

Über die Methylierung der Eiweißstoffe

Von

J. Herzig, k. M. K. Akad., und Karl Landsteiner

Aus dem I. Chemischen Laboratorium der k. k. Universität in Wien

(Vorgelegt in der Sitzung am 10. Jänner 1918)

I. Einwirkung von Diazomethan.¹

Die seinerzeit von uns² publizierten Versuche über die Methylierung von Eiweißstoffen mittels Diazomethan ergaben, daß die einzelnen Körperklassen (Proteine, Protamine, Peptone) sich voneinander in bezug auf ihre Methylierbarkeit bis zu einem gewissen Grade unterscheiden, daß aber innerhalb dieser Gruppen, so verschieden sich die Verbindungen auch sonst verhalten mögen, in bezug auf die Menge der sowohl am Sauerstoff als auch am Stickstoff aufgenommenen Gruppen sich nur geringe Unterschiede nachweisen lassen. Die Werte für OCH_3 bewegten sich bei den untersuchten Proteinen (Kasein, Gelatine, Serumeiweiß vom Pferd, Edestin und Seidenfibroin) innerhalb der Grenzen 3·68 und 4·86% OCH_3 , für CH_3 am Stickstoff (wenn man vom Seidenfibroin absieht) innerhalb 3·72 und 5·34% CH_3 . Beim Seidenfibroin ergab sich für Methylimid eine viel geringere Zahl, wobei allerdings zu bemerken war, daß die Bestimmung schon nach einmaligem Behandeln mit Diazomethan ausgeführt worden war. Bei einer weiteren Untersuchung zeigte es sich, daß in

¹ Die experimentellen Tatsachen sind von Herrn F. Zipperer und Fr. M. Quittner ermittelt worden.

² Biochem. Zeitschr., 61, 458 (1914).

der Tat der beim Seidenfibroin mit 2·77% seinerzeit gefundene Wert für CH_3 am N einen Grenzwert darstellt, da nach sechsmaliger weiterer Behandlung mit Diazomethan wieder nur 2·91% gefunden wurden und dieser Wert auch bei weiterer sechsmaliger Behandlung nur 2·79% betrug. Der Wert für CH_3 am N ist also konstant geblieben, und zwar merklich kleiner als bei den anderen Proteinen. Bei dieser intensiven Behandlung ist außerdem die Zahl für OCH_3 von 4·22 auf 4·80 beziehungsweise 4·93% OCH_3 gestiegen.

Im Anschlusse hieran ist dann auch Wolle einem genauen Studium unterworfen worden. Dieses Produkt ist uns von Hofrat Suida gütigst überlassen worden und war vollkommen entfettet und appreturfrei. Es war dasselbe Material, welches er seinerzeit¹ für seine ausgedehnten Untersuchungen verwendet hat. Die Wolle zeigte sich merkwürdigerweise gegen Diazomethan viel resistenter als die bisher untersuchten Stoffe dieser Körperklasse. Trotzdem konnten aber bei wiederholter Behandlung die bisher beobachteten Grenzwerte erhalten, ja zum Teil ein wenig überschritten werden. Der Gang der Reaktion soll aus folgender Zusammenstellung ersichtlich werden:

- I. Nach zweimaliger Behandlung war der Gehalt 1·76% OCH_3 und 3·09% CH_3 am N.
- II. Nach weiterer zweimaliger Behandlung war der Gehalt 3·13% OCH_3 und 4·00% CH_3 am N.
- III. Nach weiterer zweimaliger Behandlung war der Gehalt 3·40% OCH_3 und 4·74% CH_3 am N.
- IV. Nach weiterer zweimaliger Behandlung war der Gehalt 4·50% OCH_3 und 5·16% CH_3 am N.

Schließlich wurden nach weiterer zehnmaliger Behandlung Daten erhalten, welche wohl sehr wahrscheinlich die eigentlichen Grenzwerte darstellen, und zwar 5·89% OCH_3 und 6·28% CH_3 am N.

Nachdem sich nun bei Seide eine merkliche Abweichung von den bisher untersuchten Proteinen ergeben hat, sind wir dann zur Untersuchung einer anderen Klasse von Eiweiß-

¹ Mon. f. Chem., 25, 1107 (1904); 26, 413 und 855 (1905); 27, 225 und 1193 (1906).

stoffen übergegangen, und zwar der alkohollöslichen Eiweißstoffe der Getreidearten. Für die Wahl dieser Körper war hauptsächlich der Umstand maßgebend, daß sie in bezug auf die Bausteine zu den bestaufgeklärten Substanzen der Eiweißgruppe gehören. So kennt man nach Osborne beim Gliadin aus Weizen 83·8%, beim Zein aus Mais 85·4% an Spaltprodukten. Das Studium dieser Eiweißstoffe wurde durch die Kriegsverhältnisse sehr behindert, indem beispielsweise beim Zein sich aus Mangel an Material sehr bald die Unmöglichkeit weiterer Versuche ergab. Es war aber möglich, eine größere Partie Gliadin aus Weizen herzustellen, so daß diese Verbindung etwas genauer untersucht werden konnte. Das Gliadin wurde nach der Methode von Abderhalden¹ dargestellt, welche eine qualitativ und quantitativ befriedigende Ausbeute liefert.

Was zunächst die gemeinsamen Eigenschaften des Zeins und Gliadins betrifft, so ist zu erwähnen, daß beiden Substanzen offenbar eine, wenn auch geringe Tendenz zur Veresterung beim Behandeln mit Alkohol allein ohne jeglichen Zusatz einer Mineralsäure zuzukommen scheint. Infolgedessen war in der Regel schon bei den Eiweißkörpern selbst ein höherer Methoxylgehalt (1 bis 1·4%) als bei anderen Proteinen zu konstatieren. Auch in bezug auf CH_3 am N waren die Werte bei beiden Substanzen etwas höher als gewöhnlich. Die Zahlen lagen zwischen 1·14 und 2·26%. Gegen Diazomethan erweist sich das Zein ziemlich resistent, während das Gliadin rasch die Maximalzahlen erreichen ließ. Es soll nunmehr der Gang der einzelnen Reaktionen angegeben werden.

Zein mit Diazomethan in ätherischer Lösung bis zum Verschwinden desselben behandelt, lieferte ein Präparat, das 1·98% OCH_3 und 2·84% CH_3 am N enthält. Diese Einwirkung wurde genau in derselben Weise viermal wiederholt, ohne daß sich eine erhebliche Steigerung des Wertes für CH_3 am Stickstoff eingestellt hätte. (Gefunden 3·17% OCH_3 und 2·92% CH_3 am N.)

¹ Abderhalden, Handbuch der biochem. Arbeitsmethoden. II. Band. p. 321 (1910).

Da das Zein sehr hart war und sich sehr schwer zerkleinern ließ, konnte man als Ursache für die Trägheit der Reaktion an rein mechanische Momente, nämlich das Nichteindringen der Flüssigkeit, denken. Das bereits teilweise methylierte Zein ($3 \cdot 17\%$ OCH_3 und $2 \cdot 92\%$ CH_3 am N) wurde daher in viel Methylalkohol gelöst, mit Diazomethan behandelt und die nach dem Abdestillieren des Äthers und Alkohols im Vakuum getrocknete Masse bei 100° bis zur Konstanz getrocknet und analysiert. Gefunden $4 \cdot 17\%$ OCH_3 und $2 \cdot 84\%$ CH_3 am Stickstoff.

Betrachten wir unsere Versuchsreihe:

- I. $1 \cdot 98\%$ OCH_3 , $2 \cdot 84\%$ CH_3 am N
- II. $3 \cdot 17\%$ OCH_3 , $2 \cdot 92\%$ CH_3 am N
- III. $4 \cdot 17\%$ OCH_3 , $2 \cdot 84\%$ CH_3 am N

im Zusammenhang, so ist jedenfalls eine ziemliche Resistenz gegen die Methylierbarkeit am Sauerstoff zu konstatieren und außerdem weichen die für CH_3 am N erzielten Grenzwerte deutlich von der Norm ab.

Demgegenüber hat Gliadin schon nach einmaliger Behandlung den gewöhnlichen Grenzwert bereits etwas überschritten und liefert bei der weiteren Behandlung die höchste bis jetzt bei den Eiweißstoffen erzielte Methoxylzahl. Das CH_3 am N betreffend, verhält sich Gliadin genau so wie Zein und sind die erreichten Grenzwerte nahezu identisch ($2 \cdot 84$ und $2 \cdot 56\%$ CH_3 am N).

Gliadin, mit einem Überschuß von Diazomethan behandelt, liefert ein Produkt, welches folgende Zahlen gibt:

- I. Nach einmaliger Behandlung $5 \cdot 93\%$ OCH_3 und $1 \cdot 75\%$ CH_3 am N.
- II. » neuerlicher » $5 \cdot 68$ » » $2 \cdot 13$ » » »
- III. » » » $7 \cdot 06$ » » $2 \cdot 56$ » » »

Um die einfachen Methylierungen mit Diazomethan zu erledigen, soll noch eines Versuches gedacht werden, den wir mit nichtkoaguliertem Serumeiweiß vom Pferd ausgeführt haben. Das nichtkoagulierte Eiweiß verhielt sich ganz ähnlich dem bisher untersuchten koagulierten Produkt.

II. Die Einwirkung von methylalkoholischer Salzsäure.¹

Im Anschluß an die von uns² publizierten Versuche ist parallel mit der Einwirkung von Diazomethan auch das Studium der Reaktion von Methylalkohol und Salzsäure auf die eben abgehandelten Substanzen unternommen worden. Was die Ausführung der nun folgenden Versuche betrifft, so soll erwähnt sein, daß wir einer noch nicht publizierten Versuchsreihe Zipperer's folgend, immer mit einprozentiger methylalkoholischer Salzsäure durch 10 Stunden am Rückflußkühler gekocht haben.

In dieser Art behandelt, lieferte das Seidenfibroin nach dem Trocknen bei 100° 1·22% OCH₃. Bei einer Wiederholung des Versuches war die Esterzahl³ 1·40% OCH₃. Der Wert für CH₃ am Stickstoff lag wie bei allen bisherigen Versuchen mit alkoholischer Säure innerhalb der bekannten Grenzen für die unveränderten Proteine, so daß die Tatsache als feststehend zu betrachten ist, daß bei der Einwirkung von alkoholischer Säure keine nennenswerte Alkylierung am Stickstoff stattfindet. Das Seidenfibroin zeigt also ein eigenartiges Verhalten, da es die geringste bis jetzt beobachtete Esterzahl ergeben hat. Nun war allerdings wegen des hohen Tyrosingehaltes eine von der Ätherzahl abweichende Esterzahl zu erwarten, aber die Differenz ist so groß, daß sie durch den Tyrosingehalt allein nicht erklärt werden kann. Das Präparat mit 1·22% OCH₃ liefert schon nach einmaliger Behandlung mit Diazomethan nahezu die im früheren Kapitel für das Seidenfibroin angegebenen Werte für OCH₃ und CH₃ am N.

Im Gegensatz zum Seidenfibroin zeigt die Wolle ein ziemlich normales Verhalten, indem nach der Behandlung mit Methylalkohol und Salzsäure die Analyse der bei 100° getrockneten Substanz folgende Zahlen gab:

3·80% OCH₃ und 1·49% CH₃ am Stickstoff.

¹ Bearbeitet von F. Zipperer und M. Quittner.

² Biochem. Zeitschr., 61, 458 (1914).

³ Der Einfachheit halber möge die mit Diazomethan erhaltene Methoxyzahl, wenn auch nicht ganz korrekt, als Ätherzahl, die mit methylalkoholischer Salzsäure erlangte als Esterzahl bezeichnet werden.

Bei dieser Gelegenheit soll einer von den vielen Fällen namhaft gemacht werden, wobei die von uns gewöhnlich benutzte Methode¹ mit der nach Kirpal und Bühn² verglichen worden ist. Nach Kirpal wurde bei der eben erwähnten Substanz (3·80% OCH₃ und 1·49% CH₃ am N) gefunden:

- I. 4·11% OCH₃ und 1·22% CH₃ am N.
 II. 3·89% OCH₃ und 1·22% CH₃ am N.

Die Übereinstimmung läßt, wie auch bei allen anderen nicht direkt angeführten Versuchen, nichts zu wünschen übrig. Die Esterzahl der Wolle entspricht demnach der Esterzahl der anderen Eiweißkörper. Demgegenüber erwies sich die Wolle, wie schon oben erwähnt, gegen die Einwirkung von Diazomethan ziemlich resistent, obwohl allerdings bei der sehr intensiven Behandlung die üblichen Grenzwerte erlangt werden konnten.

Diese Resistenz gegen Diazomethan zum Unterschied gegen methylalkoholische Salzsäure konnte auch durch die physikalische Struktur der Wolle bedingt sein. Herr Dozent Dr. Wasicky hatte die Güte, die Wolle in dieser Richtung mikroskopisch zu untersuchen. Er teilte uns hierüber folgendes mit:

»Die Bezeichnung war:

- A = Wolle mit methylalkoholischer HCl behandelt.
 B = Wolle mit Methylalkohol allein behandelt.
 C = ursprüngliche Wolle von Suida.

Im mikroskopischen Bild unterscheidet sich die Wolle A von C darin, daß die einzelnen Haare gequollen erscheinen, und zwar auf Kosten der Faserschicht. Es macht den Eindruck, als sei in die Faserschicht die Lösung einer Substanz eingetreten und dadurch sogar Mazeration erfolgt. Mechanisch wurde dann auch dadurch an vielen Stellen die Kutikala lädiert. Die Wolle B zeigt ein ähnliches Bild, aber nicht so weit vorgeschritten«.

Wir haben mit Rücksicht auf diesen Befund die mit methylalkoholischer Salzsäure behandelte Wolle der weiteren Einwirkung von Diazomethan unterworfen, in der Erwartung, daß nunmehr sehr schnell die Grenzwerte erreicht sein werden.

¹ Biochem. Zeitschr., 61, 458 (1914).

² Berl. Ber., 47, 1084 (1914); Mon. f. Chem., 36, 853 (1915).

Dies ist in bezug auf den Gehalt an CH_3 am Stickstoff fast vollkommen der Fall und auch der Gehalt an OCH_3 steht nur noch sehr wenig zurück. Die mit methylalkoholischer Substanz behandelte Wolle ($3\cdot80\%$ OCH_3 und $1\cdot49\%$ CH_3 am N) ergab nach einmaliger Behandlung mit Diazomethan $4\cdot38\%$ OCH_3 und $5\cdot27\%$ CH_3 am N.

Um nun zu der Klasse der alkohollöslichen Eiweißkörper überzugehen, so ist aus dem früher Gesagten bereits ersichtlich, daß Zein in bezug auf die Methylierbarkeit am Sauerstoff bei der Behandlung mit Diazomethan viel widerstandsfähiger ist als Gliadin, daß aber in beiden Fällen gleichmäßig die normalen Grenzwerte für CH_3 am N nicht erreicht werden konnten.

Wie die folgenden Versuche zeigen, nehmen die beiden alkohollöslichen Eiweißkörper auch insofern eine Ausnahmestellung ein, als die gefundenen Esterzahlen die größten bis jetzt beobachteten darstellen. So konnte beim Zein nach zehnstündigem Kochen mit einprozentiger methylalkoholischer Salzsäure die Esterzahl $6\cdot18\%$ OCH_3 erhalten werden. Bei einem zweiten, neuerdings dargestellten Zein war die Esterzahl $5\cdot47\%$ OCH_3 . Die Zahl für CH_3 am N hielt sich in den für Zein selbst ermittelten Grenzwerten. Die beiden mit methylalkoholischer Salzsäure behandelten Zeinpräparate ergaben, mit Diazomethan behandelt, Produkte, welche eine noch höhere Methoxylzahl lieferten, während der Gehalt an CH_3 am N den Grenzwert erreicht, welcher oben für das Zein bei der Behandlung mit Diazomethan angegeben wurde. Das Zein mit der Esterzahl $6\cdot18$ lieferte bei der Behandlung mit Diazomethan ein Produkt mit $8\cdot26$, während das mit der Esterzahl $5\cdot47$ bei der gleichen Behandlung ein Präparat von $7\cdot02\%$ OCH_3 gab. CH_3 am N war $2\cdot88\%$. Es lag nahe, diese bemerkenswerten Eigenschaften mit dem Gehalt an Glutaminsäure¹ in Zusammenhang zu bringen. Man konnte daher vermuten, daß das Gliadin, welches bekanntermaßen mehr Glutaminsäure enthält als das

¹ Das nach Osborne vorhandene Glutamin kann möglicherweise durch die Einwirkung der methylalkoholischen Salzsäure in die Säure rückverwandelt werden.

Zein,¹ dieses Verhalten noch im stärkeren Maße zeigen wird. In der Tat lieferte das Gliadin mit einprozentiger methylalkoholischer Salzsäure eine etwas höhere Esterzahl als Zein. Es sind aber außerdem weitere Beobachtungen gemacht worden, welche dahin zu deuten sind, daß bei dieser gelinden Einwirkung bereits eine schwache hydrolytische Spaltung vor sich zu gehen scheint.

Bei der Diskussion unserer ursprünglichen Resultate haben wir² geltend gemacht, daß die Einwirkung von alkoholischen Säuren anscheinend eine sehr gelinde ist und daß die vom Eiweiß abfiltrierte Flüssigkeit nicht oder nur sehr wenig gefärbt ist, daß das Eiweiß selbst nie gelb ist, sondern weiß bleibt und daß außerdem bei den daraufhin quantitativ verfolgten Darstellungen ein sehr geringer Gewichtsverlust zu verzeichnen ist. Ja es wurde sogar einmal eine geringe Gewichtszunahme beobachtet. Alle diese Tatsachen sind nun für das Gliadin nicht mehr zutreffend.

Schon bei der Behandlung mit einprozentiger methylalkoholischer Salzsäure ist eine schwache, aber doch deutliche Färbung zu beobachten, außerdem bleibt die Substanz nicht ungelöst, sondern sie geht zum Teil in Lösung. Aus dieser Lösung läßt sich durch Äther noch ein geringer Teil ausfällen, während der nicht fällbare Rest erst durch Abdunsten im Vakuum gewonnen werden kann. Versuche, die Menge dieser Fraktion quantitativ zu ermitteln, zeigten, daß es sehr schwer ist, auch bei sehr vorsichtigem Arbeiten übereinstimmende Resultate zu erhalten. Als feststehend kann aber bezeichnet werden, daß das Gliadin, wie schon erwähnt, eine höhere Esterzahl liefert und daß in der alkohollöslichen, mit Äther fällbaren Substanz in der Regel eine gleich hohe, bisweilen sogar eine etwas höhere Esterzahl nachgewiesen werden kann. So z. B. ergab in einem Falle das ungelöste Produkt 6.78% OCH_3 , das gelöste, mit Äther gefällte 7.09% OCH_3 . Das unlösliche Produkt mit dem Gehalt von

¹ Zein nach Osborne 26.20% Glutaminsäure, Gliadin nach Osborne 43.70% Glutaminsäure.

² L. c.

6·78% OCH_3 lieferte, mit Diazomethan behandelt, ein Produkt mit 9·19% OCH_3 und 2·65% CH_3 am N.

Die Steigerung des Methoxylgehaltes bei dem mit methylalkoholischer Salzsäure behandelten Zein und Gliadin durch Einwirkung von Diazomethan ist wohl kaum ganz auf Rechnung vorhandener gegen die Wirkung der methylalkoholischen Salzsäure indifferenten phenolischer Hydroxylgruppen zu setzen.

Eine unvollkommene Veresterung, beziehungsweise eine Wiederverseifung muß jedenfalls zur Erklärung herangezogen werden, aber diese könnte ebensogut beim hydrolysierten wie beim nichthydrolysierten Teil stattfinden. Diese Tatsache allein muß also nicht unbedingt im Sinne einer eingetretenen Spaltung gedeutet werden. Wie oben erwähnt, sind aber für die partielle Hydrolyse schon bei der Reaktion einer einprozentigen methylalkoholischen Salzsäure andere deutliche Anzeichen vorhanden. Noch viel auffallender treten sie auf, wenn man zur Einwirkung der dreiprozentigen methylalkoholischen Salzsäure übergeht. Auch hier haben wir bei parallelen Versuchen zur quantitativen Bestimmung der einzelnen Fraktionen keine brauchbare Übereinstimmung der Zahlen erzielen können, weil immer eine gewisse Menge von Substanz im Kolben haften blieb, welche sich nicht entfernen ließ. Immerhin konnten wir konstatieren, daß die Summe des ungelösten und des mit Äther gefällten Produktes kaum die Hälfte der ursprünglichen Substanz ausmacht, so daß also jedenfalls die Hälfte des Ausgangsmaterials bereits als hydrolysiert anzusehen wäre. Andererseits liefern die mit dreiprozentiger methylalkoholischer Salzsäure erhaltenen Produkte nahezu den gleichen Methoxylgehalt wie die oben erwähnten mit einprozentiger methylalkoholischer Salzsäure dargestellten. Wir erhielten z. B. bei zwei unlöslichen Produkten 6·37 und 7·34% OCH_3 und 8·57, beziehungsweise 9·68% OCH_3 bei den mit Äther gefällten Produkten.

Um uns ein beiläufiges Urteil über den Grad der Spaltung zu verschaffen, ist bei einem Versuche mit dreiprozentiger methylalkoholischer Salzsäure nicht nur das Ungelöste und das mit Äther Gefällte, sondern auch der sirupöse Rückstand untersucht worden. Während die beiden ersten Produkte bei

100° zur Gewichtskonstanz getrocknet wurden, konnte der Rückstand nur im Vakuum getrocknet zur Analyse gebracht werden. Dabei ergab sich das Resultat, daß der Rückstand keine größere Esterzahl lieferte als die beiden anderen Fraktionen. Es wurden beim Ungelösten 6·37% OCH_3 , beim Gelösten und Gefällten 5·57% OCH_3 beim Rückstand, der selbstverständlich als salzsaures Salz eines Esters betrachtet werden muß, 6·54% CH_3 erhalten. In der Erwartung, daß hier bereits eine sehr vorgeschrittene Hydrolyse vorliegt und daß die in Betracht kommenden Aminosäuren sich normal verhalten werden, haben wir im Rückstand eine viel höhere Methoxylzahl erwartet.

Aus dem geringen Methoxylgehalt konnte man den Schluß ziehen, daß die Hydrolyse noch eine unvollständige wäre. Allerdings muß auch die Möglichkeit berücksichtigt werden, daß eine unvollkommene Veresterung der gebildeten Aminosäuren stattgefunden haben könnte.

Direkte Versuche haben nun tatsächlich gezeigt, daß die Glutaminsäure gegen die Einwirkung von methylalkoholischer Salzsäure ziemlich resistent ist und daß sie sich ganz besonders empfindlich gegen die Menge der zur Anwendung kommenden Salzsäure erweist. Bei Anwendung von 50 cm^3 der dreiprozentigen methylalkoholischen Salzsäure auf 3 g Glutaminsäure erhielten wir nach dem Abdestillieren im Vakuum einen Sirup, welcher vakuumtrocken nur 4·22% OCH_3 enthielt, während das Chlorhydrat des sauren Esters der Glutaminsäure 15·69% OCH_3 verlangt. Diese auffallende Tatsache bewog uns, den Versuch zu wiederholen.

Das Resultat des zweiten Versuches mit der gleichen Menge war ein Produkt von dem Gehalt von 4·80% OCH_3 . Nach dem Kochen der gleichen Menge mit 150 cm^3 dreiprozentiger methylalkoholischer Salzsäure wurde die Methoxylzahl des Chlorhydrats des sauren Esters erreicht. (Gefunden 15·20% OCH_3 , berechnet 15·69% OCH_3) und diese Zahl ist bei Anwendung von 300 cm^3 der dreiprozentigen methylalkoholischen Salzsäure auf die gleiche Menge der Glutaminsäure nur um ein Geringes überschritten worden (gefunden 17·82% OCH_3). Es ist daher wegen des abnormalen Verhaltens der

Glutaminsäure trotz des geringen Methoxylgehaltes des Rückstandes beim Gliadin die Möglichkeit vorhanden, daß die Hydrolyse ziemlich weit vorgeschritten war.

Auch gegen die Einwirkung von Diazomethan ist die Glutaminsäure merkwürdig widerstandsfähig. Mit einem Überschuß von Diazomethan durch 24 Stunden behandelt, ergab sie ein Produkt mit 5.58% OCH_3 , also einem Bruchteil des Gehaltes des sauren Methylesters.

Das Verhalten der Aminosäuren gegen die oben erwähnten Agentien betreffend, sei erwähnt, daß ausgedehnte, noch nicht publizierte Versuche des im Felde befindlichen Herrn Schuster¹ gezeigt haben, daß sich viele Aminosäuren gegen Diazomethan ziemlich normal verhalten. Es sind aber auch ganz merkwürdige, vorläufig nicht aufgeklärte Ausnahmen beobachtet worden. In bezug auf das Verhalten gegen methylalkoholische Salzsäure sind in der Literatur Beobachtungen vorhanden, welche auf die leichte Methylierbarkeit auch mit verdünnten alkoholischen Mineralsäuren hinweisen. Daneben sind auch in einzelnen Fällen gegenteilige Erfahrungen zu verzeichnen. Nach eigenen Versuchen können wir mitteilen, daß beispielsweise Leucin normal reagiert. 1 g Leucin mit 100 cm^3 einer einprozentigen methylalkoholischen Salzsäure gekocht, lieferte ein Produkt von der Esterzahl 14.40 , mit 150 cm^3 einer dreiprozentigen methylalkoholischen Salzsäure 16.56 , während die salzsaure Verbindung des Methylesters 17.08 erfordert.

Aus dem oben Erwähnten folgt, daß durch die Bestimmung des Methoxylgehaltes allein eine Entscheidung über den Grad der Hydrolyse nicht möglich ist.

Nachdem andererseits für die Bestimmung des Aminosäurestickstoffes nach van Slyke oder Sörensen nicht mehr genügend Material vorhanden war, muß die Untersuchung bis

¹ Ein Teil der Resultate erscheint bereits in der Publikation von Herzig und Landsteiner (Einlauf 10. März 1914) vorläufig angezeigt. Später (Einlauf 21. April 1914) sind dann zum Teil widersprechende Beobachtungen von Geake und Nierenstein (Zeitschr. f. physiol. Chem., 92, 149 [1914]) mitgeteilt worden.

auf den Moment verschoben werden, wo die Beschaffung einer größeren Menge Gliadin möglich sein wird.

Die Frage, ob bei der Veresterung von Proteinen und Polypeptiden nicht auch gleichzeitig Hydrolyse eintritt, ist in der Literatur schon diskutiert und je nach der Natur des untersuchten Produktes und der Methode des Autors¹ verschieden beantwortet worden. Es scheinen Verhältnisse in Betracht zu kommen, die von Fall zu Fall sehr verschieden ins Gewicht fallen und auch sehr geringe Spuren Wasser scheinen eine bedeutende Rolle spielen zu können. Immerhin sind Esterifizierungen ohne jede Hydrolyse bei der Einwirkung von mit Salzsäure gesättigtem Alkohol, zum Teil sogar in der Wärme, als konstatiert zu betrachten. Mit Rücksicht hierauf waren wir daher bei der starken Verdünnung der in Anwendung gebrachten Salzsäure (1⁰/₀) wohl berechtigt, keine Hydrolyse zu erwarten, zumal bei den früheren Versuchen (z. B. beim Seidenfibroin und bei der Wolle) keine Anzeichen hierfür zu beobachten waren. Allerdings ist andererseits zu berücksichtigen, daß die zitierten Autoren mit Äthylalkohol gearbeitet haben, während wir aus praktischen Gründen Methylalkohol in Anwendung brachten. Mit Rücksicht auf diese Umstände erachten wir es daher für notwendig, zu erwähnen, daß wir beim Beginn unserer Versuche keine besonderen Vorsichtsmaßregeln gegen Feuchtigkeit angewendet haben und daß wir auch späterhin dabei verblieben sind, damit vergleichbare Resultate erhalten werden könnten. Wir haben mit Methylalkohol (Kahlbaum I.) gearbeitet und die Salzsäure wurde zum Zwecke des Trocknens durch Schwefelsäure geleitet. Beim Kochen ist kein Chlorkalziumrohr vorgelegt worden.

Als Vorbereitung für weitere ähnliche Untersuchungen sind wir zum Studium der diesbezüglichen Verhältnisse bei Witte-Pepton übergegangen. Es möge vorerst daran erinnert werden, daß nach den von uns bereits publizierten Beobachtungen das Witte-Pepton bei der Methylierung mit

¹ Br. O. Pribram, *Zeitschr. f. physiol. Chem.*, 71, 472 (1911). Abderhalden und Hanslian, *Zeitschr. f. physiol. Chem.*, 77, 285 (1912).

Diazomethan in bezug auf den Gehalt an OCH_3 sich ziemlich normal verhält und daß hingegen der Gehalt an CH_3 am N merkbar höher ist als der der Eiweißstoffe. Bei der Behandlung des Witte-Peptons mit methylalkoholischer Salzsäure sind die Erscheinungen ziemlich ähnlich, wie sie oben beim Gliadin beschrieben wurden, mit dem Unterschiede, daß sie beim Witte-Pepton noch etwas deutlicher auftreten. Schon bei der Einwirkung von 150 cm^3 einer einprozentigen methylalkoholischen Salzsäure auf 5 g Witte-Pepton gehen 2 g Substanz in Lösung, welche nur zu einem sehr geringen Teil durch Zusatz von Äther gefällt werden können. Die Resultate der Methoxylbestimmungen der Substanzen, welche bei diesen Versuchen erhalten wurden, mögen hier folgen.

Bezeichnung	Ungelöst	Gelöst und mit Äther gefällt	Rückstand im Vakuum getrocknet
5 g Witte-Pepton mit 150 cm^3 einprozentiger methylalkoholischer Salzsäure 10 Stunden	I. Versuch $5 \cdot 910/10 \text{ OCH}_3$	$6 \cdot 200/10 \text{ OCH}_3$	$10 \cdot 100/10 \text{ OCH}_3$
	II. Versuch $5 \cdot 900/10 \text{ OCH}_3$	—	$9 \cdot 430/10 \text{ OCH}_3$

Ein sehr merkwürdiges und noch unerklärliches Resultat ergibt sich, wenn man die Konzentration der Salzsäure steigert. Die Menge der gelösten, mit Äther nicht mehr fällbaren Substanz steigt, aber auffallenderweise geht parallel damit eine Verminderung des Methoxylgehaltes dieses löslichen Teiles einher. Die erhaltenen Zahlen waren folgende:

Bezeichnung	Ungelöst	Gelöst und mit Äther gefällt	Rückstand im Vakuum getrocknet
5 g Witte-Pepton mit 150 cm^3 dreiprozentiger methylalkoholischer Salzsäure 10 Stunden	I. Versuch $5 \cdot 610/10 \text{ OCH}_3$	—	$1 \cdot 930/10 \text{ OCH}_3$
	II. Versuch $5 \cdot 780/10 \text{ OCH}_3$	—	$2 \cdot 090/10 \text{ OCH}_3$

Das gelöste, mit Äther gefällte Produkt war in diesem Falle so gering, daß keine Bestimmung gemacht werden konnte. Die Differenz des Methoxylgehaltes des Rückstandes gegen den gleichen Gehalt bei Anwendung einer einprozentigen methylalkoholischen Salzsäure ist nicht immer so groß wie in den beiden angeführten Fällen. Es mögen noch zwei Bestimmungen erwähnt werden, welche ausgeführt wurden und 5.25% OCH_3 , beziehungsweise 4.81% OCH_3 ergeben haben.

Immerhin ist auch in diesen beiden Fällen die merkwürdige Tatsache zu konstatieren, daß bei Anwendung einer konzentrierteren Salzsäure der Methoxylgehalt des Rückstandes sehr merklich sinkt. Mit Rücksicht auf die stärkere hydrolytische Spaltung hätte man eine höhere Methoxylzahl erwarten können. Eine Erklärung für diese Erscheinung ist vorläufig sehr schwer zu geben, weil über das entsprechende Verhalten der in Betracht kommenden Aminosäuren noch sehr wenig bekannt ist. Wir haben durch die Bestimmung des Gesamtstickstoffes nach Kjeldahl und des Aminosäurestickstoffes nach Sørensen uns ein ungefähres Bild über den Grad der Hydrolyse, die hier vorliegt, zu machen gesucht. In den beiden durch Anwendung von 150 cm^3 dreiprozentiger methylalkoholischer Salzsäure erhaltenen Rückstände mit 1.93 und 2.09% OCH_3 wurde der Gesamtstickstoff und der Aminosäurestickstoff bestimmt.

Das Resultat ist folgendes:

Methoxylgehalt	N nach Kjeldahl	Aminosäure N nach Sørensen
1.93%	9.07%	9.00%
2.09	9.45	9.42

Hieraus ist der Schluß zu ziehen, daß bei diesen Operationen die Hydrolyse bis zu den letzten Bausteinen der Eiweißkörper vorgeschritten war.

Die gleichen Bestimmungen bei den Rückständen, welche durch die Anwendung von einprozentiger methylalkoholischer Salzsäure erhalten wurden, ergaben folgendes Resultat:

Methoxygehalt	N nach Kjeldahl	Aminosäure N nach Sørensen
9·140 ⁰ / ₀	10·000 ⁰ / ₀	8·360 ⁰ / ₀
10·10	11·17	8·74

Entsprechend der geringen Konzentration der Säure ist also die Hydrolyse in diesem Falle nicht vollständig und es ist jedenfalls noch ein Teil als Zwischenprodukt vorhanden. Mit der Annahme einer leichteren Ätherifizierbarkeit dieser Substanzen im Vergleich zu den einfachen Aminosäuren könnte der höhere Methoxygehalt dieser Rückstände erklärt werden. Ein Urteil über die Berechtigung einer derartigen Annahme überhaupt und ob sie genügt, die Differenz im Methoxygehalt ganz zu erklären, ist vorläufig schwer zu fällen.

Von allgemeinen Gesichtspunkten ausgehend, ist entsprechend den Betrachtungen von Wegscheider¹ anzunehmen, daß die Wiederverseifung der gebildeten Ester mindestens zum Teil durch das bei der Reaktion zwischen der Salzsäure und dem Alkohol entstehende Wasser bewirkt wird. Es soll aber hervorgehoben werden, daß unsere Versuche ursprünglich ein ganz anderes Ziel verfolgten und daß sie daher in der für die Beantwortung dieser Fragen wichtig gewordenen Richtung mit prinzipiellen Fehlern behaftet sind. So haben wir, wie schon erwähnt, beispielsweise die Anwesenheit des Wassers nicht mit genügender Sorgfalt vermieden. Obwohl nun bei der Glutaminsäure und beim Leucin dieser Umstand nach unseren oben mitgeteilten Versuchen keine bedeutende Wirkung ausgeübt hat, könnte er trotzdem bei anderen Substanzen von ausschlaggebender Bedeutung werden. Auch in anderer Richtung müßten die Versuche dem neuen Zwecke angepaßt werden. Es ist aber fraglich, ob für das Studium derartiger komplizierter Verhältnisse das Objekt selbst nicht zu wenig einheitlich wäre. Auf jeden Fall müßte die entsprechende, systematische, genaue Untersuchung der einschlägigen Aminosäuren vorangehen.

¹ Monatsh. f. Chem., 36, 682 (1915).

Eine einwandfreie Erklärung für die Tatsache, daß die bei der Anwendung stärkerer Säuren auftretenden Spaltprodukte weniger methyliert erscheinen, ist also vorläufig nicht möglich.

Als sicheres Resultat ist nur die Erkenntnis zu bezeichnen, daß bei den alkohollöslichen Eiweißstoffen der Getreidearten und beim Witte-Pepton auch bei Anwendung einer sehr verdünnten methylalkoholischen Salzsäure eine sehr bemerkenswerte Hydrolyse stattfindet. Demgegenüber erscheint es uns nach wie vor nicht unwahrscheinlich, daß in anderen bisher untersuchten Fällen die Hydrolyse so gering ist, daß sie praktisch vernachlässigt werden kann.

Diese Arbeit ist mit Hilfe einer Subvention der Kaiserl. Akademie der Wissenschaften ausgeführt worden.
