

# Über das Vorkommen von Monaminosäuren im Fleischextrakt.

Von  
Dr. Karl Micko.

(Mitteilung aus der staatlichen Untersuchungsanstalt für Lebensmittel in Graz.)  
(Der Redaktion zugegangen am 14. Mai 1908.)

Bekanntlich werden die Stickstoffverbindungen des Fleischextraktes durch Phosphorwolframsäure größtenteils gefällt. J. König und A. Bömer<sup>1)</sup> fanden, daß im Liebigschen Fleischextrakt etwa 90% des Gesamtstickstoffs mit dem erwähnten Reagens ausgefällt werden. Zur Erreichung dieser hohen Zahl war es aber nötig, die mit Phosphorwolframsäure versetzte Fleischextraktlösung 8 bis 9 Tage stehen zu lassen.

In neuerer Zeit haben E. Baur und H. Barschall<sup>2)</sup> die Versuche über die Fällbarkeit des Stickstoffs im Liebigschen Fleischextrakt wieder aufgenommen, wobei nur 80,5% des Gesamtstickstoffs durch Phosphorwolframsäure gefällt wurden. Es zeigt sich somit zwischen den beiderseitigen Ergebnissen ein bedeutender Unterschied, dessen Ursache allerdings schwer zu ermitteln ist. Ich selbst habe keine Versuche in quantitativer Richtung über die günstigsten Bedingungen der Fällbarkeit des Stickstoffs im Fleischextrakt mit Phosphorwolframsäure unternommen, will aber nur soviel bemerken, daß der Gesamtstickstoff des „Liebigschen Fleischextraktes“ zwar innerhalb ziemlich enger Grenzen schwankt, sich aber bei manchen stickstoffhaltigen Extraktbestandteilen dennoch größere Unterschiede zeigen können. So enthielt eine von mir untersuchte Partie von Liebigs Fleischextrakt<sup>3)</sup> 9,27% Gesamtstickstoff und 1,63%

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. anal. Chemie, 1895, Bd. XXXIV, S. 548.

<sup>2)</sup> Arbeit. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte, Berlin 1906, Bd. XXIV. S. 552.

<sup>3)</sup> Zeitschr. f. Unters. der Nahrungs- u. Genußmittel, 1902, Bd. V. S. 196.

Stickstoff in dem mit Zinksulfat aussalzbaren Teil (Albumosen). Die analogen Zahlen betragen bei einer anderen später untersuchten Partie von Liebig's Fleischextrakt<sup>1)</sup> 9,67 und 2,17. Auf «Stickstoffsubstanz» umgerechnet ergibt sich ein Unterschied im Gehalt an Albumosen von 3,36 g in 100 Teilen Fleischextrakt. Es ist nicht ausgeschlossen, daß nicht nur der Gehalt des Extraktes an Albumosen, sondern auch an anderen stickstoffhaltigen Stoffen mehr weniger größeren Schwankungen unterworfen ist. Andererseits bewährt sich die Phosphorwolframsäure nicht immer als ein verlässliches quantitativ fällendes Reagens, indem die Vollständigkeit der Fällung von der Konzentration der Lösungen, dem Gehalt an Salz und Säure, der Größe des Überschusses an Reagens und auch von der Temperatur beeinflußt werden kann.

Baur und Barschall befaßten sich des weiteren mit Untersuchungen über die Natur des mit Phosphorwolframsäure nicht ausfällbaren Stickstoffs, wobei sie sich des  $\beta$ -Naphthalinsulfochlorids als Reagens für Aminosäuren bedienten und auf diese Weise den auf Aminosäuren entfallenden Stickstoff mit 1% des Extraktes feststellten.

Nehmen wir nun an, der Fleischextrakt enthielte diesen Stickstoff in Form von Glykokoll, also derjenigen Monaminosäure, welche unter den aus den Eiweißkörpern durch Spaltung gewonnenen Monaminosäuren den höchsten Gehalt an Stickstoff aufweist. Da dem Glykokoll 18,67% Stickstoff zukommen, müßte der Gehalt des Fleischextraktes an Glykokoll mindestens 5% desselben oder rund 8% der organischen Substanz des Fleischextraktes betragen. Diese Zahlen erhöhen sich noch wesentlich, wenn im Fleischextrakt nicht bloß Glykokoll, sondern ein Gemisch verschiedener Monaminosäuren angenommen wird, deren Stickstoffgehalt mit zunehmender Kohlenstoffkette abnimmt. Alanin, Valin, Leucin und Glutaminsäure enthalten der Reihe nach 15,73, 11,97, 10,69 und 9,52% Stickstoff. Wie wir weiter unten sehen werden, beträgt der nach dem Ausfällen von 690 g Fleischextrakt mit Tannin und Phosphor-

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. Unters. der Nahrungs- u. Genußmittel, 1907, Bd. XIV, S. 295.

wolframsäure gewonnene dicke Sirup nach Beseitigung der Milchsäure und nach Abzug der mineralischen Bestandteile 83 g. Bei angenommenen 5% Monaminosäuren im Fleischextrakt müßte dieser Sirup zu weit mehr als einem Drittel aus Monaminosäuren bestehen, was aber keineswegs zutrifft. Man kann daher annehmen, daß der von Baur und Barschall ermittelte Aminosäurestickstoff nur zum Teil und, wie weiter unten gezeigt wird, sogar zum kleinen Teil auf Rechnung der Monaminosäuren zu setzen ist.

Gelegentlich der Untersuchung des aus dem mit Zinksulfat nicht aussalzbaren Teil des Fleischextraktes gewonnenen Sirups fiel mir die bei dessen Hydrolyse<sup>1)</sup> erhaltene, verhältnismäßig kleine Menge Monaminosäuren auf, so daß zu überlegen war, ob sich dieselben zum großen Teil oder gar gänzlich in dem ursprünglichen Fleischextrakt als solche vorgefunden haben.

Zur Beantwortung der die Zusammensetzung des Fleischextraktes interessierenden Frage, ob im Fleischextrakt tatsächlich Monaminosäuren vorkommen und welche es sind, führte ich die nachstehend beschriebenen Untersuchungen aus.

### Experimenteller Teil.

690 g Fleischextrakt wurden in Wasser und 250 ccm verdünnter Schwefelsäure (1 : 3) gelöst und mit soviel Gerbsäure in Lösung versetzt, bis auf neuerlichen Zusatz derselben keine Trübung oder ein Niederschlag entstand. Das Gesamtvolumen der Flüssigkeit betrug etwa 8 l. Die Bildung des durch die Gerbsäure erzeugten Niederschlages erfolgte in zwei Phasen. Zuerst entstand ein mächtiger Niederschlag, der sich alsbald zu einer anfangs zähen, später erhärtenden Masse ballte. Bei weiterem Zusetzen der Gerbsäurelösung nahm zwar die Trübung der Flüssigkeit zu, es mußte aber noch ein beträchtlicher Überschuß an Gerbsäure zugesetzt werden, um noch den zweiten Niederschlag, der aber im Vergleich zu dem ersten Niederschlag nur klein war, zu erzeugen. Eine ganz ähnliche Beobachtung

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. Unters. der Nahrungs- u. Genußmittel, 1908, Bd. XV. S. 449.

machte Kutscher,<sup>1)</sup> als er bei der Suche nach noch nicht bekannten Basen eine, und zwar nicht angesäuerte Fleischextraktlösung mit Gerbsäure versetzte.

Am nächsten Tage war die Flüssigkeit geklärt. Sie wurde von dem braunen und leicht zerbröckelnden Kuchen abgehoben, filtriert und mit soviel in Wasser gelöster Phosphorwolframsäure vermischt, bis in einer abfiltrierten Probe auf Zusatz desselben Reagens in größerem Überschuß kein Niederschlag mehr entstand. Da durch die Phosphorwolframsäurelösung eine Verdünnung der Flüssigkeit stattgefunden hat, setzte ich zu derselben auch noch etwa 100 ccm verdünnte Schwefelsäure zu. Die Filtration der Flüssigkeit und das Waschen des Niederschlages mit einer mit etwas Schwefelsäure versetzten, verdünnten Phosphorwolframsäurelösung bis zum Verschwinden der Chlorreaktion im Filtrate erfolgte, um auch den nicht sofort ausfallenden Substanzen zu ihrer Abscheidung genügende Zeit zu lassen, erst am dritten Tage. Ein weiterer Zusatz von Phosphorwolframsäure zu dem ersten mit der Waschflüssigkeit noch nicht verdünnten Filtrate bewirkte nach mehreren Stunden eine kaum merkliche Trübung und der bis zum nächsten Tage gebildete Bodensatz war geringfügig und ohne Bedeutung.

Die vereinigten Filtrate mußten vor dem nachträglichen Fällen bei 50° mit Baryhydratlösung, unter Vermeidung eines unnötigen, allzu großen Überschusses von derselben, wegen der großen und ungemein voluminösen Niederschläge mit Wasser entsprechend verdünnt werden. Die mächtigen, durch die Gerbsäure grünlich gefärbten Niederschläge wurden zuerst durch Dekantation, dann am Filter gewaschen, wobei dem als Waschflüssigkeit dienenden destillierten Wasser stets etwas Baryhydrat zugesetzt werden mußte, da sonst der Niederschlag teilweise in Lösung ging und das Filtrat trübte. Nach dem Einleiten von Kohlensäure in die filtrierte Flüssigkeit behufs Beseitigung des überschüssig vorhandenen Baryts war dieselbe nur sehr schwach gelblich gefärbt. Sie nahm bei zunehmender

---

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. Unters. der Nahrungs- u. Genußmittel, 1905, Bd. X, S. 528.

Konzentration während des Eindampfens eine deutliche alkalische Reaktion an, die aber, um ihre auf die Extraktbestandteile zersetzende Wirkung zu beseitigen, stets durch Neutralisation mit verdünnter Schwefelsäure aufgehoben wurde. Die alkalische Reaktion rührte, wenigstens vorwiegend, von den kohlen-sauren Alkalien her, welche sich durch das Fällen der Phosphorsäure mit Baryt und nachträgliches Einleiten von Kohlensäure aus den im Fleischextrakt in großer Menge vorkommenden Phosphaten gebildet haben.

In 25 ccm der eingedampften und genau auf 2 l gebrachten Flüssigkeit wurde der Stickstoff nach Kjeldahl ermittelt. Derselbe betrug 0,1337 g oder auf die gesamte Flüssigkeit, entsprechend 690 g des in Arbeit genommenen Extraktes, berechnet 10,7 g. Es wurden somit durch Gerbsäure und Phosphorwolframsäure in saurer Lösung von 100 Teilen Fleischextrakt 1,55 Teile Stickstoff, und da der erstere in 100 Teilen 9,7 Teile Stickstoff enthielt, von 100 Teilen des Gesamtstickstoffs 16 Teile als nicht gefällt wiedergefunden. Wie schon aus den eingangs angeführten Zahlen ersichtlich ist, beträgt der nach König und Bömer einerseits und Baur und Barschall andererseits quantitativ ermittelte, mit Phosphorwolframsäure nicht fällbare Stickstoff im Fleischextrakt 10 bzw. 19,5% des Gesamtstickstoffs.

In anderen 25 ccm der genau 2 l messenden Flüssigkeit wurde nach dem Eindampfen und Einäschern die Alkalinität der Asche durch Titration bestimmt und zu der übrigen Flüssigkeit die der Alkalinität der Asche entsprechende Menge titrierte verdünnte Schwefelsäure hinzugesetzt. Dieser Vorgang hatte hauptsächlich den Zweck, die an Alkalien gebundene Milchsäure in Freiheit zu setzen und ihre Beseitigung nachträglich zu erleichtern. Überdies lassen sich die schwefelsauren Alkalien leichter von den organischen Stoffen abtrennen als die gleichzeitig vorhandenen Chloride der Alkalien.

Die Flüssigkeit wurde nun bis zur Krystallisation eingedampft, das aus schwefelsauren Alkalien und Chloralkalien bestehende auskrystallisierte Salz von der Mutterlauge getrennt, zuerst mit möglichst wenig Wasser, dann mit 70%igem Alkohol schneeweiß gewaschen und dieselbe Operation mit der Mutter-

lauge wiederholt. Das erste Salz war völlig frei von organischen Stoffen, das zweite enthielt solche nur in sehr geringer Menge, während die dritte Salzfraktion bereits braun gefärbt war. Bei der Extraktion derselben mit ammoniakalischem Alkohol einerseits und salzsaurem Alkohol andererseits ging nur wenig von den färbenden Bestandteilen in Lösung, die durch Auflösen des extrahierten Salzes in Wasser und Entfärben der Flüssigkeit mit Tierkohle leicht entfernt werden konnten. Durch das successive Eindampfen der Flüssigkeit und Auskrystallisieren der Alkalisalze zeigte es sich, daß die drei Lösungen außer den ursprünglichen färbenden Bestandteilen nur kleine Mengen organischer Substanzen enthielten.

Die Mutterlauge von der dritten Salzfraktion gab bei weiterem Eindampfen ein mit einem Sirup stark verunreinigtes Salz, der sich von dem Salz mit 70%igem Alkohol nicht mehr trennen ließ, ohne daß das hauptsächlich aus Chloralkalien bestehende Salz größtenteils nicht in Lösung ging. Es wurde daher die Mutterlauge mit Alkohol versetzt, die klare alkoholische Flüssigkeit am nächsten Tage vom Ausgeschiedenen abgehoben, der Alkohol abdestilliert, der zurückgebliebene Sirup mit absolutem Alkohol vermischt und dieselbe Operation mit dem in Lösung gegangenen Teil nochmals wiederholt. Auf diese Weise ergaben sich drei Ausscheidungen und die letzte Lösung in absolutem Alkohol.

Die erste Ausscheidung bestand aus einer krystallinischen Masse, welche, unter dem Mikroskope untersucht, in einem dicken Sirup eingebettete Krystalle der Chloralkalien zeigte. Andere Krystallformen waren nicht zu beobachten.

Die zweite Ausscheidung bildete einen Sirup, in dem sich neben Kochsalzkryställchen auch noch Prismen fanden. Bei raschem Behandeln des Sirups mit 70%igem Alkohol ging dieser nebst dem größten Teil des Kochsalzes in Lösung, während die Prismen, die durch die lösende Wirkung des verdünnten Alkohols allerdings Korrosionen aufwiesen, zurückblieben. Die Menge dieser Substanz betrug 0,15 g. Durch Umkrystallisieren aus Wasser gelang es, den aus langen sechsseitigen Prismen bestehenden Körper völlig frei von den noch anhängenden Verunreinigungen zu erhalten. Er löste sich nicht in 95%igem

Alkohol, dagegen ziemlich gut in heißem 70%igen Alkohol. Von heißem Wasser wurde er leicht gelöst und beim Auskühlen der konzentrierten Lösung schossen die langen Prismen wieder an. Die Substanz enthielt neben Stickstoff auch noch weder mit Chlorbaryum noch mit alkalischer Bleilösung nachweisbaren Schwefel und gab beim Kochen mit frisch gefälltem Quecksilberoxyd ein schwer lösliches Quecksilbersalz. Einen scharfen Schmelzpunkt hatte sie nicht. Sie schmolz gegen 300° nur langsam zusammen, nachdem sie sich vor dem Erreichen dieser Temperatur allmählich geschwärzt, beziehungsweise zersetzt hat. Die Eigenschaften des fraglichen Körpers entsprachen in jeder Beziehung denen des Taurins, aus welchem er tatsächlich bestand. Seine Menge reichte indes nicht hin, um die Stickstoff- und Schwefelbestimmung auszuführen. Im Laufe der Untersuchung wird aber gezeigt, daß es sich nur um einen Teil des vorhandenen Taurins handelte, weshalb die analytischen Belege über dasselbe erst weiter unten angegeben sind.

Das Taurin habe ich bereits gelegentlich der Hydrolyse des nicht aussalzbaren Teiles im Fleischextrakte<sup>1)</sup> nachgewiesen. Es war aber hiebei nicht entschieden, ob das Taurin ein Spaltungsprodukt irgend eines Bestandteiles des Fleischextraktes ist, oder ob es als solches in demselben vorkommt. Wie die vorstehende Untersuchung beweist, trifft das letztere zu. Ich habe absichtlich die fraktionierte Fällung des mit Phosphorwolframsäure nicht ausfällbaren und von den anorganischen Salzen teilweise befreiten Teils des Extraktes mit Alkohol schon deshalb vorgenommen, um einen Teil des Taurins vor der nachträglichen Veresterung zu erhalten und dem Einwande zu begegnen, daß der Chlorwasserstoff das Taurin aus komplizierteren Verbindungen hätte abspalten können.

Die dritte Ausscheidung wog kaum 2 g und bestand aus einem mit spärlichen Kochsalzkryställchen vermengten Sirup.

Das Filtrat von der dritten Ausscheidung mußte die gesamte Milchsäure enthalten, zu deren Entfernung der Alkohol vorerst abdestilliert und der sirupartige Rückstand mit er-

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. Unters. der Nahrungs- u. Genussmittel, 1908, Bd. XV. S. 449.

neuerten Portionen Äther geschüttelt wurde, bis nur noch geringfügige Mengen Substanz in die ätherische Lösung übergangen. Die vereinigten ätherischen Auszüge hinterließen nach dem Abdestillieren des Äthers 56 g eines aus roher Milchsäure bestehenden Sirups.

Die von der Milchsäure befreite dicke Masse zeigte keine Neigung zur Krystallisation.

Die dritte Ausscheidung wurde mit der zuletzt erhaltenen milchsäurefreien Masse vereinigt und sowohl von diesem Teil als auch von den zwei ersten Ausscheidungen je ein Viertel behufs Ausführung von bestimmten Untersuchungen abgesondert. Ein zweites Viertel sowie die noch übrig bleibende Hälfte derselben Fraktionen wurden zu je einem Ganzen vereinigt und das erstere zur Prüfung auf Dipeptide, das zweite zur Untersuchung auf Aminosäuren verwendet.

### Prüfung auf Dipeptide.

Bekanntlich hat E. Fischer<sup>1)</sup> ein Verfahren ausgearbeitet, mit Hilfe dessen es ihm gelang, Dipeptide unter den Spaltungsprodukten der Eiweißstoffe nachzuweisen.

Bei der ungemein verwickelten Zusammensetzung des Fleischextraktes schien es von Interesse, zu versuchen, ob sich nach dem erwähnten Verfahren im Fleischextrakte irgend welche Peptide auffinden lassen.

Das Untersuchungsmaterial, welches, wie schon oben erwähnt, den vierten Teil des aus 690 g Fleischextrakt gewonnenen, mit Phosphorwolframsäure nicht fällbaren und von Milchsäure befreiten Sirups ausmachte, wurde im Vakuum bis zu einer zähen Masse, deren Gewicht 27 g betrug, eingedickt, mit 100 ccm absolutem Alkohol übergossen und trockenes Salzsäuregas bis zur vollständigen Sättigung der alkoholischen Flüssigkeit eingeleitet. Die Auflösung der Masse ging hierbei nur langsam vor sich und es mußte, nachdem schon die Flüssigkeit mit Salzsäuregas gesättigt war, der Kolbeninhalt, wenn auch

---

<sup>1)</sup> Untersuchungen über Aminosäuren, Polypeptide und Proteine, 1899—1906, S. 624, Berlin 1906.

mäßig, erwärmt werden, um die zähe Masse in Lösung zu bekommen.

Am nächsten Tage wurde der augenscheinlich vorwiegend aus Kochsalz bestehende Bodensatz (A) auf einem Asbestfilter gesammelt, mit absolutem Alkohol nachgewaschen, der in Lösung gebliebene Teil dagegen nach dem Abdestillieren des Alkohols und zwar im Vakuum bei  $40^{\circ}$  nicht überschreitender Temperatur dem Veresterungsprozesse nochmals unterworfen und die mit Chlorwasserstoffgas gesättigte Flüssigkeit in Eiskochsalzmischung unter gleichzeitiger Impfung mit einem Krysköllchen des salzsauren Glykokollesters acht Stunden gekühlt. Der hierbei ausgeschiedene Teil war nicht bedeutend und bestand, mikroskopisch untersucht, vornehmlich aus Kochsalz. Jedenfalls war das Vorhandensein von größeren Mengen Glykokoll ausgeschlossen, da sich sonst salzsaurer Glykokollester ausgeschieden hätte.

Die salzsaure alkoholische Flüssigkeit wurde der Destillation im Vakuum unterworfen, wobei die Temperatur  $35^{\circ}$  nicht überschritt. Der Destillationsrückstand wurde unter Erwärmen in absolutem Alkohol aufgenommen, die Flüssigkeit nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur filtriert und der dunkelgefärbte Rückstand (B) mit soviel kaltem absoluten Alkohol gewaschen, bis das gesamte Filtrat genau 200 ccm erreichte. Von diesem Filtrate wurden 10 ccm mit Wasser genau bis zu 100 ccm verdünnt und in je 25 ccm dieser Flüssigkeit das gesamte Chlor einerseits und das Chlor in der Asche andererseits bestimmt. Die Asche war nur sehr gering und enthielt nur minimale Mengen Chlor. Diese Untersuchung der Flüssigkeit auf Asche beziehungsweise die Bestimmung des in der Asche enthaltenen Chlors war notwendig, da sonst bei nennenswerten Mengen Chlor in der Asche die nachträglich zuzusetzende Menge Natrium viel zu hoch bemessen wäre, wodurch natürlich die Gefahr der Verseifung der gebildeten Ester vorläge.

Das Gesamtchlor ließ sich in der wässrigen Flüssigkeit nach Volhard titrimetrisch nicht gut bestimmen, indem ein scharfer Endpunkt der Reaktion nicht zu erreichen war. Ich habe daher einen anderen Teil der Flüssigkeit zunächst mit

einem Überschuß von kohlenstoffsaurem Natrium alkalisch gemacht, die Lösung eingedampft, den Rückstand verkohlt, die kohlenstoffhaltige Salzmasse mit Wasser ausgelaugt, die rückständige Kohle gesondert verascht, die Lösung der Asche zu dem alkalischen Filtrate hinzugefügt und in dieser Flüssigkeit das Chlor nach Volhard bestimmt.

Wie ich mich nachträglich überzeugt habe, enthält der mit Phosphorwolframsäure nicht ausfällbare Teil eine das Silbernitrat selbst in salpetersaurer Lösung und auch die Fehlingsche Kupferlösung reduzierende Substanz, worauf ich im übrigen weiter unten zu sprechen komme. Es erscheint daher leicht erklärlich, daß sich in der besagten Flüssigkeit das Chlor nicht gut titrimetrisch bestimmen ließ. Außerdem dürften auch noch andere Ursachen mitspielen.

Den übrigen Teil der alkoholischen Flüssigkeit vermischte ich mit der aus dem gefundenen Chlor genau berechneten Menge Natriumäthylat in alkoholischer Lösung, filtrierte den entstandenen Niederschlag (C) ab und wusch ihn mit absolutem Alkohol. Die nachfolgende Destillation des alkoholischen Filtrates erfolgte im Vakuum bei einer  $65^{\circ}$  des Wasserbades nicht übersteigenden Temperatur. Zwischen  $50$  und  $65^{\circ}$  destillierte nur noch sehr wenig Flüssigkeit über, die aber deutlich nach Estern roch. Das Destillat ist im nachfolgenden mit Esterfraktion I bezeichnet. Dasselbe wurde nach beendeter Destillation sofort mit Wasser stark verdünnt und nach Zusatz von überschüssiger Salzsäure auf dem Wasserbade eingedampft. Das Verseifungsprodukt, dessen Menge im übrigen nur klein war, wurde mit der gleichnamigen, weiter unten erwähnten und ebenso behandelten Fraktion der Aminosäuren vermengt.

Den Destillationsrückstand, welcher die Ester der Dipeptide enthalten sollte, erwärmte ich mit 70 ccm absolutem Alkohol, filtrierte nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur die Flüssigkeit von dem ungelösten Rückstande (D) ab und sättigte dieselbe unter Vermeidung einer Erhitzung mit trockenem Ammoniakgas. Bis zum nächsten Tage hat sich in der ammoniakalischen Flüssigkeit ein geringfügiger nicht krystallinischer Niederschlag gebildet, der sich nach einigen Tagen kaum wesent-

lich vermehrte und nach dem Abfiltrieren beim Nachwaschen mit Alkohol wieder in Lösung ging. Nach dem Abdestillieren des Alkohols aus dem Filtrate löste sich der sirupartige Rückstand in Alkohol leicht auf.

Dipeptide waren somit in dem mit Phosphorwolframsäure nicht fällbaren Teil des Fleischextraktes nicht nachweisbar.

### Untersuchung auf Monaminosäuren.

Die auf die mit Phosphorwolframsäure nicht ausgefallten Stoffe des Extraktes entfallende Hälfte wurde in derselben Weise dem Veresterungsprozeß unterworfen, wie dies bei der Untersuchung auf Dipeptide im vorstehenden beschrieben ist. Die hierbei sich ergebenden analogen Rückstände A, B, C wurden mit den früher erhaltenen gleich bezeichneten Rückständen vereinigt. Zu bemerken ist, daß auch bei dieser bereits wiederholten Veresterung derselben Masse ebensowenig irgend eine Ausscheidung des salzsauren Glykokollesters stattfand, wie bei dem ersten Versuche.

Die Destillation des Filtrates von dem durch Zusatz von Natriumäthylat hervorgerufenem Niederschlage C fand auch hier im Vakuum bis zu  $65^{\circ}$  (Fraktion I) statt, worauf die Destillation unterbrochen und der Destillationsrückstand mehrmals mit erneuerten Portionen Äther ausgeschüttelt wurde.

Den ungelöst gebliebenen Teil erwärmte ich mit etwa 80 ccm absolutem Alkohol, filtrierte nach dem Abkühlen den unlöslichen gelb gefärbten Rückstand ab und fügte diesen zu dem vorhin bei der Prüfung auf Dipeptide erhaltenen Rückstände D hinzu.

Die vereinigten und über entwässertem Natriumsulfat getrockneten ätherischen Ausschüttelungen mußten die über  $65^{\circ}$  destillierenden Ester der Monaminosäuren, sofern solche vorhanden waren, enthalten. Die Hauptmenge des Äthers wurde vorerst vorsichtig bei  $35^{\circ}$  nicht übersteigender Temperatur abdestilliert und der zurückgebliebene Rest der ätherischen Flüssigkeit einer fraktionierten Destillation im Vakuum unterworfen, wobei sich folgende Fraktionen ergaben:

Fraktion I: bis 65° des Wasserbades	—
„    II: „ 98° „ „	0,7 g
„    III: „ 190° „ Ölbad	—
Destillationsrückstand	1,1 g

Die dritte Fraktion bestand aus einem dickflüssigen Öl, welches infolge der Dickflüssigkeit und der kleinen Menge hauptsächlich im Kühlrohr stecken blieb und aus diesem mit warmem Wasser gespült wurde. Die Menge dieses Öles dürfte schätzungsweise etwa 1 g betragen haben.

Die erste und zweite Esterfraktion wurden nach dem Verdünnen mit Wasser durch 10stündiges Kochen am Rückflußkühler, die Fraktion III dagegen durch 6stündiges Erwärmen der mit 5 g Baryumhydrat versetzten wässrigen Lösung im kochenden Wasserbade verseift.

### Fraktion I.

Diese Fraktion war geteilt. Der erste und zwar der weit- aus überwiegende Teil der Ester fand sich im Destillate von der mit Natriumäthylat versetzten Flüssigkeit. Der zweite Teil der Ester war in der ersten Fraktion der in die ätherische Lösung aufgenommenen Ester enthalten und ergab nach der Verseifung nur 0,07 g Aminosäuren, die wegen ihrer gleichen Eigenschaften zu den Aminosäuren des ersten Teiles nach stattgefunder Entchlorung hinzugefügt wurden.

Der erste Teil der Ester, welcher von der Untersuchung auf Dipeptide und auf Aminosäuren und somit von  $\frac{3}{4}$  des ursprünglich in Arbeit genommenen Fleischextraktes, entsprechend 520 g desselben, stammte, wurde durch Verdünnung des Destillates mit Wasser und Salzsäure und durch Eindampfen auf dem Wasserbade verseift. Den krystallinisch erstarrten Abdampfrückstand löste ich in etwa der doppelten Menge absolutem Alkohol, sättigte die Lösung in der üblichen Weise mit Salzsäuregas und wiederholte nach dem Abdestillieren des Alkohols im Vakuum noch einmal den Veresterungsprozeß. Das Eintragen von einem Kryställchen von salzsaurem Glykokollester in die in Eiskochsalzmischung gekühlte mit Chlorwasserstoffgas gesättigte Flüssigkeit hatte nach 6 Stunden noch keine Bildung einer krystallinischen Ausscheidung, welche das Vorhandensein

von nennenswerten Mengen Glykokollester bekunden würde, zur Folge. Nach dem Abdestillieren des Alkohols, Verseifen des in Wasser gelösten Rückstandes durch Kochen am Rückflußkühler, Entchloren der Flüssigkeit mit Bleihydroxyd wurde die chlorfreie und mit Schwefelwasserstoff entbleite Lösung einer fraktionierten Krystallisation unterworfen, wobei sich vier Fraktionen, die nach dem Umkrystallisieren ganz dieselben Eigenschaften hatten, ergaben und offenbar aus einer und derselben Substanz bestanden. Diese bildete, unter dem Mikroskope untersucht, stark lichtbrechende, kurze, dicke, flächenreiche, in absolutem Alkohol unlösliche Prismen von stark süßem Geschmack. Vorsichtig auf dem Platinblech erhitzt entwickelte die Substanz reichlich Sublimatdämpfe. Der Schmelzpunkt in geschlossener Kapillare der vier durch Umkrystallisation gereinigten Krystallfraktionen schwankte zwischen 256 und 258°, also innerhalb enger Grenzen. Nach dem Ergebnisse der ausgeführten Analyse erweist sich die Substanz als identisch mit Alanin.

0,1860 g Substanz gaben 0,2776 g Kohlensäure und 0,1320 g Wasser  
 0,1058 „ „ „ verbrauchten nach Kjeldahl 12,0 ccm  $\frac{1}{10}$ -n-Schwefelsäure.

Demnach:	Gefunden:	Berechnet für Alanin ( $C_3H_7NO_2$ ):
Kohlenstoff	40,70%	40,45%
Wasserstoff	7,88%	7,86%
Stickstoff	15,88%	15,73%

Die Mutterlauge der letzten Krystallisation wurde zur Trockene eingedampft, der Rückstand mit heißem absoluten Alkohol extrahiert und der gelöste Teil nach dem Abdestillieren des Alkohols nochmals derselben Operation unterworfen. Der in Lösung gebliebene Teil bestand aus einer geringen Menge eines nicht krystallisierenden Sirups, der nach dem Kochen seiner wässerigen Lösung mit Kupferoxyd eine nicht krystallisierende in Alkohol leicht lösliche Kupferverbindung gab.

Die gesamte Menge des Alanins, wobei die aus der Mutterlauge erhaltenen, in absolutem Alkohol unlöslichen Reste eingerechnet sind, betrug 0,8 g.

Eine andere Aminosäure als Alanin konnte in der ersten Esterfraktion nicht nachgewiesen werden.

## Fraktion II.

Das durch Kochen der wässerigen Lösung der Ester am Rückflußkühler erhaltene Verseifungsprodukt wog nach dem Extrahieren mit absolutem Alkohol nur 0,24 g. Das aus Wasser vorsichtig umkrystallisierte Präparat entsprach in seinen Eigenschaften ganz dem aus der ersten Esterfraktion gewonnenen Alanin. Wegen der geringen Menge Substanz war die Ausführung einer vollständigen Analyse nicht möglich und ich mußte mich daher nur auf die Bestimmung des Stickstoffs beschränken. Die ermittelte Zahl stimmt mit der des Alanins gut überein.

0,1060 g Substanz verbrauchten nach Kjeldahl  
11,9 ccm  $\frac{1}{10}$ -n-Schwefelsäure.

Demnach:	Gefunden:	Berechnet für Alanin ( $C_3H_7NO_2$ ):
Stickstoff	15,72%	15,73%

Der alkoholische Auszug des rohen Präparates ergab nur eine geringfügige Menge eines Sirups, dessen durch Kochen der wässerigen Lösung mit Kupferoxyd hergestellte Kupferverbindung sich in 95%igem Alkohol leicht löste.

Ebenso wie in der ersten so auch in der verseiften zweiten Esterfraktion wurde eine andere Aminosäure als Alanin nicht vorgefunden.

## Esterfraktion III.

Nach dem Verseifen der Ester mit Baryumhydrat und genauem Ausfällen des letzteren mit Schwefelsäure wurde der Abdampfrückstand der filtrierten Flüssigkeit der Krystallisation überlassen, welche alsbald eintrat. Nach einigen Tagen kochte ich die krystallinische Masse zuerst mit konzentriertem, dann mit 70%igem Alkohol aus, wobei ich die Filtration nach jedesmaligem Abkühlen der Flüssigkeit vornahm. Der konzentrierte Alkohol löste einen nicht krystallisierenden Sirup auf. Der 70%ige Alkohol nahm von dem vorher erhaltenen unlöslichen Rückstande nur eine sehr geringe Menge auf. Seine wässerige, mit Tierkohle entfärbte und bis zur Krystallisation eingedampfte Lösung ergab 0,27 g einer Substanz, welche in jeder Beziehung die Eigenschaften der Glutaminsäure zeigte. Eine einmalige Umkrystallisation genügte, um das Präparat, dessen Schmelz-



dann mit ammoniakalischem Alkohol (15 ccm konzentriertes Ammoniak und 85 ccm Alkohol) unter gelindem Erwärmen extrahiert, die von dem ungelösten Teil (b) abfiltrierte Flüssigkeit verdampft, der Abdampfrückstand nochmals, aber mit weniger ammoniakalischem Alkohol als vorher ausgezogen und das Ungelöste zu dem früher erhaltenen weitaus größeren unlöslichen Teil b hinzugefügt. Der in Lösung befindliche Teil ist mit c bezeichnet.

Die Extraktion des Salzurückstandes mit ammoniakalischem Alkohol, derer ich mich schon bei den früheren Untersuchungen über Fleischextrakt bedient habe, hatte den Zweck, das Taurin in Lösung zu bekommen. Das Taurin, wenn es in feinen mikroskopischen Nadeln krystallisiert ist, löst sich in ammoniakalischem Alkohol langsam auf. Die größeren Säulen des Taurins dagegen, zeigen sich gegen die Mischung von 15 ccm konzentriertem Ammoniak und 85 ccm Alkohol viel widerstandsfähiger. Einen mit Ammoniak noch stärker verdünnten Alkohol anzuwenden, ging nicht an, weil der 15 Volumprozent Ammoniak enthaltende Alkohol ohnehin gleichzeitig eine nicht unbedeutende Menge Kochsalz aufnahm. Wie es sich nachträglich herausgestellt hat, war die Extraktion des Taurins keine vollständige; aber die überwiegende Menge desselben fand sich dennoch in dem ammoniakalisch-alkoholischen Auszuge.

Der alkoholische Auszug a enthielt noch etwas Kochsalz, welches durch Verjagen des Alkohols, neuerliches Behandeln des Rückstandes mit Alkohol und durch Wiederholen desselben Vorganges beseitigt wurde. Neben Kochsalz war in den unlöslichen Rückständen auch noch eine geringe Menge Inosit, welches weiter unten zur Sprache kommt, enthalten. Der in Alkohol lösliche sirupartige Teil zeigte nach dem Entfärben mit Tierkohle keine Neigung zur Krystallisation. Da er noch Salzsäure enthielt, wurde er durch Kochen mit Bleihydroxyd entchlort, das chlorfreie und mit Schwefelwasserstoff entbleite Filtrat eingedampft und der 0,2 g wiegende Sirup, welcher im übrigen deutlich die Reaktionen des Kreatinins gab, wochenlang der Krystallisation überlassen. Die geringe Menge der ausgeschiedenen Krystalldrüsen bestand aus Kreatinin.

Der in ammoniakalischem Alkohol unlösliche Teil b enthielt die Hauptmasse der Chloralkalien. Er wurde in heißem Wasser gelöst, die mit Tierkohle entfärbte Lösung soweit eingedampft, daß sich ein großer Teil der Chloralkalien ausgeschieden hat. Die Mutterlauge goß ich noch in warmem Zustande ab, wusch das Salz zuerst mit etwas Wasser, dann mit 70%igem Alkohol reinweiß und wiederholte mit der Mutterlauge denselben Vorgang noch mehrmals, bis die Hauptmasse der Chloralkalien beseitigt war und sich der letzten ausgeschiedenen Partie Salz bereits organische Stoffe beigemischt haben, die sich mit Hilfe der angegebenen Waschflüssigkeiten aus dem Salz nicht mehr vollständig entfernen ließen, ohne daß das Salz selbst größtenteils in Lösung überging.

Die letzte erhaltene Mutterlauge bestand nach dem weiteren Eindampfen aus einem dicken mit Chloralkalien vermengten Sirup, der erst nach dreitägigem Stehen zu krystallisieren begann. Die Bildung der plattenförmigen Krystalle erfolgte nur sehr langsam und auch das Reiben mit einem Glasstabe brachte den Sirup nicht zum Erstarren. Als ich aber den Sirup mit einigen Tropfen verdünnter Salzsäure verrührte, erhärtete derselbe spontan zu einer krystallinischen bröckeligen Masse, die ich mit soviel 70%igem Alkohol erwärmte, als gerade zur völligen Lösung der Substanz nötig war. Die bis zum nächsten Tage ausgeschiedene aus rhombenähnlichen Platten bestehende Substanz bildete nach zweimaliger Umkrystallisation aus Wasser glänzende, platte, krystallwasserhaltige Prismen, die aber an der Luft alsbald verwitterten. Diese stickstofffreie Substanz gab sämtliche Reaktionen des Inosits und diesem entsprechend lag auch ihr Schmelzpunkt bei 219°. Auch aus dem Ergebnisse der Analyse erhellt die Identität der Substanz mit Inosit.

0,1932 g der getrockneten Substanz gaben 0,2832 g Kohlensäure  
und 0,1138 g Wasser.

Demnach:	Gefunden:	Berechnet für Inosit (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> ):
Kohlenstoff	39,98%	40,00%
Wasserstoff	6,55%	6,66%

Das verdünnt alkoholische Filtrat von der zuerst erhaltenen Inositausscheidung enthielt neben dem Rest des Inosits auch

noch Kochsalz. Um diese beiden von einander annähernd zu trennen, wurde das besagte Filtrat durch Hinzufügung von konzentriertem Alkohol einer fraktionierten Fällung unterworfen. Eine der Fraktionen, welche im übrigen nicht bedeutend war, bestand aus mit etwas Kochsalz und Inosit verunreinigtem Taurin. Da Taurin aus der heißen konzentrierten wässerigen Lösung während des Abkühlens rascher auskrystallisiert als Inosit und Kochsalz, kann es von kleineren Mengen der beiden letzteren durch rasches Abspülen der säulenförmigen Krystalle mit 70%igem Alkohol unschwer getrennt werden.

Diejenigen Ausscheidungen der fraktionierten Fällung mit Alkohol, welche mehr Inosit als Kochsalz enthielten, wurden in der schon angegebenen Weise in heißem 70%igem Alkohol gelöst und weiter behandelt, worauf sich in der Regel die Hauptmenge des Inosits ausschied, während das Kochsalz ganz oder größtenteils in Lösung blieb. Aus den mit Kochsalz bereits stark vermengten Fraktionen und den noch in Lösung befindlichen kochsalzhaltigen Resten wurde das Kochsalz vorerst durch Krystallisation aus der heißen eingeeengten wässerigen Lösung der Hauptmenge nach beseitigt und das angereicherte Inosit in der schon bekannten Weise gereinigt. Taurin war außer in der einen angeführten Fraktion in den übrigen Präparaten in nur sehr geringen Mengen vorhanden.

Aus dem Abdampfrückstande der ammoniakalisch-alkoholischen Lösung c wurde der größere Teil des mitgelösten Kochsalzes nach vorherigem Entfärben der Lösung mit Tierkohle durch Krystallisation in der Wärme entfernt. Aus der letzten Mutterlauge krystallisierte beim Abkühlen Taurin in dicken sechsseitigen mit Kochsalz verunreinigten Säulen aus, welche sich teils durch mechanisches Auslesen, teils durch Abschwemmen mit 70%igem Alkohol vom Kochsalz befreien ließen.

Die Mutterlauge von dem gewonnenen Taurin wurde mit heißem 70%igem Alkohol verdünnt und da nach dem Abkühlen keine Ausscheidung entstand, durch Zusatz von konzentriertem Alkohol mit der Vorsicht fraktioniert gefällt, daß sich den ausgeschiedenen Fraktionen kein oder tunlichst wenig Kochsalz beigemischt hat. Die erhaltenen vier, gesondert aus

Wasser umkrystallisierten Fällungen, deren Gewichtsmenge im übrigen nur klein war, erwiesen sich als Gemische von Taurin und Inosit. Da Taurin aus konzentrierter Lösung früher als Inosit auskrystallisiert, ließen sich die Taurinkrystalle durch rasches Abspülen mit möglichst wenig warmem Alkohol von der inosithaltigen Mutterlauge trennen. Aus den kleinen letzten Resten der rohen Inositpräparate, welche nur sehr wenig Taurin enthielten, ließ sich das Taurin nicht mehr auf die vorstehend angegebene Weise gewinnen. Ich kochte daher dieselben mit 90%igem Alkohol unter Zusatz von einigen Tropfen alkoholischer  $\frac{1}{2}$ -N-Kalilauge und säuerte die meist trübe Lösung mit Salzsäure an, worauf nach dem Abkühlen das Taurin in Nadeln ausfiel. Inosit löst sich in der heißen alkoholischen Kalilauge nicht oder äußerst wenig, während Taurin zwar schwer vollständig in Lösung geht, aber immerhin soweit, daß es dem Inosit der Hauptsache nach entzogen werden kann.

Die in dem ammoniakalisch-alkoholischen Auszuge c vorgefundene Menge Inosit betrug nur etwa 0,2 g. Die weitaus größte Menge Inosit war in dem in ammoniakalischem Alkohol unlöslichen Teil b enthalten.

Die sämtlichen aus dem ursprünglichen Rückstande A erhaltenen meist rohen Taurinpräparate wurden zu einem Ganzen vereinigt und zweimal aus Wasser umkrystallisiert. Die Substanz bestand aus schön ausgebildeten wasserhellen sechsseitigen Säulen, denen, mikroskopisch untersucht, irgend welche Verunreinigungen nicht anhafteten. Die Analyse der Substanz ergab Zahlen, welche mit denen des Taurins in guter Übereinstimmung stehen.

0,1572 g Substanz gaben 0,2918 g Baryumsulfat

0,1488 „ „ „ verbrauchten nach Kjeldahl 11,9 ccm  $\frac{1}{10}$ -n-Schwefelsäure.

Demnach:	Gefunden:	Berechnet für Taurin ( $C_2H_7NSO_3$ ):
Schwefel	25,50%	25,60%
Stickstoff	11,19%	11,20%

Der Gehalt der Substanz an Schwefel wurde nach Asboth durch Schmelzen mit Natriumsuperoxyd und Natriumcarbonat im Nickeltigel und Fällen der gebildeten Schwefelsäure mit Baryumchlorid ermittelt.

Zur näheren Identifizierung des schon unter dem Mikroskope an der Krystallform erkannten Taurins genügt es, eine geringe Menge Substanz auf dem Wasserbade dreimal mit etwas Königswasser einzudampfen, den Rückstand in Wasser aufzunehmen und mit Chlorbaryum zu versetzen. Ob die Oxydation des Schwefels im Taurin zu Schwefelsäure auf diese Weise auch quantitativ verläuft, habe ich nicht näher geprüft.

Im ganzen wurden aus dem Rückstande A 0,6 g Taurin und 1,8 g Inosit gewonnen.

Die Salze der Alkalien betragen 19 g. Diese Menge stammt zusammen von der Untersuchung auf Dipeptide und Monaminosäuren oder von drei Vierteln des erhaltenen, mit Phosphorwolframsäure nicht ausgefällten und bereits von der Hauptmasse der anorganischen Salze befreiten Teil des Extraktes. Da ein Viertel dieses Teiles, wie dies gelegentlich der Prüfung auf Dipeptide gefunden wurde, im Vakuum bis zu einer dicken Masse eingedampft, 27 g ausmacht, beträgt die aus 690 g Fleischextrakt gewonnene Masse nach Abzug der anorganischen Salze 83 g oder rund 12% des Fleischextraktes. Die Menge der noch in dem nächsten Rückstande B enthaltenen anorganischen Stoffe ist so klein, daß sie bei der Berechnung der obigen Zahlen nicht in Betracht kommt. Der Gehalt der besagten Masse an Stickstoff berechnet sich mit 12,9%.

#### Rückstand B.

Der dunkel gefärbte Rückstand wurde mit kaltem Wasser geschüttelt, das Unlösliche auf einem Filter gesammelt, zuerst mit kaltem, dann mit heißem Wasser gewaschen. Das heiße Wasser nahm von dem Filtrerrückstande nur geringe Mengen Lösliches auf. Die löslichen Stoffe waren in dem kalten wässrigen Auszuge enthalten.

Der in heißem Wasser unlösliche Filtrerrückstand löste sich leicht in verdünntem Ammoniak oder Alkali auf, fiel aber auf Zusatz von Säure wieder aus. Derselbe erwies sich bei näherer Untersuchung als wolframhaltig, weshalb ich ihn in wässriger Aufschwemmung mit Baryumhydrat erhitzte. Nach dem Ausfällen des Baryums im Filtrate durch Einleiten von

Kohlensäure ergab die vom Baryumcarbonat abfiltrierte und eingedampfte Flüssigkeit eine unbedeutende Menge eines gelben Sirups, der selbst nach wochenlangem Stehen keine Neigung zur Krystallisation zeigte. Bei der großen Masse Flüssigkeit, welche die Verarbeitung des ursprünglichen Fleischextraktes erforderte, nimmt es kein Wunder, wenn kleine Mengen Wolfram sich bis in diesen Rückstand verirrt haben.

Der kalt wässrige Auszug des Rückstandes B wurde bis zur Krystallisation eingeengt, am nächsten Tage die Krystallisation ( $K_1$ ) auf einem Filter gesammelt, mit möglichst wenig 70%igem Alkohol gewaschen und in heißem 95%igem Alkohol aufgenommen, wobei eine kleine Menge Taurin als unlöslicher Rückstand zurückblieb. Der in Alkohol gelöste Teil krystallisierte aus konzentrierter wässriger Lösung bei langsamer Verdunstung in großen viereckigen Platten.

Die Mutterlauge von der Krystallisation  $K_1$  dampfte ich auf dem Wasserbade völlig ein und kochte den Abdampfrückstand mit Alkohol aus (Lösung a). Der kleine, aus einer schmierigen Masse bestehende, unlösliche Teil wurde mit möglichst wenig 70%igem Alkohol behandelt und der Rückstand aus konzentrierter, wässriger, mit Tierkohle vorher entfärbter Lösung mit Alkohol gefällt. Die ausgeschiedene, 0,12 g wiegende Substanz bestand aus einem Gemenge von Inosit und Taurin.

Die aus der Mutterlauge von der Krystallisation  $K_1$  erhaltene alkoholische Lösung a ergab nach dem Verjagen des Alkohols einen Rückstand, aus dessen wässriger Lösung dieselben gelblichen, großen und viereckigen Platten krystallisierten, wie sie aus der Krystallisation  $K_1$  gewonnen wurden, weshalb ich die beiden Substanzen zu einem ganzen vereinigte und nochmals durch Stehenlassen der konzentrierten wässrigen Lösung bei gewöhnlicher Temperatur umkrystallisierte. Die durchsichtigen Krystalle trübten sich beim Abspülen mit Alkohol und zerbröckelten. Jedenfalls enthielten sie Krystallwasser. Die Substanz gab die Reaktionen des Kreatinins und erwies sich als chlorhaltig. Diesem Verhalten entspricht auch das Ergebnis der Analyse, welche Zahlen ergab, die mit denen des salzsauren Kreatinins übereinstimmen.

0,1562 g der bei 100° getrockneten Substanz verbrauchten nach Kjeldahl  
31,3 ccm  $\frac{1}{10}$ -n-Schwefelsäure.

0,1706 g der bei 100° getrockneten Substanz gaben 0,1626 g Chlorsilber.

Demnach:	Gefunden:	Berechnet für salzsaures Kreatinin ( $C_4H_7N_3O \cdot HCl$ ):
Stickstoff	28,05%	28,09%
Chlor	23,58%	23,75%

Im ganzen wurden aus dem Rückstande B 1,9 g salzsaures Kreatinin und 0,05 g Taurin gewonnen.

### Rückstand C.

Diese Ausscheidung entstand beim Versetzen der alkoholischen Lösung der veresterten Masse mit Natriumäthylat und demnach war Kochsalz ihr Hauptbestandteil. Sie wurde mit Alkohol mehrmals ausgekocht. Die vereinigten, heißen, alkoholischen Auszüge setzten beim Abkühlen einen Sirup ab. Der in dem kalten Alkohol in Lösung gebliebene Teil ist mit a, der aus dem erkaltenden Alkohol ausgeschiedene Sirup ist mit b und der hauptsächlich aus Kochsalz bestehende, in heißem Alkohol unlösliche Rückstand ist mit c bezeichnet.

Der Teil a bestand nach dem Abdestillieren des Alkohols aus einem dunkelgefärbten Sirup, der sich in etwa 40 ccm kaltem Alkohol bis auf einen unbedeutenden Rest, der zu dem Teil b hinzugefügt wurde, löste. Nach Verjagung des Alkohols ließ sich die wässrige Lösung des Sirups ohne Anwendung verhältnismäßig großer Menge Tierkohle, was ich vermeiden wollte, nicht gut entfärben, weshalb ich die Flüssigkeit mit Bleihydroxyd kochte. Das mit Schwefelwasserstoff entbleite Filtrat hinterließ nach dem Eindampfen 1,5 g eines bräunlich gefärbten Sirups, in welchem sich nach wochenlangem Stehen Krystalldrusen angesetzt haben. Dieselben bestanden, wie die nähere Untersuchung ergab, vorwiegend aus Kreatinin, dessen Menge allerdings nur gering war.

Die Menge des sirupartigen Teiles b, der sich aus der heißen alkoholischen Lösung beim Abkühlen ausgeschieden hat, war nicht bedeutend. Er enthielt noch Kochsalz, löste sich in ammonikalischem Alkohol leicht auf und wurde nach Verdampfen

des letzteren mit Alkohol und drei Tropfen verdünnter Salzsäure erwärmt. Die Hauptmenge des Kochsalzes blieb hierbei ungelöst zurück, während der Sirup in Lösung ging. Nach dem Abkühlen wurde das Ungelöste ( $\alpha_1$ ) abfiltriert, der gelöste Teil ( $\alpha_2$ ) nach dem Abdestillieren des Alkohols derselben Operation unterworfen und der sich hierbei ergebende geringe Rückstand zu dem Teil  $\alpha_1$  hinzugefügt.

Der in salzsaurem Alkohol unlösliche Rückstand  $\alpha_1$  wurde in wässriger Lösung mit Tierkohle entfärbt, die Hauptmasse des Kochsalzes durch fraktionierte Krystallisation aus der eingeeengten noch heißen Flüssigkeit entfernt, und die Mutterlauge, welche die organischen Substanzen enthielt, einer fraktionierten Fällung mit Alkohol unterworfen. Zuerst fiel Taurin aus (0,13 g). In den letzten bereits mit Kochsalz verunreinigten Fraktionen war noch eine geringe Menge Inosit vorhanden.

Der in salzsaurem Alkohol lösliche Teil ( $\alpha_2$ ) bildete einen dunkelgefärbten Sirup, der durch Kochen der wässrigen Lösung mit Bleihydroxyd entchlort wurde. Das entbleite Filtrat hinterließ nach dem Eindampfen einen Sirup (0,6 g), in dem sich im Laufe mehrerer Tage prismatische Krystalle gebildet haben, die durch rasche Behandlung des Sirups mit 70%igem Alkohol, in welchem sich der letztere leicht löste, isoliert und nach dem Umkrystallisieren aus Wasser unschwer als Taurin (0,04 g) erkannt werden konnten.

Der in heißem Alkohol unlösliche, hauptsächlich aus Kochsalz bestehende Teil c ließ sich in wässriger Lösung mit Tierkohle nicht gut entfärben, weshalb ich den Abdampfrückstand mit einer Mischung von 10 ccm konzentriertem Ammoniak und 90 ccm Alkohol extrahiert habe. Der gelöste Teil ist mit  $\beta_1$ , der ungelöste Teil mit  $\beta_2$  bezeichnet.

Die ammoniakalisch-alkoholische Lösung ( $\beta_1$ ) ergab einen mit Kochsalz stark verunreinigten Abdampfrückstand, der in derselben Weise mit salzsaurem Alkohol erschöpft und weiter verarbeitet wurde, wie dies bei der Untersuchung des Teils b der Fall war. Der in salzsaurem Alkohol lösliche mit Bleihydroxyd entchlorte und hernach entbleite Teil wog nur 0,3 g und bestand aus einer schmierigen Masse, in welcher sich nach

mehreren Tagen spärliche Krystalle gebildet haben. Dieselben gaben die Reaktionen des Kreatinins.

Aus der mit Tierkohle entfärbten wässerigen Lösung des in salzsaurem Alkohol unlöslichen Rückstande entfernte ich die Hauptmasse des Kochsalzes durch Krystallisation in der Wärme und unterwarf die letzte organische Stoffe enthaltende Mutterlauge einer fraktionierten Fällung mit Alkohol. Erhalten wurden 0,04 g Taurin und 0,07 g Inosit.

Der beim Extrahieren des Teiles c mit ammoniakalischem Alkohol erhaltene Rückstand  $\beta_2$  wurde ebenso wie der Teil  $\beta_1$  mit salzsaurem Alkohol ausgezogen. Der gelöste Teil ergab 0,1 g eines teilweise krystallisierenden Sirups. Der unlösliche Teil wurde in Wasser gelöst, die mit Tierkohle entfärbte und hernach eingeeengte Lösung einer successiven Krystallisation unterworfen, die Mutterlauge stets noch in warmem Zustande abgegossen und das jedesmal auskrystallisierte Kochsalz mit heißem 70%igen Alkohol abgespült. Zum Schlusse erhielt ich einen dunkelgefärbten mit etwas Kochsalz vermengten Sirup, den ich in wässriger Lösung mit Bleihydroxyd kochte. Der aus der entbleiten Flüssigkeit zurückgewonnene Sirup zeigte eine auffällige Schwerlöslichkeit gegen 70%igen Alkohol. Er wurde aus wässriger Lösung durch Zusatz von Alkohol fraktioniert gefällt. Die ersten Fraktionen bildeten einen Sirup, der nur geringe krystallinische Ansätze zeigte. Die letzten Fraktionen waren mit Kochsalz verunreinigt. Der Sirup reduzierte die Fehlingsche Kupferlösung. Mit Silbernitrat und zwar auch in mit Salpetersäure angesäuerter Lösung gab er zuerst einen braunroten, dann schwarz werdenden Niederschlag. Quecksilberchlorid in salzsaurer Lösung erzeugte einen gelblichweißen Niederschlag, der sich auch beim Erwärmen nicht löste. Mit einem Tropfen Salpetersäure angesäuerte Lösung von Quecksilberoxydulnitrat gab sofort einen schwarzen Niederschlag. Alkalische Bleilösung wurde selbst beim Erhitzen nicht geschwärzt. Es handelt sich hier offenbar um einen reduzierend wirkenden Körper, dessen Menge indes unzureichend war, um ihn völlig reinzugewinnen und einer eingehenden Analyse zu unterziehen.

Aus dem hauptsächlich aus Kochsalz bestehenden Rückstande C wurden 0,21 g Taurin, 0,07 g Inosit und eine geringe Menge Kreatinin isoliert.

#### Rückstand D.

Dieser letzte Rückstand bildete den in absolutem Alkohol unlöslichen Teil des im Vakuum eingedampften Filtrates vom Niederschlage C. Er bestand in getrocknetem Zustand aus einer gelblich gefärbten zusammenhängenden, leichten, meerschäumartigen Substanz und wurde nach dem Zerreiben in warmem Alkohol gelöst. Die Menge des ungelöst gebliebenen Teiles war nur klein und bestand aus Kochsalz. Den Destillationsrückstand des alkoholischen Filtrates kochte ich mit so viel Alkohol, als die Substanz bis auf einen kleinen Rest in Lösung ging, ließ die Flüssigkeit bei Zimmertemperatur mehrere Stunden stehen und versuchte sowohl den in die alkoholische Lösung (a) gegangenen Teil nach dem Verjagen des Alkohols als auch die Ausscheidung (b) durch Krystallisation aus Wasser zu reinigen. Der Teil a war viel kleiner als der Teil b und im übrigen mit einem gelben Sirup stark verunreinigt. Die nicht schön auskrystallisierten Substanzen gaben die Reaktionen des Kreatinins. Ein kleiner Teil der Krystalle entsprach in der Form dem salzsauren Kreatinin und da die beiden Substanzen tatsächlich Chlor enthielten, wurden sie gesondert in wässriger Lösung mit Bleihydroxyd gekocht. Die aus den bleifreien eingeengten Filtraten auskrystallisierte Substanz zeigte keine einheitlichen Krystallformen. Sie wurde von der Mutterlauge getrennt und mit 70%igem Alkohol angerührt, wobei ein Teil ungelöst zurückblieb, der sich schon durch die Farblosigkeit von der übrigen gelblich gefärbten und in Lösung gegangenen Substanz unterschied. Er bildete nach dem Umkrystallisieren wasserhelle Prismen anscheinend monoklinen Systems, gab weder die Weylsche noch die Jaffésche Reaktion, wohl aber nach dem Eindampfen mit Salzsäure. Die Substanz enthielt Krystallwasser und bestand offenbar aus Kreatin.

0,2714 g Substanz verloren nach dem Trocknen bei 100°

0,0324 g an Gewicht.

Demnach:	Gefunden:	Berechnet für Kreatin ( $C_4H_9N_3O_2 + H_2O$ ):
Krystallwasser	11,94%	12,08%

Der Teil a ergab nur wenig Kreatin. Die weitaus größere Menge desselben stammte aus dem Teil b. Im ganzen betrug das gewonnene Kreatin 0,54 g.

Die Abdampfrückstände der 70%ig alkoholischen Filtrate vom Kreatin lösten sich bis auf einen geringen Rest in warmem konzentrierten Alkohol leicht auf und enthielten somit höchstens geringe Mengen Kreatin. Ich suchte nun nach dem Abdestillieren des Alkohols die rückständige, anscheinend vorwiegend aus Kreatinin bestehende Substanz durch Krystallisation aus heißem absoluten Alkohol zu reinigen. Beim Krystallisieren der ausgeschiedenen Substanz aus Wasser zeigte es sich, daß derselben hartnäckig ein gelber Sirup und auch andere Verunreinigungen anhafteten und da die Menge der Substanz nicht hinreichend war, um sie auf diese Weise in völlig reinem Zustande und in der nötigen Menge zur Analyse zu bringen, wurde die Substanz in warmer alkoholischer Lösung mit soviel Essigäther vermischt, daß sich eine Trübung gebildet hat, und nach erfolgter Klärung die Flüssigkeit von dem ausgeschiedenen Sirup abgossen, diese wiederum bis zur Entstehung einer Trübung mit Essigäther versetzt und dasselbe Verfahren so oft wiederholt, bis sich dem ausgeschiedenen Sirup Krystalle in größerer Menge beizumengen begannen. Die Menge des erhaltenen Sirups war bei dem Teil a größer als bei dem Teil b. Jedenfalls gelang es auf diese Weise, die größte Menge des vorhandenen Sirups von der festen Substanz abzutrennen.

Der nach dem Abdestillieren der essigätherhaltigen alkoholischen Flüssigkeit erhaltene Rückstand gab beim Kochen am Rückflußkühler mit Essigäther an diesen nur eine geringe Menge einer kreatininhaltigen Substanz ab.

Der in Essigäther unlösliche Rückstand bestand offenbar der Hauptsache nach aus Kreatinin, welches sich aber weder durch Krystallisation aus heißem Alkohol noch aus Wasser in einer zur Ausführung einer Analyse hinreichenden Menge rein gewinnen ließ. Ich habe deshalb die sämtlichen sowohl aus dem Teil a als auch aus dem Teil b erhaltenen kreatininhaltigen Fraktionen gesondert und mit etwas Salzsäure eingedampft, die Rückstände in wenig heißem Wasser aufgenommen und der

Krystallisation überlassen. Die ausgeschiedenen Krystalle wurden durch Abspülen mit Alkohol von der anhaftenden Mutterlauge gereinigt und da sie bei allen Fraktionen den gleichen Typus zeigten, zu einem Ganzen vereinigt und nochmals aus Wasser umkrystallisiert. Auf diese Weise gelang es leicht, das Kreatinin als salzsaures Salz in völlig reinem Zustand zu gewinnen, wie dies auch das Ergebnis der nachstehenden Analyse beweist.

0,1276 g der bei 100° getrockneten Substanz verbrauchten nach Kjeldahl 25,65 ccm  $\frac{1}{10}$ -n-Schwefelsäure.

0,1368 g der bei 100° getrockneten Substanz gaben 0,1308 g Chlorsilber.

Demnach:	Gefunden:	Berechnet für salzsaures Kreatinin ( $C_4H_7N_3O \cdot HCl$ ):
Stickstoff	28,14%	28,09%
Chlor	23,65%	23,75%

Bei kleinen Mengen Kreatinin, die nur schwer ohne größeren Verlust an Substanz von den hartnäckig anhaftenden Verunreinigungen zu befreien sind, empfiehlt es sich, dasselbe in salzsaures Salz, welches leicht in analysereinem Zustande zu erhalten ist, überzuführen. Da das eventuell dem Kreatinin beigemengte Kreatin beim Eindampfen mit Salzsäure in Kreatinin übergeht, ist die Gefahr, daß sich dem salzsauren Kreatinin das gleichnamige Salz des Kreatins beimengt, nicht vorhanden, was bei einem Gemenge von freiem Kreatinin und Kreatin viel leichter möglich ist.

Das salzsaure Kreatinin verliert leicht sein Krystallwasser und erweist sich in wasserfreiem Zustande bei 100° als ein beständiges Salz. Wie aus dem Ergebnisse der in dieser Abhandlung angeführten zwei Analysen des salzsauren Kreatinins ersichtlich ist, stimmen die ermittelten Zahlen mit den berechneten Zahlen günstig überein.

Es wurden aus dem Rückstande D 0,54 g Kreatin und 0,93 g salzsaures Kreatinin gewonnen.

Derjenige Teil des mit Essigäther ausgeschiedenen Sirups, welcher nur geringfügige Mengen Kreatinin enthielt, betrug 0,65 g, der aus allen übrigen kreatininhaltigen Fraktionen erhaltene, salzsaure, dünnflüssige Sirup wog nur 0,9 g.

**Zusammenfassung der Ergebnisse.**

Die vorstehend beschriebene Untersuchung hat gezeigt, daß sich in dem mit Phosphorwolframsäure nicht ausfällbaren Teil des Fleischextraktes tatsächlich Monaminosäuren vorfinden, deren Menge aber so klein ist, daß sie als ein wesentlicher Bestandteil des Fleischextraktes nicht betrachtet werden können.

Wenn wir die isolierten und zur Analyse gebrachten Körper, das Kreatinin beziehungsweise das Kreatin ausgenommen, auf 100 Teile Fleischextrakt berechnen, so ergeben sich folgende Mengenverhältnisse in Grammen:

Alanin	0,23
Glutaminsäure	0,08
Taurin	0,20
Inosit	0,36.

Wenn auch berücksichtigt werden muß, daß die Gewinnung der Aminosäuren nach der Estermethode, welche noch immerhin die günstigste von allen bisher angewendeten Methoden ist, mit Verlusten verbunden ist, also als eine völlig quantitative Methode nicht anzusehen ist, kann der Ausfall an Aminosäuren, im vorliegenden Fall an Alanin und Glutaminsäure, nicht etwa einige Prozente des Extraktes erreichen und wenn wir mit hohen Verlusten rechnen und die erhaltenen Zahlen mit dem Mehrfachen multiplizieren, ergeben sich noch so niedrige Mengen an Monaminosäuren, daß sie an der Zusammensetzung des Fleischextraktes keinen großen Anteil haben. Zu bemerken ist, daß auch die Menge der Ester selbst verhältnismäßig klein war.

Es fällt vor allem auf, daß von den Monaminosäuren neben Taurin nur Alanin und Glutaminsäure vorgefunden wurden. So waren Glykokoll, Prolin, Valin, Leucin, Phenylalanin, Asparaginsäure, also die Reihe der Monaminosäuren, welche im allgemeinen bei der Hydrolyse der Eiweißkörper erhalten werden, nicht nachzuweisen. Auch bei der kleinen Menge Alanin gelang es nicht schwer, dasselbe in analysenreinem Zustande zu erhalten. Jeder, der sich mit der Isolierung von Monaminosäuren

beschäftigt hat, weiß, wie schwer es oft fällt, aus kleinen Mengen eines Gemisches dieser Körper die einzelnen Komponenten rein zu gewinnen. Umsomehr ist die Annahme berechtigt, daß in der Esterfraktion bis zu 100° neben Alanin höchstens geringfügige Mengen anderer Monaminosäuren vorhanden waren, die sich bereits dem sicheren Nachweise entziehen. Schon bei der Destillation der Ester zeigte es sich, daß zwischen 65 und 100° nur noch eine geringe Menge Ester überdestillierte und somit etwa Leucinester nur in Spuren vorhanden sein konnte. Die Temperatur des Ölbadestieg alsdann auf 160°, bis sich das Übergehen der Ester wieder bemerkbar machte. Aus der kleinen Menge der zuletzt überdestillierten Ester konnte die Glutaminsäure nach der Verseifung dieser Esterfraktion leicht in reinem Zustand gewonnen werden.

Wie ich durch die früheren Arbeiten über Fleischextrakt, insbesondere aber durch die Hydrolyse seiner Albumosen nachgewiesen habe, geben die letzteren neben Alanin, Prolin, Valin, Leucin, Phenylalanin, Asparaginsäure und Glutaminsäure eine beträchtliche Menge Glykokoll. Es ist daher nicht als wahrscheinlich anzunehmen, daß die vorgefundenen Monaminosäuren, Alanin und Glutaminsäure, etwa als Produkte der völligen Zersetzung der in dem ursprünglichen Fleischextrakt enthaltenen Eiweißstoffe aufzufassen sind. Denn es wäre nicht gut denkbar, daß bei der Zersetzung dieser Eiweißstoffe bloß Alanin und Glutaminsäure und neben diesen keine andere Monaminosäure entstünde, zumal das Glykokoll bei der Hydrolyse der Albumosen des Fleischextraktes von allen übrigen Monaminosäuren in größter Menge auftritt.

Dieser Befund ist insofern von Belang, als bekanntlich Fleischextrakt Bernsteinsäure enthält und man die Frage aufgeworfen hat, ob etwa die Bernsteinsäure als Fäulnisprodukt der Eiweißkörper anzusehen ist. Wenn es aber bei der Fäulnis bis zur Bildung der Bernsteinsäure kommt, so ist kaum zu erwarten, daß neben Alanin und Glutaminsäure keine anderen Monaminosäuren gebildet würden. Weiters ist darauf hinzuweisen, daß der mit Zinksulfat nicht aussalzbare Teil des Fleischextraktes keine deutliche Biuretreaktion gibt, was kaum der

Fall wäre, wenn Fleischextrakt Fäulnisprodukte der Eiweißkörper und somit auch die Biuretreaktion gebende Zwischenprodukte zwischen aussalzbaren Albumosen und Monamino-säuren enthielte. Andererseits sind der Geruch und Geschmack nach faulenden Eiweißkörpern derart widerlich und schwer aus irgend einer zum Genusse bestimmten Flüssigkeit oder Masse zu beseitigen, daß der fertige Fleischextrakt nicht zu genießen und somit verdorben wäre. Aus allen diesen Gründen liegt die Ansicht viel näher, daß die Bernsteinsäure, welche zweifellos im Fleischextrakt als solche vorkommt, nicht etwa von der Fäulnis der Eiweißkörper herrührt, sondern ein natürlicher Bestandteil des Fleischextraktes ist. Bemerkenswert ist auch noch, daß die der Bernsteinsäure so nahe verwandte Asparaginsäure als solche nicht nachgewiesen wurde.

Die Untersuchung der Niederschläge beziehungsweise der Rückstände, welche sich bei der Veresterung der mit Phosphorwolframsäure nicht ausfällbaren Masse ergaben, nahm ich absichtlich vor. Wenn nämlich größere Mengen Monamino-säuren etwa Glykokoll, Alanin, Leucin oder gar Asparaginsäure und Glutaminsäure der Veresterung entgangen wären, dann hätten sie sich nach der Bindung des Chlors an Natrium infolge ihrer Schwerlöslichkeit in absolutem Alkohol, hauptsächlich in den Rückständen C und D, vorfinden müssen. Außer Taurin, welches auch in salzsaurem Alkohol sehr schwer löslich ist und der Veresterung nicht unterlag, konnte ich eine andere Monamino-säure mit Sicherheit nicht nachweisen. Mag sein, daß in den Rückständen dennoch andere Monamino-säuren als Taurin vorhanden waren, ihre Menge müßte aber recht gering sein.

Das Taurin, über dessen Vorkommen im Liebig-schen Fleischextrakt ich in der mir zugänglichen Literatur keine Angaben vorgefunden habe, findet sich im Fleischextrakt als solches vor.

Das in den Rückständen enthaltene Inosit habe ich ebenso sorgfältig gesammelt wie das Taurin, um die Höhe seines Gehaltes im Fleischextrakt annähernd zu erfahren. Er beträgt 0.36 % des Extraktes und erhöht sich, auf 100 Teile der aschenfreien Trockensubstanz des Extraktes berechnet, auf 0,6 g.

Einen weiteren Bestandteil der Rückstände bildete das Kreatinin, welches ursprünglich im Fleischextrakt als Kreatin vorhanden war und demnach von der Phosphorwolframsäure nicht gefällt worden ist. Denn während das Kreatin, welches im Fleischextrakt gegenüber dem Kreatin vorwiegt, durch Phosphorwolframsäure sofort gefällt wird, trifft dies beim Kreatin nicht zu. Da bei der weiteren Verarbeitung des mit Phosphorwolframsäure nicht ausfällbaren Teiles des Fleischextraktes mit Salzsäuregas gesättigter Alkohol zur Anwendung kam, so ist der nachträgliche Übergang des mit Phosphorwolframsäure nicht ausgefallenen Kreatins in Kreatinin leicht erklärlich. Das aus dem letzten Rückstand D erhaltene Kreatin hat sich vermutlich beim Kochen der kreatininhaltigen Lösung mit überschüssigem Bleihydroxyd aus dem Kreatinin zurückgebildet.

Die Menge der aus den Rückständen schließlich gewonnenen Sirupe war nicht bedeutend und in Alkohol zum größeren Teil löslich, und es ist dieser in Alkohol lösliche Teil jedenfalls infolge des nicht vollständigen Auswaschens der Filterrückstände mit Alkohol in diesen zurückgeblieben. Zu bemerken ist aber, daß sich die Menge der aus den Rückständen erhaltenen ursprünglichen Sirupe nach dem Kochen mit Bleihydroxyd beträchtlich vermindert hat. Monaminosäuren werden indes von Bleihydroxyd nicht zurückgehalten.

Dipeptide aus dem Fleischextrakte zu gewinnen, gelang bisher nicht.

Von den Monaminosäuren wurden somit im Fleischextrakt nachgewiesen: Alanin, Glutaminsäure, Taurin. Letzteres ist allerdings eine Aminosulfosäure. Die in Substanz erhaltene summarische Menge dieser Aminosäuren beträgt 0,51% des Extraktes oder 0,85% seiner aschenfreien Trockensubstanz.

Es erübrigt noch, die in dem alkoholischen Filtrate von dem letzten Rückstande D enthaltenen und von den Estern der Monaminosäuren befreiten Stickstoffverbindungen und ebenso den mit Phosphorwolframsäure fällbaren Anteil des Fleischextraktes einer Untersuchung zu unterziehen, über deren Ergebnisse ich in gesonderten Abhandlungen zu berichten gedenke.

Kurze Übersicht über den Gang der Untersuchung.

