

Einwirkung von Ammoniakgas auf Diastase.

III. Mitteilung.

Von

Theodor Panzer.

(Der Redaktion zugegangen am 18. Februar 1913.)

Die vorliegende Untersuchung sollte nach der ursprünglichen Absicht eine Vorarbeit für Versuche bilden, welche über die aufeinanderfolgende Einwirkung von Chlorwasserstoff- und Ammoniakgas anzustellen waren.

Um vergleichbare Resultate zu erzielen, wurden dieselben Methoden in genau derselben Ausführung angewendet, welche bei den Untersuchungen über die Einwirkung von Chlorwasserstoff auf Diastase¹⁾ und Invertase²⁾ geübt worden sind.

Es wurden nur jene Abänderungen getroffen, welche durch die Verwendung von Ammoniak statt Chlorwasserstoff geboten waren.

Bei der prozentischen Berechnung der Resultate wurde auch hier allenthalben dasselbe Prinzip verfolgt wie dort, nämlich die Berechnung auf 100 Teile des ursprünglichen, nicht mit Ammoniak behandelten Fermentpräparates.

Die vorliegende Untersuchung wurde mit Diastasepräparaten ausgeführt, von welchen Proben schon bei der erstzitierten Untersuchung verwendet worden sind; es waren das jene Präparate, welche dort mit: Diastase II und III und Diastase gereinigt III und IV bezeichnet worden sind. Der besseren Übersicht halber führe ich die auf diese Präparate sich beziehenden

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 82, S. 276.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 82, S. 377.

analytischen Daten, welche dort erhoben worden sind, in Prozenten noch einmal an.

| | Stickstoff | Asche | Amidstickstoff | Formoltitrirbarer Stickstoff | Acidität in ccm Normal-lauge für 100g Substanz |
|------------------------|------------|-------|----------------|------------------------------|--|
| Diastase II | 4,56 | 3,69 | 0,34 | 0,16 | 35,7 |
| Diastase III | 4,44 | 3,03 | 0,34 | 0,20 | 23,6 |
| Diastase gereinigt III | 5,62 | 3,55 | 0,40 | — | — |
| Diastase gereinigt IV | 5,46 | 3,56 | 0,43 | 0,18 | 32,4 |

Behandlung mit Ammoniakgas.

Das für die Versuche verwendete Ammoniakgas wurde durch Erhitzen eines Gemenges von Salmiak und gebranntem Kalk in einem Rundkolben aus böhmischem Kaliglas dargestellt. Um das leichte Springen des Kolbens zu verhüten, wurde das Erhitzen in einem Heißlufttrichter vorgenommen, in welchen der Kolben eingesetzt war. Derart gelang es, aus einem einmal beschickten Kolben für 3—4 an verschiedenen Tagen ausgeführte Versuche genügend Ammoniak zu gewinnen. Das Ammoniak wurde zunächst durch einen verhältnismäßig großen Turm geleitet, welcher mit Stückchen von gebranntem Kalk gefüllt war, und gelangte dann in einen Apparat, der ganz gleich gebaut war wie bei den Versuchen mit Chlorwasserstoff. Die nachfolgende Luftdurchleitung wurde in den Ammoniakversuchen nur bei Zimmertemperatur vorgenommen. Durch die Ammoniakbehandlung wurden die Präparate nicht sichtlich verändert, nur wurden sie gegen Luftfeuchtigkeit etwas empfindlich. Die Resultate der Versuche sind in folgender Tabelle angeführt:

Die Ammoniakmengen, welche durch die Diastasepräparate aufgenommen wurden, sind relativ klein, sie sind viel kleiner als die Chlorwasserstoffmengen, welche von den Diastasepräparaten aufgenommen worden sind. Im großen und ganzen, nicht aber in jedem Falle, hat das stickstoffreichere Präparat «gereinigt IV» etwas größere Ammoniakmengen aufgenommen, als die stickstoffärmeren Präparate «II und III».

| Bezeichnung des Diastasepräparates | Verwendete Menge des Diastasepräparates g | Aufgenommene Ammoniakmenge g | In Prozenten |
|------------------------------------|--|---------------------------------|--------------|
| II. | 1,0130 | 0,0184 | 1,82 |
| | 1,0232 | 0,0174 | 1,70 |
| | 0,9923 | 0,0203 | 2,05 |
| | 0,9997 | 0,0180 | 1,80 |
| III. | 0,5062 | 0,0089 | 1,76 |
| | 0,5637 | 0,0089 | 1,58 |
| | 0,5581 | 0,0114 | 2,04 |
| | 0,5381 | 0,0094 | 1,75 |
| | 0,5296 | 0,0105 | 1,98 |
| | 0,4438 | 0,0137 | 3,09 |
| gereinigt IV | 0,4374 | 0,0095 | 2,17 |
| | 0,1993 | 0,0078 | 3,92 |
| | 0,4812 | 0,0118 | 2,45 |
| gereinigt IV | 0,4940 | 0,0085 | 1,72 |
| | 0,5107 | 0,0132 | 2,41 |
| | 0,5269 | 0,0160 | 3,04 |

Auch hier wurden Auspumpversuche im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure angestellt. Unter diesen Bedingungen gaben die mit Ammoniak beladenen Präparate rasch, binnen weniger Tage anscheinend ihr ganzes Ammoniak ab, sie kehrten nämlich auf ihr ursprüngliches Gewicht zurück und behielten dieses bei. Die beiden folgenden Tabellen sollen dieses Verhalten ziffernmäßig veranschaulichen:

In Gewichten (Grammen):

| | I. | II. | III. | IV. | V. | VI. | VII. |
|---|--------------|--------|--------|--------|-----------------------|--------|--------|
| Diastasepräparat | Diastase III | | | | Diastase gereinigt IV | | |
| Verwendete Menge des Diastasepräparates | 0,9997 | 0,5062 | 0,5637 | 0,5581 | 0,1993 | 0,4812 | 0,4940 |
| Aufgenommene Ammoniakmenge | 0,0180 | 0,0089 | 0,0089 | 0,0114 | 0,0078 | 0,0118 | 0,0085 |

In Gewichten (Fortsetzung).

| | I. | II. | III. | IV. | V. | VI. | VII. |
|--|---------------------|---------------|---------------|---------------|------------------------------|---------------|---------------|
| Das Präparat enthielt noch Ammoniak | Diastase III | | | | Diastase gereinigt IV | | |
| am 1. Tage | 0,0076 | 0,0018 | 0,0022 | 0,0029 | 0,0010 | 0,0051 | 0,0018 |
| » 2. » | 0,0046 | 0 | — | 0,0015 | 0 | — | 0,0008 |
| » 3. » | 0,0029 | 0 | — | — | 0 | 0,0002 | — |
| » 4. » | — | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| » 5. » | 0,0008 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| » 6. » | 0,0006 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| » 7. » | 0,0001 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Konstantes Gewicht des Präparates am Ende des Versuches | 0,9998 | 0,5062 | 0,5626 | 0,5570 | 0,1988 | 0,4811 | 0,4934 |

In Prozenten:

| | I. | II. | III. | IV. | V. | VI. | VII. |
|--|---------------------|-------------|-------------|-------------|------------------------------|-------------|-------------|
| Diastasepräparat | Diastase III | | | | Diastase gereinigt IV | | |
| Aufgenommenes Ammoniak | 1,80 | 1,76 | 1,58 | 2,04 | 3,92 | 2,45 | 1,72 |
| Das Präparat enthielt noch Ammoniak | | | | | | | |
| am 1. Tage | 0,76 | 0,36 | 0,39 | 0,52 | 0,50 | 1,06 | 0,36 |
| » 2. » | 0,46 | 0 | — | 0,27 | 0 | — | 0,16 |
| » 3. » | 0,29 | 0 | — | — | 0 | 0,04 | — |
| » 4. » | — | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| » 5. » | 0,08 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| » 6. » | 0,06 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| » 7. » | 0,01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Bestimmung der Acidität.

Wenn hier von einer Acidität gesprochen wird, so ist dies eigentlich nicht richtig, weil die mit Ammoniak behandelten Diastasepräparate stark alkalisch reagierten, ausgenommen die ausgepumpten Präparate, welche auch gegen Lackmus schwach sauer reagierten. Trotzdem soll auch bei den nicht ausge-

pumpten Präparaten der Ausdruck Acidität beibehalten werden und der ziffernmäßige Ausdruck dafür mit einem Minuszeichen versehen in die tabellarischen Darstellungen eingetragen werden, damit die Auspumpversuche mit den anderen Versuchen leicht vergleichbar in eine Reihe gestellt und daran sich knüpfende Berechnungen bequemer durchgeführt werden können.

In der praktischen Durchführung der Versuche habe ich mich tunlichst eng an die Versuche mit Chlorwasserstoff angelehnt, um die Resultate vergleichen zu können. Unter anderem wurde auch hier der wässerigen Lösung des Präparates, obwohl sie schon alkalisch reagierte, zuerst eine gemessene Menge (3 ccm) Zehntel-Normal-Barytwasser zugesetzt und erst dann mit Zehntel-Normal-Salzsäure neutralisiert. Wegen der Anwesenheit von Ammoniumverbindungen hielt ich Lackmus für einen passenderen Indikator als Phenolphthalein und habe daher das Tüpfelverfahren auf empfindlichem Lackmuspapier angewendet. Daran wurde auch hier gleich die Formoltitrierung mit Phenolphthalein angeschlossen. Die Resultate sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt. Die 5 letzten Versuche der Tabelle sind mit den ausgepumpten Präparaten der Auspumpversuche II, III, IV, VI und VII angestellt worden.

| Bezeichnung des Diastasepräparates | Verwendete Menge des Diastasepräparates g | Ammoniakgehalt g | Normalflüssigkeit verbraucht | |
|------------------------------------|--|---------------------|------------------------------|-----------------------------|
| | | | zur Neutralisation ccm | zur Formoltitrierung ccm |
| II | 1,0130 | 0,0184 | — 0,114 | 0,618 |
| II | 1,0232 | 0,0174 | — 0,333 | 0,847 |
| II | 0,9923 | 0,0203 | — 0,541 | 0,943 |
| gereinigt IV | 0,4438 | 0,0137 | — 0,287 | 0,643 |
| gereinigt IV | 0,4374 | 0,0095 | — 0,149 | 0,376 |
| Auspumpversuche: | | | | |
| III | 0,5062 | 0 | — 0,046 | 0,221 |
| III | 0,5637 | 0 | 0,014 | 0,159 |
| III | 0,5581 | 0 | 0,052 | 0,194 |
| gereinigt IV | 0,4812 | 0 | 0,033 | 0,224 |
| gereinigt IV | 0,4940 | 0 | 0,082 | 0,158 |

In der in den früheren Publikationen geübten Weise folgt nunmehr die prozentische Darstellung dieser Resultate. Ohne mich weiter darauf einzulassen, ob man berechtigt ist, die mit verschiedenen Indikatoren gewonnenen Zahlen miteinander zu vergleichen, ermittle ich die «gefundenen Aciditätsabnahme», indem ich von der Acidität des mit Ammoniak behandelten Präparates die des ursprünglichen Präparates unter Berücksichtigung des vor den Zahlen stehenden Minuszeichens abziehe, und stelle wieder dieser «gefundenen» die aus dem Ammoniakgehalte (d. i. Gewichtszunahme) berechnete als «berechnete» Aciditätsabnahme gegenüber.

| Diastase- präparat | Am- moniak- gehalt % | Acidität | | Aciditätsabnahme | |
|-----------------------|-------------------------------|---|--|------------------|------------------|
| | | des be- handelten Präparates ccm | des ursprüng- lichen Präparates ccm | gefunden ccm | berechnet ccm |
| II | 1,82 | — 11,3 | 35,7 | 47,0 | 106,9 |
| II | 1,70 | — 32,5 | 35,7 | 68,2 | 99,8 |
| II | 2,05 | — 54,5 | 35,7 | 90,2 | 120,3 |
| gereinigt IV | 3,09 | — 64,7 | 32,4 | 97,1 | 181,4 |
| gereinigt IV | 2,17 | — 34,1 | 32,4 | 66,5 | 127,4 |

Auspumpversuche:

| | | | | | |
|--------------|---|-------|------|------|---|
| III | 0 | — 9,1 | 23,6 | 32,7 | 0 |
| III | 0 | 2,5 | 23,6 | 21,1 | 0 |
| III | 0 | 6,9 | 23,6 | 14,3 | 0 |
| gereinigt IV | 0 | 16,6 | 32,4 | 25,5 | 0 |
| gereinigt IV | 0 | 9,3 | 32,4 | 15,8 | 0 |

Formoltitrierung.

Ich schließe gleich die Resultate der Formoltitrierung in prozentischer Darstellung an. Die mit Ammoniak behandelten Präparate enthielten naturgemäß mehr formoltitierbaren Stickstoff als die ursprünglichen Präparate. Ich ziehe den Gehalt der ursprünglichen Präparate an formoltitierbarem Stickstoff von dem der mit Ammoniak behandelten Präparate ab und erhalte so die Zunahme des formoltitierbaren Stickstoffs.

| Diastasepräparat | Formoltitrierbarer Stickstoff | | |
|------------------|--|------------------------------------|--------------|
| | bei mit Ammoniak behandelten Präparaten % | bei ursprünglichen Präparaten % | Zunahme % |
| II | 0,85 | 0,16 | 0,69 |
| II | 1,16 | 0,16 | 1,00 |
| II | 1,33 | 0,16 | 1,17 |
| gereinigt IV | 2,25 | 0,18 | 2,07 |
| gereinigt IV | 1,20 | 0,18 | 1,02 |
| Auspumpversuche: | | | |
| III | 0,61 | 0,20 | 0,41 |
| III | 0,40 | 0,20 | 0,20 |
| III | 0,49 | 0,20 | 0,29 |
| gereinigt IV | 0,65 | 0,18 | 0,47 |
| gereinigt IV | 0,45 | 0,18 | 0,27 |

Die Diskussion der bisherigen Resultate der Ammoniakbehandlung möchte ich wieder mit dem Aufwerfen der Frage einleiten, ob das aufgenommene Ammoniak chemisch gebunden oder durch physikalische Kräfte festgehalten worden ist. Überlegt man nun, auf welche Weise Ammoniak durch die Diastasepräparate chemisch gebunden werden kann, dann ergibt sich als diejenige Verbindungsform, welche am leichtesten überblickt werden kann,

1. die Verbindung von Ammoniak mit sauren Atomgruppen zu Ammoniumsalz. Wenn wir der Einfachheit halber alle sauren Atomgruppen als Carboxylgruppen betrachten, so ergibt sich leicht ein Maß für die Menge der Carboxylgruppen. Es ist dies nicht allein die Acidität der ursprünglichen Präparate, sondern es sind auch jene Carboxylgruppen mit in Rechnung zu ziehen, welche in den ursprünglichen Präparaten durch Aminogruppen bedeckt sind, und die erst mit Lauge titriert werden können, wenn diese Aminogruppen durch Verbindung mit Formaldehyd festgelegt worden sind. Mit anderen Worten ein Maß für die Menge der Carboxylgruppen läßt sich aus der Acidität der ursprünglichen Präparate zusammen mit ihrem formoltitrierbaren Stickstoffe

berechnen. Die Mengen Ammoniak, welche derart durch die verwendeten Diastasepräparate im äußersten Falle zu Ammoniumsalzen gebunden werden können, ergeben sich aus folgender Berechnung:

| Diastasepräparat: | II. % | III. % | gereinigt IV % |
|---|----------|-----------|-------------------|
| Ammoniak entsprechend der Acidität | 0,61 | 0,40 | 0,55 |
| dem formoltitrierbaren Stickstoffe | 0,19 | 0,24 | 0,22 |
| Ammoniak zu Ammoniumsalzen gebunden | 0,80 | 0,64 | 0,77 |

Die sauren Gruppen, welche der Acidität zugrunde liegen, bedingen, nach ihrem Verhalten gegen Indikatoren zu urteilen, nur schwach saure Eigenschaften, ebenso zeigen naturgemäß die dem formoltitrierbaren Stickstoffe entsprechenden Carboxylgruppen nur das Verhalten von recht schwachen Säuren. Beide werden daher mit der schwachen Base Ammoniak nur wenig beständige Verbindungen bilden, und es kann daher nicht wundernehmen, wenn diese Verbindungen durch das Auspumpen wieder gelöst werden und wenn beim Auspumpen auch das Ammoniak der Ammoniumverbindungen von den Präparaten wieder abgegeben wird.

Ich zweifle aber nicht, daß alle sauren Gruppen mit Ammoniak zu Ammoniumverbindungen in jenen Stadien der Versuche verbunden waren, in welchen ein großer Überschuß von Ammoniak vorhanden war, z. B. dann, wenn die Präparate sich in der Ammoniakatmosphäre befinden, und vermute auch, daß dies in den nicht ausgepumpten Präparaten nach der Luftüberleitung der Fall ist, weil diese Präparate auch dann noch einen nicht unbeträchtlichen Überschuß von Ammoniak enthalten. Nimmt man nun an, daß das Ammoniak keine andere chemische Verbindung mit dem Präparate eingegangen ist, so würde dieser Überschuß die Menge des physikalisch adsorbierten Ammoniaks bedeuten. Hat aber das Ammoniak solche andere Verbindungen gebildet, dann würde dieser Überschuß für die gegebenen Verhältnisse Maximalwerte für physikalisch adsorbiertes Ammoniak angeben. Um ein Bild von dem Grade

der möglicherweise vorhandenen Adsorption zu geben, will ich diese Überschüsse bei den nicht ausgepumpten Präparaten berechnen:

| Diastase- präparat | Ammoniak- gehalt % | Zu Ammoniumsals gebundenes Ammoniak % | Ammoniak- überschuß % |
|-----------------------|--------------------------|---|-----------------------------|
| II | 1,82 | 0,80 | 1,02 |
| II | 1,70 | 0,80 | 0,90 |
| II | 2,05 | 0,80 | 1,25 |
| gereinigt IV | 3,09 | 0,77 | 2,32 |
| gereinigt IV | 2,17 | 0,77 | 1,40 |

Fasse ich nun die Möglichkeit anderer Verbindungsformen ins Auge, welche das Ammoniak mit den Diastasepräparaten eingehen kann, so will ich insbesondere drei weitere solche näher in Betracht ziehen:

2. die Bildung von Säureamid aus dem Ammoniumsals,
3. die Bindung von Ammoniak an Aldehydgruppen,
4. den Ersatz einer alkoholischen Hydroxylgruppe durch die Aminogruppe.

An die erste Möglichkeit wird insbesondere dann zu denken sein, wenn die Ammoniumverbindungen durch längere Zeit trocken aufbewahrt werden, wie dies bei den Auspumpversuchen geschehen ist.

Die zweite Möglichkeit würde natürlich die Anwesenheit von Aldehydgruppen in den Diastasepräparaten voraussetzen, die meines Wissens bisher noch nicht bewiesen worden ist. An den Ersatz einer alkoholischen Hydroxylgruppe durch die Aminogruppe unter den gegebenen Versuchsbedingungen zu denken, mag absurd erscheinen; doch sei es verstattet, auch mit dieser höchst unwahrscheinlichen Möglichkeit zu rechnen.

Es muß natürlich auch die Möglichkeit noch weiterer Bindungsformen des Ammoniaks zugegeben werden, doch fehlt mir vorläufig für deren Diskussion jeglicher Anhaltspunkt.

Wenn nun die Ergebnisse der Untersuchung auf die genannten Möglichkeiten hin diskutiert werden sollen, so dürfen

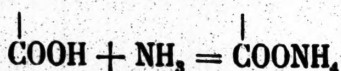
zwei weitere Möglichkeiten, welche keine Aufnahme von Ammoniak bedeuten, nicht außer acht gelassen werden u. zw.

5. die Hydrolyse und

6. die Anhydridbildung.

Ich will nur die genannten Möglichkeiten in Betracht ziehen und erörtern, wie diese Reaktionen im Gewichte der davon betroffenen Substanz, in der Acidität und im Gehalte an formoltitrierbarem Stickstoff zum Ausdruck kommen, und will dabei zunächst nur die Verhältnisse der Auspumpversuche ins Auge fassen.

1. Die Bindung von Ammoniak zu Ammoniumsalz,



welche allerdings bei den ausgepumpten Präparaten nach dem früher Erwähnten kaum in nennenswertem Grade zu erwarten ist, geht naturgemäß mit einer Gewichtszunahme der Substanz einher, deren Größe der Menge des gebundenen Ammoniaks entspricht. Da weiters die Carboxylgruppe neutralisiert wurde, so nimmt die Acidität ab und zwar wieder der Menge des aufgenommenen Ammoniaks entsprechend. Endlich ist es bekannt und ich habe mich auch noch durch spezielle Versuche davon überzeugt, daß der Stickstoff von Ammoniumsalzen bei der Formoltitrierung quantitativ als formoltitierbarer Stickstoff erscheint. Die Menge des formoltitierbaren Stickstoffs wird also zunehmen und zwar wieder entsprechend dem zu Ammoniumsalz gebundenen Ammoniak. Da alle drei Veränderungen, nämlich Gewichtszunahme, Aciditätsabnahme und Zunahme an formoltitierbarem Stickstoff, ihrer Größe nach dem zu Ammoniumsalz gebundenen Ammoniak entsprechen, darf ich sie wohl als äquivalent bezeichnen.

2. Bei der Bildung von Säureamid aus Ammoniumsalz, bzw. aus Säure und Ammoniak



wird Ammoniak aufgenommen und dafür die äquivalente Menge Wasser abgegeben. Da die Molekulargewichte von Ammoniak und Wasser nahezu gleich sind ($17,034 - 18,016 = -0,982$)

so wird an der Substanz nur eine geringe Gewichtsabnahme zu beobachten sein, die im praktischen Versuche unter Umständen gar nicht zum Ausdrucke kommt. Bei dieser Reaktion wird ferner die Carboxylgruppe zerstört und an ihre Stelle die Säureamidgruppe gesetzt, welche im alkalimetrischen Versuche nicht zur Reaktion kommt. Dementsprechend wird die Acidität abnehmen. Weil die Säureamidgruppe im alkalimetrischen Versuche nicht zum Ausdrucke kommt, so übt sie auch auf die Formoltitrierung keinen Einfluß aus.

Nun wäre es aber denkbar, daß, wenn die Bestimmung der Acidität und die Formoltitrierung vorgenommen wird, beim Zusammenbringen der Substanz mit Wasser Verseifung eintritt, indem das Säureamid unter Aufnahme von Wasser in Ammoniumsalz umgewandelt wird. Nimmt man nun den Grenzfall, nämlich die vollständige Verseifung an, dann würde diese an sich keine Veränderung der Acidität bedingen, das heißt gegenüber der ursprünglichen Substanz würde dieselbe Abnahme der Acidität zu konstatieren sein, wie wenn keine Verseifung stattgefunden hätte. Entsprechend der entstandenen Ammoniumgruppe aber wird die Menge des formoltitierbaren Stickstoffs zunehmen. Abnahme der Acidität und Zunahme an formoltitierbarem Stickstoff müssen einander äquivalent sein. Bei der Bildung von Säureamid sind daher die beiden äußersten Fälle folgende:

a) ohne Verseifung: Keine nennenswerte Gewichtsveränderung, Abnahme der Acidität, keine Veränderung des formoltitierbaren Stickstoffs;

b) vollständige Verseifung: Keine nennenswerte Gewichtsveränderung, Abnahme der Acidität und eine dieser äquivalente Zunahme des formoltitierbaren Stickstoffs.

Findet nun eine partielle Verseifung statt, dann werden die Resultate zwischen denen der beiden genannten Grenzfälle liegen, der formoltitierbare Stickstoff wird also eine Zunahme erfahren, deren Größe zwischen Null und der der Aciditätszunahme äquivalenten Größe liegt.

Um einen orientierenden Überblick darüber zu gewinnen, ob unter den Bedingungen, welche bei den Versuchen mit Diastase eingehalten wurden, im allgemeinen mit einer Ver-

seifung von Säureamiden zu rechnen ist, habe ich mit einigen Säureamiden die Probe gemacht.

Das im Vakuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknete Säureamid (ca. 0,5 g) wurde in 20 ccm Wasser gebracht und nach einer Stunde wie die Diastasepräparate titriert (Überschuß von Barytwasser, Zurücktitrieren mit Salzsäure) zunächst ohne Formalin, darauf nochmals nach Zusatz von Formalin. In dem Versuch mit Asparagin war ein Teil der eingewogenen Substanzmenge in den verwendeten 20 ccm Wasser nicht gelöst worden, weshalb die Titrationsresultate zu klein ausgefallen sind. Es wäre gewiß leicht gewesen, diesen Fehler zu vermeiden. Ich behielt ihn aber bei, um die Versuchsbedingungen, auf welche es hier hauptsächlich ankam, auch in Kleinigkeiten nicht zu ändern.

Die Resultate dieser Versuche waren folgende:

| | Verwendete Substanzmenge g | Normallauge verbraucht | |
|---------------------------|----------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| | | zur Neutrali- sation ccm | zur Formol- titrierung ccm |
| Acetamid | 0,2248 | — 0,006 | 0,029 |
| Oxamid | 0,1982 | 0,014 | 0,269 |
| Benzamid | 0,2159 | — 0,067 | 0,059 |
| Oxaminsäureäthylester . . | 0,3045 | 2,456 | 0,118 |
| Asparagin | 0,2788 | 0,012 | 1,556 |

In prozentischer Berechnung:

| | Acidität in ccm Normallauge für 100g Substanz ccm | Formoltitrierbarer Stickstoff | |
|-----------------------|--|-------------------------------|---|
| | | gefunden % | berechnet für voll- ständige Verseifung des Säureamids % |
| Acetamid | — 2,7 | 0,19 | 23,73 |
| Oxamid | 7,1 | 1,91 | 23,34 |
| Benzamid | — 31,0 | 0,37 | 11,57 |
| Oxaminsäureäthylester | 806,6 | 0,54 | 11,97 |
| Asparagin | 4,3 | 7,82 | 21,22 |

Die Zahlen für die Acidität sind an sich für die aufgeworfene Frage belanglos. Sie wurden hier nur angeführt, um zu zeigen, daß die Säureamidgruppe im alkalimetrischen Versuche nicht zum Ausdruck kommt; denn wäre dem so, dann müßten bei der angewendeten Art der Berechnung Zahlen um — 1000 erscheinen.

Eine so hohe Zahl, jedoch mit positivem Vorzeichen findet sich beim Oxaminsäureäthylester. Sie beweist, daß eine weitgehende Verseifung des Esters stattgefunden hat, die vollständige Verseifung des Esters würde 854,2 ccm Normallauge für 100 g Substanz verlangen.

Die 0,54% «formlitrirbarer Stickstoff», welche beim Oxaminsäureäthylester gefunden worden sind, können daher nicht, oder wenigstens nicht zur Gänze auf eine Verseifung des Säureamids bezogen werden; denn die Verseifung des Esters ist zweifellos während der Titrieroperationen weiter fortgeschritten und die 0,54% «formlitrirbarer Stickstoff», entsprechend 38,7 ccm Normallauge für 100 g Substanz, liegen noch unter jenem Werte, welcher bis zur vollständigen Verseifung des Esters ($854,2 - 806,6 = 47,6$ ccm) fehlt.

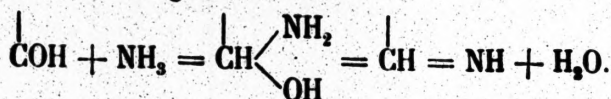
Auch die hohe Zahl für formlitrirbaren Stickstoff beim Asparagin findet eine andere Erklärung; denn das Asparagin enthält außer der Säureamidgruppe noch eine Aminogruppe und eine Carboxylgruppe, sie ist daher noch eine Aminosäure, und es muß bei der Formlitrirung diese Aminogruppe, bezw. Carboxylgruppe zum Ausdruck kommen. Dieser Carboxylgruppe würden 10,61% formlitrirbarer Stickstoff entsprechen. Daß die gefundene Zahl für formlitrirbaren Stickstoff (7,82%) noch niedriger liegt, rührt offenbar nur davon her, daß nicht das ganze Asparagin gelöst war, und gestattet keinen Schluß auf eine Verseifung der Säureamidgruppe.

Sieht man von diesen beiden Zahlen ab, dann bleibt nur noch eine nennenswerte Zahl für formlitrirbaren Stickstoff, nämlich die Zahl beim Oxamid, welche übrigens auch nur eine Verseifung von 8% des verwendeten Amides anzeigt.

Es soll keineswegs geleugnet werden, daß es Säureamide gibt, welche unter den eingehaltenen Versuchsbedingungen

vollständig oder wenigstens zum allergrößten Teile verseift werden (z. B. Carbaminsäure), im allgemeinen wird man aber nach dem Ergebnisse der beschriebenen Versuche eine solche totale Verseifung nicht als wahrscheinlichsten Fall hinstellen können.

3. Bei der Bindung von Ammoniak an eine Aldehydgruppe ergibt sich folgendes Bild:



Das Gewicht nimmt also zu um die Menge des aufgenommenen Ammoniaks, es wird aber vermindert um die Menge des abgegebenen Wassers; demnach wieder keine nennenswerte Gewichtsveränderung. Aber auch die Acidität und der formol-titrierbare Stickstoff wird nicht verändert; denn daß die Gruppe

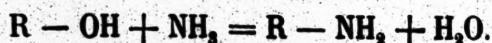


weder im acidimetrischen Versuch, noch bei der Formoltitrierung Säure bindet, geht wohl am einfachsten aus der Tatsache hervor, daß der Stickstoff der Ammoniumsalze «formol-titrierbar» ist. Die Bindung von Formaldehyd an Ammoniumsalze verläuft nach der Gleichung:



und die freigewordene Säure (HCl) ist dasjenige, was bei der Formoltitrierung titriert wird. Sie könnte aber nicht titriert werden, wenn sie nicht frei geworden wäre, und sie könnte nicht frei werden, wenn die genannten Gruppen Säure binden würden.

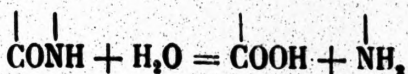
4. Der angenommene Ersatz einer alkoholischen Hydroxylgruppe durch eine Aminogruppe wäre im Sinne der folgenden Gleichung vorzustellen:



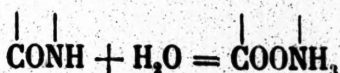
Sie würde zur Bildung eines Amins führen, welches als basische Substanz Säure binden kann. Die Bildung dieses Amins wird demnach eine Verminderung der Acidität und eine äquivalente Zunahme des formol-titrierbaren Stickstoffs verursachen. Eine nennenswerte Gewichtsveränderung wird auch

hier, weil die dem aufgenommenen Ammoniak äquivalente Wassermenge abgegeben wird, nicht zu beobachten sein.

5. Bei der Hydrolyse

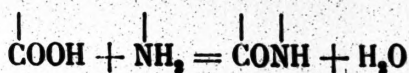


oder richtiger:

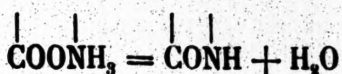


ergibt sich eine Gewichtszunahme um das aufgenommene Wasser, keine Aciditätsveränderung, weil aus einer alkalimetrisch nicht reagierenden Gruppe ein neutral reagierendes Salz entstanden ist, und eine der entstandenen Aminogruppe, bezw. Carboxylgruppe entsprechende Zunahme des formoltitrierbaren Stickstoffs. Die Zunahme des Gewichtes und des formoltitrierbaren Stickstoffs müssen auch hier einander äquivalent sein.

6. Bei der Anhydridbildung endlich



oder richtiger



ergibt sich genau das Umgekehrte: keine Aciditätsveränderung, Abnahme des Gewichtes und des formoltitrierbaren Stickstoffs in genau äquivalentem Verhältnis.

Der besseren Übersicht halber werden die Resultate dieser Überlegungen in eine Tabelle zusammengestellt, in welcher Zunahme mit +, Abnahme mit — und Konstanz, bezw. annähernde Konstanz mit 0 versinnlicht ist, doch so, daß + und — bei ein und derselben Reaktion immer äquivalente Veränderungen bedeuten.

Sollen nun die Resultate der Auspumpversuche auf dieses Schema hin geprüft werden, dann sei zunächst nochmals darauf verwiesen, daß bei den Auspumpversuchen, wie früher gezeigt worden ist, weder mit absorbierten Ammoniak, noch mit Ammoniumverbindungen zu rechnen ist, daß ferner etwa gebildetes Wasser jedenfalls aus den Präparaten entfernt worden ist und daß endlich diese Versuche Bedingungen bieten, unter welchen die Bildung von Säureamid stattfinden kann.

| | Gewicht | Acidität | Formoltitrierbarer Stickstoff |
|---|---------|----------|-------------------------------|
| 1. Bildung von Ammoniumsalz | + | - | + |
| 2. Bildung von Säureamid | | | |
| a) ohne Verseifung | 0 | - | 0 |
| b) vollständige Verseifung | 0 | - | + |
| 3. Bindung von Ammoniak an Aldehyd | 0 | 0 | 0 |
| 4. Ersatz einer alkoholischen Hydroxylgruppe durch eine Aminogruppe | 0 | - | + |
| 5. Hydrolyse | + | 0 | + |
| 6. Anhydridbildung | - | 0 | - |

Vergleicht man nun die ausgepumpte Ammoniak-Diastasepräparate mit den entsprechenden ursprünglichen Diastasepräparaten, so ergibt sich

a) keine nennenswerte Gewichtsveränderung; die Präparate zeigten nach dem Auspumpen näherungsweise dasselbe Gewicht wie vor der Ammoniakbehandlung (siehe Gewichtstabelle unter «Behandlung mit Ammoniakgas»)

b) eine Abnahme der Acidität,

c) eine Zunahme des formoltitrierbaren Stickstoffs.

d) Ich berechne in der folgenden Zusammenstellung die der prozentuellen Aciditätszunahme äquivalente Stickstoffmenge (1000 ccm Normalflüssigkeit = 1 Grammatom Stickstoff) und stelle diesen Zahlen die prozentuelle Zunahme des formoltitrierbaren Stickstoffs gegenüber.

| Diastasepräparat | Aciditätsabnahme ccm | Der Aciditätsabnahme äquivalente Stickstoffmenge ‰ | Zunahme des formoltitrierbaren Stickstoffs ‰ |
|------------------|-------------------------|--|---|
| III | 32,7 | 0,45 | 0,41 |
| III | 21,1 | 0,29 | 0,20 |
| IH | 14,3 | 0,20 | 0,29 |
| gereinigt IV | 25,5 | 0,36 | 0,47 |
| gereinigt IV | 15,8 | 0,22 | 0,27 |

Vergleicht man die beiden letzten Zahlenkolonnen miteinander und bedenkt man, daß die Werte an sich klein sind und daß die unvermeidlichen Versuchsfehler, welche bei der Bestimmung der Acidität gemacht werden, bei der Aufstellung eines Verhältnisses zwischen Acidität und der daran sich schließenden Formoltitrierung in doppelter Größe zum Ausdrucke kommen, so wird man finden, daß die beiden Kolonnen befriedigend übereinstimmen. Die Aciditätsabnahme kann daher der Zunahme an formoltitrierbarem Stickstoff äquivalent genannt werden.

Da diese Veränderungen auf einen chemischen Prozeß hinweisen, bei welchem Ammoniak aufgenommen und die äquivalente Menge Wasser abgegeben wird, so erübrigt nur noch zu zeigen, daß für die in den Versuchen obwaltenden Mengenverhältnisse die Gewichtsabnahme wirklich nur minimal sein kann. Berechnet man aus der Aciditätszunahme oder aus dem Zuwachs an formoltitrierbarem Stickstoff, welche beiden Größen den Umfang des chemischen Prozesses ausdrücken, die der Differenz $\text{NH}_3 - \text{H}_2\text{O}$ entsprechende Größe, so ist diese für den höchsten Fall prozentisch ausgedrückt — 0,032% und auf die verwendete Substanzmenge berechnet 0,0002 g, eine Größe, die sicher in den Bereich der unvermeidlichen Versuchsfehler fällt.

Nach der in dem Schema gebrauchten Ausdrucksweise kann daher der chemische Prozeß, welcher in den Auspumpversuchen stattgefunden hat, folgendermaßen ausgedrückt werden:

| Gewicht | Acidität | Formoltitrierbarer Stickstoff |
|---------|----------|----------------------------------|
| 0 | — | + |

Dieses Bild stimmt mit den Bildern zweier Prozesse der früher aufgestellten Tabelle überein, nämlich dem Prozeß 2b, Bildung von Säureamid mit vollständiger Verseifung bei dessen Zusammenbringen mit Wasser, und dem Prozeß 4, Ersatz einer alkoholischen Hydroxylgruppe durch eine Aminogruppe.

Der erste Prozeß (Säureamidbildung mit vollständiger Verseifung) hat, wie früher an Beispielen gezeigt worden ist,

nicht viel Wahrscheinlichkeit für sich. Die Annahme des zweiten Prozesses (Ersatz der alkoholischen Hydroxylgruppe durch eine Aminogruppe) schien von vornherein absurd. Jedenfalls aber liegt ein Prozeß vor, welcher schließlich dasselbe Bild liefert, wie die genannten beiden Prozesse, und diesen Prozeß will ich mir vorläufig, bis eine passendere Annahme gefunden ist, als den Ersatz einer Hydroxylgruppe durch eine Aminogruppe vorstellen.

Da taucht zunächst die Frage auf, ob nicht dasselbe Bild durch eine Kombination zweier oder mehrerer Prozesse vorgetäuscht werden kann. Ein Blick auf die entworfenen schematische Zusammenstellung lehrt, daß man, soweit man sich auf die in das Schema einbezogenen chemischen Prozesse beschränkt, die anderen Prozesse kombinieren kann, wie man will, und nie auf das Bild 0, —, + kommt, wobei nochmals betont sei, das + und — bei demselben Prozesse immer äquivalente Veränderungen bedeuten.

Eine zweite Frage wäre die, ob das Ammoniak neben der Reaktion, welche es mit der alkoholischen Hydroxylgruppe eingegangen zu sein scheint, nicht noch mit einer anderen Atomgruppe reagiert haben kann, ohne daß das Bild der ersten Reaktion beeinflußt wird. Diese Frage muß ohne weiteres bejaht werden. Der Prozeß 3, Bindung von Ammoniak an Aldehyd, verändert weder Gewicht, noch Acidität, noch formol-titrierbaren Stickstoff, er kann daher ganz gut stattgefunden haben, ohne daß aus den bei den Auspumpversuchen gefundenen Zahlen sich ein Anhaltspunkt dafür ergäbe.

Das Gleiche würde gelten von dem höchst unwahrscheinlichen Falle einer Kombination der Prozesse 5 und 6 in der Weise, daß Hydrolyse und Anhydridbildung genau in demselben Grade stattgefunden hätten.

Es weist daher das Bild 0, —, + auf einen einzigen Prozeß hin, für welchen ich vorläufig, wie gesagt, die Vorstellung akzeptieren will, er bedeute den Ersatz einer alkoholischen Hydroxylgruppe durch eine Aminogruppe.

Waren schon bei den Auspumpversuchen die Verhältnisse nicht ganz leicht zu überblicken, so liegen sie noch viel kom-

plizierter bei den übrigen Versuchen, bei welchen der Überschuß des Ammoniaks gewissermaßen nur durch einen trockenen Luftstrom abgeblasen wurde.

Die Komplikationen, welche bei diesen Versuchen hinzutreten, bestehen vor allem darin, daß bei diesen Versuchen Bindungsformen des Ammoniaks zu berücksichtigen sind, welche bei den Auspumpversuchen ganz oder fast ganz ausgeschlossen werden konnten, das sind insbesondere die Bildung von Ammoniumsalz und die physikalische Adsorption von Ammoniak. Wie die physikalische Adsorption von Ammoniak in das entworfenene Schema einzufügen wäre, ist durch eine kurze Überlegung leicht festzustellen, sie würde genau dasselbe Bild, nämlich $+$, $-$, $+$ liefern wie das zu Ammoniumsalz gebundene Ammoniak und kann daher in einer Rubrik mit diesem abgehandelt werden.

Eine zweite, noch schwerer zu überblickende Komplikation liegt darin, daß bei einigen der Prozesse, welche in das Schema aufgenommen worden sind, Wasser gebildet wird. Dieses Wasser kann dem Präparate durch den trockenen Luft- bzw. Gasstrom ganz, zum größeren oder geringeren Teile, vielleicht auch garnicht enttragen worden sein. Der letzte Fall, nämlich daß das ganze Wasser, welches gebildet worden ist, in dem Präparate zurückbleibt, ist zwar unwahrscheinlich. Ich will ihn aber doch den folgenden Betrachtungen zugrundelegen, weil er den Grenzfall bildet und daher die Gewichtszunahmen, welche er mit sich bringen würde, Maximalzahlen sind. Unter dieser Voraussetzung würde das Schema, welches für die Verhältnisse der Auspumpversuche aufgestellt worden ist, für die übrigen Versuche die folgende Gestalt annehmen.

Bei dem Prozesse 5, Hydrolyse, wurde die Gewichtsveränderung mit 0 eingesetzt, weil das Wasser, welches zu einer eventuellen Hydrolyse gebraucht wird, nur von einem anderen Prozesse stammen könnte, und daher keine Gewichtsveränderung des Gesamtpäparates bedingen würde.

Auch hier sei ausdrücklich darauf verwiesen, das $+$ und $-$ bei demselben Prozesse nur Größen bedeuten können, die einander äquivalent sind.

| | Gewicht | Acidität | Formoltitrierbarer Stickstoff |
|--|---------|----------|-------------------------------|
| 1. Bildung von Ammoniumsalz, sowie physikalische Adsorption von Ammoniak | + | - | + |
| 2. Bildung von Säureamid | | | |
| a) ohne Verseifung | + | - | 0 |
| b) vollständige Verseifung | + | - | + |
| 3. Bindung von Ammoniak an Aldehyd | + | 0 | 0 |
| 4. Ersatz einer alkoholischen Hydroxylgruppe durch eine Aminogruppe | + | - | + |
| 5. Hydrolyse | 0 | 0 | + |
| 6. Anhydridbildung | 0 | 0 | - |

In den Versuchen ohne Auspumpen findet sich nun eine Gewichtszunahme, eine Aciditätsabnahme und eine Zunahme des formoltitrierbaren Stickstoffs und es ist nunmehr zu untersuchen, inwieweit diese Veränderungen einander äquivalent sind. Zu diesem Zwecke berechne ich aus den prozentischen Werten die der Gewichtszunahme (als Ammoniak betrachtet) und der Aciditätsabnahme äquivalenten Stickstoffmengen und stelle diesen Werten den Zuwachs an formoltitrierbarem Stickstoff gegenüber.

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|------------------|----------------------|--|-------------------------|---|---|
| Diastasepräparat | Gewichtszunahme % | der Gewichtszunahme äquivalente Stickstoffmenge % | Aciditätsabnahme ccm | der Aciditätsabnahme äquivalente Stickstoffmenge % | Zunahme an formoltitrierbarem Stickstoff % |
| II | 1,82 | 1,50 | 47,0 | 0,66 | 0,69 |
| II | 1,70 | 1,40 | 68,2 | 0,96 | 1,00 |
| II | 2,05 | 1,69 | 90,2 | 1,26 | 1,17 |
| gereinigt IV | 3,09 | 2,54 | 97,1 | 1,36 | 2,07 |
| gereinigt IV | 2,17 | 1,78 | 66,5 | 0,93 | 1,02 |

Vergleicht man die Kolonen 5 und 6 miteinander, so zeigen die bezüglichen Werte, ausgenommen die des vierten Versuches, in Anbetracht der obwaltenden Umstände befriedigende Übereinstimmung. Das heißt: Aciditätsabnahme und Zunahme an formoltitrierbarem Stickstoff sind bis auf eine Ausnahme einander äquivalent. Dagegen sind die Werte der Kolonne 3 durchwegs höher als die Kolonnen 5 und 6, die Gewichtszunahme ist demnach größer, als dem äquivalenten Verhältnisse entspricht.

In der Ausdrucksweise des Schemas würden die in den Versuchen beobachteten Veränderungen folgendes Bild liefern.

| Gewicht | Acidität | Formoltitrierbarer Stickstoff |
|--------------|----------|-------------------------------|
| größer als + | — | + |

Dieses Bild ist zweifellos das Resultat einer Kombination mehrerer Prozesse. Darin stecken:

- die Bildung von Ammoniumsalz,
- die physikalische Adsorption von Ammoniak,
- derjenige chemische Prozeß, den ich mir als Ersatz einer alkoholischen Hydroxylgruppe vorgestellt habe.

Jedem einzelnen dieser Prozesse und demnach auch einer Summe der drei Prozesse kommt das Bild

+ — +

zu, auch für den Fall, daß meine Vorstellung von dem mit c bezeichneten Prozesse nicht richtig ist und dieser Prozeß etwa die Bildung von Säureamid mit nachfolgender totaler Verseifung oder ein anderer Prozeß wäre.

Die in den Versuchen beobachtete Gewichtszunahme ist aber größer, als dem Bilde + — + entspricht, und dieses Superplus ist um so auffallender, als die Wassermengen, welche durch den trockenen Gasstrom den Präparaten entführt worden sein konnten, bei der Aufstellung des Schemas vernachlässigt wurden, und die Gewichtswerte in dem Schema an sich schon Maximalwerte bedeuten.

Das beobachtete Superplus der Gewichtszunahme weist daher darauf hin, daß das Ammoniak noch

d) einen weiteren Prozeß bewirkt habe, welcher von den übrigen Prozessen losgelöst in den vorliegenden Versuchen das Bild

| | | |
|---|---|---|
| + | 0 | 0 |
|---|---|---|

in den Auspumpversuchen aber das Bild

| | | |
|---|---|---|
| 0 | 0 | 0 |
|---|---|---|

hervorrufen würde. Diesen Prozeß muß ich mir nach dem Vorliegenden vorläufig als die Bindung von Ammoniak an Aldehydgruppen vorstellen.

Schäle ich nun die Resultate dieser Überlegungen von den willkürlichen Annahmen und Vorstellungen los, so kann ich als Ergebnisse der bisherigen Untersuchung folgende hinstellen:

1. Bei der Einwirkung von Ammoniak auf Diastasepräparate gehen außer den sozusagen als selbstverständlich vorauszusetzenden Prozessen, wie Bildung von Ammoniumsalz und physikalische Adsorption von Ammoniak, noch zwei andere Prozesse vor sich.

2. Diese zwei anderen Prozesse sind beide mit der Abspaltung von einer der aufgenommenen Ammoniakmenge äquivalenten Menge Wassers oder, ganz korrekt ausgedrückt, eines Stoffes, welcher annähernd dasselbe Molekulargewicht wie Wasser besitzt, verbunden.

3. Bei dem einen der beiden Prozesse bildet sich eine Atomgruppe, welche die Eigenschaft, einerseits Säure, andererseits Formaldehyd zu binden, besitzt, bzw. beim Zusammenbringen der Präparate mit Wasser erwirbt, demnach sowohl im alkalimetrischen Versuche, als auch bei der Formoltitrierung zum Ausdruck kommt.

4. Die Atomgruppe, welche durch den anderen Prozeß gebildet wird, besitzt diese Eigenschaften nicht, sie beeinflusst daher weder die Acidität, noch die Formoltitrierung.

Endlich kann wohl noch folgender Satz als sicher hingestellt werden:

5. Wenn die Diastasepräparate Aldehydgruppen enthalten, so werden diese bei der Behandlung der Präparate mit Ammoniak an Ammoniak gebunden werden.

Wenn ich mir nun unter dem einen der beiden fraglichen

Prozesse den Ersatz einer alkoholischen Hydroxylgruppe durch eine Aminogruppe, unter dem anderen die Bindung von Ammoniak an Aldehyd vorstelle, so habe ich natürlich auch andere Umstände in Erwägung zu ziehen, welche für oder gegen diese Annahme sprechen, unter diesen wohl zunächst jene, welche für oder gegen die Anwesenheit von Aldehydgruppen in den verarbeiteten Diastasepräparaten sprechen.

Was die ursprünglichen Handelspräparate «Diastase II und III» betrifft, welche Zucker enthalten, so kann bei diesen über die Anwesenheit von Aldehydgruppen wohl kein Zweifel bestehen, und es wären die angenommenen Aldehydgruppen wenigstens zum Teil nur die des beigemengten Zuckers.

Nun enthalten aber die reduzierenden Zucker nach begründeter und ziemlich allgemein akzeptierter Vorstellung eigentlich gar keine freie Aldehydgruppe, sondern die Aldehydgruppe des Zuckers ist mit einer alkoholischen Hydroxylgruppe in Enolbindung verbunden. Wenn nun Ammoniak auf eine derartig festgelegte Aldehydgruppe einwirken soll, so kann die Möglichkeit, daß es auch die enolgebundene alkoholische Hydroxylgruppe irgendwie beeinflussen kann, nicht von vornherein von der Hand gewiesen werden, und damit rückt die Vorstellung von dem Ersatze einer alkoholischen Hydroxylgruppe durch eine Aminogruppe bei der Einwirkung von trockenem Ammoniakgas aus dem Bereiche der Absurdität doch einigermaßen in den Bereich der Möglichkeit.

Beim Kochen mit Fehlingscher Flüssigkeit wirkt die Aldehydgruppe der reduzierenden Zucker reduzierend, vielleicht deshalb, weil unter solchen Bedingungen zunächst die Aldehydgruppe aus der Enolbildung in Freiheit gesetzt wird. Es wäre aber auch die Vorstellung denkbar, daß es in andern Stoffen enolgebundene Aldehydgruppen gibt, deren Enolbindung durch Kochen mit Fehlingscher Lösung nicht gesprengt wird, welche daher Fehlingsche Lösung nicht reduziert, aber trotzdem durch trockenes Ammoniakgas angegriffen werden können, und damit würde diese Vorstellung auch auf die Resultate jener Versuche passen, welche mit den nachgewissermaßen zuckerfreien «gereinigten» Diastasepräparaten angestellt worden sind.

Diese Vorstellungen könnten vielleicht bis zu einem gewissen Grade an Stoffen von bekannter Konstitution auf ihre Richtigkeit geprüft werden. Ich glaube auch diesbezüglich schon einige Anhaltspunkte gewonnen zu haben, muß aber die Bearbeitung dieser Frage auf spätere Zeit verschieben, weil sich inzwischen anscheinend dringendere Fragen aufgeworfen haben.

Bestimmung des Amidstickstoffes.

Da Ammoniak, bezw. Ammoniumverbindungen unter der Einwirkung von salpetriger Säure ihren Stickstoff nur langsam abgeben und daher die Gegenwart dieser Verbindungen nicht bestimmbare Versuchsfehler bedingt, wurden diese Verbindungen vorher entfernt. Die mit Ammoniakgas behandelten Präparate wurden mit Wasser und etwas mehr als der berechneten Menge Magnesiumoxyd angerührt und blieben so drei Tage lang im Vakuum über Schwefelsäure stehen. Während dieser Zeit wurde öfter umgerührt und bei stärkerer Eindickung mit etwas Wasser verdünnt. Danach wurde vorsichtig verdünnte Essigsäure zugesetzt, bis das Magnesiumhydroxyd gelöst war, und die Flüssigkeit in den Zersetzungsapparat eingetragen, worin folgende Resultate erzielt wurden:

| Bezeichnung des Diastasepräparates | Verwendete Menge des Diastasepräparates g | Ammoniakgehalt g | Stickstoff ccm | Temperatur C | Barometerstand mm |
|------------------------------------|--|---------------------|-------------------|-----------------|----------------------|
| III | 0,5381 | 0,0094 | 4,4 | 15,3° | 740,0 |
| III | 0,5296 | 0,0105 | 4,9 | 18,2° | 744,0 |
| gereinigt IV | 0,5107 | 0,0123 | 5,0 | 14,3° | 745,1 |
| gereinigt IV | 0,5269 | 0,0160 | 5,3 | 16,5° | 749,0 |

| Diastasepräparat | In Prozenten | | |
|------------------|----------------|-----------------------------------|-------------------------|
| | Ammoniakgehalt | Amidstickstoff | |
| | | mit Ammoniak behandeltes Präparat | ursprüngliches Präparat |
| III | 1,75 | 0,47 | 0,34 |
| III | 1,98 | 0,52 | 0,34 |
| gereinigt IV | 2,41 | 0,56 | 0,43 |
| gereinigt IV | 3,04 | 0,58 | 0,43 |

Die Werte, welche bei den mit Ammoniak behandelten Präparaten gefunden worden sind, liegen trotz der Behandlung mit Magnesiumhydroxyd durchwegs etwas höher als bei den ursprünglichen Präparaten. Diese Werte sind in die Berechnungen des vorigen Abschnittes nicht einbezogen worden, weil sie nur als Vergleichswerte, nicht als absolute Werte aufzufassen sind. Die Differenzen zwischen den beiden letzten Kolonnen dürften wohl dem Prozesse entsprechen, welcher als Ersatz einer Hydroxylgruppe durch eine Aminogruppe gedeutet wurde, während der andere Prozeß, welcher als Bindung von Ammoniak an Aldehyd angesehen wurde, naturgemäß auch hier nicht zum Ausdruck kommen kann.

Prüfung der Fermentwirkung.

Zur Beschreibung der verwendeten Methode hätte ich den Ausführungen, welche bei den Versuchen mit Chlorwasserstoff gemacht worden sind, nichts hinzuzufügen, als daß hier zur Neutralisation der Fermentlösung natürlich nicht Lauge, sondern Zehntel-Normal-Salzsäure verwendet worden ist. Ich kann daher gleich einige Versuchsprotokolle anführen.

I.

1 g Diastase II mit Ammoniak behandelt.

Kontrolle: 1 g Diastase II.

Stärkelösung: 2 g lösl. Stärke (Kahlbaum): 500 ccm Wasser.

| Dauer des Versuches | Kontrolle | | | mit Ammoniak behandeltes Ferment | | |
|-------------------------|----------------|------------------------------|--------------------------|-------------------------------------|------------------------------|--------------------------|
| | Jod- lösung | Reduktion in mg Zucker | mg Zucker gebildet | Jod- lösung | Reduktion in mg Zucker | mg Zucker gebildet |
| Beginn | blau | 13,5 | 0 | blau | 13,7 | 0 |
| 1/2 Stunde | 0 | 17,7 | 4,2 | 0 | 19,2 | 5,5 |
| 1 Stunde | 0 | 19,0 | 5,5 | 0 | 22,2 | 8,5 |
| 1 1/2 Stunden | 0 | 20,7 | 7,2 | 0 | 22,2 | 8,5 |
| 2 Stunden | 0 | 22,4 | 8,9 | 0 | 24,1 | 10,4 |
| reduziert Fehling | — | sehr stark | — | — | sehr stark | — |

II.

0,2 g Diastase gereinigt III mit Ammoniak behandelt.

Kontrolle: 0,2 g Diastase III.

Stärkelösung: 2 g lösl. Stärke (Merck): 500 ccm Wasser.

| Dauer des Versuches | Kontrolle | | | mit Ammoniak behandeltes Ferment | | |
|-------------------------|--------------|------------------------|--------------------|----------------------------------|------------------------|--------------------|
| | Jod-lösung | Reduktion in mg Zucker | mg Zucker gebildet | Jod-lösung | Reduktion in mg Zucker | mg Zucker gebildet |
| Beginn | blau | 1,9 | 0 | blau | 1,8 | 0 |
| 1/2 Stunde | schwach blau | 7,1 | 5,2 | schwach blau | 6,5 | 4,7 |
| 1 Stunde | schwach blau | 7,2 | 5,3 | schwach blau | 7,0 | 5,2 |
| 1 1/2 Stunden | schwach blau | 7,3 | 5,4 | schwach blau | 7,0 | 5,2 |
| 2 Stunden | 0 | 7,3 | 5,4 | 0 | 7,6 | 5,8 |
| reduziert Fehling | — | stark | — | — | stark | — |

III.

0,2 g Diastase gereinigt III mit Ammoniak behandelt.

Kontrolle: 0,2 g Diastase III.

Stärkelösung: 5 g lösl. Stärke (Merck): 500 ccm Wasser (das Gemenge aus 100 ccm Fermentlösung + 100 ccm Stärkelösung enthält demnach 0,5% lösliche Stärke).

| Dauer des Versuches | Kontrolle | | | mit Ammoniak behandeltes Ferment | | |
|-------------------------|------------|------------------------|--------------------|----------------------------------|------------------------|--------------------|
| | Jod-lösung | Reduktion in mg Zucker | mg Zucker gebildet | Jod-lösung | Reduktion in mg Zucker | mg Zucker gebildet |
| Beginn | blau | 4,4 | 0 | blau | 4,3 | 0 |
| 1/2 Stunde | blau | 16,6 | 12,2 | blau | 16,9 | 12,6 |
| 1 Stunde | blau | 16,6 | 12,2 | blau | 16,5 | 12,2 |
| 1 1/2 Stunden | blau | 16,9 | 12,5 | blau | 16,6 | 12,3 |
| 2 Stunden | blau | 17,0 | 12,6 | blau | 17,6 | 13,3 |
| reduziert Fehling | — | stark | — | — | stark | — |

Es folgen noch zwei Versuche, welche mit dem Material der Auspumpversuche I und V angestellt worden sind.

Auspumpversuch I.

0,9997 g Diastase III hatten aufgenommen 0,0180 g = 1,80% Ammoniak und dieses beim Auspumpen wieder abgegeben.

Kontrolle: 1 g Diastase III.

Stärkelösung: 2 g lösl. Stärke (Kahlbaum): 500 ccm Wasser

| Dauer des Versuches | Kontrolle | | | mit Ammoniak behandeltes Ferment | | |
|-------------------------|----------------|------------------------------|--------------------------|-------------------------------------|------------------------------|--------------------------|
| | Jod- lösung | Reduktion in mg Zucker | mg Zucker gebildet | Jod- lösung | Reduktion in mg Zucker | mg Zucker gebildet |
| Beginn | blau | 15,8 | 0 | blau | 15,0 | 0 |
| 1/2 Stunde | 0 | 23,7 | 7,9 | 0 | 23,3 | 8,3 |
| 1 Stunde | 0 | 24,1 | 8,3 | 0 | 25,0 | 10,0 |
| 1 1/2 Stunden | 0 | 25,2 | 9,4 | 0 | 25,7 | 10,7 |
| 2 Stunden | 0 | 26,5 | 10,7 | 0 | 26,5 | 11,5 |
| reduziert Fehling | — | sehr stark | — | — | sehr stark | — |

Auspumpversuch V.

0,1993 g Diastase gereinigt IV hatten aufgenommen 0,0078 g = 3,92% Ammoniak und beim Auspumpen wieder abgegeben.

Kontrolle: 0,2 g Diastase gereinigt IV.

Stärkelösung: 2 g lösl. Stärke (Kahlbaum): 500 ccm Wasser.

| Dauer des Versuches | Kontrolle | | | mit Ammoniak behandeltes Ferment | | |
|-------------------------|----------------|------------------------------|--------------------------|-------------------------------------|------------------------------|--------------------------|
| | Jod- lösung | Reduktion in mg Zucker | mg Zucker gebildet | Jod- lösung | Reduktion in mg Zucker | mg Zucker gebildet |
| Beginn | blau | 4,2 | 0 | blau | 4,0 | 0 |
| 1/2 Stunde | 0 | 10,7 | 6,5 | 0 | 10,6 | 6,6 |
| 1 Stunde | 0 | 10,7 | 6,5 | 0 | 10,9 | 6,9 |
| 1 1/2 Stunden | 0 | 10,8 | 6,6 | 0 | 11,8 | 7,8 |
| 2 Stunden | 0 | 11,2 | 7,0 | 0 | 11,8 | 7,8 |
| reduziert Fehling | — | stark | — | — | stark | — |

Alle Versuche zeigen übereinstimmend, daß die diastatische Wirkung der Fermentpräparate durch die Einwirkung von Ammoniakgas nicht im mindesten geschädigt, im Gegenteil, vielleicht sogar eher ein wenig gefördert wird. Es sind daher alle jene Prozesse, welche das Ammoniak in den Bestandteilen der Diastasepräparate verursacht hat und welche durch die Neutralisation der wässerigen Lösung nicht wieder rückgängig gemacht worden sind, ohne Belang für die diastatische Wirkung. Zu diesen Prozessen gehören insbesondere die beiden aus den früheren Überlegungen erschlossenen, welche ich mir vorgestellt habe:

a) als den Ersatz einer alkoholischen Hydroxylgruppe durch eine Aminogruppe,

b) als die Bindung von Ammoniak an Aldehyd.

Es können also folgende Schlüsse gezogen werden, und zwar:

1. ohne Rücksicht darauf, ob meine früheren Überlegungen richtig sind:

Zur diastatischen Wirkung ist die Anwesenheit einer unveränderten Aldehydgruppe nicht notwendig;

2. unter der Voraussetzung, daß diese Überlegungen richtig sind:

Zur diastatischen Wirkung ist auch die an eine alkoholische Hydroxylgruppe durch Enolbindung gebundene Aldehydgruppe nicht notwendig.