

Tyndallphänomen nicht und sind unbegrenzte Zeit haltbar. Ihre Leitfähigkeit verändert sich nicht, es tritt also keine nachträgliche Bildung kolloider Kieselsäure durch Hydrolyse ein. Diese Tatsache deutet darauf hin, daß die entstandene

Verbindung kein einfaches Silikat, sondern eine komplexe Verbindung darstellt.

Ueber Untersuchungen, die sich mit dieser Frage befassen, wird demnächst gesondert berichtet werden.

## Ueber das Gleichgewicht Gelatine-Salzsäure.

Von Robert Wintgen (Göttingen) und Karl Krüger (Bonn).

(Eingegangen am 27. Oktober 1920.)

Die Fähigkeit der Gelatine und der Eiweißkörper im allgemeinen, Salzsäure zu binden, ist bereits häufig untersucht worden. Von neueren Arbeiten, die sich mit diesem Gegenstand beschäftigen, seien die Veröffentlichungen Pauli's und seiner Schüler (s. u.), die von Procter (s. u.) und Jacques Loeb<sup>1)</sup> genannt. Wo. Pauli<sup>2)</sup> hat die Ergebnisse seiner diesbezüglichen umfangreichen und bedeutsamen Untersuchungen in der kürzlich erschienenen ersten Hälfte seiner Kolloidchemie der Eiweißkörper zusammengefaßt. Eine Zusammenstellung der älteren Literatur findet sich bei R. Höber<sup>3)</sup> und T. B. Robertson<sup>4)</sup>. Da zur Untersuchung der Bindung von Elektrolyten an Eiweißkörper die gewöhnlichen analytischen Hilfsmittel wegen Störung des Gleichgewichts in der Regel nicht anwendbar sind, werden neuerdings hauptsächlich physikalisch-chemische Methoden zur Bestimmung der ungebundenen Salzsäure bzw. der Konzentration der freien Wasserstoffionen angewandt. Von diesen Methoden verdient die heute allgemein übliche Methode der Gasketten zweifellos vor allen andern den Vorzug. Wir haben bei schon einige Jahre zurückliegenden, anfänglich mit einem andern Ziel unternommenen Untersuchungen, über die der eine<sup>5)</sup> von uns seinerzeit kurz berichtete, uns der Methylazetatkatalse bedient. (F. A. Hoffmann<sup>6)</sup> und O. Cohnheim<sup>7)</sup> maßen die

Wasserstoffionenkonzentration in Salzsäure-Gelatinegemischen mit Hilfe der Katalyse der Rohrzuckerinversion.)

Die Gelatine (Marke Non plus ultra) stammte aus den Deutschen Gelatinewerken A.-G. in Höchst am Main. Zur Bestimmung des Wassergehaltes der lufttrocknen Gelatine wurde sie bei 110° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Wasserverlust in Proz. 17,27 und 17,23, im Mittel 17,25. Die folgenden Angaben beziehen sich der Einfachheit halber, wenn nicht ausdrücklich anders bemerkt, stets auf lufttrockne Gelatine. Der Aschengehalt betrug 1,66 Proz. Die Gelatine reagierte schwach sauer, 1g in CO<sub>2</sub>-freiem Wasser gelöst verbrauchte mit Phenolphthalein als Indikator (Umschlag unscharf) 3,34; 3,66; 3,32; 3,69, im Mittel 3,51 ccm 0,05 n NaOH. Diese Azidität, die natürlich bei den Titrationen der späteren Messungen mit zum Ausdruck kommt, ruft selbst keine Beschleunigung der Esterverseifung hervor, wie aus folgenden Vergleichsversuchen ersichtlich. 2 ccm einer fünfprozentigen bei 25,0° im Thermostaten stehenden Methylazetatlösung verbrauchten nach

0	23	286	630	1540 Stunden
0,00	0,01	0,82	3,14	13,51 ccm

0,05 n NaOH. 2 ccm derselben Lösung, aber unter Zusatz von 2 Proz. Gelatine verbrauchten unter denselben Bedingungen nach

0	23	286	630	1540 Stunden
0,15	0,15	0,19	0,28	0,41 ccm

0,05 n NaOH. Der Gelatinezusatz scheint also im Gegenteil bemerkenswerter Weise eine beträchtliche Verlangsamung der Reaktionsgeschwindigkeit hervorzurufen.

Die Versuchsanordnung für unsere Messungen war folgende<sup>8)</sup>:

In einem 100 ccm fassenden Meßköhlchen wurden 0; 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2; 3; 4; 5 und

<sup>1)</sup> Jacques Loeb, Journ. of Gen. Physiol. 1, 237, 363 (1919).

<sup>2)</sup> Wo. Pauli, Kolloidchemie der Eiweißkörper, I. Hälfte (Dresden u. Leipzig 1920).

<sup>3)</sup> R. Höber, Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe, 4. Aufl. (Leipzig u. Berlin 1914)

<sup>4)</sup> T. B. Robertson, Die physikalische Chemie der Proteine (Dresden u. Leipzig 1912).

<sup>5)</sup> R. Wintgen, Ueber das Gleichgewicht Gelatine-Salzsäure. (SB. d. Niederrhein. Ges. für Natur und Heilkunde in Bonn, Chemische Abteilung 1915; Collegium 1916, 201.)

<sup>6)</sup> F. A. Hoffmann, Zentralbl. f. klin. Medizin 1889, 773, u. 1890, 521.

<sup>7)</sup> O. Cohnheim, Zeitschr. f. Biol. 33, 489 (1896).

<sup>8)</sup> Ostwald-Luther, Hand- und Hilfsbuch zur Ausführung physiko-chemischer Messungen, 3. Aufl. (Leipzig 1900), 524.

6 g. Gelatine in etwa 30 ccm Wasser bei 70° gelöst. Nach dem Abkühlen im Thermostaten erhielt jede der Lösungen einen Zusatz von 50 ccm Salzsäure (0,1 bzw. 0,2 n) und 5 ccm Methylazetat. Nach dem Auffüllen mit Wasser von 25° auf 100 ccm und gutem Durchschütteln wurde von der Mischung in ausgedämpfte 50 ccm fassende Erlenmeyerkölbchen aus Jenaer Glas gefüllt, die mit Bleiblech beschwert und nummeriert waren und bis zum Rand in dem Wasser eines großen, genau auf 25,0° eingestellten Thermostaten standen.

Von Zeit zu Zeit wurden mit einer Pipette 2 ccm des Reaktionsgemisches den Fläschchen entnommen, die Pipette außen mit Filtrierpapier abgewischt und der Inhalt in ein Becherglas entleert. Beim Entleeren der Pipette in der gewöhnlichen Weise würde man infolge der verschieden starken Benetzung der Pipettenwand, die durch die wechselnde Zähigkeit der einzelnen Gelatinelösungen bedingt ist, Fehler erhalten. Um nun bei allen Messungen stets den ganzen Inhalt der Pipette zu titrieren, wurde das aus der Pipette ausgelaufene Reaktionsgemisch mit Natronlauge (Indikator Phenolphthalein) zunächst auf schwach rot titriert, hierauf wieder in die Pipette aufgesaugt und nach dem abermaligen Auslaufen sorgfältig zu Ende titriert. Die Zeitintervalle  $t$  (in Minuten) rechnen von dem Augenblick, in dem der erste Tropfen Methylazetat mit der salzsäurehaltigen Gelatine in Berührung kam, bis zu dem Beginn der einzelnen Titrationen, d. h. bis zu dem Augenblick, in dem der erste Tropfen Lauge in die zu titrierende Lösung fällt.

Der Anfangswert  $A_0$  des Reaktionsverlaufes, bei dem also noch kein Methylazetat verseift ist, wurde, um Beobachtungsfehler auszuschalten, der Einfachheit halber in einem besonderen Versuch ohne Zusatz von Methylazetat für alle Messungen festgelegt: In einem 100 ccm Kölbchen wurden 50 ccm n-Salzsäure auf 100 ccm verdünnt. 2 ccm des Gemisches verbrauchten bei der Titration nach dem oben beschriebenen Verfahren 20,20 ccm einer 0,05 n NaOH. Hieraus berechnet sich der Anfangswert für die Messungen mit 0,05 und 0,10 n Salzsäure zu 2,02 und 4,04 ccm. Die Bestimmung des Endwertes  $A_\infty$ , der bei den konzentrierten Gelatinelösungen erst nach Monaten erreichbar ist, geschah ebenfalls in einem besonderen Versuche. Zu diesem Zweck wurde eine entsprechende Mischung ohne Gelatinezusatz angesetzt und nach mehrtägigem Stehen im Thermostaten titriert.

Tabelle I.

50 ccm 1,00 n HCl }  
5 Methylazetat } in 100 ccm Wasser:

25,0° Zeit	I 0,05 n NaOH	II 0,05 n NaOH
1. VI.	—	—
5. VI.	44,47 ccm	44,57 ccm
6. VI.	44,56 ccm	44,57 ccm

Als Endwert  $A_\infty$  für eine 0,5 n Säure wurde 44,57 ccm gewählt; also  $A_\infty - A_0 = 24,37$  ccm. Da bei allen Messungen dieselbe Menge Methylazetat in 100 ccm Lösung vorhanden war, ist dieser Wert für alle Messungen derselbe. Wir erhalten also für Anfangs- und Endwert der beiden Meßreihen folgende Zahlen:

Tabelle II.

25,0°	0,05 n HCl	0,10 n HCl
Anfangswert: $A_0$	2,02 ccm	4,04 ccm
Endwert: $A_\infty$	26,39 ccm	28,41 ccm

Die Zwischenwerte  $A_t$  mußten je nach dem Gelatine-Gehalt um einen ihrer Azidität (siehe Seite 81) entsprechenden Betrag gekürzt werden. Diese Korrektur beträgt für 2 ccm bei einem Gehalt von z. B. 0,1; 0,2; 1; 3; 6 Proz. Gelatine 0,01; 0,01; 0,07; 0,28; 0,42 ccm 0,05 n-Lauge. Im allgemeinen wurden für jede Gelatine- und Salzsäurekonzentration mehrere voneinander unabhängige in besonderen Kölbchen angesetzte Versuchsreihen durchgeführt. Die Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten  $R$  geschah nach der bekannten Formel:

$$R = \frac{\log(A_\infty - A_0) - \log(A_\infty - A_t)}{t}$$

Die ersten und letzten Werte für  $R$  blieben wie üblich wegen Störung des Reaktionsverlaufes unberücksichtigt. (Ostwald-Luther, loc. cit. 527.) Als Beispiel einer Messung sei folgende angeführt.

Tabelle III.

Minuten	NaOH		$R \cdot 10^4$
	0,05 n	korr.	
0	—	[2,02]	—
1487	8,56	8,42	0,890
2195	10,95	10,81	0,886
2899	12,99	12,85	0,881
4367	16,67	16,53	0,900
5004	17,83	17,69	0,894
5912	19,33	19,19	0,896
6432	19,96	19,82	0,885
7417	21,16	21,02	0,886
		[26,39]	Mittel 0,890

Von einer mit der Zeit fortschreitenden Zersetzung der Gelatine — etwa einer hydrolytischen Spaltung — begünstigt durch die Anwesenheit der Säure, die sich in einer Veränderung der Konstante hätte äußern müssen, war nie etwas zu bemerken. Auf die Bestän-

digkeit von Rinderalbumin gegen verdünnte Säuren haben schon Manabe und Matula<sup>9)</sup> hingewiesen.

Die Ergebnisse der Versuche mit 0,05 n HCl sind in folgender Tabelle zusammengestellt.

Tabelle IV.  
25,0°. 0,05 n Salzsäure.

g Gelatine im Liter	Geschwindigkeitskonstante $R \cdot 10^4$	Im Mittel $R_{\text{gef.}}$	$R_{\text{ber.}}$	$b_{\text{gef.}}$	$b_{\text{ber.}}$
0	1,442; 1,448; 1,448	1,446	1,446	0,0500	0,0500
1	1,423; 1,423	1,423	1,418	0,0492	0,0490
2	1,381; 1,395; 1,402	1,393	1,389	0,0482	0,0480
5	1,318; 1,313; 1,315	1,315	1,305	0,0452	0,0451
10	1,182; 1,185; 1,185; 1,83	1,184	1,164	0,0410	0,0403
20	0,884; 0,890; 0,884; 0,888	0,886	0,883	0,0306	0,0305
30	0,595; 0,600	0,598	0,607	0,0207	0,0210
40	0,329; 0,337; 0,348	0,338	0,344	0,0117	0,0119
50	0,158; 0,130; 0,140; 0,146; 0,146	0,144	0,136	0,0050	0,0047
60	0,052; 0,052	0,052	0,052	0,0018	0,0018

Aus den Zahlen und Fig. 1 ergibt sich, daß die R-werte mit steigendem Gelatinegehalt zunächst proportional und etwa von 35 g Gelatine an immer weniger stark abnehmen.

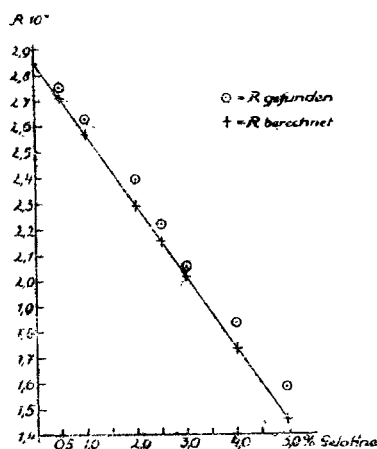


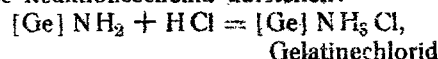
Fig. 1

Geschwindigkeitskonstante der Esterverseifung durch 0,05 n HCl bei Gegenwart von Gelatine.

Da  $R$  als Maß der Geschwindigkeit der Esterverseifung proportional der Konzentration  $b$  der freien Wasserstoffionen ist, so können wir diese Konzentration aus den  $R$ -Werten berechnen nach der Gleichung  $b = R/c$ , wo  $c$  eine Konstante bedeutet. Bei dem Versuch mit 0,05 n Salzsäure ohne Gelatinezusatz erhalten wir  $R = 1,446 \cdot 10^{-4}$ . Nehmen wir an, daß die 0,05 n Salzsäure vollständig in Ionen zerfallen ist<sup>10)</sup>, so wird  $c = \frac{0,05}{1,446 \cdot 10^{-4}} = 345,8$ .

Danach ergibt sich für die Lösung mit 0,05 n HCl wenn wir mit  $m$  die g Gelatine im Liter bezeichnen, für die Wasserstoffionenkonzentration die in Tabelle IV unter  $b_{\text{gef.}}$  angegebenen Werte.

Daß Eiweißstoffe befähigt sind Wasserstoffionen in dieser Art zu binden, ist lange bekannt (siehe z. B. Höber, loc. cit. 141, 173, Pauli, loc. cit. 45) und wird fast allgemein darauf zurückgeführt, daß die elektrisch amphoteren Eiweißstoffe in Gegenwart von Säuren wie schwache Basen reagieren, mit diesen also salzähnliche, leicht hydrolysierende Verbindungen eingehen, etwa vom Typus des Chlorammoniums oder des Aluminiumchlorids, indem sich die Salzsäure an ein oder mehrere  $\text{NH}_2$ -Gruppen anlagert. Nehmen wir zunächst einmal nur der Einfachheit halber an, daß nur eine  $\text{NH}_2$ -Gruppe in Reaktion träte; so ließe sich folgendes Reaktionsschema aufstellen:

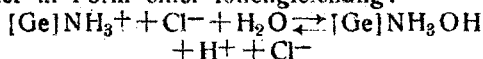


<sup>9)</sup> Manabe u. Matula, Biochem. Zeitschr. 52, 391 (1913).

<sup>10)</sup> Richtiger wäre es, den Dissoziationsgrad der Salzsäure mit in Rechnung zu setzen; doch ist es schwierig, hierfür den richtigen Wert zu ermitteln. So findet z. B. Ostwald 363,4 bei 25°, Green 397 bei 24,9°, Bray und Hunt 398,4 bei 25°, für  $\Lambda_{20}^{\text{HCl}}$  (siehe Abegg, Handbuch 1913, IV, 139.) Noch größere Unsicherheit herrscht über den Wert von  $\Lambda_{\infty}^{\text{HCl}}$ . Wir haben deshalb vorläufig von einer Berücksichtigung des Dissoziationsgrades abgesehen, um so mehr, als auch  $R$  nicht streng proportional der Wasserstoffionenkonzentration ist. (Siehe Lundén, Zeitschr. f. physik. Chem. 49, 196 (1904); 54, 542 (1906).)

wo [Ge] den bei der Reaktion unbeeinflussten Gelatinekomplex bezeichnen soll. In wässriger Lösung würde sich dann ein Gleichgewicht einstellen:

$[\text{Ge}]\text{NH}_3\text{Cl} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons [\text{Ge}]\text{NH}_3\text{OH} + \text{HCl}$  (1)  
oder in Form einer Ionengleichung:



Wie Manabe und J. Matula (loc. cit. 392) nachgewiesen haben, ist das Gelatinechlorid im Gegensatz zum Chlorid des Albumins praktisch vollkommen dissoziiert, so daß wir, wenn wir auch die Dissoziation der Salzsäure als praktisch vollständig annehmen, schreiben können:

$[\text{Ge}]\text{NH}_3^+ + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons [\text{Ge}]\text{NH}_3\text{OH} + \text{H}^+$  (2)  
entsprechend beispielsweise der Gleichung  
 $\text{NH}_4^+ + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{NH}_4\text{OH} + \text{H}^+$ .

Hiernach bilden sich bei der Einwirkung von Wasserstoffionen auf Gelatine Ionen der Gelatine, ebenso wie sich bei der Einwirkung von Wasserstoffionen auf Ammoniumhydroxyd Ammoniumionen bilden. Nun enthält aber, wie die anderen Eiweißstoffe, so auch die Gelatine zweifellos nicht eine sondern mehrere Amidogruppen; ferner kommen auch noch Stellen der Peptidbindung für die Salzsäureanlagerung in Betracht. Von L. Blasel und J. Matula<sup>11)</sup> ist in der Tat gezeigt worden, daß auch das Desaminoglutin, ein durch Einwirkung von salpetriger Säure auf Gelatine erhaltenes Produkt, welches also aller Voraussicht nach keine endständigen  $\text{NH}_2$ -Gruppen mehr besitzt, Wasserstoffionen zu binden vermag. Ferner haben Pauli und Sven Odén<sup>12)</sup> berechnet, daß unter Berücksichtigung der Konzentration der freien Wasserstoff- und Chlorionen aus Leitfähigkeitsmessungen von Albumin-Salzsäuregemischen (Säuregehalt 0,075 n — 0,02 n) sich eine zunehmende Beweglichkeit der Proteinionen mit steigendem Säurezusatz ergibt, und daraus auf eine zunehmende Ladung der Ionen, also eine zunehmende Wertigkeit, geschlossen. Nach Pauli's Vorstellung findet nur in ganz niedriger Säurekonzentration die Bildung einwertiger Proteinionen statt, d. h. nur hier reagiert das Proteinion nach obigem Schema als einwertige Base; in höherer Konzentration hingegen werden mehrere Amidogruppen zur Salzbildung herangezogen. Proteine haben nicht eine sondern mehrere Dissoziationskonstanten von verschiedener schnell abnehmender Größe. Schon

bei zweiwertigen Säuren und Basen werden die Verhältnisse recht verwickelt und man kann wohl sagen, daß über die verschiedenen Dissoziationskonstanten mehrwertiger Basen und Säuren bisher wenig Sicheres bekannt ist. In den meisten Fällen hat man unter dem Gesichtspunkt der Stufendissoziation derartige Elektrolyte so behandelt, als ob sich zunächst und vornehmlich einwertige Ionen in wässriger Lösung bildeten. Diese Vorstellung wollen auch wir zunächst unserer Betrachtung zugrunde legen und demgemäß prüfen, ob unsere Messungen sich nach obigem Reaktionsschema deuten lassen.

Für das Gleichgewicht säurehaltiger salzfreier Ampholytlösungen hat Sørensen in seinen klassischen Proteinstudien<sup>13)</sup> eine ausführliche Formel gegeben.

$$y = -\frac{a-s + \frac{k_w \beta'}{k_b \alpha}}{2} + \sqrt{\frac{a-s + \frac{k_w \beta'}{k_b \alpha}}{4} + s \frac{k_w \beta'}{k_b \alpha}} \quad (3)$$

Darin bedeutet y die Konzentration der vom Ampholyten nicht gebundenen Säure; da wir annehmen, die freie Säure sei ganz in Ionen zerfallen, so wird für uns  $y = b$ ; a die Äquivalentkonzentration des Ampholyten; nehmen wir an, das Glutin reagiere als einsäurige Base,

so wird  $a = \frac{m}{M}$ , wenn m die g Gelatine im

Liter bedeuten und mit M das Molekulargewicht der Gelatine bezeichnet wird; s die Äquivalentkonzentration der zugesetzten Säure, die wir mit n bezeichnen;  $k_w$  ist das Ionenprodukt des Wassers (bei  $25^\circ = 1,1 \cdot 10^{-14}$ );  $k_b$  die basische Dissoziationskonstante des

Ampholyten; darnach wird  $\frac{k_w}{k_b} = K$ , die Hy-

drolysenkonstante.  $\alpha$  und  $\beta'$  bedeuten die Dissoziationsgrade der Säure und des Ampholytsalzes. Bei seinen Berechnungen setzt Sørensen den Dissoziationsgrad des Ampholytsalzes gleich dem von  $\text{NH}_4\text{Cl}$  in derselben Konzentration. Ueber den Dissoziationsgrad des  $\text{NH}_4\text{Cl}$  gilt aber das Seite 83 für Salzsäure gesagte<sup>14)</sup>. Wir haben deshalb und auch aus andern Gründen<sup>15)</sup> geglaubt,  $\alpha = \beta'$  setzen

<sup>11)</sup> Zeitschr. f. physiol. Chem. 103, 134 (1918).

<sup>12)</sup> L. Blasel u. J. Matula, Biochem. Zeitschr. 58, 417 (1914).

<sup>13)</sup> Pauli u. Sven Odén, Anzeig. d. Akad. d. Wissenschaften Wien, Nr. 24 (1913).

<sup>14)</sup> Siehe Abegg, Handbuch 1907, III, 259. Mit den meist benutzten Zahlen wird der Dissoziationsgrad des  $\text{NH}_4\text{Cl}$  kleiner als der der Salzsäure derselben Konzentration, was wohl unwahrscheinlich ist.

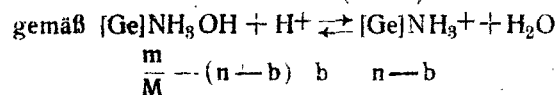
<sup>15)</sup> Wie Manabe u. Matula, Biochem. Zeitschr. 52, 381, 392 (1913) gezeigt haben, werden bei der Einwirkung verdünnter Salzsäure auf Rinderalbumin

zu dürfen, schon um die Rechnung zu vereinfachen. Dann geht Gleichung (3) über in

$$b = -\frac{1}{2} \left( \frac{m}{M} - n + K \right) \pm \sqrt{\frac{1}{4} \left( \frac{m}{M} - n + K \right)^2 + K n^{16}}. \quad (4)$$

Gleichung (4) erhält man natürlich auch unter den oben gemachten Voraussetzungen unmittelbar aus der Gleichung für die Hydrolysenkonstante

$$K = \frac{b \left[ \frac{m}{M} - (n - b) \right]}{n - b} = \frac{b m}{M (n - b)} - b \quad (5)$$



Nach Formel (4) ergibt sich aus den oben angegebenen ( $b$  proportionalen)  $R_{\text{gef.}}$ -Werten durch Ausgleichrechnung  $M = 1014^{17}$  und  $K = 4,139 \cdot 10^{-4}$ . Hieraus ergibt sich für die basische Dissoziationskonstante

$$k_b = \frac{k_a}{K} = \frac{1,1 \cdot 10^{-14}}{4,14 \cdot 10^{-4}} = 2,7 \cdot 10^{-11}$$

Für Alanylglyzin, Glyzylglyzin und Leuzylglyzin (wohl die einzigen bisher untersuchten amphoterer Stoffe mit Peptidbindung) beträgt  $k^b$  2,1 u.  $2,0$  u.  $3,1 \cdot 10^{-11}$  (Lundén, s. u.). Hiermit sind die unter  $R_{\text{ber.}}$  und  $b_{\text{ber.}}$  angegebenen Werte berechnet. Wie man sieht, stimmen die gefundenen und berechneten Werte gut überein. Man kann also nach Gleichung (4) die unter der Annahme abgeleitet ist, Gelatine reagiere wie eine schwach einsäurige Base, die Wasserstoffionenkonzentration im Gleichgewicht Glutinsalzsäure berechnen.

Berechnet man mit denselben Werten für  $M$  und  $K$  und dem Faktor  $c = \frac{0,1}{2,850 \cdot 10^{-4}} = 350,9$  (s. oben)  $R$  und  $b$  für die Konzentration 0,1 der Salzsäure, so erhält man die in Tabelle V und Fig. 2 angegebenen Werte.

Tabelle V.  
25,0°. 0,10 n Salzsäure.

g Gelatine im Liter	Geschwindigkeitskonstante $R \cdot 10^4$	Im Mittel $R_{\text{gef.}}$	$R_{\text{ber.}}$	$b_{\text{gef.}}$	$b_{\text{ber.}}$
0	2,843; 2,857	2,850	2,850	0,1000	0,1000
5	2,747; 2,760	2,754	2,710	0,0966	0,0951
10	2,623; 2,636	2,630	2,570	0,0923	0,0902
20	2,395; 2,400	2,398	2,291	0,0842	0,0804
25	2,220	2,220	2,151	0,0779	0,0755
30	2,054	2,054	2,012	0,0721	0,0706
40	1,836	1,836	1,743	0,0644	0,0608
50	1,589	1,589	1,456	0,0558	0,0511

Die gefundenen Werte sind durchweg etwas größer als die berechneten. Worauf dies zurückzuführen ist, läßt sich schwer sagen. Sicher werden hierbei die in der Rechnung

Chlorionen in steigendem Maße gebunden. Beim salzsauren Glutin dagegen ist die Dissoziation bedeutend stärker.

Nach Arrhenius ist in einem Gemisch zweier starker Elektrolyte mit einem gemeinsamen Ion der Dissoziationsgrad jedes Elektrolyten durch die Konzentration des gemeinsamen Ions bestimmt.

<sup>16)</sup> Diese Gleichung haben wir auch in der oben angeführten vorläufigen Mitteilung unserer Berechnung zu Grunde gelegt.

<sup>17)</sup> Einen annähernden Wert von  $M$  erhält man natürlich auch aus Fig. 1, wenn man den oberen geradlinig verlaufenden Teil der Kurve bis zum Schnittpunkt mit der Abszissenachse verlängert. Bei 5,1 Proz. Gelatine würde  $R$  in Gegenwart von 0,06 n HCl gleich 0, wenn keine Hydrolyse einträte, d. h. bei diesem Punkte wären alle H-Ionen verschwunden. 1 Mol. HCl würde also rund 1020 g Gelatine binden.

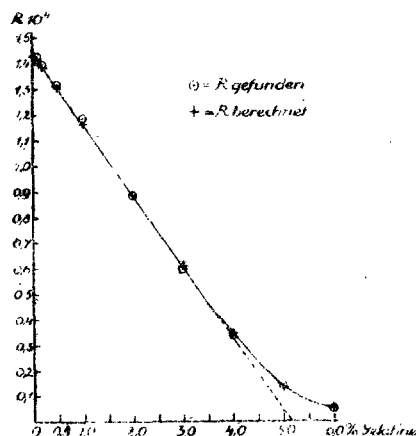


Fig. 2

Geschwindigkeitskonstante der Esterverseifung durch 0,10 n HCl bei Gegenwart von Gelatine.

nicht mit berücksichtigten und wie oben aus-einandergesetzt schwer mit Sicherheit zu schätzenden Dissoziationsgrade der Elektrolyte und während der Verseifung die sog. Neutral-salzwirkung eine Rolle spielen. Würden, woran man zunächst denken könnte, in Gegenwart der stärkeren Salzsäure noch neue  $\text{NH}_2$ -Gruppen zur Salzbildung herangezogen, so ist im Gegenteil eine Verminderung der H-Ionen, also eine Abweichung in der entgegengesetzten Richtung zu erwarten. Aus den  $R_{\text{gef.}}$ -Werten ergibt sich schätzungsweise  $M = 1090$ . Da die lufttrockene Gelatine noch 17,25 Proz. Wasser enthält, also 82,75 Proz. trockne Gelatine, ist noch eine Korrektur anzubringen. Nach Formel (5) ergibt sich für zwei verschiedene salzsaure Lösungen lufttrockener Gelatine

$$K = \frac{m_1 b_1}{M(n-b_1)} - b_1 = \frac{m_2 b_2}{M(n-b_2)} - b_2,$$

daraus folgt

$$M = \frac{1}{b_2 - b_1} \left[ \frac{b_2 m_2}{n - b_2} - \frac{b_1 m_1}{n - b_1} \right] \quad (6)$$

für 82,75 Proz. Gelatine hat man  $m_1$  und  $m_2$  noch mit dem Faktor  $f = \frac{82,75}{100} = 0,8275$  zu

multiplizieren, also auch  $M = 1014$ ; folglich  $M_{\text{H}_2\text{O} \text{ frei}} = 839$ . Die Hydrolysenkonstante  $K = 4,139 \cdot 10^{-4}$  ändert sich nicht, da in Gleichung (5) sowohl  $m$  wie  $M$  mit  $f$  zu multiplizieren sind. Diese Verhältnisse ergeben sich auch ohne weiteres aus den Figuren 1 und 2. Unter Berücksichtigung der Korrektur für das Wasser rücken alle Werte auf der x-Achse proportional nach links. Dadurch tritt eine Parallelverschiebung der ganzen Kurve und damit auch eine Verschiebung des Schnittpunktes ihres geraden Teiles mit der Abszissenachse, welche  $M$  bestimmt, nach links ein. Krümmung und Richtung der Kurve, von denen  $K$  abhängt, bleiben unverändert.

Der  $K$ -Wert kann keinen großen Anspruch auf Genauigkeit machen, da er sich natürlich nur aus dem verhältnismäßig kleinen Krümmungsstück der Kurve ergibt.

Wir haben sodann geprüft, ob auch die Messungen von Pauli und seinen Mitarbeitern<sup>18)</sup> sich nach Gleichung (4) berechnen lassen. Wir haben zu diesem Zweck nicht den langwierigen Weg der Ausgleichrechnung eingeschlagen, sondern folgenden: Schreibt man Gleichung (5) in der

Form:  $b = \frac{1}{M} \cdot \frac{m \cdot b}{n - b} - K$ , so drückt diese

aus, daß  $b$  eine lineare Funktion von  $\frac{mb}{n-b}$  ist. Trägt man also zusammengehörige Werte von  $b$  und  $\frac{mb}{n-b}$  in ein Koordinatensystem ein,

so muß man, wenn die Messungen sich nach Formel (4) ausdrücken lassen, eine gerade Linie erhalten. Wie Fig. 3 zeigt, ist das im großen und ganzen der Fall. Die Werte in der Nähe des Nullpunktes der Geraden konnten nicht alle eingezeichnet werden. Auch der letzte Wert in der Tabelle IIb von L. Blasel und J. Matula, loc. cit., ist in der Figur nicht berücksichtigt. Er liegt nicht in der Fortsetzung der Geraden sondern höher<sup>19)</sup>, der nächst höhere ebenfalls nicht mit aufgenommener Wert aus der Kurvenangabe (Pauli u. Hirschfeld, loc. cit., 256) entnommen, liegt aber wieder auf der Verlängerung der Geraden.

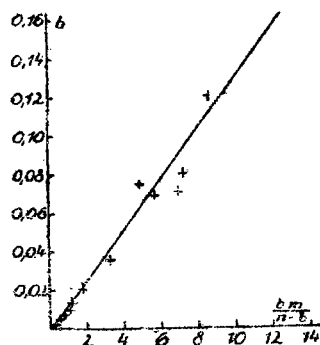


Fig. 3

Glutin (berechnet nach Zahlen von Pauli, Matula, Blasel, Manabe, Hirschfeld; Biochem. Zeitschrift 52, 369; 58, 417; 62, 245).

Aus den Werten für 1 Proz. Glutin und  $2,0 \cdot 10^{-2}$  und  $5,0 \cdot 10^{-2}$  haben wir  $M = 881,4$ ,  $K = 1,473 \cdot 10^{-4}$ ,  $k_b = \frac{0,6 \cdot 10^{-14}}{1,47 \cdot 10^{-4}} = 4,08 \cdot 10^{-11}$

berechnet. (Daß dieser Wert für Zimmertemperatur größer ist als der von uns bei 25° ermittelte liegt wohl auch daran, daß in den Rechnungen mit Pauli's usw. Zahlen bei  $b$  der Dissoziationsgrad der Salzsäure berücksichtigt ist.)

In der folgenden Tabelle VI sind die gefundenen und die nach Formel (4) berechneten

<sup>18)</sup> K. Manabe u. J. Matula, Biochem. Zeitschr. 52, 369 (1913); Wo. Pauli u. M. Hirschfeld, 62, 245 (1914); L. Blasel u. J. Matula, 58, 417 (1914).

<sup>19)</sup> Dieses könnte man darauf zurückführen, daß bei der hohen  $\text{H}^+$ -Konzentration mehr Amidogruppen sich an der Salzbildung beteiligen. Für diesen Punkt berechnet sich  $M$  zu  $\text{vd } 500$ .

Werte zusammengestellt. Bei dieser Rechnung haben wir wie gesagt für  $n$  nicht die Konzentration der gesamten Säure sondern nur den nach den Angaben Pauli's und seiner Mitarbeiter berechneten dissoziierten Anteil derselben zu Grunde gelegt. Entsprechend dem Verlauf der Geraden ist auch hier die Uebereinstimmung befriedigend, wenn man berücksichtigt, daß die Messungen — wohl bei wechselnder Zimmertemperatur<sup>20)</sup> ausgeführt — manchmal auch unter sich beträchtlich abweichen (siehe die beiden Versuche mit 1 Proz. Gelatine und  $5 \cdot 10^{-3}$  n Salzsäure).

Tabelle VI.

n HCl	b	
	gef.	ber.
1 Proz. Gelatine		
$5,0 \cdot 10^{-2}$	$3,28 \cdot 10^{-2}$	$3,57 \cdot 10^{-2}$
2,0	$8,02 \cdot 10^{-3}$	$8,02 \cdot 10^{-3}$
2,0	6,93	8,02
1,5	3,60	3,57
1,0	$9,78 \cdot 10^{-4}$	$5,88 \cdot 10^{-4}$
1,0	8,72	5,88
$7,0 \cdot 10^{-3}$	1,58	2,05
5,0	1,07	1,07
5,0	1,57	1,07
3,0	$1,84 \cdot 10^{-5}$	$5,00 \cdot 10^{-5}$
0,75 Proz. Gelatine		
$5,0 \cdot 10^{-2}$	$3,15 \cdot 10^{-2}$	$3,85 \cdot 10^{-2}$
2,0	$7,56 \cdot 10^{-3}$	$10,77 \cdot 10^{-3}$
1,0	1,34	$1,80 \cdot 10^{-3}$
0,5 Proz. Gelatine		
$2,0 \cdot 10^{-2}$	$1,21 \cdot 10^{-2}$	$1,36 \cdot 10^{-2}$
1,0	$3,66 \cdot 10^{-3}$	$4,18 \cdot 10^{-3}$
$5,0 \cdot 10^{-3}$	$6,92 \cdot 10^{-4}$	$4,96 \cdot 10^{-4}$
2,5	1,42	1,04
0,25 Proz. Gelatine		
$2,0 \cdot 10^{-2}$	$1,59 \cdot 10^{-2}$	$1,63 \cdot 10^{-2}$
1,0	$7,12 \cdot 10^{-3}$	$6,89 \cdot 10^{-2}$
$5,0 \cdot 10^{-3}$	2,03	2,21
2,5	$4,80 \cdot 10^{-4}$	$3,91 \cdot 10^{-4}$
1,25	$13,77 \cdot 10^{-5}$	$9,81 \cdot 10^{-5}$

Es war von Interesse, welche Resultate mit unserer Berechnungsweise die Messungen von Manabe und J. Matula<sup>21)</sup> sowie von L.

<sup>20)</sup> Die Hydrolyse der Salze sehr schwacher Basen mit sehr starken Säuren nimmt allerdings nur unbedeutend mit der Temperatur zu. (Lundén, Affinitätsmessungen, Stuttgart 1908, S. 69. Walker, Einf. i. d. phys. Chemie, 2. Aufl., Braunschweig 1914, S. 407).

<sup>21)</sup> Manabe u. J. Matula, loc. cit. 52, 394

Blasel und J. Matula<sup>22)</sup> am Desaminoglutin ergeben würden.

Desaminoglutin (Manabe und J. Matula): 8 Wochen dialysiert,  $C_H$  einer 0,15prozentigen Lösung  $3,14 \cdot 10^{-7}$ . Zusammengehörige Werte von  $\frac{mn}{n-b}$  und  $b$  liegen nicht auf einer geraden Linie.  $M = 224,2$  (aus Versuch 1 und 3, loc. cit. 394).

Desaminoglutin (L. Blasel und J. Matula): 2 Wochen dialysiert,  $C_H$  einer 0,75prozentigen Lösung  $1,79 \cdot 10^{-5}$ . Zusammengehörige Werte von  $\frac{mn}{n-b}$  und  $b$  liegen auf einer geraden Linie (s. Fig. 4)  $M = 918,3$  (aus Versuch 1 und 5, loc. cit. 432)  $K = 9,4 \cdot 10^{-4}$ ,  $k_b = 6,4 \cdot 10^{-12}$ . Trotz Verlust der endständigen  $NH_2$ -Gruppen hat sich das „Molekulargewicht“ nicht wesentlich geändert. (Nach den Angaben von Wo. Pauli<sup>23)</sup> sollte man etwa 820 erwarten), ein Resultat, das wiederum für  $M_{\text{Glutin}} = 839$  spricht, denn sicher neigt das Desaminoglutin noch mehr zur Bildung nur einwertiger Ionen als das Glutin.

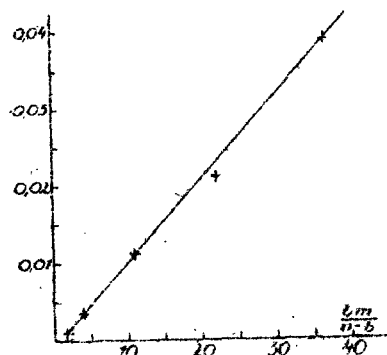


Fig. 4

Desaminoglutin (berechnet nach Zahlen von Blasel und Matula; Biochem. Zeitschr. 58, 423).

Auf einem andern Wege ist das Gleichgewicht Gelatine-Salzsäure von H. R. Procter<sup>24)</sup> untersucht worden. Er ließ Gelatine in verdünnter Salzsäure bis zum Eintritt des Gleich-

<sup>22)</sup> L. Blasel u. J. Matula, loc. cit. 58, 417.

<sup>23)</sup> Wo. Pauli, Kolloidchemie der Eiweißkörper, 70.

<sup>24)</sup> H. R. Procter, Kolloidchem. Beih. 2, 243 (1911); Journ. Chem. Soc. 105, 313 (1914). British Assoc. for the Advancement of Science, First Rep. on colloid Chemistry and its industrial applications 1917, 5. (Procter gibt hier eine zusammenfassende Darstellung des Problems vom gerbereitechnischen Standpunkt.)

gewichts quellen, setzte die gequollenen abgetrockneten Stücke dann der Einwirkung von festem Kochsalz aus, wodurch diese unter Abgabe der überschüssigen salzsauren Lösung bis zur hornartigen Konsistenz einschrumpfen und bestimmte durch Titration die Säuremenge, welche gebunden bleibt. Unter der Annahme, daß das Glutin eine bei niedriger Säurekonzentration zu vernachlässigende zweite basische Valenz<sup>25)</sup> hat, fand er aus der so ermittelten Hydrolysenkurve ein Verbindungsgewicht von 839. J. A. Wilson<sup>26)</sup> ist der Ansicht, daß die zweite Valenz von beginnender Zersetzung herühre oder durch Analysenfehler vorgetauscht sei und berechnete mit Procter's Daten 768. In ähnlicher Weise untersuchte V. Kubelka<sup>27)</sup> das verwickelte Gleichgewicht Salzsäure-Hautpulver und berechnet, daß die bei niedriger Konzentration der Säure vermutlich entstehende Verbindung auf 1 Grammäquivalent Salzsäure 977 g Hautkollagen enthält.

M. Berrar<sup>28)</sup> fand, daß Glutin beim Füllen mit einem Gemisch von Pikrinsäure und Quecksilberjodid-Jodkalium unabhängig von den Mengenverhältnissen auf 823 g stets 1 Mol HCl aufnimmt. A. Guttenberg<sup>29)</sup> maß die Salzsäurebindung des Glutins mit Hilfe der Güntzberg'schen (Phlorogluzin-Vanillin) Reaktion. Aus seinen Zahlen ergibt sich, daß 1 Mol HCl 788 g Glutin äquivalent ist. Von Procter (loc. cit.) ist auch schon darauf hingewiesen worden, daß der von ihm und uns gefundene Wert 839 der Formel  $C_{15}H_{57}O_{13}N_{11}$  entspricht, welche den analytischen Resultaten von Schützenberger und Bourgeois ebenso gut gerecht wird wie die von diesen vorgeschlagene  $C_{76}H_{124}O_{25}N_{24}$ . Aus Siedepunkterhöhungen wässriger Gelatinelösungen verschiedener Konzentration erhielt C. Paal<sup>30)</sup> für das Molekulargewicht der Gelatine Werte, die zwischen 878 und 960 liegen. Alles dies scheint unserer Ansicht nach darauf hinzudeuten, daß Glutin (falls es überhaupt eine einheitliche Substanz ist) in wässriger Lösung bei Gegenwart von verdünnter Salzsäure und ebenso in

der Hitze in eine Verbindung vom Äquivalentgewicht, vielleicht auch vom Molekulargewicht 800 -- 900 übergeht. Gegen das Molekulargewicht sprechen außer den bereits oben auseinandergesetzten Gründen noch zahlreiche andere.

Zwar sind nach G. Bredig<sup>31)</sup> das Hydrazin, das Guanidin und der Harnstoff, obwohl sie mehrere Amidogruppen haben, ausgesprochen einsäurige Basen, und Hydrazin läßt sich scharf als einsäurige Base titrieren. Die freien Amidogruppen der Monochlorhydride dieser Verbindungen zeigen also nur noch verschwindend geringe basische Reaktion. Aber das basische Chlorhydrid des Aethylendiamins ist bereits erheblich stärker basisch als das basische Chlorhydrid des Hydrazins. So zeigen wässrige Hydrazindichloridlösungen fast dieselbe Leitfähigkeit wie sich für ein Gemisch von 1 Mol Salzsäure und 1 Mol Hydrazinmonochlorid berechnet. Wässrige Lösungen von Aethylen-diamindichlorhydrid zeigen aber ungefähr nur die Hälfte der Leitfähigkeit wie sich für ein Gemisch von 1 Mol Salzsäure und 1 Mol Aethylen-diaminmonochlorhydrid berechnet. Aethylen-diamin läßt sich bereits scharf zweibasisch titrieren. G. Bredig zeigte ferner, daß auch das Dichlorid des Lysins, welches uns als wohldefiniertes Spaltungsprodukt des Eiweiß hier besonders interessiert, stark hydrolysiert, während das Monochlorid kaum Spuren von Hydrolyse zeigte. A. Kanitz<sup>32)</sup> hat dann die erste und zweite basische Dissoziationskonstante einiger bekannter Eiweißabbauprodukte genauer untersucht und fand:

	Erste basische Dissoziationskonstante	Zweite basische Dissoziationskonstante
	25°	
Histidin	$5,7 \cdot 10^{-6}$	$5,0 \cdot 10^{-13}$
Arginin	$< 1,0 \cdot 10^{-7}$	$2,2 \cdot 10^{-12}$
Lysin	$< 1,0 \cdot 10^{-4}$	$1,1 \cdot 10^{-12}$

Die zweite Konstante ist also gegenüber der ersten sehr schwach.

Aus den nachher noch zu besprechenden Versuchen über die Verseifungsgeschwindigkeit von Methylazetat in Gegenwart solcher Ampholytsalze fand er beim Histidindichlorid in der Verdünnung 10 als das 100fache des hydrolysierten Molenbruchteils  $100x = 31,8$ ; beim Lysindichlorid in der Verdünnung 10 bzw. 20  $100x = 22,4$  und 30,8; beim Arginindinitrat

<sup>25)</sup> Für die 1. und 2. basische Dissoziationskonstante ergeben sich die Werte  $0,5 \cdot 10^{-11}$  u.  $0,6 \cdot 10^{-12}$ .

<sup>26)</sup> J. A. Wilson, Journ. of the American Leather Chemist's Association 12, 108 (1917).

<sup>27)</sup> V. Kubelka, Koll.-Zeitschr. 23, 57 (1918).

<sup>28)</sup> M. Berrar, Biochem. Zeitschr. 47, 205 (1912).

<sup>29)</sup> A. Guttenberg, Münchener med. Wochenschrift 43, 147 (1896).

<sup>30)</sup> C. Paal, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 25, 1202 (1892).

<sup>31)</sup> G. Bredig, Zeitschr. f. physik. Chem. 13, 315 (1894).

<sup>32)</sup> A. Kanitz, Zeitschr. f. physiol. Chem. 47, 476 (1906).



in der Verdünnung  $10,75 \cdot 100 \times = 19,5$ . Trotzdem also die zweiten basischen Dissoziationskonstanten sehr schwach sind, macht augenscheinlich bei Säureüberschuß die Salzbildung bei der ersten Gruppe nicht halt. Wir haben nun nach Angaben von A. Kanitz und entsprechenden Messungen von J. Walker<sup>33)</sup> aus Harnstoff nach Formel (6) aus je zwei Messungen das Molekulargewicht  $M$  berechnet. J. Walker fand als Konstante der Verseifungsgeschwindigkeit  $C$  für seine  $n$  Salzsäure 0,00315.

für das Gemisch 1 Mol Salzsäure und  $\frac{1}{2}$  Mol Harnstoff 0,00228; für 1 Mol Salzsäure und 4 Mol Harnstoff 0,000503. A. Kanitz, loc. cit. für 0,1  $n$  Salzsäure  $C = 3,165 \cdot 10^{-4}$ , für Histidindichlorid ( $V = 10$ )  $C = 1,01 \cdot 10^{-4}$ , für Histidinhydrochlorid ( $V = 10$ )  $C = 1,84 \cdot 10^{-6}$  ( $C$  zeigte schlechte Konstanz;  $1,84 \cdot 10^{-6}$  ist das Mittel aus den drei ersten Werten), für Lysindichlorid ( $V = 10$ )  $C = 7,07 \cdot 10^{-5}$  und für Lysindichlorid ( $V = 20$ )  $C = 4,88 \cdot 10^{-5}$ . Daraus ergaben sich für Formel (6) folgende Zahlen:

Tabelle VII.

	$m_1$	$m_2$	$n_1$	$n_2$	$b_1$	$b_2$	$M$ nach Formel (6)	$M$
Harnstoff	10	240	1	1	0,7238	0,1597	59,87	60
Glyzin*)	30,024	30,024	0,1	0,5	$1,306 \cdot 10^{-3}$	$106,42 \cdot 10^{-3}$	73,5	75
Histidin	10	10	0,2	0,1	0,03191	0,0005813	91,01	155
Lysin	14,6	7,3	0,2	0,1	0,02234	0,01542	73,0	146
Glyzylglyzin*)	26,42	26,42	0,1	0,2	$0,7047 \cdot 10^{-3}$	$0,0760 \cdot 10^{-3}$	137,9	132,1

\*) S. P. L. Sørensen, Zeitschr. f. physik. Chemie **103**, 151 (1918).

\*) K. G. Dernby, Comp. rend. du Laboratoire de Carlsberg **11**, 269 (1916).

Bei Harnstoff und Glyzin ergibt sich also das theoretische Molekulargewicht, bei Lysin die Hälfte, beim Histidin mit dem 2. und 3. Stickstoffatom im Ring ein mittlerer Wert<sup>34)</sup>. Das Glyzylglyzin reagiert also bei Gegenwart von Salzsäure nicht mit dem Peptidstickstoff. Wenn also auch das Desaminoglutin noch H-Ionen bindet, brauchen doch den Peptidstickstoffatomen im Glutin noch keine nennenswerten basischen Eigenschaften zugeschrieben zu werden<sup>35)</sup>.

Trotzdem sind wir schließlich der Meinung, daß, wenn auch bei der Salzsäurebindung des Glutins hauptsächlich eine basische Gruppe sich beteiligt, man nicht ohne weiteres nach Formel (4) 839 als das Molekulargewicht des Glutins annehmen kann. Man tut vielmehr besser, dieser Zahl vorläufig nur den Wert eines Verbindungs- oder Äquivalentgewichtes zuzuschreiben und dementsprechend unserer Hydrolysenkonstanten bzw. Dissoziationskonstanten den Wert einer mittlerer oder reduzierter Konstanten im Sinne

von Wo Pauli und M. Hirschfeld<sup>36)</sup>. Vom rein chemischen Standpunkte aus kann man schon aus der Art und Zahl der Spaltungsprodukte des Glutins auf ein weit höheres Molekulargewicht schließen. Aus den relativen Mengen dieser Spaltungsprodukte nach D. D. van Slyke<sup>37)</sup> und ihrem Stickstoffgehalt berechnete so D. J. Lloyd<sup>38)</sup> kürzlich als niedrigstes Molekulargewicht der Gelatine angenähert 10300. Immerhin bleibt es unserer Meinung nach sehr beachtenswert, daß Paal's Molekulargewicht aus der Siedepunkterhöhung praktisch mit dem Wert 839 übereinstimmt.

In rein wässriger Lösung, also ohne Salzsäurezusatz und bei gewöhnlicher Temperatur liegen natürlich ganz andere Verhältnisse vor. Nach Zähigkeit, osmotischem Druck, Diffusionsgeschwindigkeit und ultramikroskopischem Aussehen zu schließen, handelt es sich hier nicht um Einzelmoleküle sondern um Molekülaggregate.

Der experimentelle Teil der Arbeit wurde im Chemischen Institut der Universität Bonn ausgeführt.

<sup>33)</sup> J. Walker, Zeitschr. f. physik. Chem. **4**, 324 (1889).

<sup>34)</sup> Vielleicht rührt die Abweichung aber auch von dem ungenauen  $C$ -Wert her (siehe oben).

<sup>35)</sup> Die Untersuchung synthetischer Polypeptide in dieser Richtung ist in Angriff genommen.

<sup>36)</sup> Wo. Pauli u. M. Hirschfeld, Biochem. Zeitschr. **62**, 256 (1914).

<sup>37)</sup> D. D. van Slyke, Journ. Biol. Chem. **10**, 15.

<sup>38)</sup> D. J. Lloyd, Biochem. Journ. **14**, 147 (1920).