

Über die Benzolderivate im Glutin und den Eiweißgehalt der Gelatine.

Von

E. Salkowski.

(Aus der chemischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität Berlin.)
(Der Redaktion zugegangen am 13. Dezember 1919.)

Im Anschluß an die gemeinsam mit meinem Bruder kürzlich gemachte Mitteilung „Über den Anteil der Benzolderivate am Eiweißmolekül“¹⁾ habe ich das aus früheren gemeinsam angestellten Versuchen über Leimfäulnis stammende Material etwas weiter untersucht und teile im folgenden die Ergebnisse mit, soweit sie sich auf die Benzolderivate beziehen.

Es sind im ganzen 5 Versuche mit je 400 g bester französischer Handelsgelatine (Golddruck) angestellt, später noch ein einzelner Versuch mit 400 g. Die Gelatine wurde jedesmal in 8 Liter Leitungswasser warm gelöst, mit 1 g KH_2PO_4 , 1 g $\text{MgSO}_4 + 7\text{H}_2\text{O}$ und 200–240 ccm kaltgesättigter Natriumcarbonatlösung versetzt. In einigen Fällen wurde, um die Fäulnis zu beschleunigen, noch ein Zusatz von Kaliumnatriumtartrat gemacht; das war zulässig, da es uns um die aliphatischen Fäulnisprodukte nicht zu tun war. Geimpft wurde in üblicher Weise mit faulender Fleischmaceration. Die Digestion geschah bei ca. 40° in einem leicht bedeckten großen Kolben und dauerte 7–9 Tage. Das Material wurde alsdann in bei der Eiweißfäulnis beschriebener Weise²⁾ verarbeitet, die Produkte in einem entsprechenden Stadium vereinigt, jedoch ist

¹⁾ Diese Zeitschr. Bd. 105, S. 242.

²⁾ Diese Zeitschr. Bd. 8, S. 417 und Bd. 19, S. 8 und 491.

von allen Produkten $\frac{1}{10}$ zu Vorversuchen abgenommen, so daß sich die Zahlenangaben im folgenden nicht auf 2000 g, sondern nur auf 1800 g Gelatine beziehen.

1. Indol.

Eine Indolgruppe kommt dem Leim der allgemeinen Meinung nach nicht zu¹⁾. Diese Ansicht stützt sich wohl hauptsächlich auf die Angabe von M. Nencki²⁾, der die Fäulnisprodukte von Eiweiß und Leim vergleichend untersucht und in den letzteren kein Indol gefunden hat. Freilich ist dagegen einzuwenden, daß damals die Reaktionen auf Indol noch wenig ausgebildet waren. Wir haben die Untersuchung darauf in 2 Versuchen, entsprechend 800 g Leim, ausgeführt. Das betreffende Destillat gab schwache Reaktion mit Salpetersäure und Kaliumnitrit. Der beim Verdunsten des Ätherauszugs bleibende Rückstand gab in wäßriger Lösung gleichfalls unzweifelhafte Indolreaktion. Auffallenderweise aber ergab sich Indol noch an einer andern Stelle, nämlich in der Lösung, welche die Oxysäuren aus 1800 g Leim enthalten sollte und diese tatsächlich auch enthielt. Die rohen Oxysäuren lösten sich in Wasser mit starker Trübung und die Lösung roch nach Indol. Sie wurde nochmals destilliert. Das Destillat gab starke Indolreaktion, nicht allein mit HNO_3 und KNO_2 , sondern namentlich auch mit p. Dimethylamidobenzoldehyd-Lösung bei Zusatz weniger Tropfen Salzsäure ohne Zusatz von Nitrit. Der Ätherauszug der noch übrig gebliebenen Lösung lieferte 0,012 g beim Verdunsten.

Als der Destillationsrückstand wochenlang im Kolben gestanden hatte, zeigten sich am Glase anhaftend harzig-ölige Tröpfchen, von denen die Flüssigkeit fast restlos abgegossen werden konnte³⁾. Sie lösten sich in Alkohol; die Lösung gab, mit einem angemessenen Volumen Wasser verdünnt, gleichfalls

¹⁾ Vgl. Cohnheim Chemie der Eiweißkörper, 3. Aufl., S. 245.

²⁾ M. Nencki, Über die Zersetzung der Gelatine und des Eiweißes. Festschrift, Bern 1876.

³⁾ Sie wurde, da sie noch etwas trüb war, noch filtriert.

Reaktion mit HNO_3 und KNO_2 . Ob es sich dabei um Indol handelte oder, was wahrscheinlicher ist, um verharzte Indol-essigsäure, muß dahingestellt bleiben, jedenfalls ist auch hier ein Indolderivat gefunden.

2. Phenolgruppe.

Das Fehlen der Tyrosingruppe wird allgemein als charakteristisch für den Leim angesehen, obwohl man bei vorsichtigem Verfahren auch mit reiner Handelsgelatine eine positive Reaktion mit Millonschem Reagens¹⁾ erhalten kann, die wohl schwerlich auf etwas anderes als auf die Tyrosingruppe bezogen werden kann. Daß es nicht möglich ist, unter den Pankreasverdauungsprodukten Tyrosin zu isolieren, spricht nicht unbedingt gegen einen geringen Gehalt der Gelatine an der Tyrosingruppe. In der Tat ergab sich bei Verarbeitung der Fäulnisprodukte von 1800 g Gelatine eine nicht ganz unbedeutende Quantität aromatischer Oxysäuren, von denen eine Probe schon in der Kälte beim Stehenlassen mit Millonschem Reagens eine Rotfärbung gab. Zur Bestimmung der Menge wurde die Lösung auf 100 ccm gebracht, 10 ccm unter Anwendung von Phenolphthalein als Indikator mit $\frac{1}{5}$ -Lauge titriert. Sie erforderten 5,05 $\frac{1}{5}$ -Lauge, also für die ganze Quantität 10,1 ccm $\frac{1}{1}$ -Lauge. Nimmt man an, daß ein Gemisch gleicher Mol. Oxyphenylpropionsäure und Oxyphenylessigsäure mit dem mittleren Mol.-Gewicht 159 vorliegt, so entspricht dies 1,606 Oxy-säure. Daß es sich wirklich um aromatische Oxysäuren handelt, wurde durch folgende Reaktion bestätigt:

1. Millonsche Reaktion äußerst intensiv;
2. Verhalten zu 3%iger Eisenchloridlösung: grauviolette Färbung, die sich schnell in ein schmutziges Graugrün umwandelt²⁾. Ich füge noch hinzu, daß auf Zusatz von Essigsäure zu dieser Reaktionsmischung eine orange

¹⁾ Mein Praktikum der physiolog. Chemie, 1. Aufl. (1893) S. 267. Ausführliche Literaturangaben über die Reaktion des Leims mit Millonschem Reagens bei C. Th. Mörner. Diese Zeitschr. Bd. 28, S. 485 (1899).

²⁾ Vgl. H. Salkowski, Ber. d. d. chem. Ges. Bd. 12, S. 1439 (1879).

gefärbte Lösung entstand. Ein Gemisch der beiden Oxy-säuren, von den früheren Eiweißfäulnisversuchen stam-mend, zeigte dasselbe Verhalten, während stark verdünnte Eisenchloridlösung sich auf Essigsäurezusatz nur gelb färbte.

3. Mit Bromwasser Trübung, dann Niederschlag.

Für die Berechnung der prozentigen Menge kommt einerseits der Wasser- und Aschegehalt der Gelatine in Betracht, ander-seits der Stickstoffgehalt des bei der Verarbeitung erhaltenen Alkoholniederschlages, der, auf Eiweiß umgerechnet, von der zum Versuch genommenen Quantität Gelatine in Abzug zu bringen ist.

Die angewendete Gelatine enthielt rund 83% organische Substanz¹⁾ = 1660 g. Der ungelöste Rückstand aus 2 Kilo Gelatine wog 136 g. Derselbe bestand zum größten Teil aus anorganischer Substanz (viel Eisenoxyd aus dem Destillier-gefäß stammend), enthielt nur 4,26% N²⁾ = 26,625 g Eiweiß-substanz. Das ergibt für die ganze Quantität 35,67 g N-Substanz. Es sind somit 1660 — 37,7 = 1624,3 g organische Trocken-substanz zersetzt. Da die Oxysäuren aus $\frac{9}{10}$ der ganzen Menge stammen = 1462 g, so ergibt sich die Quantität der aus aschefrei und wasserfrei gedachten Substanz entstandenen Oxysäuren = 0,11%. Der noch vorhandene Rest der Oxy-säuren wurde auf dem Wasserbad eingeeengt, die am nächsten Tage ausgeschiedenen Kristalle abgepreßt. Ihr Schmelzpunkt lag bei 120°. Für eine zur Kontrolle hergestellte Mischung gleicher Teile der beiden Säuren von früheren Versuchen wurde der Schmelzpunkt zu 125° gefunden. Es war nun noch zu untersuchen, ob vielleicht den Oxysäuren eine merk-liche Quantität Bernsteinsäure beigemischt sei, eine Frage, die bei den Oxysäuren aus Fibrin nicht hatte untersucht werden können, da das Material inzwischen durch einen un-glücklichen Zufall im Laufe der langen Zeit verloren gegangen

¹⁾ 0,9256 g verloren bei 110° 0,1398 g Wasser und gaben 0,0174 g Asche.

²⁾ 0,706 g erforderten bei der Kjeldahlbestimmung 4,3 ccm $\frac{1}{2}$ -Säure.

war. Es handelte sich also um ein Verfahren, das gestattet, relativ kleine Mengen von Bernsteinsäure neben den Oxysäuren aufzufinden. Hierzu schien mir das Verhalten der Bleiverbindungen geeignet. Etwa 2 g des Gemisches der beiden Oxysäuren aus den früheren Versuchen wurden in Wasser gelöst, 0,1 g Bernsteinsäure in Lösung hinzugesetzt und die gemeinsame Lösung der drei Säuren mit überschüssigem, frisch ausgefälltem und ausgewaschenem Bleicarbonat auf dem Wasserbad zur Trockne gedampft, der Abdampfungsrückstand in einen Kolben gebracht und mit Alkohol erhitzt, wobei er größtenteils in Lösung ging, abfiltriert und mit Alkohol nachgewaschen.

a) Der Rückstand wurde in starker Essigsäure gelöst, durch H_2S entbleit, von PbS abfiltriert und eingedampft. Der Eindampfungsrückstand wurde nach dem Vorgange von Neuberg¹⁾ mit Ammoniak und Zinkstaub zur Trockne gedampft, dann im Reagenzglas stark erhitzt: die Dämpfe färbten einen mit Salzsäure benetzten Fichtenspan intensiv rot²⁾.

b) Die alkoholische Lösung schied beim Stehenlassen einen weißen Niederschlag aus, der sich bei hinreichendem Wasserzusatz löste. Aus der mit H_2S entbleiten, vom PbS abfiltrierten Lösung wurden die Oxysäuren zurückerhalten. Eine kleine Probe der zu dem obigen Versuch angewendeten Oxysäuren für sich nach dem Neubergschen Verfahren untersucht, gab keine Rötung des Fichtenspan, abgesehen von einer ganz minimalen Rötung an einzelnen Stellen. Wahrscheinlich hing den Säuren, obwohl sie gut kristallisiert waren, doch noch etwas Bernsteinsäure an.

Nunmehr wurden die noch vorhandenen Reste der Oxysäuren mit Bleicarbonat abgedampft usw. Das Ergebnis war nicht vollkommen negativ, indessen so minimal, daß die Bernsteinsäure für die quantitative Bestimmung kaum in Betracht

¹⁾ Neuberg, Diese Zeitschr. Bd. 31, S. 574 (1900/01).

²⁾ Die sogenannte „Hustenreaktion“ ist hier nicht anwendbar, da die Oxysäuren beim Erhitzen ebenso stark zum Husten reizende Dämpfe geben, bekanntlich auch die Benzoesäure, wie denn überhaupt die „Hustenreaktion“ nur selten verwendbar ist.

kommt. Es ist überflüssig, zu sagen, daß die Bernsteinsäure aus der Asparaginsäure des Leims stammt.

Es fragt sich, ob außer der Oxysäure noch Phenol nachweisbar war. Nur in 2 Versuchen aus im ganzen 800 g ist hierauf geachtet worden. Es ergaben sich 0,010 g dem Gange der Untersuchung als Phenol anzusehende Substanz. Die wäßrige Lösung gab mit Bromwasser Trübung und im Laufe einer halben Stunde kristallinischen Niederschlag, mit Ferrichlorid schmutziggrüne Färbung.

Damit ist also erwiesen, daß die in Arbeit genommene Gelatine eine nicht ganz zu vernachlässigende Quantität der Tyrosingruppe enthielt. Im Widerspruch damit hat Selitrenny¹⁾ bei der Fäulnis des Leims keine Oxysäuren erhalten, abgesehen von ganz minimalen Spuren. Es ist indessen nicht unmöglich, daß der von ihm angewendete *Bacillus liquefaciens* die Oxysäure reduziert hat, haben wir ja auch einmal aus Tyrosin Hydrozimtsäure erhalten, wenn auch nur eine kleine Quantität.

3. Die Phenylgruppe.

Daß Glutin — soweit man die Handelsgelatine als Glutin bezeichnen kann — die Phenylgruppe enthält, ist lange bekannt. Es geht schon aus den alten Versuchen von Schlieper und Guckelberger²⁾ hervor, die bei der Oxydation von Knochenleim mit Kaliumchromat und Schwefelsäure Benzoesäure im Destillat erhielten, weiterhin aus den Versuchen von Spiro³⁾, endlich aus der Darstellung von Phenylalanin durch Emil Fischer, Levene und Aders⁴⁾. Über die Mengenverhältnisse ist wenig bekannt. Phenylalanin wurde nur zu 0,4% erhalten, indessen sagen die genannten Autoren, daß in Wirklichkeit der Gehalt sicher sehr viel höher sei.

¹⁾ Selitrenny, *Malys Jahrb.* Bd. 19, S. 514.

²⁾ Schlieper, *Annal. der Chemie* Bd. 59, S. 1, Guckelberger daselbst Bd. 64, zitiert nach Gmelin, *Handbuch der organ. Chemie* 4. Aufl. Bd. 4, S. 2297.

³⁾ Spiro, *Hofmeisters Beiträge zur chemischen Physiologie usw.* Bd. 1, S. 347.

⁴⁾ Diese Zeitschr. Bd. 35, S. 70 (1902).

Selitrenny (l. c.) hat aus Leim ebenso wie aus Eiweiß bei der Fäulnis Hydrozimtsäure erhalten. Bezüglich der Quantität sagt Selitrenny, dem Malyschen Jahresbericht zufolge, daß sie „mit dem Verlust etwa 1% betrage, da aber nur die Hälfte des Leims in kristalloide Produkte umgewandelt sei, so dürfte ihre Menge wohl 2—3% betragen“. Die Angabe ist, wie man sieht, reichlich unbestimmt.

Für die Entscheidung der Frage über die Größe der Phenylgruppe in der Gelatine standen mir nur die Natriumsalze der flüchtigen und aromatischen Säuren aus 400 g Gelatine zur Verfügung. Das Salzgemisch wurde in Wasser gelöst, die Lösung mit verdünnter Schwefelsäure kongosauer gemacht, mit Äther ausgeschüttelt. Die vereinigten ätherischen Auszüge abdestilliert, der Äther möglichst entfernt und das rückständige Öl im Fraktionierkölbchen bis zum Siedepunkt von etwa 170—175° destilliert. Es fragte sich nun, wie man den Gehalt des rückständigen Öls an Hydrozimtsäure bzw. Phenylessigsäure feststellen sollte.

Zur Feststellung des Gehalts habe ich in meinen früheren Versuchen, wo es sich um die gleiche Frage beim Eiweiß handelte, das Öl in Natriumcarbonatlösung gelöst und diese Lösung in passender Quantität einem Kaninchen eingegeben, das die Säure dann als Hippursäure bzw. Phenacetursäure ausscheidet. Diese Säuren wurden in ätherische Lösung übergeführt, der Stickstoffgehalt der Ätherlösung bestimmt und hieraus die Hydrozimtsäure berechnet¹⁾. Im vorliegenden Falle glaubte ich aus verschiedenen Gründen von der Benutzung des Organismus absehen zu sollen. Die Einführung der Schlundsonde ist keine ganz leichte Prozedur: es kommt gelegentlich einmal vor, daß man in die Luftröhre gelangt oder gar den Oesophagus perforiert. Die Erscheinungen sind nicht immer gleich so markant, daß man von der Einspritzung absieht, so daß das Material, das im vorliegenden Falle wohl als kostbares bezeichnet werden kann, da so viel äußerst unangenehme Arbeit daran hängt, also eventuell verloren geht. Dieses Risiko wollte ich nicht laufen. Es liegt aber noch ein zweiter Grund vor. Thierfelder und Shervin²⁾ haben gefunden, daß beim Menschen Phenylessigsäure nicht als Phenacetursäure im Harn erscheint, sondern als Phenylacetylglutamin resp. als Phenylacetylglutamin-Harnstoff. Es ist nicht ausgeschlossen, daß dieser Vorgang neben der Phenacetursäurebildung auch beim Kaninchen erfolgt, die Bestimmung des

¹⁾ Diese Zeitschr. Bd. 9, S. 501 und Bd. 105, S. 246.

²⁾ Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch. Bd. 47, S. 2630.

N-Gehaltes des Ätherauszuges somit keinen bindenden Schluß auf die Quantität der Benzoesäure-Homologen zuläßt.

Aus den angegebenen Gründen sah ich von der Benutzung des Organismus als Oxydationsmittel ab und beschloß, die Oxydation des Säuregemisches in alkalischer Lösung mit Kaliumpermanganat vorzunehmen in der Erwartung, daß die flüchtigen aliphatischen Säuren vollständig oxydiert werden würden, die Benzoesäure-Homologen zu Benzoesäure. Ein Vorversuch hatte mir gezeigt, daß man aus Hydrozimtsäure auf diesem Wege leicht Benzoesäure erhält. Der Rückstand im Destillierkolben wurde daher mit Wasser und Natronlauge in Lösung gebracht und zunächst die Hälfte der Lösung unter wiederholtem Zusatz von Kaliumpermanganatlösung so lange erhitzt, bis neben dem MnO_2 eine Grünfärbung von Manganaten bestehen blieb. Dann die zweite Hälfte ebenso behandelt. Der Überschuß von Kaliummanganat wurde durch Alkohol entfernt, von dem in dichter Form ausgeschiedenen MnO_2 abgenutscht und nachgewaschen. Filtrat und Waschwasser wurden eingedampft und nach dem Ansäuern ausgeäthert. Die Ätherlösung hinterließ ein Öl, das noch nach flüchtigen Säuren roch und bis zum nächsten Tage nicht kristallisierte. Die Oxydation in alkalischer Lösung wurde daher wiederholt, stundenlang — zum größten Teil auf dem Wasserbad — erhitzt und so lange Kaliumpermanganat hinzugesetzt, bis auch nach langem Erhitzen die violette Färbung bestehen blieb, dann ebenso wie vorhin verfahren. Schon beim Ansäuern der alkalischen Lösung im Scheidetrichter fiel ein weißer Schaum aus. Der Ätherauszug wurde abdestilliert, die restierende Ätherlösung in ein gewogenes Bechergläschen gebracht, das in ein erhitztes Wasserbad versenkt war. Das Öl erstarrte beim Herausnehmen des Gläschens aus dem Wasserbad sofort unter den Augen strahligkristallinisch von verschiedenen Kristallisationspunkten aus. Der Rückstand roch ein wenig nach Benzaldehyd. Dieser Geruch hatte sich schwach auch bei der Oxydation bemerkbar gemacht¹⁾. Der erstarrte Rück-

¹⁾ Bezüglich des Verhaltens der Zimtsäure bei der Oxydation heißt es in Beilstein, 3. Aufl., Bd. 2, S. 1405: „Durch Oxydationsmittel (ver-

stand wog 3,52 g. Er löste sich in Natriumcarbonatlösung leicht und fast vollkommen klar; auf Zusatz von Salzsäure fiel eine Säure aus, die abfiltriert und ausgewaschen, auf Filtrierpapier getrocknet wurde. Ihr Schmelzpunkt, an einem Anschützschen Thermometer bestimmt, lag bei 121°. Es kann also keinem Zweifel unterliegen, daß es sich um Benzoesäure handelt. Der Sicherheit halber wurde noch der Silbergehalt des Silbersalzes bestimmt. Zu dem Zweck wurde die Säure zur Entfernung etwa noch anhaftender Salzsäure aus heißem Wasser umkristallisiert. Sie schied sich in der typischen Form glänzender Blättchen aus. Das Silbersalz durch Lösen der Säure in verdünntem Ammoniak, Abdampfen der Lösung bis zur schwachsauren Reaktion, Zusatz von Silbernitratlösung in Überschuß, Abnutschen und gutes Nachwaschen dargestellt, wurde über Schwefelsäure getrocknet. 0,3908 g gaben beim Glühen 0,1836 g Ag, entsprechend 46,98%. Benzoesaures Silber erfordert 47,16%.

Rechnet man die Benzoesäure auf Hydrozimtsäure um, so ergeben sich 4,328 g. Von der angewendeten Gelatine sind rund 83% organische Substanz¹⁾. Danach berechnet sich die Quantität der entstandenen Hydrozimtsäure zu 1,30%. Dabei kommt allerdings noch in Betracht, daß in diesem Falle die Quantität der nicht zersetzten Gelatine nicht bestimmt ist, die Quantität der Hydrozimtsäure würde sich mit Berücksichtigung dieses Umstandes etwas höher stellen, anderseits aber kommt in Betracht, daß der gewogene Rückstand, wenn er auch kristallinisch erstarrt war, doch vielleicht nicht ganz reine Benzoesäure darstellte. Man könnte gegen die

dünnte Salpetersäure — Simon, Bleisuperoxyd, Annalen Bd. 55, S. 1 —) wird Zimtsäure zunächst in Bittermandelöl (Unterschied der Zimtsäure von der Benzoesäure) und dann in Benzoesäure übergeführt.“ Ich habe mich davon überzeugt, daß auch bei der Oxydation von Zimtsäure mit Kaliumpermanganat in alkalischer Lösung Geruch nach Benzaldehyd auftritt. Bei der Oxydation käuflicher Hydrozimtsäure habe ich dies nicht feststellen können. Sollte vielleicht der Fäulnishydrozimtsäure etwas Zimtsäure beigemischt sein?

¹⁾ Siehe oben.

Rechnung noch einwenden, daß bei der Oxydation ja ein Verlust durch die Bildung von Benzaldehyd stattgefunden hat. Der Geruch danach war indessen recht schwach, ich glaube nicht, daß durch die Bildung desselben irgend merkliche Fehler entstanden sind.

Das von den bisherigen Anschauungen abweichende Ergebnis der vorliegenden Untersuchung ist die Entstehung merklicher Mengen von aromatischer Oxysäuren aus der Gelatine. Man könnte vielleicht der Meinung sein, daß diese aus dem Impfmateriale stammen. Bei der geringen Quantität desselben ist dies ganz ausgeschlossen, viel näher liegt die Erklärung, daß die Gelatine nicht nur aus Glutin besteht, sondern Eiweißkörper enthält. Diese Annahme wird ja auch allgemein gemacht. Sie ist darin begründet, daß die Knochen nicht nur Ossein enthalten, sondern auch Osseomucoid und nach Hawk und Gies Osseoalbumid¹⁾. Es ist wohl anzunehmen, daß bei der fabrikmäßigen Darstellung der Gelatine hieraus peptonartige Körper entstehen werden; ganz ausgeschlossen ist, bei der bekannten Fähigkeit des Glutins, unlösliche Körper in Lösung zu halten²⁾, vielleicht auch nicht, daß der Leim direkt Eiweiß enthält³⁾.

Ich habe mich mehrfach bemüht, aus der Gelatine einen eigentlichen Eiweißkörper darzustellen oder wenigstens eine Fraktion zu isolieren, welche entscheidende Reaktionen für Eiweiß gibt. Von vornherein aussichtslos erschienen die Bemühungen nicht, wenn auch gerade nicht sehr aussichtsreich. Das Fibrin hat, Oxysäure und Phenol zusammen als Phenol berechnet, 2,85 % Phenol geliefert. Die aus dem Leim er-

¹⁾ Vgl. Hammarsten, Lehrbuch der physiol. Chemie, 8. Aufl. (1914) S. 111 und 520. — Cohnheim, Chemie der Eiweißkörper, 3. Aufl. (1911), S. 270 und 375.

²⁾ Bezüglich dieses Punktes möchte ich an meine alten Beobachtungen erinnern, daß dem Leim die Eigenschaft zukommt, Hypoxanthinsilberoxyd in Lösung zu halten. Pflügers Arch. Bd. 4, S. 94.

³⁾ Es steht übrigens nicht fest, daß die käufliche Gelatine nur aus Knochen dargestellt wird; es könnte auch Bindegewebe bzw. Sehnen dazu benutzt werden; ich habe hierüber nichts Sicheres feststellen können.

haltenen 0,11 % Oxysäure entsprechen 0,065 % Phenol, wobei allerdings die kleine Quantität des aus dem Leim erhaltenen Phenols selbst unberücksichtigt bleibt. Legt man diesen Gehalt zugrunde, so würden im Leim etwa 2,3 % Eiweiß enthalten sein.

Ehe ich über die wenig befriedigenden Ergebnisse berichte, möchte ich einige Bemerkungen über die Reaktion machen, die ich zur Charakterisierung des Eiweißes neben der Millonschen benutzt habe, nämlich die mit p-Dimethylamidobenzaldehyd. Rohde¹⁾ ist wohl der erste, der diese auf dem Gehalt des Eiweißes an Tryptophan beruhende Reaktion als typisch für Eiweiß angegeben und empfohlen hat. Rohde beschreibt die Reaktion folgendermaßen: „Im Reagenzglas werden zu der Eiweißlösung oder in Wasser aufgeschwemmtem Eiweiß 5–10 Tropfen einer 5%igen schwach schwefelsauren (10%) Lösung von p-Dimethylamidobenzaldehyd gefügt; dann läßt man vorsichtig unter häufigem Umschütteln konzentrierte Schwefelsäure bis zum Auftreten der Farbe²⁾ zufließen.“

Weiterhin sagt R.: „Als Säure wurde anfänglich konzentrierte Salzsäure benutzt, doch bald wegen der leichten Täuschung durch die eintretende Liebermannsche Reaktion verworfen; zuletzt wurde nur konzentrierte Schwefelsäure angewendet.“

Die Berechtigung dieses Einwandes gegen die Anwendung von konzentrierter Salzsäure ist nicht recht abzusehen, denn schließlich ist die Liebermannsche Reaktion wahrscheinlich doch auch nichts anderes als eine Reaktion auf Tryptophan, außerdem aber wird die Konzentration beim Zusatz von Salzsäure, wenn sie nur einen Teil der Lösung ausmacht, doch nie so groß, daß sie allein das Eintreten der Liebermannschen Reaktion bewirkt. Ich ziehe nach meinen Erfahrungen mit Lösungen von Witte-Pepton und Leimpepton³⁾ (2–2½%)

¹⁾ Diese Zeitschr. Bd. 44, S. 164.

²⁾ sc. violetten.

³⁾ Sammlungspräparat, seinerzeit von mir durch Pepsinverdünnung dargestellt, wenig Albumose enthaltend.

und darunter) sowie mit Indolaminopropionsäure (0,1 % und darunter) die Reaktion mit Salzsäure nach Steensma¹⁾ vor, und zwar in folgender Form:

Man setzt $\frac{1}{2}$ Vol. einer 2%igen alkoholischen p-Dimethylaminobenzaldehyd hinzu, dann $\frac{1}{3}$ bis $\frac{1}{2}$ Vol. (auf das Ganze bezogen) rauchende Salzsäure. Zögert der Eintritt der Reaktion, so erhitzt man gelinde. Statt der alkoholischen Lösung kann man auch die schwefelsaure, von Rohde angegebene, anwenden.

Als Vorzüge der Reaktion mit Salzsäure eventuell unter Zusatz von N_1NO_2 erscheinen mir folgende:

1. Die Reaktion tritt zwar langsamer ein, ist aber haltbarer. Die violette Farbe wandelt sich allmählich in mehr oder weniger tiefes Blau um, das sich wochenlang, ja monatelang hält. Ob man die schwefelsaure Lösung des Aldehyds anwendet oder die alkoholische, scheint ziemlich gleichgültig zu sein: die Färbung schien bald bei der einen, bald bei der andern intensiver. Zweckmäßig stellt man die Reaktion in beiden Formen an und läßt sie bis zum nächsten Tage stehen.

2. Die Reaktion mit Schwefelsäure kann verfehlt werden oder schlecht ausfallen, wenn man zuviel Schwefelsäure hinzusetzt, was leicht geschehen kann, da man natürlich bemüht ist, eine möglichst intensive Färbung zu erhalten.

3. Ich gedachte, den Farbstoff mit Amylalkohol auszuschütteln, besonders zum Zweck spektroskopischer Untersuchung. Das geht mit der schwefelsauren Lösung nicht. Rohde bemerkt schon: „Als Lösungsmittel für die drei gefärbten Verbindungen sind wirksam Wasser und Alkohol, unwirksam Äther, Amylalkohol, Schwefelkohlenstoff und Petroläther.“²⁾ Stellt man aber die Reaktion mit Salzsäure

¹⁾ Steensma, Diese Zeitschr. Bd. 47, S. 25 (1906).

²⁾ Rohde hat außerdem noch Vanillin und p-Nitrobenzaldehyd angewendet.

an, so nimmt Amylalkohol den Farbstoff auf, allerdings auch nicht so glatt: es entstehen häufig trübe Mischungen, die sich nur schwer absetzen, und dann findet man oft auch den Amylalkohol wenig gefärbt. Der Farbstoff geht übrigens aus der etwas angewärmten Reaktionsmischung leichter in den Amylalkohol über, als aus der kalten.

Konstant sind folgende Erscheinungen. Stellt man die Reaktion mit einer 2- bis $2\frac{1}{2}\%$ igen albumosehaltigen Leimpeptonlösung an, so erhält man beim Schütteln mit Amylalkohol ganz oder fast ganz klare Lösungen. Gießt man dieselbe oder einen Teil in das gleiche Volumen Wasser, so tritt sofort eine Scheidung ein, und zwar bleibt der Farbstoff im Amylalkohol. Das Verhalten erinnert an die von Neuberg¹⁾ vor kurzem aufgefundenen und von ihm unter der Bezeichnung „Hydrotropie“ zusammengefaßten Erscheinungen. Die Beobachtungen von Neuberg beziehen sich auf eine große Zahl von Kalium- und Natriumsalzen organischer Säuren, ihnen würde sich das Leimpepton anschließen. Zum Auftreten der Erscheinung, d. h. zur Bildung einer klaren Lösung, darf das Leimpepton in der angegebenen oder etwas geringeren Konzentration nicht fehlen²⁾: aus Mischungen von 1 Vol. Wasser, $\frac{1}{2}$ Vol. Alkohol (Methyl- oder Äthyl-), konzentrierter Salzsäure und etwa der Hälfte des Gemisches Amylalkohol setzt sich der Amylalkohol zwar auch sehr langsam ab, aber schließlich doch.

Läßt man das Reaktionsgemisch (mit 2 bis $2\frac{1}{2}\%$ Pepton „Witte“) mit dem Amylalkohol stehen, so nimmt meistens die Blaufärbung des Amylalkohols an Intensität zu, obwohl in der Regel ein Teil des Farbstoffes in die wässrige Lösung zurückdiffundiert. Auch wenn man den Amylalkohol abgetrennt hat, färbt er sich tiefer. Nicht selten ist die Amylalkohollösung nach mehrtägigem Stehen völlig klar und so tief dunkelblau gefärbt, daß man sie zur spektroskopischen Untersuchung verdünnen muß. Bei passender Verdünnung zeigt die Lösung

¹⁾ Neuberg, Biochem. Zeitschr. Bd. 76, S. 107 (1916).

²⁾ Die Anwesenheit oder Abwesenheit des Aldehyds ist natürlich gleichgültig.

einen Absorptionsstreifen zwischen D und C. Anscheinend ist die Farbe unbegrenzt haltbar, wenigstens bleibt sie monatelang unverändert. Die beschriebenen Erscheinungen sind die Regel, indessen kommen auch Ausnahmen vor, mitunter nimmt die Intensität der Färbung nicht zu. Die Ursache dieser Abweichung aufzufinden, ist mir nicht gelungen. Selbstverständlich beweist die Reaktion an sich nicht Eiweiß, sondern nur die Indolaminopropionsäure in demselben.

Für den Nachweis sehr kleiner Mengen von Eiweiß empfiehlt Rohde die Schichtprobe mit konzentrierter Schwefelsäure, und zwar soll man den Aldehyd zu 1 % in der Schwefelsäure lösen. Wie ich gesehen habe, kann man ebensogut den Aldehyd in der von Rohde angegebenen schwefelsauren Lösung der zu prüfenden Flüssigkeit hinzusetzen und sie dann mit konzentrierter Schwefelsäure unterschichten, was bequemer erscheint. Zu der Schichtprobe bemerkt Rohde: „Beweisend ist nur der Farbenring, nicht eine diffuse Färbung der einen oder andern Flüssigkeit.“ In der Tat kann der rötliche Farbenton auch ohne die Gegenwart von Eiweiß bzw. Tryptophan auftreten. Die Feinheit der Reaktion schätzt Rohde für Kasein auf 0,015 %, ich habe mich hiemit nicht eingehend beschäftigt, da ich kein unmittelbares Interesse an dieser Frage hatte, fand sie jedoch ungefähr übereinstimmend damit an einer Lösung von 0,02 % Pepton „Witte“. Die Reaktion unter Anwendung von Salzsäure statt Schwefelsäure ist an einer solchen nicht weniger fein, namentlich, wenn man die Mischung ein wenig erhitzt. Ich möchte raten, die Reaktion in beiden Formen nebeneinander anzustellen. Da man auch bei Anwendung von Salzsäure die schwefelsaure Lösung des Aldehyds anwenden kann, so ist die Mühe der doppelten Ausführung nur gering.

Ich komme nun zu den Versuchen, die Eiweißgruppe aus der käuflichen Gelatine zu isolieren. Es wurden zwei Wege eingeschlagen. C. Th. Mörner¹⁾ hat angegeben, daß man die Gelatine durch längeres Einlegen in 0,2—0,5 % ige Kali-

¹⁾ C. Th. Mörner, Diese Zeitschr. Bd. 28. S. 485 (1899).

lauge und nachfolgendes Waschen reinigen könne. Rohde gibt an, daß ungereinigte Gelatine mit seiner Reaktion positiv reagiere, gereinigte dagegen nicht, also frei ist von Eiweiß. Danach wäre das Eiweiß in der alkalischen Flüssigkeit zu suchen. Das Prinzip ist außerordentlich einfach, die Ausführung jedoch recht unerquicklich.

Im ersten Versuch wurden 25 g Gelatine mit 1 Liter 0,5%iger Kalilauge übergossen. Die Kalilauge bedeckte die Gelatine vollständig. Schon nach 6 Tagen war die Gelatine so stark gequollen, daß bei dem Versuch, die Masse durch Leinwand zu klären, fast nichts abfloß. Sie wurde daher in die benutzte Schale zurückgebracht, was natürlich mit erheblichem Verlust verbunden war, und mit einem weiteren Liter Wasser durchgerührt. Da auch jetzt nur äußerst wenig von selbst durch Leinwand hindurchfloß, wurde versucht, die Filtration durch gelinden Druck mit der Hand zu befördern. Dabei gelangte aber äußerst fein verteilte Gelatine in die Kolatur und die nachfolgende Filtration durch Papier ging trotz wiederholtem Verdünnen und Filterwechsel äußerst schlecht, so daß schließlich ein Anteil aufgegeben werden mußte. Die vereinigten Filtrate wurden zuerst auf freiem Feuer, dann auf dem Wasserbad auf etwa 50 cm eingedampft, dann in das mehrfache Volumen Alkohol absolutus eingegossen, wobei sich eine zähe Masse ausschied. Der Alkohol konnte am nächsten Tage ohne Verlust abgegossen und durch neuen Alkohol ersetzt werden. Nach abermals 24 Stunden wurde die Masse noch im Alkohol mit dem Spatel möglichst zerkleinert, der Alkohol abgegossen und durch Äther ersetzt. Nach 24 Stunden wurde filtriert und die harte Masse in der Reibschale trocken gerieben. Man erhielt so ein weißes, stäubendes Pulver im Gewicht von 3,9 g, das sich mit größter Leichtigkeit in Wasser löste. Zur Herstellung einer 2½%igen Lösung wurde 1 g auf 40 cm in einem Erlenmeyer-Kölbchen befindlichen Wasser aufgeschüttet und ohne daran zu rühren, stehen gelassen. Nach kurzer Zeit war die Substanz völlig zu einer etwas trüben, ziemlich stark alkalischen Lösung gelöst, die ganz klar filtrierte. Mit dieser Lösung, sowie einer zweiten, ebenso behandelten Quantität, wurden die Reaktionen angestellt.

Aus der Quantität der im Fäulnisversuch erhaltenen Oxy-säuren geht hervor, daß die Gelatine nicht mehr wie rund 2,3 % Eiweißkörper enthalten kann. Aus dem Gewicht der auf dem beschriebenen Wege trotz großer Verluste erhaltenen Substanz von 3,9 g = 15,6 % der Gelatine folgt also, daß die Substanz nur zum kleinsten Teil aus Eiweiß bestehen kann. In der Tat verhielt sie sich zu Reagentien wie Leimalbumose¹⁾.

¹⁾ Vgl. auch die folgende Mitteilung.

Die Millonsche Reaktion war negativ, Essigsäure + Ferrocyankalium erzeugte keine Trübung, bei Anstellung der Aldehydreaktion war die Färbung vielleicht etwas stärker wie bei 2½% iger Gelatine bzw. Leimalbumose. Beim Erhitzen mit bleihaltiger Natronlauge entstand keine Schwärzung. In ihrem ganzen Verhalten würde die Substanz etwa dem Hofmeister-schen¹⁾ Semiglutin entsprechen,

Bei einem zweiten Versuch wurden 25 g. Gelatine in einem großen Glasstutzen mit 3 Liter Kalilauge von 0,25% übergossen und unter häufigem sanften Rühren mit einem Glasstab 14 Tage stehen gelassen. Die Gelatine war stark gequollen. Die Masse wurde auf ein Drahtsieb gebracht, das Abfließen der Lösung durch leises Rütteln befördert, wiederholt mit destilliertem Wasser gewaschen, die gesamten Lösungen und Waschwässer durch Papier filtriert, das Filtrat — im ganzen etwa 9 Liter — eingedampft und im übrigen ebenso verfahren, nur mit dem Unterschied, daß beim Eindampfen zur Vermeidung der Einwirkung des Alkalis, wiederholt Essigsäure hinzugesetzt wurde. Das Endergebnis war dasselbe. Auffallenderweise zeigte in diesem Falle die erhaltene Lösung schon beim Zusatz von 10 Tropfen der schwefelsauren Aldehydlösung ohne Säurezusatz Orangefärbung, die bald in Gelb überging, bei dem Gebrauch der alkoholischen Lösung war dieses nicht der Fall. In diesem Falle wurde auch die rückständige Gelatine verarbeitet. Sie wurde durch tagelanges Waschen mit oft erneuertem Leitungswasser durch Dekantieren gewaschen, dann durch Eingießen von heißem Wasser gelöst, die Lösung stark eingeengt und mit Alkohol gefällt usw.

Rohde gibt an, daß sich die gereinigte Gelatine von der ungereinigten durch das Ausbleiben der Farbenreaktion mit p-Dimethylamidobenzaldehyd unterscheidet. Davon habe ich mich an 1% igen Lösungen der gereinigten und ungereinigten Gelatine (letztere frisch hergestellt und noch etwas warm) nicht sicher überzeugen können.

Ein etwas besseres Ergebnis hinsichtlich des Eiweißnachweises hat ein anderer Versuch, der von der allerdings wenig wahrscheinlichen, Voraussetzung ausging, daß das Eiweiß kolloidal gelöst in der Gelatine enthalten sei.

25 g Gelatine wurden in 250 ccm Wasser gelöst, nach einigem Erkalten 2,5 ccm Salzsäure von 1,126 D hinzugesetzt, einen Tag im Thermostaten digeriert, dann sehr vorsichtig mit Natron neutralisiert. Es entstand eine flockige Trübung, die man auf Syntonin resp. Albuminat beziehen kann. Es ge-

¹⁾ Hofmeister, Diese Zeitschr. Bd. 2, S. 302.

lang nicht, die Trübung auf dem Filter zurückzuhalten. Die trübe Flüssigkeit wurde daher mit Kieselgur geschüttelt und filtriert. Sie filtrierte unter Anwendung eines Heißwassertrichters völlig klar. Der etwas ausgewaschene Filtrückstand wurde mit heißer Essigsäure übergossen. Das essigsaure Filtrat gab positive Reaktion mit Glyoxylsäure und Schwefelsäure und mit alkoholischer Aldehydlösung und rauchender Salzsäure eine Violettfärbung, die jedenfalls viel intensiver war, als die aus Gelatinelösung zu erzielende. Es ist also bei diesem Versuch bis zu einem gewissen Grade gelungen, einen Eiweißkörper aus der Gelatine zu isolieren.