

Einwirkung von Stickoxyd auf Diastase.

VII. Mitteilung.

Von

Theodor Panzer.

(Der Redaktion zugegangen am 29. April 1913.)

In früheren Abhandlungen¹⁾ ist nachgewiesen worden, daß die Diastase eine Atomgruppe enthält, welche für die diastatische Wirkung notwendig ist, und welche sich mit Chlorwasserstoff verbinden kann. Diese Atomgruppe hat keine basischen Eigenschaften, ihre Verbindung mit Chlorwasserstoff ist kein Salz. Sie kann demnach weder die Aminogruppe, noch eine alkylierte Aminogruppe sein. Die Frage, ob außer der in Rede stehenden Atomgruppe noch die Aminogruppe zur diastatischen Wirkung notwendig ist oder nicht, soll derzeit nicht angeschnitten werden. Die fragliche Atomgruppe ist auch nicht die Aldehydgruppe, weil bewiesen wurde, daß die Aldehydgruppe für die diastatische Wirkung nicht notwendig ist.

In dem Bestreben, die chemische Natur dieser Atomgruppe zu erkennen, sollten zunächst verschiedene Atomgruppen, welche Chlorwasserstoff binden können, systematisch daraufhin untersucht werden, ob sie für die diastatische Wirkung von Belang sind. Als erste der Gruppen, welche in diesem Sinne geprüft werden sollten, wählte ich die Gruppe zweier doppelt gebundener Kohlenstoffatome.

Ein für den vorliegenden Zweck ideal zu nennendes Reagens müßte sich unter Lösung der doppelten Bindung an die beiden Kohlenstoffatome anlagern, sollte aber außer dieser Verbindung mit keiner anderen Atomgruppe reagieren und sollte insbesondere auch keine tiefgreifenden Veränderungen der Konstitution bewirken. Von den zahlreichen Reagentien, welche zum Nachweis doppelt gebundener Kohlenstoffatome verwendet worden sind, entspricht wohl keines diesem Ideal. Es bleibt also nichts anderes übrig, als mehrere von jenen Stoffen, welche sich an Doppelbindung anlagern können, in mehreren Ver-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 82, S. 276; vgl. auch Bd. 84, S. 161.

suchsreihen zu untersuchen, damit durch Vergleichung der Resultate erkannt werden könne, welche Veränderungen der Auflösung der doppelten Kohlenstoffbindung und welche anderen chemischen Reaktionen zususchreiben sind.

Von theoretischen Überlegungen ausgehend, glaubte ich ein dem aufgestellten Ideal recht nahekommenes Reagens in dem Stickoxyd gefunden zu haben. Es war wohl vorauszusehen, daß das Stickoxyd als ungesättigte Verbindung sich besonders leicht an doppelte Kohlenstoffbindungen anlagern werde, etwa nach dem Typus $— CH = CH — + 2 NO = — CH \cdot NO — CH \cdot NO$. Andererseits war mir über die Einwirkung des Stickoxyds auf andere Atomgruppen nichts bekannt, ausgenommen das Stickoxyd-Hämoglobin.

Als ich aber die Literatur durchsuchte, konnte ich keine Angabe darüber finden, daß reines Stickoxyd zur Anlagerung an doppelte Kohlenstoffbindung schon verwendet worden wäre. O. Wallach, Schmidt, Hantzsch, Ssidorenko, Demjanow, Wieland und Stenzl u. a. haben entweder Gemenge von Stickstoffoxyden, in welchen vielleicht hin und wieder Stickoxyd enthalten gewesen sein mag, oder andere Oxyde des Stickstoffs zu dem gedachten Zwecke verwendet.

Trotzdem also die wichtigste Vorfrage, nämlich die, ob Stickoxyd sich überhaupt an doppelte Kohlenstoffbindungen anlagert, noch nicht gelöst erschien und einer späteren Bearbeitung vorbehalten werden mußte, habe ich doch Versuche über die Einwirkung dieses Gases auf Diastase angestellt, weil mir einige Vorversuche interessante Resultate zu versprechen schienen.

In den ersten derartigen Versuchen hatte ich das Stickoxyd aus Eisenchlorürlösung und Salpetersäure dargestellt, in einem Gasometer über Wasser aufgefangen und aus dem Gasometer erst über die Präparate geleitet. In den späteren Versuchen, und hierher gehören alle im folgenden beschriebenen Versuche, habe ich mich eines bequemeren Verfahrens bedient, nämlich der Entwicklung von Stickoxyd aus salpetriger Säure. Ich habe dieselbe Lösung von salpetrigsaurem Natrium verwendet, welche für die Bestimmung des Amidstickstoffs nach van Slyke dient, natürlich in viel größerer Menge, für einen

Versuch 400 ccm der Lösung von salpetrigsaurem Natrium und 100 ccm Eisessig. Das Gas wurde mit Lauge gewaschen und in einem mit Stückchen von gebranntem Kalk gefüllten Turme getrocknet. Der Apparat, in welchem die Behandlung der Diastase mit Stickoxyd vorgenommen wurde, war im wesentlichen ebenso gebaut, wie die Apparate, welche bei den Versuchen mit Chlorwasserstoff und Ammoniak verwendet worden sind. Vor dem Kölbchen, in welches das Wägegläschen mit der getrockneten Substanz eingestellt wurde, war aber statt des Zweiweghahnes ein Dreiweghahn angebracht, welcher gestattete, ein Gas in das Kölbchen und ein zweites Gas ins Freie zu leiten.

Nachdem der Apparat mit der Substanz beschickt war, wurde zuerst die Luft daraus durch Kohlensäure verdrängt, welche aus Marmor- und Salzsäure in einem Kippischen Apparat entwickelt, mit konzentrierter Schwefelsäure gewaschen und in einem mit Chlorcalcium gefüllten Turme getrocknet wurde. Inzwischen wurde in einer Gasentwicklungsflasche salpetrigsaures Salz und Eisessig zusammengebracht und das zunächst stürmisch sich entwickelnde Stickoxyd durch Wasch- und Trockengefäß und den Dreiweghahn ins Freie geleitet. Wenn nötig, wurde die rasche Gasentwicklung durch Schütteln der Gasentwicklungsflasche unterstützt. Wenn aus diesem Teil des Apparates die Luft vollständig vertrieben war, was sich aus dem Verschwinden der braunen Dämpfe namentlich beim Ansehen des weißen Ätzkalks leicht erkennen ließ, und der übrige Apparat mit Kohlensäure gefüllt war, wurde durch Umstellung des Dreiweghahnes das Stickoxyd über die Substanz geleitet und die Kohlensäureentwicklung abgestellt. Durch kräftiges Schütteln der Gasentwicklungsflasche wurde wieder ein rascher Strom von Stickoxyd erzeugt, sodaß in dem Kölbchen, welches die Substanz enthielt, die Kohlensäure rasch durch Stickoxyd verdrängt wurde, dann wurde der Apparat durch 18 Stunden ruhig sich selbst überlassen, während welcher Zeit die allmähliche Zersetzung der salpetrigen Säure einen andauernden, langsamen Strom von Stickoxyd lieferte. Nach Ablauf der 18 Stunden wurde das Stickoxyd wieder durch

Kohlensäure verdrängt, noch weiter Kohlensäure durchgeleitet, schließlich das Wägegläschen herausgenommen und gewogen. Die Diastasepräparate erlitten bei dieser Behandlung keine sichtbare Veränderung, höchstens einen leicht grünlichen Stich, sie waren auch gegen feuchte Luft nicht so sehr empfindlich wie die mit Chlorwasserstoff behandelten Diastasepräparate. Im übrigen decken sich die Methoden, welche bei der weiteren Verarbeitung dieser Präparate angewendet wurden, vollkommen mit den bisher angewendeten. Es können daher ohne weiteres die Resultate angeführt werden, doch sei nochmals betont, daß alle prozentischen Berechnungen sich auf 100 Teile des ursprünglichen, unveränderten Diastasepräparates beziehen.

Die Diastasepräparate, welche zu diesen Versuchen verwendet worden sind, waren die, welche in früheren Abhandlungen mit «Diastase III» und «Diastase gereinigt IV» bezeichnet worden waren. Die Analyse hatte für diese Präparate ergeben in Prozenten:

	Diastase III	Diastase gereinigt IV
Stickstoff	4,44 %	5,46 %
Asche	3,03 %	3,56 %
Amidstickstoff	0,34 %	0,43 %
Formoltitrierbarer Stickstoff	0,20 %	0,18 %
Acidität entsprechend ccm Normallauge für 100 g Substanz	23,6 ccm	32,4 ccm

Behandlung mit Stickoxyd.

Bezeichnung des Diastasepräparates	Verwendete Menge des Diastasepräparates in g	Aufgenommene Stickoxydmenge in g	In Prozenten
III.	0,9983	0,0300	3,01
	0,5700	0,0208	3,65
	0,5281	0,0104	1,97
	0,4980	0,0133	2,67
	0,5033	0,0148	2,94
	0,5096	0,0136	2,67
	0,4965	0,0156	3,14
	0,6143	0,0194	3,16

Fortsetzung.

Bezeichnung des Diastasepräparates	Verwendete Menge des Diastasepräparates in g	Aufgenommene Stickoxydmenge in g	In Prozenten
Gereinigt IV.	0,2074	0,0235	11,33
	0,5215	0,0334	6,40
	0,5078	0,0317	6,24
	0,4961	0,0373	7,52
	0,5266	0,0378	7,18
	0,4895	0,0466	9,52
	0,4971	0,0241	4,85
	0,5013	0,0497	9,91
	0,4643	0,0444	9,56
	0,4883	0,0403	8,25

Auch hier wurden Auspumpversuche angestellt. Um das ausgepumpte Stickoxyd aufzunehmen, enthielt der mit konzentrierter Schwefelsäure beschickte Vakuumexsikkator noch eine Petrischale, welche mit einem trockenen Gemenge aus Natronkalk und Ferrosulfat (*Ferrum sulfuricum alchole praecipitatum*) gefüllt war. Die Resultate der Auspumpversuche geben die beiden folgenden Tabellen wieder.

In Gewichten (Grammen).

	I.	II.	III.	IV.	V.	VI.
Diastasepräparat	Diastase III			Diastase gereinigt IV		
Verwendete Menge des Diastasepräparates	0,9983	0,5700	0,5281	0,2074	0,5215	0,5266
Aufgenomm. Stickoxydmenge	0,0300	0,0208	0,0104	0,0235	0,0334	0,0378
Das Präparat enthielt noch Stickoxyd: am 1. Tage	—	0,0205	0,0104	0,0193	0,0326	0,0374
» 2. »	0,0263	—	konstant	0,0183	0,0319	—
» 3. »	0,0259	0,0204	konstant	—	—	—
» 4. »	konstant	0,0196	konstant	0,0182	0,0317	0,0370
» 5. »	konstant	0,0190	konstant	konstant	0,0316	konstant
» 6. »	konstant	0,0183	konstant	konstant	konstant	konstant
» 7. »	konstant	0,0179	konstant	konstant	konstant	konstant

Fortsetzung.

Diastasepräparat	I.	II.	III.	IV.	V.	VI.
	Diastase III			Diastase gereinigt IV		
am 8. Tage		0,0173				
» 9. »		—				
» 10. »		0,0168				
» 11. »		0,0166				
» 12. »		0,0164				
» 13. »		konstant				

In prozentischer Berechnung.

Diastasepräparat	I.	II.	III.	IV.	V.	VI.
	Diastase III			Diastase gereinigt IV		
Aufgenommenes Stickoxyd . .	3,01	3,65	1,97	11,33	6,40	7,18
Das Präparat enthielt noch Stickoxyd: am 1. Tage	—	3,60	1,97	9,30	6,25	7,10
» 2. »	2,63	—	konstant	8,82	6,12	—
» 3. »	2,60	3,58	konstant	—	—	—
» 4. »	konstant	3,44		8,78	6,08	7,03
» 5. »		3,33		konstant	6,06	konstant
» 6. »		3,21		konstant	konstant	konstant
» 7. »		3,14				
» 8. »		3,04				
» 9. »		—				
» 10. »		2,95				
» 11. »		2,91				
» 12. »		2,81				
» 13. »		konstant				

Die in der ersten Tabelle verzeichneten Stickoxydmengen zeigen allerdings große Unterschiede. Doch kann man wohl das eine entnehmen, daß das milchzuckerfreie Präparat «Diastase gereinigt IV» beträchtlich mehr Stickoxyd aufnehmen kann als das milchzuckerhaltige «Diastase III». Übrigens sind bei dem letzteren Präparate die Differenzen viel kleiner als bei ersterem.

In den Auspumpversuchen geben die Präparate in der Regel nur kleine Mengen von Stickoxyd ab und bewahren dar-

nach ein konstantes Gewicht. Diese Gewichtskonstanz ist meist schon nach ganz wenigen Tagen (1—5) erreicht. Daß dies in einem Versuche etwas länger gedauert hat, rührt offenbar nur davon her, daß das Gemisch aus Natronkalk und Ferrosulfat das Stickoxyd nicht gar so prompt bindet.

Jedenfalls ist die Hauptmenge des Stickoxyds fester gebunden, und nur ein kleiner Teil wird leicht abgegeben. Ich stelle in einer Tabelle zur bequemeren Übersicht den fester und den lockerer gebundenen Anteil an Stickoxyd, wie er sich aus den einzelnen Versuchen ergeben hat, zusammen.

Versuchs- Nr.	Diastase- präparat	Auf- genommenes Stickoxyd %	Fester gebundenes Stickoxyd %	Lockerer gebundenes Stickoxyd %
I.	III	3,01	2,60	0,41
II.	III	3,65	2,88	0,77
III.	III	1,97	1,97	0
IV.	gereinigt IV	11,33	8,78	2,55
V.	› IV	6,40	6,06	0,34
VI.	› IV	7,18	7,03	0,15

Es liegt nahe, bei dem fester gebundenen Stickoxyd an eine chemische Verbindung zwischen Stickoxyd und Bestandteilen des Diastasepräparates zu denken. Allerdings ist es schwer, sich vorzustellen, daß, wenn eine chemische Verbindung eintritt, ein und dasselbe Präparat verschiedene Mengen von Stickoxyd fester binden sollte. In den Versuchen I und II stimmen zwar die fester gebundenen Stickoxydmengen in Anbetracht der Versuchsbedingungen sehr gut überein, aber im übrigen herrscht keine Übereinstimmung. Dieser Widerspruch klärt sich indessen leicht auf.

Nimmt man von jedem Präparate jene Versuche heraus, welche den höchsten Wert für fester gebundenes Stickoxyd aufweisen, d. i. bei Diastase III: Versuch I und II, bei Diastase gereinigt IV: Versuch IV, so zeigt sich, daß in diesen Versuchen auch nennenswerte Mengen von lockerer gebundenem Stickoxyd abgegeben wurden. In den übrigen Versuchen wurde

entweder gar kein Stickoxyd oder nur recht geringe Mengen Stickoxyd abgegeben. Im praktischen Versuche bedeuten diese geringen Mengen solche von um 1 mg. Wie übrigens die braunen Pünktchen, welche an einzelnen Stellen der Ferrosalzmasse aufgetreten waren, beweisen, waren diese kleinen Mengen wirklich Stickoxyd und nicht etwa Wägefehler. Doch haben wohl so kleine Mengen nichts Wesentliches zu bedeuten.

Wenn daher diese letzteren Präparate keinen nennenswerten Überschuß von Stickoxyd abgeben können, dann werden auch die Atomgruppen, welche Stickoxyd chemisch binden können, nicht mit Stickoxyd gesättigt gewesen sein. Diese Sättigung hat nur in den Versuchen I, II und IV stattgefunden und die übrigen Versuche weisen nur deshalb niedrigere Werte für fester gebundenen Stickoxyd auf, weil die Sättigung noch nicht vollendet war.

Man kann demnach sagen, daß das Präparat «Diastase III» ungefähr 2,8% und das Präparat «Diastase gereinigt IV» ungefähr 8,8% Stickoxyd chemisch binden kann. In allen Versuchen war den Präparaten ein ganz beträchtlicher Überschuß von Stickoxyd dargeboten worden. Wenn unter diesen Umständen die stickoxydbindenden Gruppen der Diastasepräparate nicht immer ganz mit Stickoxyd gesättigt waren, so beweist dies nur, daß die chemische Verbindung mit Stickoxyd, wenigstens unter den eingehaltenen Versuchsbedingungen, nicht sehr leicht vor sich geht.

In diesem Sinne sind jedenfalls auch die Verschiedenheiten in den Stickoxydmengen, welche die nicht ausgepumpten Präparate enthielten, zu erklären. Man wird wohl annehmen können, daß in allen jenen Versuchen, in welchen die Präparate weniger als 2,8, bzw. 8,8% Stickoxyd enthalten, die stickoxydbindenden Gruppen nicht ganz mit Stickoxyd gesättigt sind, und daß in jenen Versuchen, in welchen die Präparate mehr als 2,8, bzw. 8,8% Stickoxyd enthalten, nicht nur diese Sättigung eingetreten ist, sondern daß auch die Präparate locker gebundenes Stickoxyd enthalten.

Es fragt sich nun, was denn dieses locker gebundene Stickoxyd ist. In erster Linie sollte man an physikalische

Kräfte denken, welche diese lockere Bindung verursachen. Nun sind aber die mit Stickoxyd behandelten Präparate an der Luft relativ gut, an trockener Luft sogar sehr gut haltbar, und obwohl chemisch unverändertes Stickoxyd an der Luft sofort Sauerstoff aufnimmt und in braunes Stickstoffdioxyd übergeht, ist an den mit Stickoxyd behandelten Diastasepräparaten, wenn sie aus der Kohlensäureatmosphäre an die Luft gebracht werden, nicht die geringste Veränderung, weder eine Verfärbung, noch die Entwicklung brauner Dämpfe wahrzunehmen. Man wird also damit rechnen müssen, daß auch dieses locker gebundene Stickoxyd chemisch gebunden ist, und daß alles Stickoxyd, welches etwa adsorbiert gewesen war, schon im Kohlensäurestrom beseitigt worden ist.

Bestimmung der Acidität.

Unter Anwendung von Phenolphthalein als Indikator wurden folgende Resultate erhalten. Die in den Tabellen angeführten Auspumpversuche sind die Auspumpversuche II, III, V und VI. In den Auspumpversuchen ist als Stickoxydgehalt die Menge des fester gebundenen Stickoxyds verstanden.

Bezeichnung des Diastasepräparates	Verwendete Menge des Diastasepräparates g	Stickoxydgehalt g	Normalflüssigkeit verbraucht	
			zur Neutralisation ccm	zur Formoltitrierung ccm
III	0,5096	0,0136	0,315	0,078
III	0,4965	0,0156	0,314	0,078
Gereinigt IV	0,4971	0,0241	0,602	0,099
IV	0,5013	0,0497	0,988	0,076

Auspumpversuche.

III	0,5700	0,0164	0,283	0,094
III	0,5281	0,0104	0,242	0,094
Gereinigt IV	0,5215	0,0316	0,625	0,115
IV	0,5266	0,0370	0,564	0,120

In prozentischer Berechnung.

Diastase- präparat	Stickoxyd- gehalt %	Acidität		Aciditäts- zunahme ccm
		des behandelten Präparates ccm	des ursprünglichen Präparates ccm	
III	2,67	61,8	23,6	38,2
III	3,14	63,2	23,6	39,6
Gereinigt IV	4,85	121,1	32,4	88,7
› IV	9,91	197,1	32,4	164,7
Auspumpversuche.				
III	2,88	49,7	23,6	26,1
III	1,97	45,8	23,6	22,2
Gereinigt IV	6,06	119,8	32,4	87,4
› IV	7,03	107,1	32,4	74,7

Durch die Behandlung mit Stickoxyd ist die Acidität aller Präparate gewachsen. Eine ziffernmäßige Relation zwischen dieser Aciditätszunahme und der Menge Stickoxyd, welche aufgenommen wurde, konnte nicht gefunden werden. Im großen und ganzen betrachtet erfuhren die Präparate, welche viel Stickoxyd aufgenommen hatten (Diastase gereinigt IV), auch eine beträchtliche Erhöhung der Acidität als jene, welche nur wenig Stickoxyd aufgenommen haben (Diastase III).

Formoltitrirung.

In prozentischer Berechnung.

Diastasepräparat	Formoltitrierbarer Stickstoff	
	bei mit Stickoxyd behandelten Präparaten %	bei ursprünglichen Präparaten %
III	0,21	0,20
III	0,22	0,20
Gereinigt IV	0,28	0,18
› IV	0,21	0,18
Auspumpversuche.		
III	0,23	0,20
III	0,25	0,20
Gereinigt IV	0,31	0,18
› IV	0,32	0,18

Bei den mit Stickoxyd behandelten Präparaten liefert demnach die Formoltitrierung keine wesentlich anderen Werte als bei den ursprünglichen Präparaten.

Bestimmung des Amidstickstoffs.

Bezeichnung des Diastasepräparates	Verwendete Menge des Diastasepräparates g	Stickoxydgehalt g	Stickstoff ccm	Temperatur °C.	Barometerstand mm
III.	0,4980	0,0133	3,4	20,6	736,0
III.	0,5033	0,0148	4,6	17,5	749,3
Gereinigt IV.	0,5078	0,0317	3,1	19,0	735,5
„ IV.	0,4883	0,0403	3,2	20,0	745,5

In prozentischer Berechnung.

Diastasepräparat	Stickoxydgehalt %	Amidstickstoff	
		mit Stickstoff behandeltes Präparat %	ursprüngliches Präparat %
III.	2,67	0,38	0,34
III.	2,94	0,52	0,34
Gereinigt IV.	6,24	0,34	0,43
„ IV.	8,25	0,37	0,43

Auch hier ergeben sich keine nennenswerten Differenzen zwischen den mit Stickoxyd behandelten Präparaten und den ursprünglichen Präparaten.

Nach den Resultaten der Formoltitrierung und der Bestimmung des Amidstickstoffs scheint das Stickoxyd weder hydrolytische Spaltungen, noch Anhydridbildungen hervorgerufen zu haben, wie dies ja von dem Stickoxyd, welches an sich weder sauren, noch basischen Charakter besitzt, nicht anders zu erwarten war. Immerhin darf ein solcher Schluß nur mit einiger Reserve gezogen werden, denn das Stickoxyd könnte

nachträglich an der Luft in Stickstoffdioxyd übergehen und beim Zusammenbringen mit Wasser teils als Salpetersäure hydrolytisch wirken, teils als salpetrige Säure Aminogruppen zerstören, Prozesse, welche für die Resultate der Formoltitrierung und der Bestimmung des Amidstickstoffs einander entgegenwirken. Wenn auch ein solches Verhalten nicht gerade wahrscheinlich ist, so muß doch daran gedacht werden.

Prüfung der Fermentwirkung.

Bei der Prüfung der Fermentwirkung tauchten Zweifel auf, ob die Lösung der mit Stickoxyd behandelten Diastasepräparate für die Verzuckerungsversuche zu neutralisieren sei oder nicht. Es wurden daher Versuche mit Neutralisation gegen Lackmus und solche ohne Neutralisation angestellt. Dieser Umstand war nicht gerade von hervorragender Bedeutung. Es zeigte sich, daß die Neutralisation die Wirksamkeit der Präparate um ein wenig steigerte. Ich greife wieder nur einige Versuche heraus.

I.

1 g Diastase II mit Stickoxyd behandelt, Lösung nicht neutralisiert.

Kontrolle: 1 g Diastase II.

Stärkelösung: 2 g lösliche Stärke: 500 ccm Wasser.

Dauer des Versuches	Kontrolle			Mit Stickoxyd behandeltes Präparat		
	Jod- lösung	Reduktion in mg Zucker	mg Zucker gebildet	Jod- lösung	Reduktion in mg Zucker	mg Zucker gebildet
Beginn	blau	13,1	0	blau	15,4	0
1/2 Stunde	0	19,5	6,4	0	22,4	7,0
1 „	0	20,6	7,5	0	24,5	9,1
1 1/2 Stunden	0	21,9	8,8	0	26,1	10,7
2 „	0	22,4	9,3	0	26,7	11,3
Reduziert Fehling		stark			stark	

II.

0,2 g Diastase gereinigt IV mit Stickoxyd behandelt, Lösung neutralisiert.

Kontrolle: 0,2 g Diastase gereinigt IV.

Stärkelösung: 2 g lösliche Stärke: 500 ccm Wasser.

Dauer des Versuches	Kontrolle			Mit Stickoxyd behandeltes Präparat		
	Jod- lösung	Reduktion in mg Zucker	mg Zucker gebildet	Jod- lösung	Reduktion in mg Zucker	mg Zucker gebildet
Beginn	blau	3,6	0	blau	2,7	0
1/2 Stunde	0	9,6	6,0	>	3,0	0,3
1 >	0	10,3	6,7	>	3,0	0,3
1 1/2 Stunden	0	10,3	6,7	>	3,9	1,2
2 >	0	10,6	7,0	>	4,9	2,2
Reduziert Fehling		stark			wenig	

III.

0,2 g Diastase gereinigt IV mit Stickoxyd behandelt, Lösung nicht neutralisiert.

Kontrolle: 0,2 g Diastase gereinigt IV.

Stärkelösung: 2 g lösliche Stärke: 500 ccm Wasser.

Dauer des Versuches	Kontrolle			Mit Stickoxyd behandeltes Präparat		
	Jod- lösung	Reduktion in mg Zucker	mg Zucker gebildet	Jod- lösung	Reduktion in mg Zucker	mg Zucker gebildet
Beginn	blau	4,2	0	blau	3,3	0
1/2 Stunde	0	9,7	5,5	>	3,1	0
1 >	0	10,2	6,0	>	3,8	0,5
1 1/2 Stunden	0	10,5	6,3	>	3,8	0,5
2 >	0	10,4	6,2	>	3,8	0,5
Reduziert Fehling		stark			nicht	

An diese Beispiele schließe ich noch zwei Versuche an, welche mit den ausgepumpten Präparaten von den Auspumpversuchen I und IV angestellt sind.

Auspumpversuch I.

0,9983 g Diastase hatten aufgenommen 0,0300 g = 3,01% Stickoxyd und nach dem Auspumpen noch behalten 0,0259 g = 2,06% Stickoxyd. Die Lösung wurde nicht neutralisiert.

Kontrolle: 1 g Diastase III.

Stärkelösung: 2 g lösliche Stärke: 500 ccm Wasser.

Dauer des Versuches	Kontrolle			Mit Stickoxyd behandeltes Präparat		
	Jod- lösung	Reduktion in mg Zucker	mg Zucker gebildet	Jod- lösung	Reduktion in mg Zucker	mg Zucker gebildet
Beginn	blau	16,9	0	blau	18,0	0
1/2 Stunde	0	24,5	7,6	0	25,2	7,2
1 >	0	24,6	7,7	0	26,6	8,6
1 1/2 Stunden	0	25,0	8,1	0	26,5	8,5
2 >	0	25,3	8,4	0	27,0	9,0
Reduziert Fehling	sehr stark			sehr stark		

Auspumpversuch IV.

0,2074 g Diastase gereinigt IV hatten aufgenommen 0,0235 g = 11,33% Stickoxyd und nach dem Auspumpen noch behalten 0,0182 g = 8,78% Stickoxyd. Die Lösung wurde nicht neutralisiert.

Kontrolle: 0,2 g Diastase gereinigt IV.

Stärkelösung: 2 g lösliche Stärke: 500 ccm Wasser.

Dauer des Versuches	Kontrolle			Mit Stickoxyd behandeltes Präparat		
	Jod- lösung	Reduktion in mg Zucker	mg Zucker gebildet	Jod- lösung	Reduktion in mg Zucker	mg Zucker gebildet
Beginn	blau	3,9	0	blau	3,1	0
1/2 Stunde	0	7,0	3,1	>	3,6	0,5
1 >	0	7,6	3,7	>	3,7	0,6
1 1/2 Stunden	0	6,9	3,0	>	3,6	0,5
2 >	0	7,1	3,2	>	3,5	0,4
Reduziert Fehling	mäßig			nicht		

Das milchzuckerhaltige Präparat (Diastase III) erfährt durch die Behandlung mit Stickoxyd in seiner Wirksamkeit keinerlei Beeinträchtigung, das milchzuckerfreie Präparat (Dia-

stase gereinigt IV) hingegen wird durch diese Behandlung in seiner Wirksamkeit arg geschädigt. Die Auspumpversuche geben kein wesentlich anderes Resultat. Hält man dieses merkwürdige Verhalten zusammen mit der Tatsache, daß das milchzuckerfreie Präparat (Diastase gereinigt IV) beträchtliche Mengen von Stickoxyd aufnehmen kann, während das milchzuckerhaltige Präparat (Diastase III) nur wenig Stickoxyd aufnimmt, so ist der Schluß recht verlockend, daß der Milchzucker die Diastase vor der schädigenden Einwirkung des Stickoxyds schützt, indem er mit einer für die Fermentwirkung notwendigen, in wässriger Lösung leicht trennbaren Atomgruppe verbunden ist; in dem milchzuckerfreien Präparate würde hingegen dieser Schutz fehlen und die für die Fermentwirkung notwendige Atomgruppe wäre der Verbindung mit Stickoxyd unbesichert preisgegeben.

Ich will aber alle weiteren Schlußfolgerungen vermeiden, bis ich einige Kenntnisse darüber erlangt habe, welche Atomgruppen sich mit Stickoxyd verbinden können.

In der Meinung, daß bei der Einwirkung von Stickoxyd auf gewisse Atomgruppen möglicherweise Nitrosogruppen entstehen könnten, indem das Stickoxyd als Radikal—NO sich mit diesen Atomgruppen verbindet, habe ich mit Diastasepräparaten, welche mit Stickoxyd behandelt worden waren, einige den Nitrosoverbindungen zukommende Reaktionen angestellt.

a) 0,6143 g Diastase III nahm auf 0,0194 g = 3,16% Stickoxyd.

b) 0,4643 g Diastase gereinigt IV nahm auf 0,0444 g = 9,56% Stickoxyd.

Proben dieser beiden Präparate wurden nebeneinander den folgenden Reaktionen unterzogen:

1. Eine Probe jedes Präparates wurde in Wasser gelöst und die Lösung zu einer Auflösung von Jodkalium und Stärkekleister zugesetzt: die Flüssigkeit färbte sich sofort dunkelblau.

2. Die filtrierte wässrige Lösung jedes Präparates wurde mit klarem Schwefelwasserstoffwasser versetzt: die Flüssigkeit trübte sich sofort milchig.

3. Die Lösung der Diastase III färbte sich beim Erwärmen mit salzsaurem Anilin rötlichgelb, die Lösung der Diastase gereinigt IV färbte sich bei derselben Behandlung deutlich rotgelb und lieferte beim Schütteln einen rosa gefärbten Schaum.

4. Proben beider Präparate in eine Auflösung von Diphenylamin in konzentrierter Schwefelsäure eingetragen färbten diese intensiv blau.

5. Proben beider Präparate wurden in Alkohol aufgeschwemmt, mit einer alkoholischen Lösung von α -Naphthol und einer wässrigen Lösung von schwefelsaurem Hydroxylamin und darauf tropfenweise mit einer sehr verdünnten Sodalösung versetzt. Die Flüssigkeit selbst verfärbte sich dabei nicht, dagegen nahmen die ungelösten Partikelchen zuerst eine grünliche, dann rötliche Färbung. Mit der Diastase gereinigt IV wurde außerdem noch dieselbe Reaktion in wässriger Lösung angestellt: die Flüssigkeit färbte sich nur grünlich, hatte aber am nächsten Tage einen roten Farbstoff abgeschieden.

Mehr Aufschlüsse erwarte ich von Versuchen über die Einwirkung von Stickoxyd auf Stoffe von bekannter Konstitution. Diese Versuche sind bereits begonnen worden.