

Die Anwendung der β -Naphthalinsulfochloridmethode zur Erkennung der partiellen Hydrolyse von Fleischeiweiß.

Von
Peter Bergell.

(Der Redaktion zugegangen am 14. Februar 1914.)

Seit der Darstellung der ersten Naphthalinsulfaminosäuren und Naphthalinsulfopeptide (E. Fischer und P. Bergell, 1902, Chem. Ber. Bd. 35, S. 3779) ist das β -Naphthalinsulfochlorid häufig als Gruppenreagens auf Aminosäuren und Verkettungen von Aminosäuren angewandt worden. Die Mehrzahl der einbasischen Monoaminosäuren und die Mehrzahl der Polypeptide gibt mit dem Naphthalinsulforest schwerlösliche Verbindungen. Auch Diaminomono-carbonsäuren geben schwerlösliche Niederschläge (Riesser, Diese Zeitschrift, Bd. 49, S. 210.) Auch basische Derivate der Monoaminosäuren reagieren mit dem Chlorid, sofern die primäre Aminogruppe frei ist, wie Bergell und Feigl, E. Königs, Bergell und von Wülfing an den Amid- und Amiden der Aminosäuren und ähnlichen Verbindungen nachwiesen. Nur die freien zweibasischen Monoaminosäuren haben unter den hydrolytischen Bausteinen des Eiweißmoleküls das Vorrecht, keine entsprechenden schwerlöslichen Derivate zu bilden, während ihre Halbamide schon wieder leicht isolierbare Verbindungen geben. Die Mehrzahl der Aminosäuren und der Polypeptide gibt demnach mit β -Naphthalinsulfochlorid schwerlösliche Derivate.

Es lag daher nahe, daß die Reaktion außer für die Erkennung und Isolierung der Aminosäuren und Peptide, sowie für synthetische Zwecke auch noch Verwendung fand für die Erkennung von unvollständigen hydrolytischen Vorgängen. Die Naphthalinsulforeaktion ist auch als rein analytische Methode gehandhabt worden. Art und Menge der total wie partiell hydrolysierten Abkömmlinge der Eiweißstoffe sind zuweilen praktisch wichtig. In gleicher Weise ist auch die Möglichkeit der Erkennung scheinbar geringfügigen Abbaues oft von Be-

deutung. So haben Baur und Barschall («Vereinbarungen», herausgegeben vom Kaiserl. Gesundheitsamt 1911) die Naphthalinsulfochloridmethode in eingehender Untersuchung bei verschiedenen Peptonen und Fleischextrakten angewandt. Sie fanden, daß auch bei den letzteren ein Teil des Stickstoffs bei der Reaktion in unlösliche Verbindung übergeführt wird.

Bei der Neuuntersuchung einzelner dieser Resultate wurde nun bei Erweiterung der Fragestellung gefunden, daß die Naphthalinsulforeaktion auf einfachem Wege eine Beurteilung des hydrolytischen Zustandes des Fleischeiweißes ergibt. Sie zeigt auch bei scheinbar geringem Abbau große Ausschläge und gibt somit brauchbare Anzeichen für den partiellen, hydrolytischen Abbau. Eine derartig scharfe Methodik ist aber hier am Platze, da ein Abbau, der in bezug auf die Masse des Fleischeiweißes gering erscheint, in den wässrigen Extrakten potenziert sich darstellt. Die Methode wurde auf frisch dargestellte Extrakte verschiedenster Art vergleichsweise angewendet.

Es erscheint zunächst noch notwendig, einiges über das Wesen der Reaktion selbst zu sagen. Es handelt sich um ein schwerlösliches Chlorid, das, gegen wässrige alkalische Lösungen geschüttelt, träge, aber bei richtiger Leitung der Reaktion mit hoher Ausbeute reagiert. Alkali wird verbraucht, so daß neutrale, selbst schwach saure Reaktion eintreten kann. Unbedingt muß das Alkali portionsweise zugefügt werden. Bei der Zufügung des ersten Moleküls reagieren bis 50% der Masse, da ein Ausfallen nur stattfindet, wenn die Natronsalze der entstehenden Verbindungen schwer löslich sind. Der Zusatz in Intervallen kann nicht durch sehr langes Schütteln oder bestimmte Alkalität ersetzt werden. Bei der Reaktion findet dauernd eine Konkurrenz zwischen der Aminogruppe und dem fixen Alkali statt, wenn dieselbe für die erstere auch bei Alkaliüberschuß ungleich gefährlicher wird als bei schwacher Alkalinität. Über die Behandlung von öligen oder halbfesten Niederschlägen ist bei jedem Versuche das Einschlägige angegeben.

Eine wichtige Frage ist, ob bei derartigen Isolierungen eine Reinigung durch vorherige Einschiebung einer Phosphorwolframsäurefällung stattfinden darf. Mit dieser Frage hängt

auch zum Teil die Erörterung zusammen, wie weit hier Aminosäuren oder Polypeptide und höhere Spaltprodukte, die jedoch kein Eiweiß mehr sind, die Nomenklatur bestimmen. Versuche ergaben bald, daß die Phosphorwolframsäureniederschläge, wie nach der Erfahrung zu erwarten war, Substanzen einschließen, die sonst mit dem Naphthalinsulfochlorid in Reaktion treten. Wird die Fällung stets in gleicher Weise vorgenommen, können zwar unter Umständen untereinander übereinstimmende Zahlen gewonnen werden. Dieselben bleiben aber stets hinter den Werten zurück, die in der gut enteweißten Lösung bei direkter fehlerfreier Anwendung der Reaktion erhalten werden. Selbst bezüglich leicht löslicher Monoaminosäuren kann bekanntlich die Phosphorwolframsäurefällung Verluste bringen, zweifellos bei den Polypeptiden. Die Einheit ist hier der Stickstoff, der einem Molekül angehört, das eine mit dem Naphthalinsulfochlorid reagierende primäre Aminogruppe besitzt. Der Begriff Aminosäuren- und Polypeptidstickstoff ist zusammenzufassen, wobei zu bedenken ist, daß manche Diaminosäuren, wie die zweibasischen Monoaminosäuren, sofern sie nicht Halbamide sind, mit dem Chlorid nicht in analoger Weise reagieren. Die Phosphorwolframsäurefällung muß demnach vermieden und die Naphthalinsulforeaktion nach gründlicher Enteweißung direkt durchgeführt werden unter obigen Kautelen.

Es ergab sich nun, daß von einem wässrigen Extrakt, das durch vierstündiges Kochen von frischem Fleisch hergestellt war und bei dem eine weitergehende Konzentrierung vermieden war, überraschenderweise so gut wie überhaupt keine Naphthalinsulfoverbindungen erhalten wurden. Nur Spuren von Reaktionsprodukt zeigten sich. Findet dagegen eine Konzentrierung der Lösung statt, scheinbar gleichgültig, ob bei höherer oder tieferer Temperatur, bei gewöhnlichem oder vermindertem Druck, und wird dieselbe bis fast zur Trockene durchgeführt, so verhält sich die wässrige Lösung des Rückstandes anders. Sie gibt bereits eine nicht unbedeutende Menge stickstoffhaltigen Reaktionsproduktes bei der Naphthalinsulforeaktion. Es muß demnach bei dem Einengen zur Trockene eine Spaltung auftreten, die beim längeren Kochen der ver-

dünnten Lösung nicht auftritt. Durch die Reaktion vermag man also eine frisch hergestellte Fleischbouillon von einer aus besten Extrakten bereiteten zu unterscheiden, was meines Wissens bisher nicht in dieser Weise bekannt war.

Daraufhin wurden Versuche angestellt, ob die Naphthalinsulfureaktion wesentlich höhere Werte ergibt, wenn eine gewisse Autolyse des zur Anwendung gelangenden Fleisches stattgefunden hat. Wie zu erwarten war, steigen hier die gefundenen Werte wesentlich an. Auch ist die Vermehrung hier anscheinend schon etwas mehr auf das Auftreten von freien Aminosäuren zurückzuführen. Die Autolyse steigert den Aminosäuren-Polypeptidwert, sowohl wenn sie bei saurer Reaktion, wie ohne Säurezusatz verläuft. Die Werte erhöhen sich bei Zusatz von Desinfektionsmitteln, sowohl wie auch bei Eintritt leichter Fäulnis, wobei natürlich quantitative Unterschiede bestehen.

Von technisch hergestellten Fleischextrakten wurden einige untersucht, nämlich Kemmerich, Liebig- und Armour-Fleischextrakt. Diese zeigen, besonders die beiden letzteren, außerordentlich hohe Werte bei der Naphthalinsulfureaktion. Die Methode dürfte daher höchstwahrscheinlich auch in der Nahrungsmittelchemie von Bedeutung sein. Es sei bemerkt, daß für die erwähnten Versuche die Methode von Sörensen nicht anwendbar ist. Es ist dies jedenfalls die Ursache dafür gewesen, daß seitens der Nahrungsmittelchemiker die Verschiedenheiten des partiellen Fleischabbaues noch nicht in der beschriebenen Weise erkannt wurden.

Ebenso wie die Stickstoffzahlen der Reaktionsprodukte der Naphthalinsulfochloridreaktion steigt bei den selbsthergestellten Extrakten auch der prozentuale Gehalt des Extrakt-rückstandes selbst, was auf einen Gehalt an stickstoffreicheren, leicht abspaltbaren Aminosäuren und Peptiden schließen läßt. Amidstickstoff oder Ammoniak scheint keine wesentliche Rolle zu spielen, da Naphthalinsulfamid nicht auftritt. Die Reaktionsprodukte sind in verdünntem Ammoniak spielend löslich und ist überhaupt Bildung von Naphthalinsulfamid stets erst von einer gewissen Konzentration an zu beobachten. Je weiter

die Autolyse des Fleisches fortschreitet, um so größer erweist sich auch die Menge der löslichen Stoffe.

Nach diesen Ergebnissen erscheint mir die Naphthalinsulfochloridreaktion nicht ungeeignet, bei direkter Anwendung auf Extrakte verschiedenster Art ein ungefähres Bild vom hydrolytischen Zustand des Ausgangsmaterials, nämlich des Fleischiweißes, zu geben. Nachfolgende Zahlen sprechen dafür und ist die Methode relativ leicht und schnell ausführbar wie kontrollierbar.

Experimenteller Teil.

Zur Untersuchung gelangten folgende Extrakte: 1. aus frischem Rindfleisch, als direkte Bouillon untersucht. 2. Extrakt aus frischem Rindfleisch, zur Trockene gebracht und wieder gelöst. 3. Extrakt wie 2., jedoch aus autolysiertem resp. bakteriell zersetztem Fleisch bereitet. 4. Fertige Fleischextrakte des Handels, und zwar Liebig, Kemmerich (Bullox) und Armour-Fleischextrakt.

1. Je 500 g frisches Rindfleisch, fett- und sehnenfrei, wurden durch einen Fleischwolf getrieben und mit 750 ccm Wasser in einem mit Deckel verschlossenen Emailtopf drei Stunden gekocht. Dann wurde filtriert und mit 250 ccm heißem Wasser nachgewaschen. Filtrat = 1000 ccm wurde auf 500 ccm eingengt.

2. $3\frac{1}{2}$ kg frisches fett- und sehnenfreies Rindfleisch wurden durch den Fleischwolf getrieben und mit etwa 8 l gewöhnlichem Wasser vier Stunden in einem leicht verschlossenen Emailtopf gekocht und abgepreßt. Der Preßsaft wurde nochmals filtriert und im Vakuum bei ca. 80° zur Trockene gebracht. Ausbeute 140 g = 4%.

3. 2 kg frisches fett- und sehnenfreies Rindfleisch, in gleicher Weise zerkleinert, wurde durch 24stündiges Aufbewahren im Brutschrank der Autolyse und bakteriellen Zersetzung unterworfen. Darauf wurde vier Stunden mit etwa 5 l gewöhnlichem Wasser ausgekocht und abgepreßt. Der Preßsaft wurde filtriert und im Vakuum unter 80° zur Trockene gebracht. Ausbeute 130 g = 6,5%.

4. Von fertigen Extrakten wurden verwendet: die Originalpackungen von Liebigs Fleischextrakt ($\frac{1}{8}$ Pfd.: Mk. 1,30). Ein Pfund dieses Extraktes wird nach den Angaben der Liebig-Gesellschaft aus 34 Pfund knochen- und fettfreien Fleisches erhalten, d. h. 100 g Fleisch geben nach dem angewandten Verfahren 2,94 g Extrakt (2,94%). Ferner die Originalpackungen von Paraguay-Fleischextrakt «Bullox», hergestellt von Prof. Dr. Kemmerich, San Salvador, Paraguay-Fleischextrakt-Gesellschaft Hamburg. Schließlich Armour's Extrakt of Beef. Chicago.

Wasserbestimmung der Extrakte.

Extrakt nach 2. aus frischem Fleisch bereitet enthielt 13,51% Wasser. Extrakt nach 3. aus autolysiertem Fleisch enthielt 12,11% Wasser. Liebigs Extrakt enthielt 18,53%, Kemmerichs Bullox enthielt 19,57%, Armour 19,76% Wasser.

Die Bestimmungen wurden in der Weise ausgeführt, daß je 10 g der Extrakte in Porzellanschälchen im Trockenschrank bei 100–110° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet wurden.

Kochsalzbestimmung in den Extrakten.

2,0 g Extrakt werden in einem Nickeltigel mit ca. $\frac{1}{2}$ g NaOH und 2 ccm Wasser erhitzt.

Nach dem Wegkochen des Wassers wird gegläht und darauf der Rückstand mit Wasser ausgekocht und die gesamte Lösung auf 100 ccm verdünnt unter Zufügung von Salpetersäure. 50 ccm des Filtrates dienen zur Bestimmung nach Volhard. (Eine direkte Anwendung der Volhard'schen Methode auf die verdünnten Extrakte ergibt viel zu hohe Werte.) Die gefundenen Kubikzentimeter $\frac{n}{10}$ -AgNO₃ mit 0,00585 multipliziert geben den Gehalt an NaCl in Grammen.

Extrakt aus frischem Fleisch:

1. verbraucht 2,2 ccm $\frac{n}{10}$ -AgNO₃ = 0,01287 g NaCl = 1,287% NaCl.
2. » 2,15 » » = 0,01257 » » = 1,257% » .

Extrakt aus «autolysiertem» Fleisch:

1. verbraucht 2,1 ccm $\frac{n}{10}$ -AgNO₃ = 0,01228 g NaCl = 1,228% NaCl.
2. » 2,2 » » = 0,01287 » » = 1,287% » .

Extrakt Bullox-Kemmerich:

1. verbraucht 5,0 ccm $\frac{n}{10}$ -AgNO₃ = 0,02925 g NaCl = 2,925% NaCl.
2. » 5,0 » » = 0,02925 » » = 2,925% » .

Extrakt Liebig:

1. verbraucht 5,5 ccm $\frac{n}{10}$ -AgNO₃ = 0,03218 g NaCl = 3,218% NaCl.
2. » 5,7 » » = 0,03334 » » = 3,334% » .

Extrakt Armour:

1. verbraucht 12,4 ccm $\frac{n}{10}$ -AgNO₃ = 0,07254 g NaCl = 7,254% NaCl.
2. 12,3 " " " = 0,07195 " " = 7,195% " "

Gesamtstickstoff nach Kjeldahl.

I. Aus 250 g frischem Fleisch direkt bereitete Bouillon (siehe oben), die niemals weiter als auf 60 ccm eingengt und wieder verdünnt war, gelangte zur Analyse. Von der Lösung entsprach 1 ccm genau 0,833 g frischem Fleisch.

1. 5 ccm verbrauchten 14,2 ccm $\frac{n}{10}$ -H₂CO₄ = 0,01988 g N.
2. 10 " " " 27,4 " " " = 0,03836 " "

Die Lösung enthielt demnach 0,3906 g N in 100 ccm.

II. Extrakt aus frischem Fleisch:

Eine Lösung, von der 1 ccm 0,04 g festem Extrakt (der noch 13,51% H₂O enthielt) entsprach, gelangte zur Analyse.

1. 5 ccm verbrauchten 12,3 ccm $\frac{n}{10}$ -H₂SO₄ = 0,01722 g N.
2. 5 " " " 12,5 " " " = 0,0175 " "

Der lufttrockene feste Extrakt enthielt demnach 8,61 resp. 8,75% N.

Der wasserfreie feste Extrakt 9,95 resp. 10,12% N. (Der höhere Stickstoffgehalt der direkten Bouillon entspricht der Darstellung.)

III. Fester Extrakt von «autolysiertem» Fleisch:

Eine Lösung, von der 1 ccm = 0,04 lufttrockenem festem Extrakt entsprach, wurde analysiert.

1. 5 ccm verbrauchten 14,6 ccm $\frac{n}{10}$ -H₂SO₄ = 0,0204 g N.
2. 10 " " " 28,7 " " " = 0,04018 g N.

Der lufttrockene Extrakt enthielt demnach 10,22 resp. 10,05% N.

Der trockene Extrakt 11,62 resp. 11,42% N.

IV. Liebigs Extrakt:

Zur Analyse diente eine Lösung, von der 1 ccm 0,04 g lufttrockenem Extrakt (mit 18,53% Wasser) entsprach.

1. 5 ccm verbrauchten 12,3 ccm $\frac{n}{10}$ -H₂SO₄ = 0,01722 g N.
2. 10 " " " 24,5 " " " = 0,0343 " "

Der lufttrockene Extrakt enthält demnach 8,61 resp. 8,575% N.

Der trockene Extrakt ca. 10,6% N.

V. Bullox-Kemmerich-Extrakt:

Zur Analyse diente eine Lösung, von der 1 ccm 0,02 g lufttrockenem Extrakt entsprach.

1. 5 ccm verbrauchten 7,5 ccm n_{10} -H₂SO₄ = 0,0105 g N.

2. 5 „ „ 7,1 „ „ = 0,0994 „ „

Der lufttrockene Extrakt enthielt 10,5 resp. 9,94% N.

Der trockene Extrakt ca. 12,5% N.

VI. Armour-Extrakt:

Zur Analyse gelangte eine Lösung, von der 1 ccm 0,02 g Extrakt entsprach.

1. 5 ccm verbrauchten 6,1 ccm n_{10} -H₂SO₄ = 0,0854 g N.

2. 5 „ „ 5,9 „ „ = 0,0826 „ „

Auf fast trockenen Extrakt berechnet sich 8,54 resp. 8,26% N, auf wasserfreien Extrakt ca. 10,3% Stickstoff.

Stickstoffbestimmung der Naphthalinsulfoverbindungen in den verschiedenen wässrigen Extrakten nach Kjeldahl:

A. Eine frische Bouillon, die nicht zur Trockene eingengt war und von der 1 ccm einem Gramm frischem Fleisch entsprach, wurde mit Kochsalz und Essigsäure enteweißt. (Auf 250 g 5 g NaCl, schwach essigsäures Aufkochen.) Es wurde filtriert und mit schwacher Natronlauge neutralisiert. Die klare Lösung wurde in Zwischenräumen von 1¹/₂ Stunden mit einer ätherischen β -Naphthalinsulfochloridlösung (6,0 g) nach dreimaligem Zufügen von je 10 ccm N.-NaOH auf der Maschine geschüttelt. Die wässrige Lösung wurde in einem Scheidetrichter von der ätherischen getrennt, filtriert und mit Salzsäure übersättigt. Die ausfallenden Naphthalinsulfoverbindungen waren größtenteils ölig und brauchten zur Krystallisation bzgl. zum Absetzen mehrere Tage. Sie wurden auf Faltenfilter durch vorsichtiges Dekantieren der obenstehenden klaren Schicht filtriert und mit Wasser gewaschen. Der auf dem Filter befindliche Niederschlag wurde zusammen mit dem Filter mit der im Kolben verbliebenen, gleichfalls gewaschenen Bodenschicht vereinigt und in wenig verdünnter Natronlauge gelöst. Die Lösung wurde filtriert resp. abgesogen und das Filter ausgewaschen. Im Filtrat, das schließlich auf 120 ccm aufgefüllt war, wurde der Stickstoff bestimmt.

1. 10 ccm verbrauchten 2,6 ccm $n_{/10}\text{-H}_2\text{SO}_4 = 0,04368$ g N
in der Gesamtlösung von 120 ccm.

2. 10 ccm verbrauchten 2,2 ccm $n_{/10}\text{-H}_2\text{SO}_4 = 0,03696$ g N
in der Gesamtlösung.

Die Versuche ergaben bei Wiederholung Werte zwischen 0,037 als niedrigste und 0,049 g als höchste Werte.

B. Extrakte von frischem Fleisch:

Eine Lösung von 8 g lufttrocknen Extraktes wurde nach dem Enteiweißen auf Naphthalinsulfverbindungen verarbeitet. Zur Analyse diente schließlich wieder eine Lösung von 120 ccm.

1. 10 ccm verbrauchten 5,2 ccm $n_{/10}\text{-H}_2\text{SO}_4$

2. 10 „ „ 5,1 „ „

= 0,08736 bis 0,08568 g N in der Gesamtlösung.

Bei Wiederholung wurden tiefere Werte erhalten, unter 0,06 g N in der Gesamtlösung.

C. Extrakt aus autolysiertem Fleisch:

Darstellung der Naphthalinsulfverbindungen analog. 120 ccm entsprachen schließlich wieder 8,0 g lufttrocknen Extraktes.

1. 10 ccm verbrauchten 7,1 ccm $n_{/10}\text{-H}_2\text{SO}_4$

2. 10 „ „ 6,8 „ „

= 0,11828 bis 0,11424 g N in der Gesamtlösung.

Bei Wiederholung Werte zwischen 0,113 bis 0,118 g N erhalten.

D. Fleischextrakte des Handels.

Liebigs Extrakt:

Darstellung analog, so daß 120 ccm wieder die Naphthalinsulfverbindungen aus 8,0 g enthielten.

1. 10 ccm verbrauchten 9,4 ccm $n_{/10}\text{-H}_2\text{SO}_4$

2. 10 „ „ 9,4 „ „

= 0,15792 g N in der Gesamtlösung.

Bei Wiederholung wurden noch höhere Werte (0,17 g N und darüber) erhalten.

Bullox-Kemmerich-Extrakt:

Bei analoger Verarbeitung (8,0 g Extrakt, 120 ccm Lösung) verbrauchten

1. 10 ccm verbrauchten 6,9 ccm $n_{/10}\text{-H}_2\text{SO}_4$

2. 10 „ „ 6,5 „ „

= 0,11592 bis 0,1092 g N.

Armour Extrakt:

Bei analoger Ausführung verbrauchten

1. 10 ccm 8,6 ccm n_{10} -H₂SO₄

2. 10 „ 8,8 „ „

= 0,1444 bis 0,1478 g N.

Versuche nach vorausgegangener Fällung mit Phosphorwolframsäure:

250 g frisches Rindfleisch wurden in Würfel geschnitten, mit ca. 700 ccm Wasser vier Stunden am Rückflußkühler gesiedet und filtriert. Das Filtrat wurde mit Salzsäure versetzt, auf 1 l mit Wasser aufgefüllt und mit 80 g Phosphorwolframsäure gefällt. Nach dem Absetzen des Niederschlages wurde filtriert und das Filtrat zur Fällung der überschüssigen Phosphorwolframsäure mit ca. 20 g gepulvertem Baryt versetzt und eine Stunde auf der Maschine geschüttelt. Im Filtrat wurde der Baryt mit Schwefelsäure gefüllt. Ein aliquoter Teil wurde neutralisiert und auf 150 ccm (= 85,5 g Fleisch) eingeeengt. Diese Lösung wurde mit 10 ccm n_{1} -NaOH versetzt und mit ätherischer Naphthalinsulfochloridlösung (5 g) geschüttelt. In Intervallen von 1½ Stunden noch dreimal Alkali hinzugefügt. Bei der Ausfällung waren die Naphthalinsulfoverbindungen nicht krystallin und ihre Menge derart gering, daß von einer quantitativen Bestimmung abgesehen wurde. Ein gleiches Resultat wurde bei der Anwendung eines trocknen Extraktes, der aus ganz frischem Fleisch hergestellt war, erhalten. 7,35 g Liebig-Extrakt wurden in Wasser gelöst und in gleicher Weise behandelt. Die Fällung der Naphthalinsulfoverbindungen (aus noch 5,1 g Extrakt) ergab einen nicht unbeträchtlichen und bald krystallisierenden Niederschlag.

Für quantitative Versuche wurde von dieser Methode, wie erwähnt, Abstand genommen.