

# Über die Extraktivstoffe der Muskeln.

## III. Mitteilung.

Von

**Temistocle Jona.**

(Aus dem Institut für pharmazeutische und toxikologische Chemie der kgl. Universität in Pavia.)

(Der Redaktion zugegangen am 3. Februar 1913.)

Nach den Untersuchungen von K. Micko,<sup>1)</sup> in welchen gezeigt wurde, daß man beim Kochen der Extraktivstoffe der Muskeln mit konzentrierter Salzsäure infolge der Hydrolyse bemerkenswerte Mengen von Aminosäuren erhält, wäre es nicht unwahrscheinlich, auch Polypeptide aus denselben zu isolieren.

Micko selbst hatte schon den Fleischextrakt (Liebig) sukzessiven Fraktionierungen unterworfen und in einer der Fraktionen nach Dipeptiden gesucht;<sup>2)</sup> der Erfolg war jedoch negativ.

Ich habe mir vorgenommen, nach Dipeptiden zu suchen; als Ausgangsmaterial verwendete ich dazu nicht bloß den im Handel erhältlichen Fleischextrakt der Liebig-Gesellschaft, sondern auch ein italienisches Erzeugnis, nämlich den Zardonischen Fleischextrakt.

Zu diesem Zwecke habe ich den von Micko befolgten Weg<sup>2)</sup> modifiziert und zur Isolierung der Dipeptide die Fischersche Methode<sup>3)</sup> angewendet, indem ich dieselben in Diketopiperazin umwandelte; ich bin dabei zu den folgenden Ergebnissen gelangt: 1. Aus beiden Sorten von Fleischextrakt habe ich kleine Mengen von Taurin getrennt und bei beiden

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. Unters. Nahrungs- u. Genußmittel, Bd. 10, S. 393, Bd. 11, S. 705, Bd. 14, S. 253, Bd. 15, S. 449. — Diese Zeitschrift, Bd. 56, S. 180.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 56, S. 182.

<sup>3)</sup> Untersuchungen über Aminosäuren, Polypeptide u. Proteine, 1906, S. 624.

konnte ich die Anwesenheit von größeren Mengen von Glykokoll ausschließen. 2. Es gelang mir, aus dem Zardonischen Fleischextrakt einen Körper zu isolieren, den ich mit dem Anhydrid des d-Alanyl-d-Alanins identifiziert habe, und woraus ich durch Aufschließung der Kette das freie Dipeptid erhielt. Es ist das erste Anhydrid eines Dipeptids, das aus einem Fleischextrakt erhalten wurde.

Im weitem Verlauf meiner Untersuchungen beschäftigte ich mich mit der Frage, ob in den Fleischextrakten sich Gelatine vorfindet, eine Frage, über welche ja schon seit geraumer Zeit diskutiert wird. Zu diesem Zwecke ist mir die vor kurzem von Schmidt<sup>1)</sup> zur Untersuchung der Gelatine vorgeschlagene Methode sehr zustatten gekommen, welche ein neues Hilfsmittel zur Untersuchung darstellt.

Die einander so widersprechenden Resultate, zu welchen die zahlreichen, früheren Untersucher gelangten, hängen, wie ich anderen Orts auseinandergesetzt habe,<sup>2)</sup> von verschiedenen Ursachen ab: So kamen namentlich, in Ermangelung eines Besseren, rein empirische Untersuchungsmethoden zur Anwendung, welche, auf verschiedene und wenig präzisierte Prinzipien gestützt, zu verschiedenen Ergebnissen führen; ihre Anwendung auf die Fleischextrakte, welche in ihrer Zusammensetzung so kompliziert und so verschieden von den Substanzen sind, für welche jene Methoden erprobt und ausgearbeitet worden waren, führte zu weiteren Divergenzen.

Es ist klar, daß die Anwendung der Schmidtschen Methode bei der Untersuchung der Gelatine in den Fleischextrakten derartige Unzukömmlichkeiten nicht vollkommen beseitigt, und deshalb glaube ich auch nicht auf diesem Wege die Frage endgültig und erschöpfend zu lösen. Bis jetzt aber sind unsere Kenntnisse über die Gelatine und die Art und Weise, sie jedesmal mit absoluter Sicherheit in ihren Gemischen nachzuweisen, sehr gering, so daß wir nur aus der Summe der mit sehr zahlreichen und verschiedenen Methoden ge-

<sup>1)</sup> Chemiker-Zeitung, 1910, S. 839.

<sup>2)</sup> Sulle sostanze estrattive dei muscoli. Nota 1.<sup>a</sup> Tipografia M. Rossetti. Fossano 1911.

wonnenen Resultate einen mehr oder weniger gewagten Schluß über ihre Anwesenheit im Fleischextrakt ziehen können und uns vorläufig noch gedulden müssen, mit Hilfe rationellerer Methoden endgültig jeden Zweifel nach dieser Richtung zu zerstören. Die von mir verwendete Schmidtsche Methode vermag also nicht die Frage zu lösen, sie bringt uns nur einen weiteren Anhaltspunkt. Aus den im folgenden angeführten Experimenten geht hervor, daß sich im Fleischextrakt Gelatine oder besser gesagt Substanzen vorfinden, die sich dem Schmidtschen Reagens gegenüber wie Gelatine verhalten.

#### A. Die Untersuchung der Dipeptide.

1270 g von Zardonis bzw. Liebigs Fleischextrakt werden bei Zimmertemperatur in 10 l Wasser gelöst und die erhaltene Lösung mit festem Ammonsulfat gesättigt. Hierauf wird das Ganze 24 Stunden stehen gelassen und dann filtriert. Den am Filter zurückbleibenden Teil wäscht man mit einer gesättigten, wässrigen Ammonsulfatlösung und vereinigt dann die rötlich-braunen, gegenüber Lackmus schwach sauer reagierenden Filtrate. Denselben werden nun 5 l 98%igen Alkohols hinzugesetzt, das Ganze längere Zeit hindurch stark geschüttelt, das ausgefällte Ammonsulfat abfiltriert und vom Filtrat der Alkohol, nach vorausgegangener genauer Neutralisation mit Soda, durch Destillation bei 30 mm Druck entfernt. Nach Verjagung des Alkohols wird bis zu neuerlichem Auskrystallisieren des Ammonsulfates eingeengt, von neuem 5 l 98%igen Alkohols hinzugesetzt, abermals filtriert und der Alkohol wie das erstmal verjagt, und das Ganze wieder bis zum Auskrystallisieren des Ammonsulfats eingeengt. Nach vorausgegangener Filtration wird Alkohol hinzugefügt, nochmals filtriert, der Alkohol verjagt und nun die übrigbleibende Flüssigkeit durch Auffüllen mit Wasser auf 10 Liter gebracht. Zu dieser Flüssigkeit werden 4,5 Volumprocente verdünnter Schwefelsäure (1 : 3) und unter beständigem Umrühren eine 10%ige Lösung von Phosphorwolframsäure in geringem Überschuß hinzugefügt, um eine vollständige Ausfällung zu erhalten; nach ungefähr 10stündigem Stehen wird filtriert. Der Filtrerrückstand wird mit ein wenig

Schwefelsäure und Phosphorwolframsäure versetztem Wasser gewaschen und hierauf mit Hilfe einer Presse kräftig ausgedrückt. Die so erhaltene feste Masse wird mit  $H_2SO_4$  und Phosphorwolframsäure angesäuertem Wasser verrieben, neuerlich ausgepreßt; diese Behandlung wird schließlich noch ein drittes Mal wiederholt. Der Phosphorwolframsäureniederschlag wird mit Fließpapier getrocknet und für eventuelle weitere Untersuchungen aufbewahrt. Das erste, nach der Entfernung des Phosphorwolframsäureniederschlags erhaltene Filtrat wird mit den Waschwässern des Niederschlags vereinigt und zur Fällung der in Lösung gebliebenen Schwefelsäure und Phosphorwolframsäure Barytwasser hinzugesetzt, wobei ein zu großer Überschuß an Baryumhydroxyd vermieden werden soll. Hierauf wird filtriert, der Barytüberschuß durch eine berechnete Menge von  $H_2SO_4$  beseitigt, der Filtrerrückstand gewaschen und Filtrat und Waschwasser zusammengegossen. Die so erhaltene Flüssigkeit verhält sich gegenüber Lackmus neutral und beträgt gegen 30 Liter. Sie wird nun bis auf  $\frac{1}{3}$  ihres Volumens eingedampft und dann das Eindampfen bei vermindertem Druck fortgesetzt (30 mm Quecksilber). In dem Maße als die Einengung fortschreitet, scheiden sich Krystalle ab, welche abgetrennt werden. Die Krystalle werden zunächst mit sehr kaltem Wasser und hierauf mit gleichfalls sehr kaltem, wässerigem Alkohol gewaschen. Die erste Fraktion der abgeschiedenen Krystalle besteht hauptsächlich aus Alkalisulfaten und Alkalichloriden. In den letzten Mutterlaugen, welche einen gelbbraunen Sirup darstellen, finden sich noch Kryställchen, die sich erst nach sehr langer Zeit und mit großen Schwierigkeiten abscheiden lassen.

Diesen Mutterlaugen wird nun Alkohol zugesetzt, das Ganze 12 Stunden stehen gelassen und filtriert (bei  $5^{\circ} C.$ ). Durch den Filtrerrückstand läßt man nun rasch ein wenig 70%igen Alkohol durchlaufen, welcher den größten Teil des Natriumchlorids löst, die Kryställchen aber unaufgelöst läßt.

Bei wiederholter Umkrystallisation aus Wasser scheiden sich weiße Krystalle aus, welche auf Platinblech ohne merklichen Rückstand verbrennen, keinen definierten Schmelzpunkt besitzen, sondern sich bei ungefähr  $240^{\circ}$  zersetzen; nach allen

ihren chemischen und physikalischen Eigenschaften zu urteilen, sind sie mit dem Taurin identisch.

0,1101 g dieser Substanz ergaben bei 15° C. und 750 mm Druck 10,8 ccm N.

Stickstoffgehalt des Taurins

$C_2H_7SO_3N$  berechnet:

N% 11,20

Gefunden:

11,43.

Das bei 5° gehaltene Filtrat wird zum Zwecke der Entfernung des Alkohols einer Destillation bei vermindertem Druck unterworfen, mit sehr verdünnter  $H_2SO_4$  angesäuert und, um die in den Fleischextrakten immer in beträchtlichen Mengen anwesende Milchsäure<sup>1)</sup> zu entfernen, wiederholt mit Äther durchgeschüttelt, wobei das Ganze immer sehr kalt gehalten wird. Der Äther wird abgeschieden und der kalten, wässrigen Lösung zur Entfernung der noch anwesenden Schwefelsäure  $Ba(OH)_2$  in geringem Überschuß zugesetzt. Es wird nun filtriert und im Filtrat der Barytüberschuß durch eine berechnete Menge von  $H_2SO_4$  beseitigt. Man filtriert und engt bei einem Druck von 20 mm bis zur Sirupdicke ein, welcher Sirup infolge der Abkühlung fest wird. Dieser Sirup wird auf Dipeptide untersucht und vor allem der Veresterung unterworfen. Zu diesem Zwecke wird der Abdampfrückstand in einem Ballon mit 750 ccm absoluten Alkohols versetzt und gemischt. Hierauf leitet man trockenes Chlorwasserstoffgas bis zur Sättigung durch und beendet das Durchleiten, wenn eine fast vollständige Lösung eingetreten ist. Nach Beendigung dieses Vorganges, während welches übermäßiges Erhitzen stets vermieden werden soll, läßt man das Ganze 12 Stunden ruhig stehen und filtriert hernach den sich gebildeten mineralischen Niederschlag über Asbestwolle ab. Das Filtrat wird im Vakuum bei einer Temperatur, die 40° nicht übersteigt, destilliert. An dem nicht destillierten Rückstand wird die Behandlung mit Alkohol und trockenem Salzsäuregas noch zweimal wiederholt. Die alkoholische, mit HCl gesättigte Lösung läßt man 12 Stunden bei 0° C. ruhig stehen, nachdem sie vorher mit einem Krystall

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 56, S. 181.

von dem Chlorhydrat des Glykokolläthylesters geimpft wurde. Es wird filtriert; der kleine auf dem Filter bleibende Rückstand ist nur von mineralischen Substanzen gebildet, wodurch die Gegenwart größerer Glykokollmengen ausgeschlossen erscheint. Das Filtrat wird im Vakuum bei einer  $40^{\circ}$  nicht überschreitenden Temperatur destilliert. Die Chlorhydrate im Rückstand werden mit Hilfe berechneter Mengen von Natriumäthylat in der Kälte zerlegt und das gefällte Natriumchlorid abfiltriert. Die filtrierte alkoholische Lösung wird bei einem Druck von 10 mm Hg abdestilliert; die Temperatur des Bades erreicht erst am Ende der Prozedur eine Höhe von  $65^{\circ}$  C. Auf diese Weise werden der Alkohol und die Ester der Monaminosäuren getrennt. Den Destillationsrückstand nimmt man mit absolutem Alkohol auf und filtriert und leitet durch das Filtrat bei  $0^{\circ}$  einen Strom von trockenem Ammoniakgas bis zur Sättigung durch. Man läßt nun das Ganze einige Tage bei  $0^{\circ}$  stehen. Aus der vom Zardonischen Fleischextrakt herrührenden Flüssigkeit setzen sich nach und nach feine Blättchen ab, welche durch Filtration getrennt werden können. Wird die Flüssigkeit einige Tage hindurch sich selbst überlassen, so fällt schließlich nichts mehr aus; destilliert man, so erhält man als Rückstand einen Sirup von gummiartiger Konsistenz. Aus der vom Liebigschen Fleischextrakt stammenden Flüssigkeit erhält man nur eine Trübung und die ausgefällte Substanz ist so spärlich, daß es unmöglich ist, sie näher zu untersuchen; bei Destillation bleibt gleichfalls ein sirupähnlicher Rückstand von gummiartiger Beschaffenheit zurück.

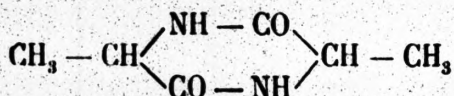
Die Krystalle werden nun in kochendem Wasser gelöst, aus welchem sie auskrystallisieren; das Umkrystallisieren wird nochmals wiederholt. Die Menge der erhaltenen Krystalle betrug 2,42 g, was also 1,90% des Extraktes entspricht. Sie verbrennen auf dem Platinblech, ohne einen Rückstand zu hinterlassen, und erweisen sich bei der Analyse als eine stickstoffhaltige, aber phosphor- und schwefelfreie Verbindung. Rasch erhitzt, schmelzen sie bei ungefähr  $296^{\circ}$  und bilden dann eine gelbliche Flüssigkeit. Die Substanz schmeckt ein wenig bitter; wird sie durch kurzes Kochen in Lösung gebracht und

mit Kupferoxyd versetzt, so färbt sie sich nicht. Sie ist in Wasser, in verdünnten Säuren und Alkalien auch in der Kälte löslich, hingegen in absolutem Alkohol unlöslich. Bei 100° getrocknet, ergibt sie bei der Analyse die folgenden Resultate: 0,2112 g der Substanz ergeben 0,3960 g CO<sub>2</sub> und 0,1390 g H<sub>2</sub>O  
 0,1250 g » » » » 21,20ccm N bei 15° u. 760mm Hg.

Berechnet für C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> ON:	Gefunden:
C% 50,70	50,81
H% 7,04	7,26
N% 19,72	19,90

Das mit Hilfe der Gefrierpunktmethode unter Verwendung von Essigsäure als Lösungsmittel gefundene Molekulargewicht beträgt 136. Für C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>ON würde man ein Molekulargewicht von 71 annehmen müssen. Unserer isolierten Substanz gebührt demnach die doppelte Formel C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>N<sub>2</sub> (Molekulargewicht = 142).

Der zur Isolierung der Verbindung befolgte Weg, die erhaltene Formel und alle beobachteten physikalischen Eigenschaften, lassen den Schluß zu, daß diese Substanz ein Anhydrid eines Dipeptids und zwar das Anhydrid des Alanyl-Alanins vorstellt:



Zur Identifizierung der Verbindung habe ich versucht, die Kette aufzuschließen, um das Dipeptid selbst zu erhalten:



Außerdem bestimmte ich das spezifische Drehungsvermögen.

1. 0,90 g der fein pulverisierten Substanz werden mit 7,5 ccm Normalnatronlauge bei Zimmertemperatur geschüttelt.<sup>1)</sup> Nach zwei Stunden ist dieselbe gelöst. Um die Hydrolyse zu vervollständigen, wird das Ganze noch eine weitere Stunde sich selbst überlassen. Hierauf wird CH<sub>3</sub>COOH bis zu schwach saurer Reaktion hinzugefügt und das Ganze bei herabgesetztem

<sup>1)</sup> Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch. Bd. 39 (1906), S. 467 u. folg.

Druck eingedampft. Der Rückstand wird in 25 cem Alkohol gelöst und erwärmt. Kaum ist die Flüssigkeit bis zur Siedehitze erwärmt, so beginnen sich Krystalle abzuscheiden. Nach 5 Minuten währendem Kochen kühlt man ab und filtriert. Die auf dem Filter gebliebene Substanz wird nochmals umkrystallisiert, indem man sie in Wasser löst und nun absoluten Alkohol hinzusetzt. Man erhält auf diese Weise Krystalle, die die Eigenschaften des d-Alanyl-d-Alanins von Fischer<sup>1)</sup> aufweisen und die, getrocknet, bei der Analyse folgende Zusammensetzung ergeben:

0,2011 g der Substanz ergeben 0,3310 g CO<sub>2</sub> u. 0,1392 g H<sub>2</sub>O  
 0,1555 g » » » » » 22,8 cem N bei 12° u 758 mm.

Berechnet für C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub>N:

Gefunden:

C% 45,00

44,85

H% 7,50

7,70

N% 17,50

17,35

2. Zur Bestimmung des spezifischen Drehungsvermögens<sup>2)</sup> verwendete ich eine Lösung von 0,2710 g der Substanz in Wasser, deren Gesamtgewicht dann 12,800 g betrug. Auf diese Weise erhalte ich eine Flüssigkeit von der Konzentration 2,11%; die Dichte bei 20° beträgt 1,0031. Die Drehung des Natriumlichtes bei 20° beträgt —1,119. Daraus berechnet sich:  $[\alpha]_D^{20} = -28,1^\circ$ . Aus allen angeführten Experimenten geht daher hervor, daß die isolierte Substanz identisch mit dem Anhydrid des d-Alanyl-d-Alanins oder dem cis-Dimethyldiketopiperazin ist, (F.=297°;  $[\alpha]_D^{20} = -28,8 \pm 0,5$ ), welches E. Fischer durch Behandlung des Äthylesters des d-Alanyl-d-Alanins mit ammoniakalischen Alkohol dargestellt hat.<sup>2)</sup>

## B. Untersuchung auf Gelatine.

Ich hielt es nicht für angezeigt, direkt die wässrige Lösung des Fleischextraktes zu untersuchen, da ich einen störenden Einfluß seitens der in ihr enthaltenen Substanzen fürchtete. Ich arbeitete daher bloß mit jenem Anteil des Ex-

<sup>1)</sup> Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch. Bd. 39 (1906), S. 467 u. folg.

<sup>2)</sup> Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch. Bd. 39 (1906).



traktes, der bei Sättigung der wässerigen Lösung mit Ammonsulfat ausfällt. Zu dem Zwecke löste ich 22,6 g des Fleischextraktes in 200 ccm Wasser von 15° C. und sättigte die erhaltene Lösung mit Ammonsulfat. Nach 12 Stunden wurde filtriert, der Filtrerrückstand mit einer gesättigten, wässerigen Lösung von Ammonsulfat gewaschen und dann in Wasser aufgelöst. Die verwendete Wassermenge war so groß, daß die Lösung fast farblos, demnach also sehr verdünnt war. Dieses Filtrat prüfte ich mit einer wässerigen 1,2%igen Lösung von Ammoniummolybdat und einer Lösung von Salpetersäure ( $d=1,2$ ). Im nachfolgenden sind die erhaltenen Resultate angeführt:

1. Lösung + Ammoniummolybdat: kein Niederschlag.
2.    »   +                    »                    + 3 Min. langes Kochen: leichte Trübung.
3.    »   +                    »                    + 2 Tropfen  $\text{HNO}_3$ : Weißer, beim Erhitzen sich lösender Niederschlag, der beim Abkühlen wieder ausfällt.
4.    »   +                    »                    + 2 Tropfen  $\text{HNO}_3$  und 3 Min. langes Kochen: starker, nicht flockiger Niederschlag.
- 5a)   »   +                    »                    +  $\text{HNO}_3$  im Überschuß langsam hinzugesetzt: Niederschlag, der sich bei Säureüberschuß unvollständig löst.
- b)   »   +                    »                    +  $\text{HNO}_3$  im Überschuß rasch hinzugesetzt: Niederschlag, der sich im Säureüberschuß vollkommen klar löst.
- c)   »   +                    »                    +  $\text{HNO}_3$ : Niederschlag der sich in konzentrierter  $\text{HNO}_3$  und schwieriger in 80%igen Essigsäure löst.
6. Die Lösung + Ammoniummolybdat wird nicht nur von  $\text{HNO}_3$ , sondern auch von verdünnter  $\text{H}_2\text{SO}_4$  und  $\text{HCl}$  gefällt. Die Essigsäure und die Weinsäure hingegen erzeugen eine Trübung, welche durch Kochen sich vermindert; die Oxalsäure gibt eine Trübung, welche beim Erhitzen verschwindet, bei Abkühlung aber wieder erscheint.

Dieses Verhalten ist gleich jenem, welches von Schmidt für die Gelatine angegeben wurde; die einzigen Unterschiede

bestehen darin, daß 1. die Weinsäure und Essigsäure einen Niederschlag bewirken, der beim Erhitzen, anstatt sich zu vermehren oder ungeändert zu bleiben, sich vermindert. 2. Die Farbe des Niederschlags bekommt mit der Zeit keinen bläulichen Stich.

Ich untersuchte daher einige Muster von Gelatine und fand, daß sie mit dem Schmidtschen Reagens Niederschläge ergeben, die sich ganz annähernd wie die Niederschläge verhalten, die man mit den Fleischextrakten gewinnen kann.

In Hinblick auf die reichliche Menge der erhaltenen Niederschläge kann man daher schließen, daß die Fleischextrakte einen ziemlich starken Prozentsatz von Gelatine oder, besser gesagt, von Substanzen enthalten, die sich dem Schmidtschen Reagens gegenüber wie Gelatine verhalten.