

# Über die Methylierung von Gelatine

von

**Zd. H. Skraup und B. Böttcher.**

Aus dem II. chemischen Universitätslaboratorium.

(Vorgelegt in der Sitzung am 7. Juli 1910.)

Der eine von uns hat in Gemeinschaft mit E. Krause<sup>1</sup> gefunden, daß das Casein methoxylhaltig ist (0·80%) und auch an Stickstoff gebundenes Alkyl enthält, welches als Methyl gerechnet 1·1% beträgt.

Wird Casein, in alkoholischer Kalilauge gelöst, mit Methyljodid behandelt, so erhöht sich sowohl der Gehalt an Methoxyl als auch der von Stickstoffmethyl; der erste auf rund 2, der zweite auf rund 3·5%. Das so gewonnene methylierte Protein ist nach Abrechnung des eingetretenen Methyls in seiner Zusammensetzung vom Casein kaum verschieden und dieses gilt selbst für den Gehalt an Schwefel und Phosphor. Nach der Hydrolyse erhält man aber die krystallisierenden Spaltungsprodukte in einem anderen Verhältnis als aus dem ursprünglichen Casein. Histidin und Arginin entstehen nur in sehr geringer Menge, Lysin überhaupt nicht.

Die Methylierung des Caseins hat demnach, was die Hexonbasen betrifft, im wesentlichen dieselbe Wirkung wie die Einwirkung der salpetrigen Säure, da das bei dieser Einwirkung entstehende sogenannte Desamidocasein bei der Hydrolyse ebenfalls Arginin in geringerer Menge liefert als Casein selbst und Lysin überhaupt nicht.

---

<sup>1</sup> Monatshefte für Chemie, 1909.

Das methylierte Casein und das Desamidocasein haben weiter auch noch die Ähnlichkeit, daß sie beide kein Tyrosin geben, welches aus dem Casein selber entsteht. Dafür entsteht aus Methylcasein sowie aus dem Desamidocasein Glutaminsäure und Leucin ungefähr in derselben Menge wie aus dem Casein selber. Es ist bemerkenswert, daß bei zwei gänzlich verschiedenen Methoden dieselben Veränderungen im Proteïn-molekül eintreten und es ist gerechtfertigt, vorläufig anzunehmen, daß diese Veränderungen an solchen Gruppen vor sich gehen, welche strukturechemisch, sterisch oder auch physikalisch-chemisch, chemischen Einflüssen leichter zugänglich sind.

In dieser Abhandlung sollen die Veränderungen besprochen werden, welche bei der Methylierung der Gelatine eintreten. Es sei erwähnt, daß die Gelatine schon vor einigen Jahren in die Desamidogelatine übergeführt und für diese festgestellt worden ist,<sup>1</sup> daß bei ihrer Hydrolyse Lysin ebenso nicht entsteht wie aus dem Desamidocasein. Histidin und Arginin wurden dafür aufgefunden. Leider wurde ihre Menge damals quantitativ nicht bestimmt; die anderen Spaltungsprodukte wurden überhaupt nicht näher bestimmt und nur für das Glykokoll noch gefunden, daß es in reichlicher Menge entstehe.

Für die Methylierung der Gelatine war geradeso wie beim Casein zunächst wichtig festzustellen, ob in ihr selber schon Alkyl an Sauerstoff oder aber an Stickstoff gebunden sei. Es ist tatsächlich der Fall. Sie enthält 0·35%  $\text{CH}_3\text{O}$  und 1·1% Stickstoffmethyl. Der Gehalt an Stickstoffmethyl ist ungefähr so groß wie im Casein (1·1%), der Methoxylgehalt kleiner wie im Casein (1·1%). In der methylierten Gelatine wurden rund 2% Methoxyl und 4·1% Stickstoffmethyl gefunden, also wieder fast dieselben Werte wie im methylierten Casein, in welchem 2% beziehlich 3·4% gefunden wurden. Also auch bei der Gelatine tritt beim Behandeln mit Jodmethyl Methyl ein.

Bei der Elementaranalyse wurde der Kohlenstoffgehalt etwas höher, der Stickstoffgehalt etwas niedriger gefunden als in der Gelatine, der Schwefelgehalt beträgt aber nur die Hälfte

---

<sup>1</sup> Monatshefte für Chemie, 27, 653 (1906).

von dem in der Gelatine. Daß beim Methylieren des Caseïns der Schwefelgehalt und auch der Phosphorgehalt dafür nicht geändert wurde, ist schon früher erwähnt worden.

Bei der Hydrolyse der Methylgelatine zeigte sich, daß ebenso wie beim methylierten Caseïn Lysin überhaupt nicht auftritt und Histidin und Arginin nur in Mengen, die etwa 10% jener betragen, welche die Gelatine selbst liefert.

Von den anderen Spaltungsprodukten der Gelatine wurden Glykokoll, Alanin, Leucin, Pyrrolidincarbonsäure und Phenylalanin wiedergefunden, von Glykokoll sogar mehr als sonst aus der Gelatine erhalten wird. Ganz abweichend von dem Befund bei dem Caseïn, welches nach der Methylierung ebensoviel Glutaminsäure liefert als im unveränderten Zustand, konnte aus der methylierten Gelatine Glutaminsäure nur in sehr geringer Menge und erst nach einem modifizierten Verfahren erhalten werden. Dieses ist sehr auffallend. Um zu erfahren, ob nicht eine Abspaltung von Glutaminsäure durch das Kaliumhydroxyd im Verlauf der Methylierung stattfindet, haben wir Gelatine unter ganz denselben Umständen wie bei der Methylierung mit alkoholischer Kalilauge nur mit dem Unterschied behandelt, daß eine dem Jodmethyl äquivalente Menge von Essigsäure allmählich zufließ. Ebenso wie nach der Methylierung wurde sodann mit Ammonsulfat ausgesalzen und das so erhaltene Protein mit Salzsäure hydrolysiert. Es entstand dieses Mal Glutaminsäure ungefähr in derselben Menge wie aus der ursprünglichen Gelatine. Infolgedessen ist der Schluß zulässig, daß nicht eine sekundäre Alkaliwirkung, sondern die Methylierung als solche das so bedeutende Zurücktreten der Glutaminsäure bewirkt. Es ist nicht gelungen, eine methylierte Glutarsäure aufzufinden und es ist deshalb nicht bewiesen, daß eine solche entstanden ist. Andererseits liegt aber auch kein Grund vor, dieses unbedingt in Abrede zu stellen. Selbst wenn das aber der Fall wäre, bleibt es von Interesse, daß Caseïn und Gelatine bei der Methylierung beide eine Veränderung ihrer Hexonbasen erfahren, beide keine Veränderung im Leucinrest etc. aufweisen, daß, während Caseïn im Glutaminsäurerest auch nicht verändert wird, dieses bei der Gelatine dagegen der Fall ist.

Soweit man berechtigt ist, aus den angeführten Ähnlichkeiten abzuleiten, daß jene Gruppen, welche die Hexonbasen, vor allem das Lysin enthalten, dem chemischen Eingriff der Methylierung leichter zugänglich sind als die Gruppen, welche das Leucin etc. enthalten, ebenso berechtigt ist man zu folgern, daß der Rest der Glutaminsäure in der Gelatine anders angeordnet ist als im Casein, daß er in der Gelatine vor chemischen Eingriffen weniger geschützt ist als in dem Casein.

## Experimenteller Teil.

### Gelatine.

Gelatine löst sich in alkoholischer Kalilauge schon in der Kälte bei anhaltendem Schütteln relativ leicht. In 20  $cm^3$  einer zehnprozentigen, absolut alkoholischen Kalilauge lassen sich 8 g Gelatine auflösen. Dementsprechend wurden je 50 g käufliche feingeschnittene Gelatine in 125  $cm^3$  Alkohol, der 13 g Kaliumhydroxyd enthielt, eingetragen und 6 Stunden auf der Maschine geschüttelt. Nach dieser Zeit war bis auf geringe Reste, von denen abgegossen werden konnte, alles gelöst. Hierauf wurden 50 g Jodmethyl zugefügt und unter Schütteln am Rückflußkühler bis zum Verschwinden der alkalischen Reaktion gekocht, was nach ungefähr 2 Stunden der Fall war. Sodann wurden 13 g KOH in 25  $cm^3$  absolutem Alkohol gelöst und wieder 50 g Jodmethyl zugefügt und wieder bis zur Neutralität erwärmt, was dieses Mal länger, 4 bis 5 Stunden, dauerte. Während der Einwirkung von Jodmethyl scheidet sich eine ölige Masse ab, die aber durch Zusatz von wenig Wasser (25 bis 30  $cm^3$ ) in Lösung geht. Beim Kochen war Ammoniakentwicklung nicht wahrzunehmen. Sie ist deutlich zu konstatieren, wenn statt absolutem Alkohol wasserhaltiger Wein-geist genommen wird.

Es wurde hierauf abdestilliert, bis das Destillat sich beim Vermischen mit Wasser nicht mehr trübte (Jodmethyl), am Wasserbad in einer Schale der Alkohol möglichst vertrieben, dann in 500  $cm^3$  Wasser aufgelöst und 190 g Ammoniumsulfat eingetragen. Es entstand eine weiße Fällung, von der nach dem Erkalten leicht abgegossen werden konnte und die

noch sechsmal hintereinander wieder in der gleichen Menge Wasser gelöst und mit Ammoniumsulfat ausgefällt wurde. Zu den ersten Ausfällungen wurde gewöhnliches, zu den letzten absolut reines Salz verwendet. Der Nachweis, daß die anorganischen Salze vollständig entfernt sind, erfolgte mit derselben kleinen Modifikation, die der eine von uns mit E. Krause<sup>1</sup> beschrieben hat. Die allererste Fällung wog 127 g, die zweite 67 g, die letzte 60 g, die Veränderung bei den späteren Fällungen war demnach so gut wie Null.

Die letzte Fällung wurde heiß in 1 l Wasser gelöst, reines Barytwasser zugefügt, bis die Fällung nicht mehr zunahm und der Überschuß von Baryt mit Kohlendioxyd ausgefällt. Auch hier hat es sich, um das häufige Schäumen zu vermeiden, zweckmäßig erwiesen, das Gas in geschlossene Gefäße einzuleiten. Spuren von Barium blieben in Lösung. Da aus kolloidaler Lösung solche letzten Reste äußerst schwer und kaum sicher ausfällbar sind, haben wir jenes weiter nicht berücksichtigt. Bei den Analysen kommen wir darauf noch zurück. Die von den Barytsalzen filtrierte Flüssigkeit wurde unter vermindertem Druck eingedampft und zur Trockne gebracht.

Das Reaktionsprodukt ist eine gelbliche amorphe Masse, die gepulvert nahezu weiß ist. Die Ausbeuten schwanken etwas. Bei Verarbeitung von je 300 g Gelatine erhielten wir einmal 105 g, das anderemal 150 g. Abgesehen von der Quantität fanden wir auch sonst kleine Differenzen im Methylgehalt. Sie waren eben so gering, daß wir die Hydrolyse mit dem Gemisch beider Substanzen und nicht mit jeder einzelnen ausführten. Um über den Methylgehalt der hier beschriebenen Substanz ein Urteil zu gewinnen, haben wir von der Gelatine, die wir verwendet haben, den Gehalt an Methoxyl und Stickstoffmethyl bestimmt. Die Gelatine wurde im Vakuum bei 110° getrocknet, wobei sie gewichtskonstant wurde. Bei höherer Temperatur (über 130°) tritt Bräunung und mit ihr wohl im Zusammenhang stete Gewichtsabnahme ein.

---

<sup>1</sup> Monatshefte für Chemie, 30, 447 (1909).

**Methoxyl.**

0·9802 g	gaben	0·0279 g	AgJ	=	0·38%	OCH <sub>3</sub>
0·3315 g	»	0·0221 g	»	=	0·31%	»

**Methylimid.**

0·8182 g	bis	230°	0·0346 g	AgJ	=	0·27%	CH <sub>3</sub>	
	weiter	»	310°	0·0211 g	»	=	0·17%	
		»	»	330°	0·0632 g	»	=	0·49%
		»	»	330°	0·0276 g	»	=	0·21%
					Summe	1·14%	CH <sub>3</sub>	

Über 330° keine Abscheidung von AgJ.

0·307 g	bis	230°	0·0491 g	AgJ	=	0·31%	CH <sub>3</sub>	
	weiter	»	310°	0·0319 g	»	=	0·20%	
		»	»	330°	0·0535 g	»	=	0·33%
		»	»	330°	0·0354 g	»	=	0·22%
					Summe	1·06%	CH <sub>3</sub>	

Höher erhitzt kein AgJ mehr.

Demnach enthält die käufliche Gelatine im Mittel 0·35% OCH<sub>3</sub> und 1·10% Stickstoffmethyl.

**Methylierte Gelatine.**

Wie schon erwähnt, wurde die Substanz zweier verschiedenen Darstellungsoperationen analysiert. Die Trocknung erfolgte im Vakuum bei 110° durch 4 bis 5 Stunden. Die getrocknete Substanz ist äußerst hygroskopisch. Die beiden analysierten Substanzen sind bei Anführung der Analysendaten mit *A* und *B* bezeichnet. Die Probe auf einen Jodgehalt verlief negativ.

**Methoxyl.**

<i>A</i>	0·9674 g	gaben	0·1698 g	AgJ	=	2·32%	OCH <sub>3</sub>
	0·9038 g	»	0·1435 g	»	=	2·10%	»
<i>B</i>	1·0304 g	»	0·1447 g	»	=	1·85%	»
	1·1713 g	»	0·1717 g	»	=	1·90%	»

**Stickstoffmethyl.**

<i>A</i>	0·9038 g	erhitzt	bis	230°	0·2282 g	AgJ	=	1·62%	CH <sub>3</sub>
		weiter	»	310°	0·2854 g	»	=	2·02%	»
			»	»	330°	0·0631 g	»	=	0·45%
			»	»	330°	0·0347 g	»	=	0·25%
			über	330°	0·0				
					Summe	4·34%	CH <sub>3</sub>		

<i>B</i> 0·8516 <i>g</i> erhitzt bis 230°	0·3685 <i>g</i> AgJ = 2·77 <sup>0</sup> / <sub>0</sub> CH <sub>3</sub>	
weiter » 310°	0·0936 <i>g</i> » = 0·70 <sup>0</sup> / <sub>0</sub> »	
» » 330°	0·0406 <i>g</i> » = 0·31 <sup>0</sup> / <sub>0</sub> »	
über 330°	0·0	
	Summe 3·78 <sup>0</sup> / <sub>0</sub> CH <sub>3</sub>	

## Elementaranalysen.

<i>A</i> 0·1896 <i>g</i> gaben	0·3619 <i>g</i> CO <sub>2</sub> und	0·1144 <i>g</i> H <sub>2</sub> O.
0·2219 <i>g</i> »	0·4235 <i>g</i> » »	0·1329 <i>g</i> »
0·2226 <i>g</i> »	35·4 <i>cm</i> <sup>3</sup> N bei <i>t</i> = 23° und	736 <i>mm</i> .
1·0488 <i>g</i> »	0·0175 <i>g</i> BaSO <sub>4</sub> .	
<i>B</i> 0·1394 <i>g</i> »	0·2558 <i>g</i> CO <sub>2</sub> und	0·0801 <i>g</i> H <sub>2</sub> O.
0·2760 <i>g</i> »	0·5254 <i>g</i> » »	0·1647 <i>g</i> »
0·1527 <i>g</i> »	23·0 <i>cm</i> <sup>3</sup> N bei <i>t</i> = 20° und	757 <i>mm</i> .
1·0897 <i>g</i> »	0·0118 <i>g</i> BaSO <sub>4</sub> .	
1·0025 <i>g</i> »	0·0201 <i>g</i> »	

In 100·Teilen:

	<i>A</i>				<i>B</i>				
C . . . .	52·05	51·95	—	—	52·06	52·03	—	—	—
H . . . .	6·75	6·68	—	—	6·67	6·69	—	—	—
N . . . .	—	—	17·76	—	—	—	17·5	—	—
S . . . .	—	—	—	0·24	—	—	—	0·15	0·20

Ein Vergleich der Zahlen für *A* und *B* ergibt, daß die elementare Zusammensetzung die gleiche ist, Die Substanz *A* gab etwas höhere Zahlen für Methoxyl und Stickstoffmethyl; die Differenzen liegen aber noch in der Grenze der Versuchsfehler.

Die Schwefelbestimmungen wurden nach Mörner durch Erhitzen mit Ätzkali und Salpeter im Nickeltiegel vorgenommen.

Wie schon erwähnt, enthielten die Präparate kleine Mengen von Baryt. 0·7325 *g* hinterließen verascht 0·0019 *g* Rückstand, der mit Schwefelsäure abgeraucht und mit Wasser ausgekocht dann 0·0021 *g* betrug, was einem Prozentgehalt von 0·02 Ba entspricht. Es ist anzunehmen, daß bei der Schwefelbestimmung die Menge von Schwefel, die dem Bariumgehalt äquivalent ist, verloren geht, wir haben deshalb bei Berechnung des Prozentgehaltes von Schwefel in *A* diese Mengen auch in Rechnung gebracht.

Vergleicht man die Analysendaten für die käufliche Gelatine mit der von uns erhaltenen methylierten Gelatine, so zeigt sich:

In 100 Teilen:

	Gelatine	Methylierte Gelatine
C.....	51·45	52·06
H.....	7·08	6·67
N.....	18·18	17·50
S.....	0·46	0·23
OCH <sub>3</sub> .....	0·35	2·04
NCH <sub>3</sub> .....	1·10	4·06

Die methylierte Gelatine ist, wie man sieht, nicht nur reicher an Methyl in den beiden Formen, sondern auch etwas reicher an Kohlenstoff, dafür etwas ärmer an Stickstoff und von Schwefel enthält sie nur die Hälfte.

### Hydrolyse der Methylgelatine.

100 g der Methylgelatine (Gemisch der Präparate *A* und *B*), enthaltend 92 g Trockensubstanz, wurden mit der sechsfachen Menge konzentrierter Salzsäure am Rückflußkühler 8 Stunden gekocht, von ungelösten Flocken filtriert, auf ein Drittel des Volumens eingedampft, mit Salzsäuregas gesättigt und im Eisschrank 4 Tage belassen. Nach dem Erkalten wurde mit Glutaminsäurechlorhydrat geimpft. Trotz Schütteln und Reiben trat Krystallisation nicht ein, während Gelatine unter den gleichen Verhältnissen sehr erhebliche Mengen Glutaminsäure liefert.

Nach diesem negativen Befund wurde zum Syrup gedampft und nach der Vorschrift von E. Fischer zweimal verestert. Es begann nach dem Erkalten bald Krystallisation, welche durch fünftägiges Stehen im Eisschrank gefördert wurde.

Das Rohgewicht der Krystallisation betrug 29·6 g. Sie war im Äußeren der Glykokollverbindung, welche bei analoger Verarbeitung aus Eiweißstoffen sonst entsteht, sehr ähnlich, es fiel aber das relativ hohe Gewicht auf. Da es nicht unmöglich erschien, daß diese Gewichtsvermehrung daher rührt, daß das in der Gelatine vorhandene Glykokoll mehrfach methyliert worden sei, wurde die Substanz einer fraktionellen Krystallisation aus Alkohol unterworfen, bei welcher die schwieriger krystallisierende Mutterlauge immer wieder neu esterifiziert und gefärbte Lösungen mit Tierkohle entfärbt wurden. Auf



diese Art wurden fünf Fraktionen gewonnen, deren erste und letzte analysiert wurden.

Erste Fraktion Fusionspunkt  $144^{\circ}$ .  $0\cdot2364\text{ g}$  gaben  $0\cdot2445\text{ g}$  AgCl.

Fünfte Fraktion Fusionspunkt  $144^{\circ}$ .  $0\cdot1857\text{ g}$  gaben  $0\cdot1926\text{ g}$  AgCl.

In 100 Teilen:

	Berechnet für	Gefunden	
	$\text{C}_4\text{H}_{10}\text{NO}_2\text{Cl}$	I	II
Cl .....	25·4	25·57	25·64

Die Krystallisation besteht demnach ausschließlich aus der Salzsäureverbindung des Glykokollesters. Warum sie in größerer Menge auskrystallisierte, als es sonst der Fall ist, wenn unveränderte Gelatine verarbeitet wird, ist schwer zu erklären. Vielleicht verhindern methylierte Begleitstoffe das Auskrystallisieren weniger als die nicht methylierten. Die Mutterlauge der Rohkrystallisation von Glykokollester wurde nochmals auf Glutaminsäure geprüft. Zu diesem Behufe wurde sie, mit verdünnter Salzsäure im Überschuß versetzt, anhaltend gekocht, dann stark eingedampft und mit Salzsäuregas gesättigt.

Nach vierzehntägigem Stehen im Eisschrank hatte sich eine sehr geringe Krystallisation ( $0\cdot5\text{ g}$ ) gebildet. Es war das kein Chlorammonium, denn mit Barytwasser gekocht, wurde kein Ammoniak abgespalten. Nach Ausfällung des Baryts mit Schwefelsäure, Entfärben mit Tierkohle und Eindampfen wurden nahezu farblose Krystalle ( $0\cdot2\text{ g}$ ) erhalten, die bei  $186$  bis  $187^{\circ}$  sich verflüssigten und nach dem Chlorgehalt salzsaure Glutaminsäure waren.

$0\cdot1547\text{ g}$  gaben  $0\cdot1239\text{ g}$  AgCl.

In 100 Teilen:

	Berechnet für	Gefunden
	$\text{C}_3\text{H}_{10}\text{NO}_4\text{Cl}$	
Cl .....	19·3	19·8

Wie später noch erwähnt wird, fand sich eine weitere kleine Menge von Glutaminsäure in den Rückständen der Esterdestillation. Selbst wenn diese in Rechnung gezogen wird,

ist die Ausbeute von Glutaminsäure aus methylierter Gelatine viel geringer als aus der Gelatine selber.

Diese Minderausbeute läßt sich unter anderem auch durch die Annahme erklären, daß beim Erwärmen der Gelatine mit alkoholischer Kalilauge eine Spaltung derart erfolgt, daß die Glutaminsäure als solche oder in Form eines größeren Komplexes austritt und in die Mutterlaugen der Fällungen durch Ammonsulfat übergeht.

Um dieser Möglichkeit näher zu treten, wurde Gelatine (50 g) unter denselben Bedingungen wie bei der Methylierung mit 125  $cm^3$  absolutem Alkohol, der 13 g KOH enthielt, zunächst 2 Stunden am Wasserbad erwärmt. Während dieser Zeit tropfte Essigsäure sehr langsam zu, deren Menge äquivalent war der des Jodmethyls, welches bei der Methylierung verwendet wird. Hierauf wurden die früher angegebenen Mengen von Ätzkali und absolutem Alkohol wieder zugefügt und 5 Stunden gekocht, während welcher Zeit wieder Essigsäure zutropfte. Die weitere Verarbeitung war ganz gleich der nach der Methylierung. Es wurden im ganzen 200 g Gelatine verarbeitet und nach viermaligem Aussalzen mit Ammonsulfat 44·2 g trockene Substanz erhalten. Die Ausbeute an aussalzbarem Eiweiß, hier 22 g, ist demnach geringer wie sie nach erfolgter Methylierung war (bis 50%).

Diese Substanz wurde nun genau in derselben Art wie die methylierte Gelatine mit Salzsäure hydrolysiert und weiter behandelt. Hier trat im Eiskasten schon nach 4 Stunden Krystallisation ein und nach 1 Tag war die Masse erstarrt. Nach fünftägigem Stehen wurde filtriert und 7·1 g Trockensubstanz erhalten, die alle Eigenschaften des Chlorhydrats der Glutaminsäure hatte.

Das Filtrat von der Glutaminsäure gab verestert 4·1 g Chlorhydrat des Glykokollesters und aus dessen Mutterlauge wurden in weiterer Anwendung der Methode von E. Fischer die Ester gewonnen und im Vakuum destilliert.<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> Rechnet man auf Prozente um und vergleicht man diese mit den Prozentzahlen, die sich aus den Fischer'schen Zahlen für Gelatine ergeben, so treten große Unterschiede auf, die schwer zu erklären sind.

Bis 55°	gingen über	3·45 g
55 bis 100°	»	» 11·95 g
100 » 130°	»	» 6·15 g
130 » 160°	»	» 4·80 g
Rückstand		5 g

Das Filtrat von der geringen Krystallisation von Glutaminsäure, aus der methylierten Gelatine erhalten, wurde nun neuerdings zweimal verestert. Glykokoll schied sich nicht mehr ab. Die freien Ester wurden mit NaOH und  $K_2CO_3$  abgeschieden und schließlich im Vakuum destilliert. Es ging über:

	Prozente		E. Fischer
Bis 55°	2·1 g	2·3	5·2
55 bis 100°	14·8 g	16·1	16·5
100 » 130°	9·7 g	10·5	3·3
130 » 160°	4·5 g	4·9	2·3
Rückstand	10·0 g	33·8	27·3

Die Estermengen sind von jenen, die aus der Gelatine von E. Fischer erhalten werden, nicht auffallend verschieden. Siehe dagegen die frühere Anmerkung.

Die Fraktion bis 55° hinterließ, mit Wasser bis zum Verschwinden der alkalischen Reaktion gekocht, eine sehr kleine Menge Substanz. Sie bestand also im wesentlichen aus Alkohol. Fraktion 55 bis 100°. Die Hauptmenge ging gegen 55° über. Sie wurde in gleicher Weise behandelt und gab drei aufeinanderfolgende Krystallisationen 1·4 g, 0·95 g und 0·75 g und endlich einen ganz geringfügigen Abdampfrückstand.

Die Krystallisation wurde durch abgestuftes Umkrystallisieren aus Wasser gereinigt.

Skraup und Böttcher			E. Fischer
40 bis	55°	7·8	5·2
55 »	100°	27·0	16·5
100 »	130°	13·9	3·3
130 »	160°	10·9	2·4
		59·6	27·4

Krystallisation 1 (Fusionspunkt 240°):

0·1994 g gaben 0·2957 g CO<sub>2</sub> und 0·1430 g H<sub>2</sub>O.

Nochmals umkrystallisiert:

0·1033 g gaben 0·1531 g CO<sub>2</sub> und 0·0727 g H<sub>2</sub>O.

In 100 Teilen:

	Berechnet für C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub> N	Gefunden	
		I	II
C .....	40·45	40·44	40·42
H .....	7·87	8·02	7·87

Die anderen Krystallisationen wurden vorerst mit Alkohol ausgekocht. Unlöslich 1·5 g. Der Alkohol hinterließ 0·2 g krystallisierte Substanz.

Der in Alkohol unlösliche Teil ist der Hauptmenge nach wieder Alanin.

0·1507 g gaben 0·2160 g CO<sub>2</sub> und 0·1035 g H<sub>2</sub>O.

In 100 Teilen:

	Gefunden
C .....	39·2
H .....	7·6

Fraktion bis 130°. Verseifung mit Baryt. Das unlösliche Barytsalz hinterließ mit Schwefelsäure gekocht nur sehr geringe Mengen. Ob Asparaginsäure vorliegt, war nicht zu entscheiden. Das barythältige Filtrat, von Baryt mit Schwefelsäure befreit, gab eine Reihe von Krystallisationen und einen Syrup, der mit einem ähnlichen Syrup der nächst höher siedenden Fraktion vereinigt wurde.

Die erste und dritte der Krystallisationen wurde analysiert.

0·1537 g gaben 0·3014 g CO<sub>2</sub> und 0·1341 g H<sub>2</sub>O.

0·1054 g gaben 0·1962 g CO<sub>2</sub> und 0·0872 g H<sub>2</sub>O.

In 100 Teilen:

	Leucin berechnet	Gefunden	
		I	II
C .....	54·96	53·48	50·77
H .....	9·92	9·76	9·26

Die überwiegende Hauptmenge der krystallisierenden Substanz ist demnach Leucin.

Fraktion 130 bis 160°. Sie wurde in Wasser gelöst und zum Nachweis von Phenylalanin mit Petroläther extrahiert. Dieser lieferte nur kleine Mengen (0·1 bis 0·25 g) eines krystallinischen Chlorhydrats, das mit Chromsäure dem Geruch nach Phenylacetaldehyd gab. Hierauf wurde mit Baryt verseift und dieser dann mit Schwefelsäure entfernt. Das Filtrat dunstete syrupös ein; es wurde zur Trennung von Pyrrolidincarbonsäure von anderen Leucinsäuren in üblicher Art wiederholt mit Alkohol behandelt.

Der alkohollösliche Teil wurde mit dem alkohollöslichen Syrup der niedriger siedenden Esterfraktion vermengt und in das Kupfersalz verwandelt. Es wurde das in Alkohol schwerlösliche Kupfersalz der racemischen Pyrrolidincarbonsäure erhalten, welches mit Schwefelwasserstoff in die freie Säure verwandelt wurde, diese mit Alkohol nochmals von Aminosäuren befreit und wieder in das Kupfersalz übergeführt. Erhalten 0·9 g.

0·2348 g gaben 0·0650 g CuO.

In 100 Teilen:

	Berechnet für $C_{10}H_{16}O_4N_2Cu$	Gefunden
Cu .....	21·8	22·1

Das erste Filtrat vom racemischen Kupfersalz wurde in bekannter Weise auf die Phenylisocyanatverbindung der aktiven Pyrrolidincarbonsäure, beziehungsweise ihr Anhydrid verarbeitet.

Die umkrystallisierte Substanz (1·4 g) gab den Fusionspunkt 139 bis 140°, während E. Fischer für die reine Substanz 143° angibt. Auch bei der Analyse zeigte sich ein nicht unerhebliches Plus an Stickstoff.

0·1702 g gaben 20·4  $cm^3$  N bei 17·5° und 745 mm.

0·1907 g gaben 23·2  $cm^3$  N bei 17° und 739 mm.

In 100 Teilen:

	Berechnet für $C_{12}H_{12}O_2N_2$	Gefunden	
		I	II
N .....	12·96	13·78	13·90

Nochmals umkrystallisiert:

0·1408 g gaben 0·3447 g CO<sub>2</sub> und 0·0704 g H<sub>2</sub>O.

In 100 Teilen:

	Berechnet	Gefunden
C .....	66·67	66·77
H .....	5·57	5·59

Es ist aber doch sicher, daß die aktive Pyrrolidincarbon-  
säure vorliegt.

Der Rückstand der Esterdestillation, 10 g, wurde in verdünnter Salzsäure gelöst, durch Behandeln mit einem Gemenge von Zinnchlorür und Bleiacetat, schließlich Schwefelwasserstoff entfärbt und zum Syrup gedampft. Nach einigen Tagen waren im Eisschrank sehr unreine Krystalle (2·5 g) entstanden, die, durch Umkrystallisieren gereinigt, 1 g wogen. Sie hatten das Ansehen des Chlorhydrates der Glutaminsäure und auch ungefähr deren Zusammensetzung.

0·1642 g gaben 0·1935 g CO<sub>2</sub> und 0·0821 g H<sub>2</sub>O.

0·1221 g gaben 0·0964 g AgCl.

In 100 Teilen:

	Berechnet für C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> NO <sub>4</sub> Cl	Gefunden
C .....	32·7	32·14
H .....	5·45	5·59
Cl .....	19·3	19·9

Aus dem Rest wurde mit Silberoxyd das Chlor genau gefällt, die nach dem Eindampfen und Umkrystallisieren erhaltene Säure schmolz bei 196 bis 197° (unkorr.).

Die Salzmasse, welche beim Ausschütteln der Ester mit Äther abfällt, wurde in etwas überschüssiger Salzsäure gelöst und durch wiederholtes Eindampfen und Extrahieren mit Alkohol die organische Substanz von den Alkalichloriden tunlichst befreit. Als dann die konzentrierte Lösung, welche die organischen Verbindungen enthielt, mit Salzsäuregas gesättigt wurde, hatte sich auch nach 40tägigem Stehen im Eisschrank nichts abgeschieden.

#### Hexonbasen.

Es war nach den früheren Erfahrungen beim Casein nicht unwahrscheinlich, daß auch bei der Gelatine durch Methylierung

eine Veränderung der Hexonbasen erfolgt. Um experimentell sicher zu gehen, wurde auch hier die Kossel-Kutscher'sche Methode an der Gelatine selber eingeübt. Es wurden 30 g verwendet und die modifizierte Methode<sup>1</sup> in Anwendung gebracht. Die einzige Abweichung war die, daß zur ersten Fällung von Histidin und Arginin nicht Silbersulfat, sondern frisch gefälltes Silberoxyd in die etwas überschüssige Schwefelsäure enthaltende Lösung eingetragen wurde.

Es wurde erhalten:

	Gefunden	Erfahrungsgemäß
Histidinchlorhydrat 0·23 g, Histidin in Prozenten	0·6	0·4
Argininnitrat 2·95 g, Arginin in Prozenten . . . . .	8·3	9·3
Lysin pikratumkrystallisiert, Zersetzungspunkt 254 bis 255°, 2·95 g, Lysin in Prozenten . . . . .	4·6	6·0

Die gefundenen Werte stimmen also annähernd mit jenen überein, die im Cohnheim'schen Buch angegeben sind.

### Methylgelatine.

Es wurden 30 g (entsprechend 28 g Trockensubstanz) mit 180 g Wasser und 90 g konzentrierter Schwefelsäure 14 Stunden gekocht, im übrigen verfahren wie bei der Gelatine angegeben ist. Im Laufe der Operation fiel schon die relativ kleine Menge der Silberniederschläge auf. Von rohem Histidinchlorhydrat wurden 0·04 g, entsprechend einem Histidin-gehalt von 0·01%, erhalten, von Argininnitrat 0·25 g, entsprechend 0·9% Arginin.

Das Phosphorwolframat, welches das Lysin enthalten sollte, wurde in üblicher Weise auf das Pikrat verarbeitet. Es fiel ein nicht krystallisierendes Öl aus. Weder durch partielles Extrahieren mit Alkohol, noch sonst war es zum Krystallisieren zu bringen. Auch die alkoholische Lösung, aus der es ausfiel, gab keine Krystalle. Man kann deshalb annehmen, daß Lysin nicht vorhanden, das in der Gelatine existierende Lysin demnach bei der Methylierung verändert worden ist.

<sup>1</sup> Zeitschrift für physiol. Chemie, 38, 39 (1903).

### Farbenreaktionen.

Je 1·5 g käuflicher Gelatine und Methylgelatine wurden in 20  $cm^3$  Wasser gelöst; gleiche Volumen der zwei Lösungen wurden mit genau abgemessenen Mengen der Reagentien vermischt. Die Biuretreaktion, die Reaktionen mit  $\alpha$ -Naphthol und Thymol treten in vollständig gleicher Weise ein. Nur bei der Xanthoproteinreaktion war ein kleiner Unterschied zu bemerken. Die Methylgelatine gab eine deutlichere Gelbfärbung und auf Zusatz von Ammoniak war bei ihr der Farbumschlag in Rot viel lebhafter.

---