

Hydrolyse des Horns.

Von

Emil Fischer und Theodor Dörpninghaus.

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

(Der Redaction zugegangen am 31. August 1902.)

Bei der Hydrolyse des Horns sind bisher gefunden worden: Tyrosin und Leucin,¹⁾ Asparaginsäure²⁾ und Glutaminsäure,³⁾ Arginin,⁴⁾ Lysin⁵⁾ und endlich Cystin.⁶⁾ Nach den Erfahrungen bei anderen Proteinstoffen war indessen zu erwarten, dass noch weitere Spaltungsproducte vorhanden seien. Wir hielten deshalb eine Nachprüfung der älteren Untersuchungen mit den neueren Hilfsmitteln für wünschenswerth und es ist uns durch die Estermethode in der That gelungen, noch folgende 6 Monoaminosäuren: Glycocoll, Alanin, α -Aminovaleriansäure, α -Pyrrolidincarbonensäure, Serin und Phenylalanin aus dem Horn zu isoliren.

Besondere Beachtung verdient unter diesen das Serin, welches Cramer bekanntlich zuerst aus dem Seidenleim erhielt und welches seitdem auch unter den Spaltungsproducten des Seidenfibroins gefunden wurde.⁷⁾

Da die Hornsubstanz von diesen beiden Producten in ihrer Zusammensetzung erheblich abweicht, so deuten die fol-

1) Hinterberger, Annalen, Bd. 71, S. 70.

Schwanert, Annalen, Bd. 102, S. 222.

2) Kreussler und Hinterberger, Journ. f. prakt. Chem., Bd. 107, S. 222 u. 240.

3) Horbaczewski, Sitzungsberichte d. kais. Akad., Bd. 80, S. 101.

4) Hedin, Diese Zeitschrift, Bd. XX, S. 186.

5) Hedin, Diese Zeitschrift, Bd. XXI, S. 297.

6) Mörner, Diese Zeitschrift, Bd. XXVIII, S. 595 u. Bd. XXXIV, S. 207.

7) E. Fischer u. A. Skita, Diese Zeitschrift, Bd. XXXV, S. 221.

genden Beobachtungen darauf hin, dass Serin ein verbreiteter Bestandtheil der Proteinstoffe ist, und wir haben die Ueberzeugung, dass es nur in Folge seiner schwierigen Erkennung bisher so selten gefunden wurde.

Auf die Verbreitung der α -Pyrrolidincarbonsäure, ferner des Alanins und Phenylalanins wurde bereits früher wiederholt hingewiesen.

Mit der Aminovaleriansäure scheint es ähnlich zu stehen, aber ihre Isolirung bietet so grosse Schwierigkeiten, dass sie nach der Auffindung im Casein hier zum ersten Male wieder als hydrolytisches Spaltungsproduct der Proteine im reinen Zustand abgeschieden wurde. Ihre Menge ist hier relativ gross, denn sie beträgt nach unserer Schätzung 4—5% der Hornsubstanz; leider ist aber die Trennung vom Leucin so schwer, dass die Darstellung des reinen Präparats eine sehr mühsame Arbeit erfordert und mit grossen Verlusten verbunden ist.

Für die Untersuchung diente Horn von Rindern aus den Donauländern, welches in Form feiner Abfallspähne von einer Berliner Knopffabrik bezogen wurde. Es verlor bei vierstündigem Trocknen im Toluolbade 12,7% Wasser und wenn das Trocknen nach vorhergegangenem 24stündigen Auslaugen mit 5%iger Salzsäure erfolgte, 17,3%.

Auf eine Reindarstellung des Keratins nach dem Verfahren von Kühne und Chittenden¹⁾ haben wir verzichtet, da auch das so gewonnene Präparat kaum als ein einheitlicher Körper betrachtet werden kann.

Für die Hydrolyse wurden 1 kg Hornspähne mit 4 kg Salzsäure vom specifischen Gewicht 1,19 übergossen. Nach vierstündigem Erhitzen auf dem Wasserbade war der allergrösste Theil gelöst und nun wurde die Mischung 10 Stunden am Rückflusskühler gekocht. Das völlige Verschwinden der Biuretreaction zeigte die Beendigung der Hydrolyse an.

Die tiefbraune Lösung wurde zunächst von einem Rückstand, der grösstentheils aus Salmiak und Natronsalzen bestand, abfiltrirt und bei stark vermindertem Druck zum dicken Syrup

¹⁾ Zeitschr. f. Biologie, Bd. 26, S. 291.

eingedampft, dann noch warm mit 3 l absolutem Alkohol übergossen und durch Einleiten von Salzsäuregas ohne Abkühlung verestert. Bei dieser Operation entstand wiederum eine klare tiefbraune Lösung. Um die Veresterung zu vervollständigen, ist es rathsam, nach zwölfstündigem Stehen unter vermindertem Druck einzudampfen und den Rückstand von Neuem mit der gleichen Menge Alkohol und Salzsäuregas zu behandeln. Nach 24stündigem Stehen wird wiederum unter vermindertem Druck aus einem Wasserbade, dessen Temperatur 45° nicht überschreiten soll, verdampft und der Rückstand in der mehrfach beschriebenen Weise¹⁾ mit Aether, Kaliumcarbonat und concentrirter Alkalilösung auf die freien Ester der Aminosäuren verarbeitet. Die ätherische Lösung derselben ist zuerst dunkelbraun gefärbt, wird aber beim Trocknen mit Natriumsulfat hellgelb. Beim Verdunsten des Aethers auf dem Wasserbade bleibt ein gelbbraunes Oel zurück, welches die Ester der Aminosäuren und ausserdem eine nicht unerhebliche Menge von schwefelhaltigen Körpern enthält. Die letzteren erschweren in Folge ihrer leichten Zersetzlichkeit die Destillation auch bei 0,3 mm Druck so sehr, dass es rathsam ist, sie durch Vermischen mit Petroläther von den leichtflüchtigen Aminoestern zu trennen. Zu diesem Zweck wurde das obige Gemisch der Ester mit 2 kg Petroläther (bis 38° siedend) geschüttelt, wobei ein dunkelbraunes Oel ausfiel, während die darüber stehende Lösung hellgelb gefärbt war.

Mit Ausnahme des Serins findet sich nun der grössere Theil der Aminosäureester in der Petrolätherlösung, während die schwefelhaltigen Producte mit dem Serinester und dem Rest der Aminoester in dem dunklen Oel enthalten sind.

Um die getrennte Verarbeitung dieser beiden Theile schildern zu können, bezeichnen wir sie als A und B.

A.

Zunächst wurde der Petroläther auf dem Wasserbade abdestillirt und der Rückstand erst unter 10 mm Druck aus einem bis 70° erwärmten Bade abdestillirt (Fraction I), dann

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXV, S. 300.

die Destillation unter 0,2—0,4 mm Druck fortgesetzt und dabei folgende Fractionen erhalten:

2.	50—115° (Temperatur des Bades)	195 g
3.	115—140°	45
4.	140—155°	15
5.	155—195°	27
		282 g.

Dazu kommen noch 39 g Ester, welche aus Fraction I, die noch viel Aether, Alkohol und Petroläther enthielt, durch wiederholte, fractionirte Destillation erhalten wurden, so dass die Ausbeute an Estern im Ganzen 321 g betrug. Im Gegensatz zu den 4 ersten Fractionen erstarrte die fünfte Fraction zum grössten Theil in der Vorlage.

Nicht flüchtige Producte sind in dem Petroläther kaum gelöst, denn der Destillationsrückstand betrug nur wenige Gramm und dieses Product war aller Wahrscheinlichkeit nach secundär aus den Estern entstanden.

B.

Anders verhielt sich das in Petroläther unlösliche Oel. Bei seiner Destillation, welche in gleicher Weise ausgeführt wurde, blieb ein tiefschwarzer, glänzender, schwefelhaltiger Rückstand, der beim Erkalten sehr hart und spröde wurde, im Gewichte von 110 g zurück. Ausserdem resultirten folgende Fractionen:

1.	bis 70° (Temperatur des Bades bei	10 mm)	34 g
2.	60—110°	0,2—0,4	50
3.	110—135°	0,2—0,4	25
4.	135—155°	0,2—0,4	30
5.	155—185°	0,2—0,4	33
			172 g.

Die Gesammtmenge der Ester der Monoaminosäuren mit Ausnahme des Tyrosins betrug mithin 493 g, d. i. 56,5% der Trockensubstanz oder 59,5% des mit Salzsäure ausgelaugten Horns.

Die beiden ersten Fractionen von A und B wurden nochmals unter 10 mm Druck fractionirt.

Die Verseifung der Ester geschah wie früher bei den unter 85° siedenden (Temperatur des Dampfes) Präparaten durch Kochen mit Wasser am Rückflusskühler und bei den höher siedenden durch Erwärmen mit überschüssigem Barytwasser auf dem Wasserbade. Im letzteren Falle blieb die Lösung längere Zeit zur möglichst vollständigen Abscheidung des asparaginsäuren Baryts stehen, wurde dann filtrirt und nach dem genauen Ausfällen des Baryts zur Gewinnung der in Lösung befindlichen Aminosäuren im Vacuum zur Trockne verdampft.

Zur Abscheidung des Phenylalanins und Serins war noch eine besondere Behandlung der über 85° siedenden Ester vor der Verseifung nöthig, welche später genauer beschrieben wird.

Rechnet man diese beiden Aminosäuren und das Tyrosin ab, so war die Menge der aus den beiden Esterfractionen erhaltenen Aminosäuren folgende:

A.

1.	bis 40° (Temperatur des Dampfes)	5,5 g
2.	$40-55^{\circ}$	4,0 „
3.	$55-80^{\circ}$	62,0 „
4.	$80-85^{\circ}$	111,0 „
5.	$85-110^{\circ}$	3,0 „
6.	$110-140^{\circ}$ (Temperatur des Bades)	20,0 „
7.	$140-155^{\circ}$	10,0 „
8.	$155-195^{\circ}$	16,0 „
		<hr/> 231,5 g.

B.

1.	bis 40° (Temperatur des Dampfes)	1,5 g
2.	$40-55^{\circ}$	5,5 „
3.	$55-80^{\circ}$	10,0 „
4.	$80-85^{\circ}$	25,0 „
5.	$85-110^{\circ}$	22,0 „
6.	$110-135^{\circ}$ (Temperatur des Bades)	12,0 „
7.	$135-155^{\circ}$	18,0 „
8.	$155-185^{\circ}$	10,0 „
		<hr/> 104,0 g.

Aus Fraction 6 und 7 dieses Theils (B) wurden 7 beziehungsweise 8 g unlöslichen Barytsalzes erhalten, das in obigen Zahlen nicht einbegriffen ist.

Schwefelhaltige Producte waren in den über 110° siedenden Fractionen enthalten, sie sind aber frei von Stickstoff und befinden sich in dem durch Aether abgeschiedenen Phenylalaninester. Cystin und ähnliche Producte bleiben bei der Anwendung der Estermethode entweder in der alkalischen Lauge oder in dem nicht flüchtigen Theil des ätherischen Auszuges. Ferner entstand bei der Destillation eine erhebliche Menge flüchtiger, schwefelhaltiger Producte, vor allem Schwefelammonium, welche sich in der durch flüssige Luft gekühlten zweiten Vorlage zusammen mit etwa 25 ccm. Alkohol condensirten.

Der Nachweis des Glycocolls, der gewöhnlich durch Abscheidung des in Alkohol unlöslichen salzsauren Esters geschieht, liess sich hier in Folge eines Zufalls sehr leicht führen.

Die unter 40° siedende Fraction schied nämlich schon nach kurzem Stehen Krystalle ab, die nach 6 Stunden abfiltrirt wurden und deren Menge verhältnissmässig gross war (2,5 g).

Nach dem Umkrystallisiren aus heissem Wasser wurden sie als Glycinanhydrid erkannt. Sie schmolzen im geschlossenen Rohr bei 305° unter Zersetzung und gaben folgende Zahlen:

0,1201 g Substanz gaben 0,1856 CO_2 und 0,0585 H_2O .

0,1452 g " " 31 ccm N bei $20,5^{\circ}$ u. 759 mm.

$\text{C}_4\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_2$ berechnet: 42,11% C, 5,26% H, 24,36% N;

gefunden: 42,14% C, 5,41% H, 24,32% N.

Andere Mengen von Glycocoll waren in den höheren Fractionen enthalten, wurden aber nicht isolirt.

Fraction 40 – 55° .

Die Menge der aus A und B gewonnenen Aminosäuren betrug 9,5 g und bestand zum grösseren Theil aus Alanin; enthielt aber auch kleinere Mengen der Homologen. Durch mehrmaliges Umkrystallisiren aus Wasser oder verdünntem Alkohol wurden 3 g reines d-Alanin isolirt.

0,1724 g Substanz gaben 0,2548 g CO_2 und 0,1233 g H_2O .

0,1666 g " " 22,9 ccm. N bei 22° u. 760 mm.

$\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2$ berechnet: 40,45% C, 7,86% H, 15,73% N;

gefunden: 40,31% C, 7,95% H, 15,57% N.

Die optische Bestimmung des Hydrochlorats ergab:

0,5812 g Substanz in 6,5499 g Wasser. Mithin 8,15% Gehalt. Specifisches Gewicht 1,014. Drehung im Decimeterrohr bei Natriumlicht 0,70° nach rechts, mithin

$$[\alpha]_D^{20} = +8,5,$$

während das reine d-Alanin +9,68 hat. Das Präparat war also grösstentheils d-Alanin mit einer kleinen Beimengung von Racemkörper.

Zur völligen Identificirung wurde es durch Erhitzen mit überschüssigem Barytwasser auf 180° völlig racemisirt¹⁾ und in den Benzoylkörper verwandelt.²⁾ Letzterer schmolz bei 162° und hatte die Zusammensetzung $C_{10}H_{11}NO_3$.

0,1327 g Substanz gaben 0,3018 CO_2 und 0,0679 H_2O .

$C_{10}H_{11}NO_3$ berechnet: 62,17% C, 5,70% H;

gefunden: 62,03% C, 5,65% H.

Fraction 55—80°.

Die Aminosäure, deren Gesamtmenge aus A und B 72 g betrug, war gelb gefärbt. Sie enthielt eine erhebliche Menge von α -Pyrrolidincarbonensäure. Um diese abzuscheiden, wurde das gepulverte Product zweimal mit der zehnfachen Menge absoluten Alkohols ausgekocht, wobei 16 g in Lösung gingen. Der nicht gelöste Theil war ein Gemisch von Aminovaleriansäure und Leucin, deren Trennung noch dadurch erschwert wurde, dass beide Säuren partiell racemisirt waren.

Zunächst wurden 15 g des Gemisches in 300 ccm heissem Wasser gelöst und die erkaltete Flüssigkeit 24 Stunden der Krystallisation überlassen. Hierbei fiel eine verhältnissmässig geringe Menge Leucin aus. Das Filtrat wurde mit weiteren 400 ccm Wasser versetzt und mit überschüssigem gefällten Kupferoxyd $\frac{1}{2}$ Stunde gekocht. Die heiss filtrirte Lösung schied beim Erkalten 1,3 g Leucinkupfer ab.

1) Da Glasröhren von dem Barytwasser bei dieser Temperatur zu stark angegriffen werden, so benützen wir zu diesen und ähnlichen Operationen Porzellanbecher, die mit der Flüssigkeit gefüllt in einem Autoclaven von Kupfer oder Eisen erhitzt werden.

2) E. Fischer, Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch. **32**, 2454.

Die durch Schwefelwasserstoff vom Kupfer befreite Lösung wurde fractionirt krystallisirt, wobei die leichtlöslichen Theile durch Zusatz von Alkohol abgeschieden wurden, dann einer erneuten systematischen Krystallisation unterworfen, bis schliesslich die leicht löslichen Partien die Zusammensetzung der Aminovaleriansäure zeigten.

So gelang es, allerdings mit vieler Mühe, 3 g eines Präparats zu isoliren, welches, abgesehen von der gutstimmenden Analyse, auch in seinen äusseren Eigenschaften den Eindruck einer einheitlichen Substanz machte.

0,1917 g Substanz gaben 0,3602 g CO_2 und 0,1608 g H_2O .

0,2129 g " " " " 22 ccm N bei $19,5^\circ$ u. 755 mm.

$\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_2$ berechnet: 51,28% C, 9,40% H, 11,95% N;

gefunden: 51,23% C, 9,33% H, 11,77% N.

0,3651 g Substanz in 3,9354 g 20%iger Salzsäure gelöst. Mithin 8,49% Gehalt. Specifisches Gewicht 1,09. Drehung im 1-Decimeterrohr $2,4^\circ$ nach rechts. Das entspricht

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +25,9.$$

Der Werth stimmt ungefähr überein mit den Zahlen, welche der eine von uns für die Aminovaleriansäure aus Casein fand (27,1) und mit denjenigen, die E. Schulze und E. Winterberger¹⁾ an der aus Keimlingen von Lupinen erhaltenen Säure beobachteten (+28,2 und +27,9).

Auf die geringen Unterschiede ist kein Werth zu legen, da, wie schon gesagt, bei der Hydrolyse von Proteinsubstanzen durch starke Salzsäure stets ein Theil der Aminosäuren racemisirt wird und die Isolirung der reinen activen Säure durch Krystallisation kaum möglich ist.

Wir halten es deshalb für wahrscheinlich, dass die Aminovaleriansäure aus Casein, Horn und Lupinen die gleiche ist.

Um ein Urtheil über die Structur dieser Säure zu gewinnen, haben wir das Präparat aus Horn durch 18stündiges Erhitzen mit überschüssigem Barythydrat auf 180° racemisirt und nach dem Ausfällen des Baryts die Aminosäure in den Phenylcyanatkörper und dessen Anhydrid verwandelt.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXV, S. 300.

Das erste schmolz unter Zersetzung bei 162,5° (corr.) und der Schmelzpunkt des letzteren lag bei 123° (corr.).

Die Analyse des Anhydrids gab folgende Zahlen:

0,1998 g Substanz gaben 0,4825 g CO₂ und 0,1179 g H₂O.

C₁₂H₁₁N₂O₂ berechnet: 66,05% C, 6,42% H.

gefunden: 65,83% C, 6,55% H.

Die beiden Schmelzpunkte sind allerdings etwas verschieden von den Werthen, die früher für die entsprechenden Derivate der Aminovaleriansäure aus Casein gefunden wurden.¹⁾ Wir glauben jedoch, dass die jetzt untersuchte Säure reiner war, da uns eine erheblich grössere Menge Material zur Verfügung stand. Um so mehr Interesse verdient die Uebereinstimmung der jetzt beobachteten Schmelzpunkte mit denjenigen, welche M. Slimmer im hiesigen Laboratorium für die beiden Phenyleyanatverbindungen der synthetischen α -Aminoisovaleriansäure fand.²⁾

Wir halten es daher für recht wahrscheinlich, dass die im Horn, ferner, wie oben erwähnt, im Casein und in den Keimlingen von *Lupinus* beobachtete Aminovaleriansäure die active α -Aminoisovaleriansäure



Fraction 80—85°.

Die Gesamtmenge der Aminosäuren aus A und B betrug 136 g. Sie wurde zuerst durch Krystallisation aus heissem Wasser in 4 Fractionen zerlegt und zwar aus A 3 Fractionen zu 50, 25 und 26 g und aus B 1 Fraction zu 25 g. Jede dieser Fractionen wurde zur Isolirung der α -Pyrrolidincarbonsäure, welche sich jedoch hauptsächlich in der dritten Fraction von A befand, mit der zehnfachen Menge absoluten Alkohols ausgekocht und der alkoholische Auszug mit dem aus der vorigen Fraction gewonnenen vereinigt.

Beim Einengen der alkoholischen Lösung fiel zunächst eine kleine Menge (5 g) gewöhnlicher Aminosäuren aus. Um diese möglichst vollständig zu entfernen, verdampft man zur

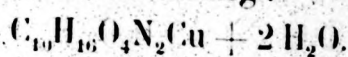
1) Diese Zeitschrift, Bd. XXXIII, S. 160.

2) Berichte, Bd. 35, S. 403.

Trockne, kocht den Rückstand wieder mit Alkohol aus, verdampft das Filtrat abermals und wiederholt die Lösung in Alkohol. So wurden schliesslich 30,5 g α -Pyrrolidincarbon-säure gewonnen, welche fast frei von gewöhnlichen Säuren war.

Für die Trennung der activen und der racemischen Verbindung dienten wie früher die Kupfersalze, von denen das active Salz in Alkohol leicht löslich ist, während das racemische ungelöst zurückbleibt.

Das racemische pyrrolidincarbon-säure Kupfer, welches aus Wasser in schön ausgebildeten blauen Prismen krystallisirte, zeigte die Zusammensetzung:



0,3121 g Substanz verlor bei 120° 0,0340 g H_2O .

Berechnet: 10,99% H_2O ;

Gefunden: 10,90% H_2O .

0,2531 der wasserfreien Substanz gaben 0,0687 CuO .

Berechnet: 21,81% Cu .

Gefunden: 21,66% Cu .

Die racemische Säure schmolz unter Zersetzung bei 203—204°. Ihre Gesammtmenge betrug 11 g.

Zur Identificirung der activen Säure diente das Anhydrid der Phenylcyanatverbindung. Es schmolz bei 143° und gab folgende Zahlen:

0,1617 g Substanz gaben 0,3957 g CO_2 und 0,0845 g H_2O .

0,1557 g „ „ „ 17,5 g bei 19,5° und 758 mm.

$\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$ berechnet: 66,67% C , 5,57% H , 12,96% N ;

gefunden: 66,74% C , 5,82% H , 12,92% N .

Zur Bestimmung der optischen Drehung wurden 0,3956 g in 4,4836 g 20%iger Salzsäure gelöst. Mithin Gehalt 8,1%, specifisches Gewicht 1,120, Drehung 4,33° nach links.

$$\text{Also } [\alpha]_{\text{D}}^{20} = -47,60^\circ.$$

Der Werth stimmt mit dem früher für das Präparat aus Casein gefundenen gut überein.

Die in Alkohol unlöslichen Aminosäuren dieser Fraction bestanden zum grössten Theil aus Leucin, welches bekanntlich durch Krystallisation aus heissem Wasser wegen seiner geringen Löslichkeit gut gereinigt werden kann. Es gelang daher leicht, 70 g ganz reines Leucin darzustellen.

Die optische Drehung des zuerst auskrystallisirten Products zeigte eine geringe Differenz gegen diejenige der zweiten Fraction.

a) 1,0485 g Leucin in 21,0061 g Salzsäure von 20% gelöst: mithin Procentgehalt 4,75, spezifisches Gewicht 1,11, Drehung im 2-Decimeterrohr 1,96 nach rechts

$$[\alpha]_D^{20} = + 18,5^{\circ}.$$

b) 1,1291 g Leucin in 20,2315 g Salzsäure von 20% gelöst: mithin Procentgehalt 5,28, spezifisches Gewicht 1,12, Drehung im 2-Decimeterrohr 2,09 nach rechts.

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

Die Analyse gab folgende Werthe:

0,2329 g Substanz gaben 0,4686 g CO₂ und 0,2099 g H₂O.

0,3195 g » » 29,6 cem N bei 21° und 761 mm.

C₆H₁₃NO₂ berechnet: 54,96% C, 9,92% H, 10,69% N;

gefunden: 54,88% C, 10,02% H, 10,58% N.

Die höher siedenden Fractionen von A und B sind getrennt untersucht worden.

Fraction 85—110° (A).

Die Fraction war sehr klein (3 g) und bestand im Wesentlichen aus Leucinester.

Fraction 85—110° (B).

Sie enthielt Ester von Leucin, Asparaginsäure, Serin und einer bisher noch unbekanntes Aminosäure. Ihre Verarbeitung war wesentlich auf die Isolirung des Serins gerichtet. Zu dem Zwecke wurden die 22 g Ester dieser Fraction mit 5 cem Wasser versetzt und mit dem achtfachen Volumen Petroläther ausgeschüttelt, wodurch Leucin und Asparaginsäure entfernt wurden. Die wässrige Schicht enthielt den grössten Theil der übrigen Bestandtheile. Sie wurde zunächst mit Barytwasser verseift und nach dem genauen Ausfällen des Baryts unter vermindertem Druck zur Trockne verdampft. Der Rückstand wurde mit dem sechsfachen Volumen Alkohol ausgekocht. Hierbei geht die oben erwähnte, unbekanntes Substanz in Lösung: sie bleibt beim Verdampfen des Alkohols als dicker Syrup

zurück und konnte bisher leider nicht in eine analysirbare Form gebracht werden. Das Kupfersalz dieser Säure, welches ebenfalls nicht krystallisirt, ist zum Unterschied vom activen α -pyrrolidincarbonsauren Kupfer unlöslich in Alkohol.

Der im Alkohol unlösliche Theil enthielt das Serin. Er wurde in wenig kaltem Wasser gelöst, von einem geringen Rückstand abfiltrirt, dann mit Thierkohle gekocht und nach dem starken Einengen der Krystallisation im Exsiccator über Schwefelsäure überlassen. Die Menge der erhaltenen Krystalle betrug 4,5 g. Nach einmaligem Umlösen aus Wasser war das Präparat rein.

0,2375 g gaben 0,2963 g CO_2 und 0,1440 g H_2O

0,2120 gr gaben 23,8 ccm N bei 14° und 758 mm.

$\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_3$ berechnet: 34,29% C, 6,67% H, 13,32% N.

gefunden: 34,02% C, 6,74% H, 13,18% N.

Es war optisch inactiv und zeigte sowohl in Schmelzpunkt wie auch in Geschmack und Krystallform völlige Uebereinstimmung mit dem einerseits aus Seide,¹⁾ andererseits durch Synthese²⁾ gewonnenen Serin. Das Product begann bei 220° sich zu bräunen und schmolz bei 243—244° unter Zersetzung.

Fraction 115—140° (A).

Sie enthält u. A. die Ester von Phenylalanin, Asparaginsäure und Glutaminsäure. Zur Isolirung des Phenylalanins wurde sie zuerst mit dem doppelten Volumen Aether vermischt und die ätherische Lösung dreimal mit dem doppelten Volumen Wasser durchgeschüttelt, wobei die Ester der Glutaminsäure und Asparaginsäure ins Wasser gingen. Die ätherische Lösung wurde eingedampft und der Rückstand mit starker Salzsäure auf dem Wasserbade abgeraucht. Der Rückstand ist alsdann ein Gemisch von salzsaurem Phenylalanin und einem sehr übel riechenden Oel. Dies letztere liess sich mit Aether vom Phenylalanin trennen. Beim Abdampfen des Aethers hinter-

1) Diese Zeitschrift Bd. XXIII, S. 177. Cramer, Journ. f. pract. Chemie Bd. 96, S. 76.

2) E. Fischer und H. Lench's Sitzungsber. der kgl. Akademie der Wissenschaften 1902, Bd. VI.

blieb es als gelbes schwefelhaltiges, aber stickstofffreies Oel (im Ganzen 6 g), das besonders in der Verdünnung intensiv nach faulem Fleisch roch und bei 10 mm Druck zwischen 197 und 203° kochte.

Das salzsaure Phenylalanin wurde nochmals aus starker Salzsäure gereinigt. Durch Abdampfen mit Ammoniak und Auslaugen des Rückstandes mit kaltem Wasser liess sich das Phenylalanin leicht isoliren und durch Umkrystallisiren aus heissem Wasser reinigen.

0.2197 g Substanz gaben 0.5181 g CO₂ und 0.1355 g H₂O

0.1825 g „ „ „ 13.2 ccn N bei 19.5° und 767 mm.

C₉H₁₁NO₂ berechnet: 65.43% C, 6.66% H, 8.48% N;

gefunden: 64.32% C, 6.85% H, 8.37% N.

Das Product war zum grössten Theil racemisirt, denn die optische Bestimmung gab $[\alpha]_{D}^{20} = + 11,21$.

Die Ausbeute an Phenylalanin aus dieser Fraction betrug 11 g, die Gesamtausbeute aus sämtlichen Fractionen 26 g.

Die mit Baryt verseifte, wässerige Lösung der ätherlöslichen Ester dieser Fraction bestand zum grössten Theil aus Asparaginsäure und Glutaminsäure. Sie wurden mit dem entsprechenden Theil von 110—135° (B) zusammen weiter verarbeitet.

Fraction 110—135° (B).

Diese Fraction wurde zunächst wieder auf Serin verarbeitet, es gelang noch 1,5 g desselben zu isoliren. Dann wurde genau wie bei der vorigen Fraction das Phenylalanin (4 g) entfernt und der Rest mit Barytwasser verseift. Hierbei krystallisirten 8 g racemischer asparaginsaures Baryt, während noch ein grösserer Theil des Salzes der activen Säure in Lösung blieb.

Nach dem Ausfällen des Baryts wurde zunächst aus diesem Theil von A und B der grösste Theil der Glutaminsäure mit concentrirter Salzsäure entfernt, dann aus der salzsauren Lösung der Asparaginsäure die Salzsäure verdampft und schliesslich mit Silbercarbonat gefällt und endlich die Asparaginsäure als Kupfersalz abgeschieden.

Das Kupfersalz wurde bei 130° bis zur Gewichtsconstanz getrocknet.

0.3291 g gaben 0.0954 g H₂O ab.
 $C_4H_5NO_4Cu + 4\frac{1}{2} H_2O$ berechnet: 29.45% H₂O;
 gefunden: 28.99% H₂O.

Die optische Bestimmung ergab, dass die aus dem Kupfersalz isolirte Säure fast reines optisch actives Product war. 0.5612 g Substanz in 6.8013 g 10%iger Salzsäure gelöst; mithin 8.25 Procentgehalt und 1.06 spec. Gew. Drehung im 2-Decimeterrohr 3.84° nach rechts. Also

$$[\alpha]_D^{20} = + 22.0.$$

Die aus dem krystallisirten Barytsalz isolirte Asparaginsäure war racemisch.

0.2196 g Substanz gaben 0.2900 CO₂ und 0.1057 g H₂O.
 0.1597 g " " " 14.3 ccm N bei 17.5° und 760 mm.
 $C_4H_7NO_4$ berechnet: 36.09% C, 5.26% H, 10.53% N;
 gefunden: 36.00% C, 5.35% H, 10.39% N.

Fraction 140—155° (A).

Die Fraction enthielt Phenylalanin und Glutaminsäure neben wenig Asparaginsäure.

Fraction 140—155° (B).

Nach dem Entfernen des Phenylalanins waren aus der wässerigen Lösung der Barytsalze 7 g eines schön krystallisirten Barytsalzes ausgefallen.

Es wurde als das Salz der racemischen Glutaminsäure erkannt. Die Analyse der freien Säure ergab folgende Zahlen.

0.1716 g Substanz gaben 0.2553 g CO₂, 0.0977 g H₂O.
 0.1598 g " " " 12.8 ccm N bei 16° und 764 mm.
 $C_5H_9NO_4$ berechnet: 40.81% C, 6.12% H, 9.52% N;
 gefunden: 40.56% C, 6.32% H, 9.38% N.

Aus dem Barytsalz, welches in Wasser gelöst blieb, wurde active Glutaminsäure gewonnen.

0.5731 g Substanz in 9.4560 g 20%iger Salzsäure gelöst: mithin 5.71 Procentgehalt und 1.026 spec. Gew. Drehung im 2-Decimeterrohr 3.74° nach rechts. Also

$$[\alpha]_D^{20} = + 31.91,$$

während die aus Gelatine¹⁾ isolirte Glutaminsäure unter den gleichen Bedingungen

$$[\alpha]_D^{20^\circ} = 30,45$$

und die aus Casein

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

ergab.

Fraction 155—195^o (A)
und Fraction 155—185^o (B).

Auch diese Fractionen enthielten wiederum Phenylalanin und Glutaminsäure und ausserdem eine bisher unter den Spaltungsproducten der Proteinkörpern noch nicht beobachtete Substanz, die Pyrrolidoncarbonsäure.

Für die Isolirung der letzteren wurden die Ester zunächst mit Baryt verseift, von den schwer löslichen Barytsalzen filtrirt, das Filtrat vom Baryt mit Schwefelsäure genau befreit, dann zur Trockne verdampft und mit Alkohol ausgekocht. Nach dem Kochen mit Thierkohle schied die stark eingeeengte alkoholische Lösung beim Erkalten die Pyrrolidoncarbonsäure in schön ausgebildeten, schneeweissen Krystallen ab, die bei 147^o schmolzen.

0,1815 g Substanz gaben 0,3115 g CO₂ und 0,0942 g H₂O.

0,1991 g " " " 18,9 ccm N bei 20^o und 762 mm.

C₅H₇NO₃ berechnet: 46,51% C, 5,42% H, 10,86% N;

gefunden: 46,81% C, 5,76% H, 10,91% N.

Ueber den Ursprung dieser Säure kann man nicht zweifelhaft sein, sie ist offenbar aus Glutaminsäure, aus der sie auch schon früher erhalten wurde,²⁾ secundär entstanden. Ihre Gesamtmenge betrug 15 g.

Ihre Bildung ist mit daran Schuld, dass die Ausbeute an Glutaminsäure verhältnissmässig gering war.

Es ist deshalb jedenfalls rationeller, die Glutaminsäure, wenn sie in irgendwie erheblicher Menge bei der Hydrolyse eines Proteinstoffes entsteht, dadurch zu isoliren, dass man die ur-

1) Fischer, Aders und Levene, Diese Zeitschr., Bd. XXXV, S. 70

2) Monatshefte für Chemie III, 228. Gazetta Chimica 24 I, 370.

sprüngliche salzsaure Lösung stark eindampft und die Masse nach dem Sättigen mit Salzsäuregas der Krystallisation überlässt.¹⁾

Zum Schluss stellen wir die gesammten Mengen der von uns in den Spaltungsproducten des Horns nachgewiesenen Aminosäuren zusammen in Procenten 1. vom rohen und 2. vom getrockneten Horn.

1.	2.
0,3 %	0,34 % Glycocoll
1,0 %	1,20 % Alanin
5,0 %	5,70 % α -Aminoisovaleriansäure
16,0 %	18,30 % Leucin
3,0 %	3,60 % α -Pyrrolidincarbonsäure
0,6 %	0,68 % Serin
2,6 %	3,00 % Phenylalanin
2,2 %	2,50 % Asparaginsäure
2,6 %	3,00 % Glutaminsäure
1,5 %	1,70 % Pyrrolidonecarbonsäure
34,8 %	40,02 %

Wie in früheren Fällen bemerken wir auch hier, dass alle diese Werthe hinter der wirklichen Menge der Aminosäuren erheblich zurückbleiben. So ist der Glutaminsäuregehalt zweifelsohne viel grösser, denn Horbaczewski fand denselben zu 15%.

Das Tyrosin und Cystin sind gar nicht berücksichtigt, dasselbe gilt von den Diaminosäuren, da diese Producte, wie früher erwähnt, bei dem von uns eingeschlagenen Verfahren nicht gewonnen werden.

Wir machen endlich darauf aufmerksam, dass auch unser Verfahren keine erschöpfende Methode für die Aufsuchung der Monoaminosäuren ist, dass wir im Gegentheil das Vorhandensein verschiedener noch unbekannter Substanzen dieser Klasse im Horn vermuthen müssen.

¹⁾ Hlasiwetz und Habermann, Annalen der Chemie 169, 150.