

filtriren. Der nach dem Verdunsten der ätherischen Lösung hinterbleibende Rückstand wurde zur Gewichtsconstanz getrocknet und gewogen.

Auf diese Weise wurden aus 3.10 g Phenyloxycumarazin 1.43 g Benzoësäure erhalten, statt 1.60 g, welche theoretisch verlangt waren.

Organisch-chemisches Laboratorium der Kgl. Techn. Hochschule zu Berlin.

264. C. Beitler: Ueber das Chloroproteïnochrom.

[Aus dem chemischen Laboratorium des Institutes für experimentelle Medicin in Petersburg.]

(Eingegangen am 23. Juni.)

Unter diesem Namen werde ich in Folgendem einen rothen Farbstoff beschreiben, der durch Zusatz von Chlorwasser zu den Producten der pankreatischen Eiweissverdauung entsteht und schon von Gmelin beobachtet wurde. Gleich wie nach Chlor- so auch nach Brom-Zusatz zu der Verdauungsflüssigkeit entstehen im Wasser unlösliche, roth oder violet gefärbte Substitutionsproducte, die schon von verschiedenen Autoren, jedoch ohne sonderlichen Erfolg, untersucht wurden. Stadelmann¹⁾), der namentlich das Bromproduct untersuchte, bezeichnet die bis jetzt nicht isolirte Muttersubstanz des Farbstoffes mit dem Namen Proteïnochromogen und das Bromproduct als Proteïnochrom.

Die Untersuchung dieser Substanzen wurde vor einigen Jahren von M. Nencki²⁾ wieder aufgenommen, welcher zeigte, dass nach Bromzusatz zu der Verdauungsflüssigkeit zum mindesten zwei verschiedene Körper gebildet werden, von denen derjenige, der in geringerer Menge entsteht, sich durch einen hohen Bromgehalt (27 pCt.) und geringen Schwefelgehalt (0.5 pCt.) auszeichnet, während der andere braune Körper weniger Brom (20.5 pCt.), dagegen bedeutend mehr Schwefel (2.2 pCt.) enthält. Da die Isolirung des Proteïnochromogens, sowie die Reindarstellung der Bromsubstitutionsproducte nicht gelang, und mit Rücksicht darauf, dass das Proteïnochromogen allem Anscheine nach die Muttersubstanz der verschiedenen thierischen Pigmente ist, und es sehr wünschenswerth war, die Natur und Zusammensetzung dieser Substanz zu erforschen, so habe ich auf Vorschlag von Professor Nencki und mit dessen gütiger Unterstützung die Einwirkung von Chlor und Jod auf das Proteïnochro-

¹⁾ Zeitschr. f. Biologie 27, 491 (1890). ²⁾ Diese Berichte 28, 560 (1895).

mogen näher studirt; die bis jetzt erhaltenen Resultate bilden den Gegenstand der vorliegenden Mittheilung.

Um möglichst wenig einfache gelöstes Eiweiss zu haben, hat Nencki das Pankreas ohne jeden Fibrinzusatz der Selbstverdauung überlassen. Quantitative Bestimmungen zeigten mir aber, dass bei Fibrinzusatz ca. 20 pCt. des rothen Chlorproductes mehr gebildet werden. Ich habe daher auf 1.5 kg zerkleinertes, von Fett und Bindegewebe sorgfältig befreites Ochsenpankreas noch 750 g weiss gewaschenes Fibrin zugesetzt, das Ganze mit 5 L Wasser übergossen und bei Zimmertemperatur drei Tage lang unter häufigem Umschwenken der Selbstverdauung überlassen. Um die Fäulniss auszuschliessen, wurden auf je 1 kg der Mischung 15 g Chloroform zugesetzt. Die Verdauungsflüssigkeit wurde hierauf durch Tuch colirt, bis zur Coagulation des Eiweisses auf dem Wasserbade erhitzt, vom geronnenen Eiweiss abfiltrirt und weiter auf dem Wasserbade bis zur Syrupeconsistenz eingeengt. Nach dem Erkalten wurde die Flüssigkeit vom ausgeschiedenen Tyrosin und Leucin durch Filtration befreit und zuerst mit Petroläther, dann mit reinem Aether, um die darin löslichen Stoffe zu entfernen, geschüttelt.

Das Proteinochromogen aus der Verdauungsflüssigkeit zu isoliren, gelang uns nicht. Im Gegensatz zu den Angaben früherer Autoren konnte ich constatiren, dass das Proteinochromogen durch Tannin, Sublimat, salpetersaures Quecksilberoxydul und Quecksilberoxyd und Millon'sches Reagens nicht gefällt, wohl aber von den letztgenannten drei Reagentien zersetzt wird. Ebenso wenig wird das Proteinochromogen durch Jodkalium-Quecksilberjodid, Jodkalium-Wismuthjodid, basisches Wismuthnitrat, Ferrocyanalkalium, Magnesiumsulfat, Platinchlorid, Kupfersulfat, Pikrinsäure oder Silbernitrat gefällt. Entgegen der Angabe von Krukenberg, dass das Proteinochromogen durch Silbernitrat vollkommen gefällt wird, fand ich, dass das Silbernitrat allerdings schon in der Kälte reducirt wird, doch nach Entfernen des reducirtten Silbers durch Filtration, wie auch des überschüssigen Silbernitrats durch Chlornatrium, das Proteinochromogen durch Chlorwasser, anscheinend in unveränderter Menge, im Filtrate nachweisbar sei. Goldchlorid wird ebenfalls durch die Flüssigkeit reducirt.

Das einzige bis jetzt bekannte Fällungsmittel des Proteinochromogens ist die Phosphorwolframsäure in salzsaurer oder essigsaurer Lösung. Aus dem Niederschlage jedoch gelingt es nicht nach sehr langem Auswaschen das Proteinochromogen zu isoliren. In verschiedenen Versuchen, bei welchen ich die Albumosen, Peptone und Xanthinkörper durch Tannin-, Bleiacetat- und Sublimat-Fällungen möglichst entfernt hatte, wurde das Filtrat, nach Entfernung des überschüssigen Bleis resp. Quecksilbers durch Schwefelwasserstoff, mit Phosphorwolframsäure gefällt und der Niederschlag tagelang mit 2-prozentiger

Essigsäure ausgewaschen. Dieser Niederschlag, durch Bleiacetat oder Baryhydrat zerlegt und nach Entfernung des letzteren im Vacuum verdunstet, ergab einen syrupartigen Rückstand, der zwar mit Chlor- resp. Brom-Wasser den rothvioletten Niederschlag, allerdings in viel geringerer Menge, als die ursprüngliche Lösung, gab, daneben aber auch die Biuretreaction zeigte und von Neuem mit Tannin und Sublimat Niederschläge erzeugte — ein Zeichen, dass wir es hier mit keiner einheitlichen Substanz zu thun haben. Mit Rücksicht hierauf und auf Grund der weiter unten mitzutheilenden Analysen des Chlorsubstitutionsproductes nach vorausgegangener Fällung der Proteïnochromogenlösung mit Blei- oder Quecksilber-Salzen halte ich dafür, dass schon in der Kälte durch diese Metallsalze das Proteïnochromogen theilweise zersetzt wird. Es gelang uns aber nach zwei verschiedenen Methoden, das Chloroproteïnochrom von gleicher elementarer Zusammensetzung zu erhalten, welcher Umstand dafür spricht, dass die erhaltenen Zahlen der wahren Zusammensetzung des Chloroproteïochroms entsprechen.

Die eine der beiden Methoden ist folgende: Die pankreatische Verdauungsflüssigkeit wird nach dreitägigem Stehen, ohne dass vorher gelöstes Eiweiss entfernt wurde, der Dialyse durch Pergamentpapier unterworfen. Das mit Chlorwasser bis zur Ausfällung versetzte Dialysat wird 24 Stunden stehen gelassen, weil das Chloroproteïnochrom sich erst allmählich ausscheidet. Der rothviolette Niederschlag wird auf ein Filter gebracht und so lange mit Wasser gewaschen, bis das Filtrat keine Biuretreaction und keine Trübung mit Silbernitrat mehr giebt. Zum Schluss wird der Niederschlag mit Aether gewaschen, dann vorsichtig vom Filter abgehoben und im Vacuo über Schwefelsäure bis zum constanten Gewichte getrocknet. Die Analysen zweier, von verschiedener Darstellung herührender Präparate ergaben folgende übereinstimmende Zahlen:

Präparat I	Präparat II
C 52.09 pCt.	52.12 und 52.20 pCt.
H 5.22 »	5.34 » 5.37 »
N 13.50 »	13.32 » 13.40 »
Cl 4.86 »	4.65 —
S 1.21 »	— —

Beide Präparate, auf Platinblech verbrannt, erwiesen sich aschefrei.

Nach der zweiten Methode wurde die pankreatische Flüssigkeit durch Erhitzen auf dem Wasserbade enteiweisst, heiß filtrirt und nach dem Erkalten mit Chlorwasser versetzt. Die Fällung des Chlorproductes bewerkstelligte ich hier in zwei Fractionen, indem ich die Lösung des Proteïnochromogens mit nicht genügender Menge des Chlorwassers versetzte, den abgeschiedenen rothen Niederschlag abfiltrirte und im Filtrate davon durch weiteren Chlorzusatz das Chloro-

proteinochrom vollständig ausfällt. Die Reinigung der beiden Präparate geschah wie oben. Sie waren beide aschefrei und gaben bei der Verbrennung folgende Zahlen:

Fraction I		Fraction II
	(die Verdauungsflüssigkeit bis zur vollständigen Fällung mit Chlorwasser versetzt)	
C 52.12 und 52.22 pCt.		C 52.45 pCt.
H 5.43 » 5.47 »		H 5.54 »
N 13.65 —		N 13.66 »
Cl 4.73 » 4.58 »		Cl 4.59 »
S 1.24 —		S 1.41 »

Die auf die eine oder die andere Weise erhaltene Verdauungsflüssigkeit, mit Chlorwasser versetzt, färbt sich fuchsinroth; bald entsteht eine Trübung, und der Körper scheidet sich allmählich in roth-violetten Flocken ab. Ein geringer Ueberschuss von Chlorwasser schadet nicht. Erst bei stärkerem Gehalt an Chlor wird die Farbe missfarbig-braun. Der abgeschiedene Farbstoff ist unlöslich in Wasser, sehr wenig löslich in kaltem Alkohol und Essigester, leichter löslich in 50-procentigem Alkohol, dagegen unlöslich in Chloroform. Wie weiter unten gezeigt wird, wird das Chloroproteinochrom schon durch Kochen mit Alkohol oder Essigester zersetzt.

Die schön rothen Lösungen in verdünntem Alkohol fluoresciren kupferfarbig; bei längerem Stehen nimmt die Lösung einen Stich in's Violette an und fluorescirt mehr grünlich. Die frisch bereitete rothe Lösung zeigt ähnlich wie das von Nencki analysirte Bromproduct ein Absorptionsband im grünen Theil des Spectrums. Ich habe die Lage der Absorptionsbänder des Brom- und des Chlor-Productes genauer zu bestimmen gesucht und folgendes Resultat erhalten: Das Bromproduct, in Alkohol gelöst, zeigt ein ziemlich verwaschenes Band der Wellenlänge von 582—484 Millionstel mm mit einer Maximalabsorption von 571—532 mm. Durch Zusatz von Salzsäure zu der alkoholischen Lösung wird das Band etwas schärfer, der Wellenlänge 571—544 entsprechend. In verdünnter Natronlauge ist die Farbe des Bromproductes verhältnissmäßig recht lange beständig und zeigt ein scharfes Band zwischen 576—551. Die alkoholische Lösung des Chlorproductes, von annähernd gleicher Farbenintensität, zeigte ein Absorptionsband zwischen der Wellenlänge 576—484. Nach Zusatz von etwas Salzsäure wurde das Band schmäler, zwischen der Wellenlänge 544—528. Die alkoholische Lösung, mit etwas Aether versetzt, zeigte zwei Absorptionsstreifen: der eine von 576—564, der zweite von 522—509. Die anfangs schön rothe Lösung des Chlorproductes in verdünnter Natronlauge wird rasch braun und zeigt ein ziemlich scharfes Band zwischen 576—544 Millionstel mm.

In Alkalien ist das Chlorproteinochrom leicht löslich, doch geht die anfangs schön roth-violette Farbe in wenigen Minuten in eine bräunliche über. In saurer Lösung, selbst in der Wärme, ist dagegen dieser Farbstoff, wie weiter unten gezeigt wird, recht beständig.

Unter der Annahme, dass das von mir analysirte Product ein wirklich einheitliches ist und Schwefel in seinem Molekül enthält, ist die einfachste aus den analytischen Zahlen berechnete Formel: $C_{26}H_{116}Cl_3N_{21}O_{31}S$, welche verlangt:

Theorie	im Mittel erhalten
C 52.44 pCt.	C 52.20 pC.
H 5.28 »	H 5.40 »
Cl 4.83 »	Cl 4.74 »
N 13.38 .	N 13.50 .
S 1.45 »	S 1.19 »

Das Product chlorfrei berechnet, also das freie Proteinochromogen, würde dann die Zusammensetzung $C_{98}H_{119}O_{31}N_{21}S$ haben, welche Formel: Procente C 55.04, H 5.68, N 14.04, S 1.52 und O 23.72 verlangt.

Das hohe Molekulargewicht der Substanz legte den Gedanken nahe, dass das von mir analysirte Product vielleicht eine Verbindung von einem Eiweissstoffe mit einer Chromogengruppe von einer einfachen Zusammensetzung ist. Ich suchte daher das Proteinochromogen durch Kochen mit verdünnten Mineralsäuren in seine Componenten zu spalten, doch erwies sich auffallenderweise diese Verbindung Säuren gegenüber als recht beständig. Ich versetzte die enteiweisste Verdauungsflüssigkeit mit so viel Salzsäure, dass die Lösung 5 pCt. ClH enthielt und kochte sie eine halbe Stunde lang am Rückflussküller. Nach dem Erkalten wurde die etwas trübe Lösung filtrirt, anfangs mit Natriumcarbonat, zuletzt mit Natriumacetat neutralisiert und mit Chlorwasser wie üblich gefällt. Dem Anscheine nach war die Ausbeute an Farbstoff nicht viel geringer, und die Elementaranalyse der im Vacuum getrockneten Substanz ergab eine nur wenig verschiedene prozentische Zusammensetzung. Gefunden Procente: C 53.88, H 5.12, N 13.60, Cl 4.16, S 1.42 und 1.35.

Dieses Resultat ist um so bemerkenswerther, als allem Anscheine nach durch Metallsalze schon in der Kälte die schwefelhaltige Gruppe vom Proteinochromogen abgespalten wird. Ich habe wiederholt in Präparaten, die nach vorausgeganger Fällung der Verdauungsflüssigkeit mit Sublimat oder Bleiacetat dargestellt wurden, nur Spuren von Schwefel gefunden. Dabei war aber die übrige prozentische Zusammensetzung des Chlorproductes nicht constant. So ergab ein Präparat, das anfangs mit Tannin, hierauf mit Bleiacetat und nach Entfernen des Letzteren mit Schwefelwasserstoff, mit Chlorwasser gefällt wurde,

folgende Zusammensetzung: Procente C 47.16, H 4.35, N 13.60, Cl 8.56, S 0.11. Ein Präparat von einer folgenden Darstellung ergab aber: Procente C 47.54, H 4.45, N 13.32, Cl 4.80, S 0.28.

Ich versuchte das aus der dialysirten Verdauungsflüssigkeit erhaltenen Chloroproteïnochrom aus Alkohol oder Essigester umzu-kristallisiren. In diesen beiden Flüssigkeiten ist der Farbstoff anfangs mit schön rother Farbe, wenn auch nur wenig, selbst in der Wärme, löslich. Beim fortgesetzten Auskochen haben die späteren Auszüge schon einen bräunlichen Stich, und der Farbstoff wird weniger löslich, bis schliesslich ein schwarzes, in Alkohol fast unlösliches Pulver hinterbleibt. Längeres Kochen mit diesem Lösungsmittel zer-setzt also den Farbstoff, was auch die Elementaranalyse der gelösten Fraction bestätigt. Die Lösung der Farbstoffes in Essigester wurde auf dem Wasserhade verdunstet und der Rückstand im Vacuum ge-trocknet. Eine Kohlenwasserstoffbestimmung ergab darin Procente: C 59.55 und H 5.44. Ein anderes, auf gleiche Weise mit Alkohol bereitetes Präparat ergab Procente: C 54.66 und H 5.05, Zahlen, welche bedeutend unter einander und auch von der prozentischen Zu-sammensetzung des unveränderten Farbstoffes differiren.

Da die Isolirung des Proteïnochromogens mir nicht gelang, suchte ich durch Einwirkung von feuchtem Silberoxyd auf das Chloroproteïnochrom ein chlorsfreies Product zu erhalten. Schüttelt man die in 50-proc. Alkohol gelöste Substanz mit Silberoxyd, so wird die Flüssigkeit bald entfärbt und das Filtrat erweist sich als chlorsfrei. Auch in Wasser suspendirtes Chloroproteïnochrom, mit Silberoxyd geschüttelt, verliert das Chlor. Durch Einkleinen von Schwefelwas-ser-stoff in die filtrirte Lösung wurde das gelöste Silber entfernt und das Filtrat davon in einem Vacuumapparate bei 23—25° verdunstet. An den Wänden des Vacuumapparates schied sich noch etwas Silber ab. Die concentrirte Lösung wurde im Exsiccator über Schwefelsäure ge-trocknet und der syrupöse Rückstand mit absolutem Alkohol extrahirt. In Alkohol war der Rückstand kaum löslich und hinterblieb als eine krystallinische, alkalisch reagirende Masse, die mit Salzsäure und Platinchlorid gut krystallisirende Salze gab. Die Krystalle erwiesen sich als stickstoff- und schwefel-haltig. Leider reichte die erhaltene Menge für Analysen nicht aus. Wir werden den Versuch in grösserem Maassstabe wiederholen und hoffentlich den Körper in genügender Menge erhalten. Erwähnen möchte ich noch, dass, gleich wie Prof. Nencki für das Bromproduct gefunden, auch das Chloroproteïnochrom mit Kali geschmolzen ausser Pyrrol noch Skatol und Indol liefert.

Es ist zweckmässig für die weitere Untersuchung, die bisherigen Resultate über den Gmelin'schen Körper zusammenzustellen. Sie lassen sich folgendermaassen formuliren:

1. Im Eiweissmolekül ist eine komplexe chromogene Gruppe enthalten, welche bei der Pankreasverdauung losgelöst wird und durch Chlorwasser in Form eines rothen Chlorsubstitutionsproductes abgeschieden werden kann.

2. Dieses Product — das Chloroproteïnochrom — dessen aus den Analysen ermittelte Zusammensetzung der Formel $C_{96}H_{116}Cl_3N_{21}O_{31}S$ entspricht, wird durch Alkalien und Metallsalze schon in der Kälte, sowie durch Kochen mit Alkohol oder Essigester zersetzt, wobei verschiedene, nicht näher charakterisirte Spaltungsproducte entstehen.

3. Das Proteïnochromogen, dessen Zusammensetzung annähernd durch die Formel $C_{96}H_{119}O_{31}N_{21}S$ ausgedrückt werden kann und das sich, im Vergleich zu den Eiweissstoffen, durch einen höheren Kohlenstoff- und einen niedrigeren Stickstoff-, namentlich aber Wasserstoff-Gehalt von ihnen unterscheidet, ist ein ebenfalls sehr leicht zersetzbare Körper, der aber durch Membranen diffundirt und aus der wässrigen Lösung nicht durch Metallsalze und nur durch Phosphorwolframsäure gefällt wird. Durch Zerlegung der Phosphorwolframsäureverbindung kann das Proteïnochromogen nicht wieder zurück erhalten werden.

265. A. Fock: Ueber die Molekulargewichtsbestimmung fester Körper.

(Eine 2. Erwiderung an Hrn. Isidor Traube.)

(Eingegangen am 6. Juni.)

In einer als »Erwiderung« bezeichneten Notiz¹⁾) bekämpft Hr. I. Traube eine Reihe von Anschauungen und Vorstellungen, welche mir zugeschrieben bezw. bei mir vorausgesetzt werden, und zwar in möglichst unbestimmter Form, z. Th. sogar nur möglicherweise. Würde ich dieselben gehegt oder vertreten haben, so müsste ich seine Kritik in manchen Punkten als zutreffend hinnehmen. Es handelt sich indessen überall nur um von Hrn. I. Traube selbst auf Grund von Missverständnissen construirte Auffassungen und Widersprüche.

So wird z. B. angenommen, dass nach meiner Ansicht die Molekulargewichte (sämmtlicher) fester Stoffe unimolekular sind. Dann resultirt natürlich ein Widerspruch mit dem, was man auf anderem Wege über die Molekulargrösse einzelner Körper schliessen muss, so z. B. bei der Essigsäure und einigen der sich ähnlich, d. i. associirend, verhaltenden Substanzen. In der Zusammenfassung der Resultate

¹⁾ Diese Berichte 31, 1081.