

# **Über die Reaktionsweise von Kupfer- und Chromsalzen mit Gelatine und Gelatinehydrolysaten**

Von der Abteilung für Chemie  
der Technischen Hochschule Darmstadt

zur

Erlangung des Grades eines Doktor-Ingenieurs  
(Dr.-Ing.)

genehmigte

## **Dissertation**

Vorgelegt von

**Dipl.-Ing. Karl Theo Dröscher**  
aus Kirn (Nahe)

Tag der Einreichung: 20. 6. 1940

Tag der mündlichen Prüfung: 24. 6. 1940

---

Springer-Verlag Berlin Heidelberg GmbH 1942

ISBN 978-3-662-28082-9 ISBN 978-3-662-29590-8 (eBook)  
DOI 10.1007/978-3-662-29590-8

Berichterstatter: Prof. Dr. A. Küntzel  
Mitberichterstatter: Prof. Dr. C. Schöpf

Sonderdruck aus der Biochemischen Zeitschrift Band 306, Heft 3—4  
und Band 312, Heft 3—4

Springer-Verlag Berlin Heidelberg GmbH

Die bei der Biuretreaktion der Eiweißkörper und ihrer Abbauprodukte auftretende Kupferkomplexfarbe läßt sich bekanntlich nicht auf eine bestimmte Farbnuance festlegen; sie schwankt vielmehr zwischen Violett und Rot, und zwar abhängig 1. von dem Verhältnis von Kupfer zu der Eiweißmenge in der zu untersuchenden Lösung und 2. von dem Abbaugrad des Eiweißkörpers.

Was den ersten Punkt betrifft, so hat schon *Brücke* (1) im Jahre 1883 gezeigt, daß bei geringem Kupferzusatz zu einer Eiweiß- bzw. Peptonlösung eine rote Kupferfarbe auftritt, während bei größerem Kupfergehalt der Versuchslösung die Komplexfarbe violett ist. *Kühne* (2) stellte eine Tabelle der Farbnuancen bei verschiedenen Eiweißabbauprodukten je nach der zugesetzten  $\text{CuSO}_4$ -Menge auf. Vor kurzem beschäftigten sich *F. Lieben* und *H. Jesserer* (3) mit dieser Frage und widmeten ihr eine ausführliche, auf quantitativen Methoden beruhende Untersuchung. Diese Forscher geben den gleichen Sachverhalt in der Weise wieder, daß sie von einer roten und einer blauen Farbkomponente der Biuretfarbe sprechen; die rote Komponente tritt bei geringem Kupferzusatz auf, bei Steigerung der Kupferkonzentration erscheint dann auch noch die blaue Komponente.

Über den Einfluß der Kupferkonzentration auf die Biuretfarbe besteht demnach Übereinstimmung unter den zahlreichen Autoren, die sich mit der Biuretreaktion beschäftigt haben. Dagegen findet man verschiedene Anschauungen über den Einfluß des Abbaugrades auf die Kupferfarbe. Die älteren Autoren betonen die Ungleichheit der Färbung von Proteinlösungen und abgebauten Proteinen: „Eiweißlösungen färben sich mit Kali und Kupferoxydlösung violett, Peptonlösungen aber rot.“ (*Brücke*, l. c. S. 215). *Lieben* und *Jesserer* hingegen führen diese von den älteren Autoren gefundenen Farbunterschiede auf die Ungenauigkeit der qualitativen Ausführung der Biuretreaktion zurück und finden ihrerseits, daß Proteine und Peptone nach Farbstärke und Farbton gleichartig reagieren.



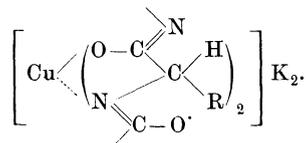
hauptsächlich bildet sich ein Komplex, dessen Liganden die Peptidgruppen der Proteine und Polypeptide sind und in zweiter Linie entsteht ein Komplex, dessen Liganden die freien Aminogruppen der Proteine, Polypeptide und auch der Aminosäuren sind. Beide Komplexe können gesättigt sein oder ungesättigt, was ebenfalls von Einfluß auf die Komplexfarbe ist. — Daß die Peptidgruppen der Proteine die Träger der Biuretreaktion sind, hatte *Schiff* noch nicht erkannt. Diese Erkenntnis hat sich erst seit den Arbeiten von *E. Fischer* (8) durchgesetzt und gehört heute zu den Elementarkenntnissen der Eiweißchemie (9). Man erhält jedoch erst dann eine Erklärung für die Variabilität der Biuretfarben, wenn man berücksichtigt, daß unter den Bedingungen der Biuretreaktion noch andere komplexbildende Gruppen in Proteinen und verstärkt in Proteinabbauprodukten vorhanden sind.

Das soll an den folgenden Versuchen im einzelnen näher ausgeführt werden.

### 1. Der Kupferpeptidkomplex.

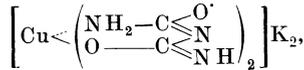
Aus Essigester und Methylamin wurde Essigsäuremethylamid,  $\text{CH}_3 \cdot \text{NH} \cdot \text{CO} \cdot \text{CH}_3$ , der einfachste Peptidkörper, hergestellt; er zeigt keine Biuretreaktion. Dasselbe gilt für die Verbindung  $\text{H}_3\text{C} \cdot \text{OOC} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{NH} \cdot \text{CO} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{OH}$ , hergestellt aus Glycylglycinester durch Desamidieren mit Natriumnitrit und Essigsäure. Wenn man dagegen den Tripeptidester aus drei Glykokollresten auf die gleiche Weise desamidiert und mit Kupfer und Alkali versetzt, so erhält man eine ausgesprochene Rotfärbung der Lösung. Ferner stellten wir aus Malonsäurediäthylester und wässrigem Methylamin das Malonsäure-bis-methylamid,  $\text{CH}_3 \cdot \text{NH} \cdot \text{CO} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CO} \cdot \text{NH} \cdot \text{CH}_3$ , nach Angaben von *M. Freund* (10) her, erhielten mit dieser Verbindung jedoch keine Biuretreaktion, sondern nur eine schwach blaue Färbung. Aus diesen Versuchen geht hervor, daß zur Biuretreaktion mindestens zwei Peptidgruppen in polypeptidischer Anordnung im Molekül vorhanden sein müssen. Daß eine einzelne Peptidgruppe zur Biuretreaktion nicht ausreicht, ist auf Grund des negativen Biurettestes des Glycylglycins bereits von *H. O. Calvery* (11) betont worden.

Dieser Peptidkomplex ist nur in stark alkalischer Lösung beständig; weiterhin ist darauf hinzuweisen, daß die Cupriionen nur dann in komplexer Form in Gegenwart von Alkali gelöst bleiben, wenn ein gewisser Überschuß von Peptiden vorhanden ist. Für die Konstitution dieses Komplexes ist folgende Formulierung denkbar:



Danach werden zunächst die beiden Peptidgruppen unter dem Einfluß der hohen Alkalikonzentration enolisiert. Sodann wird das aktivierte Wasserstoffatom der Peptidgruppe durch das Kupferatom ersetzt, das seinerseits mit dem Stickstoffatom der Peptidgruppe eine nebenvalentige Bindung eingeht. Es entsteht so ein Nebenvaleanzring erster Art im Sinne von *P. Pfeiffer* (12).

In analoger Weise läßt sich die Biuret-Kupferkomplexverbindung von Schiff formulieren:



für die jedoch noch andere Formulierungen möglich sind.

Die folgende Tabelle I enthält die weiter im Schrifttum angegebenen Formelvorschläge dieser Komplexverbindung, die in der Schreibweise etwas aneinander angeglichen sind, ohne daß die wesentlichen Gesichtspunkte der ursprünglichen Formulierung verändert wurden.

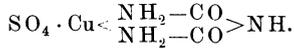
Tabelle I.

Autor	Formelbild
<i>H. Schiff</i> (4) .....	$\text{Cu} - \left( \begin{array}{c} \text{OH} \\   \\ - \text{NH}_2 - \text{CO} \\ \text{KNH}_2 - \text{CO} \end{array} \begin{array}{l} \nearrow \text{NH} \\ \searrow \end{array} \right)_2$ $\begin{array}{c}   \\ \text{OH} \end{array}$
<i>L. Tschugaeff</i> (13) .....	$\left[ \text{Cu} \left\langle \begin{array}{c} \text{NH} - \text{CO} \\ \text{NH} - \text{CO} \end{array} \begin{array}{l} \nearrow \text{NH} \\ \searrow \end{array} \right\rangle \right]_2 \text{K}_2$
<i>H. Ley</i> (14) .....	$\left[ \text{Cu} \left\langle \begin{array}{c} \text{NH}_2 - \text{CO} \\ \text{N} = \text{CO} \end{array} \begin{array}{l} \nearrow \text{NH} \\ \searrow \end{array} \right\rangle \right]_2 \text{K}_2$
<i>H. O. Calvery</i> (11) .....	$\left[ \text{Cu} \left\langle \begin{array}{c} \text{NH} = \text{CO}' \\ \text{NH} = \text{CO} \end{array} \begin{array}{l} \nearrow \text{NH} \\ \searrow \end{array} \right\rangle \right]_2 \text{K}_2$

Von diesen Formeln ist die von *Tschugaeff* die wahrscheinlichste; sie kommt unserer Formulierung am nächsten. Sie kann jedoch nicht als Vorbild für die Aufstellung einer Formel für den Peptidkomplex dienen, weil die beiden Stickstoffatome zweier benachbarter Peptidgruppen um ein Kettenglied näher aneinanderstehen als die beiden Aminostickstoffatome des Biurets. Bei einer Ringbildung, bei der das Kupferatom von zwei Stickstoffatomen eingeschlossen wird, könnte im Falle der Peptidverbindung nur ein fünfgliedriger Ring entstehen, während die von uns gewählte Formulierung einen Sechsring ermöglicht und daher vorzuziehen ist.

Die Frage, ob die *Tschugaeffs*che Formel der Cu-Biuretverbindung oder die der Peptidformel analoge wahrscheinlicher ist, ist nicht zu entscheiden. Die subjektiv empfundene Farbgleichheit zwischen Biuret- und Peptid-

komplexverbindung ist jedenfalls kein Grund dafür, auch gleichartig konstituierte Komplexe anzunehmen. Die Lichtabsorptionskurve der Kupfer-Biuretverbindung zeigt nämlich eine sehr geringe Übereinstimmung in bezug auf Lage und Höhe des Extinktionsmaximums mit den Kurven von Kupfer-Proteinverbindungen (S. 200). Zugunsten der Formel von *Tschugaeff* spricht, daß sich die neutrale blaugefärbte Kupfer-Biuretverbindung,  $\text{CuSO}_4(\text{C}_2\text{N}_3\text{O}_2\text{H}_5)$  (*Schiff*), nur nach Art einer  $\text{N} \dots \text{Cu} \dots \text{N}$ -Verkettung formulieren läßt:



## 2. Der Kupferaminokomplex.

Die blaue Komponente der Biuretfarbe tritt dann am reinsten in Erscheinung, wenn keine Möglichkeit für die gleichzeitige Bildung von Peptidkomplexen besteht, also bei der Reaktion des Kupfers mit vollständig abgebauten Eiweißhydrolysaten bzw. mit einheitlichen Aminosäuren. Die Farbe derartiger Lösungen ist bekanntlich rein blau.

Zum Unterschied gegenüber den Peptidkomplexen, die nur in stark alkalischer Lösung gebildet werden können, sind jedoch die Komplexverbindungen der Aminosäuren mit Kupfer auch im schwach alkalischen, neutralen und schwach sauren Gebiet beständig, wenn auch die Farbe bzw. die Konfiguration der Komplexe mit der Azidität der Lösung Änderungen unterliegt. Hierüber liegen Messungen von *Borsook* und *Thimann* (15) an Kupferglykokoll- und Kupferalanin-komplexen vor.

Die Formelvorschläge der Tabelle II sind mit denjenigen von *Borsook* und *Thimann* nicht identisch. Das bekannte innere Komplex-

Tabelle II. Farben von Cu-Glykokollkomplexen bei verschiedenem  $p_{\text{H}}$ .

$p_{\text{H}}$ -Bereich	Farbe	Lage des Extinktionsmaximums* in $m\mu$ bei $\text{Cu}:\text{N} = 1:50$	Formel
Stark sauer	Kupferchloridfarbe	—	$[\text{Cu}(\text{OH}_2)_2] \text{Cl}_2 + 2 \text{HOOC} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{NH}_3\text{Cl}$
Schwach sauer $p_{\text{H}}$ etwa 3 - 4	grünblau	720 - 680	$[\text{Cu} \cdot (\text{OOC} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{NH}_3)_2] \text{Cl}_2$ (I)
Schwach sauer bis schwach alkalisch, $p_{\text{H}}$ 5 - 9	blau	640 - 620	$[\text{Cu} \left\langle \begin{array}{l} \text{O} - \text{OC} \\ \text{NH}_2 - \text{CH}_2 \end{array} \right\rangle_2]$ (II)
Stark alkalisch $p_{\text{H}}$ 10 - 12	blau	etwa 660	$[\text{HO} \rangle \text{Cu} \left\langle \begin{array}{l} \text{NH}_2 - \text{CH}_2 - \text{COO} \\ \text{NH}_2 - \text{CH}_2 - \text{COO} \end{array} \right\rangle \text{Na}_2]$ (III)

\* Nach *Borsook* und *Thimann*.

salz des Kupfers mit zwei Glykokollmolekülen ist nach ihnen nur in neutraler Lösung beständig; in Gegenwart von Alkali zerfällt dieses Salz. Um eine bestimmte Kupfermenge durch Glykokoll in alkalischem Gebiet ständig in Lösung halten zu können, bedarf es eines Überschusses von Glykokoll im Verhältnis  $\text{Cu} : \text{N} = 1 : 5,3$ . Bereits ein Ansatz von 1 Kupfer zu 4 Glykokoll erweist sich als unstabil und läßt nach kurzem Stehen eine Trübung bzw. Abscheidung von Kupferhydroxyd erkennen. Wir haben es hier offenbar mit einem Komplex des Cupriions zu tun, welcher dem bekannten Tetramminkomplex des Kupfers analog gebaut ist und der folgendermaßen zu formulieren ist:



Genau so wie Glykokoll verhalten sich die übrigen Aminosäuren, die als Endglieder der totalen Eiweißhydrolyse auftreten. Aber auch die nativen Proteine reagieren mit Kupfersalzen unter Bildung von gemischten Carboxyl-Aminokomplexen bzw. reinen Amminkomplexen. Denn die Proteine verfügen auf Grund ihres Gehalts an Diamino- und Dicarbonsäuren über freie Gruppen dieser Art. Nur sind diese Gruppen an den Makromolekülen der Proteine räumlich fixiert, so daß eine lokale Anreicherung, wie sie zur Bildung abgesättigter Komplexe erforderlich ist, nicht möglich ist. Die Reaktion der Proteine mit Kupfersalzen unter Bildung ungesättigter Kupfer-Carboxyl-Aminokomplexe erkennt man am deutlichsten im neutralen bzw. schwach saurem Gebiet, in welchem eine Störung des Farbeindrucks durch die roten Peptidkomplexe nicht erfolgen kann; denn letztere bilden sich nur im alkalischen Gebiet. Bekannt ist, daß Serumeiweiß mit Kupfersulfat eine bläuliche Kupferalbuminatfällung gibt. Versetzt man eine Gelatinelösung mit etwas Kupfersulfat, so ist mit bloßem Auge kaum wahrzunehmen, daß eine Reaktion im Sinne einer Komplexänderung des Cupriaquokomplexes stattgefunden hat. Bei genauer optischer Analyse ist jedoch das Auftreten einer derartigen Reaktion zweifellos festzustellen. Ebenso wie im alkalischen Gebiet kommt die Komplexänderung stärker zum Ausdruck, je größer der Überschuß der Eiweißkomponente gegenüber Kupfer ist. Die Komplexfarbe der unabgebauten Gelatine ist grün, die des vollständig abgebauten Hydrolysats ist blaugrün. Mit Glykokoll bildet Kupfersulfat rein blau gefärbte, aber ebenfalls wenig farbintensive Komplexe (Abb. 1, 2 und 3). Die Übereinstimmung dieser Kurven läßt den Schluß zu, daß in allen drei Fällen Komplexverbindungen vom Typus des Kupferglykokollsalzes gebildet werden. Daß das Eiweißhydrolysat eine etwas andere Farbe in Gegenwart von Kupfer erhält als die Glykokolllösung, kann auf eine individuelle Verschiedenheit der Kupferkomplexe der einzelnen Aminosäuren hinsichtlich der Farbe zurückgeführt werden.

Macht man nun ein Aminosäure-Kupfersalzgemisch stark alkalisch, so erfolgt eine Intensivierung der Aminokomplexfarbe. Eine analoge Farbänderung der Kupferaminkomplexe bei Alkalizugabe ist jedoch im Falle der Proteine nicht zu bemerken, weil sie durch das Auftreten

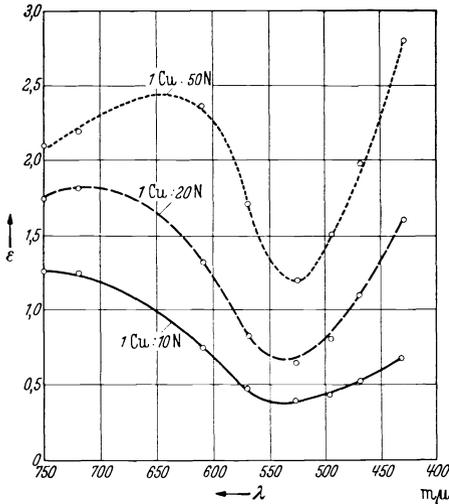


Abb. 1. Extinktionskurven von Kupfersulfat + desaggregierter Gelatine ohne Alkali. Kupferkonzentration 0,3 %.

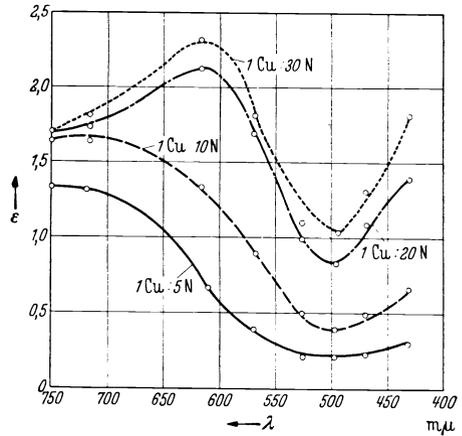


Abb. 2. Wie Abb. 1, statt desaggregierter Gelatine wurde ein abiuretetes Gelatinehydrolysat genommen.

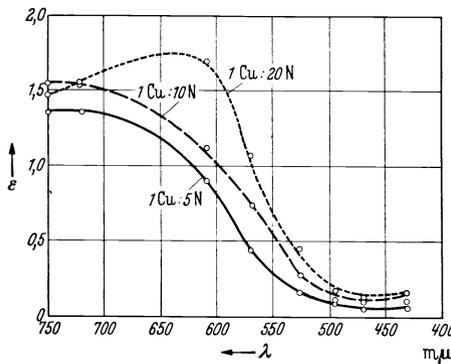


Abb. 3. Wie Abb. 1, statt Gelatine wurde Glykokoll genommen.

der intensiv rotgefärbten Peptidkomplexe überdeckt wird. Über die verschiedenen Formen der Kupferkomplexe der Proteine abhängig von der Azidität unterrichtet die folgende tabellarische Zusammenfassung (Tabelle III).

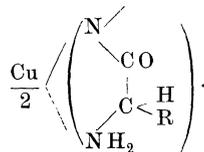
Im alkalischen Gebiet, also unter den Bedingungen der Biuretreaktion, existieren demnach zwei Typen von Kupferkomplexverbindungen nebeneinander.

Tabelle III.

Art der Cu-Komplexverbindungen in verschiedenen [H <sup>+</sup> ]-Bereichen	Reagierende Gruppen des Proteins	
	Carboxyl- und Aminogruppen	Peptidgruppen
Sauer — neutral	Glykokollsatzkomplex unter Bevorzugung der COO-Gruppe I → II* Farbe: grün — blaugrün	—
Neutral — schwach alkalisch	Glykokollsatzkomplex II* Farbe: blau	—
Schwach alkalisch — stark alkalisch	wenig stabiler Glykokoll- satzkomplex unter Bevor- zugung der Aminogruppe II → III*. Farbe: blau	stabiler Peptid- komplex Farbe: rot

\* Die römischen Zahlen beziehen sich auf die Formelbilder in Tabelle II.

Daneben muß aber auch auf die Möglichkeit der Bildung von Mischkomplexen hingewiesen werden, die dann gegeben ist, wenn zu einer Peptidgruppe eine freie Aminogruppe in  $\alpha$ -Stellung steht. Das geht aus der Beobachtung hervor, daß Glycylglycin mit Kupfer und Alkali eine zwar blaue, aber doch mehr nach Violett verschobene Farbe gibt im Vergleich zu der Glykokollkupferfarbe. Auch die Kupferkomplexfarbe des Tripeptids ist von derjenigen des desamidierten Tripeptids deutlich verschieden: diese ist rot, jene ist mehr violett. Es muß sich also ein Komplex folgender Art bilden, welcher in der Farbe eine Mittelstellung zwischen dem Peptidkomplex und dem Aminokomplex einnimmt.



Im Falle der Biuretreaktion mit nativen Proteinen dürfte die Möglichkeit dieser Komplexbildung allerdings selten gegeben sein.

Für das Verständnis der Verhältnisse bei der Biuretreaktion ist weiterhin wichtig, daß von den beiden Arten von Liganden offensichtlich die Peptidgruppe komplexstabiler ist. Der experimentelle Grund für diese Annahme ist folgender. Läßt man eine mit Kupfer versetzte alkalische Eiweißlösung längere Zeit unter Rückfluß kochen, so vermindert sich der Gehalt an gelöstem Kupfer, wobei sich die Farbe gleichzeitig immer mehr nach rot und schließlich nach gelbrot verschiebt und CuO ausfällt.

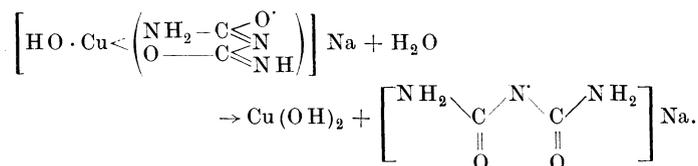
Gibt man zu den an Kupfer verarmten Lösungen wieder Kupfersalzlösung, so erscheint wieder die ursprüngliche violette Biuretfarbe.

Dieser Versuch ist zugleich ein Beweis für die Bildung von Kupferpeptidkomplexen; denn wenn man eine kupferfreie Eiweißlösung gleich lange mit Alkali erhitzt, so erweist sie sich als abiuret. Im alkalischen Milieu hat also eine Hydrolyse der freien Gelatine stattgefunden. Durch

die Bildung komplexer Kupfersalze unterbleibt die Hydrolyse bzw. wird erheblich gehemmt. Dieser Befund kann nur so erklärt werden, daß die Kupferatome mit der Peptidgruppe unter Komplexbildung reagiert haben und daß auf Grund dieser komplexen Bindung die Peptidgruppen vor Hydrolyse geschützt sind.

### 3. Die Bildung basischer Kupferkomplexe.

Die vorstehend geschilderten Kupferkomplexe können sich nur dann bilden, wenn ein so großer Überschuß an den komplexbildenden Peptid- und Aminogruppen vorhanden ist, daß eine Sättigung des Komplexes mit diesen Gruppen erfolgt. Doch sind auch ungesättigte Kupferkomplexe lösungsbeständig; diese können nur als basische Kupfersalze formuliert werden, z. B.  $\text{OH} \cdot \text{Cu} \cdot \text{R}$ , wobei R ein Biuretrest oder eine Dipeptidgruppe sein kann. Das erkennt man deutlich an dem Beispiel der Biuretkupferkomplexe. Stellt man sich eine Kupferbiuretlösung her, in welcher 2 Mol Biuret auf 1 Cu kommt, so ist diese Lösung beim Erhitzen instabil; sie verliert Kupfer als schwarzes  $\text{CuO}$  und zugleich verschiebt sich die Farbe von rotviolett nach rot. Der Vorgang ist so zu verstehen, daß in der ursprünglichen Lösung ein Hydrolysen-gleichgewicht zwischen Biuret-Natrium, basischem Kupferbiuret und gesättigtem Kupferbiuret besteht. Dieses Gleichgewicht wird durch das Erhitzen im Sinne einer verstärkten Komplexhydrolyse gestört.



Es erfolgt eine Abscheidung von Kupferhydroxyd, bis sich das Verhältnis von komplexstabilem Kupfer zu Biuret so weit zugunsten der Biuretkonzentration verschoben hat, daß nur noch gesättigte Komplexe in der Lösung vorhanden sind. In diesem Falle findet man etwa 4 Biuret auf 1 Cu in der Lösung.

Daraufhin eine Kupferbiuretverbindung konstruieren zu wollen, in der 1 Kupferatom 4 Moleküle Biuret undissoziiert gebunden hält, wäre natürlich verfehlt und die in dieser Richtung gehenden Spekulationen von *Lieben* und *Jesserer* sind abzulehnen. Es gibt tatsächlich nur zwei Biuretkupferverbindungen, nämlich die gesättigte mit zwei Biuretmolekülen und die ungesättigte oder basische mit einem Molekül Biuret. Beide sind kristallin erhalten worden, die erste von *Schiff*, die zweite von *Ley*.

Ähnliche Gleichgewichtsbetrachtungen lassen sich mit den Kupferaminokomplexen anstellen. Um Kupfer durch Glykokoll in Gegenwart von Alkali komplex gelöst zu halten, braucht man 4 Moleküle Glykokoll auf 1 Kupfer. In einer Lösung dieses Verhältnisses liegen jedoch noch

keineswegs gesättigte Glykokollkomplexe vor, wie aus der Intensitätserhöhung der Komplexfarbe hervorgeht, wenn man zu dieser Lösung weiterhin Glykokoll zusetzt (Abb. 2). Auch ist die Lösung von 1 Kupfer zu 4 Glykokoll nur in der Kälte und nicht beim Erhitzen stabil; sie wird aber durch weiteren Glykokollzusatz auch gegen Erhitzung stabilisiert. Eine Absättigung des Kupferkomplexes mit Glykokoll ist also nur bei Anwendung eines hohen Glykokollüberschusses möglich. Der anfangs genannte Faktor des Mengenverhältnisses von Kupfer und Eiweißkomponente, der eine Verschiebung der Farbe nach mehr blauviolett (im Falle großer Kupferkonzentrationen) bzw. nach rotviolett (im Falle eines Eiweißüberschusses) bedingt, ist zweifellos auf die Bildung basischer Kupferkomplexe im Falle der Anwendung von viel Kupfersalz zurückzuführen, während sich bei Zugabe von wenig Kupfer zu viel Eiweiß im wesentlichen gesättigte Verbindungen bilden können.

#### 4. Vergleichende Untersuchung der Kupferkomplexfarbe von Gelatine und ihren Abbauprodukten bei verschiedenem Verhältnis Cu : N.

Die im vorstehenden auseinandergesetzten Gesichtspunkte lassen die Farbänderungen der Biuretreaktion unter den verschiedensten Bedingungen restlos verstehen. Wir wollen ihre Anwendbarkeit zunächst auf den Fall überprüfen, daß wir einen Eiweißkörper abbauen und die Änderung der Farbe mit fortschreitendem Abbau verfolgen. Es ist hierbei nicht nur erforderlich, das Verhältnis von Kupfer zu Eiweißkomponente zu berücksichtigen, sondern man muß auch die Kupferkonzentrationen der zu untersuchenden Lösungen konstant halten. Denn da die Farbe von dem Kupferion ausgeht, so können nur Lösungen gleicher Kupferkonzentration miteinander verglichen werden. Dieser Hinweis ist notwendig, weil andere Forscher Lösungen gleichen Eiweißgehalts und wechselnder Kupfermengen kolorimetrisch verglichen haben. Für die Versuche wurde Gelatine verwendet und mit Hilfe von Säure stufenweise abgebaut. Zur Charakterisierung des erreichten Abbaues wurde der Prozentgehalt des freien Aminostickstoffs bezogen auf Gesamtstickstoff bestimmt. Außerdem wurden optische Drehung und Gerbstofffällungsvermögen der Abbaustufen bestimmt (Tab. IV).

Zu dem Abbau der Gelatine ist im einzelnen noch folgendes zu sagen:

Gelatine ist bereits ein abgebauter, stark denaturierter Eiweißkörper. Die Gelatine bildet sich aus Kollagen auf Grund einer Hitzeumwandlung (Verleimung), nachdem ein geringfügiger, für die Umwandlungsfähigkeit in Gelatine jedoch entscheidender hydrolytischer Abbau vorausgegangen ist (16). Das wichtigste Ergebnis der Verarbeitung von Kollagen in Gelatine ist die Entstehung löslicher, wenn auch immer noch hochmolekularer und

Tabelle IV.

Nr.	Art des Abbaues bzw. Herstellung der Lösung	Cu-Farbe im alkalischen Milieu	Amino-Stickstoff nach van Slyke %	Optische Drehung $[\alpha]_{20}^D$	Gerbstofffällende Wirkung
1	10%ige Gelatinelösung wurde durch Lösen von 20 g Trockengelatine in 200 ccm H <sub>2</sub> O hergestellt	blauviolett	3,73	- 141	Gerbstofffällung, setzt sich sofort ab
2	10%ige Gelatinelösung wurde im Autoklaven bis 150° C erhitzt und abkühlen gelassen	rotviolett	4,48	- 138	Dasselbe
3	10%ige Gelatinelösung wurde 2 Stunden mit n/2 H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> unter Rückfluß gekocht	rotviolett	14,05	- 125	Gerbstofffällung, setzt sich langsam ab
4	10%ige Gelatinelösung wurde mit n/2 H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> im Autoklaven bis auf 160° C erhitzt und dann abkühlen gelassen	violett	28,4	- 63,7	starke Trübung
5	10%ige Gelatinelösung wurde im Autoklaven mit n/2 H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 3 Stunden bei 180° C erhitzt	blauviolett	31,9	- 40	sehr schwache Trübung
6	10%ige Gelatinelösung wurde mit n/2 H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 8 Stunden im Autoklaven bei 180° erhitzt	blaugrün	38,1	- 16,7	Dasselbe
7	Die Lösung von 6 wurde 10 Stunden mit 10%iger H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> unter Rückfluß gekocht	blau	62,8	- 7,15	„

micellar gebauter Eiweißteilchen aus dem vorher unlöslichen Gerüstprotein Kollagen. Die Gelatine, insbesondere die technisch hochwertige Emulsionsgelatine, kommt, was den Zuwachs von Carboxyl- und Aminogruppen durch die erwähnte fabrikatorisch herbeigeführte Hydrolyse betrifft, dem verleimten, hydrolytisch jedoch nicht weiter abgebauten Kollagen so nahe, daß man beide Stufen des Kollagenabbaues, das verleimte noch unlösliche Kollagen einerseits, die lösliche hochwertige Gelatine andererseits, als gleichwertig ansehen darf. Es sei übrigens hier erwähnt, daß nach der Auffassung von *E. Cherbuliez*, *J. Jeannerat* und *K. H. Meyer* (17) auch bei der eigentlichen Verleimung des Kollagens in bestimmtem Umfange eine hydrolytische Aufspaltung von Peptidgruppen erfolgt.

Will man die Gelatine abbauen, so kann man auf zwei Wegen vorgehen. Die mildeste Form des Gelatineabbaues besteht in einer längeren Erhitzung der neutralen Lösung, wobei die Gelatinierbarkeit und Viskosität weitgehend herabgesetzt werden. Dieses Verfahren stellt eine Fortsetzung desjenigen Prozesses dar, welcher die Gelatine aus dem „Leimgut“ (d. i. dem gekalkten und wieder neutralisierten Kollagen) hat entstehen lassen, ein Prozeß, der Versieden genannt wird. In der Technik wird die Wertverminderung der Gelatine durch zu langes ausgedehntes Versieden als Umwandlung in „Gelatosen“ gekennzeichnet. *Gerngroß* (18) nannte diesen Vorgang, bei welchem hauptsächlich die physikalischen Eigenschaften, kaum aber die

chemischen beeinflußt werden, Desaggregation. Man kann sich die Desaggregation als allmähliche Auflösung der Gelatinemicellen vorstellen, welche ursprünglich die löslichen Teilchen der Gelatine bilden. Diese Micellen sind Bündel von Fadenmolekülen, welche noch bis zu einem gewissen Grade die Molekülanordnung der Kollagenfaser beibehalten haben. Der Zusammenhalt ist teils durch mechanische Verfilzung der Fadenmoleküle, teils durch schwache Assoziationskräfte bzw. elektrovalente Bindungen bedingt. Es bereitet keine Schwierigkeit, die Lockerung und Lösung dieser lockeren Molekülbündel als Aufhebung der genannten Bindungen durch die langdauernde Erhitzung zu verstehen. Bei der Desaggregation findet jedoch sicherlich auch ein geringer hydrolytischer Abbau von Peptidgruppen statt, der aber im allgemeinen unterhalb der analytischen Feststellbarkeit bleibt. Das Endziel der Desaggregation ist die Bildung von einzelnen Fadenmolekülen, die in ihrer Länge, verglichen mit der Länge dieser Moleküle im Zustand der micellaren Bündelung, kaum geändert sind. Ein wirksamer Abbau der Fadenmoleküle in kleinteilige Peptide und Aminosäuren kann erst durch eine Säure- oder Alkalihydrolyse bzw. durch einen Fermentabbau bewirkt werden. Dieses ist der zweite Weg des Abbaus von Gelatine. Geht man von hochwertiger Gelatine aus, statt von einem Desaggregat, so wird hierbei die Stufe des Desaggregats gleich übersprungen. Das Desaggregat ist also keine Zwischenstufe eines hydrolytischen Abbaus. Das am meisten angewandte Mittel für die Hydrolyse ist starke Mineralsäure. Man kocht das Eiweiß mit seinem sechsfachen Gewicht an Wasser und seinem dreifachen an Schwefelsäure oder mit dem sechsfachen Gewicht von 20%iger Salzsäure etwa 20 bis 30 Stunden. Die Schwefelsäure hat den Vorteil vor der Salzsäure, daß sie leicht als  $\text{BaSO}_4$  nach der Hydrolyse wieder entfernt werden kann. HCl wendet man dann an, wenn zur Aufarbeitung des Hydrolysats in die einzelnen Aminosäurefraktionen die *Fischersche* Estermethode benutzt wird. In unserem Falle war es von Nachteil, daß durch die Einwirkung von hochkonzentrierter Schwefelsäure die Hydrolysate infolge ausgeschiedener Huminsubstanzen so dunkelbraun gefärbt sind, so daß sie erst nach einer Entfärbung mit Tierkohle zur optischen Untersuchung verwendet werden konnten. Durch diesen Reinigungsprozeß geht aber ein beträchtlicher Prozentsatz des Eiweißes verloren. Um diese Schwierigkeit nun nach Möglichkeit auszuschalten, bauten wir die Gelatine mit verdünnter Säure im Autoklaven unter Anwendung von erhöhtem Druck ab und kamen auf diese Weise zu Lösungen, die einer wesentlich geringeren Reinigung mit Tierkohle bedurften, um zu klaren hellen, optisch gut zu untersuchenden Lösungen zu gelangen. Über die Wirkung des Abbaus von Proteinen im Autoklaven erfahren wir Näheres von *Ssadicow* (19).

Die Bestimmung des Abbaugrades durch Messung des sogenannten *van Slyke-N* zeigt sehr deutlich, daß bei bestimmter Hydrolysezeit das erreichbare Ausmaß des Abbaus von der Säurekonzentration im Hydrolysenansatz abhängt. Was die Aufhebung des Reaktionsvermögens der Gelatine mit Gerbstoffen durch den Abbau betrifft, so hat man auf dieser Grundlage Methoden zur Wertbestimmung von Leim- und Gelatinelösungen ausgearbeitet (20). *G. Toth* (21) hat den Viskositätsabfall von Leim- und Gelatinelösungen bei partiellem Abbau im Vergleich mit der gerbstoff-fällenden Wirkung der Lösungen untersucht. *Toth* findet, daß erst bei länger dauernder Einwirkung von Säure auf Eiweiß die Gerbstofffällung aufhört, also erst dann, wenn ein großer Teil der Peptidgruppen aufgespalten ist. Unsere Ergebnisse bestätigen diese Angabe. Die Fällungen wurden

ausgeführt, indem 10 ccm einer 1 g Stickstoff im Liter enthaltenden Lösung mit 5 ccm einer 3 g Tannin im Liter enthaltenden Lösung versetzt wurde. Die Fällung oder Prüfung bleibt erst dann aus, wenn etwa 50 % der Peptidgruppen (nach Aussage der *van Slyke*-Stickstoffbestimmung) gespalten sind.

Die Gelatine und die Abbaulösungen wurden mit Kupfersulfat im Verhältnis  $\text{Cu} : \text{N} = 1 : 10, 1 : 50$  und  $1 : 70$  versetzt, mit einigen ccm 2 n NaOH alkalisch gemacht und auf eine Konzentration von 0,15 % Cu gestellt. Diese Lösungen wurden dann in 1 cm dicker Schicht mit dem Stufenphotometer von *Zeiss* auf die Extinktionen bei verschiedenen Reifarben (gefiltertes Licht) untersucht. Aus den Lichtdurchlässigkeiten wurden die Extinktionswerte berechnet. Die kurvenmäßige Darstellung der Extinktionswerte, aufgetragen gegen die Lichtwellenlängen, gibt die für die Farben in jedem einzelnen Falle charakteristischen Lichtabsorptionskurven. Die Ergebnisse der Farbmessungen sind aus der Tabelle V und den Abb. 4 bis 10 zu entnehmen.

Tabelle V.

Nr. der Gelatine in Tabelle IV	Molverhältnis Cu : N	Subjektive Farbe	Lage des Extinktionsmaximums in $\mu$	Höhe des Extinktionsmaximums $\epsilon$
1	1 : 10	blauviolett	570—560	3,50
	1 : 50	violett	560—550	3,58
	1 : 70	violett (röter werdend)	550—540	3,46
2	1 : 10	violett	560—550	3,28
	1 : 50	rotviolett	535—515	3,16
	1 : 70	rot	515—500	3,26
3	1 : 10	violett	560—540	3,12
	1 : 50	rotviolett	525—510	3,65
	1 : 70	rot	510—490	3,50
4	1 : 10	blauviolett	565—550	2,39
	1 : 50	rotviolett	530—520	3,08
	1 : 70	rot	520—505	3,26
5	1 : 10	blau	610—590	1,88
	1 : 50	violett	560—545	2,62
	1 : 70	violett	545—530	2,96
6	1 : 10	blau	620—600	1,76
	1 : 50	blaugrün	620—600	1,82
	1 : 70	grün	620—600	1,98
7	1 : 10	blau	610—600	1,50
	1 : 50	blaugrün	610—600	1,59
	1 : 70	grün	610—600	1,66

Man erkennt, daß der Einfluß des Mengenverhältnisses sich bei den noch biureten Abbaustufen im gleichen Sinne geltend macht: je größer die Eiweißmenge, um so mehr kommt die rote Komponente der Biuretfarbe zum Vorschein, gekennzeichnet durch eine Verschiebung des

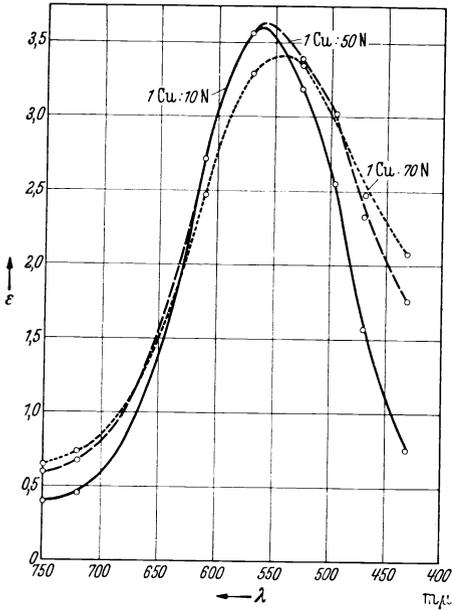


Abb. 4. Extinktionskurven von Kupfersulfat + Gelatine + Alkali. Kupferkonzentration 0,15 %.

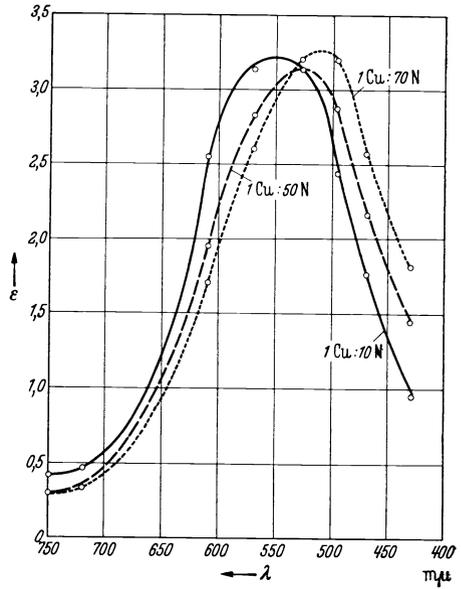


Abb. 5. Wie Abb. 4, Gelatine von Abbaustufe 2.

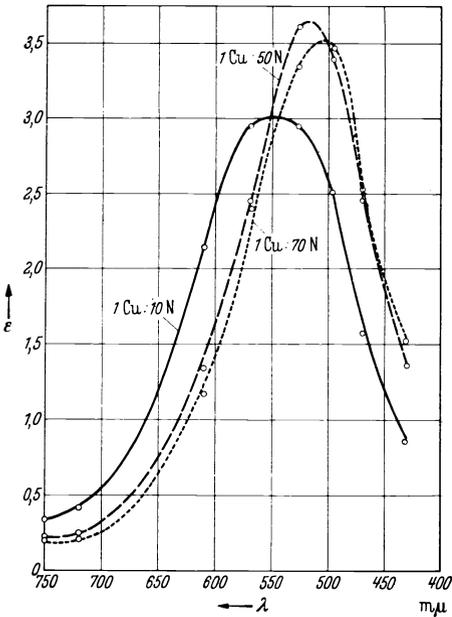


Abb. 6. Wie Abb. 4, Gelatine von Abbaustufe 3.

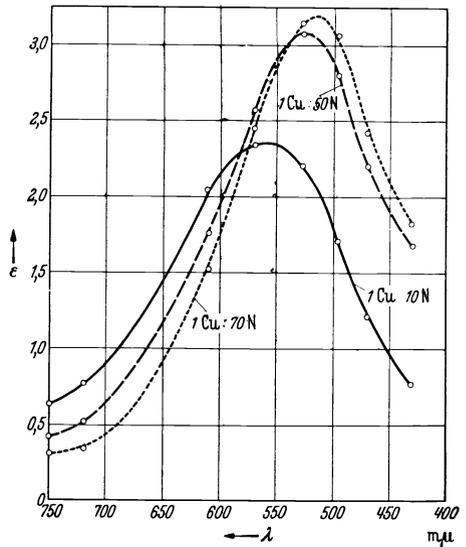


Abb. 7. Wie Abb. 4, Gelatine von Abbaustufe 4.

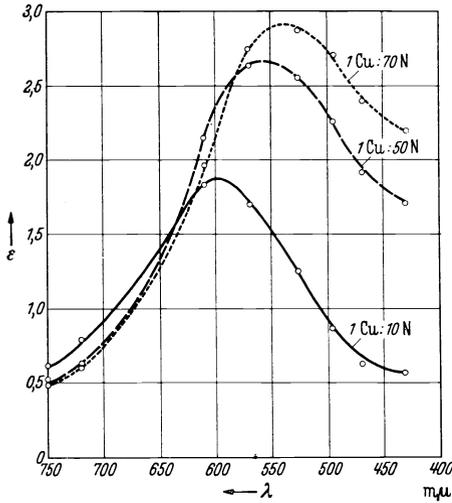


Abb. 8. Wie Abb. 4, Gelatine von Abbaustufe 5.

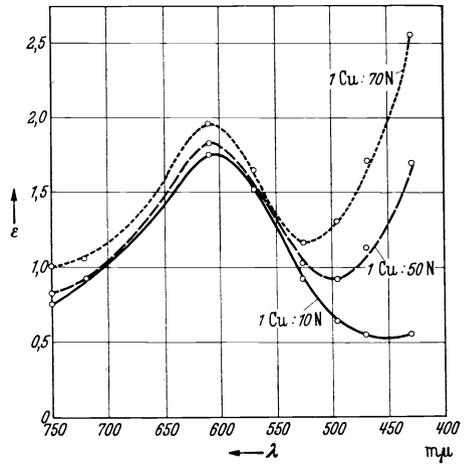


Abb. 9. Wie Abb. 4, Gelatine von Abbaustufe 6.

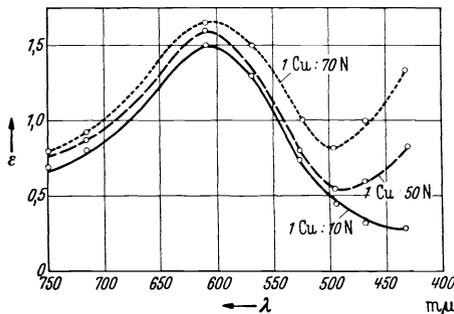


Abb. 10. Wie Abb. 4, Gelatine von Abbaustufe 7.

Extinktionsmaximums ins kurzwellige Gebiet. Vergleicht man aber die einzelnen Abbaustufen miteinander, so bemerkt man, daß das Mengenverhältnis Cu : N auf die Lage der Lichtabsorptionskurven bei mittlerem Abbaugrad einen sehr viel stärkeren Einfluß ausübt als bei der unabgebauten Gelatine bzw. als bei dem Aminosäuregemisch eines vollkommen abgebauten Hydrolysats. Die durch die Änderung des Mengenverhältnisses Cu : N bedingte Farbverschiebung ist besonders bei den Abbaustufen 4 und 5 (Abb. 7 und 8) sehr groß, und zwar ist sie ungefähr ebenso groß wie die Farbverschiebung, die bei konstantem Mengenverhältnis durch Änderung des Abbaugrades herbeigeführt werden kann. Wir müssen diese besonders starke Farbverschiebung bei mittlerem Abbaugrad darauf zurückführen, daß hier nur in beschränktem Maße Peptidkomplexe gebildet werden können, weil ein großer Teil der Peptid-

gruppen aufgespalten ist. Da die Peptidkomplexe stabiler sind als die Aminokomplexe, so bilden sich bei hoher Konzentration des Hydrolysats zunächst nur Peptidkomplexe; bei geringerer Konzentration werden auch Aminogruppen zur Komplexbildung herangezogen. Auf Grund der blauen Farbe überdecken diese die rote Farbe der Peptidkomplexe nahezu vollständig. In extremen Fällen kann man lediglich durch die Verschiebung des Mengenverhältnisses Cu : N zu einer Aufhebung der Biuretfarbe kommen; die Lösung 4 und 5 ist bei größeren Cu-Zusätzen scheinbar abiuret.

Man kann darüber im Zweifel sein, ob der Übergang von biureter zu abiureter Reaktion bei Abbaustufe 4 oder bei Abbaustufe 5 zu suchen ist. Hält man einen rotviolettten Farbton (Absorptionsmaximum bei etwa 500 m $\mu$ ) für das charakteristische Kennzeichen der Biuretreaktion, so liegt der Übergang bei Abbaustufe 4, und zwar zwischen den Ansätzen Cu : N = 1 : 10 und Cu : N = 1 : 50. Der an zweiter Stelle genannte Ansatz wäre als biuretfarben zu bezeichnen, während der andere Ansatz nicht mehr die Biuretfarbe aufweist. Nimmt man jedoch als Grenze der Biuretreaktion den Übergang von violett nach reinem blau an, so wäre das Verschwinden der Biuretfarbe der Abbaustufe 5 zuzuordnen. In diesem Falle wären wieder die Ansätze Cu : N = 1 : 50 und 1 : 70 als biuretfarben zu bezeichnen, während der Ansatz 1 : 10 abiuret genannt werden muß, da er rein blau gefärbt ist.

Erst bei der Abbaustufe 6 erhält man keinerlei rote Farbkomponente in der Kupferkomplexfarbe mehr. Diese Lösung hat also bestimmt als abiuret zu gelten. Doch ist man bei dieser Abbaustufe keineswegs am Ende der Abbaumöglichkeit angelangt, wie die *van Slyke*-Zahlen der Tabelle VIII zeigen. Das Verschwinden der Biuretreaktion kann also nicht als Kriterium für einen vollständigen Abbau gelten, auch dann nicht, wenn man die für die Biuretreaktion günstigsten Bedingungen, d. h. einen großen Eiweißüberschuß gegenüber Kupfer wählt (Abb. 9, 10).

Bemerkenswert ist, daß bei den Abbaustufen 6 und 7 (die übrigens deswegen nicht miteinander direkt verglichen werden können, weil bei Abbaustufe 7 ein größerer Teil des Proteinstickstoffs in Form von Huminstickstoff durch die Tierkohleentfärbung entfernt werden mußte) neben der blauen abiureten Kupferfarbe auch eine grüne Kupferfarbe bzw. Übergänge von blau nach grün auftreten, und zwar dann, wenn man einen großen Stickstoffüberschuß zur Anwendung bringt, also unter denjenigen Bedingungen, bei denen im Falle des unabgebauten bzw. weniger abgebauten Eiweißpräparats die Biuretfarbe am reinsten in Erscheinung tritt. Diese grüne Farbe ist auf eine Komplexbildung des Kupfers mit Prolin zurückzuführen, die also nur bei genügendem Prolinüberschuß deutlich wird.

In den Abb. 11 bis 13 sind die Kurven der ursprünglichen Gelatine und der sechs verschiedenen Abbaustufen für jedes der drei untersuchten Mengenverhältnisse gesondert aufgetragen. Abb. 11 enthält die Ergebnisse der kupferreichen Lösungen (Cu : N = 1 : 10). Der Kupfergehalt dieser Lösungen kommt nahe an den Sättigungswert (s. S. 194 ff.) heran.

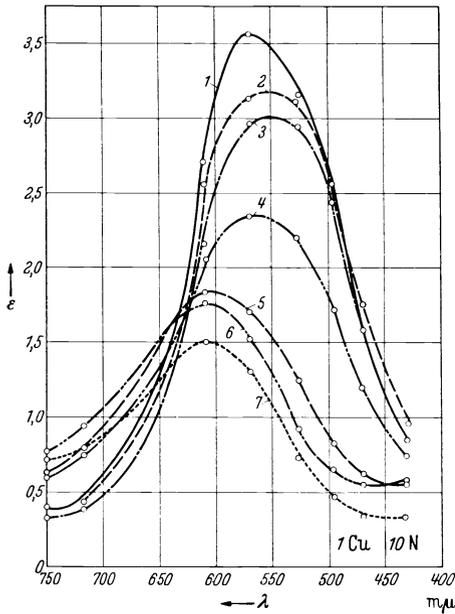


Abb. 11. Extinktionskurven der Gelatine-Kupfersulfat-Alkalislösungen bei verschiedenem Abbaugrad der Gelatine. Kupferkonzentration 0,15%. Die Zahlen bedeuten die Abbaustufen der Gelatine entsprechend Tabelle IV. Verhältnis Cu : N = 1 : 10.

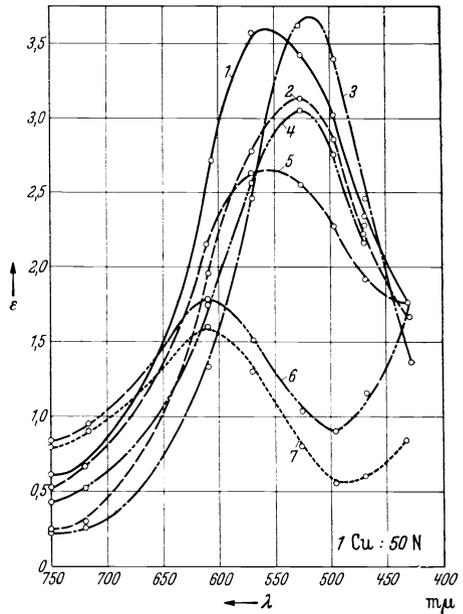


Abb. 12. Wie Abb. 11, Verhältnis Cu : N = 1 : 50.

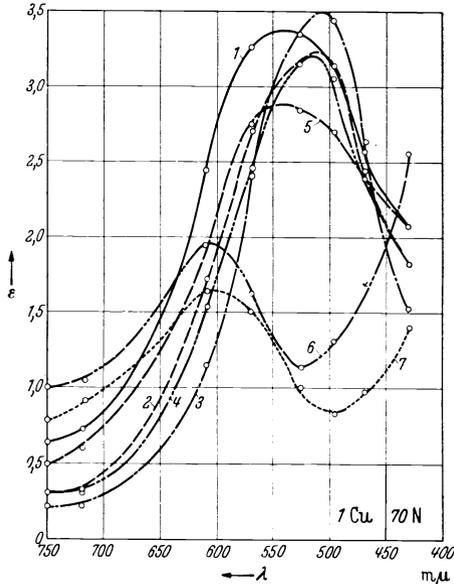


Abb. 13. Wie Abb. 11. Verhältnis Cu : N = 1 : 70.

Man erhält hier einen kontinuierlichen Übergang der Kurven bei den einzelnen Abbaustufen: Mit jeder weiteren Abbaustufe sinkt das Maximum der Extinktion. Die Lage des Extinktionsmaximums jedoch verschiebt sich nicht, wie zu erwarten, von rechts nach links, sondern wandert bei den niederen Abbaustufen zunächst ins mehr kurzwellige Gebiet (rechts) und von Abbaustufe 4 ab wieder ins langwellige Absorptionsgebiet (nach links). Man sieht also, daß ein gewisser anfänglicher Abbau die rote Komponente der Biuretfarbe stärker zum Vorschein kommen läßt, als bei unabgebauten Eiweißkörpern der Fall ist. Dieser Tatbestand ist auch bei den anderen Reihen unter Anwendung größerer Stickstoffmengen bei konstantem Kupfergehalt festzustellen (Abb. 12 und 13), doch tritt hierbei noch eine weitere Komplikation auf, indem die Höhen der Extinktionsmaxima nicht kontinuierlich absinken; vielmehr verringern sich die Maxima nur beim Übergang von der unabgebauten Gelatine zur Desaggregatstufe. Mit Beginn der eigentlichen Hydrolyse setzt dann merkwürdigerweise wieder ein Steigen des Maximums ein, bei weiterem Abbau findet sodann ein Sinken des Maximums zugleich mit einer Verschiebung des Maximums ins langwellige Gebiet statt.

Diese Versuche entscheiden die in der Einleitung erwähnte ungeklärte Fragestellung zugunsten der Behauptung älterer Autoren. Die „Peptone“ haben u. U. eine reinere Biuretfarbe als die weniger weit abgebauten Ausgangsstoffe.

Die einfachste Erklärung hierfür ist, daß im nativen Protein, aber auch in der Gelatine, die Peptidgruppen zum Teil miteinander gittermäßig verankert und für die Reaktion mit Kupfer nicht frei sind. Für die strukturierten Proteine wird die Annahme einer gittermäßigen Bindung zwischen benachbarten Peptidgruppen parallel orientierter Kettenmoleküle nach dem Schema einer Wasserstoffbindung allgemein angenommen; daß auch bei Gelatine noch Reste dieser Gitterstruktur vorliegen, ist bei der großen Behutsamkeit, mit der man bei der Gelatinefabrikation vorzugehen pflegt, durchaus möglich. Die ersten Folgen eines Abbaus, insbesondere die Folgen einer weiteren Desaggregation, sind also nicht allein eine Spaltung von Peptidgruppen und Freilegung von Aminogruppen (die Freilegung von Carboxylgruppen spielt im alkalischen Milieu, in dem die Biuretreaktion ausgeführt wird, für die Gestaltung des Kupferkomplexes keine Rolle), sondern auch eine Zugänglichmachung von weiteren ursprünglich micellar blockierten Peptidgruppen für die Komplexbildung mit Kupfer.

##### **5. Alkalische Kupfer-Proteinlösungen, die mit Kupfer gesättigt sind.**

Der im vorigen Abschnitt näher diskutierte Befund, daß beim beginnenden Abbau zunächst eine Verschiebung des Extinktions-

maximums ins Gebiet kleinerer Wellenlängen erfolgt, ist jedenfalls bei Gelatine und bei Anwendung der Säurehydrolyse als Abbaumethode sehr wenig ausgeprägt. Er allein kann die mit großer Bestimmtheit gemachte Aussage der älteren Autoren, daß „die Biuretfarbe der Proteine violett, die der Peptone rot“ sei, nicht rechtfertigen.

Die Erklärung, die von *Lieben* und *Jesserer* für diese Angaben vorgebracht wird, bezieht sich auf die Farbverschiedenheit der Kupferfarbe, die durch verschiedene Kupfermengen bedingt ist. Danach hätten die älteren Autoren stets bei der Biuretreaktion der Proteine mehr Kupfer in die Lösung gebracht und daher eine mehr blaue Farbe gefunden als bei der Ausführung dieser Reaktion mit Peptonen, wobei die Farbe rot ist. Es ist kaum anzunehmen, daß den älteren Autoren diese Zusammenhänge entgangen sein sollten; bestimmt sind sie bestrebt gewesen, den Vergleich dieser Systeme durch Anwendung gleicher Kupfermengen zu ermöglichen. Nun wäre aber denkbar, daß bei Anwendung von Kupfersalz im Überschuß und Abfiltrieren des nicht-komplexgebundenen Kupfers Verschiedenheiten der Aufnahme auftreten, welche bei einem qualitativen Arbeiten natürlich unbemerkt bleiben können.

Aus dieser Fragestellung heraus soll näher untersucht werden, wieviel Kupfer durch Gelatine und Gelatinehydrolysat gebunden werden kann und wie die Farben dieser Lösungen bei Sättigung mit Kupfer sind. Nach *Lieben* und *Jesserer* ist die Grenze der Kupferaufnahme durch alkalische Proteinlösungen bei allen Proteinen und Proteinabkömmlingen die gleiche: eine 0,5%ige Eiweißlösung kann maximal 0,06% Cu aufnehmen. Die genannten Zahlen erhielten diese Autoren beim Zugeben von Kupfersulfat im Überschuß zu der alkalischen Proteinlösung, wonach der ungelöste Anteil an  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  abfiltriert wurde. Rechnet man das Verhältnis von Eiweiß zu Kupfer auf das Verhältnis Kupfer zu Stickstoff um, so ergibt sich hier unter Zugrundelegung des Stickstoffgehalts der Gelatine ein Verhältnis  $\text{Cu} : \text{N} = 1 : 7$ .

Tatsächlich sind die gekupferten Proteinlösungen u. U. etwas kupferreicher ( $\text{Cu} : \text{N} = 1 : 6$ ), als *Jesserer* und *Lieben* angeben. Diese Autoren haben nicht berücksichtigt, daß beim Abfiltrieren des überschüssig zugegebenen Kupfers in der Form von Kupferhydroxyd ein bestimmter Bruchteil des Proteins der Lösung mit in den Niederschlag gerät. Eine nähere Untersuchung hat gezeigt, daß das überschüssige Hydroxyd in seinem Adsorptionsverhalten gegenüber Eiweiß nicht nur davon abhängig ist, wieviel Adsorbens  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  in der Lösung vorhanden ist, sondern auch davon abhängt, wieviel Alkali sich neben dem Hydroxyd in Lösung befindet. Je alkalischer die Eiweißlösung, um so weniger ausgeprägt ist die Adsorption und umgekehrt.

Man darf daher den Eiweißgehalt der Cu-Proteinlösung nicht gleich demjenigen der ursprünglichen Proteinlösung ansehen, sondern muß ihn

Tabelle VI.

Nr.	Lösung	Adsorbierte N-Menge in %	Molverhältnis Cu : N der an Cu gesättigten Lösungen
1	10 ccm anhydrierte Gelatine + 5 ccm 2 n NaOH + 2 ccm 10 %ige CuSO <sub>4</sub> -Lösung	10,1	1 : 6,15
2	+ 5 ccm 10 %ige CuSO <sub>4</sub> -Lösung	16,6	1 : 6,38
3	+ 10 ccm 10 %ige CuSO <sub>4</sub> -Lösung	25,4	1 : 6,72
4	+ 10 ccm 10 %ige CuSO <sub>4</sub> -Lösung + 10 ccm 2 n NaOH	19,1	1 : 6,30
5	+ 10 ccm 10 %ige CuSO <sub>4</sub> -Lösung + 10 ccm 40 %ige Lösung	17,9	1 : 6,04

in der von überschüssigem Cu(OH)<sub>2</sub> abgetrennten Lösung besonders ermitteln.

Man kann jedoch auch noch auf andere Weise Kupfer-Proteinlösungen erhalten, indem man Eiweiß und Kupfersalz zusammengibt und erst dann Alkali zusetzt. Auf diese Weise können viel kupferreichere Lösungen erhalten werden. Der Grenzwert der Sättigung mit Kupfer liegt in diesem Falle bei 1 Cu : 2,38 N. Wendet man noch größere Kupfermengen bei konstanter Eiweißkonzentration an, so erhält man auch bei dieser Arbeitsweise eine Fällung von Cu(OH)<sub>2</sub>. Diese mit Kupfer gesättigten Gelatinelösungen der zweiten Herstellungsart sind allerdings nicht stabil, sie sind also nicht als gesättigt, sondern besser als übersättigt zu bezeichnen. Bei Zimmertemperatur beginnt nach etwa 12 Stunden von dem Herstellungszeitpunkt an eine langsame Abscheidung von Cu(OH)<sub>2</sub>; bei Erwärmen erfolgt die Abscheidung schon früher. Die Stabilitätsdauer der kupferübersättigten Lösungen hängt aber außer von der Temperatur auch noch von dem Grad der Übersättigung an Kupfer und weiterhin von der Alkalimenge ab, die man dem System Eiweiß-Kupfersalzlösung zugibt. Je größer der Alkaliüberschuß, um so schneller stellt sich die stabile Endform unter Cu(OH)<sub>2</sub>-Abscheidung ein.

Um dieses näher zu zeigen, wurde folgende Versuchsreihe angesetzt: 5 ccm einer 1 %igen Gelatinelösung wurden mit einer eingewogenen und so bemessenen CuSO<sub>4</sub>-Menge versetzt, daß nach Zugabe von 10 ccm 2 n NaOH eben kein Niederschlag eintrat. Die blauviolette Lösung blieb höchstens 1 Minute klar und trübte sich danach. Bei Zugabe verdünnterer Alkalilösungen verlängert sich die Stabilitätsperiode und der Beginn der Abscheidung der Ausflockung verzögert sich entsprechend.

Wenn der instabil vom Protein in Lösung gehaltene Anteil von Cu(OH)<sub>2</sub> abgeschieden ist, dann ist die Proteinlösung in Farbe und

Tabelle VII.

Nr.	Alkalikonzentration	Zeit, nach der eine Trübung auftrat	Zeit, nach der sich ein grobflockiger Niederschlag absetzte
1	1 ccm 2n NaOH + 9 ccm H <sub>2</sub> O	etwa 30 Minuten	4 Stunden
2	2 „ 2n „ + 8 „ „	„ 15 „	2 „
3	3 „ 2n „ + 7 „ „	„ 10 „	
4	4 „ 2n „ + 6 „ „	die Trübung war um so stärker, je größer die Alkalikonzentration	
5	5 „ 2n „ + 5 „ „		
6	6 „ 2n „ + 4 „ „	etwa 1 Minute	1 „
7	7 „ 2n „ + 3 „ „		
8	8 „ 2n „ + 2 „ „		
9	9 „ 2n „ + 1 „ „		
10	10 „ 2n „ + 0 „ „		

Cu-Gehalt gleich der Cu-Proteinlösung, die vor der Kupferzugabe Alkali enthielt.

Tabelle VIII.

Nr.	Cu-Gelatinelösung	Subjektive Farbe	Molverhältnis Cu : N	Lage des Extinktionsmaximums in m $\mu$
1	Alkali nachträglich zugegeben	blauviolett	1 : 2,38	580—560
2	Lösung nach Abscheidung der labil gebundenen Cu-Menge	blauviolett	1 : 6,2	560—540
3	Alkalizugabe vor der Cu-Zugabe	blauviolett	1 : 6,0	560—540

Wie die Lichtabsorptionskurven (Abb. 14) zeigen, ist die Lösung, welche zum Teil Kupfer in instabiler Form enthält, mehr blau und weniger intensiv gefärbt als die Lösung mit ausschließlich stabil gebundenem Kupfer. Das Maximum der Kurve liegt im ersten Falle bei 570 m $\mu$ . und zeigt eine halb so große Extinktion als das Maximum im zweiten Falle, in welchem es bei 550 m $\mu$ . zu liegen kommt. Die beiden Kurven sind von Lösungen gleichen Kupfergehalts (und dementsprechend ungleichen Eiweißgehalts) aufgenommen (0,05 %ige Lösung in bezug auf Cu). Da die Intensität der

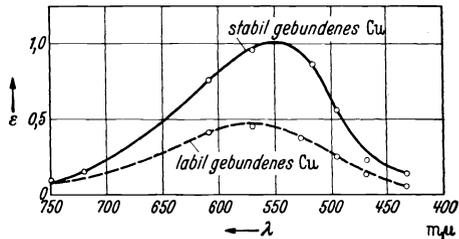


Abb. 14. Vergleich der Extinktionskurven von Gelatine — Kupfersulfat — Alkalilösungen bei Kupfersättigung (stabil gebundenes Kupfer) und Kupferübersättigung (labil gebundenes Kupfer) Kupferkonzentration in beiden Fällen 0,05%.

Kupferfarbe nur dann groß ist, wenn Cu sich in komplexer Bindung befindet, so geht aus der geringen Extinktion der zweiten Kurve hervor, daß ein Teil des Kupfers nicht komplexgebunden sein kann. Dieser Anteil ist offenbar identisch mit dem labil gebundenen Anteil, der nur

durch das Eiweiß infolge einer Art Schutzkolloidwirkung für einige Zeit suspendiert wird und an der Koagulation zu sedimentierbaren Flocken gehindert wird.

Nimmt man unter diesen Herstellungsbedingungen der Kupferproteinlösung die Farbkurven der blauen und roten Komponenten der Biuretfarbe durch Bestimmen der Extinktionen von Gelatinelösungen gleichen N-Gehalts aber steigender Cu-Menge mit den Filtern F 72 (rot) und F 47 (blau) auf, in der Weise wie *Jesserer* und *Lieben* vorgegangen sind, so erhält man für

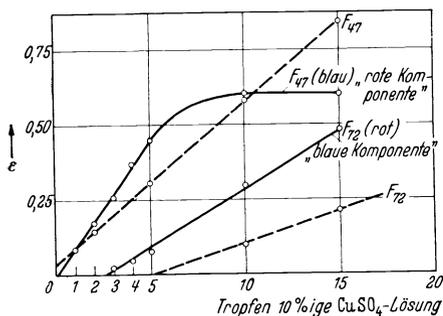


Abb. 15. 1%ige Gelatinelösung mit 5%iger Kupfersulfatlösung tropfenweise versetzt und dann alkalisch gemacht. Extinktionen bei Vorschalten der Filter 47 (blau) und Filter 72 (rot). Die gestrichelten Kurven sind der Arbeit von *Lieben* und *Jesserer* entnommen und beziehen sich auf Caseinlösungen.

die rote Komponente von einer bestimmten Zugabe von  $\text{CuSO}_4$  an einen konstanten Wert (Abb. 15), während *Jesserer* und *Lieben* stets eine geradlinige Zunahme der Farbkurven der beiden Komponenten beobachtete. So anschaulich auch die Aufteilung der Komplexfarbe in zwei extrem gefärbte Teilkomponenten zu sein scheint, so ist diese Vereinfachung doch in verschiedener Hinsicht irreführend. Verfolgt man nämlich die Änderung der Extinktion bei F 72 bzw. F 47 an Lösungen gleichen Kupfergehalts (vgl. Abb. 4), so sieht man, daß eine Verschiebung des Verhältnisses  $\text{Cu} : \text{N}$  im Sinne eines stärkeren Überwiegens von Cu gegenüber Eiweiß ein Sinken der Farbstärke der roten Komponente (und nicht wie bei *Jesserer* und *Lieben* ein Steigen) bedingt. Man muß bei dem Vergleich derartiger Lösungen also die Kupferkonzentration konstant halten, da ja die Farbstärke und der Absorptionsverlauf der Kupferfarbe hier zum Vergleich herangezogen wird.

## 6. Einfluß des Abbaus der Proteine auf die Sättigung mit Kupfer.

Gelatine wurde durch Kochen der neutralen Lösung desaggregiert, bzw. mit  $n/10 \text{ H}_2\text{SO}_4$  schwach hydrolysiert und auf die Grenzzahl der aufnehmbaren Kupfermenge untersucht. Zu diesem Zweck wurde die

Tabelle IX. Zugabe von Kupfersulfat zu alkalischen 1%igen Gelatinelösungen verschiedenen Abbaugrades (gesättigte Cu-Lösung).

Nr.	Vorbehandlung	Subjektive Farbe	Molverhältnis Cu : N	Lage des Extinktionsmaximums in $m\mu$
1	—	blauviolett	1 : 5,8	560—550
2	24 Std. desaggregiert	violett	1 : 6,3	555—545
3	24 Std. hydrolysiert mit $n/10 \text{ H}_2\text{SO}_4$ unter Rückfluß	blau, etwas zu violett hinneigend	1 : 5,77	590—580
4	3 mal 24 Std. hydrolysiert	blau	1 : 5,62	615—605

Tabelle X. Zugabe von Alkali zu neutraler Kupfersulfat-Gelatine-Lösung (übersättigte Cu-Lösung).

Nr.	Vorbehandlung	Subjektive Farbe	Molverhältnis Cu : N bei maximaler Kupferzugabe	Lage des Extinktionsmaximums in $m\mu$
1	—	blauviolett	1 : 2,3	580—560
2	24 Std. desaggregiert	blauviolett	1 : 3,6	575—565
3	24 Std. hydrolysiert	blau, etwas zu violett hinneigend	1 : 5,38	590—580
4	3 mal 24 Std. hydrolysiert	blau	1 : 5,68	610—600

Biuretprobe einmal unter Anwendung von Kupferüberschuß und Abfiltrieren des nichtkomplexgebundenen Kupferhydroxyds hergestellt (Tabelle IX) und ein zweites Mal unter Zugabe bestimmter Kupfersalzmengen zu neutraler Lösung und darauffolgendem Alkalizusatz (Tabelle X).

Es zeigt sich hierbei, daß durch den Abbau der Gelatine die Möglichkeit der Übersättigung mit Kupfer aufgehoben wird.

Zur Aufhebung der Bindung von unstabilem Kupfer ist allerdings eine Desaggregation noch nicht ausreichend. Wir können daraus schließen, daß die Übersättigung nicht lediglich auf einer Suspendierung von kolloidverteiltem Kupferhydroxyd in den Molekularzwischenräumen der Gelatinemicellen beruht. Nicht so sehr der micellare Aufbau der Gelatineteilchen als vielmehr die Molekülgröße und Form als solche (Kettenmoleküle) muß als die Hauptbedingung für das Zustandekommen der Übersättigung angesehen werden. Hiermit steht auch in Übereinstimmung, daß sich Eialbumin mit Kupfer übersättigen läßt; bei diesem Eiweißkörper ist eine micellare Struktur der in Lösung befindlichen Teilchen nach dem bisherigen Stand unserer Kenntnisse nicht anzunehmen.

Die Lösungen 1 und 2 der Tabelle X sind, wie das Verhältnis Kupfer zu Stickstoff anzeigt, übersättigt und daher unstabil. Die Lösung 2 als die weniger stark übersättigte zeigt dementsprechend eine längere Stabilitätsperiode als die Lösung 1. Von Lösung 3 ab, die eine längere Säurehydrolyse erhalten hat, sind die Kupfergehalte der Lösungen gleich denjenigen, die auf die andere Weise hergestellt sind.

Diese Versuche zeigen, daß nur bei unabgebauten bzw. wenig abgebauten Eiweißkörpern eine Übersättigung mit Kupfer möglich ist, nicht aber bei höheren Abbaustufen („Peptone“). Da die mit Kupfer übersättigte Eiweißlösung ein sehr blaustichiges Violett aufweist, so ergibt sich die Möglichkeit, mit unabgebauten Eiweißkörpern viel blaustichigere Kupferfarben zu erhalten als bei abgebauten, wenn man bei Anstellen der Biuretreaktion Alkali zuletzt zugibt.

Die vorstehend mitgeteilten Versuche wurden an Gelatine ausgeführt. Es erhebt sich die Frage, ob die gefundenen Gesetzmäßigkeiten auch auf andere Eiweißkörper übertragbar sind.

## 7. Die Farben von Kupferproteinlösungen bei verschiedenen Eiweißkörpern.

*Lieben* und *Jesserer* kamen zu dem Ergebnis, daß alle Eiweißkörper und Abkömmlinge derselben, wie Peptone, desamidierte Proteine usw., gleiche Farbstärke und eine gleiche Sättigung an Kupfer (bei Zugabe der Kupferlösung zu alkalischer Proteinlösung und Abtrennen des überschüssigen Kupferhydroxyds) aufweisen. Bei genauerer Untersuchung findet man jedoch Verschiedenheiten zwischen den Biuret-farben der einzelnen Proteine.

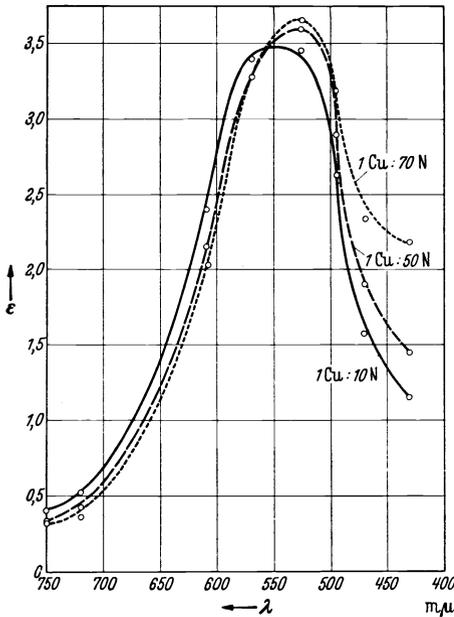


Abb. 16. Extinktionskurven von Kupfersulfat—Eialbumin—Alkallösungen.  
Versuchsanordnung wie bei Abb. 4.

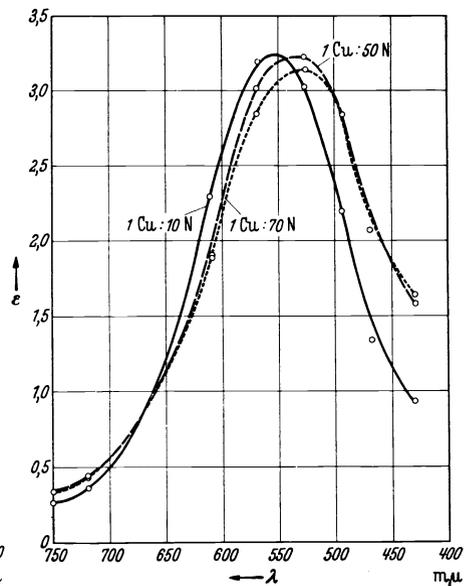


Abb. 17. Extinktionskurven von Kupfersulfat—Casein—Alkallösungen.  
Versuchsanordnung wie bei Abb. 4.

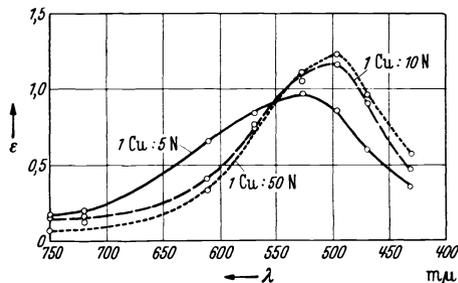


Abb. 18. Extinktionskurven von Kupfersulfat—Biuret—Alkallösungen.  
Versuchsanordnung wie bei Abb. 4.

Vergleicht man die Lichtabsorptionskurven der Systeme Kupfer-Eialbumin, Kupfer-Gelatine und Kupfer-Casein, so sinkt die Höhe der Extinktion im Maximum bei den drei Eiweißkörpern in der genannten Reihenfolge etwas; auch sind die Maxima bei Eialbumin und Casein bei etwas kürzeren Lichtwellenlängen gelegen als bei Gelatine (Abb. 16, 17 u. vgl. dazu Abb. 4). Zum Vergleich geben wir die Ergebnisse einer analogen Untersuchung mit Biuret wieder (Tab. XI, Abb. 18).

Tabelle XI. 0,15 % Cu.

Reaktionspartner des Cu	Nr.	Molverhältnis Cu : N	Subjektive Farbe	Lage des Extinktionsmaximums in $\mu$	Höhe des Maximums des Extinktionskoeffizienten
Casein	1	1 : 10	blauviolett	560—550	3,26
	2	1 : 50	violett	540—530	3,30
	3	1 : 70	rotviolett	530—520	3,18
Eialbumin	1	1 : 10	violett	555—545	3,58
	2	1 : 50	rotviolett	540—530	3,58
	3	1 : 70	rotviolett	530—520	3,66
Biuret	1	1 : 5	rotviolett	535—515	1,00
	2	1 : 10	rot	510—490	1,18
	3	1 : 50	rot	510—490	1,21

Was die Sättigung an Kupfer betrifft, so zeigt sich, daß die alkalische Casein- und Eialbuminlösung mit Kupfersalzlösung versetzt, nicht den gleichen Sättigungsgrad aufweisen wie eine alkalische Gelatinelösung.

Tabelle XII.

Eiweißkörper	Verhältnis Cu : N bei Sättigung
Gelatine .....	1 : 6,0
Casein .....	1 : 6,9
Eialbumin .....	1 : 4,1

Bei Casein, das mit Alkali gelöst werden kann, läßt sich ein Übersättigungsversuch in der Art, wie er bei Gelatine durchgeführt wurde (Versetzen der neutralen Lösung mit neutralem Cu-Salz und dann Alkalizugabe), nicht anstellen. Bei Eialbuminlösungen führt er zu sehr kupferreichen Lösungen ( $\text{Cu} : \text{N} = 1 : 1,25$ ), die jedoch nicht, wie bei Gelatine, nach kürzerer oder längerer Zeit  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  abscheiden, sondern die gesamte Kupfermenge in stabiler Lösungsform enthalten. Die Unterscheidung zwischen stabil und labil gebundenem Kupfer ist also in diesem Falle nicht möglich. Gibt man noch größere Kupfersalzlösungen zu der Eierklarlösung, so erscheint das überschüssig in der Lösung enthaltene  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  als fein verteilte und filtrierbare Trübung. Gibt man schließlich so viel Kupfersalz zu, daß  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  in abfiltrier-

barer Form ausfällt, so hält dieser Niederschlag beim Filtrieren seinerseits den größten Teil des Proteins so festgebunden, daß das Filtrat sehr stark an Eiweiß verarmt ist.

Man sieht also, daß bei der Reaktion der Eiweißkörper mit Kupfersalzen in alkalischer Lösung qualitativ und quantitativ Verschiedenheiten der einzelnen Proteine auftreten, die sich im einzelnen nicht erklären lassen, da unsere Kenntnisse über die Unterschiede der genannten Proteine in bezug auf Aminosäurezusammensetzung, Bau der Makromoleküle und Bildung übermolekularer Assoziationsformen (Micellen) noch zu ungenügend sind.

Vergleicht man jedoch das Verhalten dieser verschiedenen Proteine gegenüber Kupfer und Alkali mit dem Verhalten des Biurets, so erkennt man, daß die Proteine gegenüber dem sehr abweichenden Biuret doch eine recht gute Übereinstimmung aufweisen. Das zeigen am besten die Lichtabsorptionskurven der Cu-Biuretlösungen, die bei gleichem Kupfergehalt eine nur halb so große Extinktion im Absorptionsmaximum aufweisen als die Kurven der Proteine (Abb. 18). Auch liegen die Maxima im Gebiet kleinerer Lichtwellenlängen. Die Farbe der gekupferten Proteinlösung als Biuretfarbe zu bezeichnen, erscheint auf Grund dieser quantitativen Messung nicht sehr angebracht; allerdings wird man an dem einmal eingeführten Sprachgebrauch nichts mehr ändern können.

### 8. Gelb gefärbte Kupfer-Gelatinelösungen.

Eine weitere Besonderheit der Gelatine gegenüber Casein und Eialbumin zeigt sich, wenn man zu den mit Kupfersulfat versetzten Gelatinelösungen nur Alkali bis zu einem  $p_H$ -Wert von 8,5 bis 10 zugibt, das überschüssige  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  abfiltriert und dann erhitzt. Man erhält

Tabelle XIII.

Nr.	Lösung	$p_H$ -Wert	Verhältnis Cu : N	Farbe	Veränderung beim Kochen
1	10 ccm 1%ige Gelatinelösung + einige Tropfen 2n NaOH	8,5	1 : 9,1	hellviolett	gelb
2	+ einige Tropfen 2n NaOH	10	1 : 7,65	blauviolett	gelb, Ausscheidung von kolloidal gelöstem CuO
3	+ 2 ccm 2n NaOH	stark alkalisch	1 : 6,9	„	rot, unter Ausscheidung von CuO
4	+ 2 ccm 40%ige NaOH	dasselbe	1 : 6,1	„	dasselbe
5	+ 5 ccm 40%ige NaOH	„	1 : 6,2	„	„

dabei nämlich eine rotgelbe (in verdünnter Lösung gelbe) Komplexfarbe der Kupfer-Gelatinelösung, während vor dem Kochen die Lösung eine violette Farbe hatte. Gibt man aber zu der hellvioletten noch nicht gekochten Lösung noch mehr Alkali zu, so bleibt dann beim Kochen die normale Biuretfarbe bestehen.

Gibt man Alkali zu, nachdem die Lösung vorher unter dem Einfluß der Erhitzung die gelbe Farbe angenommen hat, so bleibt die gelbe Komplexfarbe bestehen, wird aber beim erneuten Erhitzen stärker nach rot verschoben. Der Kupfergehalt der auf oben beschriebene Weise hergestellten Kupfer-Gelatinelösung ist durch das Verhältnis  $\text{Cu} : \text{N} = 1 : 9,1$  gekennzeichnet, d. h. die Lösung ist kupferärmer als bei Anwendung eines Alkaliüberschusses. Man kann jedoch derartige gelbe Lösungen auch mit dem gewöhnlichen Sättigungswert der Gelatinelösung an Kupfer herstellen ( $\text{Cu} : \text{N} = 1 : 6,0$ ). Man geht zu diesem Zwecke von einer normalen Gelatine-Kupfer-Alkalilösung aus, die mit Kupfersulfatüberschuß und Alkaliüberschuß hergestellt wurde und stumpft sie auf  $p_{\text{H}} = 8,5$  bis 9 ab. Sie hat dann eine mehr blaue Farbe, die beim Kochen sehr schnell (schneller als beim Kochen der direkt hergestellten Lösungen von  $p_{\text{H}} = 8,5$  bis 9) gelb wird. Die gelben Lösungen sind in beiden Fällen schwach getrübt, was auf eine Ausscheidung von  $\text{CuO}$  zurückzuführen ist. Casein und Eialbumin eignen sich nicht, um die gelben Kupferkomplexlösungen herzustellen. Die Lösungen dieser Proteine zeigen unter den angegebenen Bedingungen keine wesentliche Farbverschiebung.

Andererseits findet man beim Erhitzen kupferreicher Casein- bzw. Eialbuminlösungen eine Abscheidung von rotem Kupferoxydul, die auf Reduktion des komplexgebundenen Kupfers durch die Zuckerbestandteile in diesen Proteinen bedingt ist. Beim Casein wird außerdem noch komplex-gebundenes Kupfer beim Erhitzen als  $\text{CuO}$  abgeschieden.

### Zusammenfassung.

1. Es werden vergleichend die Farben von alkalischen Kupferproteinlösungen untersucht; die bei Änderung des Verhältnisses  $\text{Cu} : \text{N}$  und bei fortschreitendem Abbau auftretenden Farbverschiebungen werden auf die Bildung verschiedener Typen von Kupferkomplexverbindungen zurückgeführt.

2. Für das Auftreten der Biuretfarbe (rot) ist das Vorliegen zweier benachbarter Peptidgruppen erforderlich. Daneben können freie Aminogruppen von Proteinen oder Proteinabbauprodukten bis herunter zu Aminosäuren Kupfer in Form von Aminokomplexen stabilisieren. Es entstehen hierbei blaue Kupferlösungen. Unter den Bedingungen der Biuretreaktion können beide Komplextypen gleichzeitig auftreten, wobei entsprechende Mischfarben entstehen.

3. Das in alkalischer Lösung durch die genannten Gruppen stabilisierte Cupriion ist nur bei genügendem Konzentrationsüberschuß der genannten Komplexbildner an diesen Gruppen abgesättigt. Es kann aber auch als basischer Komplex vollkommen oder für eine bestimmte Zeit stabilisiert erscheinen. Auch der Sättigungsgrad der Kupferpeptidkomplexe ist von Einfluß auf die Biuretfarbe.

4. Der Maximalwert einer durch eine bestimmte Proteinmenge stabilisierbaren Menge von Cupriionen ist von der Zusammengabe der Komponenten abhängig.

### Literatur.

- 1) *Brücke*, Monatshefte f. Chem. **4**, 203, 1883. — 2) *Kühne*, Zeitschr. f. Biol. **29**, 308, 1892. — 3) *F. Lieben* u. *H. Jesserer*, diese Zeitschr. **285**, 36, 1936; **287**, 71, 84, 1936; **292**, 403, 419, 1937. — 4) *H. Schiff*, Ann. **299**, 236, 1898; **319**, 300, 1901; **352**, 73, 1907. — 5) *Tomita*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **201**, 38, 1931. — 6) *L. Tschugaeff*, Ber. **46**, 1973, 1913. — 7) *Schlesinger*, Zeitschr. f. anorg. u. allgem. Chem. **151**, 71, 1900. — 8) *E. Fischer*, Ber. **35**, 1095, 1902. — 9) *Edlbacher*, Praktikum der physiologischen Chemie. Berlin u. Leipzig 1932. — 10) *M. Freund*, Ber. **17**, 134, 1884. — 11) *H. C. Calvery* in C. L. A. Schmidt: The Chemistry of the Amino Acids and Proteins, 1938. — 12) *P. Pfeiffer*, Komplexverbindungen in K. Freudenberg: Stereochemie 1932. — 13) *L. Tschugaeff*, Ber. **40**, 1975, 1907. — 14) *H. Ley*, ebenda **46**, 4040, 1913. — 15) *Borsook* u. *Thimann*, J. of biol. Chem. **48**, 671, 1932. — 16) *A. Küntzel* u. *H. Koepff*, Collegium **1938**, S. 433. — 17) *E. Cherbuliez*, *J. Jeannerat* u. *K. H. Meyer*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **255**, 241, 1938. — 18) *Gerngroß*, Ber. **63**, 1603, 1930. — 19) *Ssadikow*, diese Zeitschr. **136**, 237, 241, 1923; **137**, 397, 401, 1923; **138**, 156, 1923; **205**, 360, 1929. — 20) *Ganther*, Zeitschr. f. analyt. Chem. **32**, 413, 1893; *Müller*, Angew. Chem. **15**, 482, 1237, 1902. — 21) *G. Toth*, Collegium **1939**, S. 439.
-

Die vorliegende Untersuchung schließt an unsere Arbeit über die bei der Biurettreaktion auftretenden farbigen Kupferkomplexe mit Eiweißkörpern an (1). Wir konnten dort zeigen, daß die Verschiedenheit der Farbtönungen bei der Biurettreaktion auf die Anwesenheit zweier Gruppen in den Eiweißkörpern zurückzuführen ist: die charakteristische rote Biurettfarbe wird durch das Zusammenwirken zweier Peptidgruppen mit einem Kupferatom bei alkalischer Reaktion hervorgerufen; daneben können freie Aminogruppen Kupfer in Form von (blauen) Amino-komplexen stabilisieren. Die Änderungen der Farbnuancen bei der Biurettreaktion in Abhängigkeit von dem Verhältnis Cu zu komplexbildendem Stickstoff bzw. vom Abbaugrad des angewandten Eiweißkörpers sind im wesentlichen durch das gleichzeitige Auftreten beider Komplextypen bedingt.

Wir stellten uns die Frage, ob und wie weit analoge Verhältnisse bei der Reaktion zwischen Chromsalzen und Eiweißkörpern vorliegen. Diese Frage war durch zwei sich widersprechende Meinungen aufgeworfen worden: *K. H. Gustavson* (2) glaubte auf Grund verschiedener Beobachtungen der Peptidgruppe bei der Chromgerbung eine Rolle als Bindeguppe des Eiweißkörpers für das gerbende Chromsalz zusprechen zu sollen; andererseits fanden *Jesserer* und *Lieben* (3), daß Casein mit Chromsalzen unter den Bedingungen der Biurettreaktion keine Verbindung eingeht. Nun wird zwar die Chromgerbung nicht unter den Bedingungen der Biurettreaktion vorgenommen, doch sollte eine Mitwirkung der Peptidgruppe bei der Chromgerbung einen positiven Ausfall einer Chrom-Biurettreaktion bedingen. Insofern stehen die beiden angeführten Meinungen im Widerspruch.

1. Wir untersuchten zuerst die Möglichkeit einer Biuretreaktion unter Verwendung von Chrom als farbbildendem Komplexmetall.

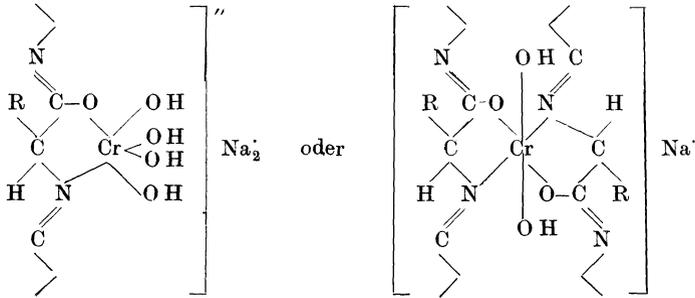
Wenn man zu einer alkalischen Eiweißlösung Kupferhydroxyd zugibt, so löst sich  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  nach einiger Zeit, wobei die charakteristische Biuretfarbe entsteht. Gibt man hingegen Chromhydroxyd zu einer alkalischen Eiweißlösung, so erfolgt keine Auflösung der Hydroxydfällung; ein wieder-in-Lösung-Bringen von Chromhydroxyd durch Anbieten eines Komplexbildners ist weder bei Glykokoll noch mit anderen komplexaktiven Körpern möglich. Desgleichen scheidet die bei Kupfer so bequem anzuwendende Methode aus, die in einer Zugabe von Kupfersalz zur Eiweißlösung und nachträglichem Zufügen von Alkali besteht, da hierbei entweder Chromhydroxyd ausfällt und nicht mehr in Lösung geht oder bei genügend großem Eiweißüberschuß mit diesem eine alkali-stabile Verbindung eingeht, welche nicht der Biuretverbindung entspricht, sondern dem anderen Verbindungstyp angehört (vgl. Abschnitt 3). Die einzige Möglichkeit, eine biuretähnliche Komplexverbindung des Chroms mit Eiweiß zu erhalten, besteht darin, daß man von vornherein eine sehr stark alkalische Chromitlösung anwendet. Man erhält jedoch in diesem Falle nur dann eine durch Farbänderung erkennbare Komplexverbindung, wenn man unabgebaute oder schwach abgebaute Gelatine verwendet; mit Glykokoll oder einem vollkommen abgebauten Eiweißhydrolysat erfolgt hingegen keine Komplexbildung.

Die Farbe des Chrompeptidkomplexes ist violett und sehr leicht von der grünen Chromitfarbe der Ausgangslösung zu unterscheiden. Dieser Komplex ist nur in Gegenwart von soviel Alkali, als zur Lösung des Chromhydroxyds zu Chromit erforderlich ist, beständig. *Jesserer* und *Lieben* dialysierten 11 Tage lang eine Lösung von Chromit plus Casein gegen 3%ige Natronlauge, wobei sich alles Chrom als grünes Chromhydroxyd abschied. Sie kamen deshalb zu der Schlußfolgerung, daß Chrom mit alkalischen Eiweißlösungen keine Verbindung eingeht. Diese Angabe ist also zu korrigieren.

Auch mit Biuret erhält man eine Chromkomplexbildung in stark alkalischer Lösung, wobei eine Verschiebung der hellgrünen Chromitfarbe nach Blaugrün eintritt. Voraussetzung für die Chromit-Biuretreaktion mit Biuret ist die Verwendung einer hochkonzentrierten Biuretlösung von genügendem Alkaligehalt.

Abgesehen von der Farbänderung äußert sich die Komplexaktivität des Biurets und der Peptide in einer Stabilisierung der alkalischen Chrom-Eiweißlösung gegenüber Erhitzen; eine unstabilisierte Chromitlösung oder eine mit abiuretem Eiweißhydrolysat versetzte Chromitlösung scheidet beim Erhitzen Chromhydroxyd aus.

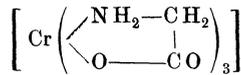
Der Chrompeptidkomplex wäre in Analogie zu dem Kupferpeptidkomplex folgendermaßen zu formulieren:



Mit Chrom bilden sich in stark alkalischem Gebiet demnach nur Peptidkomplexe, während Komplexe, in denen die Aminogruppen der Proteine oder Aminosäuren als Liganden vorliegen, bei der Alkalität der Biuretprobe offenbar nicht existenzfähig sind. Die Problematik des Farbwechsels, der für die Cu-Biuretreaktion so charakteristisch und zugleich schwer zu durchschauen ist, tritt also bei Chrom nicht auf.

2. Eine Biuretreaktion mit Chromsalzen ist, wie gezeigt wurde, möglich, aber wegen der Unstabilität der entstehenden Komplexverbindung mit Peptidgruppen beim Verdünnen nicht als Grundlage für eine Beurteilung des Abbaugrades von Eiweißhydrolysaten empfehlenswert. Aus dem gleichen Grund ist die Annahme von *Gustavson*, daß unter den  $p_{\text{H}}$ -Bedingungen der Chromgerbung eine Beteiligung der Peptidgruppen an der Chrombindung zustandekommt, abzulehnen.

Hingegen weist der andere Typus der Metallkomplexverbindung mit Eiweiß bei Chrom eine um so größere Stabilität auf. Dieser andere Typus leitet sich von dem bekannten Kupferglykokollsalz von *Ley*



ab (4).

Es soll nun gezeigt werden, daß diese Art der Komplexsalzbildung im Falle des Chroms insofern zu einer Beurteilung des Abbaugrades von Eiweiß herangezogen werden kann, als mit zunehmendem Abbaugrad in Eiweißkörpern die Zahl der freien Amino- und Carboxylgruppen zunimmt und infolgedessen die Möglichkeit zur Ausbildung von Komplexverbindungen des Glykokollsalztypus ansteigt. Damit ändert sich auch die Farbe der Eiweißchromsalzlösung.

Zu unseren Versuchen verwendeten wir eine ähnliche Abbaureihe der Gelatine, wie bei den Messungen der Biuretfarben mit Kupfer, d. h. teils bei neutraler Reaktion im Autoklaven desaggregierte Gelatine, teils mit  $n/2$  Schwefelsäure durch Sieden bzw. Autoklavenerhitzung auf  $180^\circ$  hydro-

lysierte Gelatine. Die von Säure befreiten Lösungen wurden mit Chromnitrat im Verhältnis Cr:N = 1:10 versetzt und in einer Konzentration von 0,3% Cr im Stufenphotometer auf Lichtabsorption bei verschiedenen Spektralbereichen untersucht.

Die Ergebnisse zeigt Abb. 1. Die Zahlen der Kurven beziehen sich auf die Gelatinelösungen der Tabelle IV einer früheren Mitteilung (1). Die Aufeinanderfolge der Kurven zeigt eine viel größere Regelmäßigkeit als im Falle der Biuretreaktion mit Kupfersalz, vgl. Abb. 11 bis 13 der erwähnten Veröffentlichung (1). Sie spricht dafür, daß immer nur ein Typus von aktiven Gruppen bei der Reaktion mit Chrom beteiligt ist, und zwar handelt es sich um die Carboxyl- und Aminogruppen, die auch bei der Reaktion von Glykokoll mit Chromsalzen in Funktion treten. Die Farbe des Reaktionsproduktes von Chrom mit Glykokoll ist nahezu übereinstimmend mit derjenigen des Gemisches Gelatine-Chrom, sofern man für ein gleiches Verhältnis von Chrom zu reagierenden Gruppen Sorge trägt.

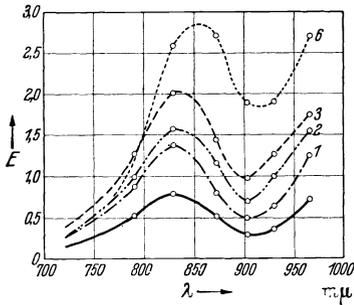


Abb. 1.

Bei hohem Abbaugrad und genügender Eiweißkonzentration hat die Chromlösung — nachdem die Komplexbildung durch kurzes Erhitzen herbeigeführt worden ist — eine prachtvolle tiefdunkelrote Farbe.

Diese Messungen zeigen, daß mit Chrom eine Farbreaktion der Eiweißkörper möglich ist, welche nicht nur qualitativ, sondern sogar quantitativ vom Abbau des Eiweißkörpers abhängig ist. Allerdings leistet diese Methode nicht mehr als eine chemische Abbaugradbestimmung, z. B. mit Hilfe der *van Slyke*-Methode.

Ein wichtigeres Ergebnis dieser Untersuchung ist jedoch das folgende: diejenigen Gruppen, welche in der unabgebauten Gelatine Träger der Reaktion mit Chrom sind, müssen die gleichen sein, wie die Gruppen, die beim Abbau der Gelatine freigelegt werden, da im Gegensatz zu den Farbmessungen des Systems Kupfer-Eiweiß-Alkali der Typus der Kurve bei fortschreitendem Abbau ungeändert bleibt. Damit ist die Annahme von *Gustavson*, daß die Peptidgruppen an der Chromgerbung Anteil nehmen, ebenfalls widerlegt.

3. Gegen die Beweisführung einer Nichtbeteiligung der Peptidgruppe an der Chromeiweißbindung bei der Chromgerbung kann der Einwand gemacht werden, daß vielleicht in bestimmten  $p_H$ -Bereichen eine Aktivierung und komplexe Bindung beider Gruppen, der Peptidgruppe und des im Glykokollchromsalz verankerten Paares polarer

Gruppen vorliegt. Dieser  $p_H$ -Bereich könnte nur ein alkalischer sein, da, wie gezeigt wurde, die Peptidgruppe nur in stark alkalischer Lösung zu einer Komplexsalzbildung mit dem Chrom aktiviert werden kann.

Hier zeigt wieder der Vergleich der Farben der Systeme Eiweiß-Kupfer und Eiweiß-Chrom, daß eine Komplexumwandlung beim Alkalischemachen einer neutralen Eiweißmetallsalzlösung nur im Falle des Kupfers, nicht aber beim Chrom erfolgt. Beim Kupfer entsteht überhaupt erst die Biuretfarbe durch Alkalischemachen der Kupfer-eiweißlösung; im neutralen Gebiet ist die Farbe der Lösung grün [Extinktionsmaximum bei 650, vgl. Abb. 1 in (1)], im alkalischen Gebiet rotviolett [Extinktionsmaximum bei 550, vgl. Abb. 5 in (1)]. Diese Farbänderung beruht darauf, daß die Kupferatome im alkalischen Gebiet die Peptidgruppen als Liganden bevorzugen, während Aminokomplexe nur so weit bestehen bleiben, als die Peptidgruppen zur Absättigung nicht ausreichen. Die Chromgelatine zeigt hingegen bei Alkalizugabe keine Farbänderung: der einmal gebildete glykokollsalzähnliche Komplex des Chroms ist so stabil, daß er auch beim Kochen in Alkali nicht zerstört wird. Das gilt jedoch nur mit der Einschränkung, daß die Chromatome durch die Carboxyl- bzw. Aminogruppen des Eiweißkörpers abgesättigt sind. Damit diese Forderung erfüllt wird, muß der Eiweißkörper etwas hydrolytisch abgebaut sein.

Läßt man hingegen auf das Gemisch unabgebauter Gelatine mit Chromsalz Alkali einwirken, so findet eine Komplexzerstörung statt. Das gleiche gilt für das technische Chromleder, welches durch Alkali-einwirkung entgerbt wird. Hieraus geht hervor, daß im Chromleder und im Reaktionsprodukt zwischen unabgebauter Gelatine und Chromsalzen die Chromkomplexe nicht abgesättigt sind. Das ist auch durchaus verständlich, da die in der Hautsubstanz bzw. in der unabgebauten Gelatine vorhandenen aktiven Gruppen sich in einer ganz bestimmten weiträumigen Lageverteilung befinden, die so beschaffen ist, daß höchstens immer nur ein Paar aktiver Gruppen, also je eine Carboxyl- und eine Aminogruppe mit einem Chromatom reagieren können.

### Zusammenfassung.

Die Chromsalze können ebenso wie die Kupfersalze zwei Typen von Komplexverbindungen mit Eiweißkörpern eingehen. Bevorzugt ist der Typus, welcher dem Glykokollsalz entspricht. Bei ihm treten freie Carboxyl- und Aminogruppen in den Komplex ein. Dieser Verbindungstyp liegt auch dem Gerbvorgang bei der Chromgerbung zugrunde.

Der andere Typus, bei dem Peptidgruppen in den Komplex eintreten und der der Kupfer-Eiweißverbindung bei der Biuretreaktion entspricht, tritt nur in stark alkalischer Lösung auf. Eine Beteiligung der Peptidgruppen an der Bindung der Chromsalze durch die Hautsubstanz im Chromleder findet nicht statt.

#### Literatur.

- 1) A. Küntzel u. Th. Dröscher, diese Zeitschr. **306**, 177, 1940. — 2) K. H. Gustavson, J. Amer. Leather Chem. Ass. **34**, 444, 1938. — 3) F. Lieben u. Jesserer, diese Zeitschr. **285**, 36, 1936; **287**, 71, 84, 1936; **292**, 403, 419, 1937. — 4) H. Ley u. K. Ficken, Ber. **45**, 377, 1912.

## Lebenslauf

Als Sohn des Betriebsleiters Theodor Dröschler wurde ich am 28. Januar 1912 zu Kirn (Nahe) geboren. Nach dreijährigem Besuch der Volksschule und sechsjährigem Besuch des Realprogymnasiums zu Kirn trat ich in die Oberrealschule zu Oberstein-Idar ein und bestand dort die Reifeprüfung Ostern 1930. Seit Herbst 1930 studierte ich an der Technischen Hochschule Darmstadt und legte hier die Diplomhauptprüfung am Institut für Gerbereichemie im September 1938 ab. Von diesem Zeitpunkt ab war ich am gleichen Institut als Assistent tätig und mit der Ausführung der vorliegenden Arbeit beschäftigt.