

Über die bei der Isolierung der Monoaminosäuren mit Hilfe der Estermethode entstehenden Verluste.

I. Mitteilung.

Von

Emil Abderhalden und Arthur Weil.

(Aus dem physiologischen Institute der tierärztlichen Hochschule, Berlin.)

(Der Redaktion zugegangen am 14. August 1911.)

Die Einführung der Estermethode zur Isolierung der Monoaminosäuren durch Emil Fischer hat unsere Kenntnisse über die Zusammensetzung der Proteine außerordentlich erweitert. Die erste Aufgabe, die zu erfüllen war, bestand darin, die Untersuchung möglichst vieler verschiedenartiger Eiweißstoffe des Tier- und Pflanzenreiches auf ihren Gehalt an einzelnen Aminosäuren durchzuführen. Diese Arbeiten führten zu den wichtigen Resultaten, daß die verschiedenartigen Aminosäuren bei den verschiedensten Proteinen mit wenig Ausnahmen immer wiederkehren. Vor dieser Feststellung war immer noch die Möglichkeit gegeben, daß die einzelnen Eiweißkörper durch den Gehalt an ganz bestimmten Bausteinen ausgezeichnet sind. Nach dem jetzigen Stand unserer Kenntnisse der Zusammensetzung der Eiweißkörper ist zwar die Möglichkeit immer noch gegeben, daß bisher unbekannte Bausteine mitwirken, um den einzelnen Proteinen ein bestimmtes Gepräge zu geben, in der Hauptsache dürfte jedoch die Struktur und Konfiguration das Ausschlaggebende sein. Schon die Betrachtung einfacher isomerer Polypeptide, die sich nur durch die Reihenfolge der einzelnen Bausteine unterscheiden, zeigt, wie einflußreich die Gesamtstruktur auf die Eigenschaften dieser Verbindungen ist.

Bei der Durchführung der einzelnen Hydrolysen wurde das Hauptgewicht auf die Isolierung bestimmter, ganz reiner

Aminosäuren gelegt. Von Fall zu Fall mußte mit der Möglichkeit gerechnet werden, daß neue Spaltprodukte vorhanden waren. Das Suchen nach solchen war mit großem Verlust an Material verknüpft. Bekanntlich zeigen manche Aminosäuren die unerwünschte Eigenschaft, Mischkristalle zu bilden. Diese täuschen dann neue Bausteine vor. Eine Unsumme von Arbeit und Zeit war erforderlich, um alle Klippen von Täuschungen zu umgehen. Immer wieder schien der Nachweis eines neuen Bausteines geführt, bis schließlich auf irgend eine Weise gezeigt werden konnte, daß Unreinheiten die Ursache der Abweichung im Verhalten der isolierten Substanz von den bisher bekannten Aminosäuren waren. Es unterliegt keinem Zweifel, daß den von Skraup und anderen Autoren mitgeteilten neuen Aminosäuren Gemische bekannter Bausteine der Proteine zugrunde lagen. Es ist klar, daß unter den genannten Verhältnissen die Ausbeute an einzelnen Aminosäuren Not leiden mußte. Dazu kam noch, daß bei allen Mitteilungen, die von dem einen von uns mit seinen Mitarbeitern über die Zusammensetzung von Eiweißstoffen an Aminosäuren veröffentlicht sind, nur die Werte mitgeteilt sind, die ganz reinen Aminosäuren entsprechen. Eine Ausnahme bildet nur die Leucinfraction, die neben Isoleucin stets unbestimmte Mengen von Valin enthielt. Diese Lücke in den Untersuchungsergebnissen ist stets genügend hervorgehoben worden. Emil Fischer hat schon in der ersten Mitteilung über die Hydrolyse von Casein gezeigt, daß es unmöglich ist, die genannten drei Aminosäuren quantitativ zu trennen. Erst neuerdings ist eine Bestimmung von Leucin, Isoleucin und Valin von Levene und van Slyke ausgearbeitet worden. Sie gibt, wie wir uns überzeugt haben, gute Werte, wenn der Zusatz von Bleiacetat zur Abscheidung des Leucins sehr vorsichtig unter fortwährendem heftigem Schütteln erfolgt. Die Methode bedeutet einen großen Fortschritt in der Isolierung der drei genannten Aminosäuren. Alle bisher mitgeteilten Werte für die Leucinfraction müssen in Zukunft in die drei genannten Aminosäuren aufgeteilt werden.

Geht man bei der Berechnung der Ausbeuten nicht von

den reinen Aminosäuren aus, sondern von den Rohprodukten, dann erhält man natürlich wesentlich höhere Werte. Es ist z. B. ganz unmöglich, mit Hilfe der Estermethode das gesamte Prolin in reinem Zustande zu gewinnen. Stets bleibt auch bei Überführung in das sehr schön krystallisierende Kupfersalz ein ganz erheblicher, nicht krystallisierender Rückstand übrig. Wir haben den nicht krystallisierenden Teil nicht in Rechnung gebracht, weil die Möglichkeit vorlag, daß in dem Sirup Aminosäuren unbekannter Konstitution enthalten waren. Nach unseren reichen Erfahrungen dürfte es sich jedoch um Produkte handeln, die sich direkt von dem Prolin ableiten. Wenn in der Literatur neuerdings höhere Werte für die Ausbeute an Prolin mitgeteilt werden, als wir sie angegeben haben, so muß immer in Betracht gezogen werden, welche Substanzen den Ausbeuten zugrunde gelegt worden sind. Verwendet man zur Prolinbestimmung die neuerdings von van Slyke angegebene Methode, dann kommt man selbstverständlich zu höheren Werten, weil man nicht das Prolin als solches isoliert. Wir ziehen im allgemeinen die direkte Isolierung der einzelnen Aminosäuren im vollständig reinen Zustande jeder indirekten Methode vor. Es ist fraglich, ob es für unsere Kenntnis der Zusammensetzung der Eiweißkörper von entscheidender Bedeutung ist, ob die Ausbeute an Aminosäuren bei bestimmten Eiweißkörpern um wenige Prozente gesteigert werden kann. Wir dürfen nicht vergessen, daß die Eiweißkörper als solche in keinem einzelnen Fall das Kriterium der Einheitlichkeit besitzen. Je nach der Art der Darstellung können die einzelnen Eiweißpräparate eine verschiedene Zusammensetzung haben, und dieser Umstand kann für die verschieden große Ausbeute maßgebend sein. Ferner wissen wir, daß mit Hilfe der Estermethode keine einzige Aminosäure quantitativ abgeschieden werden kann. Arbeiten wir mit Gemischen von Aminosäuren, die ganz verschiedene Eigenschaften haben, dann wird es viel von der Art der angewandten Methodik abhängen und auch von der Geschicklichkeit des Experimentators, wie hoch sich die Ausbeuten im einzelnen Falle stellen. Es kann leicht vorkommen, daß z. B. die Aus-

beuten an Aminomonocarbonsäuren sehr gute sind, und gleichzeitig die an Aminodicarbonsäuren stark zurückstehen. Wir heben diese Verhältnisse nochmals klar hervor, weil Halliburton in gänzlicher Verkennung der Sachlage und aus voller Unkenntnis der ganzen Methodik heraus versucht hat, die bisherigen Resultate auf dem Gebiete der Eiweißforschung, die mit Hilfe der Estermethode gewonnen worden sind, in ihrem Werte herabzusetzen.

Man könnte die Frage aufwerfen, ob es richtig war, mit Hilfe der Estermethode, die keine quantitativen Werte gibt, zunächst ohne Berücksichtigung der Fehlerquellen, und ohne den Versuch gemacht zu haben, diese nach allen Richtungen hin kennen zu lernen, zahlreiche Proteine auf ihren Gehalt an Aminosäuren zu untersuchen. Emil Fischer, Emil Abderhalden, Thomas B. Osborne und ihre Mitarbeiter haben zunächst mit der von Emil Fischer ausgearbeiteten Methode stets unter gleichen Bedingungen gearbeitet und in verhältnismäßig kurzer Zeit eine sehr große Anzahl von Eiweißstoffen des Tier- und Pflanzenreiches untersucht. Um Vergleiche ziehen zu können, sind die minimalen Ausbeuten an Aminosäuren angegeben worden. Niemand hat einen Zweifel darüber gelassen, daß die Ausbeuten durchaus kein Bild von dem wirklichen Gehalt der Eiweißkörper an den einzelnen Aminosäuren geben. Es ist auch nie bezweifelt worden, daß die Ausbeuten von Fall zu Fall durch bessere Methoden gesteigert werden können. Niemand hat ferner je darüber einen Zweifel offen gelassen, daß die bisherigen Methoden unzureichend sind. Unter diesen Verhältnissen hätte man allerdings den Versuch machen können, an Hand eines ganz bestimmten Eiweißkörpers alle Bedingungen durchzustudieren, welche die besten Ausbeuten an den einzelnen Aminosäuren ergeben. Es wird gewiß gelingen, schließlich Methoden auszuarbeiten, die für jede einzelne Aminosäure eine quantitative Bestimmung zulassen. Die bisherigen Bemühungen hatten noch keinen großen Erfolg. Hätte man mit den Untersuchungen der einzelnen Eiweißkörper zugewartet, bis eine ideale Methode zur Isolierung der Aminosäuren für alle Proteine gefunden worden wäre, dann

würden ohne Zweifel unsere Kenntnisse über die Zusammensetzung der Proteine zurzeit noch sehr wenig gefördert sein. Es schien uns korrekter, zunächst einmal viele Eiweißkörper zu untersuchen, und so zwar einen rohen, aber immerhin wertvollen Einblick in die Zusammensetzung der verschiedenartigsten Proteine zu erhalten. Auf die Bedeutung dieses Vorgehens für die Gewinnung bestimmter Aminosäuren, und für die Untersuchung der bei der partiellen Hydrolyse der Eiweißkörper entstehenden Spaltprodukte ist bereits hingewiesen worden.¹⁾

Osborne hat auf dem Gebiete der Pflanzeneiweißkörper genau den gleichen Weg eingeschlagen wie wir. Er hat nun auch begonnen, die Frage zu erörtern, wie die erhaltenen Aminosäuren in bezug auf die absoluten Werte zu beurteilen sind.²⁾ Er hat Gemische von bekannten Aminosäuren in bestimmten Gewichtsmengen hergestellt, dann die Estermethode angewandt und die Aminosäuren wieder isoliert. Er beobachtete, daß hierbei ganz bedeutende Verluste eintreten, und er schließt daraus, daß höchstwahrscheinlich der Teil der stickstoffhaltigen Spaltprodukte der Proteine, der durch die bis jetzt erhaltenen Ausbeuten an Aminosäuren nicht gedeckt wird, auf Aminosäuren bekannter Natur, die sich bei der angewandten Methodik dem Nachweis entziehen, zurückzuführen ist.

Osborne hat ferner begonnen, die von ihm mitgeteilten Ausbeuten an einzelnen Aminosäuren durch Wiederholung der Hydrolysen zu kontrollieren. Er kommt dabei in manchen Fällen zu bedeutend höheren Werten. Selbst für die Glutaminsäure, deren Bestimmung allgemein für eine quantitative galt, findet er neuerdings höhere Werte. Für Casein fand z. B. Emil Fischer 10%, Emil Abderhalden und seine Mitarbeiter fanden annähernd den gleichen Wert, auch Osborne gibt in

¹⁾ Emil Abderhalden, Beitrag zur Kenntnis der bei der totalen Hydrolyse von Proteinen auftretenden Aminosäuren. Diese Zeitschrift. Bd. 68, S. 477, 1910.

²⁾ Thomas B. Osborne and Breese Jones. A Consideration of the Sources of Loss in Analyzing the Products of Protein Hydrolysis. American Journal of Physiology, Vol. XXVI. p. 305, 1910.

einer früheren Mitteilung die gleiche Zahl für Glutaminsäure an. Neuerdings findet er durch länger dauerndes Kochen des Caseins mit Säure ca. 15% Glutaminsäure. Auch für Gliadin findet Osborne jetzt 44% gegenüber den 37%, die er selbst früher gefunden hatte. Es wird Gegenstand eingehender Untersuchungen sein, festzustellen, ob tatsächlich die länger dauernde Hydrolyse die Ursache für die höhere Ausbeute an Glutaminsäure ist, oder aber, ob das angewandte Eiweißmaterial in seiner Zusammensetzung inkonstant ist. Diese Vermutung ist sehr naheliegend, wenn man bedenkt, wie roh die Darstellung der einzelnen Proteine ist. Wir verfügen über keine Methode, die für wirklich einheitliches reines Material Garantie leistet. Der eine von uns hat selbst Gliadin verschiedener Provenienz auf Glutaminsäure untersucht und zwar stets nach 16stündigem Kochen mit konzentrierter Salzsäure. Die Ausbeuten an Glutaminsäure schwanken von 30—40%. Manche der untersuchten Präparate waren ohne Zweifel sehr unrein, wie schon die große Menge an Huminsubstanzen, die sich bei der Hydrolyse bildeten, zeigte. Ein ganz besonders sorgfältig dargestelltes Gliadin besaß einen Glutaminsäuregehalt von 45%. Untersuchungen über die Frage, ob der verschiedene Glutaminsäuregehalt des Caseins auf die Methodik zurückzuführen ist oder aber auf das Material, sind im Gange. Daß das käufliche Casein Hammarsten eine sehr verschiedene Zusammensetzung haben kann, beweist der Befund von Glykoll im Casein, den Skraup erhoben hat. Von keinem anderen Forscher ist diese Aminosäure bei der Hydrolyse des Caseins wiedergefunden worden.

Der eine von uns hat vor längerer Zeit begonnen, die Verluste, die bei der Isolierung der Aminosäuren mit Hilfe der Estermethode entstehen, genau zu verfolgen.¹⁾ Durch systematisch fortgesetzte Versuche sollten neue Methoden ausgearbeitet werden, um für die einzelnen Bausteine der Proteine Werte zu erhalten, die dem wirklichen Gehalt an diesen möglichst nahe kommen.

¹⁾ Emil Abderhalden, l. c.

Zunächst wurden an Hand des N-Gehaltes eintretende Verluste von Operation zu Operation genau verfolgt. Derartige Untersuchungen müssen ohne weiteres zeigen, bei welcher Operation die größten Verluste eintreten. Man wird in Zukunft verlangen müssen, daß jede Mitteilung über den Gehalt von Eiweißkörpern an Aminosäuren von einer Kontrolle des Stickstoffgehaltes begleitet ist. Es wird dann ein leichtes sein, festzustellen, ob die gleiche Methode, von verschiedenen Forschern angewandt, annähernd gleiche Resultate gibt. Man wird dann auch leicht erkennen können, worauf sich die verschiedenartigen Resultate begründen.

Unseren Untersuchungen liegt die folgende Fragestellung zugrunde: Welche Ausbeuten liefern die einzelnen Aminosäuren, wenn sie mit Hilfe der Estermethode isoliert werden? Es sollen für jede einzelne Aminosäure die besten Bedingungen ausfindig gemacht werden. Ferner soll geprüft werden, ob man annähernd immer die gleichen Werte wiedererhält. Endlich wird dann festzustellen sein, wie sich die Aminosäuren verhalten, wenn sie zusammengemischt werden. Wir haben vorläufig die Glutaminsäure und die Asparaginsäure untersucht. Der Gang der Untersuchung war kurz folgender: Die reinen Aminosäuren wurden unter den üblichen Bedingungen verestert. Die Veresterung wurde dreimal wiederholt; in einzelnen Fällen wurde nur einmal verestert und in diesem Falle nach den Angaben Emil Fischers¹⁾ mehrere Stunden am Rückflußkühler gekocht. Dann setzten wir die Ester in Freiheit und zwar einesteils mit Hilfe von Natronlauge und Kaliumcarbonat, anderenteils mit der berechneten Menge Natriumalkoholat und endlich nach dem Vorschlage von Pribram mit Ammoniak. Die Ester wurden dann in der üblichen Weise destilliert und das Destillat in verschiedener Weise verseift. In einzelnen Fällen unterließen wir die Destillation und verseiften den Ester direkt durch Kochen mit Salzsäure und verdampften zur Trockene. Der Rückstand wurde dann gewogen, umkrystallisiert und aus der Gewichts-

¹⁾ Emil Fischer, Untersuchungen über Aminosäuren, Polypeptide und Proteine. S. 193—195. Berlin 1906.

menge des reinen Produktes festgestellt, ein wie großer Teil der Aminosäure bei der Veresterung in den Ester übergeführt wurde und bei der Infreiheitsetzung erhalten geblieben war. Die genauen Resultate sind bei den einzelnen Versuchen angeführt.

Im allgemeinen ist folgendes zu bemerken: Beide Aminosäuren, Glutaminsäure und Asparaginsäure, lassen sich mit Hilfe der Estermethode nicht quantitativ nachweisen. Die Ausbeute betrug im besten Falle bei der Glutaminsäure ca. 75% und bei der Asparaginsäure ca. 60%.

Man wird also speziell bei den Angaben über die Ausbeute an Asparaginsäure die Werte um mindestens 40% erhöhen müssen. Die Verluste sind in Wirklichkeit noch bedeutender; denn wir arbeiteten mit den reinen Säuren und unter Vorsichtsmaßregeln, die wir den beiden Dicarbonsäuren speziell angepaßt hatten.

Wir haben bei beiden Aminosäureestern die Verseifung mit Wasser vorgenommen. Hierbei zeigte es sich, daß der Glutaminsäureester bei der Destillation zum größten Teil in Pyrrolidoncarbonsäureester übergeht. Dieser erstarrt in der Vorlage krystallinisch. Emil Fischer und Reginald Boehmer¹⁾ haben kürzlich die gleiche Beobachtung bei der Destillation des aus Glutaminsäureesterchlorhydrat durch Erhitzen auf 160° gewonnenen Produktes mitgeteilt. Verseift man den Ester durch ca. 20 stündiges Kochen mit der 10 fachen Menge Wasser, so erhält man, ebenso wie aus dem reinen, nicht destillierten Glutaminsäureester, Pyrrolidoncarbonsäure. Sie ist meistens nicht ganz rein, sondern enthält geringe Mengen von Glutaminsäure. Wir konnten die einzelnen Fraktionen sehr leicht auf ihren Gehalt an Glutaminsäure prüfen. Pyrrolidoncarbonsäure gibt nämlich mit Triketohydrindenhydrat keine Blaufärbung, während Glutaminsäure in geringsten Spuren sofort die Farbreaktion gibt. Das von Ruhemann dargestellte

¹⁾ Emil Fischer und Reginald Boehmer, Verwandlung der Glutaminsäure bzw. Pyrrolidoncarbonsäure in Prolin. Bericht der Deutschen Chem. Gesellschaft. Jg. 44. S. 1332—37. 1911.

Reagens erwies sich bei unseren Untersuchungen als außerordentlich wertvoll.

Wir haben unsere Versuche bei der Asparaginsäure und der Glutaminsäure nach zwei Richtungen durchgeführt. Einmal suchten wir festzustellen, wieviel von den gesamten Aminosäuren zurückgewonnen werden konnte, wenn reine Asparagin- und Glutaminsäure verestert und dann auf verschiedene Weise (Natronlauge und Kaliumcarbonat, Natriumalkoholat) die Ester in Freiheit gesetzt wurden. Wir haben die bei den einzelnen Operationen entstehenden Verluste durch Verfolgung der Stickstoffwerte festgestellt. Den bei der In-freiheitsetzung der Ester verbleibenden Rückstand haben wir nicht weiter verarbeitet. Aus früheren Erfahrungen wissen wir, daß man bei Wiederholung der Veresterung noch weitere Ausbeuten an Aminosäureestern erhalten kann. Da bei dem größten Teil der mitgeteilten Hydrolysen von Eiweißkörpern die Veresterung nur einmal (in dem einen Falle allerdings wiederholt) durchgeführt worden ist, so haben wir, um möglichst analoge Verhältnisse zu haben, darauf verzichtet, den genannten Rückstand weiter zu untersuchen.

Bei einer anderen Reihe von Versuchen haben wir Studien über die Verseifung des Asparaginsäure- und Glutaminsäureesters durch Kochen mit Wasser ausgeführt. Der Asparaginsäureester läßt sich durch etwa dreißigstündiges Kochen verseifen. Die zurückgewonnene Asparaginsäure erwies sich als rein. Die Mutterlauge enthielt noch Stickstoff; offenbar war die Verseifung eine noch nicht ganz vollständige. Die im folgenden mitgeteilten Versuche geben einen Einblick in die angewandte Methode.

Bei der Glutaminsäure liegen die Verhältnisse komplizierter. Bei der Verseifung des Esters erhielten wir, wie schon oben erwähnt wurde, neben Glutaminsäure stets Pyrrolidincarbonsäure. Die Analysenzahlen der in den folgenden Versuchen (Versuch 1—3) isolierten Produkte geben über das Mengenverhältnis der beiden Verbindungen Aufschluß. Auch das Drehungsvermögen der isolierten Fraktionen weist auf Gemische hin.

Asparaginsäure.

Versuch 1 (Tab. III, 1).

20 g Asparaginsäure werden mit je 200 ccm absolutem Alkohol unter Einleiten von trockenem Salzsäuregas dreimal verestert. Der Ester wird mit Natronlauge und Kaliumcarbonat aus dem Chlorhydrat in Freiheit gesetzt. Die Ausbeute beträgt: 24,5 g = 86,3 %.

Die Destillation erfolgte bis 130° des Ölbadens und 0,6 mm Druck. Es ist dies die für den Asparaginsäureester günstigste Temperatur, da beim raschen Steigen der Temperatur auf 150° bedeutend schlechtere Ausbeuten an Destillat erhalten wurden, wie Tabelle III zeigt.

Es destillierten 23,1 g Ester über = 91 % des Gesamt-esters. Das Destillat wurde mit 230 ccm Wasser 30 Stunden lang am Rückflußkühler gekocht. Es ist unbedingt nötig, sogleich nach der Destillation den Ester mindestens 5 Stunden lang bis zum Verschwinden der alkalischen Reaktion zu kochen. Wartet man mit dem Kochen, oder verseift zunächst nur kurze Zeit, so erhält man selbst nach 30 stündiger Verseifung statt der reinen, krystallinischen Säure einen dunkelbraunen Sirup, aus dem durch Kochen mit Kupferoxyd nur ein geringer Prozentsatz an asparaginsaurem Kupfer gewonnen werden kann. (S. Versuch 3.) Das auf dem Wasserbade bis zum Krystallbrei eingeengte verseifte Destillat hinterließ einen Rückstand von 16,9 g, der aus 100 ccm Wasser mit Tierkohle umkrystallisiert eine Ausbeute von 11,7 g Asparaginsäure gab = 58,5 % d. Theorie.

Analysen: F: 295° (unkorr.) = 299,5° korr. Zersetzung unter Schwarzfärbung.

0,1639 g verbr. 12,4 ccm n_{10}^20 H₂SO₄.

0,1434 g Substanz gaben 0,1914 g CO₂ und 0,0710 g H₂O.

Berechnet für C₄H₇NO₄ (133,01): Asparaginsäure.

C = 36,09 % H = 5,26 % N = 10,53 %

Gefunden:

C = 36,40 % H = 5,50 % N = 10,59 %.

0,2381 g Substanz in 5,6821 g Lösung (3 Mol. HCl) drehen + 0,24° ($\pm 0,01^\circ$) im 1 dm-Rohr. $d = 1,0301$. $[\alpha]_D^{20} = + 5,56^\circ$.

Das Ausgangsmaterial (Kahlbaum) gab folgende Werte: 0,3227 g Substanz in 7,7246 g Lösung (3 Mol. HCl) drehen im 1 dm-Rohr + 1,04° ($\pm 0,01^\circ$). $d = 1,0292$. $[\alpha]_D^{20} = + 24,19^\circ$. Es hat also eine Racemisierung um 18,63° stattgefunden.

Ähnliche Werte zeigte der nicht destillierte, durch Kochen mit Wasser verseifte Ester. Die spezifische Drehung der gewonnenen Asparaginsäure betrug + 8,50° (Versuch II, 2). Es war somit nur eine Racemisierung um 15,69° eingetreten. Bei einem früheren Versuch betrug $[\alpha]_D^{20}$ nach 15 stündigem Kochen: + 9,43°.

Versuch 2.

20 g Asparaginsäure, wie bei Versuch 1, dreimal verestert. Näheres über die Destillation s. Tabelle III, 2 u. 3. Der beim Einengen des durch 30 stündiges Kochen verseiften Destillats verbleibende Rückstand wurde nicht durch Umkrystallisieren aus Wasser gereinigt, sondern durch dreimaliges Auskochen mit je 100 ccm^r absolutem Alkohol, wobei der nicht verseifte Ester in Lösung ging, während als Rückstand des Filtrats reine Asparaginsäure zurückblieb.

Analyse: 0,1702 g Substanz verbr. 12,9 ccm $n_{10} H_2SO_4$.

Ber. für $C_4H_7NO_4$ (133,01): N = 10,53 %

Gefunden: N = 10,62 %.

Sämtliche Abschnitte der Verarbeitung wurden durch Stickstoffanalysen verfolgt. (Tab. II, 1 u. 2.)

Versuch 3. (Tab. III, 4.)

30 g Asparaginsäure wurden in 150 ccm absolutem Alkohol suspendiert, Salzsäuregas bis zur Sättigung eingeleitet und eine Stunde am Rückflußkühler gekocht. Ester mit der berechneten Menge Natriumalkoholat in Freiheit gesetzt. Ausbeute: 26,71 g Ester = 63 % d. Theorie. Bei der Destillation bei 0,8 mm Druck und 150° gingen 18,7 g des Esters in die Vorlage über. Der Ester wurde zunächst nur 2 Stunden mit 190 ccm Wasser gekocht, blieb dann 12 Stunden bei Zimmer-

temperatur stehen und wurde dann noch weitere 28 Stunden durch Kochen verseift. Beim Einengen im Vakuum bei etwa 50° des Wasserbades hinterblieb ein ölicher Rückstand von 3 g, der in 200 ccm Wasser gelöst und mit überschüssigem Kupferoxyd gekocht nur 1,7 g lufttrockenes asparaginsäures Kupfer gab. Das Destillat, das beim Einengen gewonnen wurde, gab nach 2 stündigem Kochen mit der gleichen Menge konzentrierter Salzsäure beim Eindampfen auf dem Wasserbade 1,5 g Asparaginsäurechlorhydrat, so daß insgesamt die Ausbeute auf freie Säure berechnet nur ca. 2 g betrug.

Versuch 4 (Tab. III, 5).

30 g Asparaginsäure wie bei II, 1 einmal verestert gaben nach der Infreiheitsetzung mit Natriumalkoholat

31 g Ester = 72,7 % der Theorie,

die ohne Destillation durch 30stündiges Kochen mit 300 ccm Wasser verseift wurden. Der beim Einengen verbleibende Rückstand wog 23,2 g und gab nach einmaligem Umkrystallisieren aus Wasser

18,8 g Asparaginsäure = 62,67 % der Theorie.

Analyse: 0,1442 g verbr. 10,7 ccm n_{10} H₂SO₄.

Berechnet für C₄H₇NO₄ (133,01): N = 10,53 %.

Gefunden: N = 10,40 %.

0,2156 g Substanz in 5,2088 g Lösung (+ 3 Mol. HCl) drehen + 0,36° (+ 0,02°) im 1 dm Rohr. $d = 1,0231$.

$[\alpha]_D^{20} = + 8,50^\circ$ (vgl. Versuch I, 1).

Glutaminsäure.

Versuch 1.

30 g Glutaminsäure wurden mit 300 ccm absolutem Alkohol und Sättigung mit Salzsäuregas verestert, dann wurde mit weiteren 375 ccm absolutem Alkohol 3 Stunden gekocht. Nach dem Einengen des Esterchlorhydrats unter vermindertem Druck bis zur Krystallisation wurde der Ester mit Natronlauge und Kaliumcarbonat in Freiheit gesetzt.

Analyse des Esters:

0,4525 g Substanz verbr. 22,55 ccm n_{10} H₂SO₄.

Berechnet für $C_9H_{17}NO_4$ (203,01), Glutaminsäurediäthylester:

$$N = 6,98\%$$

$$\text{Gefunden: } N = 6,90\%$$

Ausbeute an Ester: 23,6 g = 57% der Theorie.

Der Ester wurde mit 240 ccm Wasser 30 Stunden lang am Rückflußkühler gekocht. Die alkalische Reaktion war schon nach 3 Stunden verschwunden; doch genügt diese Zeit noch nicht zur vollständigen Verseifung, da man nach 3stündigem Kochen immer nur einen sirupösen Esterrückstand, nicht aber das krystallinische Gemisch der freien Säuren erhält. Nach dem Verseifen wurde im Vakuum bis zum Krystallbrei eingengt. Der im Exsikkator getrocknete Rückstand wog 17,8 g. Er wurde aus 50 ccm verdünntem, ca. 50%igem Alkohol mit Tierkohle umkrystallisiert. Durch fraktionierte Krystallisation wurden 5 Fraktionen erhalten, die mit der 3fachen Menge verdünnten Alkohols umkrystallisiert wurden.

I. Fraktion: 0,7 g.

Geschmack: schwach sauer, Nachgeschmack der Glutaminsäure.

Reaktion mit Triketohydrindenhydrat: sofort positiv.

F: 195° (unk.) unter Aufschäumen.

Drehung des polarisierten Lichtes: ca. + 7°.

II. Fraktion: 1,5 g.

Geschmack: wie I.

Reaktion mit Ruhemanns Reagens: positiv.

F: gegen 178° Zersetzung.

0,3497 g Substanz in 5,9521 g wässriger Lösung, $d = 1,016$, drehen + 0,17°. $[\alpha]_D^{20} = + 2,85^\circ$.

III. Fraktion: 0,8 g.

Geschmack: bittersauer.

Triketohydrindenhydrat: negativ.

F: 153°.

0,1944 g Substanz in 3,7297 g Lösung, $d = 1,012$, drehen im 1 dm Rohr -- 0,43°. $[\alpha]_D^{20} = -- 8,15^\circ$.

IV. Fraktion: 0,5 g.

Geschmack: deutlicher Pyrrolidoncarbonsäuregeschmack.

Triketohydrindenhydrat: negativ.

F: 146°.

0,2280 g Substanz in 5,4228 g Lösung, $d = 1,009$, drehen
— 0,34°. $[\alpha]_D^{20}$: — 7,78°.

V. Fraktion: 0,4 g.

Geschmack: bittersauer.

Triketohydrindenhydrat: negativ.

F: 174° (unk.).

0,1413 g Substanz in 5,6790 g Lösung, $d = 1,0035$,
drehen im 1 dm-Rohr — 0,29° ($\pm 0,01^\circ$). $[\alpha]_D^{20} = -11,61^\circ$.

Analysen:

I. Fraktion: 0,1599 g Substanz geben 0,2423 g CO_2 und
0,0861 g H_2O .

II. Fraktion: 0,1240 g Substanz geben 0,2027 g CO_2
und 0,0667 g H_2O . 0,2035 g verbrauchen 15,5 ccm $n_{/10} \text{H}_2\text{SO}_4$.

III. Fraktion: 0,1441 g verbrauchen 11,2 ccm $n_{/10} \text{H}_2\text{SO}_4$.

IV. Fraktion: 0,1352 g verbrauchen 10,35 ccm $n_{/10} \text{H}_2\text{SO}_4$.

V. Fraktion: 0,1506 g verbrauchen 11,7 ccm $n_{/10} \text{H}_2\text{SO}_4$.
0,1281 g Substanz geben 0,2159 g CO_2 und 0,0601 g H_2O .

Berechnet für $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4$ (147,01): Glutaminsäure.

C = 40,82% H = 6,12% N = 9,53%

Berechnet für $\text{C}_5\text{H}_7\text{NO}_3$ (129,01): Pyrrolidoncarbonsäure.

C = 46,51% H = 5,43% N = 10,86%

Gefunden:	C	H	N
I.	41,32%	5,98%	—
II.	44,58%	5,98%	10,67%
III.	—	—	10,90%
IV.	—	—	10,72%
V.	46,01%	5,21%	10,88%

Zusammenstellung des gefundenen Drehungsvermögens
der einzelnen Fraktionen:

I. ca. +7°. II. +2,85°. III. — 8,15°. IV. — 7,78°. V. — 11,61°.

$[\alpha]_D^{20}$ der Glutaminsäure + 10,5°,

$[\alpha]_D^{20}$ der Pyrrolidoncarbonsäure — 11,52°.

Versuch 2 (Tab. III, 3).

30 g Glutaminsäure werden wie bei Versuch 1 einmal mit nachfolgendem Kochen verestert.

Der Ester wird mit der berechneten Menge Natriumalkoholat in Freiheit gesetzt.

Ausbeute an Ester: 30,5 g = 73,6% der Theorie.

Der Ester wurde bei etwa 0,6 mm Druck destilliert. Bis 150° des Ölbadestemperatur ging zunächst eine klare, wasserhelle Fraktion über. Nach etwa einer Stunde hörte die Destillation auf. Erst bei 170—180° des Ölbadestemperatur begann eine schwach gelblich gefärbte zähe Flüssigkeit überzugehen, die in der Vorlage unter starker Wärmeabgabe krystallinisch erstarrte. Das im Innern des Destillierkolbens befindliche Thermometer zeigte hierbei konstant 151°.

Das Destillat wog 20,8 g; Rückstand: 5,4 g; Verlust: 4,3 g.

Die gewonnenen 20,8 g Ester wurden 30 Stunden lang mit 210 ccm Wasser gekocht. Im Vakuum eingengt hinterblieb ein Rückstand, der getrocknet 15,9 g wog. (+ 1,9 g Probeentnahme des Esters = 1,6 g Säure.)

Aus 50 ccm 50%igem Alkohol umkrystallisiert; in 5 Fraktionen getrennt.

I. Fraktion: umkrystallisiert 1,1 g.

Geschmack: deutlich nach Glutaminsäure.

Reaktion mit Triketohydrindenhydrat: sofort blauviolette Farbe.

F: 198° (unk.) unter Aufschäumen.

II. Fraktion: 1,3 g rein.

Geschmack: bitterlich sauer.

Triketohydrindenhydrat: keine Reaktion.

F: gegen 159° Erweichung.

III. Fraktion: 0,3 g.

Geschmack: nach Pyrrolidoncarbonsäure.

Triketohydrindenhydrat: negativ.

F: 154°.

IV. Fraktion: 0,7 g.

Geschmack und Triketohydrindenhydrat: negativ.

F: 141°.

V. Fraktion.

Geschmack und Triketohydrindenhydrat: negativ.

F: 178°.

Analysen:

I. Fraktion: 0,1612 g geben 0,2458 g CO₂ und 0,0872 g H₂O. 0,1330 g verbrauchen 8,85 ccm ⁿ/₁₀ H₂SO₄.

II. Fraktion: 0,1389 g geben 0,2350 g CO₂ und 0,0735 g H₂O. 0,2875 g verbrauchen 21,7 ccm ⁿ/₁₀ H₂SO₄.

III. Fraktion: 0,1362 g verbrauchen 10,65 ccm ⁿ/₁₀ H₂SO₄.

IV. Fraktion: 0,1886 g verbrauchen 14,5 ccm ⁿ/₁₀ H₂SO₄.

V. Fraktion: 0,1545 g geben 0,2637 g CO₂ und 0,0773 g H₂O.

Berechnet für C₅H₉NO₄ (147,01):

C = 40,82% H = 6,12% N = 9,53%

Berechnet für C₅H₇NO₃ (129,01):

C = 46,51% H = 5,43% N = 10,86%

Gefunden:

	C	H	N
I.	41,59%	6,01%	9,55%
II.	46,14%	5,89%	10,57%
III.	—	—	10,95%
IV.	—	—	10,77%
V.	46,55%	5,56%	10,84%

Spezifische Drehung der isolierten Fraktionen:

I. 0,1869 g in 9,6008 g wässriger Lösung, d = 1,004, drehen im 1 dm-Rohr + 0,19°.

II. 0,2690 g in 5,2092 g Lösung, d = 1,019, drehen im 1 dm-Rohr — 0,39°.

IV. 0,2597 g in 4,0057 g Lösung, d = 1,011, drehen im 1 dm-Rohr — 0,46°.

V. 0,3635 g in 5,6531 g Lösung, d = 1,016, drehen im 1 dm-Rohr — 0,65° (+ 0,02°).

(α)_D^{20°}: I. + 6,14°. II. — 7,41°. IV. — 7,01°. V. — 9,95°.

Versuch 3.

32 g Glutaminsäurechlorhydrat = 25,65 g Säure geben nach 3 maliger Veresterung und Infreiheitsetzung mit Natriumalkoholat :

31,3 g Ester = 88,4% d. Theorie.

Bei der Destillation unter 0,8 mm Druck werden 2 Fraktionen aufgefangen.

I. Fraktion bis etwa 130° des Ölbadest: 4,9 g. Wasserklar, leichtflüssig. Reaktion mit Lackmus alkalisch. Mit Triketohydrindenhydrat: blauviolette Färbung. Es handelt sich also um den Glutaminsäureester.

II. Fraktion bis 180° des Ölbadest: 9,3 g.

Claisenkolbenthermometer: 151°.

Erstarrt in der Vorlage krystallinisch. Reaktion mit Lackmus sauer; mit Triketohydrindenhydrat keine Blaufärbung.

Aus absolutem Alkohol umkrystallisiert scheiden sich lange, zugespitzte Nadeln ab.

F: gegen 46° (unk.) Erweichung, gegen 52° Schmelzen.

0,5712 g in 5,8821 g Lösung, $d = 1,017$, drehen im 1 dm-Rohr — 0,25° (+ 0,01°). $(\alpha)_{D}^{20} = - 2,53^{\circ}$.

Analysen: 0,1602 g gaben 0,3137 g CO₂ und 0,1001 g H₂O. 0,1712 g gaben 13,1 ccm (764 mm, 23°).

Berechnet für C₇H₁₁NO₃ (157,01) = Pyrrolidoncarbonsäureäthylester.

C = 53,5 %, H = 7,07 %, N = 8,92 %.

Gefunden: C = 53,4 %, H = 6,94 %, N = 8,69 %.

Der bei der Destillation verbleibende Rückstand erstarrt krystallinisch: 9,1 g. Reaktion mit Lackmus: sauer; mit Triketohydrindenhydrat negativ.

Will man aus dem Glutaminsäureester direkt reine Glutaminsäure unter Umgehung der Pyrrolidoncarbonsäure gewinnen, dann bewirkt man die Verseifung am besten mit Salzsäure. Beim Eindampfen erhält man dann direkt reines Glutaminsäurechlorhydrat. Von den durchgeführten Versuchen sei einer (Versuch 4) als Beispiel angeführt.

Versuch 4. (Tab. III, 4.)

32 g Glutaminsäurechlorhydrat geben nach 3maliger Veresterung und Infreiheitsetzung mit Natriumalkoholat 31,7 g Ester = 89,5 % der Theorie.

Bei 0,3 mm bis 180° destilliert.

Destillat: 24,6 g. Rückstand: 3,2 g. Verlust 3,9 g.

Destillat mit 250 ccm Wasser 30 Stunden gekocht, bis auf etwa 100 ccm eingengt und Salzsäuregas bis zur Sättigung eingeleitet. Im Eisschrank scheiden sich grobe Krystalle ab. Mutterlauge davon eingedampft.

I. Krystallfraktion: 19,4 g. Rückstand 1,2 g.

Ber. auf 32 g Chlorhydrat 60,6 %. Rückstand 3,8 %.

Analysen der mit Alkohol und Äther gewaschenen

I. Fraktion.

0,2833 g verbr. 15,35 ccm n_{10} AgNO_3 .

0,1962 g » 10,6 » n_{10} H_2SO_4 .

Berechnet für $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4\text{HCl}$ (183,46)

Cl = 19,33 % N = 7,63 %

Gefunden

Cl = 19,21 % N = 7,57 %.

Das ursprüngliche Drehungsvermögen des Ausgangsmaterials war nicht verändert.

0,5412 g Substanz in 5,3787 g wässriger Lösung, $d = 1,034$, drehten im 1 dm-Rohr $+ 2,40^\circ$ ($\pm 0,02^\circ$).

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 23,06^\circ$. Ber. für Glutaminsäure: $+ 28,78^\circ$.

Der bei der Destillation zurückgebliebene Rückstand wird durch 2ständiges Kochen mit der 10fachen Menge $5 \times n$. Salzsäure in Glutaminsäurechlorhydrat übergeführt. Beim Einleiten von Salzsäuregas bis zur Sättigung fallen im Eisschrank 2,4 g Glutaminsäurechlorhydrat aus. Mutterlauge eingengt: 0,9 g.

Das aus dem Destillationsrückstand gewonnene Chlorhydrat zeigt gegenüber dem Ausgangsmaterial eine geringe Racemisierung:

0,2861 g in 6,5129 g wässriger Lösung, $d = 1,015$, drehen im 1 dm-Rohr $+ 0,96^\circ$.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = + 21,53^\circ$; berechnet für Glutaminsäure: $+ 23,40^\circ$.

Bestimmung der Ausbeute an Asparaginsäure und Glutaminsäure nach Anwendung der Estermethode.

Die folgenden Tabellen geben einen Überblick über einige der ausgeführten Versuche. Die Einzelheiten der Versuchsanordnung ergeben sich ohne weiteres aus der Übersicht; wir glauben deshalb, auf weitere Beschreibungen verzichten zu können.

I. Versuche mit Asparaginsäure.

Tabelle I. Asparaginsäure.

	Versuch I		Versuch II		Ester mit Natronlauge und Kaliumcarbonat in Freiheit gesetzt			
					Versuch III		Versuch IV	
	Stickstoffgehalt							
	in g	in %	in g	in %	in g	in %	in g	in %
Ausgangsmaterial ..	2,106	100	2,106	100	2,106	100	4,212	100
Ätherische Lösung der Ester	1,750	83,10	1,721	81,71	1,710	81,29	3,421	81,41
Probeentnahme ...	0,125	5,93	0,102	4,84	0,112	5,31	0,121	2,87
Destillat (bis 160° bei 0,2 mm Druck)	1,325	62,91	1,294	61,44	1,300	61,72	2,728	64,77
Probeentnahme	0,022	1,04	0,152	7,21	0,113	5,31	0,125	2,96
Destillationsrückstand	0,144	6,83	0,125	5,93	0,172	8,17	0,310	7,36
Verlust bei der Destillation	0,156	7,43	0,200	9,50	0,126	6,09	0,262	6,41
Reine Asparaginsäure	1,16	55,08	1,06	50,33	1,00	47,49	2,25	53,41

Bei Versuch 1—4 sind die Ester mit Natronlauge und Kaliumcarbonat in Freiheit gesetzt worden. Die Ausbeute an reiner Asparaginsäure bezogen auf das Ausgangsmaterial betrug 47,49%, 50,33%, 53,41% und 55,08%. Die in der Tabelle wiedergegebenen Werte zeigen, daß bei gleichartiger Durchführung der einzelnen Operationen durch die gleiche Person Werte erhalten werden, die sehr gut unter-

einander übereinstimmen. Die Ausbeute an reiner Asparaginsäure war im höchsten Falle 55%. Es verblieb eine Mutterlauge, die ohne Zweifel noch etwas Asparaginsäure enthielt; ferner ist es möglich, durch Verarbeitung des Destillationsrückstandes die Ausbeute noch etwas zu steigern. Über 60% dürfte man im allgemeinen wohl kaum hinaus kommen. Zu berücksichtigen wären auch noch die Verluste, die durch die Probeentnahme zu den Stickstoffbestimmungen eingetreten sind. Bei der Infreihetsetzung der Ester erhielten wir rund 80% des gesamten Stickstoffs in den Äther; die Destillation ergab rund 60% des Stickstoffs des Ausgangsmaterials. Im Destillationsrückstand verblieben rund 7% des Gesamtstickstoffs.

Die bei der Destillation eingetretenen Verluste machen etwa 8% aus. Es handelt sich hier um stickstoffhaltige Verbindungen, die bei der Destillation in der Vorlage nicht kondensiert werden. Sie finden sich in der mit flüssiger Luft gekühlten Vorlage. Ihre Natur ist nicht näher untersucht worden.

Tabelle II. Asparaginsäure.

	Stickstoffgehalt					
	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3	
	g	%	g	%	g	%
1. Ausgangsmaterial.....	2,106	100	2,106	100	2,106	100
2. Lösung der Ester	1,416	67,24	1,516	71,95	1,646	78,14
a) Probeentnahme	0,062	2,94	0,059	2,81	0,014	0,67
b) Destillat	1,166	55,36	1,112	52,78	0,957	45,44
c) Destillerrückstand.....	0,064	3,03	0,152	7,24	0,567	26,90
d) Verlust bei d. Destillat..	0,124	5,91	0,193	9,12	0,118	5,13
e) Probe vom Destillat ...	0,023	1,11	0,027	1,28	0,010	0,48
f) 1. Verseiftes Destillat, rein	0,853	40,50	0,832	39,51	0,769	36,50
g) 2. „ „ Mutterlauge	0,271	12,86	0,247	11,72	0,173	8,19
3. Rückstand bei der Infreihetsetzung	0,679	32,22	0,578	27,45	0,437	20,75
4. Sa. der Proben, zu Tab. III zu addieren	0,085	4,05	0,086	4,09	0,024	1,15

Tabelle III. Asparaginsäure.

Ver- such- Nr.	Aus- gangs- mate- rial	Ver- estert- mal	Ester in Freiheit gesetzt mit	Ester- Ausbeute		Destillation					Verseiftes Destillat umkrystallisiert			Bemerkungen			
				g	%	Temp. mm	Stun- den- dauer	g	% der Säure	% des Esters	g Rück- stand	g	% der Säure		% des Ge- samt- Esters	% des Destil- lats	
1	20	3	Natronlauge + Kaliumcarbonat	24,5	86,3	130°	0,6	1	23,1	81,3	94,3	0,6	11,7	58,5	67,9	72	
2	20	3	desgl.	20	70,5	130°	0,9	1 1/2	18,4	64,7	91,8	1,0	8,1	40,5	57,6	62,6	Stickstoffverluste durch Probeentnahme, Tab. II, 1. 4,05 %
3	20	3	desgl.	20,5	72,1	140°	0,8	1	16,5	58,1	80,4	2,2	7,9	39,5	54,8	68,2	Stickstoffverluste durch Probeentnahme Tab. II, 2. 4,09 %
4	30	1	Natrium-alkoholat	26,7	63	150°	0,1	2	13,2	30,8	50	5,4	—	—	—	—	Keine Verseifung
5	30	1	desgl.	31	72,7	—	—	—	—	—	—	—	18,8	62,6	85,8	—	Nicht destilliert
6	20	3	desgl.	20,2	71	130°	0,8	1 1/2	14,3	50	70	3,1	9,2	46	65,7	92	
7	20	3	desgl.	NaCl- haltig	—	150°	0,9	1 1/2	13	45,7	—	NaCl- haltig	7,3	36,5	—	79,8	Stickstoffverluste Tab. II, 3. 1,15 %
8	20	1	Ammoniak	15,2	61,5	140°	0,2	1/2	14,1	50	93	0,7	8,9	44,5	83,2	89,5	
9	20	3	desgl.	22,7	80	150°	0,5	1	11,3	40	50	9,7	—	—	—	—	Keine Verseifung

Bei Versuch 1 und 2 (Tab. II) sind die Ester mit Natronlauge und Kaliumcarbonat in Freiheit gesetzt; bei Versuch 3 wurde Natriumalkoholat angewandt. Die Ausbeuten an Ester, an Destillat und schließlich an freier Asparaginsäure stehen hinter den bei der ersten Versuchsreihe (Tab. I) erhaltenen Werten zurück. Die Ausbeuten an reiner Asparaginsäure betragen rund 40%, berechnet auf den Stickstoffgehalt des Ausgangsmaterials. Ein erheblicher Anteil von Stickstoff verblieb in der Mutterlauge. Diese Unterschiede zeigen, daß bei der Anwendung der Estermethode die Übung eine ziemlich bedeutende Rolle spielt.

In die Tabelle III sind die in Tabelle II mitgeteilten Versuche und ferner noch einige andere aufgenommen. Bei einem Teil der Versuche sind die Ester mit Natronlauge und Kaliumcarbonat, bei einem zweiten Teil mit Natriumalkoholat und endlich bei der dritten Versuchsreihe mit Ammoniak in Freiheit gesetzt worden. Die Ausbeute an Estern war bei jeder Art der Esterinfreisetzung ziemlich die gleiche. Es dürfte kaum eine Methode einen Vorzug verdienen. Wurde die Temperatur beim Destillieren sofort auf 150° gesteigert, dann war die Ausbeute an Destillat stark vermindert. Man ersieht ferner aus den in der Tabelle enthaltenen Angaben, daß die Wiederholung der Veresterung die Ausbeute an Ester erheblich steigert. Bei den in Tabelle I und II mitgeteilten Versuchen ist die Veresterung in allen Fällen 3 mal durchgeführt worden.

II. Versuche mit Glutaminsäure.

(S. die Tabelle I auf Seite 467.)

Bei allen 4 Versuchen wurde die angewandte reine Glutaminsäure dreimal verestert. Die Ester setzten wir mit Natronlauge und Kaliumcarbonat in Freiheit. Die Gesamtausbeute an reiner Glutaminsäure betrug nach Verseifung des Esters mit Salzsäure rund 70%. Sie ist somit beträchtlich höher als bei der Asparaginsäure. Berücksichtigt man jedoch nur die Glutaminsäure, die man aus dem Destillat erhält, dann kommt man auch nur bis auf etwa 60%. Ca. 10%

Tabelle I. Glutaminsäure.

	Versuch I		Versuch II		Ester mit Natronlauge und Kaliumcarbonat in Freiheit gesetzt			
					Versuch III		Versuch IV	
	Stickstoffgehalt							
	in g	in %	in g	in %	in g	in %	in g	in %
Ausgangsmaterial ..	2,375	100	2,375	100	2,375	100	2,375	100
Ätherische Lösung der Ester	1,910	80,42	1,935	81,47	1,875	78,95	1,812	76,29
Probeentnahme	0,025	1,06	0,019	0,80	0,021	0,88	0,018	0,76
Destillat (bei 180° bei 0,2 mm Druck)	1,425	60,00	1,215	51,16	1,325	55,79	1,512	63,66
Probeentnahme	0,018	0,76	0,025	1,06	0,020	0,84	0,024	1,01
Destillationsrück- stand	0,225	9,48	0,510	21,46	0,386	16,25	0,202	8,50
Verlust bei der De- stillation	0,235	9,88	0,191	8,05	0,143	6,03	0,080	3,37
Reine { aus Destillat	1,375	57,89	1,195	50,31	1,286	54,15	1,500	63,16
Gluta- { aus Rück-								
min- { stand ...	0,202	8,54	0,488	20,55	0,372	15,66	0,195	8,21
säure {								
Summe....		66,43		70,86		69,81		71,37

lassen sich aus dem Destillationsrückstand gewinnen. Die Versuche verliefen nicht in allen Fällen so einheitlich, wie dies bei Versuch 1—4 der Fall war. Bei den zuerst ausgeführten Versuchen erhielten wir einen viel erheblicheren Destillationsrückstand und dann auch eine viel schlechtere Ausbeute an Glutaminsäure aus dem Destillat. Die Ausbeute an Destillat ließ sich durch möglichst rasche Steigerung der Temperatur des Ölbad es auf 180° wesentlich erhöhen. Es geht dann der gebildete Pyrrolidoncarbonsäureester mit hinüber; meist beobachtet man hierbei Krystallisation. Was die einzelnen Werte anbetrifft, so ist die Ausbeute an Estern bei der In-freiheitsetzung gleich derjenigen bei der Asparaginsäure. Das Destillat gab bei der Glutaminsäure ebenfalls etwa 60% des Stickstoffs des Ausgangsmaterials. Der Verlust bei der Destil-

lation war gleichfalls ähnlich. Doch zeigen sich bei der Glutaminsäure größere Schwankungen. Auch bei diesen Versuchen zeigt sich deutlich der Einfluß größerer Übung.

Tabelle II. Glutaminsäure.

	Stickstoffgehalt			
	Versuch 1		Versuch 2	
	g	‰	g	‰
1. Ausgangsmaterial	1,753	100	1,753	100
2. Ätherlösung der Ester	1,078	61,49	1,370	78,11
a) Probeentnahme	0,011	0,94	0,012	0,68
b) Destillat	0,852	48,58	0,788	44,95
c) Destillationsrückstand	—	—	0,343	19,56
d) Verlust bei der Destillation	0,215	11,97	0,227	12,92
e) Probe des Destillats	0,027	1,53	0,010	0,60
f) „ „ Rückstandes	—	—	0,011	0,65
g) 1. Verseiftes Destillat, Krystalle	0,778	44,35	0,771	44,0
2. „ „ Mutterlauge	0,013	0,77	0,013	0,72
h) 1. „ Rückstand, Krystalle	—	—	0,304	17,36
2. „ „ Mutterlauge	—	—	0,011	0,62
3. Rückstand bei der Infreiheitsetzung der Ester	0,696	39,67	0,367	21,1
4. Summe der Proben; zu Tab. III zu addieren	0,038	2,74	0,031	1,93

Tabelle II berichtet über 2 Versuche. Bei dem ersten wurde der Ester mit Natronlauge und Kaliumcarbonat, bei dem zweiten mit Natriumalkoholat in Freiheit gesetzt. Die Ausbeute an Glutaminsäure betrug im besten Falle 61‰. Die Ursache der geringeren Ausbeute bei diesen Versuchen dürfte auf die rasche Durchführung der Destillation zurückzuführen sein.

Tabelle III enthält die Versuche der Tabelle II mit einigen anderen zusammengestellt. Es sind Versuche angeführt, bei denen die Ester mit Natronlauge und Kaliumcarbonat in Freiheit gesetzt wurden, solche mit Natriumalkoholat und solche, bei denen Ammoniak verwendet wurde. Auch hier kommt der Einfluß der wiederholten Veresterung zur Geltung.

Tabelle III. Glutaminsäure.

Versuch-Nr.	Ausgangsmaterial	Veresertmal	Ester in Freiheit-gesetzt mit	Ester-Ausbeute		Destillation					Verseiftes Destillat		Verseifter Rückstand		Gesamt-Ausbeute %	Bemerkungen	
				-g	%	Temperatur	Stunden	g Destillat	g Rückstand	g Verlust	g	%	g	%			g
1	20	3	Natronlauge + Kaliumcarbonat	22,4	81,1	160°	0,8	11½	12,4	8,4	1,6	7,5	30	6,8	27	57	
2	18,4	3	desgl.	15,8	62,2	180°	0,8	½	11,1	—	3,7	10,19	44,35	—	—	44,35 + 2,74 (Vers. 1, Tab. II.)	
3	30	1	Natriumalkoholat	30,5	73,6	180°	0,3	3	20,8	5,4	4,3	17,5	—	—	—	—	Ester mit Wasser verseift. Gemisch von Pyridoncarbon-säure und Glutaminsäure
4	25,65	3	desgl.	31,7	89,5	100° + 180°	0,3	3	24,6	3,2	3,9	20,6	64,4	3,3	10,3	74,7	
5	20	3	desgl.	19	68,8	180°	0,6	1½	12,4	5,4	1,2	9,6	38,4	4,4	17,6	56	
6	18,4	3	desgl.	NaCl haltig	—	180°	0,8	1½	10,3	—	—	9,88	44,0	3,99	17,36	61,36 + 1,93 (Vers. 2, Tab. II.)	
7	10	1	Ammoniak	9,8	71	—	—	—	—	—	—	8,6	70,5	—	—	—	
8	20	3	desgl.	20,5	74,2	180°	0,8	2	8,1	11,6	0,8	7,4	29,6	9,5	38,0	67,6	

Überblicken wir die erhaltenen Resultate, dann ergibt sich, daß selbst bei Anwendung der reinen Aminosäuren die Estermethode bei einmaliger Anwendung zu bedeutenden Verlusten führt. Sie betrug bei der Asparaginsäure ca. 40% und bei der Glutaminsäure ca. 30%. Die letztere Aminosäure ist nur in den seltensten Fällen ausschließlich mit Hilfe der Estermethode aus dem Hydrolysat von Eiweißkörpern gewonnen worden. Fast in allen Fällen wurde sie direkt als salzsaures Salz abgeschieden. Die in der Literatur angegebenen Werte dürften somit der Wirklichkeit sehr nahe kommen. Die Asparaginsäure dagegen ist stets mit Hilfe der Estermethode isoliert worden, weil zurzeit keine Methode bekannt ist, die gestattet, die Asparaginsäure quantitativ aus dem bei der Hydrolyse von Eiweißkörpern entstehenden Aminosäurengemisch abzutrennen. Die Asparaginsäure findet sich in den Eiweißkörpern, soweit unsere Kenntnisse reichen, stets in relativ geringen Mengen. Es ist kein Protein bekannt, das große Mengen von dieser Aminosäure aufweist. Die für die einzelnen Eiweißkörper angegebenen Werte dürften auf Grund unserer Untersuchungen und der Erfahrungen von Osborne ohne weiteres mindestens verdoppelt werden. Bei unseren Versuchen arbeiteten wir unter den denkbar besten Bedingungen. Wir gingen von den reinen Aminosäuren aus und verarbeiteten sie einzeln. Wir werden unsere Versuche fortsetzen und zunächst eine Aminosäure nach der andern in gleicher Weise mit Hilfe der Estermethode isolieren. Schließlich werden wir, wie es bereits Osborne getan hat, die einzelnen Aminosäuren mischen und wiederum mit Hilfe der Estermethode die einzelnen Verbindungen zurückgewinnen. Endlich wird es notwendig sein, bestimmte Mengen der Aminosäuren zu Proteinen möglichst bekannter Zusammensetzung hinzuzufügen und dann die Ausbeuten, die man mit Hilfe der Estermethode erhält, zu vergleichen. Auf diesem Wege wird es möglich sein, annähernd die wirklichen Ausbeuten an einzelnen Aminosäuren von Fall zu Fall berechnen und die Frage zu entscheiden, ein wie großer Teil des Eiweißmoleküls noch unbekannt ist. Vor allen Dingen wird es von Interesse sein,

durch Verarbeitung künstlicher Gemische aller bekannten Aminosäuren festzustellen, ob durch Zersetzung Produkte entstehen, die denen entsprechen, die man bei der Aufarbeitung der Aminosäurengemische von Eiweißhydrolysen beobachtet. Speziell beim Casein erhält man größere Mengen eines nach Fleischextrakt riechenden Sirups, über dessen Natur sich zurzeit nichts aussagen läßt. Ebenso sind bei den übrigen Eiweißstoffen Produkte beobachtet worden, die nicht krystallisieren und über deren Zusammensetzung wir bis jetzt noch gar nicht orientiert sind.
