

# Über die Abscheidung von Aminosäuren mit Hilfe der Carbaminoreaktion.

Von

M. Siegfried und E. Schutt.

---

(Aus der chem. Abteilung des physiologischen Institutes der Universität Leipzig.)

(Der Redaktion zugegangen am 18. September 1912.)

---

Die Baryumsalze der Carbaminosäuren besitzen verschiedene Löslichkeit in Wasser. So ist das carbaminoessigsäure Baryum sehr viel schwerer löslich als das carbaminopropionsäure Salz, sodaß mit Hilfe der Carbaminoreaktion eine Trennung von Glykokoll und Alanin möglich ist.<sup>1)</sup> Ferner hat der eine von uns gemeinsam mit Schmitz<sup>2)</sup> die Abscheidung der Glutaminsäure aus dem Gemische der Spaltungsprodukte des Pepsin-glutinpeptons auf gleichem Wege durchgeführt; E. Abderhalden und K. Kautzsch<sup>3)</sup> konnten so die Glutaminsäure von der Pyrrolidincarbonsäure trennen.

Wo angängig, ist das Verfahren deshalb besonders zur Trennung und Abscheidung von Aminosäuren geeignet, weil man aus den Niederschlägen und Filtraten die Aminosäuren leicht und völlig unverändert regenerieren kann. Ferner deshalb, weil diejenigen Aminosäuren, welche schwer lösliche Baryumsalze ihrer Carbaminosäuren bilden, so aus salzhaltigen Lösungen salzfrei und aus den Lösungen ihrer Salze, z. B. aus Chloriden, Nitraten, als Aminosäuren selbst, frei von den betreffenden Säuren gewonnen werden. Um sie salzfrei und aus ihren Säuresalzen frei von den Anionen zu erhalten, ist die Carbaminoreaktion auch bei solchen Aminosäuren vorteilhaft verwendbar, welche nicht sehr schwer lösliche Salze ihrer

---

<sup>1)</sup> M. Siegfried, Berl. Ber., Bd. 39, S. 397.

<sup>2)</sup> M. Siegfried und H. Schmitz, Diese Zeitschrift, Bd. 65, S. 285 (1910).

<sup>3)</sup> E. Abderhalden und K. Kautzsch, Diese Zeitschrift, Bd. 68, S. 487 (1910).

Carbaminosäuren bilden, wenn man in konzentrierten Lösungen arbeitet und die Operation mehrfach wiederholt.

Wir haben das Verhalten verschiedener Aminosäuren bei der Carbaminierung unter Benutzung von Barythydrat geprüft, indem wir die Bedingungen variierten.

### I. Versuche mit d-Glutaminsäure.

Wir bestimmten die Menge der unter verschiedenen Bedingungen in den Niederschlag gegangenen Aminosäuren durch Ermittlung des im Niederschlage oder im Filtrate oder in beiden enthaltenen N. Hierbei wurde wieder zur Vermeidung des Stoßens der früher beschriebene Kjeldahl-Apparat<sup>1)</sup> benutzt.

Eine größere Anzahl von Versuchen, bei denen Glutaminsäure von Kahlbaum bezogen und selbst aus Casein dargestellte Glutaminsäure verwendet wurde, lieferten uns für die in den Barytniederschlag gehende Menge Stickstoff Werte von 81 bis 85 % des angewandten. Da wir durch Änderungen der Bedingungen keine höheren Werte erhalten konnten und doch nach den Erfahrungen des einen von uns Glutaminsäure vollständig mit Hilfe der Carbaminoreaktion abscheidbar ist, vermuteten wir, daß die Glutaminsäurepräparate durch eine Substanz verunreinigt waren, welche bei der Carbaminierung nicht in den Niederschlag geht. Diese Vermutung hat sich insofern bestätigt, als wir, nachdem wir Glutaminsäure verwendeten, die wir vorher durch Carbaminieren gereinigt hatten, unter den gleichen Bedingungen, unter denen wir mit den nicht gereinigten Präparaten nur 81—85 % in den Niederschlag überführen konnten, so gut wie die gesamte Glutaminsäure im Niederschlage erhielten.

Die zu diesen Versuchen dienende Glutaminsäure stellten wir aus technischem, rohem Casein nach einem Verfahren her, das unseres Erachtens dem üblichen der Abscheidung als Chlorhydrat vorzuziehen ist. Es liefert sehr schnell und billig Glutaminsäure, da technisches Casein verwendet werden kann, das sonst langsam und stark verunreinigtes Glutaminsäurechlorhydrat gibt. Inwieweit das Verfahren bei der Unter-

<sup>1)</sup> M. Siegfried, Diese Zeitschrift, Bd. 41, S. 1 (1903).

suchung der Spaltungsprodukte der Proteinkörper mit Vorteil verwendet werden kann, sollen erst weitere Untersuchungen dartun.

Unser Verfahren beruht auf der Abscheidung der Glutaminsäure als neutrales Baryumsalz.

Die Glutaminsäure bildet als zweibasische Säure ein saures und ein neutrales Salz. Wie der eine<sup>1)</sup> von uns gezeigt hat, entsteht das saure Salz quantitativ, d. h. frei von dem neutralen Salze, wenn man in die mit überschüssigem Barytwasser versetzten wässerigen Lösungen von Glutaminsäure Kohlensäure einleitet, aufkocht und filtriert. Dementsprechend haben dieses Salz E. Abderhalden und K. Kautzsch<sup>2)</sup> aus Glutaminsäure und Baryumcarbonat erhalten.

Das neutrale Salz wird nur bei Anwesenheit überschüssigen Barythydrates erhalten. Habermann<sup>3)</sup> hat es durch Zusatz von 1 Mol.  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  zu 1 Mol. Glutaminsäure und Eindunsten der Lösung über Schwefelsäure dargestellt. Dieses neutrale Salz ist ebenso wie die Baryumsalze der Aminomonocarbonsäuren sehr stark hydrolysiert. Infolgedessen befindet sich in einer verdünnt wässerigen Lösung, in der auf 1 Mol. Glutaminsäure 1 Mol. Barythydrat vorhanden ist, nur sehr wenig des neutralen Salzes; in der Hauptsache enthält eine solche Lösung das saure Salz der Glutaminsäure und Barythydrat. Wird eine solche Lösung, wie es Habermann getan hat, über Schwefelsäure konzentriert, so tritt die Hydrolyse des neutralen Salzes infolge zunehmender Konzentration der Lösung und somit der Hydroxylionen zurück, infolgedessen entsteht wesentlich mehr neutrales glutaminsaures Baryum neben Barythydrat und saurem Salze, und ersteres scheidet sich aus. Bringt man das auskristallisierte Salz wieder mit Wasser zusammen, so löst es sich leicht auf, weil es infolge der starken Hydrolyse vorwiegend in saures Salz und Barythydrat zerfällt. Auf diese Weise erklären sich die Angaben, daß das neutrale Baryumsalz relativ leicht löslich in Wasser ist.

<sup>1)</sup> M. Siegfried, Diese Zeitschrift, Bd. 45, S. 257 (1905).

<sup>2)</sup> E. Abderhalden und K. Kautzsch, Diese Zeitschrift, Bd. 64, S. 447 (1910).

<sup>3)</sup> Habermann, Liebigs Annalen, Bd. 179, S. 248.

In Wahrheit ist das neutrale Baryumsalz der Glutaminsäure sehr schwer löslich. Dies neutrale Baryumsalz wird aber auch in verdünnten wässerigen Lösungen durch Zurückdrängung der Hydrolyse, also durch Vermeidung des Zerfalles des neutralen Salzes in das saure Salz und Barythydrat, erhalten, wenn man die wässerige Lösung mit Barythydrat sättigt.

Der eine von uns (S.) hat 40 g Glutaminsäure in 500 ccm Wasser auf dem Wasserbade bei 30° unter Eintragen von soviel feingepulvertem Barythydrat (Kahlbaum, aschefrei, pro analysi) gelöst, bis bei stark alkalischer Reaktion eine feine Haut von Baryumcarbonat an der Oberfläche entstand, abgesaugt, mit Wasser gewaschen und in geschlossener Büchse über Nacht stehen gelassen. Andern Tags waren nur Spuren einer Ausscheidung entstanden. Auch beim Schütteln mit etwas gepulvertem Barythydrat entstand keine Ausscheidung. Als aber überschüssiges Barythydrat eingetragen war, krystallisierte plötzlich das Baryumsalz massenhaft aus. Der Niederschlag wurde schon nach einer halben Stunde abgesaugt, mit gesättigtem Barytwasser ausgewaschen und lieferte 36 g Glutaminsäure. Das Filtrat des Niederschlages wurde über Nacht in Eis gekühlt stehen gelassen. Es entstand eine Abscheidung, die nach Absaugen und Waschen mit Barytwasser noch 2,8 g Glutaminsäure ergab.

#### Darstellung von Glutaminsäure aus technischem Casein durch Abscheidung als Baryumsalz.

3 kg technisches Casein wurden mit ca. 15 l 25%iger Salzsäure am Rückflußkühler 12 Stunden gekocht, die Lösung auf dem Wasserbade eingeengt und mit Wasser auf 10 l gelöst. Unter Umrühren mit der Maschine wurde mit krystallisiertem Barythydrat neutralisiert und am anderen Tage von dem ausgeschiedenen dunklen Niederschlage abfiltriert. Das helle Filtrat wurde wieder bei gewöhnlicher Temperatur am Rührwerk mit Barythydrat gesättigt. Andern Tags wird der kaum gefärbte Niederschlag abgenutscht und mit gesättigtem Barytwasser gewaschen. Der Niederschlag wird auf dem Wasserbade ent-

weder mit Ammoncarbonat oder mit Schwefelsäure zersetzt. Im ersteren Falle ist es nötig, den nach Eindampfen des Filtrates vom Baryumcarbonate erhaltenen Rückstand wiederholt und anhaltend unter Zusatz von Wasser einzudampfen, um das Ammoniumsalz vollständig in die Säure überzuführen. Nur beiläufig sei bemerkt, daß wir 137 g Ausbeute an farbloser Glutaminsäure erhielten. Da wir die Qualität des verwendeten technischen Caseins nicht kannten, hat diese Zahl keine Bedeutung. Später soll über die Ausbeuten, welche bei Anwendung unserer Methode erhalten werden, berichtet werden.

Der so erhaltenen Glutaminsäure kann Asparaginsäure beigemischt sein. Zur Entfernung derselben führt man die Glutaminsäure in das Chlorhydrat über, dessen Abscheidung aus konzentrierter Salzsäure jetzt sehr leicht und vollständig erfolgt, während dies bei der Abscheidung aus der rohen Eiweißzersetzungslösung nicht der Fall ist.

Die Reinheit der erhaltenen Säure wurde durch das Silber-salz kontrolliert.

0,2137 g Substanz gaben 0,1275 g Ag = 59,66%

berechnet für  $C_5H_7NO_4Ag_2$ : 59,81%.

Die Carbaminierung geschah in der Weise, daß je 37 g der Säure in 1500 ccm Wasser unter Zusatz einer geringen Menge Barythydrat gelöst, in die Lösung Kohlensäure eingeleitet, dazu 50 g Barythydrat, Kohlensäure, bis Phenolphthalein fast entfärbt wurde, wieder 50 g Barythydrat, Kohlensäure, 20 g Barythydrat. Während der Versuche wurde mit Eis gekühlt und gut durchgeschüttelt. Nach 3stündigem Stehen in Eiswasser wurde abgenutscht, der Niederschlag mit halbgesättigtem, eisgekühltem Barytwasser ausgewaschen und mit Wasser und Ammoncarbonat auf dem Wasserbade zersetzt. Der nach dem Eindampfen des Filtrates vom Baryumcarbonate erhaltene Rückstand wurde in das

saure glutaminsaure Ammonium  
übergeführt.

Unseres Wissens ist es nicht bekannt, daß dieses Salz leicht schön krystallisiert zu erhalten ist. Dasselbe krystallisiert aus der verdünnt ammoniakalischen Lösung durch Zusatz von Alkohol und eventuell zuletzt Äther in prachtvollen langen Prismen, die oft in Drusen anschießen. Aus der verdünnt ammoniakalischen Lösung krystallisiert so nicht etwa das neutrale Salz, die Verbindung der Glutaminsäure mit 2 Mol. Ammoniak, sondern das saure Salz, die Verbindung mit 1 Mol. Ammoniak von der Formel:  $C_5H_8NO_4 + H_2O$ .

Zur Feststellung dieser Zusammensetzung wurden vollständige Analysen ausgeführt und das präformierte Ammoniak besonders noch nach Schloessing bestimmt.

- I. 0,2248 g Substanz gaben 0,1608 g  $H_2O$  und 0,2692 g  $CO_2$   
 II. 0,2949 g        "        "        0,2108 g  $H_2O$    "   0,3569 g  $CO_2$   
 III. 0,1582 g erf. 17,16 ccm  $n_{10}$ -S. nach Kjeldahl  
 IV. 0,2742 g gaben 35,9 ccm tr. N bei 757 mm u.  $17^\circ$   
 V. Schloessing: 0,3622 g Substanz erf. 19,24 ccm  $n_{10}$ -S.

	Gefunden:	Berechnet für $C_5H_8NO_4NH_4 + H_2O$ :
C	32,65, 33,01 %	32,97 %
N	15,16, 15,38 %	15,33 %
H	8,00, 7,98 %	7,70 %
$NH_3$ -N	7,44 %	7,69 %

Die Substanz war über Schwefelsäure getrocknet.

Zur Überführung des Ammoniumsalzes in die Glutaminsäure selbst wurde die wässrige Lösung des ersteren mit einer etwas größeren Menge Barytwasser vermischt, als zur Umwandlung des Ammoniumsalzes in das neutrale Barymsalz nötig war, und die Mischung auf dem Wasserbade eingedampft. Nach Verjagen des Ammoniaks wurde zu der Lösung des Rückstandes soviel vorher auf das verwendete Barytwasser genau eingestellte Schwefelsäure gegeben, daß das Baryum gerade genau ausgefällt wurde. Das Filtrat vom Baryumsulfat lieferte die Säure, die nach Umkrystallisieren aus heißem Wasser nunmehr völlig rein war und das Ausgangsmaterial der unten beschriebenen Versuche bildete. Analysen, Fp. und spezifisches Drehungsvermögen erweisen die Reinheit:

- I. 0,2356 g Substanzen gaben 0,3504 g CO<sub>2</sub> und 0,1346 g H<sub>2</sub>O  
 II. 0,2364 g            "            "    0,3509 g CO<sub>2</sub>    "    0,1369 g H<sub>2</sub>O  
 III. 0,2334 g gaben 16,03 ccm <sup>n</sup>/<sub>10</sub>-S  
 IV. 0,2195 g   "    15,07 ccm <sup>n</sup>/<sub>10</sub>-S.

	Gefunden:	Berechnet für C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>4</sub>
C	40,56, 40,40 %	40,71 %
H	6,38, 6,47 %	6,12 %
N	9,62, 9,63 %	9,52 %

Als Schmelzpunkt (Zersetzungspunkt) wurde 222—223° gefunden. Da ein (von der Reichsanstalt geprüft) Thermometer verwendet wurde, dessen Skala erst bei 200° beginnt, ist der Fp. als korr. anzusehen. Er ist also nicht unwesentlich höher, als er gewöhnlich gefunden wird (ca. 10°). Die Glutaminsäure schmolz bei dieser Temperatur schnell und bildete unter Kohlensäureentwicklung eine wasserklare, farblose Flüssigkeit. Ein anderes Präparat, das ebenfalls aus Casein dargestellt und mit der Carbaminoreaktion gereinigt war, hatte den gleichen Zersetzungspunkt, ebenso das Gemenge beider. Das Gemenge des vorliegenden Präparates mit einer Säure, die durch Zersetzung von Gelatine und Reinigen mit Hilfe der Carbaminoreaktion dargestellt war, schmolz bei 220—221°.

Der Fp. der d-Glutaminsäure ist also 222 bis 223°. (korr.)

Auch das spezifische Drehungsvermögen der von uns dargestellten, mit Hilfe der Carbaminoreaktion gereinigten Säure wurde höher als sonst angegeben gefunden, nämlich  $[\alpha]_{20}^D = + 34,89^\circ$  in salzsaurer Lösung.

0,3661 g zu 25 ccm mit 10%iger Salzsäure gelöst  $l = 2$ ,  
 $\alpha = 1,02 (\pm 0,01)$ .

Bei einem anderen Präparate, das wir ebenfalls mit der Carbaminoreaktion gereinigt hatten, fanden wir 32,52°, bei einem dritten ebenso dargestellten 33,88°.

Wenn man das spezifische Drehungsvermögen einer Aminosäure als Chlorhydrat bestimmen will, so ist es nicht angängig, das Chlorhydrat in Wasser oder die Aminosäure in der äquivalenten Menge Salzsäure zu lösen, sondern man

muß einen wesentlichen Überschuß an Salzsäure nehmen. Im ersteren Falle hätte man infolge der Hydrolyse des Aminosäurechlorhydrates ein Gemenge der Aminosäure und des Chlorhydrates, würde also bei der Glutaminsäure zu niedrige Werte erhalten.

### Die Abscheidung der d-Glutaminsäure unter verschiedenen Bedingungen.

Versuch I. 0,1918 g Substanz in 2 ccm HCl 25%, 75 ccm H<sub>2</sub>O, 100 ccm Barytwasser, etwas Phenolphthalein in Substanz, eisgekühlt, 2,5 g feingepulvertes Barythydrat, geschüttelt, CO<sub>2</sub>, bis die rote Farbe des Phenolphthaleins eben verschwand, 2,5 g Barythydrat, geschüttelt, CO<sub>2</sub>, 2,5 g Barythydrat, geschüttelt, CO<sub>2</sub>, 2,5 g Barythydrat, geschüttelt, CO<sub>2</sub>, etwas Barythydrat, bis beim Schütteln die rote Farbe wieder auftrat. Nach dreistündigem Stehen in Eis wurde abgesaugt und mit eisgekühltem Barytwasser nachgewaschen (100 ccm) und kjeldahlisiert. Gefunden 98,93% des in der angewandten Glutaminsäure vorhandenen N.

Versuch II, ebenso wie I, jedoch anstatt 10 g Barythydrat nur 6 g in Portionen von 2 g, 1 g, 1 g, 1 g, 1 g, angewandt 0,1768 g Glutaminsäure. Gefunden 99,84%.

Versuch III, ebenso wie II, jedoch mehr Glutaminsäure. 0,3728 g angewandt. Gefunden 99,43%.

Bei den Versuchen I bis III war es nicht ausgeschlossen, daß ein größerer Teil der Glutaminsäure vor der Einwirkung der Kohlensäure als neutrales Baryumsalz der Glutaminsäure selbst ausgeschieden war. Bei den folgenden Versuchen wurde diese Möglichkeit dadurch ausgeschaltet, daß ohne vorherige Sättigung mit Barythydrat in die klare Lösung Kohlensäure bis zur Entfärbung des Phenolphthaleins eingeleitet und erst hierauf mit festem feingepulverten Barythydrat gesättigt wurde. So wurde auch nur eine möglichst geringe Menge Barythydrat verwendet, was für die Methode der Abscheidung von Vorteil ist. Wie die Versuchsergebnisse zeigen, gelingt die Abscheidung der Glutaminsäure auch bei Anwendung dieser geringeren Mengen Barythydrat.

Versuch IV. 0,1622 g Substanz, ca. 1 ccm Salzsäure 25<sup>o</sup>/<sub>o</sub>, 50 ccm Wasser, 100 ccm Barytwasser, Phenolphthalein. Eiskühlung, CO<sub>2</sub> bis Verblässen der roten Farbe. Sättigen mit Barythydrat. 3 Stunden im Eis stehen gelassen. Abgesaugt auf in Eis gekühltem Trichter; mit 50 ccm halbgesättigtem, eisgekühltem Barytwasser. Gefunden im Niederschlag 99,75<sup>o</sup>/<sub>o</sub>.

Versuch V, ebenso, angewandt 0,2478 g Substanz. Gefunden im Niederschlag 99,13<sup>o</sup>/<sub>o</sub>.

Versuch VI. 0,2 g Glutaminsäure, 1 ccm HCl 25<sup>o</sup>/<sub>o</sub>, 20 ccm H<sub>2</sub>O. Phenolphthalein. 100 ccm gesättigtes Barytwasser. CO<sub>2</sub>. Sättigen mit Barythydrat. 1/2 Stunde Schütteln in der Maschine nach vorherigem Abkühlen in einer Kalkmischung, bis etwas Eis im Innern der Büchse entstanden war, 10—15 Minuten im Eiswasser stehen gelassen, auf Filterplatte von 4 cm Durchmesser abgesaugt (eisgekühlter Trichter), mit 25 ccm eisgekühltem, halbgesättigtem Barytwasser ausgewaschen. Gefunden im Niederschlag 97,82<sup>o</sup>/<sub>o</sub>.

Die d-Glutaminsäure ist also vollständig durch die Carbaminoreaktion abscheidbar.

## II. Versuche mit l-Asparaginsäure.

Die von Kahlbaum bezogene Asparaginsäure gab zu hohe N-Werte (11,89 und 12,14<sup>o</sup>/<sub>o</sub> anstatt 10,54<sup>o</sup>/<sub>o</sub>). Erst nach viermaligem Umkrystallisieren aus Wasser wurde N = 10,78<sup>o</sup>/<sub>o</sub> gefunden.

Versuch I. 0,2506 g Substanz in ca. 1 ccm Salzsäure 25<sup>o</sup>/<sub>o</sub> gelöst, 200 ccm Wasser, 5 g Barythydrat, Phenolphthalein, CO<sub>2</sub>, 3 g Barythydrat, CO<sub>2</sub>, 2 g Barythydrat, CO<sub>2</sub>, 5 g Barythydrat, CO<sub>2</sub>, Barythydrat in geringem Überschuß. Immer Eiskühlung und gut durchgeschüttelt. Über Nacht in Eis stehen gelassen, abgesaugt, mit 100 ccm eisgekühltem, halbgesättigtem Barytwasser nachgewaschen. Gefunden im Niederschlag 97,19<sup>o</sup>/<sub>o</sub>.

Versuch II. 0,2710 g Substanz, 200 ccm H<sub>2</sub>O + 1 ccm HCl 25<sup>o</sup>/<sub>o</sub>. 5 g Barythydrat, Phenolphthalein, CO<sub>2</sub>, 2 g Barythydrat, CO<sub>2</sub>, 2 g Barythydrat, CO<sub>2</sub>, 1 g Barythydrat, CO<sub>2</sub>, geringer Überschuß an Barythydrat. 5 Stunden in Eis gekühlt

stehen gelassen, abgesaugt und mit 100 ccm eisgekühltem, halbgesättigtem Barytwasser nachgewaschen. Im Niederschlage 99,21 % gefunden.

Versuch III, ebenso, angewandte Substanz 0,2730 g. Im Niederschlag gefunden 99,45 %.

Die Asparaginsäure wird also ebenso wie die Glutaminsäure als Baryumsalz ihrer Carbaminsäure quantitativ abgeschieden.

Es war noch zu prüfen, ob die Asparaginsäure auch unter den einfachen Bedingungen, die für die Abscheidung der Glutaminsäure genügten (S. 268 Vers. VI), abgeschieden wurde. Wie die folgenden Versuche zeigen, ist dies tatsächlich der Fall.

Versuch IV. 0,2556 g Substanz, 1 ccm HCl 25 %, 100 ccm Barytwasser, Phenolphthalein, CO<sub>2</sub>, gepulvertes Barythydrat bis Überschuß, 30—40 Minuten mit der Maschine geschüttelt, nach dreistündigem Stehen (in Eiswasser) abgesaugt, mit 50 ccm halbgesättigtem Barytwasser gewaschen. Im Niederschlag gefunden 99,98 %.

Versuch V, ebenso wie IV, angewandte Substanz 0,2471 g. Gefunden im Niederschlag 95,87 %.

Versuch VI, ebenso; angewandt 0,2 g Substanz. Im Niederschlage gefunden 99,15 %.

Die Baryumsalze der Carbaminsäuren reagieren stark alkalisch; deshalb wird, wenn man nach Einleiten der Kohlensäure bis zum Verblässen der roten Farbe des Phenolphthaleins nicht wieder mit Barythydrat sättigt bzw. wenigstens stark alkalisiert, infolge der Hydrolyse ein Teil des Baryumsalzes verändert werden. Wie wir weiter unten durch Versuche mit Glykokoll dartun werden, ist anzunehmen, daß sich unter den zur Abscheidung der Aminosäuren gewählten Bedingungen basische Salze bilden, die natürlich erst recht zu ihrer vollständigen Bildung die Gegenwart überschüssigen Baryts erfordern. Dementsprechend erhält man auch keine vollständige Ausscheidung der Asparaginsäure, wenn man nach Einleiten der Kohlensäure nicht wieder mit Barythydrat schüttelt, wie z. B. folgender Versuch zeigt:

Angewandt 0,2444 g Substanz in 1 ccm Salzsäure gelöst, dazu 100 ccm Barytwasser, Eis, Phenolphthalein, CO<sub>2</sub> bis zum

Verblässen der roten Farbe, über Nacht in Eis stehen gelassen, abgesaugt, nicht nachgewaschen.

Gefunden im Niederschlag 36,54%, im Filtrate 64,75%.

### III. Versuche mit l-Asparagin.

Versuch I. 0,2860 g Substanz, ca. 1 ccm Salzsäure 25%, 100 ccm gesättigtes Barytwasser, Phenolphthalein, CO<sub>2</sub>, 10 g Barythydrat, CO<sub>2</sub>, 10 g Barythydrat, CO<sub>2</sub>, 5 g Barythydrat, CO<sub>2</sub>, Barythydrat. Nach dreistündigem Stehen im Eis im Niederschlag gefunden 90,23%.

Versuch II, ebenso; angewandt 0,2840 g Substanz. Gefunden im Niederschlag 89,00%.

Versuch III. 0,2 g Substanz, 1 ccm HCl, 20 ccm Wasser, Phenolphthalein, 100 ccm gesättigtes Barytwasser, CO<sub>2</sub>, Sättigen mit Barythydrat. 1/2 Stunde mit der Maschine geschüttelt, nach 10—15 Minuten abgesaugt. Im Filtrate gefunden 13,86%.

### IV. Versuche mit Glykokoll.

Das Glykokoll war aus Glykokoll «Kahlbaum» durch Abscheidung als glykokollcarbonsaures Baryum hergestellt worden.

Versuch I. 0,2694 g Substanz in 100 ccm gesättigtem Barytwasser gelöst, Phenolphthalein, Eis, CO<sub>2</sub> bis zum Verblässen der roten Farbe, 10 g gepulvertes Barythydrat, CO<sub>2</sub>, Barythydrat im Überschuß; 1/2 Stunde mit der Maschine geschüttelt, 1 Stunde eisgekühlt stehen gelassen, abgesaugt, mit 50 ccm halbgesättigtem, eisgekühltem Barytwasser gewaschen. Gefunden im Niederschlag 90,37%, im Filtrate 10,59%.

Versuch II. 0,2497 g Substanz, 1 ccm Salzsäure, 100 ccm Barytwasser, Eis, Phenolphthalein, CO<sub>2</sub>, festes Barythydrat bis stark alkalische Reaktion, CO<sub>2</sub>, Überschuß von Barythydrat, 2 Stunden in der Maschine geschüttelt, sogleich abgesaugt, mit 50 ccm halbgesättigtem, eisgekühltem Barytwasser gewaschen. Gefunden im Niederschlag 94,19%, im Filtrate 7,54%.

Versuch III. 0,2568 g Substanz, 1 ccm HCl, 100 ccm Barytwasser, Phenolphthalein, Eis, CO<sub>2</sub>, mit Barythydrat gesättigt, 1/2 Stunde mit der Maschine geschüttelt, 3 Stunden in

Eis stehen gelassen, abgesaugt, mit 50 ccm halbgesättigtem, eisgekühltem Barytwasser gewaschen.

Gefunden im Niederschlag 94,25%, im Filtrate 7,98%.

Die vollständige Abscheidung des Glykokolls, wie die der Glutaminsäure und Asparginsäure, ist uns nicht gelungen. Wir haben viele Versuche unter Änderung der Bedingungen ausgeführt, jedoch nie mehr, oft aber wesentlich weniger Glykokoll als unter den in den Versuchen I bis III mitgeteilten Bedingungen im Niederschlage erhalten.

Da durch Bestimmung des Quotienten  $\frac{\text{CO}_2}{\text{N}}$  festgestellt ist, daß Glykokoll quantitativ durch Kohlensäure bei Gegenwart von Barythydrat in die Glykokollcarbonsäure übergeführt wird, bestehen für die Tatsache, daß es nicht vollständig abgeschieden wird, nur die Möglichkeiten, daß entweder das glykokollcarbonsaure Baryum nicht beinahe unlöslich ist, oder daß verschiedene, basische Salze mit verschiedener Löslichkeit entstehen.

Um zwischen diesen beiden Möglichkeiten zu entscheiden, wurde in folgenden Versuchen Glykokoll, wie oben beschrieben, carbaminiert, der Niederschlag nach Absaugen und Auswaschen mit halbgesättigtem, eisgekühltem Barytwasser mit 100 ccm eisgekühltem Barytwasser auf der Maschine geschüttelt, abgesaugt, das Filtrat kjeldahlisiert, der Niederschlag wieder mit der gleichen Menge Barytwassers die gleiche Zeit geschüttelt, wieder abgesaugt und diese Manipulation nochmals wiederholt.

In dem Falle, daß die relative Löslichkeit auf der Entstehung verschiedener basischer Baryumsalze der Carbaminocessigsäure beruht, war zu erwarten, daß das vierte Filtrat weniger Stickstoff enthielt, als das dritte und zweite, das dritte weniger als das zweite. Hingegen würde ein annähernd gleicher Stickstoffgehalt der einzelnen Filtrate dafür sprechen, daß ein einheitliches, relativ lösliches Salz entsteht.

Versuch I, angew. 0,4554 g Substanz. Gefunden im 2. Filtrate 13,27%, im 3. Filtrate 11,09%, im 4. Filtrate 6,94%.

Versuch II, angew. 0,4430 g Substanz. Gefunden im 2. Filtrate 12,91%, im 3. Filtrate 8,84%, im 4. Filtrate 5,22%.

Hiernach ist anzunehmen, daß verschiedene basische Salze entstehen.

#### V. Versuche mit d-, l-Alanin.

Vom Alanin erhielten wir bei nur geringen Änderungen der Versuchsbedingungen nicht unwesentlich differierende Mengen in dem Niederschlag. Bei einer größeren Versuchsreihe betrug diese Menge nicht viel mehr und nicht viel weniger als 50% vom Ausgangsmaterial. Wir vermuteten daher, daß durch die Carbaminierung eine Trennung in 2 isomere Alanin, vielleicht eine Spaltung in die optisch aktiven Komponenten bewirkt werde. Dem war aber nicht so. Sowohl das aus den Niederschlägen als das aus den Filtraten regenerierte Alanin war optisch inaktiv. Ferner verhielt sich das erstere ebenso wie das letztere bei erneuter Carbaminierung, während doch, wäre eine Trennung durch die voraufgegangene Carbaminierung erfolgt, das aus dem Niederschlag regenerierte Alanin bei erneuter Carbaminierung zur Hauptsache wieder in dem Niederschlage hätte gefunden werden müssen, und umgekehrt das aus dem Filtrate erhaltene wieder in dem Filtrate.

Unter den für Glutaminsäure, Asparaginsäure, Asparagin und Glykokoll festgelegten einfachsten Bedingungen wurden 74 bis 82% im Filtrate erhalten.

#### VI. Die Abscheidung verschiedener Aminosäuren unter gleichen Bedingungen.

Die Bedingungen, welche als einfachste, bereits teilweise beim Glykokoll, Alanin, der Glutaminsäure, Asparaginsäure und dem Asparagin angewendet wurden, sind kurz folgende:

0,2 g der betreffenden Säure, 1 ccm HCl 25%, 20 bis 100 ccm H<sub>2</sub>O, etwas Phenolphthalein in Substanz, 100 ccm gesättigtes Barytwasser, CO<sub>2</sub> bis zum Verblässen der roten Farbe, mit etwas überschüssigem, frisch gepulvertem Barythydrat in der Maschine eine halbe Stunde geschüttelt, nach 10—15 Minuten langem Stehen auf einer Filterplatte von 4 cm Durchmesser abgesaugt, mit 25 ccm halbgesättigtem Barytwasser nachgewaschen. Während der ganzen Operation ist mit Eis + Wasser zu kühlen, vor dem Schütteln in der Maschine in

einer Kältemischung, bis in der Büchse etwas Eis entstanden ist. Das Absaugen geschieht auf einem mit Eis umgebenen Trichter.

Im folgenden sind die für verschiedene Aminosäuren gewonnenen Werte angeführt, wobei die im Niederschlage enthaltenen Mengen angegeben sind, auch dann, wenn sie durch Bestimmung des Stickstoffes im Filtrate ermittelt sind.

In die Niederschläge gingen % der Aminosäuren:

Glykokoll	94,25; [94,19]
d-, l-Alanin	26—18
d-, l-, $\alpha$ -Aminobuttersäure	28,02; 24,38
d-, l-, $\alpha$ -Aminovaleriansäure	28,14; 23,22
l-Leucin	78,16; 79,67
d-Glutaminsäure	99,13; 97,82
l-Asparaginsäure	99,98; 99,45
l-Asparagin	[89,00]: 86,14
Phenylglykokoll	4,36; 8,21
Phenylaminoessigsäure	12,40; 16,58
Phenylalanin	35,22; 34,73
Tyrosin	36,68; 34,41
außerdem Glukosamin	81,79; 80,39

Man sieht also, daß vollständig Glutaminsäure und Asparaginsäure in den Niederschlag gehen, fast vollständig Glykokoll; zu  $\frac{4}{5}$  etwa das Leucin und Asparagin. Ebensoviele wird vom Glukosamin, das anhangsweise mit untersucht wurde, abgeschieden; hier kommt möglicherweise die Hydroxylkohlenstoffreaktion mit in Betracht. Am wenigsten wird das Phenylglykokoll abgeschieden, was schon dadurch erklärt wird, daß es überhaupt nur in sehr geringem Grade carbaminiert wird.<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> M. Siegfried und C. Neumann, Diese Zeitschrift, Bd. 54, S. 432 (1908).