

## Ueber die Hydrolyse des Leims.

Von

Emil Fischer, P. A. Levene und R. H. Aders.

Aus dem I. chemischen Institut der Universität Berlin.)

Der Redaction zugegangen am 19. Februar 1902.)

Trotz der zahlreichen Arbeiten über die hydrolytischen Spaltungsprodukte des Leims ist man über deren Natur verhältnissmässig wenig unterrichtet, und die Angaben verschiedener Autoren widersprechen sich zudem in manchen Punkten. Bei der Spaltung durch Säuren ist nachgewiesen die Bildung des Glycocols und des Leucins.<sup>1)</sup> Ferner hat C. Gaechtgen<sup>2)</sup> Asparaginsäure gefunden, deren Menge aber nur auf 0,07% des Leims geschätzt; allerdings ist diese Angabe später von Tatarinoff<sup>3)</sup> wieder bestritten worden, welcher weder Asparaginsäure noch Glutaminsäure finden konnte. Schützenberger und Bourgeois<sup>4)</sup> haben die Gelatine mit Barytwasser bei höherer Temperatur zersetzt und machen über die Natur der Spaltungsprodukte nur die folgenden kurzen Angaben:

Pour l'ichtyocolle, l'osséine et gélatine, on a trouvé comme constituants du mélange amidé:

1. Glycocolle 20 à 25 pour 100;
2. Alanine  $C_3H_7AzO_2$ ;
3. Acide amidobutyrique  $C_4H_9AzO_2$ ;
4. Traces d'acide glutamique;
5. Termes de la série  $C_nH_{2n-1}AzO_2$  avec  $n = 4, 5, 6,$  plus de 50 pour 100.

Leider fehlen ausführlichere Mittheilungen, wie diese

1) Braconnot, ferner Nencki, J. f. pr. Ch., Bd. 15, S. 395.

2) Diese Zeitschr., Bd. I, S. 299.

3) Jahresber. 1879, S. 880.

4) Compt. rend. Bd. 82, S. 263.

Produkte im Einzelfalle erkannt und ihre Menge bestimmt wurde. Auffallend ist, dass in der Liste der Aminosäuren das Leucin gänzlich fehlt. Wie unvollkommen die von Schützenberger im Allgemeinen angewandten Methoden zur Erkennung der einzelnen Spaltungsprodukte der Proteinstoffe gewesen sind, wurde schon bei einer früheren Gelegenheit hervorgehoben.<sup>1)</sup> Quantitative Angaben werden von den meisten Beobachtern nur bezüglich des Glycocolls gemacht, aber sie schwanken erheblich. Im Gegensatz zu Schützenberger, der 20—25% des Basengemenges angibt, konnte Charles S. Fischer<sup>2)</sup> durch Ueberführung in Hippursäure nur 4% Glycocoll gewinnen, während Gonnermann<sup>3)</sup> eine Ausbeute von 8,5% feststellte und wir später zeigen werden, dass man mit Hilfe der hier besonders exacten Estermethode 16,5% der trockenen Gelatine isoliren kann.

Von Diaminosäuren wurden gefunden: Arginin,<sup>4)</sup> Histidin und Lysin.<sup>5)</sup>

Dass die Gelatine auch eine aromatische Gruppe enthält, ist durch die Beobachtungen von Schlieper und Guckelberger, welche bei der Oxydation Benzoesäure erhielten, von Nencki, Selitrenny, Schulze und in neuester Zeit von K. Spiro<sup>6)</sup> sicher festgestellt, und es sprachen manche Gründe für die Annahme, dass sie in Form von Phenylalanin vorhanden sei. Der definitive Beweis dafür war aber noch zu erbringen.

Angesichts dieser mancherlei Unsicherheiten und Widersprüche haben wir es für nützlich gehalten, die Spaltungsprodukte der Gelatine durch Salzsäure mit Hilfe der neuen, kürzlich beschriebenen Methode, welche auf der fractionirten Destillation der Aminoester beruht, zu prüfen, und wir haben damit sicher nachweisen können: Glycocoll, Alanin, Leucin,

1) E. Fischer, diese Zeitschr., Bd. XXXIII, S. 415, 1901.

2) Diese Zeitschr., Bd. XIX, S. 164.

3) Pflüger's Archiv, Bd. 59, S. 42.

4) Hedlin, diese Zeitschr., Bd. XXI, S. 161.

5) Kossel u. Kutscher, diese Zeitschr., Bd. XXXI, S. 203.

6) Beitr. z. chem. Physiologie u. Pathologie, I. 347, 1901.

Phenylalanin, Asparaginsäure, Glutaminsäure und  $\alpha$ -Pyrrolidin-carbonsäure.<sup>1)</sup>

Das Verfahren war im Wesentlichen das gleiche wie beim Casein, nur bezüglich der Isolirung des Phenylalanins, dessen Menge hier etwas kleiner ist, wurde noch ein anderer, gewiss in manchen Fällen brauchbarer Weg eingeschlagen.

#### Zersetzung der Gelatine durch Salzsäure und Veresterung der Aminosäuren.

1 kg beste käufliche Gelatine, welche für bakteriologische Zwecke dient und welche 15,2% Wasser bei 105° verlor, wurde mit 3 Liter Salzsäure (specifisches Gewicht 1,19) übergossen und bei gewöhnlicher Temperatur häufig umgeschüttelt. Sie löste sich in 1—2 Stunden mit hellbrauner Farbe. Die Flüssigkeit wurde jetzt 6 Stunden am Rückflusskühler gekocht, wobei die Farbe in dunkelbraun überging, dann unter vermindertem Druck zum dicken Syrup eingedampft, mit 3 Liter absolutem Alkohol unter Erwärmen gelöst, mit gasförmiger Salzsäure gesättigt und zum Schluss noch  $\frac{1}{2}$  Stunde auf dem Wasserbade erwärmt. Die abgekühlte Flüssigkeit blieb nach Eintragen eines Krystalles von salzsaurem Glycocollester 18 Stunden im Eisschrank stehen, wobei eine reichliche Krystallisation erfolgte. Die Menge des ausgeschiedenen salzsauren Esters schwankt, sie betrug im Maximum 260 g, gewöhnlich aber nur 100—150 g, weil die alkoholische Lösung meist noch ziemlich viel Wasser enthält. Um dies zu entfernen, wird die alkoholische Mutterlauge wieder im Vacuum zum Syrup eingedampft, mit 3 Liter Alkohol aufgenommen und von neuem in der gleichen Art mit Salzsäuregas behandelt. Die abgekühlte Flüssigkeit gibt jetzt in der Regel eine zweite Krystallisation. Eventuell muss die gleiche Operation nochmals wiederholt werden. Die Gesamtausbeute betrug 260 g salzsauren Glycocollester oder 140 g Glycocoll. Die Menge von Glycocoll, welche unter diesen Umständen in der alkoholischen

<sup>1)</sup> Eine kurze Notiz über die Versuche findet sich schon in dieser Zeitschr., Bd. XXXIII, S. 440.

Lösung bleibt, ist recht gering. Dadurch wird die spätere Isolirung des Alanins wesentlich erleichtert.

Die weitere Verarbeitung der alkoholischen Mutterlaugen und die Fractionirung der Aminoester geschah genau so, wie es früher beim Casein<sup>1)</sup> beschrieben wurde.

Bei zweimaliger Destillation unter einem Druck von 8—10 mm wurden folgende Fractionen erhalten:

I.	40—55°	44.0 g
II.	55—80°	104.0
III.	80—100°	36.5
IV.	100—130°	28.5
V.	130—160°	20.0
		233.0 g

Der dunkelbraune Rückstand mit grünlicher Fluorescenz wog 125 g, war in der Hitze flüssig und erstarrte in der Kälte zu einer amorphen Masse.

#### Fraction 40—55°.

Sie enthält den wesentlichsten Theil des Alanins neben etwas Glycocoll und höheren Aminosäuren. Der Ester wurde mit der 5fachen Menge Wasser am Rückflusskühler gekocht, bis die alkalische Reaction verschwunden war, was nach etwa 7 Stunden eintrat. Die Aminosäuren wurden dann durch Eindampfen der Lösung und Krystallisation bei gewöhnlicher Temperatur in 2 Fractionen zerlegt, deren Gewicht 10 g und 15 g betrug.

Die erste Fraction war wesentlich Alanin, sie hatte den Schmelzpunkt 270°. Durch systematisches Umkrystallisiren wurden daraus 7 g vom Schmelzpunkt 294—295° gewonnen. Die Analyse ergab:

0.2038 g Substanz:	0.3040 g CO <sub>2</sub> ,	0.1488 g H <sub>2</sub> O.
C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub> N.	Berechnet: C 40.45,	H 7.87
	Gefunden: „ 40.68,	„ 8.11.

Für die optische Untersuchung diente das salzsaure Salz, welches in der früher beschriebenen Weise<sup>2)</sup> bereitet wurde. Gefunden  $[\alpha]_D^{20} = +8.9^\circ$ , während für das reine active

1) Diese Zeitschrift, Bd. XXXIII, S. 151, 1901.

2) Berichte d. d. chem. G., Bd. 32, S. 2456, 1899.

salzsaure Alanin der Werth  $+ 9,68^{\circ}$  gilt. Es scheint mithin, dass das Präparat eine kleine Menge Racemkörper enthielt.

Zur weiteren Identificirung wurde das Alanin durch 24-stündiges Erhitzen mit der 20fachen Menge Wasser und der 3fachen Menge Barythydrat auf  $^{\circ}170-180^{\circ}$  völlig racemisirt und dann durch Behandlung mit Bicarbonat und Benzoylchlorid<sup>1)</sup> in das Benzoylderivat verwandelt. Das Präparat gab folgende Zahlen:

0,1922 g Substanz: 0,4380 g  $\text{CO}_2$ , 0,0990 g  $\text{H}_2\text{O}$ .

$\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{NO}_3$  Berechnet: C 62,17, H 5,70

Gefunden: C 62,15, H 5,72.

Die zweite Fraction enthielt noch Glycocoll, welches nach der Veresterung wiederum als salzsaures Salz abgeschieden wurde. Die Menge des Hydrochlorats betrug 6 g. Die aus den Mutterlauge wieder isolirte Aminosäure enthielt noch viel Alanin, aber verunreinigt durch andere Produkte, die wir nicht näher untersucht haben.

Fraction 55  $80^{\circ}$ .

Sie enthält grosse Mengen von Pyrrolidincarbonsäure, und zwar sowohl die active wie die racemische Form, ferner Leucin und ausserdem kohlenstoffärmere Aminosäuren, vielleicht Amino-valeriansäure und Aminobuttersäure, die aber nicht im reinen Zustande isolirt werden konnten. Das Gemisch der Ester wurde zuerst durch 8-stündiges Kochen mit der 5fachen Menge Wasser am Rückflusskühler verseift. Die wässrige Lösung gab dann folgende Krystallisationen:

I. Beim blossen Abkühlen	4,0 g.
II. Nach Eindampfen	16,0
III.	20,5
IV.	32,5

Die beiden letzten Fractionen enthalten die Pyrrolidin-carbonsäure. Fraction III wurde zuerst mit der gleichen Menge Wasser ausgekocht, wobei die Hälfte in Lösung ging, das Filtrat verdampft und der Rückstand mit Fraction IV vereinigt. Durch Auskochen mit Alkohol wurden aus diesem Produkt

<sup>1)</sup> Vgl. E. Fischer, Ber. d. d. chem. G., Bd. 32, S. 2454.

27 g rohe Pyrrolidincarbonsäure erhalten. Zur Reinigung derselben sowie zur Trennung von racemischer und activer Form diente das Kupfersalz, welches in der gewöhnlichen Weise bereitet, zur Trockne verdampft und mit Alkohol ausgekocht wurde. Der unlösliche Theil, aus heissem Wasser umkrystallisirt, gab die charakteristischen blauen Prismen des racemischen pyrrolidincarbonsauren Kupfers von der Formel  $C_{10}H_{16}O_4N_2Cu + 2H_2O$ .

0.5096 g Substanz: 0.0556 g  $H_2O$  bei  $120^\circ$ .

0.5240 g Substanz: 0.1247 g  $CuO$ .

$C_{10}H_{16}O_4N_2Cu + 2H_2O$ . Berechnet:  $H_2O$  10.99,  $Cu$  19.41  
Gefunden: 10.91, 19.01.

Aus dem in Alkohol löslichen Kupfersalz wurde die active Pyrrolidincarbonsäure isolirt. Sie schmolz unter Zersetzung bei  $203-204^\circ$ . Zur Identificirung diente das Anhydrid der Phenylisocyanatverbindung. Es schmolz bei  $142^\circ$  und gab folgende Zahlen:

0.1878 g Substanz: 0.4562 g  $CO_2$ , 0.0956 g  $H_2O$ .

$C_{12}H_{12}O_2N_2$ . Berechnet:  $C$  66.66,  $H$  5.55

Gefunden: 66.25, 5.65.

Aus den Fractionen I und II konnte das ziemlich schwer lösliche Leucin durch fractionirte Krystallisation abgeschieden werden. Das Uebrige war ein Gemenge von niedrigeren Amidosäuren. Die analytischen Werthe für die freien Säuren wie für die Kupfersalze näherten sich in den schwerer löslichen Partien der Aminovaleriansäure und in den leichter löslichen der Aminobuttersäure bezw. dem Alanin. Bevor man aber die Anwesenheit dieser Stoffe definitiv aussprechen kann, halten wir es für nöthig, dass sie nicht allein selbst isolirt, sondern auch noch durch verschiedene Derivate charakterisirt werden. Dafür reichte aber die uns zu Gebote stehende Menge nicht aus.

Fraction  $80-100^\circ$ .

Sie enthält Leucin und viel Pyrrolidincarbonsäure. Die Verseifung wurde ebenfalls durch Kochen mit Wasser bewirkt, und die Aminosäuren zunächst fractionirt krystallisirt. Die erste Fraction 5.6 g war Leucin.

0,2024 g Substanz: 0,4098 g CO<sub>2</sub>, 0,1811 g H<sub>2</sub>O.

C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>O<sub>2</sub>N. Berechnet: C 54,96, H 9,92

Gefunden: > 54,95, > 9,89.

Für die Bestimmung des optischen Drehungsvermögens diente die Lösung der Substanz in der berechneten Menge Salzsäure. 0,6352 g Substanz, 10,9630 g Lösung, also Procentgehalt 5,7940. Specificisches Gewicht 1,1036. Drehung bei Na-Licht im 2Decimeter-Rohr + 2,26°. Mithin

$$[\alpha]_D^{20} = +17,67^\circ.$$

Zur weiteren Charakterisirung wurde noch eine Probe des Leucins racemisirt, mit Phenylisocyanat combinirt und die Phenylureidosäure, deren Schmelzpunkt bei 164° lag, durch Kochen mit Salzsäure ins Hydantoin verwandelt. Letzteres zeigte den richtigen Schmelzpunkt 124—126° und die Zusammensetzung:

0,2100 g Substanz: 0,5176 g CO<sub>2</sub>, 0,1335 g H<sub>2</sub>O.

C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>O<sub>2</sub>N<sub>2</sub>. Berechnet: C 67,24, H 6,89

Gefunden: 67,22, 7,06.

Die zweite Fraction, 18 g, löste sich bis auf 3 g in heissem absoluten Alkohol und bestand überwiegend aus Pyrrolidincarbonsäure. Die Ausbeute an letzterer, d. h. in Alkohol löslichem Rohprodukt betrug also im Ganzen 4,4% der nicht getrockneten Gelatine.

Fraction 100—130°.

Sie enthält neben anderen Produkten, deren Natur noch nicht festgestellt ist, Asparaginsäure. Zur Verseifung wurde sie mit der doppelten Menge krystallisirten Barythydrats und der zehnfachen Menge Wasser 2 Stunden auf dem Wasserbade erwärmt, nach völligem Erkalten wurde das ausgeschiedene Baryumsalz filtrirt, dann in Wasser suspendirt, mit Schwefelsäure genau zersetzt und die in der Mutterlauge enthaltene Asparaginsäure wie gewöhnlich durch Krystallisation gereinigt.

0,2090 g Substanz: 0,2762 g CO<sub>2</sub>, 0,1002 g H<sub>2</sub>O.

C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>O<sub>4</sub>N. Berechnet: C 36,09, H 5,26

Gefunden: > 36,04, > 5,33.

Die Ausbeute an reiner krystallisirter Asparaginsäure betrug nur 2,5 g, in Wirklichkeit ist ihre Menge aber jeden-

falls viel grösser, da die Abscheidung durch Baryt sehr unvollkommen ist und im Wesentlichen nur den Theil der Asparaginsäure liefert, der bei der Hydrolyse racemisirt worden ist. Der Haupttheil der activen Säure befand sich also noch in den Mutterlaugen, wir haben aber vorläufig auf seine Isolirung verzichtet.

#### Fraction 130 – 160°.

Bei einem Versuch mit 1 kg Gelatine konnte der in dieser Fraction enthaltene Phenylalaninester direkt durch Schütteln mit der siebenfachen Menge Wasser als Oel abgetrennt und dann in der früher beschriebenen Weise daraus das Phenylalanin gewonnen werden.

Bei einem zweiten Versuch war die Menge des durch Wasser abgetrennten Oeles so gering, dass seine Untersuchung unmöglich war, aber hier liess sich das Phenylalanin nach der Verseifung mit Baryt aus der stark concentrirten wässrigen Lösung durch Einleiten von Salzsäuregas als Hydrochlorat fällen. Das Salz wurde durch Umkrystallisiren aus starker Salzsäure gereinigt, dann in wässriger Lösung mit Natriumacetat zersetzt und das ausgeschiedene Phenylalanin aus heissem Wasser unter Zusatz von Thierkohle umkrystallisirt. Das farblose schön krystallisirte Präparat zeigte die charakteristische Verwandlung in Phenylacetaldehyd und gab folgende Zahlen:

0.2056 g Substanz: 0.4936 g CO<sub>2</sub>, 0.1244 g H<sub>2</sub>O.

C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>O<sub>2</sub>N. Berechnet: C 65.45, H 6.66

Gefunden: 65.47, 6.72.

Nach dem Drehungsvermögen, welches in wässriger Lösung nur  $[\alpha]_D^{20} = +12.6^\circ$  gefunden wurde, war das Präparat ein Gemisch von activem und racemischem Phenylalanin.

Neben Phenylalanin enthält die Fraction auch die Ester der Asparaginsäure und der Glutaminsäure. Die erstere wurde bei der Verseifung mit Baryt wieder als unlösliches Barytsalz gewonnen und daraus isolirt. Ihre Analyse ergab:

0.1960 g Substanz: 0.2598 g CO<sub>2</sub>, 0.0886 g H<sub>2</sub>O.

C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>O<sub>4</sub>N. Berechnet: C 36.09, H 5.26

Gefunden: 36.15, 5.02.

Zur Gewinnung der Glutaminsäure wurde eine andere Portion des Estergemisches durch Abdampfen mit verdünnter Salzsäure verseift, der Rückstand in wenig Wasser gelöst und die Flüssigkeit mit gasförmiger Salzsäure gesättigt. Das ausgeschiedene Hydrochlorat, welches Glutaminsäure und Phenylalanin enthielt, liess sich durch Umkrystallisiren aus Salzsäure reinigen und gab dann bei der Zersetzung mit der berechneten Menge Alkali die freie Glutaminsäure. Diese wurde aus heissem Wasser unter Zusatz von Thierkohle mehrmals umkrystallisirt, bis alles Phenylalanin entfernt war, und gab folgende Zahlen:

Analyse:	0,1956 g Substanz:	0,2914 g CO <sub>2</sub> ,	0,1106 g H <sub>2</sub> O
	0,2009 "	0,2987 "	0,1092 "
	0,1887 "	15,2 ccm. N (16,5°, 767 mm.)	
C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> O <sub>4</sub> N	Berechnet:	C 40,81, H 6,12, N 9,52	
	Gefunden:	41,05, 6,28	
		40,55, 6,04	
		— — N 9,47.	

Für die Bestimmung des optischen Drehungsvermögens diente die Lösung der Substanz in der berechneten Menge Salzsäure. 0,6642 g Substanz 11,8812 g Lösung, also Procentgehalt 5,59, spezifisches Gewicht 1,024. Drehung bei Na-Licht im 2 Decimeter-Rohr + 3,23°. Mithin

$$[\alpha]_D^{20} = + 28,21^{\circ},$$

während die Glutaminsäure aus Casein unter den gleichen Bedingungen + 30,45 gab.<sup>1)</sup>

Die Ausbeute an Glutaminsäure war recht gering, denn die Menge des Hydrochlorats betrug nur 1% der Gelatine. Sie stieg allerdings auf noch etwas bei einem anderen Versuch, wo die Destillation der höher siedenden Ester nicht bei 10 mm., sondern bei etwa 0,5 mm. Druck ausgeführt war,<sup>2)</sup> und in

<sup>1)</sup> Ber. d. d. chem. Gesellsch., Bd. 32, S. 2468.

<sup>2)</sup> Die Destillation bei diesem geringen Druck ist für die leicht zersetzlichen Ester der Aminosäuren besonders zu empfehlen. Man erhält dabei auch Substanzen, welche bei der Destillation unter 8—10 mm. sich zersetzen. Speciell in der Gelatine wurde ein derartiges Produkt gefunden, welches nach der Analyse des Kupfersalzes eine Oxyamino-säure zu sein scheint. Ueber die Einzelheiten des Verfahrens, welches besondere technische Einrichtungen erfordert, wird an anderer Stelle Mittheilung gemacht werden.

Wirklichkeit ist die Menge der in der Gelatine enthaltenen Glutaminsäure zweifellos noch erheblich grösser, da bei der Darstellung des Esters starke Verluste entstehen.

**Zusammenstellung der Resultate.**

1. Unter den Spaltprodukten des Leims durch Salzsäure sind sicher nachgewiesen: Glycocoll, d-Alanin, l-Leucin, Asparaginsäure, d-Glutaminsäure, d-Phenylalanin und l-Pyrrolidincarbonsäure. Neben den activen Säuren war aber auch allenthalben die racemische Form vorhanden, welche zweifellos bei der Hydrolyse aus ersterer entstanden ist.

2. Die Bildung von Aminovaleriansäure ist nicht sicher nachgewiesen, aber doch wahrscheinlich gemacht, und nach einigen Beobachtungen ist auch die Anwesenheit von Aminobuttersäure nicht ausgeschlossen.

3. Von den sicher nachgewiesenen Stoffen wurden folgende Mengen isolirt, berechnet in Procenten auf die getrocknete Gelatine:

Glycocoll . . . . .	16,5 %
Alanin . . . . .	0,8 %
Pyrrolidincarbonsäure . . . . .	5,2 %
Leucin . . . . .	2,1 %
Asparaginsäure . . . . .	0,56 %
Glutaminsäure . . . . .	0,88 %
Phenylalanin . . . . .	0,4 %
	26,44 %

Die wirkliche Menge dieser Stoffe, mit Ausnahme des Glycocolls, ist aber jedenfalls erheblich grösser, weil sowohl bei der Darstellung der freien Ester, wie auch bei der Isolirung der einzelnen aus den Estern regenerirten Aminosäuren grosse Verluste unvermeidlich sind.