Ueber ein krystallinisches Eiweiss der Kürbissamen;

von

Dr. Georg Grübler.

Seit der Beobachtung Maschke's¹⁾, dass das vor ihm von Hartig²⁾ in Pflanzen aufgefundene krystallinische Eiweiss auch künstlich dargestellt werden könne, hat das Erscheinen verschiedener chemischer Arbeiten über Pflanzen-eiweiss Zeugnis von dem wachsenden Interesse an genauerer Kenntniss dieses Körpers abgelegt. Maschke's Verfahren bestand in Ausziehen der Proteinkörner von Paranüssen mit Wasser bei 40°–50°, Filtriren und Abdampfen des erhaltenen Auszuges bei derselben Temperatur bis zur Krystallisation. Die erhaltenen Eiweisskrystalle beschreibt Maschke als meist sechsseitige, dicke Täfelchen, welche das Licht stark reflectirten und aus einer Verbindung von Casein mit einer Säure bestehen sollten.

Nach ihm untersuchte Nägeli³⁾ eingehend die physikalischen Eigenschaften der Proteinkrystalle und nannte letztere in Ermangelung verschiedener, für Krystalle charakteristischer Merkmale, Krystalloide, während Hofmeister⁴⁾ für die Bezeichnung „Krystall“ eintrat.

Das erste, speciell Untersuchungen pflanzlicher Eiweisskörper behandelnde, grössere Werk verdanken wir Ritthausen.⁵⁾ Dieser hat jedoch krystallinisches pflanzliches Eiweiss nicht besonders berücksichtigt.

1876 veröffentlichte Sachsse⁶⁾ die Resultate seiner Untersuchungen über Paranusskrystalloide, und nimmt die

¹⁾ Dies. Journ. **74**, 436. — Botan. Zeitg. 1859, S. 409.

²⁾ Botan. Zeitg. 1855, S. 881.

³⁾ Sitzungsber. d. Münch. Acad. 1862, **2**, 120.

⁴⁾ Handb. d. physiol. Botanik **1**, 395 (1867).

⁵⁾ Die Eiweisskörper der Getreidearten, Hülsenfrüchte und Oelsamen. Bonn 1872.

⁶⁾ Sitzungsber. d. naturforsch. Ges. zu Leipzig. 1876.

Existenz eines phosphorsäurehaltigen Eiweisskörpers (Caseins) in der Paranuss an. Sein in demselben Jahre erschienenenes Werk¹⁾ enthält eine ausführliche Zusammenstellung der bis dahin auf dem Gebiete der Krystalloiduntersuchungen erzielten Resultate.

Ein Jahr später brachte Weyl²⁾ in seiner Abhandlung auf Grundlage der Merkmale, welche Hoppe-Seyler zur Unterscheidung thierischer Eiweisskörper empfiehlt, eine Einteilung der pflanzlichen, und bezeichnet danach das Eiweiss der Paranusskrystalle als ein Vitellin. Die von Maschke und Sachsse untersuchten Eiweisskörper hält er für Zersetzungsproducte, entstanden durch die Einwirkung des zur Darstellung angewendeten warmen Wassers auf das Vitellin der Proteinkörner; ebenso verwirft Weyl die von Ritt-hausen benutzte Gewinnungsmethode von pflanzlichem Eiweiss mittelst sehr verdünnter Kalilauge, da diese nach ihm auf das genuine Eiweiss verändernd einwirkt. Da bei seiner Darstellungsweise die angeführten Fehler vermieden sind, so nimmt er an, dass nur seinen Verbrennungsanalysen ein reines Vitellin (trotz des gefundenen Aschegehaltes von 2,6 %) gedient habe; seine Analysen ergaben im Vergleich zu denen Sachsse's einen höheren C- und einen niederen S-Gehalt (berechnet für aschefreie Substanz). Die Resultate der Untersuchung gaben schliesslich Weyl Veranlassung, die Frage über die Existenz genuinen Caseins verneinend zu beantworten.

In demselben Jahre erschien eine Mittheilung Schmiedeberg's³⁾ über die Darstellung krystallinischer Verbindungen aus Pflanzeneiweiss durch Behandeln des letzteren mit Magnesia. Derselbe fällte den in der Wärme bereiteten, wässrigen Auszug der Proteinkörner der Paranuss durch Einleiten von Kohlensäure, digerirte den Niederschlag mit wenig Magnesia bei 40° einige Zeit und dampfte die erhaltene, warm filtrirte

¹⁾ Die Farbstoffe, Kohlehydrate und Proteinsubst. Leipzig 1876.

²⁾ Beiträge zur Kenntniss thier. u. pflanzl. Eiweisskörper. Zeitschr. f. physiol. Chem. **1**, 72.

³⁾ Zeitschr. f. physiol. Chem. **1**, 205.

Lösung unter sorgfältigem Einhalten einer constanten Temperatur von 35° — 40° ein, bis zum Erscheinen polyëdrischer Krystalle.

Die im folgenden Jahre von Barbieri¹⁾ veröffentlichte Arbeit über das Eiweiss der Kürbissamen war hauptsächlich gegen die Kritik Weyl's gerichtet und enthielt vergleichende Versuche über die Brauchbarkeit der Darstellungsmethoden pflanzlichen Eiweisses nach Ritthausen und Weyl, nebst analytischen Belegen; seine Versuche führen ihn zu dem Schlusse, dass beide Methoden identische Eiweisskörper liefern.

1879 veröffentlichte Ritthausen²⁾ die Ergebnisse seiner eingehenden Untersuchungen über das Eiweiss von Ricinusamen; er erhält hierbei neben anderen Resultaten auch eine Bestätigung seiner bereits früher ausgesprochenen Vermuthung, dass gewisse Samen Eiweisskörper verschiedener Natur enthalten. Die von ihm analysirten Eiweisskörper seines Krystalloïdmehles (zumeist octaëdrische Proteïnkryrstalle enthaltend) zeichnen sich theils durch hohen Gehalt an Kohlenstoff ($53,8\%$), theils durch hohen Stickstoffgehalt ($18,43\%$) aus, während der geringe Aschengehalt nach ihm für die Reinheit der untersuchten Substanzen spricht.

Zu derselben Zeit erschien die Dissertation Schimper's³⁾, welche sehr ausführliche Untersuchungen der morphologischen, physikalischen und anatomischen Eigenschaften der Proteïnkryrstalle einer grossen Anzahl von Pflanzenarten enthält. Nach ihm gehören die Krystalle der Samen hauptsächlich in zwei Systeme, in die tetraëdrische Hemiëdrie des hexagonalen Systems und in die rhomboëdrische Hemiëdrie des hexagonalen Systems; er bezeichnet diese „organisirten“ Krystalle als „Krystalloïde“.

Eine wesentliche Erleichterung der Darstellung krystalinischen Eiweisses erzielte Drechsel⁴⁾ durch Anwendung

¹⁾ Dies. Journ. [2] 18, 102.

²⁾ Pflüg. Archiv 19, Heft 1.

³⁾ Inauguraldissert. Strassburg 1878.

⁴⁾ Dies. Journ. [2] 19, 331.

der Alkoholdialyse. Bei diesem Verfahren wird der Eiweisslösung das Wasser durch eine Membran hindurch mittelst Alkohols sehr allmählich entzogen, die Krystallisation erfolgt sehr gleichmässig, und gewisse fremde Substanzen bleiben theils in der Mutterlauge gelöst, theils werden sie vom Alkohol aufgenommen. Drechsel stellte auf die erwähnte Weise die Magnesiaverbindung des Paranusseiweisses dar und bestimmte zuerst den Wasser- und Asche- resp. Magnesiumgehalt derselben. Er fand einen Magnesiumgehalt von $1,4\%$, und Wassergehalt von $13,8\%$, während die nach Schmiedeberg's Methode dargestellten Krystalle bei gleichem Magnesiumgehalte nur $7,7\%$ Wasser ergaben; andere unter Anwendung von verdünnter Natronlauge erhaltene Krystalle verloren $15,5\%$ Wasser und hinterliessen als Asche $3,98\%$ kohlen-saures Natron.

Im Verlaufe weiterer Untersuchungen ist es vor Kurzem endlich Herrn Prof. Drechsel gelungen, aus dem Eiweisse der Paranusse Krystalle zu erhalten, die an Schärfe und gleichmässig guter Ausbildung der Krystallform nichts mehr zu wünschen übrig lassen. Das hierbei angewendete Verfahren bestand darin, eine in der Wärme gesättigte Lösung von Eiweiss in einer Salzlösung zu bereiten, welche dann bei sehr langsamem Erkalten das Eiweiss krystallinisch wieder ausschied. Da diese Methode einer allgemeinen Anwendung fähig schien, so habe ich auf Anregung des Herrn Prof. Drechsel in dieser Richtung eine Reihe von Versuchen angestellt, deren Resultate ich im Folgenden beschreiben will.

Als Material für meine Untersuchungen wählte ich Kürbissamen, da dieselben nach den Angaben Barbieri's sich durch einen hohen Gehalt an Proteinkörnern auszeichnen. Behufs Gewinnung der letzteren folgte ich in der Hauptsache dem Verfahren von Maschke.

Kürbissamen wurden durch Schälen von ihrer äusseren, harten Hülle befreit, zu gröblichem Pulver zermahlen und daraus durch Schlämmen mit Oel und Petroleumäther die Proteinkörner isolirt. Letztere setzten sich in der ölhaltigen Flüssigkeit bald zu Boden und konnten, nach Abgiessen der

überstehenden Flüssigkeit, durch wiederholtes Ausziehen mit Petroleumäther vom Oele befreit werden. Die letzten Spuren anhaftender fettartiger Substanz beseitigte ich durch längeres Behandeln mit gewöhnlichem Aether im Drechsel'schen Extractionsapparate; nach beendeter Extraction verjagte ich den Aether durch sofortiges Durchleiten eines trocknen Luftstromes bis zur völligen Trockne der Masse. Die Proteinsubstanz stellte so ein feines, weisses, lockeres Pulver dar, welches unter dem Mikroskope nur wenig Zellreste oder amorphe Substanz neben einer grossen Menge von Proteinkörnern erkennen liess; sie bildete das Ausgangsmaterial meiner weiteren Untersuchungen.

Ich suchte zunächst nach dem Verfahren, welches Schmiedeberg bei Darstellung seiner krystallinischen Eiweissverbindungen beschreibt, die gleichen Verbindungen aus der vorliegenden Proteinsubstanz zu erhalten. Zu dem Zwecke digerirte ich die letztere mit der 6—8fachen Menge Wassers bei 40°, filtrirte warm und leitete in das klare, schwach bräunliche Filtrat einen Strom Kohlensäure. Es entstand nach anhaltendem Einleiten endlich eine milchige Trübung, die jedoch auch nach längerem Stehen der Flüssigkeit nur wenig Eiweissniederschlag lieferte; derselbe zeigte mikroskopisch die halb krystallinischen Formen, welche Sachsse¹⁾ an seinem, auf gleiche Weise aus Paranusseiweiss erhaltenen Niederschlage beschreibt. Der Niederschlag löste sich ebenfalls leicht in Chlornatrium und verdünntem Alkali, und schied aus der Lösung des ersteren bei Zusatz von Wasser Eiweiss amorph wieder aus.

Die Menge des erhaltenen Niederschlages war jedoch stets so gering, dass damit die Darstellung einer krystallinischen Eiweissverbindung nicht mit Vortheil auszuführen war.

Ich versuchte nun nach Drechsel's²⁾ Verfahren aus dem concentrirten, wässrigen Auszuge der Proteinsubstanz direct Krystalle zu erhalten, und brachte das klare Filtrat des Auszuges in einen Alkoholdialysator. Nach kurzem

¹⁾ Die Farbstoffe etc. der Pflanzen, S. 315.

²⁾ Dies. Journ. [2] 19, 331.

Stehen erfolgte Ausscheidung krystallinischen Eiweisses, sowohl am Boden des Dialysators als körnige Masse, als an der Oberfläche der Flüssigkeit in Form einer zarten Krystallkruste; in beiden Fällen waren mikroskopisch polyëdrische Krystalle deutlich wahrzunehmen, welche stellenweise je nach ihrer Lage scharf begrenzte, scheinbar dreieckige Täfelchen darstellten. Die erhaltene Quantität an Eiweisskrystallen genügte aber auch in diesem Falle nicht zur Anstellung weiterer Versuche. Im Ganzen lieferten die wässrigen Auszüge dieser Proteinsubstanz eine weit geringere Ausbeute an Eiweiss, als sich bei Benutzung der Paranüsse ergab. Letztere müssen daher einen in reinem Wasser weit leichter löslichen Eiweisskörper enthalten, oder einen grösseren Gehalt an löslichen Salzen, welche die Lösung des Eiweisses vermittelten, besitzen. Ich prüfte daher den schwach sauer reagirenden Auszug der Kürbissamenproteinsubstanz auf seinen Salzgehalt. Nach Entfernung des Eiweisses mit Ammoniak versetzt, gab der Auszug einen Niederschlag von Phosphaten, während das Filtrat hiervon Kalisalze der Chlorwasserstoffsäure, Schwefelsäure und Phosphorsäure enthielt. Weitere Auszüge derselben Proteinsubstanz enthielten bei geringerem Salzgehalte auch an Eiweiss nur noch minimale Mengen gelöst, obgleich die mikroskopische Besichtigung in der extrahirten Substanz noch einen fast unverändert grossen Reichthum an Proteinkörnern erkennen liess; das Wasser war sonach ein höchst ungenügendes Lösungsmittel dieses Eiweisses.

Unter Anwendung des Weyl'schen Verfahrens digerirte ich hierauf die Proteinsubstanz bei gewöhnlicher Temperatur mit 10proc. Chlornatriumlösung. Innerhalb 12 Stunden war bei öfterem Umrühren alles Eiweiss in Lösung gegangen und konnte letztere nun von dem aus Zellfasern und Globoïden bestehenden Bodensatze abfiltrirt werden. In das mit einigen Tropfen Ammoniak neutralisirte Filtrat trug ich Chlornatrium bis zur völligen Sättigung ein, wodurch eine bei längerem Stehen zunehmende, flockige Ausscheidung erfolgte, die auch bereits von Barbieri bemerkt und nach der Art des Ausscheidens für Myosin gehalten wurde. Die

Menge dieser ausgeschiedenen Substanz war hier ebenfalls nur gering, doch genügten die damit angestellten Versuche zu dem Beweise, dass hier Ausscheidung eines anderen Eiweisskörpers nicht vorlag. Der flockige Niederschlag, von der Lösung durch Filtration getrennt, blieb bei entsprechendem Zusatze von Wasser völlig unlöslich, ebenso in Alkali, löste sich jedoch leicht nach Zufügen von wenig Essigsäure oder verdünnten Mineralsäuren; unter dem Mikroskope zeigte er sich als aus sehr kleinen, durchsichtigen, krystallinischen Körnchen bestehend. Auf dem Platinbleche erhitzt, verkohlte er ohne Bildung von ammoniakalischen Dämpfen und hinterliess eine grosse Menge weisser, aus Magnesia bestehender Asche. Da auch die vorgenommene Prüfung auf Eiweiss ein negatives Resultat ergab, so lassen die erwähnten Eigenschaften die flockige Ausscheidung als zusammenhängende Massen von Globoïden erkennen, die infolge ihrer winzigen Grösse vermuthlich die Poren des Papiers beim Abfiltriren der Lösung passirt hatten. Durch nochmalige Filtration gelang es, die Lösung frei von dieser Masse zu erhalten, und wurde das klare Filtrat nunmehr durch Zusatz einer grösseren Menge Wassers gefällt. Der hierdurch erhaltene flockige Eiweissniederschlag war rein weiss und besass alle Eigenschaften des Weyl'schen Vitellins.¹⁾ Der Niederschlag wurde nach Abhebern der überstehenden Flüssigkeit durch Auswaschen mit destillirtem Wasser möglichst von Salzen befreit und zuletzt auf dem Filter gesammelt. Mit diesem Eiweisse wiederholte ich die Darstellung der krystallinischen Magnesiaverbindung und gelang es mir diesmal, im Alkoholdialysator eine grössere Menge krystallinischer Körner zu erhalten. Eine Analyse derselben ergab:

0,6252 Grm. lufttrockner Substanz verloren bei 110° 0,0742 Grm. Wasser = 11,86 % und hinterliessen nach dem Glühen 0,0052 Grm. Magnesiaasche = 0,94 % für Trockensubstanz.

Die Asche war schwach gelblich gefärbt, vermuthlich

¹⁾ In der ausgefällten salzhaltigen Flüssigkeit erhielt ich durch Kupfersalzlösung nochmals einen Niederschlag, welcher viel phosphorsaures Kupfer und gegen 60 % trocknes Eiweiss enthielt.

infolge geringen Eisengehaltes. Im Vergleiche hiermit ist der von Drechsel gefundene Magnesiagehalt der analogen Verbindung des Paranusseiwisses ungefähr um die Hälfte höher.

Bei weiterer Darstellung der noch folgenden krystallinischen Eiweissverbindungen befolgte ich das bereits ange-deutete neuere Verfahren Drechsel's, da dieses bis jetzt vor allen anderen den Vorzug einer leichten und sicheren Erzielung gut ausgebildeter Krystalle bietet.

Bei Ausführung dieses Verfahrens vertheilt man frisch gefällten Eiweissniederschlag in wenig Wasser und setzt unter Erwärmen auf annähernd 40° allmählich so viel der als Lösungsmittel dienenden Salzlösung zu, dass alles Eiweiss gelöst und die Flüssigkeit durchscheinend wird. Hierauf wird im Warmtrichter filtrirt und das völlig klare Filtrat einer möglichst langsamen Abkühlung überlassen. Nach Erkalten der Lösung auf ungefähr $6-8^{\circ}$ hat sich der grösste Theil des Eiweisses am Boden und an den Wänden des Gefässes in meist mikroskopisch kleinen Krystallen ausgeschieden, während der mehr oder minder grosse Rest in der Mutterlauge gelöst bleibt.

Nach dieser Methode gelang es mir, aus dem Eiweisse der Kürbissamen mittelst Chlornatriumlösung Krystalle zu erhalten, die eine deutlich ausgeprägte Krystallform besaßen, die Form eines regulären Octaëders. Nicht immer jedoch war es möglich, nach dem angeführten Verfahren gleichmässig gut ausgebildete Krystalle darzustellen, und waren es namentlich noch zwei Uebelstände, welche sich zuweilen störend entgegenstellten. Diese bestanden in der doppelten Schwierigkeit, bei der langsamen Filtration der Eiweisslösung in der Wärme die Temperatur constant zu halten, und beim Lösen des Niederschlages das erforderliche Quantum an Salzlösung genau einzuhalten, resp. nicht zu überschreiten. Die Nichterfüllung dieser Bedingungen hatte im ersteren Falle eine nur kugelig-krystallinische, im zweiten Falle eine zu geringe oder auch gar keine Ausscheidung des Eiweisses zur Folge. Ich suchte daher die erwähnten Uebelstände bei

weiterer Darstellung zu umgehen und erreichte diesen Zweck endlich durch folgende Abänderung des Verfahrens.

Gut ausgewaschenen Eiweissniederschlag löste ich bei gewöhnlicher Temperatur in 20proc. Chlornatriumlösung, liess einige Zeit ruhig stehen und erhielt dann nach Filtration eine völlig klare Lösung. Diese versetzte ich mit so viel Wasser, dass eine milchige Trübung entstand, welche nach Erwärmen im Wasserbade auf etwa 30° wieder verschwand. Die klare Flüssigkeit wurde hierauf nochmals mit Wasser von gleicher Temperatur versetzt, bis eine nur geringe Trübung sichtbar wurde, und wiederum bis zum Verschwinden der Trübung höher erwärmt (zumeist genügt hierbei eine Steigerung auf 40°—42°). Das Ganze wurde dann, wie früher, einer allmählichen Abkühlung überlassen. Die auf diese Weise dargestellten Krystalle sind zwar ebenfalls mikroskopisch klein, übertreffen jedoch meist die vorigen noch an Grösse und gleichmässig guter Ausbildung der Krystallform.

Die erhaltenen Krystalle waren im frischen Zustande weich und biegsam, liessen sich jedoch durch vorsichtiges Reiben mit einem Glasstabe von den Wänden des Gefässes ablösen und durch gelindes Schütteln auf eine Stelle vereinigen, so dass sie nach Abgiessen der Lauge leicht auf dem Filter gesammelt werden konnten. Der Krystallbrei wurde dann auf einen Saugtrichter gebracht, nach Absaugen der Lauge die Krystalle durch Aufgiessen von Wasser gewaschen und nach Durchsaugen von Alkohol und Aether im trocknen Luftstrome getrocknet. Aus der restirenden Lauge konnte durch nochmalige Behandlung mit Wasser noch eine geringe Menge von Krystallen erhalten werden, letztere waren jedoch meist kleiner und theilweise von undeutlicher Form. Die restirenden Laugen fand ich reich an Phosphorsäuresalzen und Eisen.

Eigenschaften der Eiweisskrystalle.

Die Krystalle stellen ein weisses Pulver dar, welches mit wenig Wasser angertührt, unter dem Mikroskope deutliche Octaëder erkennen lässt. Sie lösen sich getrocknet ebenfalls in neutralen Salzen und verdünntem Alkali, wenn

auch minder leicht als die feuchten Krystalle. In Wasser sind dieselben unlöslich und behalten auch bei längerer Berührung damit unverändert ihre Krystallform, während die frischen Krystalle sich bald trüben und allmählich in den amorphen Zustand übergehen.

Ueber weitere physikalische und krystallographische Eigenschaften der Krystalle hatte Herr Dr. Schimper in Strassburg die Güte, genauere Untersuchungen anzustellen, und schreibt er darüber Folgendes:

„Krystalle aus Kürbissamen.

Krystallsystem regulär.

Auftretende Formen: O, zum Theil untergeordnet $\infty O \infty$. Häufig Zwillinge nach dem Spinellgesetze, mit sehr verkürzter Zwillingsaxe.

Dem Krystallsysteme entsprechend sind die Krystalle völlig isotrop.

Imbibitionsfähigkeit und dadurch bedingte Aufquellung findet bei diesen Krystallen ebenfalls statt; behandelt man die Krystalle mit Alkohol und fügt Wasser hinzu, so sieht man unter dem Mikroskope das Aufquellen stattfinden, unter sehr merklicher Abnahme der Lichtbrechung; sie lagern Jod und Farbstoffe in beliebiger Menge ein. Bildung von Rissen bei Behandlung der trocknen Krystalle mit Wasser findet nicht statt, was wohl auf geringere Sprödigkeit zurückgeführt werden muss (übrigens soll bemerkt werden, dass bei den Krystallen aus Paranüssen die Erscheinung meist nur bei Individuen von bedeutenderer Grösse, als die der Kürbiskrystalle auftritt).

Die Krystalle aus Kürbissamen sind gegen Reagentien etwas resistenter als die aus den Paranüssen; ein ähnlicher Unterschied besteht zwischen den natürlichen Krystallen des Paranusstypus und des Ricinustypus; die Löslichkeit in Ammoniak hört bei geringerer Verdünnung als für die der Paranuss bereits auf; eine verdünnte Jod-Jodkaliumlösung bewirkte Auflösung der Paranussskrystalle, nicht die der Kürbiskrystalle. Gegen Kali und Säuren scheinen sie sich gleich zu verhalten, diese Reagentien bewirken, sowie Am-

moniak, bei hinreichender Verdünnung ein Zersplittern. Die künstlichen Kürbiskrystalle unterscheiden sich von den natürlichen äusserlich nur durch viel vollkommenere Ausbildung; die Krystallformen sind dieselben. Das Verhalten der natürlichen Kürbiskrystalle habe ich wenig eingehend untersucht, da ihre schlechte Ausbildung sie zu wenig geeigneten Untersuchungsobjecten macht. Ich glaube indess, dass in Bezug auf die Quellbarkeit ein ähnlicher Unterschied besteht, wie zwischen künstlichen und natürlichen Paranusskrystallen; die natürlichen Kürbiskrystalle quellen in Säuren und Alkalien viel stärker auf, als die künstlichen.“

Es sei mir gestattet, an dieser Stelle Hrn. Dr. Schimper für diese Mittheilungen meinen aufrichtigen Dank zu sagen.

Die in vielen Punkten herrschende Uebereinstimmung der Eigenschaften der natürlichen und der künstlichen Eiweisskrystalle, namentlich aber die gleiche Krystallform beider sprechen dafür, dass das Eiweiss der künstlichen Krystalle das unveränderte der natürlichen ist, demnach das zur Gewinnung benutzte Verfahren eine wesentliche Zersetzung des genuinen Eiweisses nicht befürchten lässt.

Dass die Krystalle wirklich aus Eiweiss bestanden, bewiesen ausser dem angeführten Verhalten gegen Salzlösungen und Wasser, die angestellten Eiweissreactionen (nach Milon, Scherer, Einwirkung von Kupferlösung), welche sämmtlich ein positives Resultat ergaben. Beim Erhitzen auf dem Platinbleche bräunte sich anfangs die Substanz unter Entweichen von Ammoniak, blähte sich stark auf und gab unter Entwicklung des charakteristischen Geruches nach verbranntem Horn und brennbarer Gase eine sehr poröse, leichte Kohle, welche nach dem Glühen eine nur minimale Menge Asche von meist graugrüner Farbe hinterliess.

Weitere Untersuchungen der Krystalle erstreckten sich auf deren Wassergehalt und den Coagulationspunkt der Lösung.

Der Wassergehalt der Krystalle war wegen der Hygroscopicität derselben nur annähernd festzustellen; er variierte, je nach der Dauer des zum Trocknen der frischen

108 Gröbler: Ueber ein krystallinisches Eiweiss

Krystalle erfolgten Durchleiten trockner Luft, zwischen 9 bis 14 Proc. Ich habe deshalb eine Norm für den Wassergehalt in der Weise zu erhalten gesucht, dass ich die lufttrockne Substanz im Exsiccator über Chlorcalcium bis zum constanten Gewichte trocknete und dann den beim Erwärmen auf 110° noch weiter eintretenden Verlust ermittelte und procentisch berechnete.

Menge der angewendeten Substanz.	Verlust im Exsiccator.	% H ₂ O	Verlust bei 110°.	% H ₂ O	Gesamtverlust %.
0,6260	0,0290	4,63	0,0355	5,67	10,30
1,0047	0,0860	8,56	0,0552	5,49	14,05
0,3345	0,0140	4,22	0,0175	5,22	9,44
1,0390	0,0600	5,77	0,0505	4,86	10,63

Aus diesen Zahlen ergibt sich als mittlerer Werth 5,31% Wassergehalt der im Exsiccator getrockneten Eiweisskrystalle.

Beim Stehen der Trockensubstanz an der Luft stieg der Wassergehalt in kurzer Zeit wieder bis auf 9—10% und nahm dann, je nach dem Feuchtigkeitsgrade der umgebenden Luft, nur noch sehr allmählich und wenig zu.

Angewendet lufttrockne Substanz.	Trockensubstanz bei 110°.	Wasserverlust %.	Gewicht nach Stehen an der Luft.	Zunahme %.
0,6260	0,5615	10,30	0,6245	10,08
0,4250	0,3905	8,12	0,4325	9,71
0,9960	0,8930	10,34	0,9935	10,11

Der durchschnittliche Wassergehalt des lufttrocknen krystallinischen Eiweisses würde demnach etwa 10% betragen und vermindert sich derselbe an trockner Luft auf ungefähr die Hälfte (5,31%).

Bei Bestimmung der Coagulationstemperatur zog ich zugleich den Salzgehalt der Eiweisslösung in Berücksichtigung; bei der Ausführung benutzte ich Capillarröhrchen und verfuhr nach Art der Schmelzpunktbestimmung, indem die

deutlich eintretende Trübung der Eiweisslösung innerhalb der Capillare als Zeichen der Coagulation angenommen wurde.

Eine Lösung des Eiweisses in einer Lösung

von 1 Gew.-Thl. NaCl und 3 Thln. Wass. trübte sich bei 95°,									
„ 1	„	„	„	6	„	„	„	„	88°,
„ 1	„	„	„	9	„	„	„	„	81°,
„ 1	„	„	„	12	„	„	„	„	78°.

Mit der Zunahme der Concentration der als Lösungsmittel des Eiweisses dienenden Salzlösung erhöht sich sonach entsprechend der Temperaturgrad der Coagulation, eine Beobachtung, welche mit den Resultaten anderer derartiger Bestimmungen in directem Widerspruche steht.

Einwirkung verdünnter Säuren und Alkalien.

Die leichte Veränderlichkeit des frisch dargestellten Eiweisses ist schon seit längerer Zeit Gegenstand von Untersuchungen, doch differiren die Angaben über den Grad der Empfindlichkeit bei Einwirkung von Agentien nicht unbeträchtlich.

Im Anschluss an die vergleichenden Arbeiten Barbieri's über die Brauchbarkeit der Darstellungsmethoden von Eiweiss nach Ritthausen und Weyl habe ich mich bestrebt, den bereits von Barbieri erbrachten Beweisen einen neuen hinzuzufügen, indem ich aus dem nach beiden Methoden erhaltenen Eiweisse die beschriebenen Krystalle darzustellen versuchte. Zu diesem Zwecke wurden gleiche Mengen der Proteinsubstanz je mit verdünnter Kalilauge (1:1000) und mit 10proc. Chlornatriumlösung extrahirt und die erhaltenen Lösungen gefällt, im ersten Falle durch vorsichtiges Neutralisiren mit Essigsäure, im zweiten durch Zusatz von Wasser. Die erhaltenen Niederschläge wurden gut ausgewaschen und dann unter Erwärmen in Chlornatriumlösung gelöst; nach dem Erkalten hatten beide Lösungen Krystalle ausgeschieden, welche übereinstimmend die octaëdrische Krystallform besaßen. Ebenso zeigten die Krystalle beider Darstellungsweisen ein analoges Verhalten in ihrer Löslichkeit in Salzen und verdünntem Alkali, sowie bezüg-

lich der Fällbarkeit durch Wasser, resp. Säuren. Diese völlige Gleichartigkeit der erhaltenen Producte zeigt deutlich, dass bei vorsichtiger Anwendung von Ritthausen's Verfahren ein unzersetztes Eiweiss erhalten werden kann, und widerlegt die gegentheilige Behauptung Weyl's.

Beweise für die hohe Empfindlichkeit des frisch gefällten Eiweisses gegen freie Alkalien oder Säuren erhielt ich aber durch folgende Versuche, deren Mittheilung vielleicht nicht ohne Interesse ist.

Bei den verschiedenen Eiweissfällungen nach der Weyl'schen Methode machte ich die Wahrnehmung, dass der erhaltene Niederschlag, je nachdem er mit reinem destillirten, oder mit kohlensäurehaltigem Wasser ausgefällt worden war, Verschiedenheiten in seinen physikalischen Eigenschaften zeigte. Denn während sich der durch Fällung mit destillirtem Wasser erhaltene, sehr feinflockige, durchscheinende Niederschlag leicht und völlig wasserhell in Chlornatrium-lösung löste und deutlich ausgeprägte Krystalle lieferte, war der mit kohlensäurehaltigem Wasser ausgefällte Niederschlag grobflockig, löste sich, wenn er zum Absetzen einige Zeit unter Wasser gestanden hatte, nicht mehr vollständig in Chlornatriumlösung und gab keine octaëdrischen Krystalle, sondern nur undeutlich krystallinische, rundliche Gebilde. Die Ursache dieser Erscheinung konnte sowohl in der zersetzenden Einwirkung der freien Kohlensäure gesucht werden, als auch in der Unreinheit des betreffenden Niederschlages, infolge beigemengter, fremder Substanzen, welche durch Einfluss des kohlensäurehaltigen Wassers mit ausgefällt worden waren. Zur Entscheidung dieser Frage theilte ich einen, durch Fällung mit destillirtem Wasser erhaltenen Eiweissniederschlag in zwei gleiche Theile, rührte den einen mit destillirtem, den anderen mit kohlensäurehaltigem Wasser an und liess Beides in der Kälte über Nacht stehen. Eine am anderen Morgen vorgenommene Prüfung beider Niederschläge auf ihre Eigenschaften ergab genau wieder die bereits erwähnten Verschiedenheiten und constatirte damit die Einwirkung freier Kohlensäure auf das ursprüngliche Eiweiss.

Den Einfluss verdünnter caustischer Alkalien unter-

suchte ich ebenfalls, und machte sich hier namentlich die Höhe der Temperatur geltend. Dies bewies sowohl die später noch zu erwähnende Fähigkeit äusserst verdünnter, wässriger Kalk- und Magnesialösungen (1:50,000), bei wenig höherer Temperatur relativ grosse Mengen Eiweiss in Lösung zu erhalten, als auch die bei Zimmertemperatur wiederholte Darstellung von Eiweiss nach dem Verfahren Ritt-hausen's; es war dann das erhaltene Eiweiss nicht mehr ohne starken Rückstand in Chlornatriumlösung löslich und hatte seine Eigenschaft, Krystalle zu bilden, vollständig eingebüsst. blieb eine Lösung des Eiweisses in Kalilauge der angegebenen Verdünnung ca. zwei Tage bei 10—12° stehen, so war die beginnende Zersetzung durch Bildung von Ammoniak zu erkennen, welches, wenn auch in geringer Menge, durch Nessler'sches Reagens nachgewiesen werden konnte. Neutrale Alkalisalze halten bekanntlich das Eiweiss auch bei höherer Temperatur lange Zeit unverändert gelöst und verdient in dieser Hinsicht die Weyl'sche Methode der Vitellindarstellung, deren auch ich mich behufs Gewinnung des Eiweisses bediente, den Vorzug.

Nach Darstellung des krystallinischen Eiweisses mittelst Chlornatrium prüfte ich auch das Verhalten anderer Salze in dieser Beziehung und fand, dass die meisten der in Wasser löslichen, neutralen Salze frisch gefälltes Eiweiss in Lösung bringen, jedoch nur die Lösungen der Alkalien und alkalischen Erden das Eiweiss krystallinisch wieder ausschieden.

Ich erhielt Eiweisskrystalle, und zwar durchgängig in Octaëdern, aus Lösungen von:

Essigsauerm, salpetersauerm und phosphorsaurem Natron, Brom- und Jodkalium, Chlorammonium und oxalsauerm Ammon, Chlorbarium und Chlorcalcium, schwefelsaurer Magnesia, gelbem Blutlaugensalz.

Ein besonderes Verhalten zeigten hierbei die Kalksalze insofern, als das Eiweiss in den Lösungen derselben nicht, wie bei anderen Salzen, wasserhell, sondern nur trübe und unter Hinterlassen eines geringen Rückstandes löslich war.

Was die qualitative Untersuchung der Aschen dieser Eiweisskrystalle anlangt, so fand ich im Wesentlichen die

112 Gröbler: Ueber ein krystallinisches Eiweiss

bereits bekannten Bestandtheile, wie Eisen, Kalk, Magnesia, Phosphorsäure, immer jedoch noch das beim Lösen des Eiweisses verwendete Salz. Von den mehrfach ausgeführten qualitativen Analysen halte ich, um Wiederholungen zu vermeiden, die Mittheilung einer derselben für genügend; einige Angaben über den Procentgehalt der Eiweisskrystalle (sämmtlich aus Chlornatriumlösung erhalten) an Asche lasse ich vorausgehen.

1,0078 Grm. lufttr. Subst. (= 0,8717 Grm. Trockensubst.) gaben 0,0030 Grm. Asche = 0,34 % für Trockensubst.

1,0047 Grm. lufttr. Subst. (= 0,8635 Grm. Trockensubst.) gaben 0,0023 Grm. Asche = 0,26 % für Trockensubst.

1,0240 Grm. lufttr. Subst. (= 0,9140 Grm. Trockensubst.) gaben 0,0015 Grm. Asche = 0,16 % für Trockensubst.

Die Asche wurde nach Verkohlen des Eiweisses meist schon nach kurzem Glühen kohlefrei erhalten, und deshalb die Aschebestimmungen direct auf diese Weise ausgeführt.

Die Farbe dieser Aschen war häufig mehr oder weniger grünlich; der wässrige Auszug der Asche reagirte alkalisch infolge Gehaltes an kohlensaurem Alkali. In concentrirter Salzsäure löste sich die Asche völlig auf und gab nach Verjagen der überschüssigen Salzsäure die Lösung mit essigsaurem Natron einen Eisenniederschlag, in welchem sich durch molybdänsaures Ammon Phosphorsäure nachweisen liess. In dem Filtrate des Eisenniederschlages entstand nach Zusatz von oxalsaurem Ammon eine schwache Trübung durch Spuren von Kalk, nach Zufügen von Salmiak, phosphorsaurem Natron und Ammoniak ein krystallinischer Niederschlag von phosphorsaurer Ammon-Magnesia. Eine bei letzterer Fällung meist schwach hervortretende Blaufärbung deutete auf Kupfergehalt; es wurden deshalb die Aschen noch speciell auf die Gegenwart von Kupfer geprüft, und letzteres durch Schwefelwasserstoff und gelbes Blutlaugensalz als Aschenbestandtheil positiv nachgewiesen.¹⁾

¹⁾ Da (nach Bunsen's Versuchen) das Kupfer möglicherweise erst infolge Anwendung eines Messing-Gasbrenners der Asche beim Glühen zugeführt sein konnte, so versuchte ich andere Mengen Eiweiss unter Anwendung eines gläsernen Brenners, erhielt jedoch dasselbe Resultat.

Um zu ermitteln, welcher Art die Betheiligung der Salze bei Lösung und Krystallisation des Eiweisses sei, führte ich die nun folgenden Untersuchungen aus:

Zunächst bestimmte ich in den Eiweisskrystallen quantitativ den Gehalt desjenigen Salzes, mit dessen Hülfe das Eiweiss krystallinisch erhalten worden war; dabei ist es vielleicht nicht überflüssig zu bemerken, dass bei einem Gesamttaschengehalte von 0,2 — 0,3 % die erhaltenen Zahlen Anspruch auf absolute Genauigkeit natürlich nicht machen können. Den Mittheilungen der Ergebnisse dieser Analysen habe ich zugleich die Resultate der Elementaranalysen (so weit solche ausgeführt wurden) des betreffenden Eiweisses beigefügt.

Eiweisskrystalle aus Chlornatriumlösung.

A. Chlorbestimmung.

Das zu prüfende Eiweiss¹⁾ wurde in einer geräumigen Platinschale mit Hülfe von wenig reinem kohlsauren Natron in Wasser gelöst, die Lösung zur Trockne verdampft und bei allmählicher Steigerung der Hitze verkohlt. Die Kohle wurde wiederholt mit Wasser extrahirt, die vereinigten Auszüge in einer Platinschale auf ein kleines Volumen verdampft, filtrirt, mit wenig reiner Salpetersäure angesäuert und in dieser Flüssigkeit durch Silberlösung ein weisser Niederschlag erhalten. Letzterer konnte zum Theil auch aus Cyansilber bestehen, da beim Verkohlen des Eiweisses die Bildung von Cyanverbindungen nicht ausgeschlossen war; es wurde deshalb der Silberniederschlag mit wenig verdünnter Salzsäure digerirt, um vorhandenes Cyan an Blausäurebildung zu erkennen. Die letztere war jedoch weder durch Geruch, noch als Berlinerblau nachzuweisen. Der Niederschlag be-

¹⁾ Diese Eiweisskrystalle, wie die der folgenden Untersuchungen, waren vorher mit Wasser so lange ausgewaschen worden, bis das ablaufende Waschwasser nicht mehr auf Alkalisalz reagirte. Eine Zersetzung des Eiweisses durch das Behandeln mit Wasser war nicht zu bemerken, da die Eiweisskrystalle nach wie vor ihre Krystallform gut erhalten zeigten.

114 Gröbler: Ueber ein krystallinisches Eiweiss

stand demnach nur aus Chlorsilber; er wurde nach dem Auswaschen auf ein Filter gebracht, getrocknet, mit dem Filter verbrannt und im Porzellantiegel schwach geglüht. Nach dem Glühen wurde er nochmals mit Salpetersäure und Salzsäure behandelt und wieder geglüht.

1,1002 Grm. Subst. = 0,9825 Grm. Trockensubstanz gaben 0,0014 Grm. AgCl = 0,0004 Grm. Cl = 0,04 % für Trockensubst.

B. Natronbestimmung.

Eiweiss wurde verkohlt, und die Kohle wiederholt mit heissem Wasser extrahirt, filtrirt, auf einem Uhrglase zur Trockne verdampft, gewogen und als kohlenaures Salz berechnet. Nach der Gewichtsbestimmung prüfte ich das Salz auf Natron; nach Behandeln mit Salzsäure erhielt ich Würfel von Chlornatrium; der Flamme ertheilte das Salz eine intensive Gelbfärbung.

1,0240 Grm. Substanz = 0,9140 Grm. Trockensubst. gaben 0,0016 Grm. Na_2CO_3 = 0,0009 Grm. Na_2O = 0,1 % Na_2O = 0,07 % Na.

Danach würde die Trockensubstanz dieser Eiweisskrystalle enthalten haben:

Chlor	0,04 %
Natrium	0,07 „

Im Vergleiche zum krystallinischen prüfte ich auch das amorphe, nach Weyl's Methode gefällte Eiweiss; dasselbe war ebenfalls entsprechend gut ausgewaschen worden.

Chlorbestimmung: 0,9610 Grm. Subst. = 0,8650 Grm. Trockensubst. gaben 0,0012 Grm. AgCl = 0,00035 Grm. Cl = 0,04 % Cl.

Natronbestimmung: 1,7925 Grm. Substanz = 1,5995 Grm. Trockensubstanz gaben 0,0022 Grm. Na_2CO_3 = 0,0013 Grm. Na_2O = 0,09 % Na_2O = 0,06 % Na.

Elementaranalyse des Eiweisses.

Die Substanz mischte ich in Berücksichtigung ihres Schwefelgehaltes mit chromsaurem Blei, lagerte zwischen Kupferoxyd ein und verbrannte bei vorgelegten Kupferspiralen, zuletzt unter Zuleiten eines Sauerstoffstromes.

Den Stickstoff bestimmte ich volumetrisch nach Dumas,

unter Benutzung von Magnesit zur Erzeugung der Kohlensäure.*

Der Wassergehalt der Substanz wurde aus dem Gewichtsverluste bei 110° berechnet.

Das über die Bestimmung der Bestandtheile hier Gesagte gilt zugleich für die Elementaranalysen der weiterhin noch zu beschreibenden Eiweisskrystalle.

Eiweisskrystalle der Chlornatriumlösung.

Wasser- und Aschebestimmung:

0,9145 Grm. Substanz verloren bei 110° 0,0740 Grm. Wasser = 8,1 %, die erhaltenen

0,8405 Grm. Trockensubst. gaben 0,0015 Grm. Asche = 0,18 %.

Kohlenstoff- und Wasserstoffbestimmung:

0,3390 Grm. Subst. = 0,3116 Grm. Trockensubst. gaben:

0,2036 Grm. H_2O = 0,02262 Grm. H = 7,25 % H.

0,6080 „ CO_2 = 0,1658 „ C = 53,21 „ C.

0,3150 Grm. Subst. = 0,2895 Grm. Trockensubst. gaben:

0,1887 Grm. H_2O = 0,020966 Grm. H = 7,24 % H.

0,5650 „ CO_2 = 0,1541 „ C = 53,23 „ C.

0,2840 Grm. Subst. = 0,2610 Grm. Trockensubst. gaben:

0,1684 Grm. H_2O = 0,01872 Grm. H = 7,17 % H.

0,5090 „ CO_2 = 0,1388 „ C = 53,19 „ C.

Schwefelbestimmung:

1,2888 Grm. Subst. v. 12,5 % Wassergeh. = 1,1124 Grm. Trockensubstanz gaben 0,0865 Grm. $BaSO_4$ = 0,01189 Grm. S = 1,06 % S.

0,4478 Grm. Subst. = 0,3918 Grm. Trockensubstanz gaben 0,0298 Grm. $BaSO_4$ = 0,00409 Grm. S = 1,08 % S.

Stickstoffbestimmung:

0,2420 Grm. Subst. v. 9,71 % Wassergeh. = 0,2185 Grm. Trockensubstanz gaben 35,6 Ccm. N bei $15,6^{\circ}$ und 769,0 Mm. Bar. = 0,04207 Grm. N = 19,25 % N.

0,1875 Grm. Subst. v. 7,80 % Wassergeh. = 0,1728 Grm. Trockensubstanz gaben 29,0 Ccm. N bei 16° und 745,0 Mm. Bar. = 0,03316 Grm. N = 19,19 % N.

Tabelle der procentischen Werthe.

Analyse.	I.	II.	III.	Mittelwerthe.
C	53,21	53,23	53,19	53,21
H	7,25	7,24	7,17	7,22
N	19,25	19,19	—	19,22
S	1,06	1,06	—	1,07
O	—	—	—	19,10
Asche	0,18	0,18	0,18	0,18
				100,00

Eiweisskrystalle aus Lösung von schwefelsaurer Magnesia.

Die Darstellung dieser Krystalle war derjenigen mittelst Chlornatriumlösung gleich, doch erschienen mir die hier erhaltenen Eiweisskrystalle grösser als die vorigen, und, nach dem Aschengehalte zu schliessen, leichter rein zu erhalten; Krystallform ebenfalls octaëdrisch; der Aschengehalt betrug etwas über 0,1 Procent:

a) 1,0070 Grm. Subst. verloren bei 110° 0,0917 Grm. Wasser = 9,1 %; die erhaltenen 0,9153 Grm. Trockensubstanz gaben 0,0013 Grm. Asche = 0,14 %.

b) 1,2050 Grm. Subst. verloren bei 110° 0,1145 Grm. Wasser = 9,5 %; die erhaltenen 1,0905 Grm. Trockensubstanz gaben 0,0015 Grm. Asche = 0,13 %.

Die Aschen waren rein weiss und wollig voluminös; sie lösten sich vollständig in Salzsäure und liessen in dieser Lösung Spuren von Eisen und Phosphorsäure nachweisen.

Die Asche der Substanz b) prüfte ich quantitativ auf den Magnesiagehalt. Behufs dessen stellte ich die salzsaure Lösung dieser Asche dar, fällte in dieser durch essigsaures Natron die vorhandene Spur phosphorsäurehaltigen Eisens und versetzte das Filtrat hiervon zur Ausscheidung der Magnesia nach Zufügen von Salmiak und phosphorsaurem Natron mit Ammoniak. Der erhaltene Niederschlag der phosphorsauren Ammon-Magnesia ergab nach dem Glühen:

0,0034 Grm. 2 MgO PO₅ = 0,0012 Grm. MgO = 0,11 Grm. für Trockensubstanz.

Bestimmung von Schwefelsäure und Magnesia dieser Eiweisskrystalle.

A. Bestimmung der Schwefelsäure.

1,8707 Grm. Subst. (= 1,7024 Grm. Trockensubst.) wurden durch Digestion mit salzsäurehaltigem Wasser in eine klare Lösung von Syntonin verwandelt, und letztere heiss mit wenig Chlorbariumlösung versetzt. Die hierdurch entstandene Trübung zeigte die Bildung von schwefelsaurem Baryt an, der sich nach mehrtägigem Stehen allmählich zu Boden setzte. Die überstehende klare Flüssigkeit wurde hierauf durch ein kleines Filter gegossen, zuletzt der Barytniederschlag auf das Filter gespült, mit heissem Wasser ausgewaschen, getrocknet und gegläht. Ich erhielt

0,0102 Grm. Ba SO_4 = 0,0035 Grm. SO_3 = 0,20 % SO_3 für Trockensubstanz.

B. Magnesiabestimmung.

Die als Filtrat vom schwefelsauren Baryt erhaltene Syntoninlösung wurde sammt Waschwasser zur Trockne verdampft, der Rückstand verkohlt, die Kohle mit heissem, salzsäurehaltigen Wasser mehrmals extrahirt und die vereinigten Auszüge auf ein kleines Volumen verdampft. Der in letzterem noch enthaltene Baryt wurde durch Schwefelsäurezusatz entfernt und das Filtrat hiervon bis fast zur Trockne eingedampft. Die concentrirte wässrige Lösung des Rückstandes gab, erst mit Weinsäure, dann mit Salmiak, phosphorsaurem Natron und Ammoniak versetzt, einen krystallinen Niederschlag von phosphorsaurer Ammon-Magnesia. Aus diesem erhielt ich nach dem Glühen:

0,0064 Grm. 2 MgO PO_3 = 0,0023 Grm. MgO = 0,13 % MgO für Trockensubstanz.

Eine Zusammenstellung der erhaltenen procentischen Werthe für MgO und SO_3 ergibt annähernd die Zusammensetzung der schwefelsauren Magnesia:

Gefunden: MgO : 13 Thle.	Berechnet: MgO : 10 Thle.
SO_3 : 20 „	SO_3 : 20 „
<hr/> 33 Thle.	<hr/> 30 Thle.

118 Gröbler; Ueber ein krystallinisches Eiweiss

Elementaranalysen.

Wasser- und Aschebestimmung.

1,2050 Grm. Substanz verloren bei 110° 0,1145 Grm. Wasser = 9,50 %; die erhaltenen 1,0905 Grm. Trockensubst. gaben 0,0015 Grm. Asche = 0,13 %.

Kohlenstoff- und Wasserstoffbestimmung.

0,5530 Grm. Subst. = 0,5005 Grm. Trockensubst. gaben:

0,3162 Grm. H_2O = 0,03514 Grm. H = 7,02 %.

0,9785 „ CO_2 = 0,2669 „ C = 53,32 „

0,4445 Grm. Subst. = 0,4022 Grm. Trockensubst. gaben:

0,2523 Grm. H_2O = 0,02804 Grm. H = 6,97 %.

0,7880 „ CO_2 = 0,2104 „ C = 53,27 „

Stickstoffbestimmung:

0,2905 Grm. Subst. = 0,2628 Grm. Trockensubst. gaben 43,0 Ccm. N bei $14,2^{\circ}$ und 747,5 Mm. Bar. = 0,0497 Grm. N = 18,89 %.

0,2550 Grm. Subst. = 0,2306 Grm. Trockensubst. gaben 38,5 Ccm. N bei $17,8^{\circ}$ und 746,0 Mm. Bar. = 0,0436 Grm. N = 18,90 %.

0,2245 Grm. Substanz (von 10,11 % Wassergeh.) = 0,2019 Grm. Trockensubstanz gaben 32,5 Ccm. N bei $10,7^{\circ}$ und 757,5 Mm. Bar. = 0,03856 Grm. N = 19,10 % N.

Schwefelbestimmung:

0,6360 Grm. Substanz = 0,5750 Grm. Trockensubst. gaben 0,0411 Grm. $BaSO_4$ = 0,06616 Grm. S = 1,14 % S.

0,6695 Grm. Substanz = 0,6019 Grm. Trockensubst. gaben 0,0490 Grm. $BaSO_4$ = 0,0673 Grm. S = 1,12 % S.

Procentische Werthe für Trockensubstanz.

	Analyse I.	Analyse II.	Analyse III.	Mittelwerthe.
C	53,32	53,27	—	53,29
H	7,02	6,97	—	6,99
N	18,89	18,90	19,10	18,99
S	1,14	1,12	—	1,13
O	—	—	—	19,47
Asche	0,13	0,13	—	0,13
				100,00

Eiweisskrystalle der Chlorammoniumlösung.

Für die Gewinnung dieses krystallinischen Eiweisses gilt im Allgemeinen das bisher darüber Gesagte, ebenso über

Krystallform und Eigenschaften. Dass der Aschegehalt etwas geringer gefunden wurde, rührt wohl daher, dass das an der Eiweisskrystallisation theilhaftige Salz ein in der Hitze flüchtiges war.

0,9333 Grm. Substanz = 0,8265 Grm. Trockensubst. gaben 0,0008 Grm. Asche = 0,09 %.

Die Asche besass eine schwarzbraune Farbe und bestand zum grössten Theile aus Kupferoxyd, neben Spuren von Eisen und Phosphorsäure.

Beim Veraschen der Substanz im bedeckten Platintiegel bildete sich kurz vor Beginn der Verbrennung an Deckel und Wänden des Platintiegels ein schwacher, weisser Beschlag, der sich in Wasser leicht löste und nach Verdampfen der Lösung zur Trockne sich bei stärkerem Erhitzen wieder verflüchtigte; der Beschlag bestand demnach vermuthlich aus dem Chlorammonium des Eiweisses.

Einen weiteren Beweis für den Chlorammoniumgehalt dieses Eiweisses erhielt ich durch folgenden Versuch:

Eine bestimmte Gewichtsmenge des trocknen krystallinischen Eiweisses wurde in einer kleinen Schale in wenig Chlornatriumlösung gelöst, dann mit 0,1proc. Kalilauge versetzt, und die Schale bedeckt mit einer gut schliessenden Glasplatte, an deren innerer Seite sich ein Tropfen concentrirter Schwefelsäure befand. Mit einer gleich grossen Menge salmiakfreien Eiweisses wurde ebenso verfahren, um hierdurch ein Vergleichsobject der Einwirkung der Kalilauge auf reines Eiweiss zu haben. Beide Schälchen wurden in einem kalten, ammoniakfreien Raume aufbewahrt. Nach Verlauf eines Tages wurde die Schwefelsäure beider Glasplatten, mittelst wenig Wassers in Reagensgläser gespült und nach Zusatz überschüssiger Kalilauge durch Nessler'sches Reagens auf Ammoniak geprüft. In der ersteren Flüssigkeit entstand bald Gelbfärbung, während in der anderen Lösung erst nach längerer Zeit diese Erscheinung auftrat.

Bei Wiederholung dieses Versuches unter Anwendung stärkerer Kalilauge liess sich dasselbe beobachten, nur unter entsprechend stärkerem Hervortreten der Ammoniakreaction.

120 Grübler: Ueber ein krystallinisches Eiweiss

Die erlangten Resultate sprechen sowohl für die Gegenwart des Chlorammoniums in den betreffenden Eiweisskrystallen, als auch für den bereits früher erwähnten, zersetzenden Einfluss verdünnter Kalilauge bei längerer Einwirkung auf Eiweiss.

Was den erwähnten reichlichen Kupfergehalt der Eiweisskrystalle betrifft, so war es möglich, dass das Kupfer erst während der Darstellung als Verunreinigung in das Eiweiss gelangt war, und untersuchte ich deshalb eine grössere Menge der ursprünglich verwendeten Proteinsubstanz. Sie gab, unter Anwendung eines gläsernen Brenners verbrannt, eine Asche, in welcher durch Schwefelwasserstoff, Ammoniak und durch gelbes Blutlaugensalz wiederum Kupfer deutlich nachgewiesen werden konnte.

Da auch nach dem später beschriebenen, mehrmaligem Umkrystallisiren dieses Eiweisses eine Verminderung des Kupfergehaltes nicht zu bemerken war, so muss nach diesen Beobachtungen das Kupfer als mit dem Eiweiss verbunden angesehen werden.

Das Quantum der aus Chlorammoniumlösung erhaltenen Eiweisskrystalle war bei guter Ausbildung der letzteren stets ein sehr reichliches, und benutzte ich diesen Umstand zu dem Versuche, dieses krystallinische Eiweiss mehrmals umzukrystallisiren. Ich hoffte hierbei auf Grund der bereits angedeuteten Wahrnehmung, dass die Mutterlauge der Eiweisskrystalle stets stärker phosphorsäurehaltig war, als eine Lösung der daraus erhaltenen Krystalle, das Eiweiss schliesslich phosphorsäurefrei zu erhalten. Behufs dessen wurden aus einer grösseren Menge frisch gefällten Eiweisses mittelst Chlorammoniumlösung Krystalle dargestellt, letztere durch Abgiessen und Absaugen auf einem Filter von der Lauge möglichst befreit, noch feucht von Neuem gelöst und wiederum zum Krystallisiren gebracht. Auf diese Weise wurden die zuerst erhaltenen Krystalle noch dreimal umkrystallisirt. Nach jeder Krystallisation wurde ein bestimmtes Quantum des Eiweisses mittelst molybdänsauren Ammons geprüft und, wenn noch Phosphorsäure nachweisbar, von Neuem umkrystallisirt. Die Abnahme an Phosphorsäure war nach jeder Krystallisation deutlich wahrzunehmen, so dass endlich in

dem bei der vierten Krystallisation erhaltenen Eiweisse keine, in der davon restirenden Lauge eine nur schwer erkennbare Spur von Phosphorsäure mehr nachzuweisen war. Dass ich nach Trocknen der Krystalle bei Prüfung einer grösseren Menge (ca. 1,0 Grm. lufttrockner Substanz) in etwa 0,0010 Grm. kupferhaltiger Asche trotzdem noch eine Spur Phosphorsäure fand, könnte nur zur Annahme einer Verbindung der phosphorsauren Salze mit dem Eiweisse führen.

Elementaranalysen.

Die hierzu verwendete Substanz bestand in dem durch Umkrystallisiren gereinigten Eiweisse der Chlorammoniumlösung.

Wasser- und Aschebestimmung:

0,8255 Grm. Subst. verloren bei 110° 0,0785 Grm. Wasser = $9,5\%$; die erhaltenen 0,7470 Grm. Trockensubst. gaben 0,0008 Grm. Asche = $0,11\%$.

Kohlenstoff- und Wasserstoffbestimmung:

0,3595 Grm. Substanz = 0,3254 Grm. Trockensubst. gaben:

0,2139 Grm. H_2O = 0,02376 Grm. H = $7,31\%$,

0,6380 „ CO_2 = 0,1740 „ C = $53,47\%$

0,2855 Grm. Substanz = 0,2544 Grm. Trockensubst. gaben:

0,1704 Grm. H_2O = 0,01893 Grm. H = $7,32\%$,

0,5085 „ CO_2 = 0,1368 „ C = $53,63\%$

Stickstoffbestimmung:

0,1700 Grm. Subst. = 0,1541 Grm. Trockensubst. gaben 25,5 Ccm. N bei $14,4^{\circ}$ und 756,0 Mm. Bar. = 0,02978 Grm. N = $19,33\%$ N.

0,1810 Grm. Subst. = 0,1638 Grm. Trockensubst. gaben 27,0 Ccm. N bei $13,0^{\circ}$ und 750,8 Mm. Bar. = 0,03150 Grm. N = $19,23\%$ N.

0,3308 Grm. Subst. = 0,2994 Grm. Trockensubst. gaben 48,0 Ccm. N bei $15,6^{\circ}$ und 767,0 Mm. Bar. = 0,05698 Grm. N = $19,03\%$ N.

Schwefelbestimmung:

0,3345 Grm. Substanz = 0,3030 Grm. Trockensubst. gaben 0,0256 Grm. $BaSO_4$ = 0,003516 Grm. S = $1,16\%$ S.

Procentische Werthe für Trockensubstanz.

	Analyse I.	Analyse II.	Analyse III.	Mittelwerthe.
C	53,47	53,63	—	53,55
H	7,31	7,32	—	7,31
N	19,23	19,03	19,33	19,17
S	1,16	—	—	1,16
O	—	—	—	18,70
Asche	0,11	0,11	—	0,11
				100,00

In Verbindung mit dem beschriebenen Versuche über Entfernung der Phosphorsäure aus Eiweiss scheint mir noch das nachstehend Mitgetheilte über die Beziehung der Phosphorsäure zum Eiweiss nicht ohne einiges Interesse zu sein.

Ein Vergleich der bis jetzt vorhandenen Angaben über den Phosphorsäuregehalt des pflanzlichen Eiweisses lässt zunächst erkennen, dass mit der zunehmend besseren Reindarstellung der untersuchten Substanzen eine entsprechende Abnahme des Gehaltes an Phosphorsäure (und Asche) verbunden ist. So findet z. B. Ritthausen¹⁾ bei seinen Untersuchungen von Ricinussameneiweiss bei 2—3% Aschegehalt einen Phosphorsäuregehalt von 1,85%, welcher sich bei dem gereinigten Producte auf 1,51% verminderte. Sachsse²⁾ findet im Paranusseiweiss (nach Maschke's Verfahren gewonnen) bei minimalem Aschengehalte, resp. in aschefreier Substanz, nur 0,82% Phosphorsäure; er nimmt deshalb an, dass dieselbe ein wirklicher Bestandtheil seines aschefreien Eiweisses ist.³⁾

Eine beträchtliche Verminderung des Phosphorsäuregehaltes ergab sich ferner bei Untersuchung des krystallinischen Kürbissameneiweisses im Vergleiche zum amorphen, welches durch Fällen mit Kupferlösung erhalten worden war.

¹⁾ Die Eiweisskörper etc. S. 185.

²⁾ Die Farbstoffe etc. S. 316.

³⁾ Weyl dagegen schliesst aus seinen, ebenfalls mit Paranusseiweiss angestellten Untersuchungen, dass Phosphorsäure und Asche hier nur als Verunreinigung zu betrachten sind, und berechnet dementsprechend die Elementaranalysen seines Vitellins.

1) Amorphes Eiweiss.

0,7895 Grm. Substanz = 0,7099 Grm. Trockensubst. gaben 0,0168 Grm. $2 \text{ MgOPO}_5 = 0,0107$ Grm. $\text{P}_2\text{O}_5 = 1,55 \%$.

2) Krystallinisches Eiweiss.

0,7055 Grm. Substanz = 0,6882 Grm. Trockensubst. gaben 0,0028 Grm. $2 \text{ MgOPO}_5 = 0,0018$ Grm. $\text{P}_2\text{O}_5 = 0,26 \%$.

0,7220 Grm. Substanz = 0,6550 Grm. Trockensubst. gaben 0,0024 Grm. $2 \text{ MgOPO}_5 = 0,0015$ Grm. $\text{P}_2\text{O}_5 = 0,23 \%$.

Zur Bestimmung der Phosphorsäure löste ich das Eiweiss in verdünnter Kalilauge, verdampfte in einer Porzellanschale zur Trockne und verkohlte. Die Kohle wurde mit salzsäurehaltigem Wasser ausgezogen, die Auszüge zur Trockne verdampft, wieder in wenig Wasser gelöst und in dieser Lösung nach Zusatz von wenig Weinsäure die Magnesia als phosphorsaure Ammon-Magnesia gefällt.

Die mit der weiter getriebenen Reinigung des Eiweisses verbundene Abnahme an Phosphorsäure und Asche macht zwar die vorherrschende Annahme, dass die gefundene Phosphorsäure nur als schwer vom Eiweisse zu trennende Verunreinigung anzusehen sei, wahrscheinlicher, schliesst jedoch, wie bereits angedeutet, die Möglichkeit einer Verbindung phosphorsaurer Salze mit Eiweiss nicht aus.

Eiweisskrystalle aus Chlorcalciumlösung.

Ein von dem der bisher angeführten Salze etwas verschiedenes Verhalten zeigen die Kalksalze gegen Eiweiss, da mit Chlorcalcium eine klare Lösung nicht erzielt werden konnte. Die Lösung klärt sich weder durch Zusatz von mehr Chlorcalciumlösung, noch bei Steigerung der Temperatur, im letzteren Falle tritt sogar bei ungefähr 40° Ausscheidung des Eiweisses in grossen, käsigen, unlöslichen Flocken ein. Dieselben bilden nach dem Absetzen eine schwammige, zähe, gewebeähnliche Masse, welche nach dem Trocknen hart und hornartig durchscheinend wurde.

Um diese Uebelstände zu vermeiden, versetzte ich den Eiweissniederschlag behufs Lösung so lange unter Umschütteln abwechselnd mit Wasser und Chlorcalciumlösung, bis

124 Grübler: Ueber ein krystallinisches Eiweiss

kein ungelöstes Eiweiss mehr sichtbar war. Die auch hier schwach trübe erhaltene Lösung schied nach kurzem Stehen wenige Flocken aus und gab dann ein völlig wasserhelles Filtrat. Letzteres wurde zur Darstellung krystallinischen Eiweisses unter Wasserzusatz wie früher behandelt, beim Erwärmen jedoch eine Temperatur von 30° nicht erheblich überschritten.

Das ausgeschiedene Eiweiss war ebenfalls octaëdrisch krystallisirt, doch besaßen die Krystalle meist eine undeutliche Form. Beim Stehen an der Luft trockneten sie bald zu einer glasigen Masse, welche, mit Wasser übergossen, allmählich milchweiss wurde, schwach aufquoll und sich dann in Form einer zähen Haut vom Glase abziehen liess. Diese Haut war in Chlornatriumlösung und verdünntem Alkali unlöslich, während dies bei frisch erhaltenen Krystallen desselben Eiweisses, ebenso bei gut getrockneten, nicht der Fall war. Den Kalkgehalt der Krystalle vermochte ich in der Lösung (mittels Chlornatrium) direct durch oxalsaures Ammon nachzuweisen, es entstand hierdurch eine deutliche Trübung und später ein Bodensatz von oxalsaurem Kalk.

Wasser- und Aschegehalt entsprachen den bisher dafür erhaltenen Mengen.

1,0075 Grm. Subst. verloren bei 110° 0,1075 Grm. H_2O = 10,6%; die erhaltenen 0,9000 Grm. Trockensubst. gaben 0,0035 Grm. Asche (= 0,39%), welche nach Glühen vor dem Gebläse auf 0,0020 Grm. = 0,22% sich verminderte.

In der infolge Eisengehaltes schwach gelblich gefärbten Asche bestimmte ich den Kalk durch oxalsaures Ammon und erhielt nach Glühen vor dem Gebläse 0,0006 Grm. CaO = 0,07%; an Phosphorsäure fand ich in obiger Asche 0,00028 Grm. P_2O_5 = 14,0% der Asche.

Zur Anstellung weiterer Versuche mit diesem Eiweisse stand mir genügendes Material nicht zu Gebote.

Eine Zusammenstellung der Ergebnisse, welche die angestellten Untersuchungen über das krystallinische Eiweiss bisher geliefert haben, zeigt im Wesentlichen eine Ueber-

einstimmung der Eigenschaften aller der beschriebenen Eiweisskrystalle. Dieselben lassen weder in der Form, die durchgängig octaëdrisch ist, noch im Verhalten gegen Lösungs- und Fällungsmittel, noch beim Vergleiche der Elementaranalysen Verschiedenheiten entdecken. Demzufolge könnte man mit einigem Rechte annehmen, dass in allen Fällen dasselbe krystallinische Eiweiss, unabhängig von dem als Lösungsmittel verwendeten Salze, auskrystallisirt, und das Salz selbst an der Bildung der Eiweisskrystalle chemisch nicht theilhaft sei. Dieser Annahme entgegen stehen aber die Resultate, welche sich bei Prüfung auf anorganische Bestandtheile der Eiweisskrystalle ergaben. Danach war in dem untersuchten Eiweisse, theils direct in der Lösung, theils nach Veraschung, stets noch das zur Darstellung verwendete, anorganische Salz, wenn auch in geringer Menge, nachzuweisen. In den Fällen, wo sowohl Base als Säure des betreffenden anorganischen Salzes quantitativ bestimmt wurde, ergab sich ein Zahlenverhältniss der Säure zur Base, welches annähernd der Zusammensetzung des zur Darstellung angewendeten Salzes entsprach. Daraus lässt sich im Gegensatze zur ersteren Annahme folgern, dass dem bei der Eiweisskrystallisation angewendeten Salze eine chemische Theilnahme zugeschrieben werden kann, derart, dass das Salz als solches mit dem Eiweisse eine Verbindung bildet. Beweisend für letztere Ansicht scheint mir auch noch der Umstand zu sein, dass trotz aller Reinigungsversuche des Eiweisses der Gehalt an Aschebestandtheilen (z. B. der phosphorsauren Salze) bisher nicht unter das Minimum von 0,15 bis 0,2 % zu bringen war.

Verbindungen von Magnesia und Kalk mit Eiweiss.

1. Magnesiaverbindung.

Eiweissniederschlag wurde in Wasser vertheilt und dieser Flüssigkeit unter Erwärmen auf 40° allmählich kleine Mengen Magnesia zugesetzt, so lange, bis unter Eintreten einer deutlich alkalischen Reaction das Eiweiss in Lösung gegangen

war.¹⁾ Nach genügender Digestion wurde warm abfiltrirt und die nach mehrmaligem Rückgiessen endlich klar erhaltene Eiweisslösung langsam erkalten gelassen. Das dann ausgeschiedene Eiweiss bestand aus mikroskopisch kleinen, durchsichtigen Krystallkörnern, vermischt mit einzelnen, deutlich ausgebildeten Octaëdern. An Grösse erreichten die Krystalle die vorhergehenden kaum zur Hälfte, waren jedoch bezüglich der übrigen Eigenschaften in der Hauptsache den bisher beschriebenen Eiweisskrystallen gleich. Der Aschegehalt wurde jedoch beträchtlich höher gefunden:

0,8408 Grm. Substanz = 0,7629 Grm. Trockensubst. gaben 0,0044 Grm. Asche = 0,58 %.

In der Asche wurde nach Entfernung einer Spur Eisen durch essigsaures Natron die Magnesia als phosphorsaure Ammon-Magnesia gefällt und nach Glühen als pyrophosphorsaure Magnesia bestimmt. Ich erhielt:

0,0098 Grm. 2 MgO PO_3 = 0,0035 Grm. MgO = 0,046 % für Trockensubstanz.

Die von diesen Eiweisskrystallen restirende Mutterlauge wurde bei 40° zur Trockne verdampft und lieferte eine geringe Menge einer glasigen, spröden Masse, welche, zu feinem Pulver zerrieben, ebenfalls auf den Gehalt an Magnesia geprüft wurde.

1,0700 Grm. Subst. verloren bei 110° 0,790 Grm. Wasser = 7,8 %; die erhaltenen 0,9310 Grm. Trockensubst. gaben 0,0462 Grm. Asche = 4,9 %. Die Asche lieferte 0,0507 Grm. 2 MgO PO_3 = 0,0183 Grm. MgO = 1,96 Grm. MgO für Trockensubst.

Der unlösliche Rückstand endlich, welcher bei Digestion des Eiweisses mit Magnesia verblieb, lieferte 4,2 % Asche, die neben Phosphorsäure und Eisenoxyd hauptsächlich Magnesia enthielt.

Bei einer wiederholten Darstellung der Magnesiaverbindung nahm ich zugleich auf die Löslichkeitsverhältnisse Rücksicht.

Der Eiweissniederschlag wurde in 400 Ccm. Wasser

¹⁾ Eine vollständig klare Lösung konnte ich jedoch nie erzielen, sondern es bildete sich stets ein geringer amorpher Bodensatz.

vertheilt, mit Magnesia digerirt und aus der Lösung auf die beschriebene Weise Krystalle erhalten. Die über den Krystallen befindliche Lauge enthielt auch nach längerem Stehen noch viel kleine Eiweisskrystalle suspendirt, und konnte nur durch Centrifugiren davon befreit und als völlig klare Flüssigkeit erhalten werden. Das durch Krystallisation ausgeschiedene Eiweiss ergab nach dem Trocknen ein Gesamtgewicht von 5,5 Grm.

Die Mutterlauge der Krystalle lieferte nach Verdampfen einen glasigen Rückstand im Gewichte von 2,7 Grm.

Das erhaltene krystallinische Eiweiss sowohl, als den trocknen Verdampfungsrückstand der Mutterlauge prüfte ich ebenfalls auf Gehalt an Asche und Magnesia.

Krystallinisches Eiweiss:

1,0525 Grm. Substanz = 0,9645 Grm. Trockensubst. gaben 0,0050 Grm. Asche = 0,52 %.

Die Asche ergab 0,0166 Grm. $2 \text{ MgOPO}_3 = 0,0044 \text{ Grm. MgO} = 0,45 \% \text{ MgO}$.

Rückstand der Mutterlauge:

1,4525 Grm. Substanz = 1,2915 Grm. Trockensubst. gaben 0,0605 Grm. Asche = 5,3 %.¹⁾

Die Asche gab 0,0650 Grm. $2 \text{ MgOPO}_3 = 0,0234 \text{ Grm. MgO} = 1,81 \% \text{ für Trockensubst.}$

Die 2,7 Grm. Eiweiss des Rückstandes enthielten also 0,0435 Grm. MgO, danach waren in 400 Ccm. Flüssigkeit bei 40° annähernd 8,0 Grm. Eiweiss und 0,0734 Grm. MgO gelöst, = 2 % Eiweiss und 0,00183 % MgO.

Für erwähnenswerth halte ich noch das Resultat der Aschenanalysen des krystallinischen Eiweisses und des amorphen Rückstandes der Mutterlauge. Beide Aschen gaben in salzsaurer Lösung durch Kochen mit essigsauerm Natron Eisenniederschläge, doch enthielt der Eisenniederschlag der

¹⁾ Das gefundene Mehrgewicht dieser Asche (wie dasjenige der ersten Darstellung) im Vergleich zum Magnesiagehalte rührte nur zum Theil von Alkalisalzen und Eisen her; zumeist muss es der vorhandenen Phosphorsäure zugeschrieben werden. Vermuthlich war auch schon ein Theil der Magnesia in der Eiweisslösung als phosphorsaures Salz gelöst.

128 Gröbler: Ueber ein krystallinisches Eiweiss

ersteren Asche vorwiegend reines Eisenoxyd, neben Spuren von Phosphorsäure, während in der zweiten Asche sowohl der Eisenniederschlag, als die davon restirende Lösung reichlich Phosphorsäure enthielt. Dies lässt darauf schliessen, dass die Magnesia während der Digestion dem Eiweisse den grössten Theil der Phosphorsäure entzieht, indem sie damit theils den unlöslichen Digestionsrückstand bildet, theils, wie bereits in der Anmerkung erwähnt wurde, als phosphorsaures Salz in Lösung geht.

Die Elementaranalysen dieser krystallinischen Eiweissverbindung gaben für Trockensubstanz etwas niedrigere Zahlen, als die vorhergehenden; es ist dies zum Theil wohl auf den höheren Aschegehalt zurückzuführen, zum Theil vielleicht auch auf die geringere Reinheit der Substanz, da letztere wegen ihrer sehr kleinen Krystalle nicht genügend auszuwaschen war. Ich habe deshalb die Werthe für aschefreie Substanz beigelegt.

Elementaranalyse.

Wasser- und Aschebestimmung:

1,0525 Grm. Substanz verloren bei 110° 0,0880 Grm. Wasser = 8,36 %; die erhaltenen 0,9645 Grm. Trockensubst. gaben 0,0050 Grm. Asche = 0,52 %.

Kohlenstoff- und Wasserstoffbestimmung:

0,2625 Grm. Subst. = 0,2406 Grm. Trockensubst. = 0,2392 Grm. aschefreie Subst. gaben:

0,1602 Grm. H_2O = 0,0178 Grm. H	{	= 7,20 % f. Trockensubst.
0,4645 „ CO_2 = 0,1267 „ C	{	= 52,60 „ f. Trockensubst.

0,3510 Grm. Subst. = 0,3217 Grm. Trockensubst. = 0,3199 Grm. aschefreie Subst. gaben:

0,2088 Grm. H_2O = 0,0232 Grm. H	{	= 7,21 % f. Trockensubst.
0,6220 „ CO_2 = 0,16963 „ C	{	= 52,73 „ f. Trockensubst.

Stickstoffbestimmung:

0,2340 Grm. Subst. = 0,2194 Grm. Trockensubst. = 0,2133 Grm. aschefreie Subst. gaben 36,0 Ccm. N bei $15,5^{\circ}$ und 751,5 Mm. Bar.

$$= 0,041579 \text{ Grm. N } \left\{ \begin{array}{l} = 18,95 \% \text{ f. Trockensubst.} \\ = 19,02 \% \text{ f. aschefr. Subst.} \end{array} \right.$$

0,2165 Grm. Subst. = 0,1985 Grm. Trockensubst. = 0,1973 Grm aschefr. Subst. gaben 33,5 Cem. N bei 16,0° und 739,0 Mm. Bar.

$$= 0,03751 \text{ Grm. H } \left\{ \begin{array}{l} = 18,89 \% \text{ f. Trockensubst.} \\ = 18,96 \% \text{ f. aschefr. Subst.} \end{array} \right.$$

Schwefelbestimmung:

0,8220 Grm. Subst. = 0,7535 Grm. Trockensubst. = 0,7496 Grm. aschefr. Subst. gaben 0,0521 Grm. BaSO₄ = 0,00724 Grm. S

$$= 0,00724 \text{ Grm. S } \left\{ \begin{array}{l} = 0,96 \% \text{ f. Trockensubst.} \\ = 0,97 \% \text{ f. aschefr. Subst.} \end{array} \right.$$

Procentische Werthe.

Trockensubstanz.				Aschefreie Substanz.			
	Analyse I.	Analyse II.	Mittel.		Analyse I.	Analyse II.	Mittel.
C	52,60	52,73	52,66	C	52,95	53,02	52,98
H	7,20	7,21	7,20	H	7,24	7,25	7,25
N	18,95	18,89	18,92	N	19,02	18,96	18,99
S	0,96	—	0,96	S	0,97	—	0,97
O	—	—	19,74	O	—	—	19,81
Asche	0,52	0,52	0,52				
			100,00				100,00

2. Kalkverbindung.

Die Anwendung des kaustischen Kalks zur Darstellung von krystallinischem Eiweiss erfordert mehr Vorsicht, da Kalkhydrat sehr energisch auf frisch gefälltes Eiweiss einwirkt. Letzteres liess sich schon bei Anwendung von Kalkwasser beobachten, welches trotz seines geringen Kalkgehaltes den darin vertheilten Eiweissniederschlag schnell in grosse käsige Flocken verwandelte, die sich ähnlich dem geronnenen Eiweisse verhielten und später den Boden des Gefässes als unlösliche, schwammige Masse bedeckten; Chlornatrium und verdünntes Alkali vermochten es dann nicht mehr zu lösen. Verdünntes Kalkwasser von noch deutlich alkalischer Reaction verlor dieselbe beim Vermischen mit einer hinreichenden Menge von Eiweissniederschlag; die dann

130 Grübler: Ueber ein krystallinisches Eiweiss

neutral reagirende Flüssigkeit enthielt jedoch nur wenig Eiweiss gelöst.

Behufs Darstellung der Krystalle vertheilte ich Eiweissniederschlag in viel Wasser und setzte unter Umschütteln tropfenweise Kalkwasser so lange zu, bis sich eine schwach alkalische Reaction bemerkbar machte. Hierauf digerirte ich unter weiterem vorsichtigen Zusetzen von Kalkwasser bei 40° , bis die Flüssigkeit unter Abscheidung eines geringen gelblichen Bodensatzes durchscheinend geworden war. Die so dargestellte Lösung wurde nach Filtration in der Wärme völlig wasserhell und schied nach dem Erkalten Eiweiss krystallinisch aus. Die erhaltenen Krystalle stimmten im Aussehen völlig mit denen der Magnesiaverbindung überein, verhielten sich auch bezüglich der übrigen Eigenschaften analog. Die Mutterlauge dieser Krystalle wurde nach dem Centrifugiren ebenfalls verdampft, bis zum Entstehen eines trocknen, glasigen Rückstandes.

Ich untersuchte auch hier das Eiweiss der Krystalle und des Rückstandes der Mutterlauge, sowie den während der Digestion entstandenen, unlöslichen Bodensatz.

A. Krystallinisches Eiweiss:

1,0390 Grm. Substanz verloren bei 110° 0,1105 Grm. Wasser = 10,63 %; die erhaltenen 0,9285 Grm. Trockensubst. hinterliessen nach Glühen vor dem Gebläse 0,0115 Grm. Asche = 1,2 %.

Die salzsaure Lösung der Asche gab mit essigsaurem Natron einen rothbraunen Eisenniederschlag, der eine Spur Phosphorsäure enthielt; im Filtrat hiervon wurde der Kalk durch oxalsaures Ammon gefällt und als kaustischer Kalk bestimmt. Ich erhielt 0,0101 Grm. CaO = 1,09 % für Trockensubst.

B. Verdampfungsrückstand der Mutterlauge:

1,9510 Grm. Substanz = 1,7715 Grm. Trockensubst. gaben 0,0608 Grm. Asche = 3,1 %, die sich nach Glühen vor dem Gebläse auf 0,0450 Grm. = 2,3 % verminderte.

Der wässrige Auszug dieser Asche reagirte stark alkalisch; aus der salzsauren Lösung wurde durch essigsaures Natron wenig eines weissen, phosphorsäurehaltigen Eisenniederschlages gefällt. Der Kalkgehalt der Asche wurde wie bei der vorigen bestimmt und erhalten: 0,0194 Grm. CaO = 1,09 % f. Trockensubst.

C. Der amorphe Digestionsrückstand

ergab nach Veraschen 2,8 % Asche von rothbrauner Farbe und enthielt neben Eisenoxyd und Kalk viel Phosphorsäure.

Der Gehalt der zwei letzten krystallinischen Eiweisskörper an den zur Darstellung verwendeten Basen lässt wohl kaum noch in Zweifel darüber, dass hier wirkliche Verbindungen des Eiweisses mit alkalischen Erden bestehen, indem hierbei das Eiweiss die Stelle einer Säure vertritt. Berechnet man das Moleculargewicht dieses Eiweisses, so ergibt sich, dass 40 Theile MgO mit 8848 Thln. Eiweiss, und 56 Thle. CaO mit 5081 Thln. Eiweiss verbunden sind. Diese Zahlen stehen ziemlich genau in dem Verhältnisse von 4:7, denn es sind dann

35,392	Thle. Eiweiss mit	160	Thln. MgO,
35,567	„ „ „	392	„ CaO

verbunden; danach würden im Molekül des Eiweisses der Magnesiaverbindung 8 H-Atome durch Mg, und im Eiweisse der Kalkverbindung 14 H-Atome durch Ca vertreten sein. Dieses Verhältniss muss etwas eigenthümlich erscheinen, findet aber seine Erklärung vielleicht in Folgendem:

Nach den Resultaten der Analysen betrug der Gehalt des krystallinischen Magnesiaeiweisses an Magnesia 0,45 %, der des amorph aus der Mutterlauge erhaltenen 1,82 %, während das auf analoge Weise aus der Kalkverbindung gewonnene Eiweiss in beiden Fällen 1,09 % CaO enthielt, also die bei der Darstellung gebildete, in Lösung befindliche Eiweissverbindung unverändert wieder ausgeschieden worden war.

Die ursprünglich in Lösung befindliche Eiweissverbindung der Magnesia besass vermuthlich eine der Kalkverbindung entsprechende Zusammensetzung, erlitt jedoch dann beim Auskrystallisiren eine Spaltung in der Weise, dass ein magnesiaarmes Eiweiss krystallinisch sich ausschied, während ein Eiweiss mit hohem Magnesiagehalte in der Mutterlauge gelöst blieb.

Verhalten des Eiweisses gegen Salze schwerer Metalle.

Die Untersuchungen erstreckten sich hier nur auf amorphe Eiweissverbindungen, da es mir, wie bereits angedeutet, nicht gelang, unter Anwendung dieser Salze Eiweisskrystalle darzustellen.

Eingehendere Versuche über das Verhalten des Kupfers zum Eiweiss verdanken wir bereits Ritthausen¹⁾, welcher bei seinen Untersuchungen Kupfersalzlösungen vielfach als Fällungs- und Trennungsmittel von pflanzlichen Eiweisskörpern anwendet und die Zusammensetzung des Eiweisses aus den Analysen der erhaltenen Kupferverbindungen ableitet. Seine spätere Mittheilung über Ricinussameneiweiss vervollständigte diese Untersuchungen noch weiter durch Analysen der erhaltenen Kupferverbindungen.

Das Verfahren, dessen ich mich zur Darstellung der Kupferverbindung des Eiweisses bediente, unterschied sich im Wesentlichen nicht von der Methode Ritthausen's. Eine Lösung des Eiweisses in Chlornatrium wurde mit Kupfersalzlösung im geringen Ueberschusse versetzt und der erhaltene, bläulich-weiße Niederschlag mit Wasser ausgewaschen, so lange die zuletzt eintretende starke Quellung es noch gestattete. Nach Zusatz von Alkohol schrumpfte der Niederschlag zusammen, so dass er durch Pressen zwischen Fliesspapier und Stehen an der Luft trocken erhalten werden konnte; derselbe stellte dann eine hornartige grüne Masse dar, die sich leicht zu bläulich-weissem Pulver zerreiben liess. Wurde der Niederschlag unter Anwendung von Alkohol und Aether getrocknet, so lieferte er ein lockeres Pulver von der bläulich-weißen Farbe des frischen Niederschlages. Letzteres prüfte ich auf Wasser- und Aschegehalt:

0,8365 Grm. Substanz verloren bei 110° 0,0930 Grm. Wasser = 11,1 %; die erhaltenen 0,7433 Grm. Trockensubst. gaben 0,0138 Grm. Asche = 1,8 %

Die Asche besass eine schwarz-grüne Farbe und war

¹⁾ In seinem Werke: Die Eiweisskörper etc.

stark phosphorsäurehaltig; aus der salzsauren Lösung derselben wurde das Kupfer mittelst Zink ausgeschieden und als Metall bestimmt.

0,7433 Grm. Trockensubstanz gaben 0,0061 Grm. Cu = 0,82 % = 0,0076 Grm. CuO = 1,08 %.

Der Phosphorsäuregehalt dieser Substanz betrug 1,55 %, und lässt dies, namentlich im Vergleich mit dem niederen Kupfergehalte des krystallinischen Eiweisses, annehmen, dass der in amorphen Kupferverbindungen gefundene Kupfergehalt infolge Beimengung von phosphorsaurem Kupfer ein zu hoher ist.

Bezüglich der Eigenschaften des Kupfereiweissniederschlages bestätigten sich die von Ritthausen mitgetheilten Beobachtungen; er löste sich, frisch und getrocknet, in verdünnter Kalilauge, leichter noch in ammoniakhaltigem Wasser mit schön violetter Farbe auf und schied sich beim Neutralisiren wieder aus; ein Versuch, aus der ammonhaltigen Lösung durch Alkoholdialyse Krystalle zu erhalten, hatte keinen Erfolg. Bei längerem Stehen ging die violette Farbe der Lösung allmählich in Braun über, vermuthlich infolge Bildung von Schwefelkupfer, ohne jedoch dabei den für Eiweissfäulniss charakteristischen Geruch auftreten zu lassen.

Weniger bekannt scheint die Eigenschaft von Kupfer-salzen und einiger anderer Metallsalze zu sein, lösend auf frisch gefälltes Eiweiss zu wirken. Den im Wasser vertheilten Eiweissniederschlag vermochte ich durch Zusatz von Kupferlösung zu einer völlig klaren, bläulichen Flüssigkeit zu lösen; beim Erwärmen nahm die Lösung, analog den Alkalisalzen, noch mehr Eiweiss auf, welches nach dem Erkalten amorph wieder ausgeschieden wurde. Auf Zusatz von wenig Chlornatrium zur Kupfereiweisslösung trat sofort flockige Ausscheidung des Eiweisses ein, und zeigte sich so-nach hier die eigenthümliche Erscheinung, dass dieselbe Salz-lösung sowohl als starkes Lösungs-, als als starkes Fällungs-mittel des Eiweisses auftreten kann.

Versuche über das Verhalten von Salzen anderer schwerer Metalle (wie Zinnchlorür und -chlorid, neutrales und basisch-essigsames Blei) ergaben genau dieselben Resultate, doch

134 Grüber: Ueber ein krystallinisches Eiweiss

scheinen Bleisalze noch energischer lösend auf das Eiweiss zu wirken, da eine so dargestellte Lösung auch nach Zusatz grosser Mengen Wassers nicht wieder gefällt wurde.

Eine Zusammenstellung der Resultate, welche aus diesen Untersuchungen hervorgehen, ergiebt Folgendes:

1) Die Kürbissamen enthalten ein Eiweiss, welches leicht in gut ausgebildeten Krystallen erhalten werden kann; dasselbe krystallisirt in regulären Octaëdern.

2) Die in den Kürbissamen enthaltene Proteinsubstanz besteht zum weitaus grössten Theile aus dem octaëdrisch krystallisirenden Eiweisse; letzteres bildet vielleicht den alleinigen Eiweisskörper der Proteinsubstanz, da noch nicht erwiesen ist, dass das nach Fällung und Krystallisation in den Laugen in geringer Menge gefundene Eiweiss ein anderes ist.

3) Das eingeschlagene Verfahren der Darstellung des krystallinischen Eiweisses (nach Drechsel) unter Anwendung von Salzen ist vor allen anderen jetzt bekannten Methoden dazu geeignet, einen reinen, unveränderten Eiweisskörper in Krystallen zu gewinnen.

4) Die künstlichen Eiweisskrystalle sind in der Krystallform übereinstimmend mit den natürlichen Proteinkrystallen; eine wesentliche Zersetzung des genuinen Eiweisses infolge der Behandlungsweise zur Darstellung der künstlichen Krystalle ist demnach nicht anzunehmen.

5) Auch nach dem Verfahren von Ritthausen kann ein Eiweiss gewonnen werden, welches, gleich dem Weyl'schen Vitellin, octaëdrische Krystalle liefert, woraus hervorgeht, dass dasselbe durch die angewandte Methode keine Veränderung erlitten hat.

6) Frisch gefälltes Eiweiss wird schon durch Einfluss freier Kohlensäure verändert.

7) Die Coagulationstemperatur des Eiweisses ist abhängig von dem Salzgehalte der Lösung und steigt entsprechend der Menge des zum Lösen des Eiweisses verwendeten Salzes.

8) Obgleich die aus verschiedenen Salzlösungen erhaltenen krystallinischen Eiweisse sämmtlich dieselbe Krystallform besitzen, ist es doch möglich, dass sie mit geringen Mengen der betreffenden anorganischen Salze Verbindungen bilden, da in dem darauf untersuchten Eiweisse stets das zur Krystallisation verwendete Salz deutlich nachzuweisen war.

9) Beim öfteren Umkrystallisiren des Eiweisses verschwindet der Phosphorsäuregehalt schliesslich fast vollständig; die Phosphorsäure ist demnach nicht ein integrierender Bestandtheil des Eiweisses, wie etwa des Lecithins oder Nucleins, sondern vielleicht als Salz mit ihm verbunden, wie Kochsalz, schwefelsaure Magnesia, Chlorammonium u. s. w. in den beschriebenen Krystallen.

10) Die krystallinischen Verbindungen des Eiweisses mit alkalischen Erden besitzen ebenfalls octaëdrische Krystallform; sie zeichnen sich gegenüber den Eiweisskrystallen der Salzlösungen durch einen höheren Gehalt an der zur Darstellung benutzten Basis aus, und vertritt hier das Eiweiss die Stelle einer Säure.

11) Das Moleculargewicht dieses Eiweisses berechnet sich aus den Verbindungen der alkalischen Erden für Magnesia-eiweiss auf 8848, für Kalkeiweiss auf 5081, und lässt sich die Verschiedenheit dieser Moleculargewichte vielleicht auf die leichte Veränderlichkeit der Magnesiaverbindung gegenüber der Kalkverbindung zurückführen.

12) Das krystallinische Eiweiss unterscheidet sich von dem amorphen:

- 1) durch einen weit geringeren Asche- und Phosphorsäuregehalt;
- 2) durch einen höheren Gehalt an Kohlenstoff, Stickstoff und Schwefel.

Ein Vergleich der Analysen von aus Chlornatriumlösung amorph (A) und krystallinisch (B) erhaltenem Eiweisse giebt folgende procentische Werthe:

A. Amorphes Eiweiss (nach Barbieri).		B. Krystallinisches Eiweiss.	
C	= 51,88 %	C	= 53,21 %
H	= 7,51 „	H	= 7,22 „
N	= 18,08 „	N	= 19,22 „
S	= 0,60 „	S	= 1,07 „
O	= 21,93 „	O	= 19,10 „
	<hr/>	Asche	= 0,18 „
	100,00		<hr/>
Asche	= 1,11 %		100,00

Danach enthält das krystallinische Eiweiss doppelt so viel Schwefel, als das amorphe, und einen Mehrgehalt an Kohlenstoff von 1,5 %, und Stickstoff von 1,0 %. Dagegen enthält das amorphe Eiweiss ein Plus von 0,47 % H, welches einer Gewichtsmenge von 4,30 % H_2O entsprechen würde.

Vergleicht man die procentische Zusammensetzung des krystallinischen Eiweisses mit dem amorphen in der Weise, dass die procentischen Werthe der einzelnen Bestandtheile des krystallinischen auf C 51,88 berechnet werden, so ergibt sich in nachstehenden Zahlen ein Minus von 2,52 %.

C	=	51,88
H	=	7,04
N	=	18,74
S	=	1,04
O	=	18,62
Asche	=	0,16
		<hr/>
		97,48

Nehmen wir dieses Minus als Wasser an und ziehen von den Zahlen der Barbieri'schen Analyse die entsprechende Menge Wasserstoff und Sauerstoff ab, so erhalten wir folgende Zahlen:

C	=	51,88
H	=	7,23
N	=	18,08
S	=	0,60
O	=	19,69
		<hr/>
		97,48

welche mit den von mir für das krystallinische Eiweiss gefundenen hinreichend übereinstimmen, um die Annahme zu unterstützen, dass beide Eiweisspräparate sich in ihrer Zu-

sammensetzung nur durch einen verschiedenen Wassergehalt unterscheiden. Barbieri's amorphes Eiweiss müsste demnach eine gewisse Menge Wasser enthalten, welches bei 110° noch nicht entweicht.

Leipzig, Physiolog. Institut,
im August 1880.

Ueber die Bildung von Dihydroanthranol und Anthracen aus Anthrachinon;

von

Dr. Hugo R. von Perger.

C. Graebe und C. Liebermann haben schon vor zehn Jahren die Reductionsfähigkeit des Anthrachinons durch Zinkstaub und Kalilauge beschrieben und den durch diese Reaction entstehenden, in Alkalien mit blutröther Farbe löslichen, leicht wieder in Anthrachinon umwandelbaren Körper Anthrahydrochinon genannt.¹⁾ Ueber die Eigenschaften und Zusammensetzung dieser Verbindung hat C. Liebermann erst vor kurzer Zeit höchst interessante Mittheilungen gemacht und die Constitution des „Oxanthranols“ durch die Formel

zum Ausdruck gebracht.²⁾ Von C. Liebermann und Topf³⁾ wurde durch Einwirkung von Jodwasserstoffsäure und Phos-

¹⁾ Ber. Berl. chem. Ges. 1870, S. 636.

²⁾ Das. 1880, S. 1596.

³⁾ Das. 1876, S. 1201.