

### 337. Richard Willstätter und Ernst Waldschmidt-Leitz: Alkalimetrische Bestimmung von Aminosäuren und Peptiden.

[Mitteilung aus dem Chemischen Laboratorium der Bayerischen Akademie  
der Wissenschaften in München.]

(Eingegangen am 1. Oktober 1921).

Bei der Bestimmung der lipatischen Wirkung von Pflanzensamen und von Organpräparaten auf Glyceride kann die Gegenwart von Proteinen, Peptiden und Aminosäuren die Werte fälschen. Um gebildete Fettsäuren zu bestimmen, ist es zweckmäßig, in alkoholischer Lösung zu titrieren. Dabei wird das Carboxyl der stickstoffhaltigen Verbindungen, die in wäßriger Lösung neutral oder wenig sauer reagieren, mitbestimmt. Einer ähnlichen Täuschung muß man vorbeugen, wenn bei enzymatischen Reaktionen Ammoniumacetat oder andere Ammoniumsalze als Puffer angewandt werden.

In Ammoniumsalzen, z. B. Ammoniumoxalat, Ammoniumrhodanid u. a., läßt sich nämlich die Säure alkalimetrisch unter Anwendung z. B. von Phenol-phthalein bestimmen, wenn die wäßrige Lösung des Salzes mit einer genügenden Menge Alkohol vermischt wird. Denn in der alkoholischen Lösung wirkt Ammoniak nicht auf den Indicator.

Die wäßrigen Lösungen der Ammoniumsalze müssen mit soviel Alkohol, daß sie etwa 97-prozentig alkoholisch werden (z. B. für 10 ccm wäßriger Lösung von Ammoniumrhodanid mit 525 ccm absol. Alkohol) und mit viel Indicator, z. B. 1 ccm 1-proz. alkoholischer Phenol-phthalein-Lösung auf 100 ccm Flüssigkeit, versetzt werden. Man titriert mit *n*-KOH bis zur Rosafärbung. Bei Ammoniumoxalat ist es wegen der geringen Löslichkeit in Alkohol nötig, nach jedem Zusatz recht tüchtig durchzuschütteln.

0.2626 g  $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4 + \text{H}_2\text{O}$  erforderten 3.67 ccm *n*-KOH, ber. 3.70. —  
0.2674 g  $(\text{NH}_4)\text{SCN}$  erforderten 3.51 ccm *n*-KOH, ber. 3.51.

Das gleiche Verhalten zeigen die Aminosäuren. Man kann sie ebensogut in alkoholischer Lösung alkalimetrisch bestimmen wie z. B. Stearinsäure.

1. Glykokoll:	0.2555 g	erforderten	3 36 ccm <i>n</i> -KOH,	statt ber.	3.40 ccm
2. Alanin:	0.1939 •	»	2.16 »	»	» » 2.18 »
3. Leucin:	0.1992 »	»	1.53 »	»	» » 1.52 »
4. Methyl-glykokoll:	0.4160 »	»	4.50 »	»	» » 4.62 »
5. Dimethyl-glykokoll:	0.3122 »	»	2.96 »	»	» » 3 03 »
6. Phenyl-alanin:	0.1540 »	»	0.97 »	»	» » 0.93 »
7. Tyrosin:	0.2674 »	»	1.44 »	»	» » 1.47 »
8. Histidin:	0.0926 »	»	0.58 »	»	» » 0.60 »
9. Lysin-Dichlor- hydrat:	0.2327 »	»	2.64 »	»	» » 2.54 »

*Bemerkungen:* Zu 4. Vom Methyl-glycin wurde Sulfat ( $C_2H_7O_2N$ ,  $\frac{1}{2}H_2SO_4 + \frac{1}{2}H_2O$ ) angewandt und in wäßriger Lösung auf neutrale Reaktion titriert: 0.6810 g erforderten 4.57 ccm *n*-KOH, statt 4.62 ccm.

Zu 5. Angewandt waren 0.4903 g vom Salze  $(C_4H_9O_2N)_2Cu + 3H_2O$  nach Zersetzung mit  $H_2S$  und Verjagen desselben.

Zu 7. Wegen der Schwerlöslichkeit in Alkohol übersättigten wir das Tyrosin in der hochprozentig-alkoholischen Lösung mit Alkali und titrierten den Überschuß mit Essigsäure zurück.

Zu 8. Angewandt waren 0.1251 g Histidin-Chlorhydrat nach Titration in wäßriger Lösung auf neutral (verbr. 0.60, ber. 0.60 ccm *n*-KOH).

Zu 9. Lysin wurde als Pikrat angewandt, wovon wir 0.4782 g in verd. Salzsäure lösten, durch quantitatives Ausäthern von Pikrinsäure befreien und durch Abdampfen in reines Dichlorhydrat verwandelt. Bei der Titration in wäßriger Lösung auf neutral wurde 1HCl abgesättigt (verbr. 1.32 ccm *n*-KOH, statt 1.27). Dann erforderte die Titration in Alkohol noch 2 Äquivalente KOH (gef. 2.64 ccm, statt 2.54), davon eines für das zweite Mol HCl.

Ein solches Verhalten hat vor längerer Zeit D. Vorländer<sup>1)</sup> bei Anilidiessig-*o*-carbonsäure, Alkyl-phenyl-glycin-*o*-carbonsäuren und Dimethyl-anthranilsäure beobachtet. Vorländer hat auch einen Versuch mit Glykokoll ausgeführt, das, in 25 ccm Wasser mit 50 ccm Alkohol versetzt und mit Natrium-alkoholat-Lösung titriert, das Äquivalent 86 statt 75 ergab. Wir erzielen brauchbare Werte mit höherer Alkohol-Konzentration.

Von Vorländer wurde die Erscheinung »durch Bildung innerer Addukte erklärt, welche zum Teil den Charakter der quartären Ammoniumsalze haben, und im Gegensatz zu den gewöhnlichen Addukten aus Aminen und Säuren nicht leicht durch wäßrige Alkalilauge zerlegt werden können«. Eine einfachere Erklärung scheint uns den Vorzug zu verdienen. Das Salz  $NH_2 \cdot CH_2 \cdot CO_2K$  ist in wäßriger Lösung eine Base (wie Methylamin), in alkoholischer Lösung aber gibt es gleichwie Ammoniak keine Hydroxyl-Ionen.

Polypeptide lassen sich ebenso unter Zusatz von Alkohol alkalimetrisch bestimmen. Wir verdanken wertvolle Proben von vier Peptiden aus E. Fischers Sammlung Hrn. Dr. Hermann Fischer in Berlin, und wir sind ihm für deren freundliche Überlassung sehr verbunden. Man findet für sie unter diesen Bedingungen die wahren Äquivalentgewichte, ebenso, dies ist zu folgern, für Peptone und Eiweißkörper. Auf diese Anwendung, für die sich ein weites Gebiet eröffnet, werden wir in einer späteren Mitteilung eingehen.

<sup>1)</sup> A. 341, 1 und zwar 76 [1905]; B. 52, 309, 311 [1919].

1. Glycyl-glycin:	0.1135 g	erford.	0.85 ccm	<i>n</i> -KOH,	statt ber.	0.86 ccm
2. Leucyl-glycin:	0.1900 »	»	1.04 »	»	»	1.01 »
3. Glycyl-glycyl-leucin:	0.1580 »	»	0.66 »	»	»	0.64 »
4. Leucyl-glycyl-leucin:	0.1584 »	»	0.54 »	»	»	0.53 »
5. Pepton:	1.0000 »	»	0.76 »	»	; daher Äquivalentgewicht 1320.	

*Bemerkung.* Zu 1: Vom Glycyl-glycin wurde das Chlorhydrat ( $C_4H_8O_5N_2$ ,  $HCl + H_2O$ ) angewandt und in wäßriger Lösung auf neutrale Reaktion titriert: 0.1603 g erforderten 1.18 ccm *n*-KOH (ber. für 1 Mol.  $HCl$  0.86 ccm, 0.32 ccm entfallen auf das Carboxyl).

Bei dieser maßanalytischen Bestimmung von Eiweiß-Abbauprodukten zeigt sich ein charakteristischer Unterschied hinsichtlich der Alkohol Konzentrationen, die zur Ausschaltung der Aminogruppen oder der Hydroxyl-Ionen erforderlich sind. Die Polypeptide verhalten sich schon in 40-proz. Alkohol wie gewöhnliche Carbonsäuren. Für die Peptone und Proteide gilt gleichfalls, daß schon in so verdünntem Alkohol die Endwerte erreicht werden.

#### Alkaliverbrauch in Prozenten der Theorie.

	0	10	20	30	40-proz. Alkohol
Glycyl-glycin . . . . .	37	72	85	95	99
Leucyl-glycin . . . . .	46	65	82	92	103
Glycyl-glycyl-leucin . . . .	55	82	93	100	103
Leucyl glycyl-leucin . . . .	38	51	78	96	103
Pepton . . . . .	60	75	85	94	100

Dagegen erfordern die Aminosäuren der aliphatischen Reihe oder von aliphatischem Charakter sehr hohe Alkohol-Konzentration, etwa 97 %, zur völligen Ausschaltung der Aminogruppe und Absättigung mit Alkalihydroxyd. Man muß daher auch das Wasser der *n*-Lauge berücksichtigen und ersetzt diese zweckmäßig durch eine alkoholische Normallösung.

#### Alkaliverbrauch in Prozenten der Theorie.

	50	60	70	80	90	95	97-proz. Alkohol
Glykokoll . . . . .	28.5	41	52	68	86	94	99
Alanin . . . . .	28	41	51	78	93	98	99
Leucin . . . . .	29	38	52	68	90	99	100
Methyl-glykokoll . . . . .	—	—	—	—	89	98	—
Dimethyl-glykokoll . . . . .	40	57	70	81	93	98	—
Phenyl-alanin . . . . .	63	83	101	103	—	—	—
Tyrosin . . . . .	64	77	91	96	98	—	—
Lysin-Dichlorhydrat . . . .	45	57	69	81	93	101	—
Ammoniumoxalat . . . . .	27	38	50	68	92	97	99
Ammoniumrhodanid . . . . .	36	56	73	85	97	100	—

Die Tabelle zeigt, daß es hinsichtlich der für den Endwert erforderlichen Alkohol-Konzentration Ausnahmen gibt. Das Kaliumsalz des Dimethyl-glykokolls, das allerdings beim proteolytischen Abbau nicht auftritt, verhält sich merkwürdigerweise wie eine schwächere Base als Glykokoll-Kalium. Noch mehr weichen, was zu erwarten war, Phenyl-alanin und Tyrosin ab, die schon in 70–80-proz. Alkohol die Endwerte geben. Amino-benzoesäuren sind schon in wäßriger Lösung titrierbar.

Der Äthylalkohol läßt sich durch Propylalkohol ersetzen, der bei mäßiger Konzentration die Hydroxyl-Ionen-Konzentration stärker herabsetzt, während sie von Methylalkohol in viel geringerem Maße als von Äthylalkohol beeinflußt wird.

#### Alkalimetrische Bestimmung des Alanins.

	50	60	70	80	90	95-proz.
Methylalkohol . . . .	13	31	42	50	61	74
Äthylalkohol . . . .	28	41	51	78	93	98
Propylalkohol . . . .	36	51	61	75	90	96

Einen derartigen Einfluß auf die Säurefunktion des Glykokolls haben W. Löffler und K. Spiro<sup>1)</sup> vor kurzem beim Glycerin beobachtet. Die Mischung von Glykokoll und Glycerin zeigte eine andere Wasserstoff-Ionen-Konzentration als die wäßrige Lösung der Aminosäure. »Es lag nahe zu versuchen, ob man auf diesem Wege zu einer quantitativen Titration des Glykokolls käme. Das gelingt aber nicht, auch wenn man große Quantitäten Glycerin anwendet.«

Auf das verschiedene Verhalten der Aminosäuren und Polypeptide läßt sich eine einfache Methode gründen, um in Gemischen dieser beiden Gruppen von Verbindungen den Anteil an Aminosäuren und an Polypeptiden alkalimetrisch zu bestimmen, indem man die zur Neutralisation auf Phenol-phthalein in 50-proz. (a) und in 97-proz. (b) alkoholischer Lösung erforderliche Alkalimenge ermittelt. Der Alkalianteil (x) für Aminosäuren ist dann, da die Mehrzahl derselben, und zwar die in den Mischungen im allgemeinen überwiegenden, in 50-proz. alkoholischer Lösung 28 % der zu ihrer völligen Absättigung erforderlichen Alkalimenge verbrauchen,  $x = \frac{100 \cdot (b - a)}{72}$ , und der Alkalianteil für Polypeptide =  $b - x$ .

Da wir nicht von Versuchen über Proteolyse zu berichten haben, sollen vorläufig nur wenige Beispiele den Sinn der Methode erläutern.

<sup>1)</sup> Helvet. chim. acta 2, 533 und zwar 540 [1919].

**Beispiele.** 1. Ein käufliches Pepsin-Präparat (10 ccm 10-proz. Pepsin-Lösung E. Merck 1:100) wurde geprüft, indem wir es auf 0.5 g Globulin aus Ricinussamen unter Zusatz von 0.5 ccm *n*-Salzsäure und 12 ccm Wasser 2 Stdn. bei 30° unter Umschütteln einwirken ließen.

Die Methode hat den Nachteil, daß sie viel Alkohol erfordert. Deshalb begnügen wir uns öfters mit der Konzentration von 90 %.

	zu Beginn	nach 2 Stdn.	Differenz
in 50-proz. Alkohol . .	0.13	0.39	0.26 ccm
in 90-proz. Alkohol . .	0.19	0.45	0.26 »

Bei der Pepsin-Wirkung ergab sich kein Unterschied im Aciditätszuwachs in 50- und 90-proz. Alkohol, also nur Peptid-Bildung.

2. Ein Pankreatin-Präparat (10 ccm 5-proz. Lösung) wurde geprüft durch 2-stündige Einwirkung bei 30° auf 0.5 g Globulin unter Zusatz von 10 ccm Pufferlösung von pH 7.7 (5 ccm  $\frac{1}{2}$ -K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 ccm *n*-KOH und 4 ccm H<sub>2</sub>O).

	zu Beginn	nach 2 Stdn.	Differenz
in 50-proz. Alkohol . .	0.37	1.30	0.93 ccm
in 90-proz. Alkohol . .	1.18	2.44	1.26 »

Bei der Trypsin-Wirkung entfielen vom Zuwachs der Acidität 0.46 ccm auf Aminosäuren, 0.80 ccm auf Polypeptide.

3. Vergleich der Formol-Titration (a) und der Titration in alkoholischer Lösung (b).

Angewandt 10 ccm 20-proz. Pepton-Lösung, 5 ccm 5-proz. Lösung von käuflichem Pankreatin, 5 ccm 10-proz. Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Einwirkung während 1 Stde. bei 30°.

a) Zur Bestimmung mit 30 ccm 37-proz. Formaldehyd versetzt. Zu Beginn 3.85, am Ende 5.26 ccm *n*-KOH. Also Zuwachs an Acidität entsprechend 1.41 ccm KOH.

b)	zu Beginn	am Ende	Differenz
in 50-proz. Alkohol . .	2.60	3.41	0.81 ccm <i>n</i> -KOH
in 95-proz. Alkohol . .	3.66	5.12	1.46 » »

Vom Zuwachs an Acidität entfielen 0.90 ccm auf Aminosäuren, 0.56 ccm auf Peptide.

Für die Bestimmung der Aminosäuren und Polypeptide reiht sich das einfache alkalimetrische Verfahren an die wichtige Formol-Methode von S. P. L. Sørensen<sup>1)</sup> an, die bei der Untersuchung des Eiweiß-Abbaus große Dienste geleistet hat, und an das sie ergänzende schöne Verfahren von D. D. van Slyke<sup>2)</sup> zur Bestimmung des Amino-Stickstoffs mit salpetriger Säure. Die Formol-Titration erlaubt mit

<sup>1)</sup> Bio. Z. 7, 43 [1907]; 25, 1 [1910]. — V. Henriques und S. P. L. Sørensen, H. 64, 120 [1910]. — H. Jessen-Hansen, Abderhaldens Handb. d. biochem. Arbeitsmeth. 6, 262 [1911].

<sup>2)</sup> B. 48, 8170 [1910]. — Abderhaldens Handb. d. biochem. Arbeitsmeth. 5, 995 [1911]; 6, 278 [1912].

gewissen Ausnahmen die Carboxyle der Peptide und Aminosäuren im ganzen zu bestimmen. Zwischen den beiden Körpergruppen zu differenzieren, versucht die stufenweise Formol-Titration nach V. Henriques und S. P. L. Sørensen<sup>1)</sup>, allein so bemerkenswert ihre Anwendungen für den Vergleich des peptischen und tryptischen Abbaus sind, ist sie doch ihrem Wesen nach verwickelt und liefert nicht mehr als Schätzungen.

Die Unterscheidung des Amino-Stickstoffs vom Gesamt-Stickstoff der proteolytischen Produkte nach van Slyke macht es nicht überflüssig, durch die alkalimetrische Bestimmung bei der Proteolyse zwischen den Anteilen der Aminosäuren und der Peptide an der Acidität zu unterscheiden.

### 838. K. v. Auwers und H. Westermann: Zur Spektrochemie der aliphatischen Diene mit konjugierten Doppelbindungen.

(Eingegangen am 4. Oktober 1921.)

Bei vergleichenden spektrochemischen Untersuchungen wurde wiederholt als Übelstand empfunden, daß die optischen Konstanten der einfachen aliphatischen Diene mit ungestörter, einfach oder zweifach gestörter Konjugation bis jetzt nicht in der wünschenswerten Vollständigkeit und mit der erforderlichen Genauigkeit bestimmt waren, so daß über die Normalwerte für die spezifischen Exaltationen dieser Körpergruppen noch eine gewisse Unsicherheit bestand<sup>2)</sup>. Allerdings ist von Grignard<sup>3)</sup> und seinen Schülern Reif<sup>4)</sup>, Abelmann<sup>5)</sup> und Bjelouss<sup>6)</sup> eine größere Zahl solcher Kohlenwasserstoffe dargestellt worden, doch beschränkten sich diese Forscher bei der optischen Untersuchung auf die Bestimmung von  $M_D$ . Ähnlich verfahren zum Teil andere Chemiker; nur für wenige Diene liegen vollständige Beobachtungsreihen über ihre Refraktion und Dispersion vor. Daß überdies die Angaben der verschiedenen Autoren über Dichte und Brechungsindices dieser Körper zum Teil beträchtlich von einander abweichen, ist leicht begreiflich, da die einfachsten Diene wegen ihrer leichten Veränderlichkeit schwer völlig rein zu erhalten sind.

<sup>1)</sup> H. 63, 27 [1909]. — V. Henriques und G. K. Gjaldbaek, H. 71, 485 [1911]; 75, 363 [1911].

<sup>2)</sup> Vergl. z. B. A. 413, 124 [1918].    <sup>3)</sup> Thèse, Lyon 1901.

<sup>4)</sup> B. 41, 2 39 [1908].    <sup>5)</sup> B. 43, 1574 [1910].

<sup>6)</sup> B. 43, 2330 [1910]; 45, 625 [1912].