkolben zu 100 ccm gebracht, etwas Wasser und sofort eine Menge von Zehntelnormalnatronlauge zugesetzt, welche etwas geringer war, als dem durch Wägung ermittelten Chlorwasserstoffgehalte entsprach, dann wurde mit Wasser bis etwa 80 ccm verdünnt und durch vorsichtigen Zusatz von Zehntelnormallauge gegen Lackmuspapier genau neutralisiert. Das Kontrollpräparat wurde gleichfalls in 80 ccm Wasser gelöst. Dann wurden beide Flüssigkeiten unter wiederholtem Umschütteln 1 Stunde lang sich selbst überlassen und schließlich mit Wasser auf 100 ccm aufgefüllt. Beide Lösungen wurden nun mit je 100 ccm einer unter Aufkochen frisch bereiteten und wieder abgekühlten Lösung von löslicher Stärke gemischt. Aus jeder Mischung wurden sofort 10 ccm Flüssigkeit entnommen und mit Bangscher Lösung titriert; gleichzeitig wurde eine weitere Probe entnommen und mit Lugolscher Jodlösung geprüft. Die beiden Flüssigkeiten wurden inzwischen in ein großes, auf 50° C. geheiztes Wasserbad eingestellt. Nach jeder halben Stunde wurden wieder je 10 ccm zur Zuckertitrierung und eine weitere Probe zur Prüfung mit Jodlösung herausgenommen. Nach zweistündiger Dauer wurde der Versuch unterbrochen und die Flüssigkeiten noch qualitativ mit Fehling'scher Lösung geprüft.

Von mehreren gleichartigen Versuchen, welche ich angestellt habe und die alle dasselbe Resultat ergeben haben, führe ich nur zwei an. Die Resultate der Zuckertitrierung sind angegeben als mg Zucker in den verwendeten 10 ccm Flüssigkeit.

I.

0,2 g Diastase gereinigt III mit Chlorwasserstoff behandelt; Kontrolle: 0,2 g Diastase gereinigt III; Stärkelösung: 4 g lösliche Stärke auf 1000 ccm Wasser. (Das Gemenge aus 100 ccm Fermentlösung und 100 ccm Stärkelösung enthält demnach 0,2% löslicher Stärke.)

Dauer des Versuches	Kontrolle			Mit Chlorwasserstoff behandeltes Ferment		
	Jod- lösung	Reduktion in mg Zucker	mg Zucker gebildet	Jod- lösung	Reduktion in mg Zucker	mg Zucker gebildet
Beginn	blau	2,6	0	blau	2,1	0
1/2 Stunde	„	7,4	4,8	„	2,2	0,1
1 „	schwach blau	8,4	5,8	„	2,1	0
1 1/2 Stunden	desgl.	8,4	5,8	„	2,2	0,1
2 „	0	8,3	5,7	„	2,2	0,1
Reduziert Fehling		deutlich			nicht	

II.

1 g Diastase II mit Chlorwasserstoff behandelt: Kontrolle:
1 g Diastase II: Stärkelösung: 2 g lösliche Stärke: 500 ccm
Wasser.

Dauer des Versuches	Kontrolle			Mit Chlorwasserstoff behandeltes Ferment		
	Jod- lösung	Reduktion in mg Zucker	mg Zucker gebildet	Jod- lösung	Reduktion in mg Zucker	mg Zucker gebildet
Beginn	blau	14,2	0	blau	14,3	0
1/2 Stunde	0	20,3	6,1	„	13,2	0
1 „	0	21,2	7,0	„	13,5	0
1 1/2 Stunden	0	22,0	7,8	„	13,5	0
2 „	0	22,3	8,1	„	13,5	0
Reduziert Fehling		sehr stark			mäßig ¹⁾	

Aus diesen Versuchen, sowie aus den hier nicht angeführten Versuchen zeigt sich, daß die mit Chlorwasserstoff behandelten Präparate keinerlei Wirkung auf Stärke zeigten.

Ich schließe nun zwei Versuche an, zu welchen die Diastasepräparate von den Auspumpversuchen I und II verwendet worden sind.

¹⁾ Ungefähr entsprechend dem Milchzuckergehalte des Präparates.

Auspumpversuch I.

0,9984 g Diastase II hatten aufgenommen 0,0660 g = 6,71% Chlorwasserstoff und nach 23tägigem Auspumpen noch behalten 0,0450 g = 4,51% Chlorwasserstoff.

Kontrolle: 1 g Diastase II.

Stärkelösung 2 g lösliche Stärke : 500 ccm Wasser.

Dauer des Versuches	Kontrolle			Mit Chlorwasserstoff behandeltes Ferment		
	Jodlösung	Reduktion in mg Zucker	mg Zucker gebildet	Jodlösung	Reduktion in mg Zucker	mg Zucker gebildet
Beginn	blau	16,3	0	blau	17,3	0
1/2 Stunde	0	23,4	7,1	•	23,0	5,7
1 „	0	24,5	8,2	rot	24,0	6,7
1 1/2 Stunden	0	24,3	8,0	0	25,1	7,8
2 „	0	24,0	7,7	0	26,3	9,0
Reduziert Fehling		sehr stark			sehr stark	

Auspumpversuch IV.

0,4801 g Diastase gereinigt III hatten aufgenommen 0,0498 g = 10,37% Chlorwasserstoff und nach 17tägigem Auspumpen noch behalten 0,0313 g = 6,52% Chlorwasserstoff.

Kontrolle: 0,5 g Diastase gereinigt III.

Stärkelösung: 2 g lösliche Stärke : 500 ccm Wasser.

Dauer des Versuches	Kontrolle			Mit Chlorwasserstoff behandeltes Präparat		
	Jodlösung	Reduktion in mg Zucker	mg Zucker gebildet	Jodlösung	Reduktion in mg Zucker	mg Zucker gebildet
Beginn	blau	3,3	0	blau	6,1	0
1/2 Stunde	0	12,6	9,3	•	7,2	1,1
1 „	0	14,1	10,8	•	6,7	0,6
1 1/2 Stunden	0	11,7	8,4	•	7,4	1,3
2 „	0	13,6	10,3	•	7,1	1,0
Reduziert Fehling		stark			wenig	

In beiden Versuchen ist eine diastatische Wirkung der mit Chlorwasserstoff behandelten und darnach ausgepumpten Diastasepräparate zu ersehen. Sie erreicht aber nicht mehr denselben Grad, welchen die Diastasepräparate vor der Einwirkung von Chlorwasserstoff besessen hatten. Bei dem milchzuckerhaltigen Präparate des ersten Versuches ist der Unterschied nur gering, er zeigte sich nur in einem langsameren Verschwinden der Stärke und in der langsameren Bildung von Zucker.

Eine vielleicht nur scheinbare Abnahme des bereits gebildeten Zuckers, wie sie in diesem Versuche an dem Kontrollpräparate besonders deutlich zu sehen ist, bzw. Schwankungen der Zuckermenge, wenn einmal ein gewisses Maximum erreicht ist, habe ich bei meinen Versuchen mit Diastase oft, fast regelmäßig beobachtet. Ich habe mir aber über diese Erscheinung bisher noch nicht Rechenschaft abgelegt und will daher auch den Umstand, daß das mit Chlorwasserstoff behandelte Präparat am Ende des Versuches mehr Zucker aufweist, als das Kontrollpräparat, nicht weiter in Diskussion ziehen. In dem Auspumpversuche IV wiederum ist bei dem mit Chlorwasserstoff behandelten Präparate nur eine geringe Wirkung wiedergekehrt, eine Wirkung, welche sich nur in der Bildung einer geringen Zuckermenge äußert, ohne daß die ganze Stärke hätte zum Verschwinden gebracht werden können. Allerdings hat dieses Präparat auch mehr Chlorwasserstoff enthalten, als das zum ersten Versuche verwendete: 6,52% gegen 4,51%.

Um nun zu sehen, ob nicht vielleicht nur die Menge Chlorwasserstoff, welche das Präparat beim Lösen in Wasser enthält, maßgebend für dessen Wirksamkeit sei, und um noch einige andere Verhältnisse zu studieren, habe ich einige weitere Versuche angestellt, in welchen ich ganz bestimmte Mengen Chlorwasserstoff, diesmal aber in wässriger Lösung, auf die Diastasepräparate einwirken ließ. Ich wählte dazu ungefähr jene Salzäuremengen, welche dem Chlorwasserstoffgehalt der Präparate bei den Auspumpversuchen, und zwar einerseits am Ende des Auspumpens, andererseits vor dem Auspumpen entsprach.

Die eingewogene Menge des Diastasepräparates (ent-

sprechend den Mengen in den vorhergegangenen Versuchen) wurde in einem Meßkolben zu 100 ccm mit etwas Wasser gemengt, mit der berechneten Menge einer gestellten Salzsäure (1 ccm = 0,1896 ccm normal) versetzt, auf ca. 80 ccm aufgefüllt und blieb unter wiederholtem Umschütteln eine Stunde lang stehen. Dann wurde mit Zehntelnormalnatronlauge neutralisiert, auf 100 ccm aufgefüllt und die Wirksamkeit wie in den bisherigen Versuchen unter Beziehung einer Kontrollprobe geprüft.

Parallelversuch zum Auspumpversuch I.

1. Kontrolle: 1 g Diastase III.

2. 1 g Diastase III + 6,5 ccm Salzsäure = 0,04496 g Chlorwasserstoff, entsprechend einem Chlorwasserstoffgehalte des trockenen Präparates von 4,50% (entsprechend nach dem Auspumpen).

3. 1 g Diastase III + 9,8 ccm Salzsäure = 0,06775 g Chlorwasserstoff, entsprechend einem Chlorwasserstoffgehalte des trockenen Präparates von 6,8% (entsprechend vor dem Auspumpen).

Stärkelösung: 2 g löslicher Stärke : 500 ccm Wasser.

Dauer des Versuches	1. ohne Salzsäure			2. entspr. 4,50% HCl			3. entspr. 6,8% HCl		
	Jodlösung	Reduktion in mg Zucker	mg Zucker gebildet	Jodlösung	Reduktion in mg Zucker	mg Zucker gebildet	Jodlösung	Reduktion in mg Zucker	mg Zucker gebildet
Beginn	blau	19,1	0	blau	17,7	0	blau	18,1	0
1/2 Stunde	0	24,5	5,4	,	20,7	3,0	,	21,7	3,6
1 ,	0	25,9	6,4	rot	23,1	5,4	rot	22,8	4,7
1 1/2 Stunden	0	25,9	6,8	0	24,1	6,4	,	24,0	5,9
2 ,	0	26,0	6,9	,	24,1	6,4	0	24,7	6,6
Reduziert Fehling	sehr stark			sehr stark			sehr stark		

Parallelversuch zum Auspumpversuch IV.

1. Kontrolle: 0,5 g Diastase gereinigt IV.

2. 0,5 g Diastase gereinigt IV + 4,7 ccm Salzsäure = 0,03250 g Chlorwasserstoff, entsprechend einem Chlorwasser-

stoffgehalte des trockenen Präparates von 6,5% Chlorwasserstoff (entsprechend nach dem Auspumpen).

3. 0,5 g Diastase gereinigt IV + 7,5 ccm Salzsäure = 0,05190 g Chlorwasserstoff, entsprechend einem Chlorwasserstoffgehalte des trockenen Präparates von 10,4% Chlorwasserstoff.

Stärkelösung: 2 g löslicher Stärke : 500 cm Wasser.

Dauer des Versuches	1. ohne Salzsäure			2. entspr. 6,5% HCl			3. entspr. 10,4% HCl		
	Jod- lö- sung	Re- duk- tion in mg Zucker	mg Zucker ge- bildet	Jod- lö- sung	Re- duk- tion in mg Zucker	mg Zucker ge- bildet	Jod- lö- sung	Re- duk- tion in mg Zucker	mg Zucker ge- bildet
Beginn	blau	2,2	0	blau	4,3	0	blau	7,3	0
1/2 Stunde	0	11,3	9,1	rot	9,5	5,2	violett	7,9	0,6
1 "	0	12,0	9,8	0	10,4	6,1	0	11,2	3,9
1 1/2 Stunden	0	13,1	10,9	0	10,2	5,9	0	11,0	3,7
1 "	0	13,2	11,0	0	11,4	7,1	0	11,1	3,8
Reduziert Fehling	stark			mäßig			weniger		

In diesen Versuchen zeigt sich, daß auch die wässrige Salzsäure die diastatische Wirkung der Diastasepräparate schädigt, Der Grad der Schädigung ist bei ein und demselben Präparate abhängig von der Konzentration der Salzsäure. Die Schädigung zeigt sich sowohl in einer Verlangsamung des Verschwindens der Stärke als auch in einer Verlangsamung der Zuckerbildung, in den stärksten Graden auch in einer Verringerung der Zuckerbildung.

Vergleicht man die mit 2 bezeichneten Versuche dieser Tabellen (4,50% bzw. 6,5% HCl) mit den korrespondierenden Auspumpversuchen, so ergibt sich bei den Versuchen mit milchzuckerhaltigen Diastasepräparaten kein besonders großer Unterschied. Die gereinigten, milchzuckerfreien Präparate hingegen zeigen ein verschiedenes Verhalten, indem sie bei trockener Sättigung mit Chlorwasserstoff und nachherigem Auspumpen in ihrer Wirkung mehr geschädigt werden, als wenn der nach dem Auspumpen bleibende Chlorwasserstoff die Lösung in Form wässriger Salzsäure zuführt.

Vergleicht man endlich die Versuche, welche in wässriger

Lösung mit dem milchzuckerhaltigen Präparate ausgeführt worden sind, mit denen, welche in wässriger Lösung mit dem gereinigten, milchzuckerfreien Präparate angestellt worden sind, so findet man, daß das gereinigte, milchzuckerfreie Präparat durch die wässrige Salzsäure viel mehr geschädigt worden ist als das milchzuckerhaltige Präparat, obwohl im ersteren Falle geringere Konzentrationen von Salzsäure (4,7 ccm bzw. 7,5 ccm : 100) verwendet worden sind als im letzteren (6,5 ccm bzw. 9,8 cm : 100). Es steht diese Tatsache in vollkommener Analogie zu den Unterschieden der beiden Auspumpversuche.

Die angestellten Vergleichen lehren demnach, daß für die Schädigung der diastatischen Wirkung nicht nur die Menge des Chlorwasserstoffs maßgebend ist, welche beim Auflösen des Diastasepräparates zugegen ist. Es kommt vielmehr auch auf die Art des Präparates, d. h. ob gereinigt oder nicht, bzw. richtiger gesagt, auf die Gegenwart dritter, für die Fermentwirkung irrelevanter Stoffe (Milchzucker und etwaige andere Verunreinigungen) an. Hauptsächlich aber zeigt sich, daß es etwas anderes ist, wenn man das Diastasepräparat trocken mit einem Überschuß von Chlorwasserstoff behandelt und dann diesen Überschuß teilweise, sei es durch Luftüberleiten allein, sei es noch überdies durch Auspumpen, entfernt, als wenn man die dem noch übrigbleibenden Chlorwasserstoffgehalte entsprechende Salzsäuremenge der wässrigen Lösung hinzufügt.

Auch die bei den Vergleichen gefundenen Details der Unterschiede lassen sich leicht erklären, wenn man bedenkt, daß auch die Verunreinigungen der nicht gereinigten Präparate Chlorwasserstoff aufnehmen können, und wenn man insbesondere daran denkt, daß durch vorausgegangene Ausführungen die Existenz einer oder mehrerer Atomgruppen abgeleitet worden ist, welche für die diastatische Wirkung notwendig sind, welche Chlorwasserstoff chemisch binden, jedoch nicht basische Eigenschaften besitzen und welche endlich im Vakuum Chlorwasserstoff wieder abgeben.

Ich will indessen in die Erklärungen dieser Details hier nicht weiter eingehen, ich will vielmehr das Augenmerk jetzt einzig und allein auf die angedeuteten Atomgruppen lenken.

Welcher Art ich mir ungefähr diese Atomgruppen vorstelle, habe ich bereits gezeigt, indem ich als Beispiele die alkoholische Hydroxylgruppe und die Gruppe zweier doppelt gebundener Kohlenstoffatome anführte, ohne damit sagen zu wollen, daß die fragliche Atomgruppe eine der beiden genannten ist. Die Existenz einer solchen Atomgruppe ist bisher durch Deduktionen erschlossen worden, welche nicht in allen Punkten vollkommen beweiskräftig gestützt erscheinen.

Aus den nun vorliegenden Versuchen über die Wirkung der Präparate lassen sich aber ungezwungen Schlüsse ziehen, welche die Existenz dieser Atomgruppe bewiesen erscheinen lassen, und darum soll es Zweck der noch folgenden Zeilen sein, die noch nicht ganz beseitigten Einwände zu widerlegen.

1. Der bisher noch nicht geführte Beweis, daß die in Rede stehenden Atomgruppen keine basischen Eigenschaften besitzen und den Chlorwasserstoff nicht als Säure, sondern in anderer Weise chemisch bindet (vorläufig vorausgesetzt, daß nicht einer der unter 2 und 3 auszuschließenden Umstände obwaltet), liegt in der praktischen Ausführung der Versuche zur Prüfung der diastatischen Wirkung der mit Chlorwasserstoff behandelten Präparate.

Bei diesen Versuchen wurde die wässrige Lösung der Präparate mit Lauge neutralisiert, es ist damit jede Bindung basischer Atomgruppen an Chlorwasserstoff als Säure gelöst worden, und diese basischen Atomgruppen sind wieder, praktisch genommen, in ihrem früheren Zustande hergestellt worden. Ebenso ist etwa physikalisch adsorbierter Chlorwasserstoff durch die Neutralisation unschädlich gemacht worden. Wenn daher nach der Neutralisation sich noch eine Schädigung oder Aufhebung der diastatischen Wirkung kundgibt, so hat diese mit Ionenreaktionen nichts mehr zu tun, sondern ist auf anderweitige Festlegung oder Schädigung einer oder mehrerer Atomgruppen zurückzuführen.

Auch das durch die Neutralisation gebildete Chlornatrium kann für die beträchtlichen Schädigungen bzw. für die Aufhebung der diastatischen Wirkung nicht verantwortlich gemacht werden; denn seine Konzentration in dem Verdauungsgemische

beträgt schlimmstenfalls nur 0,06%. Überdies habe ich mich durch spezielle, wegen ihrer Unwichtigkeit hier nicht ausführlich publizierte Versuche von der Belanglosigkeit so geringer Salzmengen praktisch überzeugt.

Um Mißverständnissen vorzubeugen, betone ich ausdrücklich, daß durch den vorliegenden Aufsatz keineswegs die eventuelle Bedeutung basischer Atomgruppen, im speziellen etwa der Amino-Gruppe für die diastatische Wirkung widerlegt oder auch nur in Frage gezogen werden soll. Über die Bedeutung dieser Atomgruppen sagen die beschriebenen Versuche überhaupt nichts aus, und es werden Versuche in ganz anderer Richtung angestellt werden müssen.

Ferner betone ich zur Vermeidung von Mißverständnissen, daß ich mich um die Löslichkeit der mit Chlorwasserstoff behandelten Diastasepräparate bzw. um die Entstehung von unlöslichen Anteilen durch die Behandlung mit Chlorwasserstoff nur ganz oberflächlich gekümmert habe, indem ich mir sagte, daß ja auch ein Unlöslichwerden einzelner Bestandteile der Diastasepräparate auf chemischen Reaktionen beruht, und daß, wenn eine für die diastatische Wirkung notwendige Atomgruppe chemisch gebunden oder zerstört worden ist, es ganz gleichgültig ist, ob der Bestandteil, welcher diese Atomgruppe enthalten hat, in Wasser löslich oder unlöslich geworden ist.

2. Es könnte die Einwendung erhoben werden, daß die durch Einwirkung von Chlorwasserstoff hervorgerufene Schädigung der diastatischen Wirkung nicht auf der chemischen Bindung von Chlorwasserstoff an bestimmte Atomgruppen, sondern auf hydrolytischen Prozessen beruht, welche der Chlorwasserstoff verursacht hat. Diese hydrolytischen Prozesse können stattgefunden haben a) während der Einwirkung des Chlorwasserstoffs auf das trockene Präparat, b) in der wässerigen Lösung des mit Chlorwasserstoff behandelten Präparates.

Hydrolytische Prozesse sind nicht vollkommen auszuschließen, auch nach den Resultaten der Formoltitrierung und der Bestimmung des Amidstickstoffs nicht. Aber sie können, zum mindesten nicht allein, die Ursache der Schädigung der Fermentwirkung sein, und zwar

a) während der Einwirkung des Chlorwasserstoffs auf die trockenen Präparate nicht, weil sonst beim Auspumpen die Wirksamkeit nicht hätte wiederkehren können, obwohl gerade bei diesen Versuchen der Chlorwasserstoff 18—24 mal solange eingewirkt hat als bei den anderen Versuchen;

b) in wässriger Lösung nicht, weil sonst die Versuche mit wässriger Salzsäure hätten anders ausfallen müssen. Im allgemeinen hat die wässrige Salzsäure sogar eine geringere Schädigung hervorgerufen als der gasförmige Chlorwasserstoff. Insbesondere die beiden mit 3. bezeichneten Versuche, bei welchen der Chlorwasserstoffgehalt den Versuchen ohne Auspumpen entsprach, waren nicht imstande, die Wirksamkeit der Diastasepräparate zu vernichten, während durch Einwirkung von gasförmigem Chlorwasserstoff die Wirksamkeit aufgehoben war. Dazu hat bei den letzteren Versuchen der Chlorwasserstoff in wässriger Lösung nur einen Bruchteil einer Minute einwirken können, weil er dann neutralisiert worden ist; bei den Versuchen mit wässriger Salzsäure konnte diese aber eine Stunde lang einwirken. Da die Hydrolyse in der Regel mit der Zeit fortschreitet, hätten gerade die mit wässriger Salzsäure behandelten Diastasepräparate eine weitergehende Schädigung der Fermentwirkung zeigen müssen als die mit gasförmigem Chlorwasserstoff behandelten, wenn nur hydrolytische Prozesse der Grund für den Ausfall der diastatischen Wirkung gewesen wären.

3. In ganz ähnlicher Weise wie der Einwand der Hydrolyse widerlegt sich das Gegenteil, nämlich die Annahme von Anhydridbildungen als Grund für die Schädigung der Fermentwirkungen durch die Einwirkung von Chlorwasserstoff.

Die Möglichkeit der Entstehung von Anhydriden durch Einwirkung von gasförmigem Chlorwasserstoff kann an sich nicht von der Hand gewiesen werden. Verwendet man ja doch gasförmigen Chlorwasserstoff, um Anhydride zwischen Säuren und Alkoholen, die Ester, zu bilden.

Anhydridbildung kann aber nicht die Ursache der Schädigung der diastatischen Wirkung sein, weil die Anhydridbindung durch Auspumpen nicht gelöst werden kann.

4. Ein letzter noch möglicher Einwand wäre der, daß bei den Auspumpversuchen der Chlorwasserstoff nur auf der Oberfläche der Pulvertelchen des Diastasepräparates Veränderungen hervorgerufen hat, während im Innern der Pulvertelchen noch intaktes, wirksames Ferment enthalten war, das beim Lösen des Präparates wieder seine Wirkung entfalten kann. Dann müßten auch die nicht ausgepumpten Präparate in trockenem Zustande solche wirksame Teilchen enthalten, die erst beim Auflösen des Präparates infolge der größeren Chlorwasserstoffmenge unwirksam werden. In diesem Falle aber müßten auch die mit 3. bezeichneten Versuche mit wässriger Salzsäure unwirksame Lösungen geliefert haben und damit ist auch dieser Einwand widerlegt.

So glaube ich denn durch meine Versuche bewiesen zu haben, daß zur diastatischen Wirkung eine oder mehrere Atomgruppen notwendig sind, welche Chlorwasserstoff chemisch binden, aber nicht infolge einer basischen Eigenschaft und nicht in Form einer Ionenreaktion, sondern in irgend einer anderen Weise, und welche den gebundenen Chlorwasserstoff im Vakuum wieder abgeben.
