

## Die Monoaminosäuren des Albumins aus Kuhmilch.

Von

**Emil Abderhalden** und **Hugo Přibram**. Prag.

(Aus dem I. Chemischen Institut der Universität Berlin.)  
(Der Redaktion zugegangen am 27. März 1907.)

Von den Proteinen der Milch ist bis jetzt einzig das Casein<sup>1)</sup> eingehend auf seinen Gehalt an Monoaminosäuren untersucht. Von den übrigen Proteinen hat der eine von uns in Gemeinschaft mit A. Hunter<sup>2)</sup> eine qualitative Bestimmung der im Albumin- und Globulingemisch vorhandenen Aminosäuren ausgeführt. Es wurden Glykokoll, Alanin, Leucin, Prolin, Asparaginsäure, Glutaminsäure und Phenylalanin festgestellt. Durch die Liebenswürdigkeit von Herrn Dr. Bergell gelangten wir in den Besitz von reinem Laktalbumin aus Kuhmilch.<sup>3)</sup> Wir haben verschiedene Proben von verschiedenen Darstellungen dieses Produktes untersucht. Das zu den unten stehenden Untersuchungen verwendete Albumin enthielt keine Spur von Phosphor. Das Casein war sicher vollkommen abgetrennt. Wie weit dies auch mit den übrigen Proteinen der Milch, vor allem dem Globulin, der Fall war, konnten wir nicht ganz genau feststellen. Eine Beobachtung spricht dafür, daß dieses

<sup>1)</sup> Emil Fischer. Hydrolyse des Caseins mit Salzsäure. Diese Zeitschrift, Bd. XXXIII, S. 151, 1901. — Emil Abderhalden. Abbau und Aufbau der Eiweißkörper im tierischen Organismus, Ebenda, Bd. XLIV, S. 23, 1905. — Emil Abderhalden und Alfred Schittenhelm, Vergleichung der Zusammensetzung des Caseins aus Frauen-, Kuh- und Ziegenmilch, Ebenda, Bd. XLVII, S. 458, 1906.

<sup>2)</sup> Emil Abderhalden und A. Hunter, Vorläufige Mitteilung über den Gehalt der Eiweißkörper der Milch an Glykokoll. Diese Zeitschrift, Bd. XLVII, S. 404, 1906.

<sup>3)</sup> Das Präparat war von den Sanatogenwerken, Berlin, dargestellt worden.

Protein wenigstens einem Teil der Präparate beigemischt war. Es hat sich nämlich nach den bisherigen Untersuchungen ergeben, daß die Albumine offenbar kein Glykokoll enthalten, während die bis jetzt untersuchten Globuline alle diese Aminosäure besaßen.<sup>1)</sup> Nun fanden wir in einem Teil der Präparate Glykokoll — allerdings in geringen Mengen, während das Albumin, das zu der unten angeführten Untersuchung diente, frei von Glykokoll war oder doch höchstens Spuren dieser Aminosäure enthielt. Wir hoffen, Gelegenheit zu haben, auch das Milchglobulin untersuchen zu können, um festzustellen, ob ihm Glykokoll eigen ist.

Zur Hydrolyse verwandten wir 400 g Laktalbumin. Es enthielt 1,0% Asche. Ein aliquoter Teil verlor beim Trocknen bei 100° bis zur Gewichtskonstanz 5,5% an Gewicht. Die genannte Menge Albumin wurde mit der dreifachen Menge rauchender Salzsäure (spez. Gew. 1,19) 6 Stunden am Rückflußkühler gekocht. Das dunkelviolet gefärbte Hydrolysat engten wir unter vermindertem Druck zum Sirup ein und veresterten den Rückstand mit Alkohol und gasförmiger, trockener Salzsäure. Die Veresterung wurde im ganzen dreimal durchgeführt. Die Ester setzten wir mit Natronlauge und Kaliumcarbonat in Freiheit.

Die Destillation der Ester ergab folgende Fraktionen:

I. Fraktion:	bis 60°	des Wasserbades	und 12 mm	Druck	= 30,0 g
II.	: 100°	"	" 12 "	" "	= 53,5 "
III.	: 105°	Ölbades	" 0,5 "	" "	= 68,0 "
IV.	: 200°	"	" 0,5 "	" "	= 35,5 "

Im Destillationskolben verblieb ein 102,8 g schwerer, braun gefärbter Sirup, der beim Abkühlen bald erstarrte.

Wir brauchen auch hier auf die Verarbeitung der einzelnen Fraktionen nicht genauer einzugehen, weil sie sich auf die schon vorliegenden analogen Arbeiten stützt. Auch hier isolierten wir aus den drei ersten Fraktionen nach vorheriger Verseifung durch Kochen mit Wasser und vollkommener Ver-

<sup>1)</sup> Vgl. Emil Abderhalden, Lehrbuch der physiol. Chemie. 1906 S. 187 und 188.

dampfung unter vermindertem Druck das Prolin durch Auskochen mit absolutem Alkohol. Alle alkoholischen Extrakte wurden vereinigt und unter vermindertem Druck eingeeengt und der Rückstand wiederum mit absolutem Alkohol ausgekocht. Dieser Prozeß wurde so oft wiederholt, bis schließlich kein in Alkohol unlöslicher Rückstand verblieb. Das so gereinigte Prolin verwandelten wir durch Kochen seiner wässerigen Lösung mit überschüssigem Kupferoxyd in das Kupfersalz. Seine wässerige Lösung dampften wir unter vermindertem Druck und einer  $40^{\circ}$  des Wasserbades nicht übersteigenden Temperatur völlig zur Trockene ein und trennten durch Auskochen des Rückstandes mit absolutem Alkohol das aktive Prolinkupfer vom racemischen. Das letztere diente zur Analyse:

0,3486 g lufttrockene Substanz verloren bei  $120^{\circ}$  0,0391 g  $H_2O$ .

Berechnet für  $(C_5H_9NO_2)_2Cu + 2H_2O$ :

10,99%  $H_2O$ .

Gefunden:

11,21%  $H_2O$ .

0,2759 g bei  $120^{\circ}$  getrocknetes Kupfersalz gaben 0,0759 g  $CuO$ .

Berechnet für  $(C_5H_9NO_2)_2Cu$ :

21,81%  $Cu$ .

Gefunden:

21,92%  $Cu$ .

Die gesamte Ausbeute an Prolin betrug 15,0 g.

Die in Alkohol unlöslichen Aminosäuren lösten wir in Wasser und benützten zur Trennung der einzelnen Aminosäuren ihre verschiedene Löslichkeit in diesem Lösungsmittel. Das Bestreben der verschiedenen Aminosäuren, Mischkrystalle zu bilden, macht ihre Trennung oft zu einer sehr schwierigen. Wir behalfen uns in solchen Fällen oft durch die Darstellung der Kupfersalze, welche zur Orientierung sehr geeignet sind, indem die Kupferbestimmung wenig zeitraubend ist und ihr Resultat uns ungefähr zeigt, welche Aminosäuren vorliegen. Natürlich darf man sich nie auf eine solche Analyse allein verlassen, weil Mischungen von Aminosäuren und deren Kupfersalzen leicht auf Grund der Analysenresultate einheitliche Substanzen vortäuschen können. Vor solchen Irrtümern schützt wiederholtes Fraktionieren und die Analyse verschiedener Fraktionen. Wir führen im folgenden die erhaltenen Ausbeuten an Aminosäuren an.

Fraktion I. Sie enthielt kein Glykokoll und bestand fast ganz aus reinem Alanin. Seine Menge betrug 2 g.

Fraktion II. Isoliert wurden 7,5 g Alanin, 3,0 g Valin, 26,5 g Leucin. Glykokoll war in Spuren vorhanden.

Fraktion III. Beim Abkühlen der verseiften Ester hatten sich 19,6 g Leucin abgeschieden. Außerdem wurden erhalten 26,5 g Leucin und 0,5 g Valin.

Fraktion IV. Aus dieser Fraktion war sofort nach der Destillation der Ester der Phenylalaninester mit Äther in der bekannten Weise abgetrennt worden. Die ätherische Lösung wurde nach wiederholtem Waschen mit Wasser zur Trockene verdampft und der zurückbleibende Phenylalaninester durch Eindampfen mit Salzsäure verseift. Aus dem Phenylalaninchlorhydrat gewannen wir die freie Aminosäure durch Abdampfen mit Ammoniak und Auslaugen des Chlorammoniums mit eiskaltem Wasser. Wir erhielten 8,9 g Phenylalanin. Die übrigen Ester dieser Fraktion verseiften wir durch Kochen mit wässriger Barytlösung. Nach Entfernung des Baryts mit Schwefelsäure engten wir das Filtrat vom Baryumsulfat stark ein und leiteten in die Lösung bis zur Sättigung gasförmige Salzsäure ein. Bald erstarrte die ganze Flüssigkeit. Das ausgeschiedene salzsaure Salz der Glutaminsäure wurde auf Koliertuch abgenutscht und die Mutterlauge eingeeengt. Dieser Prozeß wurde so oft wiederholt, bis keine Abscheidung mehr erfolgte. Die gesamten Krystallmassen lösten wir in Wasser, kochten die Lösung mit Tierkohle und leiteten wiederum gasförmige Salzsäure ein. Das so gereinigte und umkrystallisierte Glutaminsäurechlorhydrat trockneten wir über Kalk und Schwefelsäure. Seine Menge betrug trocken 15,0 g.

Aus der Mutterlauge der salzsauren Glutaminsäure entfernten wir die Salzsäure durch Kochen mit gelbem Bleioxyd und gewannen durch Einengen der vom gelösten Blei durch Schwefelwasserstoff befreiten Lösung die Asparaginsäure. Erhalten wurden 3,8 g Asparaginsäure. Serin war unzweifelhaft auch vorhanden. Die Analyse des isolierten Produktes gab jedoch keine gut stimmenden Zahlen.

Schließlich haben wir auch hier die Glutaminsäure in einer besonderen Menge Laktalbumin direkt bestimmt und zwar, nachdem wir das Tyrosin abgeschieden hatten. Wir benutzten zu diesem Versuche 100 g Laktalbumin und hydrolysierten

diese Menge durch 16stündiges Kochen mit der sechsfachen Menge 25%iger Schwefelsäure. Wir entfernten dann die Schwefelsäure mit Baryt, zentrifugierten das schwefelsaure Baryum ab und kochten den Niederschlag so lange mit heißem Wasser aus, bis das Filtrat mit Millons Reagens keine Rotfärbung mehr gab. Sämtliche Filtrate wurden dann eingeeengt, bis Tyrosin sich abschied. Es kam sofort vermischt mit Leucin heraus und mußte durch weiteres Umkrystallisieren von diesem getrennt werden. Wir erhielten an ganz reinem Tyrosin 0,8 g.

Die Mutterlauge vom Tyrosin verarbeiteten wir auf Glutaminsäure, indem wir in die stark eingeeengte Lösung gasförmige Salzsäure bis zur Sättigung einleiteten. Wir erhielten nach wiederholtem Umkrystallisieren schließlich auf Glutaminsäure berechnet 9,5 g.

Die Analysen der einzelnen Aminosäuren gaben folgende Resultate:

Alanin: Zersetzungspunkt  $295^{\circ}$  (korr.):

0,1841 g Substanz gaben 0,2722 g  $\text{CO}_2$  und 0,1294 g  $\text{H}_2\text{O}$

Berechnet für  $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2$ : Gefunden:

40,45% C und 7,86% H. 40,32% C und 7,80% H

Valin:

0,1835 g Substanz gaben 0,3448 g  $\text{CO}_2$  und 0,1584 g  $\text{H}_2\text{O}$

Berechnet für  $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_2$ : Gefunden:

51,28% C und 9,40% H. 51,25% C und 9,59% H

Leucin:

0,1486 g Substanz gaben 0,2995 g  $\text{CO}_2$  und 0,1330 g  $\text{H}_2\text{O}$

Berechnet für  $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_2$ : Gefunden:

54,96% C und 9,92% H. 54,96% C und 9,94% H

Asparaginsäure:

0,1761 g Substanz gaben 0,2347 g  $\text{CO}_2$  und 0,0830 g  $\text{H}_2\text{O}$

Berechnet für  $\text{C}_4\text{H}_7\text{NO}_4$ : Gefunden:

36,09% C und 5,26% H. 36,35% C und 5,24% H

Glutaminsäure:

0,1852 g Substanz gaben 0,2776 g  $\text{CO}_2$  und 0,1031 g  $\text{H}_2\text{O}$

Berechnet für  $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4$ : Gefunden:

40,81% C und 6,12% H. 40,87% C und 6,18% H

Phenylalanin:

0,1636 g Substanz gaben 0,3915 g  $\text{CO}_2$  und 0,0975 g  $\text{H}_2\text{O}$

Berechnet für  $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_2$ : Gefunden:

65,42% C und 6,66% H. 65,28% C und 6,62% H

414 Abderhalden und Pribram. Über Monoaminosäuren.

Tyrosin:

0,1512 g Substanz gaben 0,3312 g CO<sub>2</sub> und 0,0843 g H<sub>2</sub>O

Berechnet für C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>:

Gefunden:

59,66% C und 6,07% H.

59,74% C und 6,19% H.

Auf 100 g aschefreies, trockenes Milchalbumin berechnet, ergeben sich die folgenden Ausbeuten an einzelnen Aminosäuren:

Alanin	2,5 g
Valin	0,9 »
Leucin	19,4 »
Prolin	4,0 »
Asparaginsäure	1,0 »
Glutaminsäure	10,1 »
Phenylalanin	2,4 »
Tyrosin	0,85 »