

## Über einige Gelatosen

von

**Zd. H. Skraup** und **F. Hummelberger**.

Aus dem II. chemischen Universitätslaboratorium in Wien.

(Vorgelegt in der Sitzung am 2. April 1908.)

Die Hydrolyse der Proteine wurde, wenn es sich um die Gewinnung von Albumosen und Peptonen handelte, bisher meist durch Enzyme oder sehr verdünnte Säuren und deshalb aus experimentellen Gründen bei relativ großer Verdünnung durchgeführt. Wir haben versucht, ob sie auch mit relativ konzentrierten Säuren bequem auszuführen ist. Weiter haben wir versucht, die seit langer Zeit angewendete Trennung der Produkte durch Ammonsulfat in eine bequemere Form zu bringen.

Wir haben zu diesen Versuchen zunächst das Glutin verwendet, welches infolge seiner Löslichkeit in Wasser und Säuren sich gut eignet. Dabei haben wir von vornherein verzichtet, individuelle Stoffe zu gewinnen, und uns begnügt, Fraktionen zu erhalten, welche durch ihre Löslichkeit, beziehungsweise Fällbarkeit dem Ammonsulfat gegenüber einen gewissen Gattungscharakter haben.

Es wurde bei diesen auch verzichtet, die elementare Zusammensetzung festzustellen, und haben wir diese verschiedenen Gattungen lediglich hydrolysiert und von den einfachen Spaltungsprodukten jene bestimmt, die in größeren Mengen zu erwarten waren und für die brauchbare Methoden vorliegen.

Im Glutin selber ist Glykokoll, Glutaminsäure, Lysin und Arginin in ziemlich großen Mengen nachgewiesen worden, alle

anderen Aminosäuren in kleinen; deshalb haben wir uns bei den Bestimmungen auf die vier genannten Verbindungen und auf das Histidin beschränkt, welches nach der Kossel-Kutscher'schen Methode neben dem Arginin leicht bestimmt werden kann.

Es hat sich bei unseren Untersuchungen zunächst für das Glutin gezeigt, daß der Gehalt an Glutaminsäure viel höher gefunden wird, als er von E. Fischer (0·9%)<sup>1</sup> mittels der Estermethode ermittelt worden ist, wenn man nach Horbaczewski, beziehungsweise Hlasiwetz die Glutaminsäure nach erfolgter Hydrolyse als Salzsäureverbindung abscheidet.

Auf die Glutaminsäureausbeute hat überdies die Art der Hydrolyse großen Einfluß. Ein und dieselbe Gelatinsorte (französische Goldmarke) ergab, auf Trockensubstanz gerechnet, 13·9% Glutaminsäure, als nach Horbaczewski gearbeitet wurde,<sup>1</sup> und nur 10·1%, als die von E. Fischer für die Hydrolyse beschriebenen Verhältnisse eingehalten wurden.

In beiden Fällen erhielten wir dagegen viel weniger Glykokoll, als E. Fischer (16·5%) sowie Lèvenne (16·38%) angegeben haben und der eine von uns bei früheren Gelegenheiten auch beobachtet hat, nämlich diesmal übereinstimmend 9·6 und 9·7%. Wiederholte Veresterung der Mutterlauge vermehrte den Glykokollester nicht; es muß deshalb die Möglichkeit erwogen werden, daß das käufliche Glutin je nach Umständen verschiedenen Glykokollgehalt hat. Solche Differenzen sind bei Proteinen ja schon vielfach beobachtet worden.

Die partielle Hydrolyse des Glutins behufs Gewinnung der Albumosen haben wir mit 25prozentiger Schwefelsäure vorgenommen. Diese hat schon Lèvenne<sup>2</sup> verwendet, aber kochend, wobei die Hydrolyse nahezu vollständig ist.

Es hat sich gezeigt, daß 25prozentige Schwefelsäure bei Zimmertemperatur außerordentlich langsam einwirkt, viel rascher bei 50°, und daß bei dieser Temperatur nach etwa 7 Stunden eine Abnahme der geringen, durch Ammonsulfat

<sup>1</sup> Siehe den experimentellen Teil.

<sup>2</sup> Zeitschr. physiol. Chemie, 49, 247.

noch aussalzbaren Anteile nicht mehr wahrzunehmen ist. Unter diesen Umständen erfolgt der Abbau bis zu den einfachen Aminoverbindungen nur untergeordnet.

Beim fraktionellen Aussalzen hat sich weiterhin gezeigt, daß die Fällungen von verschiedener Fällbarkeit sich gegenseitig mitreißen, beziehlich in Lösung halten und daß auch bei wiederholtem Lösen und Wiederausfällen solches stattfindet. Dieses Mitreißen gilt auch für die in gesättigtem Ammonsulfat löslichen Anteile. Doch war für diese eine konstante Abnahme zu beobachten, so daß die schließlich durch Ammonsulfat erhaltenen Fällungen praktisch von solchen »Peptonfraktionen« frei sind.

Zu den vielen Fehlerquellen dieser Methode gehören zwei, welche bisher nicht besonders berücksichtigt worden sind. Einmal die, daß bei Beseitigung des Ammonsulfates durch Baryt das Bariumsulfat etwas von organischer Substanz mitreißt und das anderemal, daß beim Auskrystallisieren von Ammonsulfat dieses ganz erhebliche Mengen organische Substanz zurückhält.

Wir haben ermittelt, daß in der rund 14 kg betragenden Menge von Ammonsulfat, die bei unseren Versuchen durch Auskrystallisieren und durch Waschen mit verdünntem Alkohol wieder gewonnen wurde, nicht weniger wie 115 g organische Substanz enthalten waren.

Über die Details dieser Trennung sei auf den experimentellen Teil verwiesen.

Die in Ammonsulfat löslichen Peptonfraktionen wurden schließlich durch Dialyse gereinigt. Nach mehrtägiger Dialyse war die in das Dialysat übergehende Menge auf ein nicht mehr abnehmendes Minimum gesunken. Durch diese Abnahme und durch besondere andere Versuche ließ sich nachweisen, daß die einfachsten Spaltungsprodukte des Glutins überhaupt nur in kleiner Menge entstanden waren und beim Dialysieren vollständig weggebracht werden.

Die Albumosen verschiedener Löslichkeit und das Peptongemenge wurden bei der Hydrolyse und allen folgenden Operationen möglichst gleich behandelt. Der Gehalt an Histidin und Arginin war bei ihnen nahezu gleich und ebenso fast gleich wie im Glutin.

Auffällige Unterschiede zeigten sich aber für das Lysin, das Glykokoll und die Glutaminsäure. Ersteres und auch die Glutaminsäure ist in um so geringeren Mengen vorhanden, je leichter aussalzbar das Protein ist; für das Glykokoll gilt gerade das Umgekehrte.

Levenne<sup>1</sup> hat die durch Einwirkung von Trypin, Pepsin und Papaïn entstehenden Gelatosen, wenn auch weniger durchgreifend, durch Ammonsulfat in leichter und schwerer fällbare zerlegt und diese von ihm Proto- und Deuterogelatosen genannten Albumosen und das Tryptopepton auf ihren Glykokollgehalt untersucht. Er kam, was den Glykokollgehalt der leichter durch Ammonsulfat fällbaren »Protogelatose« und des Peptons betrifft, zu ganz denselben Beobachtungen wie wir bei der Hydrolyse mit Schwefelsäure. Bei der schwerer fällbaren »Deuterogelatose« fand er den Glykokollgehalt aber sogar höher wie in der Protogelatose, während wir ihn niedriger fanden.

Ob diese Differenz auf die verschiedenen Versuchsbedingungen zurückgeführt werden muß, können wir nicht entscheiden. Jedenfalls hat die von uns beobachtete Regelmäßigkeit in der Abnahme eine gewisse Wahrscheinlichkeit für sich.

Nach Levenne ist der Glykokollgehalt in den Gelatosen größer wie im Glutin. Wir finden für die leichtest fällbare auch einen etwas größeren Gehalt. Die Differenz ist aber so gering, daß sie auf Versuchsfehler zurückgeführt werden könnte.

Schließlich sei bemerkt, daß bei den von uns eingehaltenen Bedingungen die Produkte der Hydrolyse mit sehr geringen Verlusten erhalten werden.

Unter Berücksichtigung und Umrechnung eines Verlustes erhielten wir aus 1700 g trockener Gelatine im ganzen 236 g Albumosen, 1100 g Rohpepton und im Ammonsulfat waren 115 g organische Substanz eingeschlossen. Ungerechnet die vom Bariumsulfat mitgerissenen Mengen, waren also rund 85% der Gelatine wieder auffindbar.

---

<sup>1</sup> Zeitschr. physiol. Chemie, 37, 81; 41, 8.

## Experimenteller Teil.

Wird Glutin mit der fünffachen Menge 25prozentiger Schwefelsäure übergossen und öfter geschüttelt, so ist nach etwa einer halben Stunde eine dicke Lösung entstanden. Proben, mit dem gleichen Volum kalt gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt, geben reichliche Niederschläge, deren Filtrat anfänglich schon mit  $\frac{1}{5}$  Volum Ammonsulfat neue Niederschläge geben, während später eine Opaleszenz eintritt. Nach 24 Stunden wurde mit konzentriertem Ammoniak neutralisiert und gesättigte Sulfatlösung zugesetzt. Es zeigte sich, daß nach Halbsättigung fast vollständige Fällung eingetreten ist; denn nachfolgende Zweidrittelsättigung gab einen sehr geringen Niederschlag; nach Zweidrittelsättigung trat durch weiteren Zusatz von Sulfat nur mehr Opaleszenz ein.

Um eine annähernde Vorstellung über die in der Kälte vorgehende Veränderung zu erhalten, wurden 50 g Gelatine in 250  $cm^3$  25prozentiger Säure gelöst. Nach ungefähr 64 Stunden gibt das gleiche Volum Ammonsulfat ohne vorherige Neutralisation keine Fällung mehr, wohl aber das fünffache. Nach weiteren 10 Stunden wurde unter guter Kühlung mit Ammoniakgas schwach alkalisch gemacht und mit 2·5  $cm^3$  konzentrierter Schwefelsäure wieder angesäuert. Hiedurch wurde Halbsättigung durch Ammonsulfat erzielt. Die Fällung, zweimal mit halbgesättigter Sulfatlösung durchgeknetet, wog feucht 36 g. Filtrat und Waschwässer, mit festem Sulfat vollständig gesättigt, gaben 26 g Fällung.

Nach Wiederauflösen der 36 g in 200  $cm^3$  Wasser fielen schon nach Zweidrittelsättigung 30 g aus und das Filtrat gab nach völliger Sättigung fast keine Fällung mehr. Ähnliches war bei den nach Ganzsättigung ausgefallenen 26 g zu beobachten, die, in 200  $cm^3$  Wasser gelöst, nach Zweidrittelsättigung 17 g und im Filtrat nach Ganzsättigung dann nichts mehr abschieden.

Rascher geht die Hydrolyse natürlich in der Wärme vor sich.

Bei 50° nahmen die Fällungen, die anfänglich bei Zusatz des gleichen Volums Sulfatlösung eintraten, rasch ab,

nach  $4\frac{1}{2}$  Stunden traten sie überhaupt nicht mehr auf und nach 7 Stunden war die Fällung durch das fünffache Volum eben nur noch wahrnehmbar und verminderte sich bei noch längerem Erwärmen dann nicht mehr merklich.

Bei einem Versuche wurden 100 g Glutin (lufttrocken mit einem Wassergehalte von  $16\cdot1\%$ ) 7·5 Stunden auf  $50^\circ$  erwärmt. Nach dem Einleiten von Ammoniakgas (Halbsättigung) und Zusatz von  $5\text{ cm}^3$  Schwefelsäure fiel nun nichts mehr aus; nach Ganzsättigung mit festem Salz betrug die Fällung aber 74 g.

Diese, in  $500\text{ cm}^3$  Wasser gelöst, schied, zu zwei Dritteln gesättigt, 38 g, das Filtrat nach Ganzsättigung 17 g ab, verminderte sich also sehr wesentlich.

Betreffend dieser und der später angeführten Wägungen sei ausdrücklich hervorgehoben, daß sie naturgemäß sehr rohe sind und nur einen Vergleichswert haben. Diese Fällungen schließen außerordentlich viel Wasser ein, dessen Menge sehr wechselt, und die durch Ganzsättigung erzielten außerdem auch noch leicht ungelöstes Salz.

Durch systematisches Auflösen der 38 g in je  $500\text{ cm}^3$  Wasser und jedesmalige Zweidrittelsättigung nahm die Menge auf 27, 19, 15 und 12 g ab; die Abnahme wurde demnach immer geringer und war nicht größer als bei der Umfällung oder dem Umkrystallisieren eines nicht ganz unlöslichen Stoffes sonst. Die Filtrate geben, ganz gesättigt, Fällungen, welche der jedesmaligen Verminderung beim vorhergehenden Umfällen durch Zweidrittelsättigung ungefähr entsprechen.

Die durch wiederholtes Umfällen durch Zweidrittelsättigung schließlich erhaltenen 12 g wurden in Wasser gelöst, mit Baryt von Schwefelsäure befreit, der überschüssige Baryt mit Kohlensäure gefällt und im Vakuum zur Trockene gebracht. Der Rückstand war nahezu weiß, nicht hygroskopisch und bis auf einen geringen Rest in 80prozentigem Alkohol löslich.

Der großen Differenz wegen zwischen dem Gewicht in feuchtem und trockenem Zustande (12 g und 4 g) haben wir das ausgefällte Barium-Sulfat-Carbonatgemisch mit verdünnter Essigsäure ausgekocht. Die von allen anorganischen Verunreinigungen befreite Lösung hinterließ nur 0·1 g, die zur Hälfte aus Gips bestand.

Andrerseits zeigte sich, daß die durch die erste Ganzsättigung erhaltene Fällung von 17 g, in 500  $cm^3$  Wasser gelöst, bei Ganzsättigung nur mehr 6 g abschied, so daß bei den ersten Fällungen Stoffe mitniederfallen, die in gesättigtem Ammonsulfat löslich sind.

Um über deren Menge und Verteilung Aufschluß zu erhalten, wurden die fünf ersten Filtrate von den durch Ganzsättigung erhaltenen Fällungen durch Eindampfen und durch Extraktion mit Alkohol vom Sulfat möglichst befreit, die Schwefelsäure mit Baryt genau ausgefällt und das Filtrat vom Bariumsulfat bis zur Staubrockene eingedampft. Die Rückstände betrug 36, 9, 3, 2, 1 g, so daß sicher ist, daß die Hauptmenge schon in dem ersten Filtrat, aber noch erhebliche Mengen in den unmittelbar darauf folgenden enthalten sind. Die letzten können möglicherweise schon wieder Stoffe enthalten, die beim Sättigen mit Sulfat ausfallen, aber doch nicht ganz unlöslich sind.

Aller Wahrscheinlichkeit nach gehen in die gesättigte Salzlösung auch einfach zusammengesetzte Spaltungsprodukte der Hydrolyse über. Wir haben uns wenigstens beim Glykokoll überzeugt, daß es in gesättigter Ammonsulfatlösung relativ leicht löslich ist; Tyrosin dürfte ungefähr so schwer löslich sein wie in Wasser. Es war auch voraussichtlich, daß bei der Dialyse diese einfachen Spaltungsprodukte rascher diffundieren werden als peptidartige Stoffe. Um aber einen annähernden Maßstab zu gewinnen, haben wir einen Versuch ausgeführt, bei welchem Gelatine (10 g) durch 24 Stunden am Wasserbade mit der zehnfachen Menge Salzsäure erwärmt wurde, also ein vollständiger Zerfall anzunehmen war. Nach Zusatz von 5 g konzentrierter Schwefelsäure wurde durch wiederholtes Eindampfen die überschüssige Salzsäure möglichst entfernt, mit Tierkohle sodann entfärbt, auf 100  $cm^3$  verdünnt und in einen Pergamentpapierschlauch gefüllt.

Nach 13 stündigem Stehen waren schon 4.7 g diffundiert; von da ab nahm der Rückstand der Dialysate immer mehr ab. Als die Abnahme in Stillstand gekommen war, wurde das erste Dialysat und der Inhalt des Schlauches gleichmäßig mit Phosphorwolframsäure gefällt, im Filtrat die

Phosphorwolframsäure ausgefällt und endlich in bekannter Weise verestert. Die Gewichte der Fällungen durch Phosphorwolframsäure waren merkwürdigerweise nahezu gleich (6 g). Aus dem ersten Dialysat erhielten wir sehr reichlich das Chlorhydrat des Glykokollesters, aus dem Inhalte des Schlauches nichts.

### Vollständige Hydrolyse der Gelatine.

Es ist im einleitenden Abschnitte schon erwähnt worden, daß über den Gehalt an Glutaminsäure in der Gelatine die Angaben stark auseinandergehen. E. Fischer hat durch die Estermethode bloß 0·9%, Horbaczewski durch direkte Krystallisation der Salzsäureverbindung 14% Glutaminsäure gefunden. Wir haben untersucht, ob die Art der Hydrolyse einen Einfluß hat und dieselbe Gelatinesorte nach den Vorschriften von Horbaczewski und E. Fischer zerlegt.

500 g Gelatine wurden in 1 l Salzsäure (D. 1·19) in der Kälte gelöst, dann eine Lösung von 30 g krystallisiertem Zinnchlorür in 1 l Wasser zugefügt und 72 Stunden am Rückflußkühler gekocht. Um das Zinn mit Schwefelwasserstoff ausfällen zu können, mußte auf das vierfache Volum verdünnt werden. Das Filtrat von Schwefelzinn wurde auf 750 cm<sup>3</sup> eingengt, mit Salzsäure unter Kühlung in Eis gesättigt, geimpft und im Eisschranke vier Tage unter zeitweisem Rühren belassen.

Nach dem Verdünnen mit eisgekühltem Alkohol wurde abgesaugt, mit Alkohol die Mutterlauge verdrängt, auf Tontellern abgepreßt, dann bei höherer Temperatur zur Gewichtskonstanz getrocknet und der mit auskrystallisierte Gips durch Lösen in 50 procentigem Weingeist abgetrennt. Auf wasserfreie Gelatine gerechnet, wurden 13·9% freie Glutaminsäure erhalten.

Die alkoholischen Filtrate, nach E. Fischer auf Glykokoll-ester verarbeitet, gaben 75 g der Salzsäureverbindung, entsprechend 9·6% Glykokoll. Nach zweimaliger Esterifikation der Mutterlauge krystallisierte nichts mehr aus. Zum Vergleiche wurde dieselbe Gelatine (100 g) nach Fischer hydrolysiert, auf 150 cm<sup>3</sup> eingedampft und in der eben beschriebenen



Art die salzsaure Glutaminsäure abgeschieden. Erhalten 10·1% freie Glutaminsäure. Es ist nicht unmöglich, daß die Mehrausbeute, welche die Horbaczewski'sche Modifikation gibt, lediglich daher rührt, daß der Zusatz von Zinnsalz und das Ausfällen des Zinns durch Schwefelwasserstoff, wobei nahezu völlige Entfärbung eintritt, Verunreinigungen beseitigt, welche das Auskrystallisieren der Glutaminsäure sonst teilweise verhindern.

Das Filtrat des Glutaminsäurechlorhydrates gab nach der ersten Veresterung salzsauren Glykokollester in einer 9·7% Glykokoll entsprechenden Menge, die alkoholische Mutterlauge bei dreimaliger Veresterung keine weitere Krystallisation.

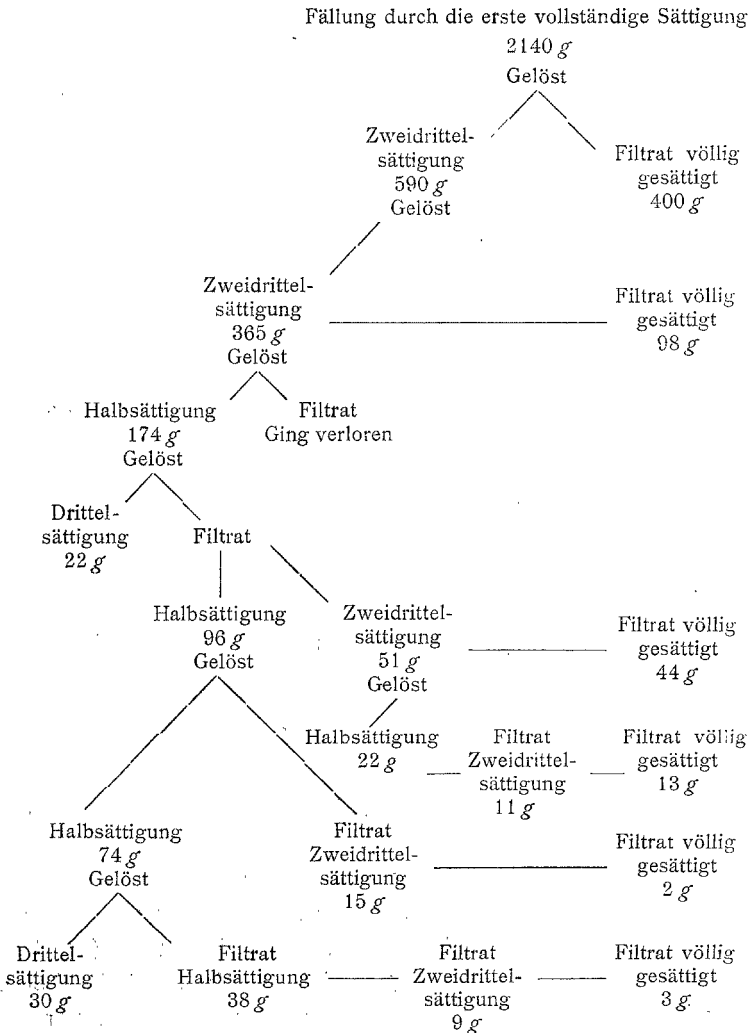
Endlich wurden 40 g Gelatine nach E. Fischer hydrolysiert und nach dem Eindicken im Vakuum mit Phosphorwolframsäure (50prozentige Lösung) ausgefällt, der Niederschlag mit einem Gemisch von verdünnter Schwefelsäure und Phosphorwolframsäure chlorfrei gewaschen, mit Baryt zersetzt und nach der Kossel-Kutscher'schen Methode Histidin, Arginin und Lysin bestimmt.

	Gefunden	Angabe in Cohnheim's Handbuch
Histidin . . .	0·4	0·4
Arginin . . . .	6·2	9·3
Lysin . . . . .	4·4	5—6

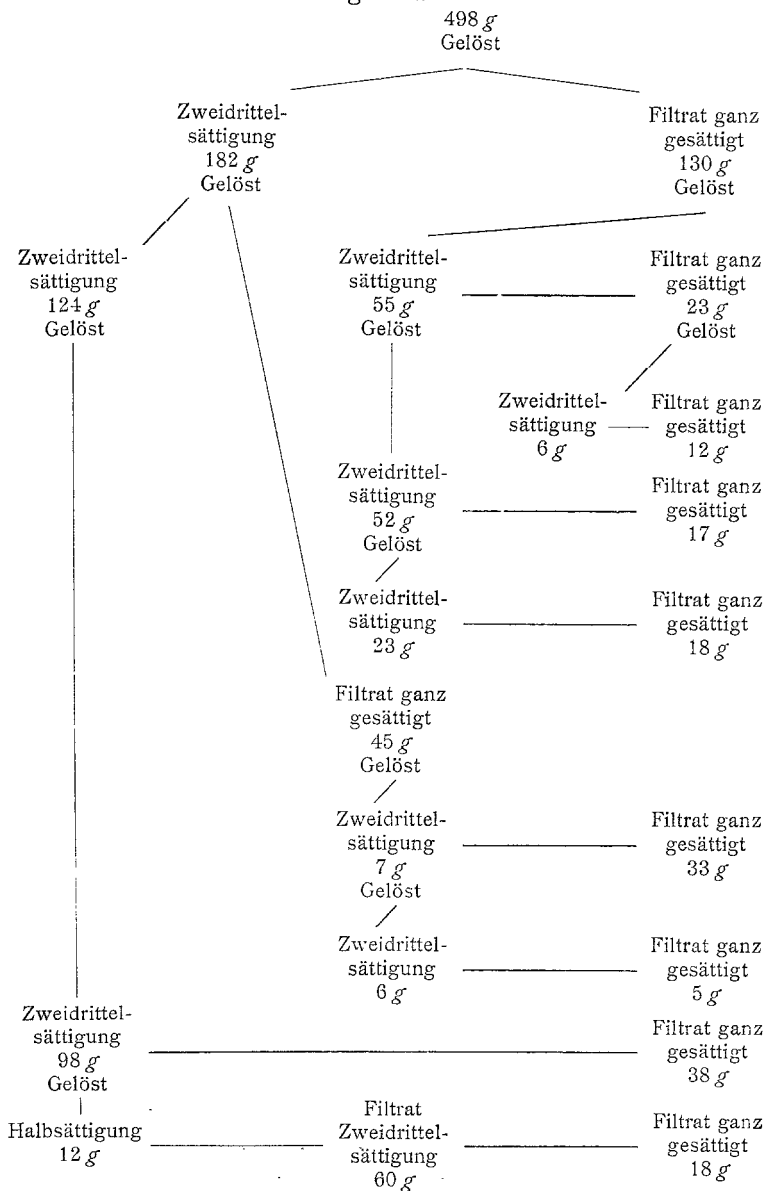
### Hydrolyse von 2 kg Gelatine mit 25prozentiger Schwefelsäure.

Dieselbe wurde unter denselben Verhältnissen ausgeführt, wie sie bei dem schon beschriebenen Vorversuch angegeben sind. Es sei nur noch zugefügt, daß beim Erwärmen auf 50° ein schwacher Geruch nach Schwefeldioxyd wahrzunehmen war. Irgend eine Verfärbung trat aber auch hier nicht auf. Nach dem Einleiten von Ammoniak und Eintragen der zur Ganzsättigung nötigen Menge von Ammoniumsulfat (3·76 kg) fiel ein dicker Sirup von 2140 g Gewicht aus, in dem beim Stehen über Nacht krystallisiertes Ammonsulfat zu bemerken war.

Die Fällung wurde in der zehnfachen Menge Wasser gelöst. Ein sehr kleiner Teil blieb unlöslich; er zeigte auch nach sehr gutem Waschen die Biuretreaktion. Die abfiltrierte Lösung wurde mit Ammonsulfat nach folgendem Schema fraktionell gefällt. Es sei noch bemerkt, daß jede Fällung in der zehnfachen Menge Wasser aufgelöst und die für den angegebenen Sättigungsgrad berechnete Menge festes Ammonsulfat fein gepulvert unter gutem Rühren eingetragen wurde.



Die bei den ersten zwei Ganzsättigungen erhaltenen Niederschläge von 400 und von 98 g wurden vereinigt in der zehnfachen Menge Wasser gelöst, wieder fraktionell gefällt und die Fällungen in der zehnfachen Menge Wasser gelöst und mit Ammonsulfat fraktionell gefällt.



Da die einzelnen Fällungen nicht bloß Wasser als »feste Lösung« einschließen, sondern auch mechanisch als Mutterlauge und die klebrigen Fällungen von der Flüssigkeit nur durch Abgießen zu befreien sind, sind auch die Wägungen nur sehr annähernd. Immerhin kann aus dem Schema entnommen werden, daß eine Konstanz kaum zu beobachten ist und wenn eine solche anscheinend vorübergehend eingetreten ist, später fast immer wieder Sprünge in den Gewichtsänderungen eintreten.

Sehr deutlich zeigt sich auch, daß die anfänglichen Fällungen bedeutende Mengen solcher Stoffe mitreißen, die nach den späteren Fällungen in gesättigtem Ammonsulfat löslich sind.

Die Trennung solcher Albumosen und Peptone durch Fällen mit Ammonsulfat ist also außerordentlich umständlich und es ist angesichts dessen besonders für die Fällungen bei höherer Sulfatkonzentration sehr fraglich, wie weit sie voneinander befreit sind.

Um festzustellen, inwieweit diese Fraktionierung die Zusammensetzung ändert, wurde aber in dem durch das Fällungsschema dargestellten Stand abgebrochen und die Fällungen von gleichem Charakter vereinigt. Da die Fällungen bei Halb- und bei Drittelsättigung für sich zu gering waren, wurden diese auch vereinigt.

Die in Wasser gelösten Fällungen wurden durch etwas überschüssiges Bariumhydroxyd von Schwefelsäure befreit, der Baryt durch Kohlensäure gefällt und dann im Vakuum zum Sirup gedampft, dieser dann auf ein bestimmtes Volum und Gewicht gebracht.

Teile der einzelnen Sirupe wurden von geglühtem Quarzsand aufgesaugt und durch Trocknen im Vakuum schließlich bei 100° zur Gewichtskonstanz gebracht. Beim Trocknen muß die Temperatur sehr allmählich gesteigert werden, da sonst auch aus geräumigen Wägegläschen Substanz ausquillt.

Nach diesen Bestimmungen betrug die Albumose durch

Drittel- und Halbsättigung.....	45·2 g
Zweidrittelsättigung.....	61·0 g
Ganzsättigung .....	65·0 g

Das ausgefällte Gemenge von Bariumsulfat und -carbonat enthielt auch in diesen Fällen nach sorgfältigem Auswaschen geringe Mengen organischer Substanz, die zwischen 2 und 3 g schwankten.

### Peptone aus der Sulfatlösung.

Zur Gewinnung wurden die Filtrate der ersten und der zweiten Ganzsättigungsfällung (Gewicht der Fällungen 2104, beziehungsweise 400 g), und zwar jedes getrennt, verwendet, um aber über den Verlauf der Trennung Aufschluß zu bekommen, auch aliquote Teile späterer Ganzsättigungen (Fällungen 98, 130 und 45 g) verarbeitet.

Bei den großen Mengen von Flüssigkeit und Ammonsulfat war es selbstverständlich notwendig, letzteres der größten Menge nach als solches abzuscheiden. Es geschah dieses durch zweimaliges Auskrystallisieren und Abspülen des Sulfates mit 50prozentigem Alkohol. Das so erhaltene Ammonsulfat war völlig farblos.

Die wieder eingedickte Mutterlauge von der zweiten Sulfatkrystallisation wurde mit dem gleichen Volum 96prozentigem Alkohol vermischt. Das abgeschiedene anorganische Salz konnte auch jetzt noch durch Waschen mit 50prozentigem Alkohol farblos erhalten werden; als aber das Filtrat wieder eingedickt und eine Probe mit dem gleichen Volum Alkohol verdünnt wurde, war die Fällung braun und halbtartig und der überstehende Alkohol fast ungefärbt. Bei einer neuerlichen Probe war aber nach Zusatz von etwas Schwefelsäure die Fällung durch Alkohol krystallinischer und die Flüssigkeit mehr gefärbt.

Es wurde deshalb nach dem Ergebnis einiger Vorversuche dem erwähnten Filtrat (1800  $cm^3$ ) 135  $cm^3$  konzentrierte Schwefelsäure und sodann das doppelte Volumen Alkohol zugefügt.

Das Filtrat der jetzt entstandenen Fällungen wurde mit der zur Fällung der Gesamtschwefelsäure etwas mehr als ausreichenden Menge Baryt vermischt, der Alkohol im Vakuum abdestilliert und der Baryt mit Kohlensäure entfernt. Nach einer Gehaltsbestimmung war 607.7 g Rohpepton in Lösung.

Die braune Fällung wurde mit Wasser soweit angerührt, daß von den Krystallen von Ammonsulfat die klebrige braune Substanz in Lösung gegangen war und nach dem Absaugen das Sulfat wiederholt mit 75prozentigem Alkohol, dem Schwefelsäure zugefügt war, noch einigemal durchgerührt. Das Sulfat wurde hiedurch ganz weiß. In den alkoholischen Filtraten wurden Schwefelsäure, Baryt, Alkohol und Ammoniak ebenso entfernt wie bei dem vorher erwähnten ersten Filtrat. Die Lösung enthielt schließlich 242 g Trockenpepton.

Aus dem Filtrat der 400 g-Fällung wurden in derselben Weise im ganzen 166 g Trockensubstanz erhalten.

Von dem 8 l betragenden Filtrat der 98 g-Fällung sowie von den Filtraten der Fällungen 130 und 45 g wurden bloß aliquote Anteile in derselben Art behandelt und der Gehalt an Trockensubstanz im Ganzen mit 35,42 und 12 g bestimmt. Somit geht hervor, daß die Hauptmenge des Rohpeptons in dem allerersten und dem nächsten Filtrat sich befindet und dann rasch abnimmt. Da die späteren Filtrate von der Ganzsättigung aller Wahrscheinlichkeit nach immer reicher an Albumosen leichter Fällbarkeit werden, haben wir nur das erste Filtrat und von diesem nur die erwähnte 607·7 g Trockensubstanz enthaltende Fraktion untersucht.

Es war sehr wahrscheinlich, daß diese auch die einfachsten Spaltungsprodukte enthält. Ist solches der Fall, dann müßte sich Glykokoll nachweisen lassen. Um hierüber Aufschluß zu erhalten, haben wir bei möglichstem Ausschlusse von Wasser eine Esterifikation vorgenommen. Zu diesem Behufe wurde eine 100 g Trockensubstanz enthaltende Menge im Vakuum eingedickt, in 600  $cm^3$  absoluten heißen Alkohol eingetragen, das Abgeschiedene öfter mit absolutem Alkohol ausgekocht und aus den abgegossenen alkoholischen Waschlüssigkeiten die in Lösung befindliche Substanz nach dem Eindampfen in derselben Art systematisch wieder gewonnen und von Wasser befreit. Es wurden nun alle Fällungen vereinigt, in der dreifachen Menge absoluten Alkohols, der wasserfreie Salzsäure enthielt, in der bekannten Weise nach Fischer esterifiziert und die Ester abgeschieden. Beim Destillieren im Vakuum ging unterhalb 160° nichts, bei 160 bis 180° nur

sehr wenig über und aus diesem war Glykokollester nicht zu erhalten.

Deshalb war anzunehmen, daß auch andere einfachste Spaltungsstücke nicht vorhanden sind. Wir haben aber trotzdem noch eine Abtrennung niederer molekularer Stoffe durch Dialyse vorgenommen.

Da leicht konstruierbare Dialysiervorrichtungen wenig beschrieben sind, halten wir es nicht für überflüssig, die von uns angewendete zu beschreiben.

Die verwendeten Schläuche aus Pergamentpapier erwiesen sich bei Vorproben recht dicht. Sie ließen nur an wenig Stellen Flüssigkeitströpfchen durch. Diese Stellen wurden mit einer Eiweißlösung betupft und dieses durch Aufspritzen von kochendem Wasser koaguliert.

Die Schläuche wurden unten an zwei nebeneinanderliegenden Stellen mit starken Seidenfäden verschnürt und oben an kurze Glasröhren von gleichem Durchmesser wie die Schläuche fest gebunden.

Diese Glasröhren steckten in einem Brett hart nebeneinander und tauchten in einen weiten Glaszylinder. Bei unserer Anordnung war der Inhalt der Schläuche halb so groß wie das Volum des Außenwassers.

Da bei der Dialyse das Volum im Schlauch allmählich auf mehr als das Doppelte zunimmt, wurden die Schläuche anfänglich nur bis etwas mehr als ein Drittel angefüllt. Das Niveau außen war beim Einfüllen stets gleich dem im Schlauch. Nach dem Ablassen des Dialysates wurde das Außenniveau dem jetzt höheren Stand im Innern entsprechend höher genommen.

Das Außenwasser wurde nach je 24 Stunden abgegossen und bis zur Gewichtskonstanz eingedampft.

In zwei getrennten Versuchen wurde folgender Verlauf konstatiert:

Anfänglicher Gehalt im Innengefäß (10% Lösung).

	130 g	290 g
1. Dialysat	30·2	63·2
2. »	18·0	37·0
3. »	11·4	27·6

4. Dialysat	7·9 g,	im Innengefäß anfänglicher Gehalt	18·8 g
5. »	6·2		13·4
6. »	5·4		9·9
7. »	4·0		8·5
Inhalt des Schlauches	45·3		111·8

### Eigenschaften der Albumosen und Peptone.

Sie sind durchwegs nahezu weiß und, einmal von Wasser und Alkohol befreit, wenig hygroskopisch. Die Biuretreaktion tritt bei gleichen Konzentrationsverhältnissen (4%) mit ziemlich gleichem roten Ton ein.

Sie sind durchwegs Gemenge von Substanzen, die in Alkohol von 75% relativ leicht, und von anderen, die in ihm relativ schwer löslich sind.

Albumose Halb- und Drittelsättigung. 4 g lösen sich in 15 cm<sup>3</sup> in der Wärme vollständig. Beim Erkalten scheiden sich 3 g ab. Das in Lösung Bleibende, nach dem Eintrocknen 1 g, löst sich in 4 cm<sup>3</sup> in der Kälte, die 3 g in 12 cm<sup>3</sup> in der Hitze; beim Erkalten fällt wieder viel Öl aus.

Zweidrittelsättigung. 5 g lösen sich in 13 cm<sup>3</sup> in der Wärme vollständig. Beim Erkalten scheiden sich 4 g ab. Das in Lösung Bleibende, nach dem Eintrocknen 1 g, löst sich in 2·7 cm<sup>3</sup> in der Kälte, die 4 g in 10·8 cm<sup>3</sup> in der Hitze; beim Erkalten fällt wieder viel Öl aus.

Ganzsättigung. 24 g lösen sich in 150 cm<sup>3</sup> in der Wärme vollständig. Beim Erkalten scheiden sich 7 g ab. Das in Lösung Bleibende, nach dem Eintrocknen 17 g, löst sich in 40 cm<sup>3</sup> in der Kälte, die 7 g in 44 cm<sup>3</sup> in der Hitze; beim Erkalten fällt wieder viel Öl aus.

Pepton aus dem Dialysierschlauch. 10 g lösten sich selbst in 120 cm<sup>3</sup> nur zu etwa vier Fünfteln. Nach dem Erkalten waren aber 4 g ausgefallen. Das in Lösung Verbliebene, nach dem Eintrocknen 6 g, löste sich schon in 10 cm<sup>3</sup> in der Wärme



und in 45  $cm^3$  in der Kälte. Die 4 g Ungelöstes lösten sich in 120  $cm^3$  in der Hitze nur zur Hälfte. Nach dem Erkalten enthielt die Lösung nur mehr 1·5 g.

Es ist nicht uninteressant, daß mit der steigenden Löslichkeit in Ammonsulfat eine Abnahme in der Löslichkeit in 75prozentigem Alkohol verbunden ist.

Von Analysen sind wir im allgemeinen abgestanden. Nur haben wir im Pepton (Inhalt des Dialysierschlauches) eine Schwefelbestimmung nach Asboth ausgeführt und, da die Substanz auch etwas Schwefelsäure enthielt, auch diese bestimmt.

1·2579 g gaben nach Asboth 0·0259 g  $BaSO_4$ .

2·4873 g mit  $BaCl_2$  gaben 0·0032 g  $BaSO_4$ .

Gefunden: Gesamtschwefel 0·28%, Schwefel als Schwefelsäure 0·02%, Differenz 0·26%.

Das Pepton, in 35prozentiger Lösung mit stark überschüssigem Ammonsulfat (Lösung) vermischt, trübte sich nur sehr schwach. Bei weiterem Zusatz von 50prozentiger Schwefelsäure, die mit Ammonsulfat gesättigt war, entstand aber ein Niederschlag, der in mehr Schwefelsäure sich wieder löst. Nach vorsichtigem Ausfällen in einer gewogenen Probe und Zersetzung des Niederschlages mit Baryt usw. betrug das Gewicht des niedergeschlagenen Proteins 25% der Gesamtmenge.

Es ist nicht unmöglich, daß diese Beimischung noch Albumosencharakter hat. Infolgedessen muß es unentschieden bleiben, ob der erwähnte Schwefelgehalt des Peptons diesem eigentümlich ist oder nicht.

Die Albumosen verschiedener Fällbarkeit und das Pepton haben wir endlich durch Kochen mit Salzsäure hydrolytisch zerlegt. Lösungen von bekanntem Gehalt (jedesmal 20 g Trockensubstanz) wurden auf 60  $cm^3$  gebracht, mit Salzsäure gut gesättigt und dann gekocht.

Im allgemeinen wurde Glutaminsäure als Chlorhydrat, dann das Glykokoll als Salzsäureester abgeschieden, die Mutterlauge des Esters durch Kochen mit Wasser verseift, die Hauptmenge der Salzsäure durch Eindampfen im Vakuum

entfernt, die Hexonbasen mit Phosphorwolframsäure ausgefällt und nach Zerlegung des Niederschlages mit Baryt die Kossel-Kutscher'sche Trennung ausgeführt. In einzelnen Fällen wurden Histidin und Arginin nicht getrennt, sondern gemeinsam durch Neutralisation mit gestellter Salpetersäure in Summe als Arginin berechnet.

In einzelnen Fällen wurde die Hydrolyse mit verdünnter Salzsäure unter Zusatz von Zinnchlorür ausgeführt. Dieser Bestimmung ist die Bezeichnung »nach Horbaczewski« angefügt. Die mit konzentrierter Salzsäure ausgeführten haben die Bezeichnung »nach Fischer«.

Konzentrationsverhältnisse, Dauer des Aufbewahrens im Eiskasten, Waschen etc. wurde in allen Fällen peinlich gleich gehalten.

Die erhaltenen Daten gehen aus folgender Zusammenstellung hervor.

Albumose erhalten durch Halb- und Drittelsättigung:

20 g (*A*) wurden nach Emil Fischer behandelt. 20 g ebenso, aber mit der sechsfachen Menge Salzsäure. In letzterem Falle (*B*) wurde das Filtrat von der Glutaminsäure nochmals nach Horbaczewski behandelt, wobei noch eine kleine Menge Glutaminsäure, 1.6%, ausfiel. In beiden Fällen wurde das Glykokoll bestimmt. Für die Hexonbasenbestimmung wurden die beiden Proben vereinigt.

Hydrolyse	Glutaminsäure	Glykokoll	Histidin	Arginin	Lysin in Proz.
<i>A</i>	2.7	10.2			
<i>B</i>	5.8	10.3			
<i>A+B</i>			5.8		1.8

Albumose erhalten durch Ganzsättigung:

Die Zersetzung wurde genau so, wie oben beschrieben, ausgeführt.

Hydrolyse	Glutaminsäure	Glykokoll	Histidin	Arginin	Lysin in Proz.
<i>A</i>	15	6.7			
<i>B</i>	11	10.5			
<i>A+B</i>			5.4		2.3

Pepton aus dem Dialysierschlauch:

Die Zersetzung erfolgte wie bei *A* der Albumosen.

Glutaminsäure	Glykokoll	Histidin	Arginin	Lysin
20·8	7·2	0·4	6·3	3·8

Endlich wurde auch die im ersten Dialysat enthaltene Substanz untersucht.

Diesesmal wurde nach Kossel mit Schwefelsäure gekocht und im Filtrat des Phosphorwolframsäureniederschlages erst Glutaminsäure und Glykokoll bestimmt.

Glutaminsäure	Glykokoll	Histidin	Arginin	Lysin
16	4·1	0·3	4·0	4·8

Aus den Zahlen geht hervor, daß die durch Ammonsulfat leichter fällbaren Albumosen weniger Glutaminsäure und Histidin, dafür mehr Glykokoll enthalten als jene Albumosen, die erst bei Gansättigung ausfallen, oder das Pepton, das überhaupt nicht gefällt wird.

Für das Histidin und Lysin bestehen merkliche Unterschiede bei diesen Albumosen nicht.

Das Pepton unterscheidet sich von der ursprünglichen Gelatine durch einen höheren Glutaminsäuregehalt und einen geringeren Gehalt an Glykokoll.