

Das diazotirte *o*-Nitro-*p*-toluidin (Schmp. 77.5°) lieferte <sup>1)</sup> bei analoger Behandlungsweise lichtgelbe, glänzende Nadelchen vom Schmp. 69°, identisch mit *o*-Nitro-*p*-diazotoluolimid.

Analyse: Ber. für  $\text{NO}_2 \cdot (\text{CH}_3) \cdot \text{C}_6\text{H}_3 \cdot \text{N}_3$ .

Procente: N 31.4.

Gef. » » 31.7.

Zürich, Analyt.-chem. Laborat. des eidgenöss. Polytechnikums.

#### 409. A. Wróblewski: Ueber die chemische Beschaffenheit der Diastase und über das Vorkommen eines Arabans in den Diastasepräparaten.

(Eingegangen am 1. October, mitgetheilt in der Sitzung von Hrn. A. Wohl.)

Man begegnet heutzutage noch sehr widersprechenden Vorstellungen über die Enzyme. In letzter Zeit ist sogar die Ansicht aufgetaucht, dass das, was wir Enzyme nennen, keine Stoffe, sondern nur Eigenschaften der Stoffe seien <sup>2)</sup>. Um die Eigenschaften der Enzyme näher kennen zu lernen, habe ich zum Objecte der Untersuchung das am leichtesten zugängliche Enzym, die Diastase, gewählt. Die bis jetzt erhaltenen Resultate theile ich in Folgendem vorläufig mit <sup>3)</sup>.

Von vielen Seiten wurden Angaben über die chemische Zusammensetzung der Diastase veröffentlicht. Wir kennen verschiedene Methoden, die zur Darstellung dieses Enzymes führen sollen, wir kennen auch eine ganze Reihe von Zahlen, welche die elementare Zusammensetzung der Diastase ausdrücken sollen. Aber es herrscht unter diesen Angaben keine Einheitlichkeit, keine Uebereinstimmung, sodass wir schliessen müssen, dass wenigstens die meisten bis jetzt erhaltenen Präparate nichts anderes, als Gemische von verschiedenen Stoffen waren. Es war interessant, bei dieser Sachlage eine eingehende Forschung nochmals zu unternehmen, um etwas Bestimmtes über Diastase erfahren zu können.

**Darstellung der Diastase.** Nach Lintner und anderen Forschern ist Diastase im ca. 50-procentigen Alkohol löslich, im ca. 65-procentigen aber nicht, sie dialysirt nicht und wird durch schwefel-

<sup>1)</sup> Näheres in der Thèse von Hrn. Renauld.

<sup>2)</sup> Maurice Arthus. Nature des enzymes. Paris 1896. »Nous proposons donc de considérer les enzymes non comme des substances matérielles, mais comme des propriétés de substances matérielles.« S. 57.

<sup>3)</sup> Die ausführliche Beschreibung der hier in aller Kürze geschilderten Untersuchungen wird in der »Zeitschr. für physiol. Chemie« erscheinen.

saures Ammon ausgesalzen. Diese Angaben benutzte ich bei der Darstellung der Diastase. Ich verarbeitete in einem Falle 3 kg, in einem anderen 5 kg Malz (oberste Dörre).

Das fein geschrotete Malz wurde mit 68-procentigem Alkohol (2 L Alkohol für je 1 kg Malz) ausgezogen, der Auszug entfernt und der ausgepresste Rückstand zweimal mit 45-procentigem Alkohol (2 L für je 1 kg Malz) extrahirt. Die Auszüge wurden mit soviel Alkohol versetzt, dass die Flüssigkeit ca. 70 pCt Alkohol enthielt; die Fällung wurde abfiltrirt, in 45-procentigem Weingeist gelöst und nochmals gefällt, dann in wenig Wasser gelöst, mit Magnesiumsulfat ausgesalzen (aus dem Filtrate fällte Ammoniumsulfat nichts mehr), bis zum Verschwinden der Schwefelsäurereaction in der äusseren Flüssigkeit dialysirt und schliesslich mit absolutem Alkohol und Aether ausgefällt<sup>1)</sup>. Durch die gleichen Operationen suchte ich auch aus den käuflichen Diastasepräparaten reinere Producte darzustellen.

Die so erhaltenen weissen Präparate waren im Wasser fast vollständig löslich, sie wirkten stark diastatisch und gaben mit Jod keine Färbung. Sie gaben die Eiweissreactionen mit Ausnahme der Biuretreaction, die entweder fast garnicht oder garnicht zum Vorschein kam<sup>2)</sup>. Diese Präparate reducirten die Fehling'sche Lösung nicht, aber beim Kochen ihrer Lösung mit Salzsäure oder Schwefelsäure entstand ein Niederschlag, der Eiweissreactionen gab, und das Filtrat reducirte Fehling'sche Lösung. Die Resultate der Elementaranalysen waren denjenigen sehr ähnlich, welche Lintner, Zulkowsky und Andere erhalten haben. Die Analysenresultate von verschiedenen Präparaten stimmten aber nicht gut untereinander. Der Stickstoffgehalt war schwankend und betrug 4—8 pCt. Die Präparate waren offenbar verunreinigt. Es war möglich, dass ein Gemisch von Proteinstoffen mit Kohlehydraten und Dextrinen vorlag. Um in dieser Richtung etwas Sicheres zu erfahren, habe ich das Brücke-Külz'sche Verfahren benutzt, welches so gute Dienste bei der Trennung des Glykogens von den Proteinstoffen leistet.

Die Lösung meines Präparates wurde mit Jodquecksilberjodkalium und verdünnter Salzsäure versetzt, wobei ein voluminöser Niederschlag entstand. Das Filtrat gab mit Alkohol einen starken Niederschlag. Derselbe bestand aus einem dextrinartigen Kohlehydrat, welches demnach durch Magnesiumsulfat mit ausgefällt wurde; es besass keine diastatische Wirkung. Zweifellos bestand

<sup>1)</sup> Die Ausfällung ist sehr schwer, wenn in der Flüssigkeit sehr wenig Salze sich vorfinden.

<sup>2)</sup> Die Ursache liegt wahrscheinlich darin, dass das weiter unten beschriebene Kohlehydrat beigemischt war.

das verwendete Diastasepräparat grösstentheils aus diesem Kohlehydrat. Im Niederschlage befand sich ein Proteinstoff.

Das Kohlehydrat. Grössere Mengen des Kohlehydrats und der w. u. beschriebenen Proteinstoffe wurden aus einem Präparate dargestellt, welches nach meiner Vorschrift von E. Merck in Darmstadt aus 100 kg Malz erhalten wurde (durch Ausziehen mit 70-procentigem, dann zweimal mit 45-procentigem Alkohol, Fällen mit starkem Alkohol und Auswaschen).

Das durch nochmalige Ausfällung gereinigte und getrocknete Kohlehydrat stellt ein schneeweisses, nicht süsses Pulver vor. Seine Lösung wird mit Jod nicht gefärbt und reducirt Fehling'sches Reagens erst nach dem Erhitzen mit Säuren; es dreht die Polarisationssebene stark nach links, nach der Inversion nach rechts. Es wird mit Bleizucker und Bleiessig nur aus sehr concentrirten Lösungen gefällt; mit Phosphorwolframsäure wird es aus concentrirter Lösung gefällt, giebt mit Tannin einen voluminösen Niederschlag und dialysirt nicht.

Um die bei der Inversion dieses Kohlehydrats entstehende Zuckerart kennen zu lernen, erhitze ich 10 g von demselben mit verdünnter Schwefelsäure. Die Flüssigkeit wurde in bekannter Weise verarbeitet. Aus der weingeistigen Lösung der Inversionsproducte krystallisirte sehr leicht eine süssschmeckende Zuckerart, welche mit Phloroglucin und Salzsäure die Pentosereaction gab. Nach dem Schmelzpunkte ihres Osazons (ca. 153°) und nach ihrem Drehungsvermögen,  $[\alpha]_D = +102.4^\circ$ , konnte sie für Arabinose erklärt werden.

Demnach ist das Vorkommen eines Arabans in den Diastasepräparaten constatirt.

Von Interesse ist, dass hier ein lösliches Pentosan vorliegt, während man, so viel ich weiss, die Pentosen bisher nur aus den Spaltungsproducten der unlöslichen Kohlehydrate isolirt hat.

Wahrscheinlich war es dieses Kohlehydrat, welches in sehr unreinem Zustande von Hirschfeld<sup>1)</sup> untersucht und für Diastase und zugleich für Landwehr's Thiergummi erklärt wurde. Wir wissen schon, dass es nicht Diastase ist. Was das Landwehr'sche Thiergummi ist, das wissen wir überhaupt nicht, weil Landwehr nur wenige Eigenschaften von seinen aus den Thiersäften erhaltenen Präparaten beschrieben und keine Spaltungen gemacht hat. Die einzige, für Thiergummi »charakteristische« Reaction mit Kupfersalzen wird thatsächlich vom Pentosan gegeben; sie gelingt aber auch mit manchen anderen Polysacchariden. Wenn wir eine Lösung des Pentosans mit einer kleinen Menge Kupfersalzlösung und dann mit Natronlauge versetzen, so bildet sich ein hellblauer Niederschlag, der sich im Ueberschusse von Natronlauge nicht löst und sich beim Kochen nicht schwärzt.

<sup>1)</sup> Pflüg. Arch. 39, 499.

Die Proteinstoffe. Da das in Vorigem beschriebene Kohlehydrat nicht diastatisch wirksam war, so musste die wirksame Substanz sich in dem durch das Brücke'sche Reagens erzeugten Niederschlage befinden, was auch experimentell sich nachweisen liess. Es erschien daher angezeigt, die im Niederschlage befindliche Substanz näher zu untersuchen. Zu diesem Zwecke wurde der mit jenem Reagens erhaltene Niederschlag ausgewaschen und mit Silbercarbonat und Wasser verrieben, um Quecksilber und Jod wegzuschaffen. Der freie Proteinstoff ging, wenn auch nur schwer und unvollständig, in Lösung. In das Filtrat wurde Schwefelwasserstoff eingeleitet, aber das Schwefelsilber konnte nicht durch Filtration weggeschafft werden, das Filtrat blieb immer schwärzlich. Um die Lösung vollständig zu reinigen habe ich sie mit Alkohol versetzt, den Niederschlag mit Alkohol ausgewaschen und in Wasser gelöst. Der Proteinstoff löste sich nur schwer und wieder unvollständig auf, die Lösung opalisirte und war grau gefärbt. Die in kleiner Menge erhaltene Flüssigkeit wirkte verzuckernd auf die lösliche Stärke und gab Proteinreactionen (Millon'sche Reaction, Xanthoproteinreaction)<sup>1)</sup>.

Bemerkenswerth ist, dass dieser Proteinstoff mit Bleizucker keine Fällung und mit Bleiessig nur eine Trübung gab. Man konnte demnach diese Reagentien zur Trennung des Proteinstoffs vom Kohlehydrat nicht benutzen.

Zur Darstellung von grösseren Quantitäten dieses Proteinstoffs konnte die oben beschriebene Methode, welche im Uebrigen einen Beweis der proteïnartigen Beschaffenheit von Diastase gebracht hat, nicht verwendet werden, weil sie zu grosse Schwierigkeiten darbietet und kein vollständig reines Präparat lieferte. Ich habe in Folge dessen eine Lösung des von Merck dargestellten Präparats, welches wir als Präparat A bezeichnen werden, mit verdünnter Schwefelsäure gekocht, wobei sich, wie früher schon erwähnt ist, eine Proteïnsubstanz ausschied, und den Niederschlag sorgfältig ausgewaschen. Dieses Product wurde zu den weiter beschriebenen Spaltungen benutzt.

Die von mir erhaltenen ursprünglichen Präparate, welche ein Gemisch vom Kohlehydrat mit dem Proteinstoff bildeten, waren fast vollständig, wenn auch schwer im Wasser löslich. Das Präparat A war aber nicht ganz löslich. Der unlösliche Theil stellte nach dem Auswaschen mit Wasser einen Proteinstoff vor. Er quoll im Wasser sehr stark auf und äusserte in diesem Zustande diastatische Wirkung. Auch von diesem Proteinstoff habe ich eine beträchtliche Menge für Spaltungsversuche gesammelt.

<sup>1)</sup> Die Trennung des Proteinstoffes vom Kohlehydrat mittels Phosphorwolframsäure bietet noch grössere Schwierigkeiten.

Die beiden Proteinstoffe, der lösliche und der unlösliche, können eine und dieselbe Substanz sein. Ich habe nämlich constatirt, dass der lösliche Proteinstoff durch die Wirkung von Alkohol an seiner Löslichkeit stark einbüsst. Auch die von Anderen gemachten Beobachtungen weisen darauf hin, dass die diastatisch wirksame Substanz durch die Wirkung von Alkohol allmählich an der Löslichkeit einbüsst. Es ist sehr möglich, dass der unlösliche Proteinstoff im Präparat A ein nur in dieser Beziehung veränderter löslicher Proteinstoff ist, worauf auch die Darstellungsmethode hinweist. Beide wirken diastatisch, der unlösliche musste aber aus ersichtlichen Gründen weniger rein sein. Der Stickstoffgehalt des unlöslichen Proteinstoffs betrug 15.3 pCt. und der des löslichen 16.2 pCt. Die vollständige Elementaranalyse schien zwecklos, weil die untersuchten Substanzen aschehaltig und demnach nicht vollständig rein waren. Dagegen habe ich die Producte untersucht, welche bei der Spaltung derselben mit Salzsäure entstehen.

Spaltung der Proteinstoffe. Ca. 30 g vom unlöslichen Proteinstoff wurden mit 20-procentiger Salzsäure nach der Methode von Hlasivetz und Habermann gespalten. In der erhaltenen Flüssigkeit konnte man als Spaltungsproducte Ammoniak, stickstoffhaltige Basen und Amidosäuren nachweisen. Von letzteren wurden Leucin und Tyrosin in Krystallen erhalten und durch ihr Aussehen unter dem Mikroskop und ihre Reactionen identificirt. Der Versuch, Arginin in Form seiner schwerlöslichen basischen Silberverbindung ( $C_6H_{11}N_4O_2 \cdot AgNO_3$ ) darzustellen, schlug fehl. Es wurde nur ein leicht lösliches Silberdoppelsalz erhalten.

Vom löslichen Proteinstoff wurden 4 g mit 20-procentiger Salzsäure auf die gleiche Weise gespalten und in den Spaltungsproducten kleine Mengen von Ammoniak und organischen Basen und relativ grosse Mengen von den Amidosäuren gefunden. Leucin und Tyrosin sind in Krystallform isolirt und mit Sicherheit identificirt worden.

Was ist Diastase? Wie ich gezeigt habe, wird die wirksame Substanz meiner Diastasepräparate durch Brücke'sches Reagens gefällt. Aus dem Niederschlage vermochte ich nur Proteinsubstanz zu isoliren. Ich habe ferner gezeigt, dass die wirksame Substanz meiner Präparate nicht dialysirbar war und durch Magnesiumsulfat ausgesalzen wurde. Hält man alle diese Beobachtungen zusammen, so muss man zu der Ansicht kommen, dass Diastase ein Proteinstoff ist.

Man wird vielleicht noch einwenden, dass einem an und für sich unwirksamen Proteinstoffe äusserst kleine Mengen des wirklichen Enzyms anhafteten. Wäre dem aber so, so würde doch dieses wirkliche Enzym durch Brücke'sches Reagens vollständig auffällbar, durch Magnesiumsulfat aussalzbar, nicht dialysirbar, von

gleichem Verhalten gegen Weingeist wie der gefundene Proteinstoff sein, mit einem Worte, es würde, wenn nicht derselbe, so doch ein dem von mir nachgewiesenen Proteinstoffe sehr ähnlicher Körper sein. Sollten diese Gründe nicht überzeugend sein, so müssten wir mit Arthus<sup>1)</sup> zum Schlusse gelangen, dass Enzyme unfassbar sind, dass sie keine Stoffe, sondern nur Eigenschaften der Stoffe sind. Wenn dies aber von einem gewissen speculativen Standpunkte aus auch richtig sein könnte, so ist doch der beschriebene Proteinstoff ein Träger der enzymatischen Kräfte, und wir können diesen Träger mit dem Namen »Diastase«, »Enzym«, bezeichnen.

Man hat oft gegen die Vermuthungen, dass Enzyme Proteinstoffe sind, die Brücke'schen Erfahrungen als Beweis angeführt. Brücke hat nämlich gefunden, dass Enzyme sehr leicht an vielen entstehenden Niederschlägen anhaften und hat unter Benutzung dieser Eigenschaft enzymotisch wirksame Lösungen erhalten, die nur undeutliche Eiweissreactionen gaben. Um dieses Anhaften, ich will sagen Adsorption der Enzyme, zur Reindarstellung der Diastase zu benutzen, habe ich mit Diastase (Präparat A) und mit sorgfältig gereinigter Knochenkohle Versuche angestellt, und es hat sich erwiesen, dass immer nur ein Theil der Diastase adsorbirt wurde, die filtrirte Lösung war wirksam und gab Proteinreactionen. Auch durch die Thonzelle geht Diastaselösung, wenn auch unvollständig, hindurch. Durch ausfallendes Calciumphosphat wird sie auch nur theilweise niedergeschlagen. Das Gleiche gilt für Pepsin, wie ich im Jahre 1893 im Drechsel'schen Laboratorium constatiren konnte. Daraus ersehen wir, dass Brücke bei seiner Darstellung des Pepsins viel Substanz verloren hat, und schliesslich, wie er es selbst gesteht<sup>2)</sup>, äusserst verdünnte Lösungen unter den Händen hatte.

Wenn man ferner das Nichteintreten gewisser Proteinreactionen in sehr verdünnten Enzymlösungen als Beweis gegen die Proteinnatur der Enzyme angeführt hat, so ist dabei Folgendes zu beachten: Es ist kaum zweifelhaft, dass die hydrolytisch-spaltende Wirkung der Enzyme die empfindlichste Reaction derselben ist, sodass, wenn bei der fortschreitenden Verdünnung ihrer Lösungen alle anderen Reactionen versagen, diese Wirkung noch hervortritt. Es macht dann auf uns den Eindruck, als ob in der Lösung kein Proteinstoff mehr, sondern nur ein Enzym enthalten sei. Im Folgenden ist ein überzeugender Beweis dafür beschrieben. Ich habe bei der Darstellung der Diastase ein Präparat dialysirt und dabei bemerkt, dass die dialysirte Flüssigkeit diastatisch wirkte, wahrscheinlich nur deshalb, weil unsichtbare Oeffnungen im Pergamentpapier vorhanden waren, und ich wollte mich überzeugen, ob viel Substanz auf diese Weise verloren gegangen

<sup>1)</sup> l. c.    <sup>2)</sup> Sitzber. Wien. Akad. d. Wiss. 43, 602.

war. Die äussere Flüssigkeit gab aber keine Proteïnreactionen. Als ich jedoch ein halbes Liter dieser Flüssigkeit eindunstete, blieb ein Rückstand, der Proteïnreactionen gab. Also konnte die Proteïnsubstanz in dieser diastatisch wirkenden Flüssigkeit durch ihre gewöhnlichen Reactionen nicht nachgewiesen werden.

Schluss. Meine Untersuchung führt zum Schluss, dass Diastase ein Proteïnstoff ist. Die gleiche Ansicht ist schon früher von anderen Forschern ausgesprochen, aber experimentell nicht nachgewiesen worden. Bekanntlich betrachtet man auch andere Enzyme mit grösserer oder geringerer Wahrscheinlichkeit als Proteïnstoffe. Wir müssen also nach unserem gegenwärtigen Wissen die Enzyme den Proteïnstoffen anreihen und in der Classification der Proteïngruppe ihnen Platz geben. Enzyme sind den Eiweissstoffen ähnlich, gehören zur Klasse der albuminoiden Substanzen und zwar als eine besondere Unterklasse<sup>1)</sup>.

Zürich. Laboratorium von Prof. Dr. Ernst Schulze.

#### 410. M. Scholtz: Ueber Diacetylutidin.

[Aus dem chemischen Institut der Universität Breslau.]

(Eingegangen am 2. October.)

Während ein Aldehyd der Pyridinreihe bisher noch nicht bekannt ist, sind die Ketone mehrfach Gegenstand der Untersuchung gewesen, doch ist die Zahl der bekannten Pyridylketone immer noch eine beschränkte, und in Folge der geringen Ausbeute, welche die bisher angewandten Darstellungsweisen liefern, sind sie immer noch schwer zugänglich geblieben. Die zuerst bekannt gewordenen Pyridylketone sind das  $\alpha$ - und  $\beta$ -Phenylpyridylketon, welches Skraup und Cobenzl<sup>2)</sup> bezw. Bernthsen und Mettegang<sup>3)</sup> aus den entsprechenden Benzoylpicolinsäuren darstellten. 1889 begann Engler das Studium der Pyridylketone, wozu er durch die Aussicht veranlasst wurde, durch Reduction derselben zu Alkinen zu gelangen, die nahe Beziehungen zu in der Natur vorkommenden Alkaloiden hätten, und zwar bediente er sich, da die Ketonisirung des Pyridins mit Säurechloriden nach Friedel-Crafts nicht zum Ziele führte, der Destillation der Calciumsalze der Pyridincarbonsäuren mit den Calciumsalzen der Fettsäuren. Auf diese Weise gelang es ihm, das  $\beta$ -Methyl-

<sup>1)</sup> Vergl. A. Wróblewski. Zur Classification der Proteïnstoffe. Centrbl. f. Physiol. 1897, 306.

<sup>2)</sup> Monatshefte 4, 436 u. 479. <sup>3)</sup> Diese Berichte 20, 1208.