

438. R. Engeland: Über Hydrolyse von Casein und den Nachweis der dabei entstandenen Monoaminosäuren.

[Aus dem Physiologischen Institut der Universität Marburg, Physiologisch-chemische Abteilung.]

(Eingegangen am 22. Juli 1909.)

Das bei der Hydrolyse von Casein und anderen Eiweißstoffen auftretende Gemenge von Aminosäuren bietet der Aufteilung, d. h. der Trennung und Reinigung der einzelnen Komponenten die größten Schwierigkeiten. Dies gilt namentlich für die Monoaminosäuren. Von ihnen sind nur diejenigen leicht zu ermitteln, die sich durch Schwerlöslichkeit in Wasser auszeichnen; nämlich das Leucin, das Tyrosin und die Glutaminsäure, deren salzsaures Salz sich in konzentrierter Salzsäure nur schwer löst. Für die übrigen leicht löslichen Aminosäuren liegen jedoch die Verhältnisse äußerst ungünstig. Der Grund hierfür ist offenbar der, daß die Monoaminosäuren zugleich Basen und Säuren, d. h. indifferente Körper, sind. Sie bilden mit Säuren wie mit Basen zwar Salze; diese sind jedoch meist leicht löslich, und auch die schwer löslichen sind zur Abscheidung irgend einer Aminosäure aus einem Gemenge nur ausnahmsweise brauchbar, und so ist denn auch das bisher für die Monoaminosäuren gebrauchte Trennungungsverfahren ein rein physikalisches.

Es fragt sich nun, ob es nicht möglich ist, durch Verstärkung der sauren oder der basischen Eigenschaften der Aminosäuren ihren Indifferentismus zu beseitigen und damit für die Trennung günstigere Verhältnisse zu schaffen. Natürlich muß der chemische Charakter der Aminosäuren bei einer derartigen Prozedur eine tiefgehende Änderung erfahren, und man wird schließlich an ihrer Stelle irgendwelche Umwandlungsprodukte erhalten. Darauf kommt es jedoch in der Eiweißchemie gar nicht an, die einzelnen Aminosäuren als solche zu isolieren, da ja die Eigenschaften derselben sehr genau bekannt sind, sondern darauf, die einzelnen qualitativ nebeneinander nachzuweisen und wenn möglich quantitativ zu bestimmen. Man muß also nur im voraus wissen, daß an Stelle irgend einer Aminosäure ein ganz bestimmtes Umwandlungsprodukt erscheint, das an ihrer Stelle identifiziert und analysiert wird. Ein genaues Analogon hierzu bietet die Chemie der Zucker. Denn letztere bringt man meist zur Identifikation und Analyse in Form ihrer Osazone, aus denen man bekanntlich das Ausgangsmaterial direkt nicht zurückgewinnen kann. Von den oben angedeuteten Wegen, den Indifferentismus der Aminosäuren zu beseitigen, empfiehlt sich nur der eine, nämlich der, die Basizität derselben zu erhöhen; und zwar deswegen, weil organische Basen viel

leichter zu trennen und analysenrein zu gewinnen sind, als organische Säuren.

Die von mir angewandte Methode ist folgende: Als primäre Amine ersetzen die Aminosäuren, mit Halogenalkyl in Reaktion gebracht, den Wasserstoff ihrer Aminogruppe durch Alkyl und gehen dabei in tertiäre Amine über; letztere addieren unter Bildung von Ammoniumbasen noch ein Molekül Halogenalkyl. Auf die Aminosäuren hat zuerst P. Gries diese Hofmannsche Reaktion angewandt, indem er aus Glykokoll und Jodmethyl das Betain aufbaute¹⁾. Wie Glykokoll, liefern alle ihm analog gebauten Aminosäuren »Betaine«, die sich wie das Anfangsglied auszeichnen durch die Krystallisationsfähigkeit ihrer Schwermetalldoppelsalze, namentlich der Aurate. Diese eignen sich daher ausgezeichnet zur Identifizierung der betreffenden Aminosäuren, namentlich wenn nur geringe Mengen hiervon vorliegen. Besonders aber hat es sich gezeigt, daß die Methode der erschöpfenden Methylierung sich mit Vorteil auch auf ein Gemenge von Aminosäuren anwenden läßt, wie es sich z. B. bei der Hydrolyse eines Eiweißkörpers darbietet. Denn die dabei entstehenden Betaine lassen sich durch die verschiedene Löslichkeit ihrer Quecksilber-, Platin- und Goldchloriddoppelsalze relativ leicht trennen und infolge der Schwerlöslichkeit dieser Doppelsalze auch recht gut quantitativ bestimmen.

Ich will im Folgenden das von mir angewandte Verfahren an einem Beispiel illustrieren und bemerke, daß das beschriebene Verfahren sich als das beste bewährt hat, so daß ich auf Grund meiner verschiedenartigen Versuche von Modifikationen entschieden abraten muß. Auf die Gründe hierfür komme ich später zurück.

Etwa 18 g Casein (von Grübler bezogen) werden durch fünfständiges Kochen mit Salzsäure von 1.19 spez. Gew. hydrolysiert, zwecks Beseitigung eines Teiles der Salzsäure eingeeengt, dann auf etwa $\frac{1}{2}$ l mit Wasser verdünnt und mit Phosphorwolframsäurelösung ausgefällt. Nach mehrtägigem Stehen wurde abgesaugt und der Niederschlag mit 5-proz. Schwefelsäure ausgewaschen. Das Filtrat der Phosphorwolframsäure wurde mittels Bariumhydratlösung von überschüssiger Phosphorwolframsäure befreit. Vom Bariumphosphorwolframat wurde durch Filtration getrennt und im Filtrate der überschüssige Baryt mit verdünnter Schwefelsäure quantitativ ausgefällt. Das Filtrat vom Bariumsulfat wurde zum Sirup eingeeengt. Nach dem Impfen krystallisierte hieraus die Glutaminsäure in Form des salzsauren Salzes aus. Seine Menge betrug etwa 2.1 g, entsprechend ca. 9.4 % Glutaminsäure.

¹⁾ Diese Berichte 8, 1406 [1875].

Das Filtrat von der Glutaminsäure wurde mit starker Kalilauge neutralisiert; es schieden sich hierauf Leucin und Tyrosin ab. Von ihnen wurde abgesaugt und mit eiskaltem Wasser gewaschen. Das Filtrat lieferte beim starken Einengen weitere Mengen von Leucin. An Rohleucin erhielt ich etwa 2.3 g.

Das Filtrat vom Leucin wurde darauf in methylalkoholischer Kalilauge unter Zusatz von etwas Wasser gelöst und mit etwas mehr als der berechneten Menge Jodmethyl versetzt, d. h. für ein *N*-Atom 3 Mol. Jodmethyl¹⁾. Nach wenigen Minuten setzte eine energische Reaktion ein, die sich bis zum lebhaften Aufsieden verstärkte. Deswegen muß man die Operation in einem mit Rückflußkühler versehenen Kölbchen vornehmen. Nach Beendigung dieser heftigen Reaktion ist die Flüssigkeit stark sauer.

Es wurde daher mit etwas methylalkoholischer Kalilauge wieder schwach alkalisch gemacht und in der Kälte stehen gelassen. Sobald die Reaktion wieder sauer wurde, wurde mit einigen Tropfen methylalkoholischer Kalilauge die alkalische Reaktion wieder hergestellt. Wenn für längere Zeit alkalische²⁾ oder amphotere Reaktion eingetreten ist, so setzt man wieder etwas Jodmethyl zu. Mit diesem abwechselnden Zusatz von Jodmethyl und Kalilauge wurde fortgefahren, bis eine dauernd neutrale oder amphotere Reaktion resultierte. Dann wurde mit Kalilauge noch einmal schwach alkalisch gemacht, etwas Jodmethyl zugesetzt und einige Zeit auf dem Wasserbade schwach erwärmt.

Darauf wurde, wenn nötig, mit einigen Tropfen verdünnter Salzsäure neutralisiert und der Methylalkohol und das unveränderte Jodmethyl abgedampft oder abdestilliert. Der Rückstand wurde mit Methylalkohol aufgenommen, wobei viel Kaliumjodid und -chlorid zurückblieben. Das Aufnehmen mit Methylalkohol wurde noch 1—2 Mal wiederholt, wobei immer reichliche Mengen der beiden anorganischen Salze zurückblieben. Schließlich wurde mit wenig Wasser aufgenommen und zwecks Beseitigung des Jods mit frisch gefälltem Chlorsilber in der Wärme digeriert, bis in der überstehenden Flüssigkeit die Jodreaktion verschwunden war³⁾.

¹⁾ Der Gesamtstickstoff wird in einer Probe nach Kjeldahl bestimmt.

²⁾ Dauernd alkalisch bleibt die Flüssigkeit natürlich nicht, solange überschüssiges Jodmethyl anwesend ist, das durch die Kalilauge, wenn auch langsam, auch in der Kälte verseift wird.

³⁾ Hat man größere Mengen zu verarbeiten, so empfiehlt es sich natürlich, die Hauptmasse des Jods mit Bleiacetat auszufällen und erst das Filtrat vom Jodblei mit Chlorsilber zu behandeln.

Das Filtrat vom Jodsilber wurde zum Sirup eingeengt und zunächst wieder mit Methylalkohol aufgenommen zwecks Befreiung vom Chlorkalium. Dann wurde mit Äthylalkohol aufgenommen, wobei auch noch etwas KCl zurückblieb¹⁾. Die so vom Chlorkalium möglichst befreite Masse wurde sodann mit wenig Wasser aufgenommen, mit Salzsäure stark angesäuert und mit gesättigter kalter Quecksilberchloridlösung versetzt, so lange als noch eine Trübung auftrat. Es entstand eine ziemlich reichliche Abscheidung eines krystallinischen in Wasser sehr schwer löslichen Quecksilberdoppelsalzes. Bevor diese eintritt, muß jedoch ein großer Überschuß von Quecksilberchloridlösung zugesetzt sein. Nach mehrtägigem Stehen wurde die Quecksilberfällung abgesaugt und mit gesättigter wäßriger Quecksilberchloridlösung gewaschen. Diese erste Quecksilberfällung enthält alle Pyrrolidincarbonsäure in Form der *N*-Methyl-hygrinsäure. Zu ihrer Isolierung wurde die Quecksilberfällung in heißem Wasser unter Zusatz von viel konzentrierter Salzsäure gelöst und mit Schwefelwasserstoff vom Quecksilber befreit. Das Filtrat vom Quecksilbersulfid wurde zum Sirup eingeengt und hierauf zur Vertreibung der überschüssigen Salzsäure noch mehrmals mit Wasser abgedampft. Dann wurde mit absolutem Alkohol aufgenommen und mit 20-proz. alkoholischer Platinchloridlösung ausgefällt. Die Fällung wurde in heißem Wasser gelöst und mit Schwefelwasserstoff vom Platin befreit. Das Filtrat vom Platinsulfid enthielt das reine Chlorid der *N*-Methylhygrinsäure. Zur Analyse führte ich es durch Zusatz von 30-proz. Goldchloridlösung in das sehr charakteristische Chloraurat über, das nach einmaligem Umkrystallisieren rein war.

0.1276 g Subst.: 0.0520 g Au, 0.1448 g Subst.: 0.0591 g Au. — 0.1622 g Subst.: 0.1039 g CO₂, 0.0448 g H₂O. — 0.1275 g Subst.: 0.0824 g CO₂, 0.0402 g H₂O.

C₇H₁₄NO₂AuCl₄. Ber. Au 40.8, C 17.4, H 3.7.
Gef. » 40.8, 40.8, » 17.9, 17.6, » 3.2, 3.5.

Das Chloraurat schmolz bei 217—218°, doch habe ich auch Präparate mit niedrigerem Schmelzpunkt in den Händen gehabt. Das Chlorid lenkte in salzsaurer Lösung das polarisierte Licht stark nach links ab, entsprechend seiner Abstammung von der *l*-Pyrrolidincarbonsäure. Wie seine Konstitution erwarten ließ, spaltete es bei der Destillation mit konzentrierter Kalilauge Dimethylamin ab.

0.1214 g Subst.: 0.0617 g Au.

C₂H₈N.AuCl₄. Ber. Au 51.2. Gef. Au 50.8.

¹⁾ Der Rückstand muß natürlich immer auf einen etwaigen Gehalt an organischer Substanz geprüft werden, da hier leicht etwas Betainchlorid ungelöst zurückbleiben kann, falls viel davon vorhanden ist.

Nun wird die Pyrrolidincarbonsäure nach den Angaben von E. Winterstein¹⁾ aus einem Gemenge von Aminosäuren durch Phosphorwolframsäure zum Teil gefällt; es mußte also die gefundene Menge — ca. 2.6 g des Chloraurates der *N*-Methylhygrinsäure, entsprechend ca. 3.4 % Pyrrolidincarbonsäure — nur einem Teil der bei der Hydrolyse in Wirklichkeit entstandenen entsprechen. Das bestätigte sich, als ich mit Salzsäure hydrolysiertes Casein in der geschilderten Weise ohne vorheriges Ausfällen mit Phosphorwolframsäure auf *N*-Methylhygrinsäure verarbeitete. Ich fand hier etwa die doppelte Menge; nämlich aus 20 g Casein 5.6 g der Goldverbindung, entsprechend ca. 6.7 % Pyrrolidincarbonsäure.

Im Filtrate von der die Pyrrolidincarbonsäure enthaltenden Platinchloridfällung ließ sich Trimethylleucin nachweisen. Es wurde zu diesem Zwecke mit Wasser aufgenommen, mit Schwefelwasserstoff vom Platin befreit, das Filtrat vom Platinsulfid zum Sirup eingengt und mittels 30-proz. Goldchloridlösung daraus das Goldsalz des Leucinbetains ausgefällt.

0.0976 g Sbst.: 0.0372 g Au. — 0.1228 g Sbst.: 0.0949 g CO₂, 0.0396 g H₂O.
 C₉H₂₀NO₂.AuCl₄. Ber. Au 38.4, C 21.1, H 3.9.
 Gef. » 38.6, » 21.1, » 3.6.

Zum Vergleich aus reinem Leucin hergestelltes Trimethylleucinaurat zeigte äußerlich die größte Ähnlichkeit; das daraus gewonnene Chlorid erwies sich ebenfalls in alkoholischer Lösung durch Platinchloridlösung nicht fällbar.

Das Filtrat von der oben behandelten ersten Quecksilberchloridfällung wurde folgendermaßen weiter verarbeitet:

Es wurde auf dem Wasserbade zum Sirup eingengt und mit kalter, gesättigter, wäßriger Quecksilberchloridlösung versetzt, wobei eine neue Fällung auftrat. Diese wurde ganz in derselben Weise wie die erste Quecksilberchloridfällung aufgearbeitet. Die Platinchloridfällung lieferte hier ein Goldsalz, das zu Trimethylamino-valeriansäure gut stimmende Werte lieferte.

0.1224 g Sbst.: 0.0849 g CO₂, 0.0405 g H₂O.
 C₈H₁₈NO₂.AuCl₄. Ber. C 19.2, H 3.6.
 Gef. » 18.9, » 3.7.

Falls hier wirklich Aminovaleriansäure zugrunde liegt, so würde die gefundene Menge — ca. 1.2 g des Goldsalzes — etwa 1.5 % Aminovaleriansäure entsprechen. Das Filtrat von der Platinfällung enthielt auch hier etwas nicht ganz reines Trimethylleucin.

0.1188 g Sbst.: 0.9462 g Au.
 Ber. Au 38.4. Gef. Au 38.9.

¹⁾ Ztschr. f. physiolog. Chem. **41**, 501.

An Trimethylleucinaurat wurde gefunden in der ersten Quecksilberchloridfällung ca. 0.7 g, in der zweiten ca. 0.95 g (nicht ganz rein). Das würde etwa 0.4 g Leucin entsprechen; rechnet man die als freie Aminosäure gefundene Menge von ca. 2.3 g hinzu, so kommt man auf einen Leucingehalt von ca. 15%. — Das Filtrat von der zweiten Quecksilberchloridfällung wurde ebenfalls zum Sirup eingeeengt und mit einer gesättigten alkoholischen Quecksilberchloridlösung ausgefällt. Die Fällung wurde mit alkoholischer Quecksilberchloridlösung gewaschen und daraus in der oben geschilderten Weise die Lösung der Chloride gewonnen. Aus dieser schied sich beim Einengen ein schön krystallisierendes Chlorid aus, das sich als Betainchlorid erwies.

Es wurde mittels Äthylalkohol von der Mutterlauge abgetrennt. Zur Analyse führte ich es in die Goldverbindung über, die sofort rein war:

0.1298 g Sbst.: 0.0562 g Au. — 0.1279 g Sbst.: 0.0552 g Au, 0.0629 g CO₂, 0.0360 g H₂O.

C₆H₁₂NO₂. AuCl₄. Ber. Au 43.1, C 13.1, H 2.7.
Gef. » 43.3, 43.2, » 13.4, » 3.1.

Den Schmelzpunkt fand ich einmal bei 209°, wie Brieger¹⁾, einmal bei 234—235°, entsprechend den Angaben von E. Fischer²⁾. Als ich einmal aus einem Goldsalz vom Schmp. 209° das Gold entfernte und aus dem so gewonnenen Chlorid das Goldsalz regenerierte, zeigte dieses den von E. Fischer angegebenen Schmelzpunkt. Die gefundene Menge an Chloraurat betrug 0.2—0.3 g, entsprechend einem Gehalt an Glykokoll von 0.15—0.2%. Die alkoholische Mutterlauge des Betains wurde darauf mit 20-proz. alkoholischer Platinchloridlösung ausgefällt. Die Fällung wurde vom Platin befreit und aus der Chloridlösung das Goldsalz dargestellt. Dieses bestand aus Homobetainaurat.

0.0873 g Sbst.: 0.0364 g Au. — 0.1153 g Sbst.: 0.0479 g Au, 0.0652 g CO₂, 0.0345 g H₂O.

C₆H₁₄NO₂. AuCl₄. Ber. Au 41.9, C 15.3, H 3.0.
Gef. » 41.7, 41.6, » 15.4, » 3.3.

Die gefundene Menge betrug ca. 0.6 g, entsprechend etwa 0.5% Alanin. Das Filtrat von der Platinchloridfällung lieferte eine geringe Menge schlecht krystallisierenden Goldsalzes, das zur Analyse nicht ausreichte. Der durch Quecksilberchloridlösung nicht fällbare Anteil gab, vom Quecksilber befreit, mit Goldchlorid nur noch eine geringe ölige Fällung. Diese vermehrte sich auch nicht, als ich alkalisch machte, durch mehrmaliges Abdampfen mit absolutem Methylalkohol entwässerte und in der Hitze mit Dimethylsulfat behandelte. Trotzdem

¹⁾ Brieger, Ptomaine III, 76. ²⁾ Diese Berichte 27, 167 [1894].

resultierte noch ein nicht unbeträchtlicher Sirup, der also nur noch geringe Mengen von Aminosäuren enthalten konnte.

Ich habe oben bemerkt, daß man, um gute Resultate zu erhalten, nach dem geschilderten Verfahren arbeiten muß, d. h. man muß die Methylierung in der Kälte vornehmen. Der Grund hierfür ist der, daß bei der Methylierung bei erhöhtem Druck und erhöhter Temperatur sehr merkwürdige Körper — z. T. offenbar hochmolekulare Kondensationsprodukte — auftreten. So erhielt ich, als ich bei Siedehitze im offenen Gefäß arbeitete, zwar die *N*-Methylhygrinsäure unverändert, außerdem aber große Massen eines Körpers der mit Goldchlorid ein schlecht krystallisierendes Doppelsalz lieferte. Bei der Methylierung in der Druckflasche bei 80° entstanden eine Reihe sehr eigenartiger hochmolekularer und z. T. sauerstofffreier Körper, so z. B. einer, für den sich aus den Analysen die Formel $C_{27}H_{46}N_2$ berechnen ließ. Doch zeichneten sich alle diese Körper aus durch die Krystallisationsfähigkeit ihrer schwer löslichen Gold- und z. T. auch Platinchloriddoppelsalze. Diese Kondensationsfähigkeit der Aminosäuren unter dem Einfluß der Methylierung ihres Stickstoffatoms ist überraschend, und es liegt der Gedanke nahe, daß bei dem Aufbau der höheren Glieder aus niederen und schließlich bei der Bildung hochmolekularer Produkte, wie sie die Eiweißkörper darstellen, im lebenden Organismus ähnliche Vorgänge eine Rolle spielen können, zumal die Fähigkeit des pflanzlichen und tierischen Organismus, Methylierungen vorzunehmen, lange bekannt ist.

Von diesem Gesichtspunkte aus betrachtet, würde sich ohne weiteres die große Verbreitung der einfachsten, erschöpfend methylierten Aminosäure, des Betains, erklären lassen. Das Betain ist in zahlreichen Pflanzen und auch in einigen Tieren ¹⁾ als einer der hauptsächlichsten Extraktstoffe nachgewiesen worden. Man war allerdings gewohnt, es als ein Derivat des Lecithins anzusprechen; es sind jedoch bisher für diese Annahme keine stichhaltigen Gründe vorgebracht worden, sondern nur seine Ähnlichkeit mit dem Cholin scheint dahin gewirkt zu haben, es mit Lecithin in Verbindung zu bringen. Höhere Homologe des Betains sind ebenfalls in letzter Zeit in tierischen Extrakten nachgewiesen worden. Weiter läßt sich auch die Herkunft des Stachydrins, das zweifellos mit der *N*-Methylhygrinsäure identisch ist, sofort erklären.

Nachdem sich die Monoaminosäuren der Methylierung so leicht zugänglich erwiesen hatten, versuchte ich auch, das Verfahren auf den durch Phosphorwolframsäure fällbaren Anteil, der die sogenannten

¹⁾ Brieger, die Ptomaine III, 76; Ackermann und Kutscher, über Krabbenextrakt, Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- und Genußmittel **13**, 610 [1907]; Suwa, Pflügers Archiv **128**, 421.

Diaminosäuren umfaßt, anzuwenden. Aber hier waren meine Bemühungen weniger erfolgreich. Es gelang mir aus dem Histidin und Lysin nur eine geringe Menge krystallinischer Methylierungsprodukte zu erhalten, so daß für die Aufteilung dieser Fraktion sich die bekannte, von Kossel und Kutscher ausgearbeitete Methode besser eignet.

Schwer zugänglich einer Methylierung scheinen die ungespaltenen Eiweißkörper zu sein. Ich habe hier mit der Folinschen Deuteroalbumose gearbeitet, die den Vorteil bietet, sich in kalihaltigem Methylalkohol zu lösen. Den Fortschritt der Methylierung suchte ich mit Hilfe der Farbenreaktionen zu verfolgen. Diese erhielten sich bei Methylierung in der Kälte lange Zeit. Methylierte ich den gleichen Eiweißkörper in der Wärme, dann verschwand allmählich die Diazo-reaktion, während die anderen Farbenreaktionen, namentlich die Biuretreaktion, unverändert bestehen blieben.

Über die vorstehenden Resultate habe ich bereits kurz am 10. Februar des Jahres in der Gesellschaft zur Beförderung der gesamten Naturwissenschaften in Marburg berichtet.

Ich habe mit dem oben geschilderten Verfahren auch die Aufteilung noch einiger anderer Eiweißkörper in Angriff genommen, wobei ich meine Methode noch weiter auszubauen gedenke. Ich bitte daher, mir das Gebiet noch einige Zeit zu überlassen.

439. Siegfried Hilpert und Paul Weiller: Über Bleisilicate.

(Eingegangen am 30. Juli 1909.)

Die Frage nach der Konstitution der Silicate und ihrer Schmelzen ist in der letzten Zeit mehr und mehr in den Vordergrund des Interesses getreten. Daß sie früher so lange vernachlässigt wurde, lag hauptsächlich in dem Mangel an Experimentalmethoden, und erst die neuere Zeit hat uns die apparativen Hilfsmittel geliefert, deren man zur Untersuchung der teilweise recht hoch schmelzenden Silicate bedarf. Wie sehr sich die systematische Durchforschung dieses Gebietes lohnt, zeigen die Ergebnisse der Glaswerke von Schott in Jena, durch welche erst die wissenschaftlichen Grundlagen für die Glasfabrikation gelegt worden sind. Es ist aber von vornherein klar, daß sich die Glastechnologen nach Möglichkeit vor Kombinationen hüteten, die leicht zur Krystallisation oder Entglasung neigen, ebenso wie auf der anderen Seite die Mineralogen die Untersuchung der krystallisierten Substanz bevorzugten. Es kommt noch hinzu, daß beide