

## Ueber das Fibroin der Seide.

Von

Emil Fischer und Aladar Skita.

(Aus dem I. chemischen Institut der Universität Berlin.)

(Der Redaction zugegangen am 5. Juli 1901.)

Die Seide lässt sich bekanntlich durch Behandeln mit Seife, Alkali und selbst durch heisses Wasser in 2 Bestandtheile scheiden, welche die Namen Fibroin und Sericin<sup>1)</sup> (Seidenleim) führen. Das Erstere ist unlöslich und überwiegt an Menge; es ist daher am häufigsten Gegenstand der Untersuchung gewesen.<sup>2)</sup>

Um Aufschluss über seine Constitution zu erlangen, hat man, wie allgemein bei Proteinstoffen, die Hydrolyse durch Säuren benützt.

Hierbei beobachteten Hinterberger und Waltenberger<sup>3) 4)</sup> das Tyrosin und wollten auch das Leucin gefunden haben; zu denselben Resultaten gelangten auch Staedeler<sup>5)</sup> und Cramer.<sup>6)</sup> Letzterer fand ausserdem noch Glycocoll. An Stelle von Säuren hat Schützenberger<sup>7)</sup> Barytwasser — bei höherer Temperatur unter Druck — für

1) Der Name Fibroin wurde von Mulder, Pogg. Ann., Bd. 37, S. 611 (1836), der Name Sericin von Cramer, Journ. prakt. Chem., Bd. 96, S. 76 (1865) in die Litteratur eingeführt.

2) Die ältere Litteratur ist in der Abhandlung von Cramer, Journ. prakt. Chem., Bd. 96, S. 76 (1865) aufgeführt.

3) Jahresber. f. Chem., 1853, S. 615.

4) Wien. Akad. Ber., Bd. XI, S. 450.

5) Ann., Bd. 111, S. 12 (1859).

6) Journ. prakt. Chem., Bd. 96, S. 76 (1865).

7) C. R., Bd. 81, S. 1191 (1875).

die Hydrolyse der Proteinstoffe verwendet. Bei der Uebertragung dieses Verfahrens auf das Seidenfibroin, das er in Gemeinschaft mit Burgeois bearbeitete, fand er neben Ammoniak, Oxalsäure, Kohlensäure und Essigsäure ein Gemisch von Aminosäuren, das folgende Zusammensetzung haben soll:

Tyrosin . . . . .	10 %
Gemisch äquivalenter Theile von Glycocoll und Alanin . . . . .	60 %
Aminobuttersäure . . . . .	10 %
Ungesättigte Säure $C_4H_7NO_2$ . . . . .	20 %

In dieser kurzen Abhandlung ist die ältere Litteratur nicht erwähnt und ebenso fehlen Belege für die Resultate gänzlich. Da ausserdem das von Schützenberger angewandte Verfahren nicht einwandfrei ist, da Baryt bei hoher Temperatur secundäre Zersetzungen bewirken kann, so sind seine Angaben über das Vorhandensein von Aminobuttersäure und Alanin ebenso zweifelhaft, wie die früheren über die Entstehung von Leucin; was die ungesättigte Aminosäure betrifft, so steht ihre Existenz völlig in der Luft.

Ungleich zuverlässiger sind die Arbeiten von Weyl,<sup>1)</sup> der die Hydrolyse wieder mit Säuren bewerkstelligte und zuerst unter den Spaltungsprodukten neben Tyrosin und Glycocoll eine Aminopropionsäure, wahrscheinlich  $\alpha$ -Alanin, mit Sicherheit nachwies, indem er sie in reinem Zustande isolirte. Leucin konnte er nicht finden.

Zuletzt hat sich Wetzel<sup>2)</sup> mit demselben Gegenstande beschäftigt, aber unter den Hydrolysirungsprodukten nur die Diaminosäuren gesucht. Leider sind seine Angaben über das Vorkommen von Histidin recht lückenhaft und um so weniger brauchbar, als es zweifelhaft ist, ob das von ihm dargestellte Fibroin rein war.

Wie aus obiger Zusammenstellung hervorgeht, sind bisher als Spaltungsprodukte des Seidenfibroins nur Tyrosin, eine Aminopropionsäure und Glycocoll erkannt. Bei den beiden ersten ist es zudem noch unbestimmt, ob sie als active oder

1) Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. 21, S. 1529 und 1407 (1888).

2) Physiol. Chem., Bd. XXVI, S. 535 (1899).

racemische Form auftreten. Der Wunsch, diese Lücke auszufüllen, war für uns die erste Veranlassung, das Studium des Fibroins wieder aufzunehmen.

Es gelang uns auch mit leichter Mühe der Nachweis, dass das Tyrosin der Seide mit dem l-Tyrosin des Caseins und anderer Proteide identisch ist.

Ebenso wurde die Aminopropionsäure als optisch activ erkannt. Sie ist mit dem d-Alanin, das vor einiger Zeit aus der racemischen Verbindung dargestellt wurde,<sup>1)</sup> identisch.

Andererseits kamen wir bald zu der Ueberzeugung, dass es mit den alten Methoden nicht möglich ist, alle hier vorhandenen Aminosäuren zu isoliren.

Wir haben deshalb auf das Fibroin das neue Verfahren, die Aminosäuren mit Hülfe ihrer Ester zu trennen, angewandt. Dabei ergab sich, dass die Zusammensetzung des Fibroins complicirter ist, als man bisher annahm. Ausser l-Tyrosin, d-Alanin und Glycocoll haben wir l-Phenylalanin und l-Leucin mit Sicherheit nachweisen können, sowie die Anwesenheit von mehreren anderen Aminosäuren sehr wahrscheinlich gemacht.

#### Darstellung des Fibroins.

Für die Darstellung des Fibroins haben wir das von Cramer<sup>2)</sup> zuerst angegebene Verfahren, Einwirkung von Wasser bei höherer Temperatur unter Druck, am geeignetsten gefunden.

Bei richtiger Anwendung desselben wird der Seidenleim vollständig gelöst, während sämtliches Fibroin unverändert bleibt.

Bei der Behandlung mit Alkali oder Säuren ist das aber nicht der Fall, weil diese auch auf das Fibroin lösend einwirken. Ja selbst mit Wasser muss man vorsichtig sein, weil die geringsten Mengen Alkali das Resultat stören. So erreicht man bei Anwendung von Glasgefäßen niemals constante Resultate, wie folgender Versuch zeigt: 10 g technisch degom-

1) E. Fischer, Bd. 32, S. 2451 (1899).

2) Journ. f. prakt. Chem., Bd. 96, S. 76 (1865).

mirtter Seide verloren beim Kochen mit 5 Liter Wasser im Glaskolben mit Rückflusskühler in den ersten 48 Stunden 22%, in den folgenden 48 Stunden an eine neue Menge Wasser 17%, dann 16% u. s. w., so dass nach 300stündigem Kochen 70% der Seide in Lösung gegangen waren. Der Rückstand hatte Glanz und Festigkeit verloren und glich Stücken zer-kochten Filterpapieres.

Diese Gefahr wird aber vermieden bei Anwendung von Porzellan- oder verzinn-ten Kupfergefäßen. Zur Darstellung des Fibroins haben wir deshalb die Seide in einem 5 Liter fassenden Porzellantopf von der Form eines Becherglases in einem Autoclaven mit der 25fachen Menge Wasser 3 Stunden auf 117—120° erhitzt. Diese Operation wurde 1—2 Mal wiederholt, bis keine Gewichtsabnahme mehr stattfand. Am bequemsten ist die Anwendung der technisch degommirten Seide, bei der ein zweimaliges Kochen mit Wasser vollauf genügt. Bei einer quantitativen Probe stellten wir fest, dass hier 5,4% der trockenen Seide von dem Wasser gelöst wurde. Ein Versuch mit 162 g gelber, lombardischer Rohseide, deren Trockengewicht bei 120° festgestellt war, ergab, dass nach dreimaligem Auskochen aller Seidenleim entfernt war. Die Menge des rückständigen Fibroins betrug 111 g, entsprach also 68,5%<sup>1)</sup> der angewandten Rohseide.

Dieses, aus gelber Rohseide dargestellte Fibroin hat im Vergleiche zu dem aus technisch degommirter Seide hergestellten noch einen schwachen Stich ins Gelbliche. Beide Sorten besitzen noch die Festigkeit des Seidenfadens, aber nicht mehr den vollen Glanz und die Weichheit der Seide; auch ist die Hygroskopicität vermindert. Wesentlich andere Eigenschaften hat das Fibroin, das nach dem Verfahren von Staedeler<sup>2)</sup> mit Natronlauge gewonnen wird. Es bildet eine

1) Diese Angabe nähert sich der von Cramer (66%), Journ. f. prakt. Chem., Bd. 96, S. 76 (1865); die Angaben von Mulder (53%), Pogg. Ann., Bd. 37, S. 611 und Berz. Jahresh., Bd. 17, S. 380, und Staedeler (42—50%), Ann., Bd. 111, S. 12 (1859), beruhen auf der unvollkommenen Gewinnungsweise des Fibroins.

2) Ann., Bd. 111, S. 12.

brüchige und zerreibliche Masse, wie schon Staedeler<sup>1)</sup> und Weyl<sup>2)</sup> angeben. Dies rührt von einer theilweisen chemischen Veränderung des Fibroins selbst her, das gegen Alkalien nichts weniger als beständig ist.

Das zu den nachfolgenden Versuchen verwandte Fibroin ist ausschliesslich aus lombardischer Seide und zwar meist aus der technisch degommirten Sorte dargestellt worden.

#### Hydrolyse des Fibroins durch Schwefelsäure.

Handelt es sich um die Gewinnung von Tyrosin, so folgt man am besten den älteren Vorschriften<sup>3)</sup> für die Spaltung des Fibroins mit verdünnter Schwefelsäure. Wir haben dementsprechend bei einem Versuch 250 g reines Fibroin mit einem Gemisch von 500 ccm. concentrirter Schwefelsäure und 2500 ccm. Wasser 18 Stunden gekocht. Die braungelb gefärbte Flüssigkeit zeigte keine Biuretreaction mehr. Die ausgeschiedene dunkle, zu Klümpchen geballte Masse, welche grösstentheils aus fettsäure-ähnlichen Stoffen bestand, wurde nach dem Erkalten abfiltrirt; ihre Menge betrug 2,5 g, also 1% des angewandten Fibroins. Nun wurde das Filtrat in der Wärme mit ungefähr 2 kg Barythydrat, das in möglichst wenig heissem Wasser gelöst war, neutralisirt, das überschüssige Baryt mit Kohlensäure gefällt und die neutrale Flüssigkeit heiss auf einer grossen Nutsche abgesogen.

Um das schwerlösliche Tyrosin ganz zu gewinnen, ist es rathsam, den Barytniederschlag mit Wasser nochmals auszukochen. Das Filtrat wird verdampft, bis schon in der Wärme eine reichliche Krystallisation eintritt. Nach dem Erkalten wird filtrirt und die Krystallmasse, welche 40—50 g beträgt, mit wenig heissem Wasser ausgekocht, um das beigemengte Alanin zu entfernen. Den Rückstand löst man dann in ungefähr 3,5 Liter siedendem Wasser, kocht mit Thierkohle und lässt das klare Filtrat krystallisiren. Die Ausbeute an reinem Tyrosin betrug 25 g, mithin 10% der angewandten Fibroin-

1) Ann., Bd. 111, S. 12.

2) Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. 21, S. 1529 (1888).

3) Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. 21, S. 1529 (1888).

menge, während Weyl nur 5,2% angibt.<sup>1)</sup> Die Angaben Schützenberger's gestatten keinen Vergleich, da sie sich bloss auf das Verhältniss des Tyrosins zu der Menge der isolirten Aminosäuren beziehen. Für die optische Untersuchung diente die Lösung des Tyrosins in 21%iger Salzsäure. Eine Lösung von 4,2% und dem specifischen Gewicht 1,118 drehte bei 20° im 2 dm.-Rohre 0,77 nach links. Mithin ist:

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = - 8,20.$$

Das Tyrosin ist demnach identisch mit der activen Form, die man bisher aus den andern Proteinstoffen gewonnen hat.

Aus den Mutterlaugen des Tyrosins wurden durch wiederholtes Eindampfen und systematisches Umkrystallisiren Alanin und Glycocoll in reinem Zustand isolirt.

Die Analyse des Alanins gab folgendes Resultat:

0.1894 g Substanz: 0.2809 g CO<sub>2</sub>, 0.1348 g H<sub>2</sub>O.

Berechnet für C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub>:

40,45 % C

7,86 % H

Gefunden:

40,45 % C

7,91 % H.

Das Produkt wurde von Weyl, der sich mit der Prüfung der freien Aminosäure begnügte, für optisch inactiv gehalten. In Wirklichkeit ist es aber activ, wie uns die Untersuchung des Hydrochlorats zeigte. Seine wässerige Lösung von 8,58% und dem specifischen Gewichte 1,02 drehte bei 20° das Natriumlicht im 1 dm.-Rohre 0,82° nach rechts. Daher war

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = + 9,37.$$

Dieser Werth ist fast der gleiche wie der für reines, salzsaures d-Alanin früher<sup>2)</sup> gefundene.

Wie schon erwähnt, haben die Schwierigkeiten, auf

1) Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. 21, S. 1529. Bei der Zahl ist übrigens ein Rechen- oder Druckfehler untergelaufen. Berechnet man sie nach den anderen Angaben über die Ausbeute von Glycocoll und Alanin, so resultirt 7,5%.

2) E. Fischer, Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. 32, S. 2451 (1899). Das synthetische Alanin drehte + 9,55.

welche wir bei der Trennung der Aminosäuren durch Krystallisation stiessen, uns veranlasst, für diesen Zweck die fractionirte Destillation ihrer Ester zu benützen.

### **Hydrolyse des Fibroins durch Salzsäure und Trennung der Aminosäuren durch ihre Ester.**

**Glycocoll.** Will man auf die Isolirung des Tyrosins verzichten, so ist es am besten, die Spaltung des Fibroins mit Salzsäure durchzuführen und nach dem Verdampfen der wässerigen Säure den Rückstand sofort zu verestern.

250 g Fibroin werden mit 1 Liter Salzsäure vom specifischen Gewicht 1,19 übergossen. Nach kurzem Schütteln entsteht eine braungelbe Lösung, die am Rückflusskühler 5 Stunden gekocht wird. Auf der dunkelbraunen Flüssigkeit schwimmt dann eine kleine Menge Fettsäure, die nach dem Erkalten abfiltrirt wird. Die Mutterlauge wird am besten unter stark vermindertem Druck bis zum dicken Sirup eingedampft. Diesen übergiesst man sofort mit 1½ Liter absolutem Alkohol und leitet einen lebhaften Strom gasförmiger Salzsäure bis zur Sättigung ein, ohne die Lösung zu kühlen. Man kocht schliesslich noch 1 Stunde auf dem Wasserbade, wobei ein Theil der Salzsäure entweicht. Das Gemisch der salzsauren Salze geht meistens schon beim Einleiten der Salzsäure in Lösung, jedenfalls aber erfolgt diese vollständig beim Erwärmen auf dem Wasserbade, das den Zweck hat, die Veresterung völlig zu Ende zu führen. Nach dem Abkühlen bringt man die alkoholische Lösung in eine Kältemischung, impft mit einem Krystall von salzsaurem Glycocollester und lässt 48 Stunden im Eisschrank stehen. Dann hat sich in der Regel der allergrösste Theil des salzsauren Glycocollesters als Krystallbrei abgeschieden. Er wird über Glaswolle abgesogen, mit wenig kaltem, absoluten Alkohol und Aether gewaschen und schliesslich im Vacuum über Natronkalk getrocknet. Das so erhaltene Präparat ist nur wenig mehr gefärbt.

Da bei der Veresterung ziemlich viel Wasser entsteht, welches der Reaction entgegenwirkt, so ist es vortheilhaft, die alkoholische Mutterlauge unter stark vermindertem Druck ein-

zudampfen, den Rückstand wieder in 1 Liter absolutem Alkohol zu lösen und neuerdings mit gasförmiger Salzsäure in der zuvor beschriebenen Weise zu behandeln. Bleibt die Flüssigkeit jetzt bei niedrigerer Temperatur 12 Stunden stehen, so pflegt, namentlich beim Einimpfen eines Krystalles, noch eine neue, aber meist geringe Krystallisation von salzsaurem Glycocoll stattzufinden. Die Gesamtmenge desselben betrug im Durchschnitt 67<sup>o</sup>/<sub>o</sub> des Fibroins. Dies ergibt für freies Glycocoll 36<sup>o</sup>/<sub>o</sub>, während Weyl<sup>1)</sup> durch Krystallisation nur 7,5<sup>o</sup>/<sub>o</sub> isoliren konnte. Einmaliges Umkrystallisiren des Hydrochlorates aus der 7fachen Menge heissem absoluten Alkohol genügt, um ein ganz reines Präparat vom Schmelzpunkt 144<sup>o</sup> zu erhalten. Wir haben uns noch überzeugt, dass der aus dem Hydrochlorat isolirte freie Ester bei 8 mm. Druck constant bei 45<sup>o</sup> destillirte und mithin frei von Homologen war.

Die salzsaure, alkoholische Mutterlauge, welche die Ester der übrigen Aminosäuren enthielt, wird geradeso verarbeitet, wie es in der vorhergehenden Arbeit über das Casein beschrieben ist: schliesslich wurde das von Aether befreite und mit Natriumsulfat getrocknete Gemisch der Ester bei 8 mm. Druck fractionirt. Nach 2—3maliger Wiederholung der Destillation unter den gleichen Bedingungen wurden folgende Fractionen erhalten:

1. Fraction	43—53 <sup>o</sup>	. . . . .	70 g
2.	53—75 <sup>o</sup>	. . . . .	13 »
3.	75—90 <sup>o</sup>	. . . . .	6 »
4.	90—140 <sup>o</sup>	. . . . .	3 »
5.	140—160 <sup>o</sup>	. . . . .	3 »
6.	über 160 <sup>o</sup>	. . . . .	0.5 »
			95.5 g

Die erste Fraction (43—53<sup>o</sup>) enthielt neben wenig Alkohol fast ausschliesslich Alaninester, denn das Glycocoll ist durch die vorhergehende Behandlung so gut wie vollständig entfernt.

d-Alanin. Zur Gewinnung des reinen Alanins wird der Ester — am besten sofort — mit der 10fachen Menge Wasser

<sup>1)</sup> Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. 21, S. 1529 (1888).

4—5 Stunden am Rückflusskühler gekocht, bis die alkalische Reaction verschwunden ist, worauf die Lösung eingedampft wird. Die Ausbeute an Alanin betrug 19% des angewandten Fibroins. Zur vollständigen Reinigung löst man das Präparat in der 6fachen Menge Wasser, entfärbt, wenn nöthig, durch Kochen mit Thierkohle und versetzt die heisse Flüssigkeit mit dem gleichen Volumen Alkohol. Beim Erkalten scheidet sich das reine d-Alanin in langen, farblosen Nadeln ab, welche unter Zersetzung bei 297° schmelzen.

0.1963 g gaben 0.2910 g CO<sub>2</sub> und 0.1403 g H<sub>2</sub>O.

Berechnet für C <sub>2</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub> :	Gefunden:
40.45 % C.	40.44 % C.
7.86 % H	7.95 % H.

Das über Phosphorpentoxyd im Vacuum getrocknete Chlorhydrat lieferte die nachstehende optische Bestimmung: 0.6712 g Substanz drehte in wässriger 9.07%iger Lösung vom specifischen Gewicht 1.015 das Natriumlicht im 1 dm.-Rohre 0.85° nach rechts.

Demnach ist

$$[\alpha]_D^{20} = + 9.23.$$

Da aus der nachfolgenden Fraction der Ester noch 2% Alanin gewonnen werden konnten, so betrug seine Gesamtmenge 21% des Fibroins, während Weyl<sup>1)</sup> nur 15% isoliren konnte.

Man sieht, wie auch hier die Estermethode dem alten Verfahren überlegen ist. Da das d-Alanin bisher nur auf mühsamem Wege durch Spaltung des Racemkörpers gewonnen werden konnte, so ist die eben beschriebene Darstellung aus Seide — trotz des hohen Preises der Letzteren — bequemer und billiger. Man wird aber dann auf die Isolirung des Fibroins verzichten und die käufliche, degommirte Seide, in welcher wir, wie erwähnt, bloss 5% Seidenleim fanden, direkt verwenden.

Die zweite Fraction (53—75%) enthält ebenfalls noch eine beträchtliche Menge Alanin und ausserdem homologe Aminosäuren, von denen aber keine isolirt werden konnte.

<sup>1)</sup> Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. 21, S. 1529 (1888).

Die Ester wurden ebenfalls mit der 10-fachen Menge Wasser verseift, und die freien Aminosäuren aus der eingengten, wässerigen Lösung mit Alkohol gefällt. Durch wiederholte Krystallisation gelang es, 5 g reines Alanin zu gewinnen.

0.1270 g Substanz gaben 0,1886 g  $\text{CO}_2$  und 0,0909 g  $\text{H}_2\text{O}$ .

Berechnet für $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2$ :	Gefunden:
40.45 % C	40.50 % C
7.86 % H	7.93 % H.

Die isolirten 5 g entsprechen 2% des angewandten Fibroins. Ein Versuch, die kohlenstoffreicheren Aminosäuren dieser Fraction mit Hülfe ihrer Kupfersalze abzutrennen, misslang.

Die dritte Fraction (75—90°) enthält neben anderen Produkten eine relativ erhebliche Menge des Esters des gewöhnlichen Leucins.

1-Leucin. Nachdem die Aminosäuren durch Kochen mit Wasser aus den Estern regenerirt waren, diente für die Isolirung des Leucins das schwer lösliche Kupfersalz. Für seine Bereitung wurden 4 g der rohen Aminosäuren in 400 ccm. Wasser gelöst, 1½ Stunden mit überschüssigem, gefällten Kupferoxyd gekocht, das Filtrat verdampft und der Rückstand mit 100 ccm. Wasser ausgekocht. Es verblieb ein Rest von 1,4 g schwer löslichem Kupfersalz, das hauptsächlich aus der Leucinverbindung bestand. Ein Theil derselben wurde aus siedendem Wasser umkrystallisirt und zeigte nach dem Trocknen bei 108° die Zusammensetzung des Leucinkupfers:

0.1872 g Substanz lieferten 0,0460 g  $\text{CuO}$ .

Berechnet für $\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_4\text{Cu}$ :	Gefunden:
19.60 % Cu	19.62 % Cu.

Ein anderer Theil des Kupfersalzes wurde mit Schwefelwasserstoff zerlegt und die Aminosäure zweimal aus der heissen, wässerigen Lösung mit Alkohol gefällt. Die so erhaltenen glänzenden Blättchen zeigten die Zusammensetzung des Leucins.

0.0849 g Substanz ergaben 0,1708 g  $\text{CO}_2$  und 0,0765 g  $\text{H}_2\text{O}$ ;

0.2222 g Substanz lieferten bei 19° und 768 mm. 20 ccm. N.

Berechnet für $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{O}_2\text{N}$ :	Gefunden:
54.96 % C	54.87 % C
9.92 % H	10.01 % H
10.68 % N	10.52 % N.

Das Produkt drehte in 20%iger salzsaurer Lösung nach rechts, wie es für das bisher in den Proteinstoffen gefundene l-Leucin bekannt ist. Aus der Stärke der Drehung ergab sich, dass der activen Aminosäure der Racemkörper beigemischt ist, dessen Menge in verschiedenen Krystallisationen variierte. Da durch diese Complication die Identificirung des Leucins durch den Schmelzpunkt seiner Derivate ausserordentlich erschwert wurde, so haben wir die gesammten aus dieser Fraction erhaltenen Aminosäuren durch 30stündiges Erhitzen mit überschüssigem Barytwasser auf 170—180° völlig racemisirt.

Dann wurde das Leucin mit Hülfe seines Kupfersalzes abgeschieden, durch Schwefelwasserstoff regenerirt und in der bekannten Weise die Phenylisocyanat-Verbindung sowie deren Anhydrid dargestellt. Das erste Präparat zeigte den Schmelzpunkt 165° (corr.), welcher auch früher für die Phenylecyanat-Leucinverbindung gefunden wurde.<sup>1)</sup> Für das zugehörige Hydantoin wurde der Schmelzpunkt 125° (corr.) beobachtet. Da Mouneyrat, welcher diese Verbindung zuerst darstellte,<sup>2)</sup> den Schmelzpunkt nicht erwähnt, so haben wir denselben für das synthetische Produkt nachträglich festgestellt und ebenfalls 125° gefunden. Die Analyse des Hydantoins gab folgende Zahlen:

0,1003 g Substanz lieferten 0,2465 g CO<sub>2</sub> und 0,0611 g H<sub>2</sub>O.

Berechnet für C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub> N <sub>2</sub> :	Gefunden:
67,24 % C	66,94 % C
6,89 % H	6,77 % H

Nach alledem kann kein Zweifel sein, dass der aus dem Seidenfibroin erhaltene Körper identisch ist mit dem gewöhnlichen l-Leucin ( $\alpha$ -Aminoisobutyl-Essigsäure). Seine Menge ist aber recht gering; wir schätzen sie auf 1—1½% des Fibroins.

Eine so kleine Quantität des Leucins nach der alten Methode in dem Gemisch der Aminosäuren, welche aus dem Fibroin entstehen, zu erkennen, können wir ohne Bedenken für unmöglich erklären. Was Hinterberger und Waltenberger, die nicht einmal das Glycocoll gefunden haben, für

1) E. Fischer, Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. 33, S. 2381 (1900).

2) Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. 33, S. 2395.

Leucin erklären, ist nichts anderes als das rohe Gemisch der Aminosäuren gewesen.

Neben dem Leucin sind in derselben Fraction noch leichter lösliche Aminosäuren, unter denen sich wahrscheinlich eine Aminovaleriansäure befindet. Dagegen haben wir für das Vorkommen von Aminobuttersäure, welche Schützenberger unter den Spaltungsprodukten des Fibroins gefunden haben will, keine Andeutung bemerkt, und wir halten es für gänzlich ausgeschlossen, dass Schützenberger bei seiner Arbeitsmethode diese Verbindung in reinem Zustand gewinnen konnte.

Die vierte und fünfte Fraction (90–140° und 140 bis 160°) sind zum Theil in Wasser löslich, enthalten jedoch ausserdem den wasserunlöslichen Ester des Phenylalanins.

l-Phenylalanin. Da seine Menge gering ist, wurden beide Fractionen in folgender Weise darauf verarbeitet.

Um den wasserunlöslichen Theil abzuscheiden, fügt man zu den Estern die 10fache Menge kaltes Wasser und filtrirt nach tüchtigem Schütteln von dem unlöslichen Oel durch ein gehärtetes, befeuchtetes Filter. Es wird nochmals mit einer kleinen Menge Wasser gewaschen und auf dieselbe Art getrennt. Zum Schluss wurde das Oel zur Verseifung mit überschüssigem 10%igen Barytwasser unter häufigem Umschütteln mehrere Stunden auf dem Wasserbade erhitzt, von dem unveränderten Oel, das aus anderen Produkten besteht, filtrirt, der Baryt mit Kohlensäure gefällt und das wässrige Filtrat verdampft.

Das so erhaltene Produkt, dessen Menge 0,6 g betrug, war Phenylalanin, aber noch keineswegs rein. Es gab beim Kochen mit Kaliumbichromat und Schwefelsäure den charakteristischen Geruch des Phenylacetaldehyds und lieferte mit Kupferacetat ein in Wasser schwer lösliches Kupfersalz. Da das Phenylalanin durch Krystallisation nicht leicht zu reinigen ist, zogen wir es vor, die kleine Menge in die Verbindung mit Phenylisocyanat zu verwandeln. Zu diesem Zweck wurden in der früher beschriebenen Weise 0,3 g in 3 ccm. Normalkalilauge gelöst, die filtrirte Flüssigkeit stark abgekühlt und tropfenweise unter kräftigem Schütteln mit 0,3 g Phenyl-

isocyanat versetzt. Nachdem der Geruch des letzteren völlig verschwunden war, wurde mit Thierkohle aufgeköcht und das Filtrat nach dem Erkalten mit einem geringen Ueberschuss verdünnter Schwefelsäure gefällt. Das anfangs ausgeschiedene Oel erstarrte bald krystallinisch. Das Produkt wurde zuerst aus heissem absoluten Alkohol mit Wasser gefällt und dann aus der 250fachen Menge siedenden Wassers umkrystallisirt. Die so erhaltenen weissen Nadelchen schmolzen nach dem Trocknen im Vacuum ebenso wie das bekannte Phenylisocyanat-l-Phenylalanin<sup>1)</sup> bei 181° (corr.) und gaben folgende Zahlen:

0.0773 g Substanz:	0.1916 g CO <sub>2</sub> .	0.0411 g H <sub>2</sub> O.
Berechnet für C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub> N <sub>2</sub> :	Gefunden:	
67.60 % C	67.63 % C	
5.63 % H	5.89 % H	

In alkalischer Lösung drehte die Substanz nach rechts. Eine approximative Bestimmung mit 0,15 g Substanz in ungefähr 3 1/2 %iger alkalischer Lösung ergab eine Drehung von 0,42, also eine spezifische Drehung:

$$[\alpha]_D^{20} = + 11.5.$$

Demnach enthielt das Präparat das Phenylcyanatderivat des l-Phenylalanins, aber demselben war eine grosse Menge des Racemkörpers beigemischt. Aller Wahrscheinlichkeit nach enthält das ursprüngliche Fibroin nur actives l-Phenylalanin. Aber bei der Hydrolyse, dem Eindampfen der sauren Lösung, der Veresterung u. s. w. kann eine theilweise Racemisirung stattfinden. Die Menge des Phenylalanins ist gering. Wir schätzen sie auf 1—1 1/2 % des angewandten Fibroins.

Nach den vorliegenden Erfahrungen und den Beobachtungen beim Casein<sup>2)</sup> darf man erwarten, dass die Proteinstoffe, welche reich an Tyrosin sind, auch Phenylalanin enthalten.

Die vierte Fraction besteht, wie zuvor erwähnt, grösstentheils aus wasserlöslichen Produkten. Nachdem das Phenylalanin abgeschieden war, wurde die wässrige Lösung mit überschüssigem Baryt verseift und die Mutterlaugen nach der

<sup>1)</sup> E. Fischer. Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. 33, S. 2386 (1900).

<sup>2)</sup> Siehe die vorhergehende Arbeit.

Entfernung des Baryts verdampft. Es bleibt ein Gemisch von Aminosäuren zurück, dessen völlige Reinigung uns noch nicht gelungen ist. Die Analysen deuten jedoch übereinstimmend dahin, dass es sich hier um eine Oxysäure, wahrscheinlich um Serin, handelt.

Die Menge der sechsten Fraction (über 160°) ist gering und sehr schwankend, da bei dieser Temperatur schon sehr erhebliche Zersetzungen des Rückstandes im Siedegefäss stattfinden. Diese Fraction erstarrt beim Erkalten zum Theil krystallinisch. Das feste Produkt lässt sich durch Auslaugen mit Aether von den flüssigen Stoffen befreien und durch Umkrystallisiren aus Alkohol reinigen. Der Körper zeigte in dem Schmelzpunkt (gefunden 300° corr.) sowie in den übrigen Eigenschaften grosse Aehnlichkeit mit dem sogenannten Phenyllactimid, welches bekanntlich durch längeres Erhitzen des Phenylalaninesters entsteht. Leider reichte die Menge für eine Elementaranalyse nicht aus.

#### **Verwandlung des d-Alanins in d-Milchsäure.**

Beziehungen zwischen der optisch activen Form des Alanins und der Milchsäure waren bisher nicht bekannt. Um diese Lücke auszufüllen, haben wir das d-Alanin, von welchem uns durch die vorhergehenden Versuche grosse Mengen zur Verfügung standen, mit salpetriger Säure zersetzt und die rechtsdrehende Milchsäure, die sogenannte Fleischmilchsäure, erhalten.

Der Versuch wurde unter ähnlichen Bedingungen ausgeführt, wie A. Strecker<sup>1)</sup> vor 51 Jahren das synthetische Alanin in die inactive Gährungsmilchsäure verwandelte. Nur haben wir es vortheilhaft gefunden, nicht die aus Salpetersäure und Arsentrioxyd entwickelten rothen Gase anzuwenden, sondern die salpetrige Säure aus Salzsäure und Silbernitrit direkt in der Flüssigkeit entstehen zu lassen. Dementsprechend wurden 5 g d-Alanin in 50 ccm. Wasser gelöst, mit 56,5 ccm. Normalsalzsäure (berechnete Menge) versetzt und auf 0° ab-

<sup>1)</sup> A. d. Chemie, Bd. 75, S. 42.

gekühlt. Wir fügten dann ungefähr  $\frac{1}{2}$  g Silbernitrit hinzu und liessen nach starkem Schütteln etwa  $\frac{1}{2}$  Stunde bei  $0^\circ$  und 1 Stunde bei Zimmertemperatur stehen, wobei eine regelmässige Stickstoffentwicklung stattfindet. In dieser Weise führen wir mit dem Zusatz des Nitrites fort, bis im Laufe von 2 Tagen 9 g davon eingetragen waren. Dann wurde die Flüssigkeit, welche kein Silber mehr enthielt, filtrirt, unter stark vermindertem Druck auf etwa 10 ccm. eingedampft und 8 bis 10 Mal mit der doppelten Menge Aether ausgeschüttelt. Die beim Verdampfen des Aethers zurückbleibende Säure wurde in das Zinksalz verwandelt. Aus der stark eingeeengten, wässrigen Lösung schied sich bei längerem Stehen im Eisschrank eine reichliche Menge kleiner, sternförmig vereinigter Nadeln ab. Das bei  $115^\circ$  getrocknete Salz zeigte den Zinkgehalt des Zinklactates:

0,2412 g Substanz ergaben 0,0803 g ZnO.	
Berechnet für $C_6O_6H_{10}Zn$ :	Gefunden:
26,78 % Zn	26,72 % Zn.

Für die optische Bestimmung diente eine wässrige Lösung, welche 3,84 % wasserfreies Salz enthielt und das spezifische Gewicht 1,01 hatte. Diese drehte im 2 dm.-Rohr bei  $20^\circ$   $0,62^\circ$  nach links. Daraus berechnet sich

$$[\alpha]_D^{20} = - 8,00.$$

Mithin war das Salz unzweifelhaft ein Derivat der d-Milchsäure. Es ist aber möglich, dass ihm eine kleine Menge Racemkörper beigemischt war, da das Drehvermögen des rechtsmilchsauren Zinks nach den Angaben der Litteratur<sup>1)</sup> etwas mehr, nämlich  $-8,6$  beträgt.

Es ist gewiss kein Zufall, dass die im Fleisch enthaltene Milchsäure und das aus dem Seidenfibroin oder Casein entstehende Alanin die gleiche Configuration besitzen.

1) Landolt, Das optische Drehungsvermögen, 2. Aufl., S. 170. Für wasserhaltiges d-milchsaures Zink ist  $[\alpha]_D^{20} = - 7,55$ , mithin für wasserfreies  $[\alpha]_D^{20} = - 8,6$ .

Die Resultate unserer Untersuchungen fassen wir folgendermassen zusammen:

1. Ausser den schon früher nachgewiesenen Körpern Tyrosin, Aminopropionsäure und Glycocoll finden sich in den Spaltungsprodukten des Fibroins mit Salzsäure noch l-Leucin, l-Phenylalanin und einige noch nicht näher charakterisirte Aminosäuren vor;

2. die Aminopropionsäure der Seide ist im Gegensatz zu der Annahme älterer Beobachter optisch activ; daraus folgt, dass sie  $\alpha$ -Aminopropionsäure sein muss. Sie hat sich identisch mit dem d-Alanin erwiesen;

3. das Tyrosin ist die auch sonst in den Proteinstoffen gefundene l-Verbindung;

4. für die Trennung des Glycocolls von den kohlenstoffreicheren Aminosäuren ist die Veresterung und die Krystallisation des salzsauren Glycocolls aus Alkohol bei Weitem die beste Methode;

5. das d-Alanin entspricht in der Configuration der d-Milchsäure;

6. aus 100 Theilen Fibroin wurden gewonnen:

	10 Theile	l-Tyrosin,
	21	d-Alanin,
	36	Glycocoll,
ungefähr	1—1½	l-Leucin,
>	1—1½	Phenylalanin.

Ueber die Zusammensetzung des Seidenleims, der im Gegensatz zum Fibroin reich an Diaminosäuren ist, hoffen wir bald berichten zu können.