

Über aus Proteinstoffen bei tiefgreifender Spaltung mit Salpetersäure erhaltene Verbindungen.

V. Mitteilung.

Weitere Untersuchung über Oxalsäurebildung aus Proteinstoffen und Aminosäuren.

Von

Carl Th. Mörner.

(Der Redaktion zugegangen am 8. Septbr. 1916.)

Inhaltsverzeichnis.

	Seite
1. Ergänzung bezüglich der systematischen Prüfung einzelner Proteinstoffbausteine	98
2. Welches ist die Ursache des von dem der Proteinstoffe im allgemeinen abweichenden Verhaltens des Glutins gegen konzentrierte Salpetersäure?	98
3. Nachprüfung der Angabe Ssadicows über den modifizierenden Einfluß von Calcium- (bezw. Magnesium-) Salz auf die Oxalsäurebildung aus Glutin	104
4. Das Verhalten von Spongin gegen konzentrierte Salpetersäure	112
5. Versuche über das Verhalten einiger bei Wasserbadwärme oxalsäure-negativer Stoffe gegen konzentrierte Salpetersäure bei höherer Temperatur	113

Einleitend sei bemerkt, daß — gleichwie bei den in einer früheren Mitteilung¹⁾ beschriebenen Versuchen über Oxalsäurebildung bei Einwirkung von Salpetersäure — bei sämtlichen nachstehend in den Abteilungen 1—4 angeführten Versuchen keine höhere Wärme als die auf dem *Wasserbad* erhältliche zur Anwendung gekommen ist. Wo nicht anderes besonders angegeben wird, ist, bei den quantitativen Versuchen, 0,5 g Material in 50 ccm haltendem (mit Uhrglas bedecktem) Erlenmeyerkolben mit 5 ccm konzentrierter Salpetersäure (ca.

¹⁾ II. Mitteilung, Diese Zeitschr., Bd. 95 (1915), S. 263—309.

60%ig) zuerst 24 Stunden in Zimmerwärme, dann 4 Stunden auf Wasserbad behandelt worden, letzteres so eingestellt, daß die Temperatur des Kolbeninhalts sich auf ca. 90° C. gehalten hat. Die Oxalsäurebestimmungen sind auf früher angegebene Weise¹⁾ ausgeführt worden; die Zahlen geben die Menge Oxalsäure (wasserfrei) an, ausgedrückt in Prozent des behandelten Materials.

1. Ergänzung bezüglich der systematischen Prüfung einzelner Proteinstoffbausteine.

Die fragliche Serie²⁾ umfaßte — nach Cohnheims Handbuch von 1911 — 17 solche Stoffe, von denen jedoch das Isoleucin nicht zur Untersuchung kam. Eine solche ist indessen nun ausgeführt worden. Das Material wurde aus Rohleucin (aus trypsindigiertem Fibrin gewonnen) mittels der Kupfer-Methylalkoholmethode und sorgfältiger Umkrystallisierung dargestellt.

Zwei Versuche wurden angestellt:

1. Mit konzentrierter Salpetersäure (60%ig).

Oxalsäure: 0.

2. Mit «Rauchsäure V».³⁾

Oxalsäure leicht nachweisbar, ihre Menge jedoch unbedeutend, nur 2% des angewandten Isoleucins entsprechend.

Im ganzen verhält sich also diese Aminosäure in der fraglichen Hinsicht ebenso wie gewöhnliches Leucin.

2. Welches ist die Ursache des von dem der Proteinstoffe im allgemeinen abweichenden Verhaltens des Glutins gegen konzentrierte Salpetersäure.

Eine Erklärung dieses seit lange bekannten Verhaltens ist bisher nicht geliefert worden. Auf den Beobachter wirkt dasselbe nahezu rätselhaft, und es führt leicht zu der aprioristischen Vorstellung, daß das Glutininmolekül, dank einer Art

¹⁾ a. a. O., S. 272.

²⁾ a. a. O., S. 268—278.

³⁾ a. a. O., S. 275.

weit festerer Bindungsweise zwischen den einzelnen Bausteinen oder Bausteincomplexen, in seiner Gesamtheit einen besonderen Grad von «Resistenz» gegen die Einwirkung des fraglichen Reagens besäße. In dieser Richtung haben sich auch, noch bis vor kurzem, des Verfassers Gedanken bewegt.¹⁾ Indessen hat das Resultat der systematischen Untersuchung des Verhaltens der verschiedenen Proteinstoffbausteine gegen Salpetersäure, über die früher berichtet worden²⁾, den Weg zu einer neuen Deutung der fraglichen Erscheinung gewiesen, ein Weg, der nun weiter verfolgt worden ist und zu positivem Ergebnis geführt hat.

Die Untersuchungen sind an Glutinformaterial ausgeführt worden, das von verschiedenem Ursprung und aus verschiedenen Zeiten herrührte — dies, um zu vermeiden, daß eine etwa vorhandene abweichende Beschaffenheit eines einzelnen Präparats Anlaß zu irreführenden Resultaten bezw. Schlüssen geben könnte — nämlich:

«Glutin Nr. 1». Gelatine («Silberdruck»), eingekauft in Upsala in den 1890er Jahren; nicht besonders gereinigt; Ca-Gehalt: 1,44 %.

«Glutin Nr. 2». Gelatine («Golddruck»), bezogen von Kahlbaum, Berlin, 1914; nicht besonders gereinigt; Ca-Gehalt: 0,40 %.

«Glutin Nr. 3». Gelatine («Golddruck»), bezogen von Merck, Darmstadt, in den 1890er Jahren; sorgfältiger Reinigung unterzogen; Ca-Gehalt: 0,02 %.

«Glutin Nr. 4». Dieselbe Einkaufsware wie Nr. 2, aber sorgfältig gereinigt; Ca-Gehalt: weniger als 0,01 %.³⁾

Zunächst wurde festgestellt, daß die «Resistenz» des Glutins bei Salpetersäurebehandlung nur *scheinbar* ist, und daß also die Abwesenheit einer sichtbaren «Reaktion» (Aufgehen der Flüssigkeit unter Auftreten nitroser Gase) und von Oxalsäurekrystallen in der konzentrierten Flüssigkeit nicht mit Fug dahin gedeutet werden darf, daß das Glutinformolekül als

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. 93 (1914), S. 179. «Erst bei Zusatz von konzentriertem Königswasser ließ, im vorliegenden Falle, der Widerstand des Glutinformoleküls endlich nach.»

²⁾ Mitteilung II, S. 268—278.

³⁾ Der Vorrat dieses Präparats war nicht hinreichend, um bei sämtlichen Versuchsserien zur Verwendung zu kommen.

solches intakt geblieben wäre. Im Gegenteil zeigte es sich, daß die salpetersäuresaure Flüssigkeit, nach Neutralisierung, weder Biuretreaktion noch Fällung mit Gerbsäure gab (auf weit gegangene hydrolytische Spaltung deutend). Alle 4 Glutinpräparate verhielten sich in dieser Hinsicht gleichartig, ja, auch bei Anwendung von nur 25%iger Salpetersäure war das Resultat das gleiche.

Nachdem eine weitere Versuchsserie nur mit konz. Salpetersäure als Agens angestellt worden war, zwecks genauer Prüfung der erhaltenen 4 Reaktionsflüssigkeiten auf Oxalsäure — eine Prüfung, die praktisch genommen negativ ausfiel ¹⁾ — wurden Versuche ²⁾ teils mit *extra stickstofftetroxydreicher Rauchsäure* (Serie a), teils mit *konz. Salpetersäure und außerdem Zusatz von gewissen Aminosäuren* in verhältnismäßig geringer Menge (Serie b—g) ausgeführt.

Serie a.

Die verwendete «Rauchsäure», ³⁾ 10 ccm in jeder Probe, wirkte erst 24 Stunden lang bei gewöhnlicher Temperatur, dann 2 Stunden lang bei 80° ein.

	Oxalsäure
Glutin Nr. 1	16%
„ „ 2	21%
„ „ 3	18%
„ „ 4	19%
<hr/>	
Im Durchschnitt:	18%.

Die in Serie b—g angewandte Glutinnmenge war 0,45 g; die übrigen 0,05 g bestanden aus einer gewissen Aminosäure bzw. einem Gemisch von Aminosäuren (unmittelbar vor der Erwärmung auf Wasserbad hinzugesetzt). ⁴⁾

¹⁾ Die kleinen Mengen von Oxalsäure (wahrscheinlich von Serin herrührend), die bei sorgfältigem Arbeiten nachgewiesen werden konnten, machten in der Regel einige wenige Zehntel Prozente aus und übersteigen niemals 1%.

²⁾ Betreffs der allgemeinen Anordnung siehe oben S. 97!

³⁾ «Rauchsäure V», siehe Mitteilung II, S. 275.

⁴⁾ Die Gesamtmenge organischen Materials war also in jedem Versuch die gewöhnliche, 0,5 g.

Serie b.

Zusatz von Cystin (0,05 g).

	Oxalsäure ¹⁾
Glutin Nr. 1	45 %
„ „ 2	46 %
„ „ 3	39 %
„ „ 4	44 %
Im Durchschnitt:	43 %.

Serie c.

Zusatz von Tyrosin (0,05 g).

	Oxalsäure
Glutin Nr. 1	45 } 45 %
„ „ 2	43 } 44 %
„ „ 3	45 %
„ „ 4	44 %
Im Durchschnitt:	44 %.

Serie d.

Zusatz von Tryptophan (0,05 g).

	Oxalsäure
Glutin Nr. 1	43 } 46 %
„ „ 2	44 } 44 %
„ „ 3	39 } 42 %
„ „ 4	43 } 41 %
Im Durchschnitt:	44 %.

Serie e.

Zusatz von Tyrosin + Cystin (je 0,025 g).

	Oxalsäure
Glutin Nr. 1	47 %
„ „ 2	45 %
„ „ 3	40 %
„ „ 4	—
Im Durchschnitt:	44 %.

¹⁾ Die Zahlen für Oxalsäure geben, wie eingangs der Arbeit erwähnt, die Prozente des behandelten Materials an (= in jedem Falle 0,5 g organische Substanz).

Serie f.

Zusatz von Tyrosin + Tryptophan (je 0,025 g).

	Oxalsäure
Glutin Nr. 1	46 %
„ „ 2	45 %
„ „ 3	42 } 43 %
„ „ 4	45 }
Im Durchschnitt:	45 %.

Serie g.

Zusatz von Serin (Anhydrid), 0,05 g.

	Oxalsäure ¹⁾
Glutin Nr. 1	1 %
„ „ 2	—
„ „ 3	2 %
„ „ 4	—

Zur Ergänzung der Serien b—g wurden *Kontrollversuche* mit der bei diesen angewandten Mengen (0,05 g) von Aminosäure oder Aminosäurengemisch allein (ohne Glutinzusatz) ausgeführt. Es ergab sich, daß die bei den Kontrollversuchen erhaltenen Oxalsäuremengen höchstens 2%, auf 0,5 g berechnet, also vollkommen zu vernachlässigende Quantitäten im Vergleich mit den bei den Hauptversuchen mit Glutin gefundenen, darstellten.²⁾

Die Versuchsserien b—f zeigen aufs deutlichste, daß der Zusatz einer verhältnismäßig geringen Menge (insgesamt $\frac{1}{10}$ in der Mischung) Cystin, Tyrosin oder Tryptophan, je für sich oder zwei zusammen, zu Glutin bewirkt, daß das Glutin bei Behandlung mit konzentrierter Salpetersäure sich auf ganz dieselbe Weise wie Proteinstoffe im allgemeinen verhält: lebhafte «Reaktion» macht sich bemerkbar, und die Oxalsäurebildung nimmt ihren gewohnten Verlauf (im Durch-

¹⁾ Die erhaltene Menge nicht größer, als daß sie dem Serin allein zugeschrieben werden kann. Während der Erwärmung keine wahrnehmbare «Reaktion»!

²⁾ Gleichgültig ob die Aminosäurequantität mit 5 ccm oder 0,5 ccm konzentrierter Salpetersäure, d. h. mit derselben absoluten (= 5 ccm) oder mit derselben relativen (= 10 ccm Säure : 1 g Material) Menge wie in den Hauptversuchen, behandelt wurde.

schnitt aus den Zahlen sämtlicher Versuche wurde 44% Oxalsäure erhalten).

Erinnern wir uns ferner, daß, dem bereits Bekannten gemäß, das Molekül des Glutins der drei fraglichen Atomkomplexe entbehrt, so scheint die Schlußfolgerung unabweislich, daß eben in diesem Umstande die Erklärung für die Ausnahmestellung des Glutins im Verhältnis zu konzentrierter Salpetersäure liegt. Seine relative Indifferenz kann sofort aufgehoben werden, sofern nur der eine oder andere der mangelnden Bestandteile hinzugefügt wird!

Was den Mechanismus betrifft, durch welchen die genannten Aminosäuren ihre Wirkung ausüben, so erhellt derselbe aus Versuchsserie a. Die Zufuhr von, wie es hier geschieht, niederen Stickstoffoxyden, hauptsächlich Stickstofftetroxyd, erweist sich als genügend, um Glutin zur «Reaktion» bzw. Oxalsäurebildung zu bringen. Nun sind jedoch sämtliche drei obengenannten Aminosäuren, wie früher nachgewiesen,¹⁾ mit Leichtigkeit direkt durch konzentrierte Salpetersäure oxydierbar,²⁾ bei welcher Oxydation niedere Stickstoffoxyde entstehen, die ihrerseits das Glutin angreifen (wobei neue Mengen solcher Oxyde gebildet werden usw., die sukzessiv zu lebhafter «Reaktion» und damit reichlicher Oxalsäurebildung führen).

Man braucht demnach im fraglichen Falle zu keiner vagen Supposition über die Einwirkung von Cystin usw. als «Katalysator» zu greifen, sondern kann den Verlauf des Prozesses direkt aufzeigen.

Obwohl somit wohl gesagt werden kann, daß die aufgestellte Frage die erforderliche Antwort erhalten hat, so schien es von Interesse zu sein, die Untersuchung weiter zu verfolgen und festzustellen, wie sich ein an sich selbst mit konzentrierter Salpetersäure reagierender Pro-

¹⁾ Mitteilung II, S. 273 und 278.

²⁾ Auch Serin ist direkt oxydierbar, aber die Reaktion verläuft bedeutend träger, weshalb die zur Angreifung z. B. von Glutin erforderliche Konzentration niederer Stickstoffoxyde in dem Reaktionsgemisch nicht erreicht wird (siehe Serie g oben).

teinstoff nach Entfernung der drei Aminosäuren (Cystin, Tyrosin, Tryptophan), event. bei danach geschehender erneuter Zufuhr einer solchen Aminosäure, verhält.

Als Material wurde hierbei Fibrin gewählt.

1. *Direkt* geprüft (0,5 g aschefreie Trockensubstanz):

Oxalsäure:

28 }
30 } 29.

2. Durch Trypsindigestion,¹⁾ Ausfällung des meisten des Tyrosins durch Konzentrierung; wiederholte Merkurisulfatbehandlung nach für die Tryptophandarstellung bekanntem Verfahren — wodurch Reste von *Tyrosin*, wie auch *Tryptophan* und *Cystin* so gut wie vollständig *entfernt werden* —, Entfernung von Quecksilber mittels Schwefelwasserstoffs und von Schwefelsäure mittels Baryumhydroxyds, Konzentrierung zu Sirup gewonnenes Material²⁾ (0,5 g aschefreie Trockensubstanz) wurde mit konzentrierter Salpetersäure wie gewöhnlich geprüft.

Oxalsäure:

0 }
0 } 0 %.

Zu weiterer Gewißheit wurden — ein wahres experimentum crucis — Versuche mit *Hinzufügung* von aktiver Aminosäure (insgesamt 0,05 g auf 0,45 g aschefreie Trockensubstanz) zu dem inerten Material angestellt. Das Resultat war:

Mit Tryptophan (0,05 g) 25 %

„ „ + Tyrosin (je 0,025 g) 26 %.

3. Nachprüfung der Angabe Ssodikows über den modifizierenden Einfluß von Calcium- (bezw. Magnesium-) Salz auf die Oxalsäurebildung aus Glutin.

In einem Aufsatz: «Über die Oxalsäurebildung aus den Kollainen»³⁾ hat Ssodikow über einige Versuche betreffend

¹⁾ Besondere Kontrollversuche zeigten, daß es für die Größe der Oxalsäurebildung gleichgültig war, ob das Fibrin in nativer Form oder nach der Einwirkung energischer Trypsindigestion angewandt wurde.

²⁾ Eine größere Portion hiervon, mit konzentrierter Salpetersäure + Amylum behandelt, ergab p-Nitrobenzoesäure (aber nicht Terephthalsäure).

³⁾ Biochem. Zeitschr., Bd. 21 (1909), S. 35—45.

Glutin bei Ab- und Anwesenheit von Calciumsalz berichtet und glaubt, einem solchen Zusatz das Vermögen zuschreiben zu können, Oxalsäurebildung aus Glutin bei Salpetersäureeinwirkung hervorzurufen. Bevor ich auf eine nähere Prüfung der Arbeit Ssadi-kows in dieser Beziehung eingehe, erachte ich es für wichtig, eine Eigenschaft der Oxalsäure zu erwähnen und durch eigene Versuche weiter zu beleuchten, die offenbar Ssadi-kow unbekannt gewesen ist, und die auch sonst allgemein übersehen zu sein scheint, nämlich die Sublimierbarkeit dieser Säure bei Temperaturen unter 100°C ., d. h. schon bei Wasserbadwärme, wodurch unerhörte Verluste verursacht werden können, falls man, bei quantitativen Versuchen, unkontrollierte Abdampfung zur Trockne auf Wasserbad stattfinden läßt (eine Methode, deren sich Ssadi-kow durchgehends bedient zu haben scheint).

Die genannte Eigenschaft der Oxalsäure ist zuvor von Siegfried konstatiert worden, der in «Notiz über die Oxydation des Phenols mittels Nitrobenzol»¹⁾ bemerkt: «Zum Schluß möchte ich die Beobachtung hinzufügen, daß Oxalsäure bereits einige Grade unter 100° zu sublimieren beginnt, was im Gegensatz zu den übrigens sehr verschiedenen Angaben der Lehrbücher steht». Noch 30 Jahre danach kann man jedoch das eine moderne Lehrbuch oder Handbuch nach dem anderen durchgehen, ohne diesen Umstand erwähnt zu finden,²⁾ ja, in der Regel findet man Angaben, die augenscheinlich in entschiedenem Gegensatz dazu stehen, so z. B. folgende: «sublimiert bei $150\text{--}160^{\circ}$ unzersetzt» (Abderhaldens Biochem. Handlexicon, 1911), «Die krystallisierte Oxalsäure schmilzt bei etwa 100° in ihrem Krystallwasser, bei höherer Temperatur sublimiert ein Teil... Wird die entwässerte Oxalsäure vorsichtig auf $150\text{--}160^{\circ}$ erhitzt, so sublimiert sie» (E. Schmidts Lehrb. d. pharm. Chem., 1910). Ssadi-kow selbst sagt, daß die fragliche Säure «beim Erhitzen über 110° sich sublimiert». Da Siegfrieds Angabe nichts über Größe der nachgewiesenen Sublimierbarkeit aussagt, sind vervollständigende Versuche hierüber, gleichwie über einige andere, durch Ssadi-kows Arbeit veranlaßte Fragen ausgeführt worden.

Bei den verschiedenen Abdampfungsversuchen wurden³⁾ Berliner Porzellanschalen ($13\frac{1}{2}$ cm im Durchmesser), auf Wasserbad (mit Öffnung von 9 cm Durchmesser) plaziert, angewandt. In jedem Falle wurde,

¹⁾ Journ. f. prakt. Chem., Bd. 139 (N. F. 31), 1885, S. 543.

²⁾ Beilsteins Handb. (1893) ist das einzige Werk, in dem Verf. Siegfrieds Beobachtung angeführt gefunden hat.

³⁾ Sofern nicht anderes ausdrücklich angegeben wird.

mittels Titrierung mit $\frac{n}{10}$ -Kaliumpermanganatlösung, die zurückgebliebene Menge Oxalsäure bestimmt, wonach auf Prozente der ursprünglichen Menge umgerechnet wurde.

Versuch 1. Krystallisierte Oxalsäure (0,175 g, entsprechend 0,125 g wasserfreier Säure) ohne jeden Zusatz. Auf Wasserbad 2 Stunden.

a) In Form von ganzen Krystallen 87%

b) In pulverisierter Gestalt 73%.

Demnach wird bereits bei dieser einfachen Versuchsanordnung ein bedeutender Oxalsäureverlust konstatiert.

Versuch 2. Krystallisierte Oxalsäure (entsprechend 0,125 g wasserfreier Säure) + 50 ccm Wasser.

	A. Ohne Zusatz von Calcium- nitrat %	B. Mit Zusatz von 0,5 g Cal- ciumnitrat ¹⁾ vor der Ab- dampfung %
a) Abdampfung auf ca. 5 ccm, wobei sich eine ringförmige Kruste von fester Substanz bildete ($\frac{3}{4}$ Std.)	83	100
b) Abdampfung zur Trockne, aber keine weitere Erhitzung (ca. 1 Std.)	66	100
c) Wie bei b), aber weitere 1 Std. auf Wasserbad. Der Rückstand bildet (in A) eine lockere Masse von feinen, durch Sublimierung neugebildeten Krystallnadeln . . .	32	100
d) Wie bei b), aber weitere 2 Std. auf Wasserbad. Der unbedeutende Rückstand (in A) von demselben Aussehen wie in c) . . .	6	100

Aus dem Versuch geht hervor, daß Oxalsäureverlust bereits vor Abdampfung zu vollständiger Trockne eintreten kann (man beachte die Krustenbildung!), und daß derselbe bei fortgesetzter Erhitzung auf Wasserbad rasch zunimmt,²⁾ daß dagegen Anwesenheit von Ca-Salz im Überschuß gegen Verlust vollständig schützt (durch Überführung der Oxalsäure in bei dem fraglichen Wärmegrade stabiles, nicht flüchtiges Ca-Salz).

¹⁾ Wasserfreies Salz.

²⁾ Der Anlaß für den verhältnismäßig weit größeren Oxalsäureverlust bei diesem Versuch (Vers. 2, A) als in Vers. 1 ist offenbar der, daß der Abdampfungsrückstand intimer an der Gefäßwand adhärirt, wodurch die Wärme besser zur Oxalsäuremasse hin fortgeleitet wird; wozu des weiteren kommt, daß diese über eine größere Fläche des erwärmten Gefäßes ausgebreitet ist.

Um festzustellen, ob der Oxalsäureverlust, bei Versuchen mit der Säure in wässriger Lösung, möglicherweise von einer Destruktion bereits bei bloßer Erwärmung einer solchen Lösung herrühren könnte, wurden folgende Versuche (Nr. 3—4) angestellt.

Versuch 3. 1. Kryst. Oxalsäure (entsprech. 0,125 g wasserfreier Säure) + 50 ccm Wasser. Die Mischung nicht in offener Schale, sondern in Erlenmeyerkolben (100 ccm); auf Wasserbad konzentriert auf ein Volumen von 5 ccm (a) bzw. 10 ccm (b), wobei keine Krustenbildung auftrat.

a) 100 %.

b) 100 %.

2. Der Versuch wurde wiederholt, mit dem Unterschied jedoch, daß das Konzentrieren durch volles Kochen über offener Flamme geschah.

a) 100 %.

b) 100 %.

Versuch 4. Kryst. Oxalsäure (entsprech. 0,125 g wasserfreier Säure) + 1 l Wasser in Erlenmeyerkolben von 1 1/2 l. Die Mischung wurde 4 Stunden lang in vollem Kochen erhalten (wobei verdampftes Wasser dann und wann ersetzt wurde); schließlich wurde die Konzentrierung so weit getrieben, daß das Volumen auf 1/4 l herabging.

99 %.

Die beiden letztangeführten Versuche zeigen deutlich, daß Oxalsäure bei bloßer Erwärmung mit Wasser sehr große Resistenz besitzt, und daß also dieser Faktor bei den oben in Vers. 2 erzielten Resultaten nicht mitspielt.

In der Absicht, ferner zu untersuchen, ob der in Vers. 1—2 beobachtete Oxalsäureverlust eine einfache Sublimierungserscheinung oder möglicherweise durch Zerfall der Säure kompliziert ist, wurde folgender Versuch ausgeführt.

Versuch 5. Kryst. Oxalsäure (2 g) + 1 ccm Wasser wurde in ein mit flachem Boden versehenes, dünnwandiges Glasgefäß eingebracht, das oben mit Zu- und Abflußröhre versehen, im übrigen aber geschlossen war. Nach Niedersenkung (zur Hälfte) in Wasserbad wurde kohlenstofffreie Luft durchgeleitet, die danach passierte:

a) ein kleines Kugelrohr mit Wasser, dann

b) eine Waschflasche mit Baryumhydroxydlösung, schließlich

c) eine Waschflasche mit Palladiumchlorürlösung.

Der Versuch dauerte 4 Stunden, während welcher keine Fällung in b) oder c) eintrat.¹⁾ In der oberen (kühleren) Partie des Versuchsgefäßes war reichliches Sublimat von wasserfreier Oxalsäure vorhanden, die teilweise zentimeterlange, feine Nadeln bildete. Die auf dem Boden des Gefäßes zurückgebliebene Oxalsäuremenge entsprach 45 % der ursprünglichen. Da also weder Kohlendioxyd noch Kohlenoxyd hat nach-

¹⁾ In a) wurde eine geringe Menge Oxalsäure angetroffen.

gewiesen werden können, scheint es klar, daß der Oxalsäureverlust bei den fraglichen Versuchen als eine unkomplizierte Sublimierungserscheinung aufzufassen ist.

Mit Rücksicht auf die von Ssadirow angewandte Methode (stets Abdampfung der salpetersäuresauren Reaktionsflüssigkeit zur Trockne) wurde schließlich folgender Versuch angestellt.

Versuch 6. Kryst. Oxalsäure (entsprech. 0,250 g wasserfreier Säure) + 50 ccm konz. Salpetersäure.

	A. Ohne Zusatz von Calcium- nitrat %	B. Mit Zusatz von 2 g Cal- ciumnitrat vor der Abdampfung %
a) Abdampfung auf ca. 10 ccm (keine Krusten- bildung)	90	91
b) Abdampfung zur Trockne, danach weitere 1 Stunde auf Wasserbad	32	79

Bei der Bewertung der Zahlen bei diesem Versuche hat man sich zunächst daran zu erinnern, daß, wie früher von mir nachgewiesen, bloße Erwärmung mit Salpetersäure zu fortlaufender Destruktion von Oxalsäure führt. In der Probe b, A summiert sich indessen der von diesem Faktor herrührende Oxalsäureverlust zu dem weit bedeutenderen, der von der Sublimierung herrührt.¹⁾

In der Probe b, B dagegen kann der letztgenannte Faktor sich deshalb nicht geltend machen, weil nach dem Weggang des Salpetersäureüberschusses die Oxalsäure als Calciumoxalat fixiert wird. Offenbar ist also, daß aus diesem Anlaß — auch bei Abdampfungsversuchen mit Salpetersäure (wie z. B. bei Proteinstoffoxydierungsversuchen) — die Gegenwart von Ca-Salz (z. B. -nitrat) gegen Oxalsäureverlust schützend wirken und demnach ceteris paribus die gefundene Oxalsäuremenge erhöhen

¹⁾ Im Lichte dieser Tatsachen ist leicht ersichtlich, wie aller Beweiskraft bar folgende Bemerkung von Ssadirow eigentlich ist: «Wie schnell freie Oxalsäure durch HNO_3 angegriffen wird, zeigt folgender Versuch: 1,3051 g wasserfreier Oxalsäure (entsprechend 0,8121 g CaO) hinterlassen nach 3 stündigem Erwärmen auf dem Wasserbade mit HNO_3 [dem Zusammenhange nach zu urteilen, sind 50 ccm konz. Säure gemeint] und Abdampfen einer 0,1040 g CaO entsprechenden Menge Oxalsäure, also nur etwa 12% von dem angewandten Gewicht». Von zwei zusammenwirkenden Faktoren ist nämlich der eine, unter leicht eintreffenden Umständen weit mächtigere außer Rechnung gelassen worden.

muß. In diesem Umstande allein — und nicht in einer von Ssadikow supponierten spezifischen Einwirkung auf die Bildungsgeschwindigkeit der Oxalsäure — scheint mir die plausible Erklärung für die Tatsache zu liegen, daß Ssadikow bei Behandlung von *Thioglutan* mit konzentrierter Salpetersäure + Calciumnitrat bis zu 40% Oxalsäure gefunden hat, «anstatt 4—12, wenn man ohne Kalkzusatz abdampft».

Was nun *Glutin* betrifft, so konstatiert S. zunächst, daß «man bei der Behandlung des Glutins mit HNO_3 von 1,40 spez. Gew. keine Oxalsäure bekommt». Die wässrige Lösung der bei Abdampfung erhaltenen Sirupe zeigte nämlich mit Calciumchlorid «nur unbedeutende Trübung». Soweit muß ich S. vollkommen recht geben (wenn man unter «keine Oxalsäure» doch nachweisbare Spuren davon versteht).

«Führt man aber die Oxydation in Gegenwart von Kalksalzen aus, so erhält man Oxalsäure» ist S.'s nächster Hauptsatz über das Glutin, den er durch Anführung von 9 quantitativen Versuchen zu stützen versucht. Von diesen müssen jedoch 8, in denen Oxalsäuremengen von 25—41% erhalten worden sind, als vollkommen unanwendbar für den Beweis der angeführten Behauptung ausgemerzt werden, da bei ihnen infolge Calciumchloridzusatzes Chlorwirkung sich hat geltend machen können, ein Faktor, von dem auch S. zugibt, daß er die Oxalsäurebildung «mächtig befördert», obwohl er, offenbar unter dem suggerierenden Einfluß einer vorgefaßten Meinung, in demselben Atemzuge erklärt: «Die Oxalsäurebildung ist also durch die Anwesenheit von Kalksalzen bedingt». Es bleibt somit nur der 9. Versuch übrig, in welchem, während 5 wiederholter Oxydationen, von denen die 4 letzten die abgedampften Filtrate (von der nächstvorhergehenden Calciumoxalatfällung her) betrafen, insgesamt 47% Oxalsäure erhalten wurde. Hierbei ist aber zu beachten, daß nur die *erste* Oxydation ohne Anwesenheit von Chlor¹⁾ ausgeführt wurde, und daß die dabei erhaltene Oxalsäuremenge nur 1,7% betrug! So schwach ist in Wirk-

¹⁾ Ca wurde hier in Form von -nitrat hinzugesetzt; im Zusammenhang mit den späteren Oxydationen wurde aber, zwecks Ausfällung der Oxalsäure, Calciumchlorid in steigender Menge eingeführt.

lichkeit der Beweis, den S. selbst für seine Hypothese betreffs Calciumsalz als Bedingung für Oxalsäurebildung aus Glutin beigebracht hat.

Zur weiteren Klarstellung der Frage habe ich einige eigene direkte Versuche angestellt. Jeder der nachstehend referierten 3 Versuche wurde an 3 verschiedenen Glutinpräparaten («Nr. 1—3»)¹⁾ ausgeführt. Die A-Proben ohne Zusatz von Calciumsalz; die B-Proben mit Zusatz (vor Beginn der Erwärmung) von Calciumnitrat (wasserfrei), in der doppelten Menge wie die des Glutins.

Versuch 1. 0,5 g Glutin + 5 ccm konzentrierter Salpetersäure; in Erlenmeyerkolben, 4 Std. auf Wasserbad. Reaktionsflüssigkeit, ohne vorhergehende Abdampfung, zur Oxalsäurebestimmung verwendet.

	Oxalsäure	
	A	B
Glutin Nr. 1	0,1 %	0,3 %
» » 2	0,4 %	0,7 %
» » 3	0,3 %	0,7 %.

Versuch 2. 1 g Glutin + 50 ccm konzentrierter Salpetersäure; in Porzellanschale Abdampfung auf Wasserbad auf ca. 10 ccm.

	Oxalsäure	
	A	B
Glutin Nr. 1	0 %	0 %
» » 2	0,4 %	0,5 %
» » 3	0 %	0 %.

Versuch 3. 1 g Glutin + 50 ccm konzentrierter Salpetersäure; in Porzellanschale Abdampfung auf Wasserbad zu Sirup. Das Verfahren 1 mal wiederholt.

	Oxalsäure	
	A	B
Glutin Nr. 1	0,8 %	0,8 %
» » 2	0,9 %	0,9 %
» » 3	0,6 %	0,9 %.

In keinem der oben beschriebenen Versuche trat eine wahrnehmbare «Reaktion» ein. Die erhaltenen Oxalsäurewerte

¹⁾ Siehe oben S. 99!

sind minimal, alle kleiner als 1%,¹⁾ unabhängig davon, ob das Glutin selbst mehr oder weniger Ca-haltig gewesen, oder ob weiteres Calciumsalz hinzugesetzt worden ist oder nicht. Sowohl mit Rücksicht auf die Schwäche der eigenen Beweisführung Ssadi kows als auf Grund des Ergebnisses meiner direkten Versuche muß ich demnach S.'s Angabe über den modifizierenden Einfluß von Calciumsalz auf die Oxalsäurebildung aus Glutin als unrichtig ansehen.

Ssadi kow will indessen seine Behauptung auch für *Magnesium*-Salze gelten lassen. Als Beweis hierfür wird ein einziger Versuch angeführt, in welchem (bei Zusatz von Magnesiumsulfat) aus Glutin der Angabe nach 18% Oxalsäure erhalten wurden. Dieser einzige Versuch steht im entschiedensten Gegensatz zu dem Resultat der von mir angestellten Versuche, die sämtliche 3 Glutinpräparate umfassen und vollkommen auf dieselbe Weise angeordnet worden sind wie die B-Proben in Versuch 1—3 oben, nur unter Austausch von Calciumnitrat gegen dieselbe Gewichtsmenge wasserfreien Magnesiumsulfats (in 8 Proben wurde 0, in der 9ten 0,1% Oxalsäure erhalten),²⁾ weshalb die Richtigkeit auch dieser Behauptung Ssadi kows aus guten Gründen bestritten werden muß.

Welche Fehlerquelle bei Ssadi kows Magnesiumsulfatversuchen mitgespielt hat, läßt sich aus der nur 2 Zeilen einnehmenden Beschreibung nicht herauslesen. Die einfachste und im übrigen wahrscheinlichste Erklärung für das der Angabe nach glänzende Resultat bezüglich der Oxalsäurebildung dürfte indessen darin zu suchen sein, daß aus Magnesiumsulfat und zwecks Ausfällung event. Oxalsäure hinzugesetztem Cal-

¹⁾ Man vergleiche hiermit die Oxalsäuremengen (ca. 45%), die unter anderen Umständen aus Glutin gebildet werden können (s. ob. S. 100—103).

²⁾ Daß in diesen Fällen nicht einmal die bei Versuchen mit Glutin allein oder bei den Ca-Salzversuchen in der Regel nachgewiesenen Oxalsäurespuren zum Vorschein gekommen sind, dürfte auf dem u. a. von Mineralwasseranalysen her bekannten Umstande beruhen, daß die Anwesenheit von Mg-Salz in relativer reichlicher Menge einer Ausfällung kleinerer Mengen Calciumoxalats entgegenwirkt.

ciumsalz herrührendes und infolge unzureichender Flüssigkeitsmenge ausgefälltes Calciumsulfat für Calciumoxalat genommen worden und nach Glühen als Calciumoxyd zur Wägung gekommen ist.¹⁾

4. Das Verhalten von Spongini gegen konzentrierte Salpetersäure.

Spongini bietet ein dem des Glutins, im ganzen genommen, analoges Verhalten dar: keine wahrnehmbare «Reaktion», nur schwache Oxalsäurebildung (in 2 Versuchen zu 4 bzw. 6% bestimmt). Bei kräftiger Rauchsäure stieg die Menge der Oxalsäure auf 14%. Bei Zusatz von in der fraglichen Hinsicht aktiver Aminosäure (insgesamt 0,05 g auf 0,45 g aschefreie Trockensubstanz) kräftige «Reaktion» und reichliche Oxalsäurebildung:

Mit Tyrosin (0,05 g) 41%

» » + Tryptophan (je 0,025 g) 43%.

Über die hydrolytischen Spaltungsprodukte des Spongins liegen Angaben von Abderhalden und Strauss²⁾ und von Kossel und Kutscher³⁾ vor. Die erstgenannten Autoren geben mit Bestimmtheit an, daß *Tyrosin fehlt*; ⁴⁾ über die An- oder Abwesenheit der anderen zwei, in diesem Zusammenhang uns interessierenden Aminosäuren (Cystin und Tryptophan) wird nichts direkt ausgesagt. Indessen wird diese Lücke bis zu einem gewissen Grade durch Angaben über das Verhalten des Spongins bezüglich gewisser Farbenreaktionen ausgefüllt, die von Strauß⁵⁾ geliefert worden sind:

¹⁾ S. hat konstant das Wägungsverfahren zur Bestimmung von Oxalsäure angewandt (bei titrimetrischer Methode wäre ein Irrtum der hier fraglichen Art ganz ausgeschlossen).

²⁾ Diese Zeitschr., Bd. 48 (1906), S. 49—53.

³⁾ Diese Zeitschr., Bd. 31 (1900—1901), S. 205.

⁴⁾ Damit in Übereinstimmung steht auch Strauß' (Studien ü. d. Albuminoide, Heidelberg 1904) Angabe über das Ausbleiben der Millon'schen Reaktion (dies auch von Verf. so gefunden).

⁵⁾ Von mir angestellte Nachprüfung hat das gleiche Resultat ergeben. Die Möglichkeit der Anwesenheit eines halogensubstituierten Tyrosin- evtl. Tryptophankomplexes ist jedoch damit nicht ausgeschlossen; für das Vorhandensein eines solchen spricht die von Posselt (Ann. d. Chemie u. Pharmacie, Bd. 45 [1843]), S. 192, Strauß und Verf., im Gegensatz zu

Adamiewicz' Reaktion } negativer Ausschlag (= *negat. auf Tryptophan*).
 Furfurolreaktion }
 Sulfhydrylreaktion, «positiv, jedoch nicht stark» (= *nur geringer Gehalt an Cystin*).

5. Versuche über das Verhalten einiger bei Wasserbadwärme oxalsäure-negativer Stoffe gegen konzentrierte Salpetersäure bei höherer Temperatur.

Das Material (1 g) + 50 ccm konz. Salpetersäure im Erlenmeyerkolben (von 100 ccm) nebst einem kleinen Stück Bimsstein wurde auf Sandbad zu vollem Kochen erhitzt (in gewissen Fällen wurde auch 2 g Calciumnitrat hinzugesetzt). Als das Volumen der Flüssigkeit auf ca. 10 ccm herabgegangen war, wurde das Kochen abgebrochen und, ohne vorhergehende Abdampfung, Oxalsäurebestimmung vorgenommen. Die Temperatur in der Reaktionsflüssigkeit hielt sich, nachdem Kochen eingetreten, die ganze Zeit auf ungefähr 120° C. Die Kochzeit betrug 1—1½ Stunden.

Glutin.

Nitröse Gase begannen sich nach ungefähr ¾ stündigem Kochen zu entwickeln. A = ohne, B = mit Zusatz von Calciumnitrat.

		Oxalsäure		
		A.	B.	
Glutin Nr. 1	8	} 6%	6	} 7%
	4		8	
, , 2	8	} 8%		} 7%
	9			
, , 3	9	} 9%		} 7%
	9			

Fibrindigestionsprodukt (befreit von Cystin, Tyrosin und Tryptophan).¹⁾

Nitröse Gase traten nach 1 stündigem Kochen auf.

Oxalsäure:

5 } 5 %
 5 }

Krukenbergs Angabe, gefundene, markierte Xanthoproteinsäurereaktion (Dibromtyrosin z. B. gibt meinem Befunde nach kräftigen Ausschlag bei letztgenannter Reaktion).

¹⁾ Siehe oben, S. 104.

Peptil (Leucylglycin).

Nitröse Gase nach $1\frac{1}{4}$ stündigem Kochen (erst $\frac{1}{4}$ Stunde vor Abbrechen des Kochens).

Oxalsäure:

5 ‰.

Aminosäuren.

Von bei Wasserbadwärme oxalsäure-negativen Aminosäuren zeigten sich folgende auch bei der nun angewandten Versuchsanordnung (mit oder ohne Calciumnitratzusatz) indifferent; keine Bildung von nitrösen Gasen, keine Oxalsäure nachweisbar:

Glykokoll, Alanin, Asparaginsäure und Glutaminsäure.

Augenfällig positives Resultat ergaben dagegen die zwei folgenden:

Leucin.

Nitröse Gase nach ca. 1 stündigem Kochen.

Oxalsäure:

5 ‰.

Valin.

Schon 3 Min. nach eingetretenem Kochen stürmischste Reaktion.

Oxalsäure:

4 ‰.

Auf der Grenze der indifferenten, rücksichtlich der geringen Oxalsäuremenge, steht Phenylalanin; nitröse Gase nach ca. $1\frac{1}{4}$ stündigem Kochen.¹⁾

Oxalsäure:

1 ‰.

Die angeführten Versuche zeigen also, daß gewisse Substanzen (u. a. Glutin), die bei Wasserbadwärme nicht (event. nur spurenweise) mit konz. Salpetersäure unter Oxalsäurebildung reagieren, dies kräftiger bei der höheren Temperatur (ca. 120°) tun können, die das Kochen mit sich bringt, andere dagegen sich auch im letztgenannten Falle indifferent

¹⁾ Bei der Abkühlung der Reaktionsmischung entstand ein Magma von p-Nitrobenzoesäurekrystallen.

verhalten. Die nachgewiesenen Oxalsäuremengen sind ja verhältnismäßig bescheiden, müssen aber, ja, können nicht anders betrachtet werden als ein relativ geringer Teil der tatsächlich gebildeten (aber wieder destruierten). Kochende konzentrierte Salpetersäure wirkt nämlich in hohem Grade destruiierend auf Oxalsäure; wiederholte Kontrollversuche, analog den Hauptversuchen, mit oder ohne Zusatz von Calciumnitrat angeordnet, haben ergeben, daß dabei Oxalsäuremengen von z. B. 0,250 g (wasserfreier Säure)¹⁾ restlos zerstört werden. Sicherlich ist dies der Anlaß, weshalb bei Versuchen mit Spongin — das schon nach $1\frac{1}{2}$ stündigem Kochen zur Entstehung nitröser Gase zu führen begann und bald danach lebhaftere «Reaktion» aufwies — der in der schließlichen Reaktionsmischung direkt nachgewiesene Oxalsäureprozentsatz:

A. ²⁾	B. ²⁾
6)	4)
5) 5	4) 4.

nicht größer gewesen ist, als der bei Versuchen in Wasserbadwärme, ohne Eintreten merkbarer «Reaktion», erhaltene (durchschnittlich 5%).

Auch bei den bei Siedetemperatur ausgeführten Oxydationsversuchen erweist sich anwesendes Calciumsalz als des Vermögens ermangelnd, die Oxalsäurebildung zu erhöhen.

¹⁾ Vor der Erwärmung hinzugesetzt; Kochzeit 1—1½ Stunden.

²⁾ A ohne, B mit Calciumnitrat.