

## **Die Hydrolyse des Kartoffeleiweißes.**

Von

**Dr. B. Sjollema und Dr. I. J. Rinkes.**

Der Redaktion zugegangen am 8. Dezember. 1911).

Der Hauptzweck dieser Arbeit war, die Zusammensetzung des Haupteiweißes der Kartoffeln kennen zu lernen.

Weil die Kenntnis der Eiweißkörper unserer wichtigsten Nahrungsmittel von großem Interesse ist und auch weil einer von uns sich mit dem Eiweiß der Kartoffeln in technischer Hinsicht viel beschäftigte, haben wir diesen Eiweißkörper für unsere Arbeit gewählt, obschon ihrer Reindarstellung große Schwierigkeiten im Wege stehen.

Die Kartoffeln wurden, nachdem sie sorgfältig gereinigt waren, zu einem feinen Brei zerkleinert (mit Raspel und Fleischmühle) und alsdann stark gepreßt, der Preßrückstand mit 10%iger Kochsalzlösung maceriert und nach einigen Stunden aufs Neue gepreßt.

Die beim Pressen erhaltenen Flüssigkeiten wurden nach Zusatz von Toluol — um Zersetzung durch Gärung zu vermeiden — in hohen Zylindern der Ruhe überlassen, damit die Stärke sich absetzte.

Zur Abscheidung des Eiweißes aus den abgeheberten Lösungen diente Kochsalz, das zur Sättigung zugesetzt wurde.

Der dabei entstandene Niederschlag wurde nach einigen Stunden abgesaugt und dann in 10%iger Kochsalzlösung gelöst und filtriert. Die filtrierte Lösung wurde solange gegen Wasser dialysiert, bis nur sehr geringe Spuren von Chlor mehr zurückgeblieben waren. (Es wurde dabei das hiesige sehr reine Leitungswasser benutzt.)

Soweit das Eiweiß sich beim Dialysieren nicht schon abgesetzt hatte, wurde es mit Alkohol vollständig niedergeschlagen.

Das in dieser Weise erhaltene Eiweiß war niemals vollständig rein. Der Stickstoffgehalt betrug ungefähr 14,9%.

Durch wiederholtes Niederschlagen mit Kochsalz, Auflösen in verdünnter Kochsalzlösung und Dialysieren bekamen wir ein Präparat mit 15,9% Stickstoff. Von diesem reineren Eiweiß erhielten wir 40 g. Osborne und Campbell, die in ähnlicher Weise das Eiweiß der Kartoffeln abschieden und reinigten,<sup>1)</sup> erhielten ein Präparat mit 16,24% Stickstoff.

Weil die Darstellung des reinen Eiweißes sehr zeitraubend ist und speziell bei der weiteren Reinigung — durch Unlöslichwerden des Eiweißes — viel verloren geht, haben wir uns entschlossen, unsere Untersuchungen zum Teile mit dem weniger reinen Eiweiß — mit 14,7—14,9% Stickstoff und also mit etwa 8% stickstofffreien Verunreinigungen (vielleicht gummiartige Kohlenhydrate) — auszuführen. Für einen Teil unserer Untersuchungen, z. B. für die Bestimmungen nach der Methode von van Slyke bedienten wir uns ausschließlich unseres reinsten Eiweißes.

Unsere Arbeit gliedert sich in folgende Teile:

I. Die Bestimmung der verschiedenen Diaminosäuren nach van Slyke.

II. Versuche über die Hydrolyse des Eiweißes mittels Fluorwasserstoffsäure.

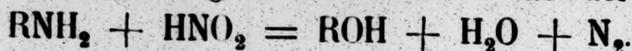
III. Bestimmung der verschiedenen Diaminosäuren nach Kossel und Patten.

IV. Bestimmung der Monoaminosäuren nach der von Emil Fischer eingeführten Estermethode.

V. Bestimmung des Tyrosins.

I. Bestimmung der verschiedenen Diaminosäuren nach van Slyke.

Die im vorigen Jahre von van Slyke<sup>2)</sup> angegebene Methode beruht auf der Zersetzung der Aminosäuren nach der Gleichung:



<sup>1)</sup> Journ. of the Amer. Chem. Soc., Bd. 18, S. 575.

<sup>2)</sup> Ber., Bd. 43 (1910), S. 3170.

Er hat für die Ausführung einen speziellen Apparat konstruiert, der auch von uns mit gutem Erfolge angewendet wurde.

Zur Bestimmung der vier Diaminosäuren muß der Schwefelgehalt bekannt sein, sodaß der Cystingehalt sich berechnen läßt. Der Arginingehalt wird dadurch in der mit Phosphorwolframsäure niedergeschlagenen Mischung von den Diaminosäuren bestimmt, daß das Arginin beim Kochen mit Natronlauge die Hälfte des Stickstoffs als Ammoniak abgibt. Auch aus dem Cystin wird hierbei ein Teil des Stickstoffs unter Ammoniakbildung (17%) in Freiheit gesetzt.

Den Histidingehalt findet man dadurch, daß von dem Nichtaminostickstoff die berechnete Menge Nichtamino-Argininstickstoff subtrahiert wird, wobei zu berücksichtigen ist, daß vom Histidin  $\frac{1}{3}$  und vom Arginin  $\frac{1}{4}$  des Stickstoffs mit  $\text{HNO}_2$  freien Stickstoff liefert. Den Lysingehalt findet man schließlich dadurch, daß von dem im ganzen gefundenen Aminostickstoff der Diaminosäuren der für die drei obengenannten Körper berechnete Aminostickstoff subtrahiert und dieser restierende Aminostickstoff auf Lysin umgerechnet wird.

Es wurden etwa 4 g von unserem reinsten Eiweißpräparat (nicht vollständig trocken) während 20 Stunden mit  $\text{HCl}$  von 20% im Ölbad gekocht. Nach Verdunsten des größten Teils der Salzsäure wurde in Wasser aufgenommen und auf 200 ccm gebracht. Durch Destillation mit  $\text{MgO}$  wurde in einem Teile dieser Lösung das Ammoniak bestimmt. Es zeigte sich dabei, daß 9,24% des Stickstoffs Ammoniakstickstoff war. Das von den 200 ccm übrig gebliebene Hydrolysat wurde zur Entfernung des Ammoniaks so lange auf dem Wasserbade mit  $\text{BaCO}_3$  erwärmt, daß sich kein  $\text{NH}_3$  mehr entwickelte; alsdann mit  $\text{H}_2\text{SO}_4$  das  $\text{BaCO}_3$  und mit  $\text{Ag}_2\text{SO}_4$  die noch anwesende Salzsäure entfernt, mit Wasser gewaschen und durch Einengen auf 100 ccm gebracht. Diese Lösung enthielt 384,9 mg Totalstickstoff (bestimmt nach Kjeldahl). Zur Bestimmung dienten zweimal 10 ccm. Verbrauch im Mittel 27,49 ccm  $\frac{1}{10}\text{-n-H}_2\text{SO}_4$ .

Der Niederschlag von  $\text{BaSO}_4$  und  $\text{AgCl}$  wog 47,0 g und enthielt 50,3 mg Melaninstickstoff. Zur Analyse: 5,1211 g. Verbrauch 3,90 ccm  $\frac{1}{10}\text{-n-H}_2\text{SO}_4$ .

Es wurden zwei Bestimmungen von Aminostickstoff mit dem Apparat von van Slyke gemacht; jedesmal in 5 ccm der Lösung.

Gefunden wurde 28,29, resp. 28,31 ccm N bei 17° C. und 755 mm im Mittel übereinstimmend mit 326,2 mg Aminostickstoff. Zur Bestimmung des in Form von Diaminosäuren anwesenden Aminostickstoffs wurde der

noch übrige Rest der Lösung (70 ccm) versetzt mit 60 ccm einer Lösung, welche auf 100 ccm 20 g Phosphorwolframsäure und 5 g Schwefelsäure enthielt. Nach zwei Tagen wurde scharf abgeseigt und mit 10 ccm einer 2,5%igen Phosphorwolframsäurelösung, die 5% Schwefelsäure enthielt, gewaschen. Der Niederschlag wurde, nachdem er in Wasser suspendiert war, mit einer kalten Barytlösung zersetzt, das Filtrat mit Kohlensäure von Ba befreit und bei vermindertem Druck zu 50 ccm eingedampft. Diese Lösung enthielt, berechnet auf die ursprüngliche Hydrolyseflüssigkeit, 79 mg Totalstickstoff, und nach van Slyke bestimmt 40,2 mg Aminostickstoff. Zur Analyse: 10 ccm. Verbraucht 7,86 ccm  $\frac{1}{10}$ -N-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. 10 ccm, zur Aminostickstoffbestimmung benutzt, lieferten 9,72 ccm Stickstoff s. G. 1,160.

Sie enthielt also 38,8 mg Nichtaminostickstoff. Weiter wurde ein Teil der Lösung mit NaOH in der von van Slyke angegebenen Weise<sup>1)</sup> behandelt, wobei 50% des Argininstickstoffs und 17% des Cystinstickstoffs als Ammoniak frei wird. Aus dem Ergebnis dieser Bestimmung ließ sich als Summe des Totalargininstickstoffs und 34% des Cystinstickstoffs 41,2 mg berechnen. Verbraucht 6,16 ccm  $\frac{1}{10}$ -N-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Schließlich wurde ein Teil der mit NaOH behandelten Flüssigkeit in einem Silbertiegel eingedampft und mit 3 g KNO<sub>3</sub> zusammengeschmolzen und nach Entfernung der Kieselsäure und Salpetersäure (mit HCl) der Schwefel als BaSO<sub>4</sub> bestimmt. Daraus ließ sich der Cystinstickstoff auf 12,8 mg berechnen. Gefunden 90,0 mg BaSO<sub>4</sub>.

Von der Bestimmung der Monoaminodicarbonsäuren wurde abgesehen, weil van Slyke<sup>2)</sup> die Titration dieser Säure nicht für alle Proteine empfehlen kann. Die Resultate sind in der umstehenden Tabelle zusammengefaßt:

Die Zahlen beziehen sich auf die nach Hydrolyse anwesenden Stickstoffverbindungen.

## II. Hydrolyse mit Fluorwasserstoffsäure.

Nach Hugouenq und Morel<sup>3)</sup> würde die Hydrolyse mit Fluorwasserstoffsäure der mit Salzsäure oder Schwefelsäure vorzuziehen sein. Es sollten weniger Zersetzungsprodukte entstehen. Ein Vorteil würde auch die einfache Methode sein, die Säure aus der Lösung zu entfernen. Als ein großer Nachteil war jedenfalls zu betrachten, daß keine gläsernen Gefäße

<sup>1)</sup> Ber., Bd. 43, S. 3177 ([1910]).

<sup>2)</sup> Ber., Bd. 44, S. 1687 (1911).

<sup>3)</sup> Comptes rendus, Bd. 148, S. 236.

benutzt werden können und daß, wie angegeben wird, die Konzentration der Säure zur vollständigen Hydrolyse nicht für alle Proteine dieselbe sein kann, und es bei zu großer Konzentration der Säure Polypeptide gibt, die sich nicht spalten.

	mg N	% vom Totalstickstoff	Wegen Löslichkeit der Phosphorwolframate korrigierte %																				
Ammoniak-N . . . . .	44,3	9,24	—																				
Melanin-N . . . . .	50,3	—	—																				
Total-N (minus NH <sub>3</sub> -N und Melanin-N) . . . . .	384,9	—	—																				
Total-N . . . . .	479,5	—	—																				
Totalamino-N . . . . .	326,2	—	—																				
Stickstoff im Phosphorwolframsäure-Niederschlag 79 mg	<table border="0"> <tr> <td rowspan="2">Nicht-Amino-N</td> <td rowspan="2">}</td> <td>Arginin-N . . . . .</td> <td>36,8</td> <td>7,67</td> <td>8,34</td> </tr> <tr> <td>Histidin-N . . . . .</td> <td>16,5</td> <td>3,60</td> <td>4,23</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">Amino-N</td> <td rowspan="2">}</td> <td>Lysin-N . . . . .</td> <td>12,9</td> <td>2,69</td> <td>2,80</td> </tr> <tr> <td>Cystin-N . . . . .</td> <td>12,8</td> <td>2,67</td> <td>3,42</td> </tr> </table>	Nicht-Amino-N	}	Arginin-N . . . . .	36,8	7,67	8,34	Histidin-N . . . . .	16,5	3,60	4,23	Amino-N	}	Lysin-N . . . . .	12,9	2,69	2,80	Cystin-N . . . . .	12,8	2,67	3,42		
Nicht-Amino-N	}			Arginin-N . . . . .	36,8	7,67	8,34																
		Histidin-N . . . . .	16,5	3,60	4,23																		
Amino-N	}	Lysin-N . . . . .	12,9	2,69	2,80																		
		Cystin-N . . . . .	12,8	2,67	3,42																		
Stickstoff im Phosphorwolframsäure-Filtrat 305,9 mg	<table border="0"> <tr> <td rowspan="2">Nicht-Amino-N</td> <td rowspan="2">}</td> <td>(Prolin-N, Oxyprolin-N, Tryptophan-N) . . . . .</td> <td>19,9</td> <td>4,15</td> <td>—</td> </tr> <tr> <td>Amino-N . . . . .</td> <td>286,2</td> <td>—</td> <td>—</td> </tr> </table>	Nicht-Amino-N	}	(Prolin-N, Oxyprolin-N, Tryptophan-N) . . . . .	19,9	4,15	—	Amino-N . . . . .	286,2	—	—												
Nicht-Amino-N	}			(Prolin-N, Oxyprolin-N, Tryptophan-N) . . . . .	19,9	4,15	—																
		Amino-N . . . . .	286,2	—	—																		

Wir haben 4 g von unserem reinsten Kartoffeleiweiß (mit 15,9% N) während 24 Stunden mit 100 ccm HFl von 21% im kochenden Wasserbade erhitzt; alsdann die HFl aus dem Wasserbade entfernt (in einer Bleischale), den Rückstand in Wasser aufgenommen, mit BaCO<sub>3</sub> den Ammoniak verflüchtigt und das Ba mit Schwefelsäure entfernt. Es wurde dann filtriert, mit Wasser gewaschen und durch Eindampfen auf 100 ccm gebracht. Zur Analyse: zweimal 10 ccm. I. Verbraucht 33,45 ccm  $\frac{1}{10}$ -n-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. II. 33,21 ccm  $\frac{1}{10}$ -n-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, im Mittel 468,0 mg.

Der Melaninniederschlag (von BaFl<sub>2</sub> und BaSO<sub>4</sub>) wog 24 g und enthielt 55 mg Melanin-N; also ein wenig mehr als bei der Hydrolyse mit Salzsäure. Zur Analyse: 2,9000 g. Verbraucht 4,77 ccm  $\frac{1}{10}$ -n-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Zweimal wurden 4 ccm zur Aminostickstoffbestimmung benutzt. Gefunden im Mittel 23,1 ccm Stickstoff s. G. 1,193, was mit 344,5 mg Aminostickstoff übereinstimmt.

Für die Ammoniakstickstoffbestimmung wurde eine neue Portion des Eiweißes in derselben Weise mit Fluorwasserstoffsäure hydrolysiert.

Gefunden wurde dabei, daß 9,4% des Totalstickstoffs als Ammoniak-N anwesend war: also ungefähr gleichviel wie bei der Hydrolyse mit Salzsäure. Der Totalstickstoff im Hydrolysat betrug 418,4 mg. 20 ccm. mit Magnesiumoxyd destilliert, verbrauchten 2,89 ccm  $\frac{1}{10}$ -n-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Die Frage, ob der Zerfall der Polypeptide in Aminosäuren ein vollständiger war, haben wir dadurch zu lösen versucht, daß wir das Verhältnis zwischen Amino-N und Total-N (minus Ammoniak- und Melanin-N) in den nach beiden Methoden erhaltenen Hydrolyseflüssigkeiten verglichen.

Wie die mitgeteilten Zahlen zeigen, war dieses Verhältnis bei der Hydrolyse mit HCl:  $\frac{326,2}{384,9}$  oder als 84,7 : 100: und bei

der mit HFl  $\frac{344,5}{468}$  oder als 73,5 : 100. Wenn man annimmt,

daß mit Salzsäure eine vollständige Hydrolyse stattfand, muß nach der Behandlung mit HFl noch etwa  $\frac{1}{8}$  Teil des Amino-stickstoffs in Polypeptidbindung vorhanden gewesen sein.

### III. Bestimmung der verschiedenen Diaminosäuren nach Kossel und Patten.

Wir haben genau die Methode befolgt, wie sie von Steudel<sup>1)</sup> beschrieben wurde, und können uns also auf die Mitteilung der Resultate beschränken.

31,69 g Kartoffeleiweiß wurde mit 105 g Schwefelsäure und 210 ccm Wasser hydrolysiert. Die dabei gewonnene Flüssigkeit enthielt 5071,6 mg N. Der BaSO<sub>4</sub>-Niederschlag wog 325 g und enthielt 412,0 mg Melaninstickstoff. Zur Analyse: 10,6670 g. Verbraucht 9,63 ccm  $\frac{1}{10}$ -n-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Die vom BaSO<sub>4</sub>-Niederschlag abfiltrierte und auf 1 l gebrachte Lösung enthielt 4546,2 mg Stickstoff.<sup>2)</sup> Zur Analyse: 10 ccm. Verbraucht 32,38 ccm  $\frac{1}{10}$ -n-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Die für die Histidinbestimmung fertiggemachte Lösung, die also frei von andern Diaminosäuren war, wurde auf 250 ccm gebracht. Zur Analyse: 25 ccm. Verbraucht 14,03 ccm  $\frac{1}{10}$ -n-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

<sup>1)</sup> Abderhalden, Handbuch der Biochemischen Arbeitsmethoden. Bd. 2, S. 498.

<sup>2)</sup> Die Summe von diesem 4546,2 mg und dem 412 mg Melaninstickstoff (= 4958,6 mg) kann natürlich nicht gleich das ursprüngliche gefundene Quantum N sein, weil ein Teil und zwar  $\frac{1}{50}$  der Flüssigkeit vor der Behandlung mit Ba für Kjeldahl-Bestimmungen benutzt wurde.

Daraus läßt sich ein Gehalt des Proteins an Histidinstickstoff berechnen von 4,00% und an Histidin von 2,36%.

Mit sorgfältig gereinigter Pikrolonsäure bekamen wir 1,724 g Histidinpikrolonat, die berechnete Menge war 1,768 g.

Aus der nach Abscheidung des Histidinsilbers erhaltenen Lösung wurde das Arginin niedergeschlagen, Schwefelsäure und Baryt entfernt und alsdann nach dem von Steudel angegebenen Verfahren das Argininpikrolonat dargestellt. Gefunden wurde 2,865 g, während sich aus dem Stickstoffgehalte der Flüssigkeit 2,917 g berechnen ließ. Die Arginin enthaltende Flüssigkeit wurde auf 300 ccm gebracht. Zur Kjeldahl-Bestimmung: 25 ccm. Verbraucht 24,90 ccm  $\frac{1}{10}$ -n- $\text{H}_2\text{SO}_4$  8,53% Argininstickstoff und 4,2% Arginin.

Die in der mit Ätzbaryt gesättigten, von den Silberverbindungen des Histidins und Arginins getrennte Lysinlösung wurde in bekannter Weise mit Phosphorwolframsäure und Pikrinsäure behandelt. Das Gewicht der ersten Krystallisation betrug 1,846 g.

Aus den Mutterlaugen wurde, nach Entfernung der Pikrinsäure und Fällung mit Phosphorwolframsäure, noch 0,768 g Lysinpikrat erhalten. In ganzen bekamen wir also 2,614 g Lysinpikrat oder 3,96% Lysinstickstoff; wir fanden also 3,3% Lysin in dem von uns untersuchten Protein. Als letzte der Diaminosäuren haben wir Cystin bestimmt und zwar mittels einer Schwefelbestimmung nach Carius, wozu das reine Präparat mit 15,9% Stickstoff benutzt wurde. Es wurde 1,18% Schwefel gefunden. 179,4 mg Kartoffeleiweiß lieferten 15,4 mg  $\text{BaSO}_4$ , während Osborne und Campbell<sup>1)</sup> 1,22% fanden.

Wenn man den gesamten Schwefel als Cystinschwefel annimmt, so beträgt der Cystingehalt 4,4%.

Unser Befund, daß im Kartoffeleiweiß Histidin, Arginin und Lysin alle drei vorkommen, war a priori zu erwarten, denn E. Schulze hatte diese Hexonbasen schon vor einigen Jahren aus dem Saft der Kartoffelknollen isoliert.<sup>2)</sup>

Schulze fand im Saft mehr Arginin als Histidin und Lysin, unsere Ergebnisse mit dem Protein stimmen hiermit überein.

#### IV. Bestimmung der Monoaminosäuren.

Das für diese Bestimmung benutzte Kartoffeleiweiß wurde während 24 Stunden mit 1 l Salzsäure von 20% am Rückflußkühler im Ölbad bei 120° C. erhitzt, alsdann von einer kleinen

<sup>1)</sup> Journ. Am. Ch. Soc., Bd. 18, S. 575.

<sup>2)</sup> Landw. Versuchsstationen, Bd. 59, S. 331 (1904).

Menge schwarzer Zersetzungsprodukte abgesaugt und bis auf ein kleines Volumen eingedampft. Der im Hydrolysat vorhandene Stickstoff entsprach 106,6 g Eiweiß von 16% Stickstoff.

Die auf ein kleines Volum eingedampfte und mit Chlorwasserstoff gesättigte Flüssigkeit schied mit Glutaminsäurechlorhydrat geimpft im Eisschrank keine Kristalle ab. Es wurde deshalb die Salzsäure durch Eindampfen bei vermindertem Druck größtenteils verflüchtigt, alsdann mit Wasser verdünnt und mit Knochenkohle gekocht. Das leicht gelb gefärbte Filtrat bei vermindertem Druck eingedampft, mit Salzsäuregas gesättigt und nachdem es mit Glutaminsäure-Chlorhydrat geimpft war, während einiger Tage in den Eisschrank gestellt. Das hierbei abgeschiedene Chlorhydrat wurde auf Koliertuch abgenutscht, getrocknet und gewogen. Das Gewicht betrug nach Abzug des Aschegehaltes 4,97 g.

Die Mutterlaugen wurden unter vermindertem Druck stark eingeeengt und mit absolutem Alkohol, der mit trockenem Salzsäuregas gesättigt war, gemischt und die Veresterung durch Einleiten von Dämpfen von absolut-alkoholischer Salzsäure begünstigt. Es gelang nicht, aus den Esterchlorhydraten Glykokoll-esterchlorhydrat zur Abscheidung zu bringen: es setzte sich nur Chlorammon ab.

Die Isolierung der Aminosäureester aus den Esterchlorhydraten wurde mit Hilfe von Natriumalkoholat gemacht. Dabei wurde etwas weniger als die aus dem Chlorgehalte berechnete Menge Natrium angewendet.

Das gebildete Kochsalz ließ sich nicht abfiltrieren; auch nicht, nachdem viel absoluter Äther zugesetzt und während einiger Tage auf Eis gestellt war: es blieb also mit den Estern gemischt.

Bei der Destillation wurde ein wenig anders vorgegangen, als meistens angegeben wird.

Die Hauptmenge des Äthers und des Alkohols wurde unter vermindertem Druck im Wasserbade abdestilliert. Das Destillat unter Zusatz von Salzsäure auf dem Wasserbade eingedampft und der Rückstand gewogen. Diese als Vorlauf zu bezeichnende Fraktion wog 8 g.

Die Destillation der Ester wurde, nachdem die Haupt-

menge des Äthers und des Alkohols verjagt war, sofort ausgeführt. Statt in vier haben wir dabei in drei Fraktionen getrennt; und zwar 1. bis 100° bei 20 mm, 2. bis 100° bei 1 mm und 3. bis 160° bei 1 mm.

Damit unsere Nomenklatur soviel wie möglich mit der üblichen übereinstimme, werden wir die erste Fraktion (bis 100° bei 20 mm) als I—II bezeichnen; die folgende als III und die letzte als IV. Leider waren wir nicht imstande, bei niedrigerem Druck als 1 mm zu destillieren. Die uns zu Gebote stehende Ölvakuumpumpe lieferte nicht die erwartete Druckverminderung auf 0,01—0,04 mm.

Der nach der Destillation zurückgebliebene Rückstand, der viel Kochsalz enthielt, schien bei unseren Untersuchungen noch viel Monoaminosäuren zu enthalten.

Im allgemeinen haben bei der Destillation die Ester die Neigung gezeigt, bei höheren Temperaturen überzugehen, als meistens angegeben wird. Dieser Umstand wäre vielleicht sowohl dadurch zu erklären, daß unser Eiweiß nicht vollständig rein war (es muß etwa 8% stickstofffreie Verunreinigungen enthalten haben), als daß wir die Natriumalkoholatmethode benutzten, und somit die Ester der Diaminosäuren, des Tyrosins usw. die Esterflüssigkeit verunreinigten.

Die Weise der Verarbeitung der zuerst analysierten Fraktion IV war die übliche. Diese Fraktion wurde also im Wasser ausgegossen und mit Äther ausgeschüttelt.

Der in Äther lösliche Teil wog 15 g und wurde durch Erhitzung mit rauchender Salzsäure verseift; alsdann die Hauptmenge der Salzsäure verjagt und der Rückstand durch Kochen mit Knochenkohle, Zersetzung des Chlorhydrats mit Ammoniak und Umkrystallisation aus Wasser gereinigt. Das krystallisierte Produkt zeigte die Zusammensetzung des Leucins.<sup>1)</sup>

0,1850 g Substanz gaben 0,3743 g CO<sub>2</sub> und 0,1653 g H<sub>2</sub>O.

<sup>1)</sup> Gewöhnlich wurden die für Analysen angewendeten Präparate im Vakuumtrockenapparat bei P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> und 100—110° C. bis zu konstantem Gewichte getrocknet; in einigen Fällen fand das Trocknen im Vakuumexsikkator bei Zimmertemperatur über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> statt.

Berechnet für Leucin: C 54,96%, H 9,92%. Gefunden: C 55,13%, H 10,01%. Es befand sich in dieser Fraktion also nicht das zu erwartende Phenylalanin, sondern Leucin.

Levene und van Slyke geben vom Leucin an,<sup>1)</sup> daß es beim Ausäthern der im Wasser ausgegossenen Leucinfraction größtenteils in Äther übergeht, während das Valin und Prolin im Wasser bleiben (ersteres größtenteils).

Der in Äther unlösliche Teil der Fraktion IV wurde durch Kochen mit Baryt verseift, der Überschuß des Baryts mit Schwefelsäure entfernt, bis zur Trockene eingedampft und alsdann durch Kochen mit absolutem Alkohol vom Prolin befreit. Der nicht in Alkohol gelöste Rückstand enthielt 44,8% C. Weil dieser Rückstand Asparaginsäure enthalten konnte und diese Säure sich durch Krystallisation schwer würde reinigen lassen (Osborne und Liddle. Am. Journ. of Phys., Bd. 26. S. 420), haben wir ihn in der oben angegebenen Weise verestert, die Ester aus den Hydrochloraten nach der von E. Fischer angegebenen Methode mit Hilfe von Natronlauge und Kaliumcarbonat und gleichzeitiger Ausätherung freigemacht und durch Destillation mit der Wasserstrahlluftpumpe in zwei Fraktionen verteilt. Der zuletzt destillierte Teil, der also die Asparaginsäure enthalten konnte, wurde mit Baryt verseift, mit Schwefelsäure vom Baryt befreit und durch Kochen mit frischgefälltem Cuprioxyd das Kupfersalz gebildet. Das nach Eindampfen auskrystallisierte Salz wurde mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Die dabei erhaltene Aminosäure (Gewicht 1,2 g), gab bei der Analyse folgende Zahlen:

0,1422 g Substanz lieferten 0,2697 g CO<sub>2</sub> und 0,1233 g H<sub>2</sub>O. Gefunden: 51,6% C und 9,7% H. Berechnet für Valin: 51,28% C und 9,4% H.

Die Aminosäure war also Valin: Asparaginsäure konnte in dieser Fraktion nicht nachgewiesen werden. (Der hauptsächlich aus festem Baryt bestehende Niederschlag enthielt keine Asparaginsäure.) Es mußte noch der Möglichkeit Rechnung getragen werden, daß in dem nicht überdestillierten Esterrückstand Asparaginsäure vorkam.

<sup>1)</sup> Journ. of Biol. Chem., Bd. 6 (1909), S. 412.

Der niedrigstkochende Teil der zum zweiten Male destillierten Ester wurde durch Kochen mit Wasser verseift und wog 4,2 g. Zur Trennung dieser Ester wurden sie in zwei verschiedenen lösliche Teile getrennt. Aus dem leichtlöslichen Teil krystallisierte eine Substanz aus mit 43,0% C., aus dem weniger löslichen Teil eine mit 46,4% C. Beide müssen also Mischungen von Alanin und Valin gewesen sein; auch die Löslichkeit wies hierauf. Eine vollständige Trennung konnte bei der kleinen Menge Substanz nicht zum Ziele führen und wurde deshalb nicht versucht.

An zweiter Stelle wurde der Vorlauf verarbeitet. Zur Entfernung von eventuell vorhandenem Ammoniak wurde mit Baryt auf dem Wasserbade eingedampft und alsdann nach der Methode von Siegfried<sup>1)</sup> auf Glykokoll reagiert. Es konnte nicht nachgewiesen werden. Auch sonst hatten wir keine Andeutung auf Glykokoll (so konnte kein Esterchlorhydrat zur Abscheidung gebracht und kein Glykokollpikrat nachgewiesen werden, und haben wir niemals eine Aminosäure mit einem Kohlenstoffgehalt gefunden, der auf Anwesenheit von Glykokoll hinwies).

Aus der restierenden Flüssigkeit wurde die Salzsäure mit Silbersulfat, der Überschuß von Silber mit Schwefelwasserstoff, die Schwefelsäure mit Baryt entfernt, das Filtrat zur Trockene verdampft und durch Kochen mit Wasser in einen löslichen und einen wenig löslichen Teil geschieden. Die hierbei auskrystallisierten Aminosäuren sind zusammen mit denen der Fraktion I—II untersucht worden. Wie sich beim Kochen mit absolutem Alkohol der Aminosäuren dieses Vorlaufs gezeigt hatte, war darin nur sehr wenig Prolin vorhanden.

Die alsdann untersuchte Fraktion I—II ergab, nach Verseifen mittels kochendem Wasser und Eindampfen, 6,2 g Aminosäuren.

Nachdem zur Isolierung des Prolins mit absolutem Alkohol ausgekocht war, wurde, wie beim Vorlauf, eine Trennung in schwer- und leichtlösliche Aminosäuren veranstaltet und die

<sup>1)</sup> Ber., Bd. 39, S. 397 (1906).

hierbei erhaltenen Portionen mit denen des Vorlaufs vereinigt.

Der löslichste Teil zeigte einen Kohlenstoffgehalt von 42,9%. Durch weitere Reinigung mittels Krystallisation ließ sich hieraus 5,3 g, noch nicht völlig reines Alanin erhalten. 0,1581 g Substanz lieferten 0,2394 g CO<sub>2</sub> und 0,1169 g H<sub>2</sub>O. Gefunden: 41,3% C und 8,3% H. Berechnet für Alanin: 40,4% C und 7,93% H.

Der schwerlösliche Teil wog 1,9 g und zeigte sich durch die Analyse als eine Mischung: 0,1601 g Substanz lieferten 0,285 g CO<sub>2</sub> und 0,1346 g H<sub>2</sub>O. Gefunden: 48,6% C und 9,4% H.

Diese Mischung wurde den Aminosäuren der Fraktion III zugesetzt.

Das Gewicht der Aminosäuren der Fraktion III, durch Verseifen mit kochendem Wasser aus dem Ester erhalten, betrug 10,5 g. Nachdem das Prolin durch Kochen mit absolutem Alkohol entfernt war, verblieb eine Substanz mit folgender Zusammensetzung: 0,1553 g Substanz lieferten 0,2690 g CO<sub>2</sub> und 0,1321 g H<sub>2</sub>O. Gefunden: 47,24% C und 9,40% H.

Sie war wahrscheinlich eine Mischung von Alanin, Valin und Leucin.

Durch fraktionierte Krystallisation aus Wasser ließ sich daraus 4,5 g einer löslichen Mischung von der folgenden Zusammensetzung abscheiden:

0,1717 g Substanz lieferten 0,287 g CO<sub>2</sub> und 0,1423 g H<sub>2</sub>O. Gefunden: 45,58% C und 8,87% H.

Sie mußte also eine Mischung von Valin und Alanin sein.

Der wenig lösliche Teil wog 2 g und ergab bei der Analyse folgende Resultate:

0,1516 g Substanz lieferten 0,2960 g CO<sub>2</sub> und 0,1321 g H<sub>2</sub>O. Gefunden: 53,25% C und 9,77% H.

Es war also als eine Mischung von Valin und Leucin zu betrachten.

Auch hier war das Quantum zu gering, um eine Trennungsmethode, z. B. die nach Levene und van Slyke,<sup>1)</sup> auszu-

<sup>1)</sup> Journ. of Biol. Chem., Bd. 6 (1909), S. 390.

führen. Wie oben erwähnt, waren die verschiedenen Fraktionen nach der Verseifung stets je zweimal mit absolutem Alkohol ausgekocht. Die dabei erhaltenen Lösungen wurden gemischt und wiederholt durch Kochen mit absolutem Alkohol von verunreinigenden Aminosäuren befreit, und zwar so lange, daß das Prolin sich vollständig in kaltem absoluten Alkohol löste. Aus dem Prolin stellten wir das Kupfersalz dar und isolierten hieraus das l-Prolinkupfer durch Auskochen mit absolutem Alkohol.

Es krystallisierte in dunkelblauen zu Rosetten vereinigten Blättchen und betrug 0,9 g. Nach der Methode von van Slyke enthielt es (berechnet auf das Prolin) 1,61% Aminostickstoff (0,700 g Kupfersalz = 0,4495 g Prolin lieferten 12,5 ccm Stickstoff von 1,167 mg pro Kubikzentimeter).

Bei dem uns zur Verfügung stehenden Quantum würde eine genügende Menge eines bedeutend reineren Präparats wohl schwierig darzustellen gewesen sein.<sup>1)</sup> Das aus dem in absolutem Alkohol unlöslichen Kupfersalz mittels Schwefelwasserstoff zurückgewonnene Prolin wog 3,52 g. Hiervon lieferten 0,143 g 7,3 ccm Aminostickstoff (von 1,167 mg pro Kubikzentimeter), also 2,98%.

Zur Berechnung des Prolingehaltes unseres Eiweißes wurde diese Verunreinigung in Abzug gebracht. Im ganzen waren 3,17 g Prolin gefunden. Die das Prolin verunreinigenden Aminosäuren wurden bei der Berechnung vernachlässigt.

Die Verarbeitung des bei der Esterdestillation im Destillationskolben zurückgebliebenen Rückstandes bestand darin, daß erstens durch Schütteln mit absolutem Alkohol das Kochsalz von den Estern getrennt wurde. Auch jetzt lieferte die Abscheidung des Kochsalzes noch Schwierigkeiten. Die alkoholische Lösung der Ester wurde eingedampft und setzte dabei spontan Krystalle (0,180 g) ab, die als Leucinimid identifiziert werden konnten und zwar durch leichte Sublimierbarkeit und Krystallform.

Zur Trennung des Phenylalanins von den übrigen Amino-

<sup>1)</sup> van Slyke, Ber., Bd. 43 (1910), S. 3170.

säuren wurden die aus dem Alkohol zurückbleibenden Aminosäuren in Wasser gelöst und mit Äther ausgeschüttelt.

Wir erhielten, in üblicher Weise weiter behandelt<sup>1)</sup> und mit Ammoniak in Freiheit gesetzt, 3,86 g Phenylalanin, das wohl nicht ganz rein war, aber doch der Hauptsache nach aus dieser Aminosäure bestand: 0,160 g Substanz lieferten 0,3784 g CO<sub>2</sub> und 0,0986 g H<sub>2</sub>O. Gefunden: 64,5% C und 6,91% H. Berechnet: 65,41% C und 6,71% H.

Der nicht in Äther lösliche Teil der Ester wurde durch 20stündiges Kochen mit Baryt<sup>2)</sup> verseift und alsdann soviel Schwefelsäure zugesetzt, daß die Lösung etwa 5% Schwefelsäure enthielt. In dieser Flüssigkeit wurden die Diaminosäuren mit Phosphorwolframsäure niedergeschlagen und nachher mit Baryt der Überschuß der Phosphorwolframsäure und mit Schwefelsäure (unter Vermeidung eines Überschusses) das Baryt entfernt. Im Filtrat vom schwefelsauren Baryum schieden sich beim Eindampfen Krystalle ab, die auf Grund der Form und Löslichkeit für Tyrosin erklärt wurden. Das Gewicht dieser Krystalle war 1,01 g.

Asparaginsaures Baryum konnten wir in den Niederschlägen nicht nachweisen. Das hier abgeschiedene Tyrosin wurde nicht weiter verarbeitet, weil wir für die Tyrosinbestimmung eine spezielle Hydrolyse mit Schwefelsäure machten. Das Filtrat vom Tyrosinniederschlag wurde mit Salzsäuregas gesättigt, mit Glutaminsäurechlorhydrat geimpft und während einiger Tage in den Eisschrank gestellt. Das Gewicht des abgeschiedenen Salzes betrug — nach Abzug des Aschegehaltes 1,14 g.

Die Mutterlauge des Glutaminsäurechlorhydrates wurde unter vermindertem Druck eingedampft und alsdann mit schwefelsaurem Silber von Chlor, mit Schwefelwasserstoff von Silber und mit Baryt genau von Schwefelsäure befreit. Es schieden sich nach dem Impfen mit Asparaginsäure keine Krystalle ab. Deshalb wurden die Aminosäuren mit Kupferoxyd in Kupfer-

<sup>1)</sup> Siehe z. B. Abderhaldens Handbuch der Bioch. Arbeitsmethoden. Bd. 2, S. 483.

<sup>2)</sup> Das benutzte Baryt wurde hier und auch sonst durch Auskochen mit Wasser und Absaugen nach Abkühlen gereinigt.

salze verwandelt, die nach Eindampfen und längerem Stehen auskrystallisierten. Das abgeschiedene Kupfersalz wog 0,910 g. Nach Zurückgewinnung der Aminosäuren mit Schwefelwasserstoff ergab die Analyse einen Kohlenstoffgehalt von 54%. Statt Asparaginsäure bestand die Substanz hauptsächlich aus Leucin. Die Mutterlaugen des Kupfersalzes wurden nicht weiter untersucht.

#### V. Bestimmung des Tyrosins.

Zur quantitativen Bestimmung des Tyrosins wurden 27,2 g Kartoffeleiweiß während 14 Stunden mit 80 g Schwefelsäure und 160 ccm Wasser im Ölbad gekocht. Nach Entfernung der Schwefelsäure mit kochender Barytlösung wurden Filtrat und Waschwässer bei vermindertem Druck eingeeengt, bis Krystallisation eintrat. Das rohe Tyrosin wog 1,65 g. Die Reinigung fand statt mit Phosphorwolframsäure. Das gereinigte Tyrosin wog 1,16 g und zeigte folgende Zusammensetzung:

0,116 g Substanz lieferten 0,2541 g  $\text{CO}_2$  und 0,0662 g  $\text{H}_2\text{O}$ .

Gefunden: 59,7 % C und 6,4 % H,

Berechnet: 59,66 % C » 6,07 % H.

Eine zweite Krystallisation, durch weiteres Einengen des Hydrolysats erhalten, enthielt kein Tyrosin mehr.

Bei der geringen uns zur Verfügung stehenden Menge Eiweiß konnte nicht nach Serin, Oxyprolin und Tryptophan gesucht werden. Bei der untenstehenden Aufzählung, der in diesem Protein gefundenen Aminosäuren, muß daran gedacht werden, daß die Verluste bei Verarbeitung einer ziemlich kleinen Menge relativ groß sind, und daß die schwierig zu entfernenden Verunreinigungen unseres Eiweißes einen ungünstigen Einfluß auf die Verarbeitung der Hydrolysate ausgeübt haben.

Auf 100 g Kartoffeleiweiß (berechnet nach 16% Stickstoff) erhielten wir:

Ammoniak:	1,8 g
Histidin:	2,3 »
Arginin:	4,2 »

Lysin:	3,3 g
Cystin:	4,4 »
Glutaminsäure:	4,6 »
Prolin:	3,0 »
Alanin:	4,9 »
Leucin:	12,2 »
Valin:	1,1 »
Valin + Alanin:	8,2 »
Valin + Leucin:	1,9 »
Phenylalanin:	3,9 »
Tyrosin:	4,3 »

Im November 1911.

Chem. Laboratorium der Tierarzneischule Utrecht.