

Über das Alkophyr und über die wahre und die sogenannte Biuretreaction.

Von Ernst Brücke.

(Vorgelegt in der Sitzung am 8. März 1883.)

I.

In diesen Berichten Bd. 61, Abth. 2, S. 250—262 (10. März 1870), habe ich eine kurze Abhandlung veröffentlicht, in der ich eine Substanz beschrieb, welcher ich den vorläufigen Namen Alkophyr gab, und welche in intensiver Weise die sogenannten Peptonreaction oder Biuretreaction zeigte. Beide Namen werden bekanntlich promiscue gebraucht, nachdem man fand, dass Verdauungsproducte, die man als Peptone bezeichnete, sich mit Kali und Kupferoxydsalzen in ganz ähnlicher Weise rötheten, wie dies von Biuretlösungen bekannt war.

Sollte Biuret oder ein leicht in Biuret überzuführender Körper an dieser Reaction theilhaftig sein, so würde dies in Zusammenhang gebracht werden müssen mit der auffallend rasch eintretenden Vermehrung der Harnstoffausscheidung nach vermehrter Eiweisszufuhr; andererseits müsste es in Zusammenhang gebracht werden mit der von mehreren Seiten gemachten Angabe, dass Zufuhr von Ammoniaksalzen die Menge des ausgeschiedenen Harnstoffes vermehrt.

Dass nun Biuret als solches in dem von mir dargestellten Alkophyr enthalten sei, war schon nach dem bisher Bekannten nicht zu vermuthen; denn das Biuret wird weder durch Phosphorwolframsäure, noch durch Phosphormolybdänsäure, noch durch Jodquecksilberkalium gefällt. Andererseits habe ich gefunden, dass die Analogien zwischen der Peptonreaction und der Biuretreaction weiter gehen, als man bis jetzt gewusst hat. Wenn ich durch eine mittelst Kali und Kupferoxyd roth gefärbte Biuretlösung anhaltend Kohlensäure leitete, so wurde die Flüssigkeit lasurblau und jede Spur von Röthlich war verschwunden; durch

Ätzkali aber liess sich die rothe Farbe wieder herstellen. Ganz ebenso verhielt sich eine Alkophyrlösung. Es ist ferner bekannt, dass man Biuret in concentrirter Schwefelsäure auflösen kann und wiederdaraus gewinnen; ohne dass es in seinen Eigenschaften verändert ist. Ich habe nun auch Alkophyr in kalter concentrirter Schwefelsäure aufgelöst und eine Substanz aus der Lösung wieder gewonnen, die sich mit Kali und schwefelsaurem Kupferoxyd noch ebenso röthete wie Alkophyr und wie Biuret.

Es schien nun nicht unwahrscheinlich, dass im Alkophyr ein Atomcomplex enthalten sei, der die besagte Reaction bedingt, und dass dieser identisch sei, mit dem Atomcomplex, der die wahre Biuretreaction hervorruft. Heutzutage zweifelt Niemand mehr daran, dass die Tyrosinreactionen des Eiweisses von einem aromatischen Atomcomplex herrühren, der auch im Tyrosin enthalten ist und der nach O. Nasse's Beobachtungen über die Verbreitung jener Reactionen in allen einfach hydroxylierten aromatischen Verbindungen vorausgesetzt werden muss.¹ So konnte es nicht unmöglich scheinen, Alkophyr oder einen Bestandtheil desselben in Biuret überzuführen und dadurch einen Zusammenhang zwischen der wahren und der sogenannten Biuretreaction nachzuweisen.

Meine Versuche in dieser Richtung haben aber bis jetzt nur negative Resultate ergeben. Ich habe weder Biuret in Substanz erhalten, noch auch eine charakteristische, eine wahre Biuretreaction.

Die gewöhnliche Art die Biuretreaction anzustellen, besteht bekanntlich darin, dass man die Biuretflösung mit Kali versetzt und eine geringe Menge Kupferoxydlösung hinzufügt, dann erscheint die rothe Färbung. Diese Reaction gibt das Alkophyr in derselben Weise.

Man kann aber die Biuretreaction in einer anderen Gestalt anstellen, in der sie in ihrer Eigenart viel deutlicher hervortritt, indem man die schön roth gefärbte Kupferverbindung, auf welcher sie beruht, zur Krystallisation bringt. Man fällt Kupfervitriollösung mittelst Kalilösung und wäscht das gefällte Kupferhydroxyd aus. Dann bringt man etwas davon noch feucht auf einen Objectträger, fügt einige Krystalle von Biuret hinzu, bedeckt

¹ Vergl. auch L. v. Barth. d. B. 52, Abt. 2, S. 162.

es mit einem Deckglase und füllt den noch übrigen Raum unter dem letzteren mit einem Tropfen Kalilösung aus. Das Biuret löst sich in der Kalilauge auf, und da, wo diese Lösung mit dem Kupferhydroxyd in Berührung ist, löst sie auch dieses, und zwar mit der bekannten rothen Farbe auf.

Wenn man nun ein solches Präparat tagelang liegen lässt, so wittern am Rande rothe Krystalle aus; sie sind theils zu Büscheln vereinigt, theils liegen sie unregelmässig durcheinander. Von diesen gehen ähnliche rothe Krystalle aus, die sich in dem Raum zwischen Deckglas und Objectträger erstrecken. Diese sind besser ausgebildet, meist schienenförmig, mit Endflächen, welche mit den beiden Langseiten ungleiche Winkel bilden. Ich fand an solchen, die mir horizontal zu liegen schienen und sich also allein für Messungen eigneten, für den spitzen Winkel Werthe zwischen 79° und 80° , beziehungsweise für die stumpfen Werthe zwischen 101° und 100° . Diese Krystalle zeigen einen auffallenden Pleurodichroismus. Sie sind nur schön roth, wenn man sie von der Fläche sieht. Sind sie um 90° gewendet, so zeigen sie eine blasse gelbgrünliche Färbung. Ist Biuret im Ueberschuss vorhanden, so dass auch dieses herauskrystallisirt, so erscheinen sie in ihrer gewöhnlichen Farbe neben den farblosen Krystallen des Biuret, und zwar häufig so, dass sie denselben aufgewachsen sind. Alle diese Erscheinungen sind so charakteristisch, dass man nicht wohl etwas Anderes damit verwechseln kann.

Ich habe diese Krystalle später noch in einer anderen Weise dargestellt, die mir empfehlenswerther zu sein scheint. Ich versetzte eine Kalilösung mit wenig Glycerin und fügte dann nur so viel von einer verdünnten Lösung von Kupfersulfat hinzu, dass ich eine tiefblaue Flüssigkeit aber keinen Niederschlag erhielt. In dieser Flüssigkeit löste sich Biuret mit schön rother Farbe und beim langsamen Verdunsten schieden sich unter dem Deckglase die erwähnten rothen Krystalle aus.

Es ist mir bisher nicht gelungen, aus dem Alkophyr ein Product zu erhalten, welches mir solche Krystalle gegeben hätte. Wenn nun auch meine Versuche in dieser Richtung vorläufig resultatlos geblieben sind, so habe ich doch einige anderweitige Beobachtungen gemacht, welche ich hier mittheilen will, damit sie zur Kenntniss Derjenigen kommen, welche sich mit der

chemischen und der physiologischen Untersuchung der Producte der Pepsinverdauung beschäftigen.

II.

Das Rohmaterial zu meinen Versuchen verschaffte ich mir in folgender Weise. Es wurde eine Verdauungsflüssigkeit angefertigt, bei der nur Phosphorsäure, keine Chlorwasserstoffsäure, zur Anwendung kam, und in dieser wurde gut mit Wasser ausgewaschenes Blutfibrin verdaut. Selbstverständlich wurde bei allen Versuchen nur Verdauungsflüssigkeit angewendet, welche selbst die Biuretreaction nicht gab. Die Chlorwasserstoffsäure wurde vermieden, wegen der Löslichkeit der Chloride in Weingeist. Die Verdauung wurde so lange fortgesetzt bis keine Zunahme in der Intensität der sogenannten Biuretreaction mehr bemerkt wurde. Hierauf wurde die Flüssigkeit filtrirt und mit kohlen-saurem Kalk abgedampft. Der letztere war erhalten durch Fällen von Chlorkaliumlösung mit kohlen-saurem Natron und war vollständig ausgewaschen. Der Abdampfungsrückstand wurde mit Weingeist ausgezogen, filtrirt und vom Filtrate der Alkohol wieder abdestillirt. Der Rückstand in der Retorte war noch flüssig, wurde in eine flache Abrauchschale ausgeleert und auf dem Wasserbade zu Trockene gebracht.

Hier wie überall bei dieser Arbeit bediente ich mich, wenn im Texte nichts Anderes bemerkt ist, eines Weingeistes, der mit dem österreichischen Alkoholometer untersucht zwischen 94 und 95 Volumprocent zeigte.¹ Dieses Alkoholometer bezieht seine

¹ Ein solcher Weingeist ist keineswegs der stärkste, in dem sich das Alkophyr noch löst. Ich habe mich davon in folgender Weise überzeugen können. Ich hatte einmal Alkophyr mittelst Ätzbaryt vom Phosphorwolframniederschlag abgetrennt und filtrirt. Der Filtrerrückstand wurde nicht ausgewaschen, sondern Wochenlang mit dem Filter an der Luft erst bei gewöhnlicher Temperatur, dann in der Wärme getrocknet. Schliesslich leerte ich das Pulver in einen dickwandigen Glaskolben und auch das zerschnittene Filtrum, dann trocknete ich noch im Luftbade, anfangs bei 100° dann bei 110° C. Der Kolben wurde verkorkt, rasch ausgekühlt, und nachdem dies geschehen war unter den Vorstoss eines Kühlers gestellt, der eben über gebrannten Kalk destillirten Alkohol condensirte. Nachdem sich der Kolben hinreichend gefüllt hatte, wurde er luftdicht verkorkt und mit einer Platte von Naturkautschuck verbunden. Nach drei Tagen, während ich den Inhalt des Kolbens öfter bewegt hatte, wurde filtrirt, ein Theil des

Angaben auf Alkohol von 0.7951 spec. Gewicht bei 12° R. Ich will auch in dem Folgenden den Namen Alkophyr für einen in starkem Weingeiste löslichen, die Biuretreaction gebenden Körper beibehalten, rechne aber ebensowenig wie früher darauf, reine Substanz in Händen gehabt zu haben; denn die Fällungen mit Phosphorwolframsäure, Phosphormolybdänsäure oder Jodquecksilberkalium können ebensowenig zur Darstellung, als zur Charakteristik einer solchen dienen, da sie so zahlreiche Körper von ganz verschiedener chemischer Beschaffenheit niederschlagen.

Indem ich die bei verschiedenen Versuchen das Alkophyr weiter zu reinigen erhaltenen Producte stets mit Kali und Bleiglätte auf ihren Gehalt an durch Blei direct nachweisbaren Schwefel probirte, fiel es mir auf, dass das Resultat sehr verschieden ausfiel, und in einem Falle so unbedeutend, dass ich vermuthen musste, es sei aus den Verdauungsproducten ein Körper zu erhalten, der mit Bleiglätte und Kali kein Schwefelblei gibt und doch die Biuretreaction zeigt.

Einen solchen Körper habe ich in der That auf folgendem Wege gewonnen:

Ich löste rohes Alkophyr, wie ich es auf die oben erwähnte Weise erhalten hatte, in Wasser auf und fällte mit einer ziemlich concentrirten Lösung von Platinchlorid in Wasser in grösseren Intervallen so lange aus, als noch etwas niedergeschlagen wurde.

Filtrats abgedampft, der andere in einem Kolben luftdicht verschlossen. Der nur geringe Abdampfungsrückstand gab die Alkophyrreaction. Ich dachte nun es könne etwa eine Barytverbindung vorhanden gewesen sein, welche sich in Alkohol leichter löste als das Alkophyr selbst, aber das war nicht der Fall, wenigstens war es nicht die Ursache des erhaltenen Resultates. Von dem in einem Kolben verschlossenen Reste des Filtrats nahm ich eine Portion und versetzte sie mit wenigen Tropfen concentrirter Schwefelsäure; dann goss ich davon in Pausen kleine Quantitäten in den Kolben zurück bis ein herausgenommener Tropfen auf feuchtes Lakmuspapier geworfen einen entschieden rothen Fleck hervorbrachte; aber es entstand keinerlei Fällung oder Trübung, auch nicht vorübergehend.

Nun wurde der Weingeist auf seinen Gehalt untersucht, der im weiteren Verlaufe der Destillation gewonnen und in derselben Weise aufbewahrt war, der also sicher nicht stärker sein konnte als der, welcher hier zur Alkophyrextraction gedient hatte. Er zeigte am österreichischen Alkoholometer nahezu 99 Volumprocent an, etwa 98.8.

Nachdem der Niederschlag sich vollständig abgesetzt hatte wurde filtrirt. In das Filtrat wurde ein Bleistab gestellt, der so lange darin stehen blieb, bis alles Platin reducirt war. Es wurde von neuem filtrirt. Das Filtrat wurde mit viel Alkohol versetzt, wobei sich eine Bleiverbindung ausschied. Von dieser wurde abfiltrirt. Das Filtrat wurde nun mit basischessigsäurem Blei vollständig ausgefällt und vom Niederschlage abfiltrirt. Das Filtrat gab auf Zusatz von Ammoniak noch wieder einen Niederschlag, der aber wenig voluminös war. Auch von diesem wurde abfiltrirt und das Filtrat mit Schwefelsäure entbleiet. Die vom Bleisulfat abfiltrirte Flüssigkeit wurde mit Ammoniak neutralisirt, der Alkohol abdestillirt und der Rest zur Trockne eingedampft. Schon der so erhaltene Rückstand verhielt sich beim Kochen mit Bleiglätte und Kali vollkommen negativ. Es bildete sich auch nicht die geringste Spur von Schwefelblei. Dass keine künstliche Entschwefelung stattgefunden hatte war gewiss; denn die bleihaltige ammoniakalische Flüssigkeit war auch in dicken Schichten wasserhell geblieben und die Bleiniederschläge waren vollkommen weiss. Der Körper wurde noch weiter gereinigt. Er wurde mit Phosphorwolframsäure gefällt, dann der ausgewaschene Niederschlag mit Ätzbaryt zersetzt, und zwar hier wie anderswo bei dieser Arbeit in gewöhnlicher Zimmertemperatur. Es wurde filtrirt, das Barium mit kohlen-säurem Ammoniak gefällt, vom Niederschlage abfiltrirt und das Filtrat auf dem Wasserbade zur Trockne gebracht.

Der so erhaltene Rückstand war anscheinend wenig hygroskopisch. Nachdem er in dünner Schicht mehr als 24 Stunden in der Abrauchschale nur mit einer Glasplatte bedeckt gestanden hatte, zeigte er sich so hart und spröde, dass beim Aussprengen mit einem scharfen Meissel die Splitter weit umherflogen. Er gab, in Wasser gelöst, eine sehr intensive Biuretreaction, liess bei Zusatz von mehr Kupferlösung den Überschuss an Kupferhydroxyd ungelöst, und seine Farbe ging nicht von Purpur in Violett über.

Nach Schmelzen mit Salpeter und Kali konnte ein Schwefelgehalt mittelst salpetersäurem Baryt nachgewiesen werden, und auch die Untersuchung mittelst Natrium und Nitroprussidnatrium gab ein positives Resultat. Ein Alkophyr mit ähnlichen aber nicht ganz gleichen Eigenschaften habe ich auch noch auf anderem

Wege erhalten. Ich kochte eine Portion des erwähnten mit Kalkcarbonat abgedampften Verdauungsgemisches, die schon einmal mit kaltem Weingeist ausgezogen war, mit Weingeist aus und liess den abfiltrirten Weingeist erkalten. Von dem, was sich beim Erkalten ausgeschieden hatte, filtrirte ich ab und fällte das Filtrat mit einer weingeistigen Bleilösung, die ich erhalten hatte durch Digeriren von Bleizucker mit Weingeist bei gewöhnlicher Zimmer-temperatur.

Von dem Bleiniederschlage wurde abfiltrirt und das Filtrat nochmals mit derselben weingeistigen Bleilösung gefällt, nachdem ich in dieselbe vorher trockenes Ammoniakgas geleitet hatte, das aus Salmiak und Ätzkalk bereitet und über Ätzkalk getrocknet war.

Von dem jetzt entstehenden Niederschlage wurde, nachdem ebenso wie das erste Mal vollständig ausgefällt war und sich die Flüssigkeit vollständig geklärt hatte, abfiltrirt. Das Filtrat wurde mit Schwefelsäure entbleiet, vom schwefelsauren Blei abfiltrirt, das Filtrat mit Ammoniak neutralisirt, nochmals filtrirt und vom Filtrate der Alkohol abdestillirt. Der Rückstand wurde, nachdem in der Abrauschale der Rest des Alkohols verjagt war, mit Wasser versetzt, filtrirt, mit Phosphorwolframsäure gefällt, der Niederschlag mit Ätzbaryt zersetzt, filtrirt und in das Filtrat Kohlensäure eingeleitet. Dann wurde vom Bariumcarbonat abfiltrirt und das Filtrat eingedampft.

Auch dieses Alkophyr war frei von sogenannten bleischwärendem Schwefel, enthielt aber noch solchen, der durch Schmelzen mit Salpeter und Kali und der mittelst Nitroprussidnatrium nachgewiesen werden konnte.

Auch dieses Alkophyr gab nur Purpurfarbe bei der Biuret-reaction als schon trotz vielfachen Umschütteln sich blaue Flocken von Kupferhydroxyd zu Boden senkten. Wenn ich aber grosse Mengen von Kupfersulfat hinzugesetzt hatte, so dass ein reichlicher Niederschlag von Kupferhydroxyd den unteren Theil des Reagirglases füllte, so blieb die darüberstehende Flüssigkeit nach dem Umschütteln violett. Ich weiss nicht, ob dies davon herrührte, dass das Kupfer eine neue Verbindung einging, oder davon, dass unsichtbar kleine Theile von Kupferhydroxyd suspendirt blieben, doch ist mir Letzteres nicht wahrschein-

lich, da sich das Kupferhydroxyd sehr vollständig abzusetzen pflegt.

Ich weiss auch nicht ob das mit Platinechlorid ausgefällte Alkophyr sich ebenso verhält, denn ich habe den Versuch mit demselben nicht in dieser Weise angestellt und beide Präparate erwiesen sich als nicht identisch. Die wässrige Lösung des zuletzt erhaltenen wurde noch durch Platinechlorid gefällt. Anfangs löste sich zwar der Niederschlag wieder auf, bei Zusatz von mehr Platinechlorid aber wurde er bleibend. Ich kann deshalb das Umgehen der Ausfällung mit Platinechlorid bei der Reinigung des Alkophyrs nicht empfehlen, obgleich auch ohne dieselbe ein Product erhalten werden kann, welches frei ist von bleischwärzendem Schwefel.

Immerhin bleibt bei dem Mangel sonstiger Hilfsmittel das Verhalten einer Alkophyrlösung gegen Kupferoxyd und Kali werthvoll für die Beurtheilung ihrer Reinheit. Alkophyrlösungen die mit Kali versetzt, beim successiven Hinzufügen einer verdünnten Kupfersulfatlösung nicht nur von Roth in Purpur, sondern auch von Purpur in Violett übergehen, sind immer unrein; denn es gibt, wie wir gleich sehen werden, Alkophyrlösungen, welche diesen Übergang nicht zeigen, sondern noch vor demselben jeden Überschuss von Kupferhydroxyd ungelöst ausscheiden. Da es sich hier um Farbenunterschiede handelt, so will ich den Namen Purpur strenger begrenzen. Unter Purpur verstehe ich eine Farbe, die nicht im Spectrum vorkommt, die spectral nur erzeugt werden kann, wenn man zwei Spectra in der Art zur theilweisen Deckung bringt, dass das rothe Ende des einen über das violette des anderen fällt. Auch hat man wohl auf die Farbe des Hintergrundes zu achten, auf den man durch die Lösung sieht. Zweckmässig stützt man das Reagirglas auf ein weisses Papier, und betrachtet die Färbung, welche auf dem Papier durch das durch die Lösung einfallende Licht entsteht. Leider kann man nicht sagen, dass eine Alkophyrlösung, die bei dieser Probe ein entsprechendes Verhalten zeigt, rein sei. Aus einer weit vorgeschrittenen Eiweissverdauung fällte ich den grösseren Theil des Fällbaren mit Phosphorwolframsäure, filtrirte und fällte den Rest. Diesen zweiten Niederschlag zersetzte ich mit Ätzbaryt, fällte den überschüssigen Baryt mit schwefelsaurem Natron,

filtrirte und machte mit einer Probe des Filtrats die Biuretreaction. Ich fügte so viel Kupferlösung hinzu, dass ein etwa 2 Centimeter hoher Niederschlag am Boden lag, und doch blieb die Flüssigkeit trotz allen Schüttelns purpurfarben, das heisst röther als das spectrale Violett, wenn sie auch mehr zum Violett neigte als bei geringerem Kupferzusatz. Sie war nicht reine Alkophyrlösung, denn sie war nicht frei von bleischwärendem Schwefel und wurde, abgedampft und in Weingeist wieder gelöst, von der weingeistigen ammoniakalischen Bleilösung noch gefällt. Ihr gutes Verhalten bei der Biuretreaction rührte wahrscheinlich davon her, dass jedes Abdampfen vermieden war. Bei der vorerwähnten sorgfältiger gereinigten Alkophyrlösung waren zwar die violettfärbenden Verdauungsproducte weggeschafft, aber es konnten beim Abdampfen neue violett oder blau färbende Substanzen entstanden sein.

Die Flüssigkeiten, welche durch Zersetzung der bei der Reinigung erhaltenen beiden Bleiniederschläge gewonnen waren, wurden gleichfalls untersucht. Bei beiden liess sich die Farbe, die bei Zusatz von Kali und Kupfersulfat entstand, in tiefes Violett überführen, noch ehe ein ungelöster Rest von Kupferhydroxyd blieb. Dies war auch noch der Fall nachdem die Flüssigkeiten durch Phosphorwolframsäure gefällt und die Niederschläge mittelst Ätzbaryt wieder zersetzt waren. Die vom ersten Bleiniederschlage gewonnene Flüssigkeit ward, wenn sie mit Essigsäure angesäuert wurde, noch durch Blutlaugensalz getrübt, die vom zweiten Bleiniederschlage gewonnene aber nicht. Der oder die aus letzterer durch Phosphorwolframsäure gefällten Körper mussten also zu den sogenannten Peptonen gerechnet werden, und doch verhielt sich wenigstens einer unter ihnen bei der Biuretreaction wesentlich anders als das Alkophyr, wie aus dem Gesagten hervorgeht.

Wenn ich hier und anderswo von sogenannten Peptonen rede, so geschieht dies desshalb, weil nicht alle Autoren mit diesem Namen eine und dasselbe bezeichnet haben. Die Berechtigung des Ausdrucks als einer Bezeichnung für Verdauungsproducte, die gewisse Eigenschaften der Eiweisskörper verloren haben, andere noch besitzen, will ich damit nicht anfechten.

Der in Rede stehende Niederschlag enthielt auch noch bleischwärenden Schwefel, aber nur in geringer Menge. Das aus

der mit essigsäurem Blei und Ammoniak ausgefallten weingeistigen Lösung erhaltene Alkophyr aber gar keinen. Überhaupt schwefelfrei war es, wie ich schon erwähnt habe, nicht; denn sowohl mittelst Nitroprussidnatrium als auch durch Schmelzen mit Salpeter und Kali konnte ich Schwefel nachweisen. Für letzteres Verfahren hatte ich eine Portion Alkophyr in Wasser gelöst, mit kohlensäurem Ammoniak abgedampft, dann wieder gelöst, filtrirt und endlich wieder zur Trockenheit gebracht. Es geschah dies um die Substanz vollständig barytfrei zu machen. Durch blosses Einleiten von Kohlensäure gelingt dies nicht.

Eine andere Probe desselben Alkophyrs löste ich in Wasser, demich Chlorwasserstoffsäure und einige Tropfen einer Lösung von salpetersaurem Baryt zusetzte, kochte sie damit auf und erhielt sie dann im Wasserbade noch durch fast drei Stunden bei 100°. Die Flüssigkeit wurde sehr dunkel, fast schwärzlich und zeigte sich beim Verdünnen tief violett in derselben Tinte, die man erhält, wenn man Eiweisskörper mit starker Salzsäure behandelt, aber ein Niederschlag setzte sich nicht ab, weder ein solcher von schwefelsaurem Baryt, noch ein anderer. Mit Kali übersättigt entfärbte sich die Flüssigkeit, und als ich Kupferlösung hinzufügte, wurde sie purpurviolett, bei weiterem Zusatz von Kupfersulfat aber indigoblau. Es war also hier eine neue Substanz entstanden, welche Kupferhydroxyd mit blauer Farbe auflöste. Diese Substanz konnte nicht Ammoniak sein, denn Nesslerisches Reagens wies nur geringe Spuren desselben nach.

Eine andere Probe versetzte ich mit Salpetersäure und einigen Tropfen einer Lösung von salpetersaurem Baryt. Als diese gekocht wurde, liess sie anfangs ein lichtiges, dann schön goldgelbes Sediment fallen. Die darüberstehende Flüssigkeit war gelb. Als ich eine Probe derselben mit Kali übersättigte ward sie tief orange, entsprechend der sogenannten Xanthoproteinreaction. Als ich nun noch Kupferlösung hinzufügte, löste sich das gebildete Hydroxyd nicht und es entstand keine rothe Farbe.

Die leichte Zerstörbarkeit der Alkophyrreaction durch Salpetersäure ist bemerkenswerth, weil dieselbe sonst eine beträchtliche Widerstandsfähigkeit zeigt. Sie wird zwar durch Kochen mit Schwefelsäure zerstört, widersteht aber, wie wir gesehen

haben, bis zu einem gewissen Grade der kalten concentrirten Schwefelsäure. (S. 2).

Eine wässerige Lösung von noch nicht gereinigtem Alkophyr habe ich 15 Minuten lang mit viel Ätzbaryt gekocht und doch nachher noch die Biuretreaction erhalten. Eine andere Portion derselben wässerigen Lösung habe ich mit dem gleichen Volum rauchender Salzsäure versetzt, aufgeköcht und durch fünf Minuten im schwachen Sieden erhalten. Als ich die Säure durch Hineinwerfen von Stücken von Natriumcarbonat getilgt hatte und Ätzkali und Kupfersulfat hinzufügte, trat die Reaction noch ein.

So lange man keine verlässlicheren Mittel zur Reindarstellung des Alkophyrs hat als jetzt, wird es kaum an der Zeit sein, dasselbe einer Elementaranalyse zu unterwerfen. Sollte aber Jemand eine solche anstellen wollen, so wird er sich immer von zwei Dingen überzeugen müssen, von dem entsprechenden Verhalten bei der Biuretreaction (Siehe Seite 8) und davon, dass seine Substanz keinen bleischwärenden Schwefel mehr enthält, ohne dass sie vorher künstlich entschwefelt worden wäre. In letzterer Beziehung darf man sich nicht damit begnügen, dass die Flüssigkeit sich beim Kochen mit Kali und Bleiglätte nicht rauchig trübt, man muss die Probe erkalten lassen und sich überzeugen, dass sich dann um die am Boden des Reagirglases liegende rothe Bleiglätte kein grauer oder brauner, sondern ein rein weisser oder gelblich weisser Hof bildet, oder gar keiner. Mit Bezug auf die Rothfärbung durch Rohrzucker und Schwefelsäure finde ich in meiner Publication vom 10. März 1870 folgende Angabe: „Was diese letzte Reaction anlangt, so habe ich zwar in einigen Fällen ein positives Resultat erhalten, obgleich Blutlaugensalz kein Eiweiss mehr anzeigte; aber in anderen Fällen erhielt ich ein entschieden negatives Resultat, und auch in denen, in welchen die Färbung eintrat, war sie viel weniger intensiv als man sie mit Eiweisskörpern erhält. Ich muss desshalb annehmen, dass sie von einer Verunreinigung mit einer den Eiweisskörpern noch näher stehenden Verbindung herrührte, welche abzuschneiden ich vorläufig kein Mittel besass.“

Die jetzt von mir darauf untersuchten Alkophyrproben gaben die Reaction sämmtlich, darunter auch eine, die völlig frei war

von bleischwärendem Schwefel. Das behufs der Reindarstellung mit Platinchlorid ausgefällte Alkophyr habe ich auf diese Reaction nicht geprüft, indem ich damals andere Zwecke mit demselben verfolgte und später kein Material mehr hatte.

Die Eiweissreaction von Adamkiewicz mittelst Eisessig und Schwefelsäure habe ich mit mehreren Proben von Alkophyr angestellt und sie immer erhalten. Die Fluorescenz war immer sehr schön; aber als Farbe des durchfallenden Lichtes erhielt ich meist nur Hochgelb und Orange, einmal Roth, während mir natives Hühnereiweiss bei gleicher Behandlung eine schöne Purpurfarbe gab. Ich kann aber hieran keinerlei Folgerung knüpfen, da Adamkiewicz nachgewiesen hat, dass nicht nur die Art des Eiweisskörpers, sondern auch die relative Menge der Zusätze auf die Farbe von bestimmendem Einfluss ist. (Farbentreactionen des Albumin im Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmacologie Bd. III. (1875) S. 412.)

III.

Zu den bisher noch nicht bekannten Eigenschaften des Alkophyrs gehört seine Löslichkeit in käuflichem, weingeisthaltigem Amylalkohol.

Wenn man trockenes Alkophyr mit käuflichem Amylalkohol erwärmt, so nimmt derselbe davon nur sehr wenig auf; viel grössere Mengen aber lassen sich in den Amylalkohol hineinbringen, wenn man eine kalte concentrirte weingeistige Lösung von Alkophyr mit dem gleichen Volum Amylalkohol versetzt, so lange im Schwefelsäurebade erhitzt bis der Siedepunkt auf 108° C. hinaufgegangen ist und dann erkalten lässt. Der grösste Theil des Alkophyrs scheidet sich in Krusten aus, die aus lauter kleinen, grösstentheils mit einander verschmolzenen, nicht doppelbrechenden Kugeln bestehen; ein nicht unbeträchtlicher Rest aber bleibt im Amylalkohol zurück. Er kann mittelst Wasser aus demselben ausgeschüttelt werden und bleibt beim Verdunsten des Wassers als eine bernsteingelbe, durchsichtige, firnissartige Masse zurück. Handelt es sich nur darum den Alkophyrgehalt des Amylalkohols nachzuweisen, so setzt man zu einer Probe in einer Eprouvette etwas verdünnte Kalilösung und einige Tropfen

einer sehr verdünnten Lösung von Kupfersulfat. Beim Umschütteln tritt die Reaction sofort ein.

IV.

Ich will demnächst aufmerksam machen auf die Schwierigkeiten, welche der scharfen Trennung der sogenannten Peptonreaction und der unter gleichen Bedingungen eintretenden Eiweissreaction entgegenstehen. Man kann sich, wie dies auch schon von anderer Seite bemerkt worden ist, nicht damit begnügen zu sagen: Eiweisslösungen färben sich mit Kali und Kupferoxydlösung violett, Peptonlösungen aber roth. Die Farbe hängt, wie wir gesehen haben, in hohem Grade ab von der Menge von Kupferlösung, welche man hinzusetzt, indem die Farbe durch weiteren Zusatz der letzteren mehr in Violett übergeht. Möglichst gereinigtes Alkophyr färbt sich allerdings auch bei Zusatz von mehr Kupfer nicht violett, sondern nur purpurfarben, indem weiterer Zusatz von Kupfersulfat nur einen ungelöst bleibenden Niederschlag von Kupferhydroxyd hervorruft. Aber Verunreinigungen können hierin überaus leicht eine Änderung hervorbringen. Es ist bekannt, dass es eine sehr grosse Menge von Substanzen gibt, welche das Kupferhydroxyd mit blauer Farbe lösen, und die Anwesenheit einer solchen kann bei Zusatz von mehr Kupfer die Farbe in Violett, ja selbst in Blau überführen.

Ein nahe liegendes Beispiel hiefür ist das Ammoniak. Man füge zu einer Alkophyrlösung Kali und Kupfersulfat, aber von letzterem so wenig, dass kein ungelöster Niederschlag bleibt. Dann setze man Ammoniak hinzu; es ändert sich dadurch die Farbe nicht. Fügt man dann aber wiederum Kupfersulfat in kleinen Portionen hinzu, so geht die Farbe in Violett über und kann sogar, wenn die hinreichende Menge von Ammoniak vorhanden ist, in Blau übergeführt werden.

Dasselbe Resultat erhält man, wenn man statt des Ammoniaks Glycerin oder Rohrzucker oder weinsaures Kali-Natron anwendet. Das Gleiche muss bei allen Körpern eintreten, die Kupferhydroxyd mit blauer Farbe auflösen, nur könnte es geschehen, dass sie die Biuretreaction von vornherein stören. Dies würde nämlich dann der Fall sein, wenn sie stärkere Verwandtschaft zum Kupfer hätten, als das aufzusuchende oder quantitativ zu bestimmende Pepton.

Andererseits kann man aber auch von Eiweisskörpern, die entschieden nicht Peptone sind, eine rothe Reaction bekommen. Natives Eiweiss färbt sich in seinen Lösungen mit Kali und Kupfersulfat violett; wenn man aber von letzterem sehr wenig hinzusetzt, so bemerkt man von diesem Violett nichts, sondern nur eine sehr blasse röthliche Färbung. Hat man diese in einer grösseren Menge von Eiweisslösung hervorgebracht und giesst dieselbe in ein hinreichend grosses Gefäss mit parallelen Wänden, so dass man durch eine hinreichend dicke Schicht hindurchsieht; so wird die Farbe dadurch nicht violett, sondern sie bleibt purpurroth und ist nun tief und gesättigt wie die, welche man vom Alkophyr erhält. Wenig Kupferlösung also färbt das gewöhnliche Eiweiss roth, erst mehr Kupferlösung färbt es violett.

Dieser Versuch ist noch mit einer Quelle der Täuschung behaftet, wenn auch in unserem Falle, wie wir sehen werden, das Resultat nicht aus derselben zu erklären ist. Eiweiss, dem man Kali hinzugefügt hat, gibt mehr oder weniger gelbliche Lösungen, die also an und für sich den blauen und violetten Theil des Spectrums stärker absorbiren, und bei der Beobachtung durch dicke Schichten kann schon dies dazu beitragen die Farbe mehr roth, weniger violett erscheinen zu lassen. Auch erwies sich die Farbe nicht haltbar, denn das sich bildende Schwefelkalium verwandelte das Kupfer in Schwefelkupfer.

Ich löste desshalb eine grössere Menge nativen Eiweisses in verdünnter Kalilauge und liess die Lösung mehrere Wochen lang unter häufigem Umrühren an der Luft stehen. Dann fällte ich mit Salzsäure und löste den von der Flüssigkeit getrennten und ausgewaschenen Niederschlag nochmals in Kalilauge. Ich erhielt nun eine farblose Flüssigkeit und auch diese gab bei vorsichtigem Kupferzusatz eine purpurrothe, keine violette Farbe. Indessen hatte die Substanz doch noch unoxydirten Schwefel enthalten und nach längerem, tagelangem Stehen färbte sich der unterste Theil der Flüssigkeit bräunlichgelb. Beim Umrühren ging in Folge davon die Färbung noch mehr in Roth über und man konnte nun noch etwas Kupferlösung hinzusetzen ohne sie in Violett überzuführen. Sie wurde gesättigter, aber sie blieb purpurroth.

Wir haben hier wieder ein Beispiel, dass Absorption im stärker brechbaren Theile des Spectrums die Reaction der des Alkophyrs ähnlicher macht. Die Färbung der Flüssigkeit nach dem Versetzen mit Kali ist also ein Factor, mit dem man beim Anstellen der Reaction zu rechnen hat, nicht minder, sind es die Veränderungen, welche im Laufe der Zeit durch die zugesetzten Reagentien hervorgebracht werden können.

Man muss mit diesen Factoren um so sorgfältiger rechnen, als der Uebergang der Färbung ins Violette zur Grenzreaction beim Titriren gemacht wird. Ohne Musterscala ist diese Grenze an und für sich schwer zu treffen, da der Uebergang von Roth durch Purpur in Violett ein continuirlicher ist. Aber auch, wenn eine Musterscala zu Gebote steht, kann die Eigenfarbe der Flüssigkeit eine beträchtliche Verschiebung, einen beträchtlichen Fehler verursachen.

Man sieht aus dem bisher Gesagten, mit welchen Schwierigkeiten man bei den colorimetrischen Peptonbestimmungen zu kämpfen hat, wenn zugleich Eiweisskörper vorhanden sind oder vorhanden sein können. Diese Unsicherheit wird aber nicht allein durch Eiweiss hervorgebracht, sondern auch durch Leim. Leim verhält sich darin dem Eiweiss ganz ähnlich, dass die Farbe bei Zusatz von sehr wenig Kupferlösung wenig gesättigtes Purpurroth ist und dass sie bei Zusatz von mehr Kupferlösung gesättigter wird und dabei in Violett übergeht.

Alle diese Dinge können berücksichtigt werden und sind berücksichtigt worden, denn man hat ja mit aller Sorgfalt gesucht das Eiweiss zu entfernen, beziehungsweise die oder den Körper, welche man nach den gangbaren Kennzeichen als Peptone bezeichnete, zu isoliren; aber in Beziehung auf eine Schwierigkeit, welche der quantitativen Bestimmung auf dem erwähnten colorimetrischen Wege entgegensteht, weiss ich keinen Rath.

Jene Bestimmung setzt voraus, dass wir wissen, dass nur eine einzige Substanz in der Flüssigkeit, diejenige eben, welche wir bestimmen wollen, das Kupfer unter Bildung der rothen Verbindung aufnimmt, sie setzt voraus, dass nicht etwa mehrere verschiedene Substanzen vorhanden sind, welche das Kupfer unter Bildung von rothen Verbindungen mit verschiedenen Äquivalenten auf-

nehmen. Darüber haben wir aber, wie wir später sehen werden, keine sichere Kenntniss, ja wir haben sogar Grund daran zu zweifeln.

Um die Kupferreaction des Eiweisses und die der Verdauungsproducte bei gleichen Kupfermengen zu vergleichen stellte ich folgenden Versuch an:

Ich säuerte von zwei Portionen Eiweisslösung die eine mit Phosphorsäure, die andere mit Chlorwasserstoffsäure an und theilte jede in zwei Hälften, deren eine ich mit einer abgemessenen Menge von Chlorwasserstoffsäure von 1 pro mille, die andere mit der gleichen Menge von Verdauungsflüssigkeit versetzte. Die Verdauungsflüssigkeit war selbstverständlich vorher geprüft worden und gab mit Kali und Kupfersulfat keine Reaction. Nach 24 Stunden mass ich von den vier Portionen in vier vierkantige Fläschchen von gleichem Kaliber gleiche Mengen hinein, versetzte sie mit gleichen Mengen Kalilösung und dann mit gleichen Mengen Kupferlösung, die ich aber in mehreren Portionen hinzufügte, so dass alle vier erst eine gleiche sehr geringe erhielten, dann eine grössere, dann eine noch grössere. Die beiden Portionen, welche Verdauungsflüssigkeit erhalten hatten, waren sehr deutlich mehr roth, die, welche nur verdünnte Chlorwasserstoffsäure erhalten hatten, sehr deutlich mehr violett, und zwar zeigte sich der Unterschied schon bei verhältnissmässig geringen Zusätzen von Kupferlösung. Ich muss bemerken, dass früher als ich eine schön rothe Lösung aus blossen Eiweiss erhalten hatte, die Schicht, durch welche gesehen wurde, mehr als zehnmal dicker war, als bei diesen Versuchen, so dass also eine relativ viel geringere Menge von Kupferlösung genügte um eine deutlich erkennbare Farbe hervorzubringen. Nach abermals 24 Stunden wiederholte ich den Versuch mit dem Reste der vier Flüssigkeiten und erhielt dasselbe Resultat.

Die Helligkeit, das heisst die Menge des durchgehenden Lichtes nach dem Auge beurtheilt, war bei allen vier Flüssigkeiten nur wenig verschieden; die beiden rothen erschienen gegen eine helle Wolke gehalten etwas heller als die beiden violetten. Im lichtschwachen Spectrum mittels des Spectroskops untersucht, zeigten beide Flüssigkeiten das Grün ziemlich gleich hell, aber die rothe zeigte das Roth heller, die violette das Violettblau. Bei

einem zweiten ähnlichen Versuche erhielt ich dieselben Resultate wie bei diesem. Ich hatte mir inzwischen eine Einrichtung gemacht, um gleich dicke Flüssigkeitsschichten mittelst des Dove'schen Photometers auf ihre Helligkeit zu prüfen. Letztere war bei den beiden zu vergleichenden Flüssigkeiten nahezu gleich. Ein kleiner Unterschied mochte auch hier zu Gunsten der rothen vorhanden sein, aber er war so gering, dass er sicher nicht unabhängig war von den täglichen und stündlichen Veränderungen des Himmelslichtes. Die Untersuchung im lichtschwachen Spectrum gab dasselbe Resultat, wie beim ersten Versuche.

Diese Beobachtungen gestatten uns den Zusammenhang der sogenannten Peptonreaction mit der unter gleichen Bedingungen eintretenden Eiweissreaction etwas näher zu erörtern.

Die letztere muss so hervorgebracht werden, dass das erste zugesetzte Kupfer an einem Körper tritt, mit dem es eine rothe Verbindung gibt. Dieser Körper scheint nur in geringer Menge vorhanden zu sein, da die Farbe nur einigermassen gesättigt wird, wenn man durch dicke Schichten sieht. Aber dieses Gesättigtwerden bei gleichbleibendem Farbenton beweist andererseits wieder, wie nicht bloß die Verdünnung bedingte, dass die Farbe roth war und nicht violett; denn wäre dies der Fall gewesen, so hätte sie bei Verdickung der Schicht violett werden müssen, wie sie es durch Zusatz von mehr Kupfer wird. Das weiter zugesetzte Kupfer muss also an einen Körper treten, mit dem es eine blaue oder violettblaue Verbindung bildet, oder es muss ein und derselbe Körper zwei Kupferverbindungen eingehen von denen die mit weniger Kupfer blass roth, die mit mehr Kupfer violett oder blau ist.

Wenn nun bei gleicher Menge des zugesetzten Kupfers die Lösung, in welcher Verdauung stattgefunden hat, mehr roth ist, weniger violett, so könnte dies zwei Ursachen haben.

1. Die das Kupfer mit violetter oder blauer Farbe bindende Substanz könnte zerstört worden sein. Dann müsste aber die Flüssigkeit viel heller sein als die andere, was sie nicht ist.

2. Es könnte soviel Substanz entstanden sein, die das Kupfer mit rother Farbe bindet, dass diese das ganze zugesetzte Kupfer für sich in Anspruch genommen hat, und es kann nun fraglich sein, ob dieselbe entstanden ist aus einer Substanz, die mit dem

Kupfer keine farbige Verbindung eingeht, oder aus einer solchen, die das Kupferhydroxyd mit violetter oder blauer Farbe auflöst. Da alle Körper, die überhaupt das Kupferhydroxyd in wässriger alkalischer Lösung auflösen, es mit blauer, violetter oder purpurrother Farbe auflösen, so ist es wohl am wahrscheinlichsten, dass sich bei der Pepsinverdauung ein Körper, der das Kupfer mit violetter oder blauer Farbe auflöst umwandelt in einen Körper, der es mit rother Farbe auflöst.

Nimmt man dies nicht an, so muss man annehmen, dass der das Kupferroth lösende Körper aus einem solchen entstanden ist, der, obgleich Bestandtheil des Eiweisses, doch in demselben bei der besagten Eiweissreaction mit dem Kupfer nicht in Verbindung tritt.

Ist der die Peptonreaction bedingende Körper identisch mit dem das Kupferhydroxyd roth lösenden Körper, der schon im Eiweiss enthalten ist? Ich habe bereits in meiner früheren Arbeit (l. c. S. 255) gezeigt, dass im Eiweiss kein Alkophyr als solches vorkommt. Andererseits aber kann die Frage entstehen, ob nicht in ihm ein Atomcomplex enthalten ist, der identisch ist, mit demjenigen, welcher im Alkophyr die in Rede stehende Reaction hervorruft, und diese Frage kann bis jetzt weder bejaht noch verneint werden.

Eine andere naheliegende Frage werden wir aber jetzt erörtern können, nämlich die, ob sich in den Verdauungsgemischen nur ein Körper befindet, der die Biuretreaction gibt, oder ob es deren mehrere sind.

Ich habe mich bereits in meiner ersten Publication über unseren Gegenstand dahin ausgesprochen, dass nicht in allen, aber in manchen Verdauungsgemischen zwei verschiedene Körper sind, welche die Reaction geben. Seither haben auch andere Beobachter Unterschiede gefunden zwischen Verdauungsproducten, welche sich mit Kupferoxydsalz und Kali purpurroth färbten.

Da nilewsky¹ unterscheidet deren zwei; die eine nennt er Pepton, die andere Pseudopepton. Nach meinen jetzigen Erfahrungen muss ich vermuthen, dass auch mehr als zwei solcher

¹ Etude sur la constitution chimique des substances albuminoïdes. Arch. d. sc. phys. et nat. Pér. III, T. V u. VII, 1881 u. 1882.

Substanzen vorkommen können. Ich habe ein Fibrin-Verdauungsgemisch, das über Calciumcarbonat bis zur Trockenheit abgedampft war, mit Weingeist (94% bis 95%) so lange heiss extrahirt, als derselbe etwas aufnahm, was sich mit Kupfersulfat und Kali roth färbte; dann wurde der Rest wieder in Wasser gelöst und filtrirt. Das Filtrat gab noch starke Biuretreaction. Es liegt nahe anzunehmen, dass die Extraction immer noch eine unvollständige war; aber dies kann ich im vorliegenden Falle nicht als einzigen Grund ansehen. Ich habe die wässrige Lösung wieder mit Weingeist gefällt, filtrirt, das Filtrat zur Trockene gebracht und den Niederschlag mit Weingeist gewaschen und abgepresst. Es zeigte sich dann, dass nicht nur die wässrige Lösung des Filtratrückstandes die Reaction gab, sondern dass auch die wässrige Lösung des Niederschlages sich viel stärker roth färbte, als es eine Eiweisslösung thut. Es musste dies von einer Substanz herrühren, die in Weingeist entschieden schwer löslich war. Dasselbe Resultat erhielt ich, als ich statt mit reinem Wasser mit sehr verdünnter Essigsäure extrahirte und den so erhaltenen Auszug wieder mit Alkohol fällte.

Andererseits habe ich durch Zersetzung der Bleiniederschläge, welche ich behufs der Reinigung von Alkophyr, das von derselben Verdauung stammte, mittelst weingeistiger Bleilösungen bewirkte, Substanzen erhalten, welche die Biuretreaction gaben. Die Substanz, welche nach dem Ausfällen mit weingeistiger Bleizuckerlösung noch durch eine solche Bleilösung erhalten wurde, in die Ammoniakgas eingeleitet war, diese Substanz wurde durch Blutlaugensalz in essigsauer Lösung nicht mehr gefällt und in ihrer Lösung entstand durch besagtes Reagens keinerlei Trübung. Sie unterschied sich also von den weniger fortgeschrittenen Verdauungsproducten und näherte sich hiedurch, wie durch ihre Löslichkeit in starkem Weingeist dem Alkophyr, unterschied sich aber von diesem wieder dadurch, dass sie durch ammoniakalische Bleilösung aus der weingeistigen Flüssigkeit ausgefällt werden konnte, und auch dadurch, dass sie noch durch Blei nachweisbaren Schwefel enthielt.

Wenn wir nun diese verschiedenen Substanzen neben einander finden, so ist der nächstliegende Gedanke, dass sie Glieder einer Kette sind, dass sich das Eiweissmolekül, welches erst die

violette Reaction gab und später die purpurfarbene, weiter und weiter verändert, aber der Atomcomplex, der die Biuretreaction entstehen lässt, dabei nicht verändert wird.

Wenn wir uns aber dieser Ansicht zuwenden, so müssen wir auch die Resultate der colorimetrischen Peptonbestimmungen anders beurtheilen, als wenn wir bei der Idee stehen bleiben: Es gibt zwei Körper, Eiweiss, das die violette Reaction gibt, und Pepton, das die rothe Reaction gibt. In letzterem Falle suchen wir die absolute Gewichtsmenge des Körpers Pepton zu bestimmen, beziehungsweise die relative Menge, in welcher derselbe in der Volumseinheit der untersuchten Flüssigkeit enthalten ist. Im ersteren Falle ist die Aufgabe uns viel weniger bestimmt gestellt.
