

Über Gelatine, II.

von

Zd. H. Skraup, w. M. k. Akad., und **F. Heckel**.

Aus dem chemischen Institute der Universität Graz.

(Vorgelegt in der Sitzung am 13. Juli 1905.)

In der ersten Mitteilung über Gelatine, die der eine von uns mit R. Zwirger veröffentlicht hat,¹ wurde angegeben, daß die Gelatine von den bisher unbekannten Aminosäuren, welche aus dem Casein isoliert worden sind, die Casean-, Casein- und Oxydiaminokorksäure nicht liefert. Da bei dieser Untersuchung die Hydrolyse der Gelatine und die weitere Verarbeitung anders vorgenommen war, als es beim Casein der Fall gewesen ist, schien es notwendig, sie unter den beim Casein beobachteten Verhältnissen zu wiederholen. Dieses ist nun geschehen und sind wir in der Lage, den negativen Befund betreffend die drei genannten Aminosäuren zu bestätigen.

Dafür hat sich herausgestellt, daß die Angabe über die Diaminoglutarsäure und Diaminoadipinsäure nicht richtig ist. Die Säuren sind im wesentlichen nichts anderes als Glykokoll, beziehlich *d*-Alanin, und die Angabe von Skraup und Zwirger ist zu streichen.

Die völlige Trennung von Alanin und Glykokoll ist, wie wir fanden, weder durch Umkristallisieren der freien Aminosäuren noch ihrer Kupfersalze durchführbar, wenn jede Methode allein angewendet wird, wie es Skraup und Zwirger getan haben, ist aber, wenn auch etwas mühsam, möglich, wenn beide Verfahren kombiniert werden. Die Trennung der Amidosäuren

¹ Monatshefte, 26, 243 (1905).

wird auch dadurch noch erschwert, wenn man anstatt Wasser verdünnten Weingeist anwendet, da dann auch aus alaninreichen Lösungen das in Alkohol schwerer lösliche Glykokoll mit auskristallisiert, was weniger der Fall ist, wenn beim Umkristallisieren reines Wasser in Anwendung kommt.

Aus den bei fraktionierter Fällung als Mittelfraktion auftretenden Phosphorwolframatn wurde nach dem Zersetzen mit Baryt eine basisch reagierende Substanz isoliert, die mit Pikrinsäure eine reichliche Fällung lieferte. Wir haben einen Teil derselben nach der Kossel'schen Methode untersucht und in erheblichen Mengen Arginin und Lysin gefunden, Histidin aber mit Sicherheit nicht nachweisen können. Der Silberniederschlag, der dieses ausschließlich enthalten soll, war sehr gering und gab mit Mercurisulfat eine eben nur wahrnehmbare Fällung. Da E. Hart (Z. f. phys. Chem., 33, 347 [1901]) angibt, daß im Glutin 0.4% Histidin vorhanden sind, ist es nicht ausgeschlossen, daß das Histidin in andere Fraktionen des Phosphorwolframniederschlags übergeht und daß wir es deshalb nicht aufgefunden haben.

Experimenteller Teil.

1 kg reinste Gelatine (Goldmarke) wurde nach den Angaben von E. Fischer und Abderhalden mit Salzsäure erhitzt, sodann im Vakuum zu Sirup gedampft, dieser in 3 l absolutem Alkohol gelöst und mit Salzsäuregas verestert. Nach dem Einimpfen der erkalteten Flüssigkeit mit salzsaurem Glykokolläthylester kristallisierten 184 g salzsaurer Glykokollester aus. Das Filtrat wieder im Vakuum abdestilliert, in 3 l absolutem Alkohol gelöst und wieder esterifiziert, lieferte bei neuerlichem Impfen nur mehr 10 g. Es wurde nun, so wie der eine von uns beim Casein vorgegangen war, zu wiederholten Malen mit Äther ausgeschüttelt.

Ätherunlöslicher Teil. Er wurde auf 1 l konzentriert. Zur ersten Fällung wurden 1400 g Phosphorwolframsäure verwendet. Die harzige Fällung wiegt trocken 970 g (Niederschlag I). Zum Filtrat kamen wieder 1400 g Phosphorwolframsäure. Der weiße, grobkörnige Niederschlag wog 1340 g (Niederschlag II). Es kamen nun 2050 g Phosphorwolframsäure in der Hitze zu.

Der nach dem Erkalten abfiltrierte Niederschlag III wog 1380 g. Er war deutlich kristallinisch. Das Filtrat schied durch sukzessives Eindampfen zunächst 310 g, dann 500 g Kristalle ab. Die letzte Mutterlauge gab nach weiterem Zusatze von höchst konzentrierter Phosphorwolframsäurelösung nur noch 200 g Kristalle. Die Phosphorwolframsäure des letzten Filtrates wurde, so wie es beim Casein beschrieben wurde, mit Baryt ausgefällt, sodann gelöstes Kupfer, welches von Kupfergefäßen herrührte, mit Schwefelwasserstoff ausgefällt, das Chlorbaryum möglichst abgeschieden und die dicke Mutterlauge sodann mit Schwefelsäure genau ausgefällt. Das Filtrat vom Baryumsulfat bis zum Sirup konzentriert, gab etwa 4 g Kristalle, die zweifellos Glutaminsäure sind. Die von diesen abgesaugte Flüssigkeit betrug nur wenige Kubikzentimeter und wurde nicht weiter untersucht.

Es können also halbwegs erhebliche Mengen der drei Aminosäuren, die beim Casein im Filtrat der salzsauren Glutaminsäure nachgewiesen wurden, aus der Gelatine nicht entstehen.

Phosphorwolframat II.

Es ist in Wasser äußerst schwer löslich. 96prozentiger Alkohol löst aber 90%₀ auf. Aus der heißen alkoholischen Lösung fällt auf Zusatz des gleichen Volums Wasser beim Erkalten der größte Teil wieder aus. Durch derartiges systematisches Umkristallisieren wurden vier Hauptfraktionen erhalten, die dann im Baryt zerlegt wurden. Die aus den zwei leichtest löslichen Fraktionen erhaltenen Substanzen kristallisierten in leucinartigen Kristallen.

Die schwerstlösliche, die 45 g organische Substanz lieferte, gab mit Pikrinsäure eine reichliche Kristallisation, die leichter lösliche (19 g) aber nur eine ölige Abscheidung.

15 g der ersten wurden nach dem modifizierten Kosselschen Verfahren verarbeitet. Es wurden 6 g Lysinpikrat und 2·7 g Arginin (Silberverbindung) erhalten.

0·2907 g Argininsilber im Vakuum getrocknet gaben 0·0779 g Ag.

In 100 Teilen:

	Berechnet	Gefunden
Ag	26·53	26·78

Das Lysinpikrat mehrfach umkristallisiert, verkohlt, ohne zu schmelzen. Es sintert von 220° an und ist bei 250° ganz schwarz. Manchmal tritt ungefähr bei dieser Temperatur Verpuffen ein.

Daß Histidin nicht nachgewiesen werden konnte, wurde in der Einleitung schon erwähnt.

Phosphorwolframat III.

Das Phosphorwolframat III wurde in drei gleichen Teilen verarbeitet. Je 460 g wurden mit 1 $\frac{1}{4}$ l heißem Wasser gekocht, wobei nur etwa 20 g aus allen drei Partien ungelöst blieben, welche auch bei neuerlichem Kochen mit viel Wasser sich fast nicht verminderten. Die Lösung der Hauptmenge schied beim Erkalten lange spitze Kristallnadeln ab. Die Mutterlauge gab eingengt plattenförmige Kristalle. Die Kristallnadeln wurden noch dreimal umkristallisiert, wobei immer wieder nach dem Erkalten Nadeln ausfielen, während die eingengten Mutterlaugen nur Platten gaben. Aus den Mutterlaugen der plattenförmigen Kristalle wurden durch Eindampfen wieder Kristalle erhalten und auch die letzten Mutterlaugen kristallisierten bis auf einen verschwindenden Rest. Die einzelnen Kristallisationen wurden sodann in heißem Wasser gelöst, durch Baryt und Kohlensäure wie üblich zersetzt und das Filtrat, welches die organische Substanz enthielt, zum Sirup eingedampft.

Die schwerstlöslichen Phosphorwolframate gaben, ganz ähnlich wie es beim Casein beobachtet worden ist, nicht kristallisierende Sirupe. Die andern kristallisierten, die mittellöslichen reichlicher als die leicht löslichen, doch blieb in allen Fällen die Hauptmenge sirupös.

Die mittellöslichen Phosphorwolframate enthielten, wie sich später zeigte, ein Gemenge von Alanin und Glykokoll, die leichtlöslichen fast nur Glykokoll.

Je leichter löslich das Phosphorwolframat ist, desto weniger organische Substanz liefert es und auch dieses nur in relativ sehr geringer Menge. Letzteres gilt auch vom Phosphorwolframat IV und V.

Die Schmelzpunkte der rohen Amidosäuren waren ungefähr 234 bis 237° und ändern sich beim Umkristallisieren

nicht. Sie wurden einzeln durch Kochen mit Kupfercarbonat und gefälltem Kupferoxyd in die Kupfersalze verwandelt. Beim Eindampfen scheidet, so wie es der eine von uns in der ersten Abhandlung über die Gelatine beschrieben hat, Glykokollkupfer aus. Dieses wurde durch nochmaliges Umkristallisieren aus heißem Wasser in schön ausgebildeten mikroskopischen Nadeln erhalten, welche, in Wasser aufgeschlemmt, dieses kaum blau färbten. Sie verlieren das Kristallwasser erst bei anhaltendem Trocknen bei 130°.

0·1794 g Trockensubstanz gaben 0·1468 g CO₂, 0·0609 g H₂O und 0·0663 g CuO.

In 100 Teilen:

	Berechnet für $C_4H_8O_4N_2Cu$	Gefunden
C	22·79	22·36
H	3·78	3·77
Cu	30·05	29·8

Die dunkelblauen Mutterlaugen des Glykokollkupfers wurden stark eingedampft. Es scheiden sich Kristalle ab, die Wasser tiefblau färben und viel leichter löslich sind als Glykokollkupfer. Sie wurden in unzureichender Menge Wasser gelöst und nochmals zur Kristallisation gedampft. Die Kristalle, kleine Nadeln, die zu blätterigen Aggregaten vereinigt sind, geben bei der Analyse die für das Kupfersalz der Diaminoglutarsäure berechneten Zahlen.

0·1708 g Trockensubstanz gaben 0·1665 g CO₂, 0·0662 g H₂O, 0·0592 g CuO.

In 100 Teilen:

	Berechnet für $C_5H_8O_4N_2Cu$	Gefunden
C	26·83	26·59
H	3·58	4·3
Cu	28·44	27·69

Durch systematische Wiederholung dieser Trennungsmethode wurden aus dem Phosphorwolframat III 30 g Glykokollkupfer und 20 g leicht lösliches Kupfersalz erhalten.

Die aus dem leicht löslichen Kupfersalz durch SH_2 abgeschiedene Säure kristallisierte aus Wasser zuerst bei 260° , nach dem Umkristallisieren stieg der Schmelzpunkt auf 280 bis 285° und blieb nach abermaligem Umkristallisieren bei 287° konstant. Das Ansteigen des Schmelzpunktes wurde diesmal weit rascher beobachtet als bei der früheren Untersuchung. Es dürfte dies darin liegen, daß diesmal beim Umkristallisieren nur Wasser verwendet wurde, während der eine von uns den durch Eindampfen erhaltenen Kristallbrei mit gleichen Teilen Alkohol vermischte, also aus 50% Alkohol umkristallisieren ließ. Daß dadurch die Abscheidung von Glykokoll befördert wird, hat ein spezieller Versuch ergeben.

Die Kristalle sind schön ausgebildete Prismen, dem Feldspat ähnlich und enthalten kein Kristallwasser.

$0\cdot1218\text{ g}$ Trockensubstanz gaben nach Lippmann und Fleissner $0\cdot1828\text{ g}$ CO_2 und $0\cdot0802\text{ g}$ H_2O .

$0\cdot1300\text{ g}$ Trockensubstanz gaben nach Glaser $0\cdot1930\text{ g}$ CO_2 und $0\cdot0935\text{ g}$ H_2O .

$0\cdot1955\text{ g}$ Trockensubstanz gaben $28\cdot75\text{ cm}^3$ N bei $t = 22^\circ$ und $B = 727\text{ mm}$.

In 100 Teilen:

	Berechnet für $\text{C}_8\text{H}_7\text{O}_2\text{N}$	Gefunden		Alanin
C	40·91	40·93	40·48	40·45
H	6·82	7·33	7·99	7·87
N	15·81	15·85		

$0\cdot501\text{ g}$ Substanz wurden in einem 10 cm^3 -Kölbchen in $22\cdot5\%$ Salzsäure gelöst und im 10 cm -Rohr bei Natriumlicht der Ablenkungswinkel bestimmt.

Er betrug $0\cdot7225^\circ$ nach rechts.

Das spezifische Drehungsvermögen berechnet sich daher:

$$[\alpha]_D = +14\cdot42^\circ.$$

Ein Teil der Säure wurde in das Kupfersalz verwandelt, welches beim Eindampfen sich in Plättchen ausschied. Unter dem Mikroskop sah man schön ausgebildete Prismen. Es kristallisiert ohne Kristallwasser.

0·1974 g Trockensubstanz gaben 0·2184 g CO₂, 0·0852 g H₂O und 0·0659 g CuO.

In 100 Teilen:

	Berechnet für $C_6H_{12}O_4N_2Cu$	Gefunden
C	30·05	30·17
H	5·00	4·82
Cu	26·54	26·63

Benzoylverbindung. Die Benzoylierung erfolgte nach E. Fischer.¹ Nach beendigem Schütteln war eine kristallinische Substanz abgeschieden, deren Schmelzpunkt bei 40° liegt, mit Alkohol den Geruch nach Benzoesäureester annahm und deshalb Benzoesäureanhydrid ist.

Die aus Wasser umkristallisierte Benzoylverbindung des Alanins hatte den konstanten Schmelzpunkt 152 bis 154°. E. Fischer gibt 148° an.

Molekulargewichtsbestimmung in Wasser (Kühlwasser —6°):

			Molekular- gewicht
Wasser 18·726	Substanz 0·2292	Erniedr. 0·267	84
	0·3774	0·703	85
	0·3838	0·155	85

Es liegt also ganz bestimmt rechts Alanin vor.

Aus den Mutterlaugen des Alanins erhielten wir beim Eindampfen Kristalle, die den Schmelzpunkt 235° gaben, der sich auch beim Umkristallisieren nicht änderte. Diese Kristalle wurden neuerdings in die Kupfersalze verwandelt. Es zeigte sich, daß beim Eindampfen etwas Glykokollkupfer auskristallisierte, aus dessen Mutterlaugen nun wieder das leicht lösliche Kupfersalz anschießt, das, durch SH₂ zerlegt, abermals zunächst die Säure vom Schmelzpunkte 287° und dann niedriger schmelzende Fraktionen liefert u. s. f. Durch sehr umständliches Aufarbeiten des leicht löslichen Kupfersalzes wurden weitere 5 g Alanin und etwa dieselbe Menge Glykokoll erhalten.

¹ Ber.

Zu einer Zeit, in der die Natur der vermeintlichen Diaminosäuren noch nicht korrigiert war, haben wir ihnen in anderen Anteilen des Hydrolysisierungsproduktes nachgespürt.

Die Salzsäureverbindung des Glykokollesters, wie sie aus dem Estersirup direkt auskristallisiert war, erwies sich frei von Alanin.

Dafür haben wir kleine Mengen des kristallisierten Phosphorwolframate, welches gleichzeitig Glykokoll und Alanin liefert, aus dem mit Ätheralkohol ausgeschüttelten Anteil isoliert.

Es sei noch zugefügt, daß die von der ersten Arbeit herührenden Präparate, in Form der freien Aminoverbindungen und der Kupfersalze fraktioniert, sich gleichfalls als Gemenge von Alanin und Glykokoll erwiesen haben.
