

Vergleichende Untersuchungen über den Gehalt der verschiedenen Bestandteile des Nervensystems an Aminosäuren.

II. Mitteilung.

Die Aminosäuren der grauen und weißen Substanz des Gehirns.

Von

Emil Abderhalden und Arthur Weil.

(Aus dem physiologischen Institute der Universität Halle a. S.)

(Der Redaktion zugegangen am 24. Januar 1913.)

Man begegnet in der Literatur vielfach der Angabe, daß die graue Substanz des Gehirns fast doppelt so viel Eiweiß enthalte, wie die weiße Substanz. Diese Annahme stützt sich in der Hauptsache auf eine Arbeit Petrowskys.¹⁾ Dieser Forscher extrahierte Gehirns substanz erschöpfend mit Alkohol und Äther, bestimmte in dem Rückstand den Stickstoff, multiplizierte die gefundene Zahl mit 6,25 und berechnete die so erhaltenen Werte auf 100 g Trockensubstanz. So fand er für graue Nervensubstanz 55,37% Albuminstoffe und Glutin, für die weiße 27,73%. Berechnet man diese Zahlen auf die frische Substanz [für graue Substanz 81,60% H₂O, für weiße Substanz 68,35% H₂O], so ergibt sich für die Rinde ein Eiweißgehalt von 10,2%, für die weiße Substanz von 8,8%. Die Differenz zwischen Grau und Weiß beträgt somit nur noch ca. 8,5% und nicht 50%, wie bis jetzt angegeben worden ist. Ferner ist zu berücksichtigen, daß der nach der Extraktion mit Alkohol und Äther verbleibende Stickstoff nicht allein auf

¹⁾ D. Petrowsky, Zusammensetzung der grauen und weißen Substanz des Gehirns. Pflügers Archiv für die gesamte Physiologie, Bd. 7, S. 367, 1873. Weitere Literaturangaben vgl. Sammelreferat: Die Chemie des Gehirns von A. Weil, Zeitschrift für die gesamte Neurologie und Psychiatrie. Abtl. Referate und Ergebnisse, Bd. 6, Heft 9, 1913.

Eiweiß entfällt, sondern daß sicher noch andere stickstoffhaltige Substanzen zurückgeblieben sind. Wir fanden bei unseren Untersuchungen, daß bei der Infreiheitsetzung der aus der grauen Substanz gewonnenen Aminosäureester ca. 32% des Gesamtstickstoffs vom Äther aufgenommen wurden, bei der weißen ca. 28%. Nach unserer früheren Annahme eines Verlustes von ca. 50%¹⁾ würden also bei der grauen Substanz vom Gesamtstickstoff ca. 64%, bei der weißen ca. 56% auf Aminosäurenstickstoff entfallen. Geht man von den isolierten einzelnen Aminosäuren aus, dann berechnet sich für beide Nervensubstanzarten ein Eiweißgehalt von etwa 6 bis 8%.

Vergleicht man den Gehalt der frischen grauen Substanz, der weißen Substanz, ferner des Rückenmarks und der peripheren Nerven¹⁾ an einzelnen Aminosäuren untereinander, so ergibt sich eine gute Übereinstimmung in den Ausbeuten an den einzelnen Bausteinen bei den erwähnten vier Protein-

100 g frische Substanz enthalten:

| Aminosäuren | Graue Substanz | Weißer Substanz | Rückenmark | Periphere Nerven |
|-------------------------|----------------|-----------------|------------|------------------|
| Glykokoll | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Alanin | 0,14 | 0,13 | 0,18 | 0,24 |
| Valin | 0,26 | 0,29 | 0,15 | 0,20 |
| Leucin und Isomere . . | 0,66 | 0,63 | 0,39 | 0,38 |
| Serin | — | 0,02 | 0,006 | 0,01 |
| Asparaginsäure | 0,07 | 0,02 | 0,02 | — |
| Glutaminsäure | 0,50 | 0,34 | 0,36 | 0,59 |
| Lysin | 0,39 | 0,39 | 0,18 | 0,28 |
| Arginin | 0,13 | 0,38 | 0,21 | 0,26 |
| Phenylalanin | — | 0,03 | — | — |
| Tyrosin | 0,26 | 0,18 | 0,14 | 0,17 |
| Prolin | 0,04 | 0,04 | 0,02 | 0,04 |
| Tryptophan | + | + | + | + |
| Histidin | 0,03 | 0,08 | 0,02 | 0,04 |
| | 2,48 | 2,53 | 1,68 | 2,21 |

¹⁾ Emil Abderhalden und Arthur Weil, Die Aminosäuren der peripheren Nerven und der Leitungsbahnen des Rückenmarks (weiße Substanz). Diese Zeitschr., Bd. 81, S. 207, 1912.

gemischen. Wahrscheinlich würde die Übereinstimmung eine noch bessere sein, wenn die zurzeit zur Verfügung stehenden Methoden quantitative Bestimmungen der einzelnen Aminosäuren ermöglichten. Daß trotz der Beteiligung der gleichen Bausteine in annähernd gleichen Mengenverhältnissen große Strukturunterschiede zwischen den verschiedenen Proteinarten vorhanden sein können, ist an dieser Stelle oft betont worden.

Zu unseren Versuchen verwandten wir das Gehirn von Rindern. Wir führten die vergleichenden Untersuchungen auch an verschiedenen anderen Tiergehirnen durch und erweiterten dadurch die Arbeiten v. Bibras¹⁾ und Masudas,²⁾ die das Gesamthirn ohne Berücksichtigung von Rinde und Leitungsbahnen auf Wasser, Asche, Fett, Stickstoff und Phosphor untersuchten. Unsere Ergebnisse bestätigen die bisherige Annahme einer weitgehenden Ähnlichkeit der Gehirne in den verschiedensten Stadien der phylogenetischen Entwicklungsreihe. Auch bei den Haustieren besteht, wie beim Menschen, dieselbe Differenz im Wassergehalt von grauer und weißer Substanz. Der Stickstoffgehalt (nach Kjeldahl) schwankt innerhalb enger Grenzen. Der höhere Aschengehalt der weißen Substanz ist wahrscheinlich zum Teil wenigstens auf den größeren Schwefelgehalt zurückzuführen.³⁾ Vergleichende quantitative Untersuchungen der einzelnen Aschenbestandteile der verschiedenartigen Nervensubstanzen sind im Gange.

Die folgende Tabelle (S. 428) gibt einen Überblick über den Wasser-, Stickstoff- und Aschengehalt von Nervensubstanzen verschiedener Tierarten.

Die Übereinstimmung der einzelnen Werte in der vorliegenden Tabelle würde vermutlich eine noch größere sein, wenn es gelänge, die verschiedenen Nervensubstanzen unter

¹⁾ A. v. Bibra, Über das Gehirn, Annalen der Chemie. Neue Reihe, Bd. 9, S. 201, 1853.

²⁾ N. Masuda, Beitrag zur Analyse des Gehirns, insbesondere über den Cholesterin- und Fettsäuregehalt desselben. Biochem. Zeitschr., Bd. 25, S. 161, 1910.

³⁾ J. L. W. Thudichum, Die chemische Konstitution des Gehirns des Menschen und der Tiere. Tübingen 1901.

100 g frische Substanz enthalten:

| | Gesamthirn | | | Graue Substanz | | | Weiße Substanz | | |
|----------------------------|------------|------|-------------------|----------------|------|-------|----------------|------|-------|
| | Wasser | N | Asche | Wasser | N | Asche | Wasser | N | Asche |
| Mensch ¹⁾ . . . | 77,3 | 1,79 | 1,5 ²⁾ | 84 | 1,74 | 1,0 | 70,4 | 1,70 | 1,75 |
| Rind | — | — | — | 81,4 | 1,66 | 1,53 | 71,3 | 1,67 | 2,38 |
| Hammel | — | — | — | 84,1 | 1,70 | 1,38 | 75,6 | 1,57 | 2,15 |
| Hund | — | — | — | 78,7 | 1,70 | 1,51 | 70,7 | 1,82 | 2,69 |
| Kaninchen . . . | 76,6 | 1,72 | 1,82 | — | — | — | — | — | — |
| Gans | 82,5 | 1,65 | 1,72 | — | — | — | — | — | — |
| Frosch | 83,8 | 1,54 | 1,61 | — | — | — | — | — | — |
| Karpfen | 74 | 1,25 | 2,23 | — | — | — | — | — | — |

genau den gleichen Bedingungen zu untersuchen. Es läßt sich z. B. beim Herauspräparieren eine gewisse Verdunstung nicht vermeiden.

Experimenteller Teil.

I. Graue Substanz.

Als Ausgangsmaterial dienten ganz frische Rindergehirne, die wir einige Stunden nach der Tötung der Tiere von dem hiesigen Schlachthofe erhielten. Nach dem Abziehen der Häute und gründlichem Entbluten in fließendem Wasser wurde mit

¹⁾ Durchschnittszahlen für Wasser nach folgenden Angaben: M. Bernhardt, Über den Wassergehalt des menschlichen Zentralnervensystems. Virchows Archiv, Bd. 64, S. 297, 1875. — A. v. Bibra, l. c. — J. Forster, Versuch über die Bedeutung der Aschebestandteile der Nahrung. Zeitschr. f. Biologie, Bd. 9, S. 363, 1873. — E. Fremy, Untersuchungen über das Gehirn. Annal. d. Chemie, Bd. 40, S. 69, 1841. — A. Magnus-Levy, Über den Gehalt normaler menschlicher Organe an Chlor, Calcium, Magnesium und Eisen, sowie an Wasser, Eiweiß und Fett. Biochem. Zeitschr., Bd. 24, S. 363, 1910. — J. Novi, Einfluß des Chlornatriums auf die chemische Zusammensetzung des Gehirns. Pflügers Archiv f. d. ges. Physiologie, Bd. 48, S. 320, 1891. — D. Petrowsky, l. c. — H. Schulz, Über den Schwefelgehalt menschlicher und tierischer Gewebe. Pflügers Archiv, Bd. 54, S. 561, 1893. — Fr. N. Schulz, Über die Verteilung von Fett und Eiweiß beim mageren Tier. Pflügers Archiv, Bd. 66, S. 154, 1897.

²⁾ J. L. W. Thudichum, l. c.

Filtrierpapier abgetrocknet und nach erfolgter Trennung beider Hemisphären, die grauen Massen herausgeschält und die Rinde mit einem scharfen Skalpell abgeschabt. Auf diese Weise kann man eine gute Trennung von weißer und grauer Substanz erreichen. Man arbeitet dabei allerdings unter Verlusten, weil etwas von der grauen Substanz an der weißen haften bleibt. Das von Löwe¹⁾ angegebene Verfahren, das auf einer Trennung der spezifisch verschieden schweren Substanzen in Ammonsulfatlösung beruht, konnten wir nicht anwenden, da wir alle Prozesse durch Stickstoffanalysen verfolgten. Wir arbeiteten ca. 40 Gehirne. Die Ausbeute betrug etwa 3 kg an grauer Substanz und 5 kg an weißer.

Um Vergleichswerte zu erhalten, arbeiteten wir unter genau den gleichen Versuchsbedingungen, wie beim Rückenmark und den peripheren Nerven.

Zunächst bestimmten wir den Wassergehalt durch Trocknen bei 100—105° bis zur Gewichtskonstanz, den Stickstoffgehalt nach Kjeldahl¹⁾ und den Aschegehalt durch Glühen bis zur Gewichtskonstanz im Porzellantiegel über der Gebläseflamme.

Analysen: 1. Bestimmung des Wassergehaltes.

| | | |
|-------------------|---------------------------|----------------------------|
| 6,6708 g verloren | 5,5318 g H ₂ O | = 82,9% |
| 4,3012 » | 3,4846 » | = 81,0% |
| 6,9056 » | 5,5400 » | = 80,3% |
| | | <u>Durchschnitt: 81,4%</u> |

2. Bestimmung des Stickstoffgehaltes.

| | | |
|-------------------|--|----------------------------|
| 4,9310 g verloren | 59,75 ccm $\frac{1}{10}$ -H ₂ SO ₄ | N = 1,69% |
| 2,5964 » | 29,95 » | = 1,62% |
| 2,2852 » | 27,35 » | = 1,68% |
| | | <u>Durchschnitt: 1,66%</u> |

3. Bestimmung des Aschegehaltes.

| | | |
|--------------------------|----------------------|-----------------------------|
| 1,7810 g trockene Subst. | gaben 0,1236 g Asche | = 1,29% der frischen Subst. |
| 1,5732 » | 0,1578 » | = 1,76% » |
| | | <u>Durchschnitt: 1,53%</u> |

¹⁾ Siegfried Löwe, Über die Trennung weißer und grauer Hirnsubstanz. Zeitschr. f. biologische Technik und Methodik, Bd. 2, S. 177, 1911.

Extraktion der frischen Substanz mit Tetrachlorkohlenstoff
(90,5 g).

| | Stickstoffgehalt | |
|-------------------------------|------------------|------|
| | g | % |
| Ausgangsmaterial | 1,497 | 100 |
| Extrakt | 0,608 | 40,6 |
| Hydrolysenfiltrat | 0,837 | 56 |
| Hydrolysenrückstand | 0,052 | 3,4 |

Isolierung der Monoaminosäuren.

2020 g frische Substanz wurden mit 8 l konzentrierter Salzsäure übergossen. Das Gemisch wurde 2 Tage unter wiederholtem Umschütteln bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Dann wurde 8 Stunden am Rückflußkühler gekocht. Nach dem Eindampfen und dreimaliger Veresterung des Rückstandes wurden die Ester mit Natronlauge und Kaliumcarbonat in Freiheit gesetzt und nach 12stündigem Trocknen über Magnesiumsulfat in 6 Fraktionen destilliert. Wir fraktionierten abweichend von der bisherigen Regel in der doppelten Zahl von Fraktionen, um eine Trennung der von uns früher beobachteten Leucinisomeren zu ermöglichen.

| | | | | | |
|--------------|------|------------------|--------|-----------------------|--------|
| I. Fraktion: | 80° | des Wasserbades; | 12 mm, | bis 40° ¹⁾ | |
| II. » | 100° | » | 12 » | » 82° | 47 g |
| III. » | 100° | » | 0,1 » | » 65° | 11,5 » |
| IV. » | 120° | Ölbades; | 0,1 » | » 80°—97° | 29,3 » |
| V. » | 120° | » | 0,1 » | » 104°—106° | 8 » |
| VI. » | 150° | » | 0,1 » | » 135° | 8,2 » |

Destillationsrückstand: 56 g.

Fraktion I—V wurden mit Wasser verseift. Fraktion VI und der Rückstand kochten wir mit Salzsäure. Aus dem letzteren wurde der größte Teil der Glutaminsäure als Chlorhydrat gewonnen. Identifiziert werden konnten: Alanin, Va-

¹⁾ Das Gewicht der ersten Fraktion ist nicht bestimmt worden, weil sie stets neben Aminosäureestern auch Alkohol enthält.

lin, Glutaminsäure, Asparaginsäure und Prolin. Leucin wurde in verschiedenen Krystallfraktionen mit ziemlich gutem spezifischen Drehungswinkel beobachtet. Die angegebenen Werte beziehen sich auf alle Krystallfraktionen mit einem Stickstoffgehalt von 10,58—10,75%. Serin und Phenylalanin konnten nicht mit Sicherheit nachgewiesen werden. Da jedoch ihr Nachweis in der weißen Substanz, von der größere Mengen verarbeitet wurden, glückte, ist es, nach der sonstigen Übereinstimmung in den Befunden an einzelnen Aminosäuren, sehr wahrscheinlich, daß Serin und Phenylalanin auch der grauen Substanz zukommen. Glykokoll fehlt, ebenso wie im Rückenmark, vollkommen. In der Rückenmarkssubstanz konnten wir diese Aminosäure auch nicht nach Verarbeitung von 15 kg auffinden.

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die Verteilung des Stickstoffs bei den einzelnen Operationen.

| | g N | % von 1. | % von 2. | % von 3. |
|----------------------------------|-------|-------------|-------------|--------------|
| 1. Ausgangsmaterial | 32,9 | 100 | — | — |
| 2. Hydrolysat | 31,1 | 94,5 | 100 | — |
| Hydrolysenrückstand | 1,8 | 5,5 | — | — |
| 3. Ätherextrakt | 10,58 | 32,2 | 34 | 100 |
| Rückstand b. d. Infreihetsetzung | 20,3 | 61,6 | 65,1 | — |
| I. Fraktion | 1,38 | 4,2 | 4,4 | 13 |
| II. > | 0,28 | 0,86 | 0,91 | 2,68 |
| III. > | 0,57 | 1,7 | 1,8 | 5,4 |
| IV. > | 2,49 | 7,58 | 8,02 | 23,6 |
| V. > | 0,74 | 2,24 | 2,37 | 6,97 |
| VI. > | 0,077 | 0,22 | 0,24 | 0,73 |
| Destillationsrückstand | 3,97 | 12,1 | 12,7 | 38,4 |
| | | | | <u>90,78</u> |

Um einen Überblick über die bei der fraktionierten Krystallisation gewonnenen einzelnen Gemische zu geben, sei die folgende Zusammenstellung angeführt:

| Fraktion | g | N % | F | [α] _D ^{20°} in | | Identifiziert als ¹⁾ |
|-----------|-------|-------|------|---|----------|---------------------------------|
| | | | | Wasser | 20% HCl | |
| I | 1,259 | 12,9 | 237° | - 4,67° | + 7,65° | Leucin + Alanin |
| II, 1 | 0,597 | 10,80 | 290° | - 5,72° | + 15,2° | Leucin |
| 2 | 0,757 | 10,95 | 292° | - 5,78° | + 9,73° | . |
| 3 | 1,385 | 12,90 | 262° | - 1,80° | + 18,9° | Leucin + Alanin |
| III, 1 | 0,333 | 10,74 | 290° | - 6,84° | + 6,57° | Leucin |
| 2 | 0,556 | 11,06 | 268° | - 7,22° | + 8,45° | Leucin + Valin |
| 3 | 0,219 | 11,32 | 285° | - | + 10,5° | , + , |
| IV, 1 | 0,758 | 10,61 | 287° | - 3,49° | + 4,75° | Leucin |
| 2 | 0,478 | 10,57 | 290° | - 6,29° | + 9,5° | . |
| 3 | 3,496 | 10,66 | 290° | - 6,26° | + 17,5° | . |
| 4 | 1,989 | 10,68 | 286° | - 5,69° | + 14,7° | . |
| 5 | 1,512 | 11,55 | 280° | - 4,57° | + 7,87° | Valin + Leucin |
| 6 | 1,962 | 12,78 | 282° | + 4,85° | + 18,37° | Alanin + Valin |
| 7 | 2,70 | 12,49 | 222° | - 10,45° | + 2,04° | Alanin + Valin + Leucin |
| 8 | 0,924 | 13,45 | 204° | - 7,67° | + 0,00° | Alanin? + Valin + Leucin |
| V, 1 | 0,854 | 10,60 | 282° | - 4,00° | + 5,06° | Leucin |
| 2 | 1,075 | 10,70 | 285° | - 6,79° | + 8,75° | . |
| 3 | 0,289 | 10,40 | 276° | - 7,71° | + 9,37° | . |
| 4 | 0,506 | 9,22 | 205° | - | - | Glutaminsäure |
| VI, 1 | 0,264 | 10,63 | 290° | - 6,83° | + 11,78° | Leucin |
| 2 | 0,127 | 9,57 | 210° | - | + 15,7° | Glutaminsäure |
| 3 | 1,031 | 10,45 | 290° | - | + 5,42° | Asparaginsäure |
| 4 | 0,682 | 9,94 | - | + 8,4° | + 15,7° | Asparagins. + Glutaminsäure |
| Rückstand | 11,72 | 7,60 | 190° | - | - | Glutaminsäurechlorhydrat |

Die folgende Tabelle ist nach denselben Gesichtspunkten, wie sie in der ersten Mitteilung angeführt sind, berechnet:

¹⁾ Angeführt sind nur die Aminosäuren, die die Hauptmenge der einzelnen Fraktionen bildeten. Oft waren drei und mehr Aminosäuren zugegen. Wie der Drehungswinkel zeigt, waren dem «Leucin» noch ein oder mehrere Isomere — wahrscheinlich Isoleucin — beigemischt.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---------------------|--|------------------------------|---|---|---|
| | 100 g Wasser u. aschefreie Substanz | 100 g frische Substanz | 100 g Gesamt- N enthalten N der ein- zelnen Amino- säuren | Auf 100 g Amino- säure-N ent- fallen g N | Spalte 4 mit Berücksich- tigung der Verlustwerte |
| Glykokoll | 0 | 0 | 0 | 0 | — |
| Alanin | 0,82 | 0,14 | 1,34 | 2,08 | 3,66 |
| Valin | 1,50 | 0,26 | 1,88 | 2,92 | 4,3 |
| Leucin u. Isomere | 3,58 | 0,66 | 4,35 | 6,45 | 9,8 |
| Asparaginsäure . | 0,39 | 0,07 | 0,38 | 0,60 | 1,5 |
| Glutaminsäure . | 2,01 | 0,50 | 2,89 | 4,48 | 7,75 |
| Lysin | 2,2 | 0,39 | 4,63 | 7,6 | — |
| Arginin | 0,72 | 0,13 | 2,5 | 3,86 | — |
| Tyrosin | 1,5 | 0,26 | 1,25 | 1,94 | — |
| Prolin | 0,23 | 0,04 | 0,32 | 0,47 | — |
| Tryptophan . . | vorhanden | + | + | + | — |
| Histidin | 0,17 | 0,03 | 0,46 | 0,71 | — |
| | 14,32 | 2,48 | 20,00 | 31,11 | |

Hervorgehoben sei, daß auch hier offenbar isomere Leucine vorhanden sind. Wir werden in einer besonderen Mitteilung über ein solches berichten.

Tyrosinbestimmung.

882 g frische graue Substanz wurden mit 3 l 25%iger Schwefelsäure nach mehrtägigem Stehen durch 16stündiges Kochen hydrolysiert. Im Barytniederschlag verblieb wieder eine beträchtliche Menge von Stickstoff, der trotz erschöpfenden Auskochens nicht zurückgewonnen werden konnte. Auch hier beobachteten wir wieder, wie beim Rückenmark, das Auftreten eines Farbstoffs, der in saurer Lösung grüne, in alkalischer rote Färbung bewirkte. Wir werden der Ursache dieses Farbenumschlages nachgehen. Beim Einengen der neu-

| | Stickstoff | |
|-------------------------------|------------|------|
| | g | % |
| Ausgangsmaterial | 14,36 | 100 |
| Hydrolysat | 13,28 | 92,5 |
| Hydrolysenrückstand | 1,08 | 7,5 |
| Barytniederschlag | 1,12 | 7,8 |
| Filtrate | 12,05 | 84,2 |

tralierten Filtrate im Vakuum bei 50° wurden 2,3110 g Tyrosin gewonnen.

Bestimmung von Histidin, Arginin und Lysin.

Aus den Filtraten der Tyrosindarstellung wurden die Basen mit Phosphorwolframsäure gefällt. Die Fällung wurde nach Kossel-Steudel weiter verarbeitet. Der Stickstoffgehalt wurde bei den einzelnen Operationen verfolgt. Lysin wurde als Pikrat isoliert. Histidin und Arginin wurden aus den Stickstoffmengen der entsprechenden Fällungen berechnet und als Pikrolonate identifiziert. Die letztere indirekte Bestimmung scheint Nachteile zu haben, denn die gewonnenen Pikrolonate entsprachen nicht annähernd der berechneten Menge an Histidin und Arginin; auch differieren die bei der grauen und weißen Substanz gefundenen Werte bedeutend, während die gewonnenen Mengen Lysinpikrat und die übrigen direkt isolierten Aminosäuren gut übereinstimmende Werte ergaben. Wir werden die Ursache dieser Differenzen noch prüfen. Es würde sich doch empfehlen, in Zukunft auch hier nur mit den isolierten Mengen der reinen Aminosäuren zu rechnen.

Lysinpikrat: 4,3934 g = 1,71 g Lysin. Fp.: Gegen 240° Aufschäumen und Zersetzung.

Histidinpikrolonat: Gegen 220° unscharfes Schmelzen, bei 236° Zersetzung.

Argininpikrolonat: Gegen 236° Zersetzung unter Aufschäumen.

Stickstoffverteilung.

| | g N | % von 1. | % von 2. |
|--|-------|----------|----------|
| 1. Ausgangsmaterial | 7,17 | 100 | — |
| Hydrolysat | 6,04 | 84,2 | — |
| Rückstände und BaSO ₄ | 1,13 | 15,3 | — |
| 2. Phosphorwolframsäurefällung . . | 2,02 | 28,2 | 100 |
| Filtrat der Fällung | 4,02 | 56,1 | — |
| Basenlösung | 1,55 | 21 | 76,7 |
| Histidin | 0,035 | 0,46 | 1,63 |
| Arginin | 0,18 | 2,5 | 8,9 |
| Lysin | 0,328 | 4,6 | 16,2 |

Nachweis von Tryptophan.

100 g graue Substanz wurden mit 300 ccm 1%iger Sodalösung und 10 g Pankreatin mit Toluol überschichtet im Brutschrank aufbewahrt. Nach 6 Tagen gab die Lösung mit Bromwasser stark violette Färbung.

Analytische Belege.

| | Substanz g | Verbraucht ccm n_{10} -H ₂ SO ₄ | Berechnet | | Gefunden |
|--------------------|---------------|---|--|-------|----------|
| | | | für | % N | % N |
| Alanin | 0,1696 | 19,0 | C ₃ H ₇ NO ₂ | 15,73 | 15,54 |
| Valin | 0,1896 | 9,05 | C ₅ H ₁₁ NO ₂ | 11,96 | 11,82 |
| Leucin | 0,2052 | 15,65 | C ₆ H ₁₃ NO ₂ | 10,69 | 10,68 |
| Glutaminsäure . . | 0,3222 | 21,7 | C ₅ H ₉ NO ₄ | 9,53 | 9,45 |
| Tyrosin | 0,2794 | 15,3 | C ₉ H ₁₁ NO ₃ | 7,74 | 7,67 |
| Asparaginsäure . . | 0,5639 | 41,9 | C ₄ H ₇ NO ₄ | 10,53 | 10,45 |

II. Weiße Substanz.

Wasser-, Stickstoff- und Aschegehalt.

Analysen: 1. Bestimmung des Gehaltes an Wasser.

| | | |
|------------------------------------|---------------------------|---------|
| 5,8310 g frische Substanz verloren | 4,2234 g H ₂ O | = 72,4% |
| 5,4260 g » » » » | 3,8604 g » | = 71,1% |
| 4,9988 g » » » » | 3,5222 g » | = 70,5% |

Durchschnitt: 71,3%

2. Bestimmung des Stickstoffgehaltes:

| | | |
|------------------------------------|---|-----------|
| 1,8006 g frische Substanz verloren | 21,7 ccm n_{10} -H ₂ SO ₄ | N = 1,69% |
| 2,7922 g » » » » | 33,55 » | N = 1,68% |
| 2,6954 g » » » » | 31,4 » | N = 1,63% |

Durchschnitt: 1,67%

3. Bestimmung des Aschengehaltes:

| | | |
|----------------------------------|----------------|----------------|
| 2,0062 g trockene Substanz gaben | 0,1892 g Asche | = 2,71% frisch |
| 2,3552 g » » » » | 0,1540 g » | = 1,88% » |
| 1,6894 g » » » » | 0,1386 g » | = 2,35% » |

Durchschnitt für die frische Substanz 2,38% »

Extraktion der frischen Substanz (46 g) mit Tetrachlorkohlenstoff.

| | Stickstoffgehalt | |
|---------------------------------------|------------------|------|
| | g | % |
| Ausgangsmaterial | 0,772 | 100 |
| Extrakt | 0,209 | 26,1 |
| Filtrat der HCl-Hydrolyse | 0,528 | 67,5 |
| Rückstand der HCl-Hydrolyse | 0,035 | 5,5 |

Isolierung der Monoaminosäuren.

3560 g reiner Substanz wurden mit 12 l konzentrierter Salzsäure hydrolysiert. Die Ester wurde mit Natronlauge und Kaliumcarbonat in Freiheit gesetzt.

| | | | | | |
|--------------|------|------------------|--------|------------|------|
| I. Fraktion: | 70° | des Wasserbades; | 12 mm, | 43—45° | — |
| II. » | 100° | » | 12 » | 45—84° | 36 g |
| III. » | 100° | » | 0,2 » | 67° u. 81° | 30 » |
| IV. » | 120° | Ölbades. | 0,2 » | 97° | 11 |
| V. » | 150° | » | 0,2 » | 114—135° | 25 |

Rückstand der Destillation 90 g.

Fraktion I—IV wurden mit Wasser, Fraktion V und der Rückstand mit Salzsäure verseift. Identifiziert werden konnten: Alanin, Valin, Leucin, Serin, Asparaginsäure, Glutaminsäure und Phenylalanin.

Das letztere scheint mit einer Aminosäure von noch niedrigerem Stickstoffgehalt vorzukommen. Wir fanden es in einer Krystallportion der V. Fraktion, die nach zweimaligem Umkrystallisieren 7,64% N enthielt und bei 271° sublimierte. Erst nach weiterem Umkrystallisieren und Darstellung des Chlorhydrates, das sich aus der konzentrierten salzsauren Lösung in der Kälte abschied, gelang es, das Phenylalanin rein zu erhalten.

Analysen: 0,1606 g Substanz gaben 0,3853 g CO₂ und 0,0978 g H₂O. — 0,1697 g ergaben 11,6 ccm N (15°, 765 mm).

| | |
|------------|---|
| Gefunden: | Berechnet für C ₉ H ₁₁ NO ₂ (165,1): |
| C = 65,43% | C = 65,41% |
| H = 6,81% | H = 6,72% |
| N = 8,62% | N = 8,49% |

Glykokoll fehlte vollständig.

Stickstoffverteilung.

| | g N | % von 1. | % von 2. | % von 3. |
|----------------------------------|------|----------|----------|----------|
| 1. Ausgangsmaterial | 58 | 100 | — | — |
| 2. Hydrolysat | 52,6 | 91,7 | 100 | — |
| Hydrolysenrückstand | 5,4 | 9,3 | — | — |
| 3. Ätherextrakt | 16,0 | 27,6 | 30,4 | 100 |
| Rückstand des Ätherextraktes | 36 | 62,0 | 68,5 | — |
| I. Fraktion | 0,48 | 0,83 | 0,91 | 3,01 |
| II. Fraktion | 3,19 | 5,49 | 5,92 | 19,9 |
| III. Fraktion | 2,62 | 4,42 | 4,99 | 16,4 |
| IV. Fraktion | 0,92 | 1,58 | 1,74 | 5,74 |
| V. Fraktion | 1,93 | 3,33 | 3,67 | 12,1 |
| Destillationsrückstand | 6,08 | 10,5 | 11,6 | 38,0 |
| | | | | 95,15 |

| Fraktion | g | N % | F | [α] _D ^{20°} in | | Identifiziert als |
|----------|-------|-------|------|---|----------|-------------------------|
| | | | | H ₂ O | 20% HCl | |
| I, 1 | 0,543 | 10,79 | 290° | - 3,72° | + 18,21° | Leucin |
| 2 | 0,134 | 10,59 | 285° | — | + 14,08° | |
| II, 1 | 2,109 | 10,78 | 288° | - 9,15° | + 15,2° | |
| 2 | 2,965 | 10,65 | 290° | - 6,55° | + 13,53° | |
| 3 | 2,170 | 11,05 | 282° | - 4,35° | + 24,7° | Valin + Leucin |
| 4 | 5,712 | 13,15 | 245° | - 2,8° | + 9,37° | Leucin + Valin + Alanin |
| 5 | 3,487 | 14,23 | 242° | - 4,58° | + 3,9° | Leucin + Valin + Alanin |
| 6 | 0,629 | 15,80 | 235° | + 1,41° | + 7,35° | Alanin |
| 7 | 1,437 | 11,30 | 210° | - 5,37° | + 2,73° | Valin + Leucin |
| III, 1 | 0,565 | 11,70 | 290° | - 2,5° | + 0,00° | Valin + Leucin |
| 2 | 1,396 | 10,52 | 290° | - 8,5° | + 10,1° | Leucin |
| 3 | 2,710 | 10,49 | 285° | - 7,65° | + 19,2° | |
| 4 | 1,806 | 10,55 | 260° | - 5,5° | + 22,75° | |
| 5 | 1,530 | 11,4 | 292° | - 3,25° | + 20,5° | Valin + Leucin |
| 6 | 1,816 | 11,28 | 240° | - 4,97° | + 19,45° | Valin + Leucin |
| IV, 1 | 0,899 | 10,45 | 285° | - 5,14° | + 6,52° | Leucin |
| 2 | 1,264 | 10,52 | 290° | - 10,85° | + 12,42° | |

| Fraktion | g | N % | F | [α] _D ^{20°} in | | Identifiziert als |
|-----------|-------|-------|------|---|----------|--------------------------|
| | | | | H ₂ O | 20% HCl | |
| IV, 3 | 1,750 | 11,61 | 283° | - 2,49° | + 18,56° | Valin + Leucin |
| 4 | 1,315 | 10,5 | 268° | - 10,2° | + 13,75° | Leucin |
| 5 | 2,359 | 10,78 | 287° | - 9,27° | + 0,00° | " |
| V, 1 | 1,130 | 7,64 | 275° | + 0,00° | + 0,00° | Phenylalanin |
| 2 | 0,635 | 10,31 | 286° | - 9,59° | — | Leucin |
| 3 | 1,750 | 12,05 | 252° | - 6,65° | + 6,12° | Serin + Asparaginsäure |
| 4 | 0,437 | 11,35 | 230° | — | — | — |
| Rückstand | 12,65 | 7,58 | 191° | — | — | Glutaminsäurechlorhydrat |

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die erhaltene Ausbeute an Aminosäuren:

| | 1 100 g wasser- u. aschefreie Substanz enthalten | 2 100 g frische Substanz enthalten | 3 Auf 100 g Gesamt-N entfallen g Amino- säuren N | 4 Auf 100 g Aminosäure N entfallen g N der Amino- säuren | 5 Spalt 4 mit Berück- sichtigung der Ver- lustwerte |
|---------------------|---|--|--|--|--|
| Glykokoll | 0 | 0 | 0 | 0 | — |
| Alanin | 0,48 | 0,13 | 1,22 | 2,22 | 3,9 |
| Valin | 1,11 | 0,29 | 2,14 | 3,88 | 5,7 |
| Leucin und Isomere | 2,39 | 0,63 | 3,95 | 7,15 | 10,8 |
| Serin | 0,09 | 0,02 | 0,21 | 0,38 | — |
| Asparaginsäure . . | 0,08 | 0,02 | 0,15 | 0,28 | 0,72 |
| Glutaminsäure . . | 1,2 | 0,34 | 1,85 | 3,38 | 5,7 |
| Lysin | 1,48 | 0,39 | 4,5 | 8,15 | — |
| Arginin | 1,44 | 0,38 | 7,6 | 13,8 | — |
| Phenylalanin . . . | 0,12 | 0,03 | 0,15 | 0,28 | — |
| Tyrosin | 0,70 | 0,18 | 0,88 | 1,59 | — |
| Prolin | 0,15 | 0,04 | 0,29 | 0,53 | — |
| Tryptophan | vorhanden | + | + | + | — |
| Histidin | 0,32 | 0,08 | 1,4 | 2,54 | — |
| | 9,56 | 2,53 | 24,34 | 45,18 | |

Tyrosinbestimmung.

1180 g Substanz wurden mit 4 l 25%iger Schwefelsäure hydrolysiert. In den Filtraten des Barytniederschlages wird wieder der oben erwähnte Farbstoff beobachtet.

Ausbeute: 2,175 g Tyrosin.

| | Stickstoffgehalt | |
|-------------------------------|------------------|------|
| | g | % |
| Ausgangsmaterial | 19,25 | 100 |
| Hydrolysenfiltrat | 16,9 | 87,8 |
| Hydrolysenrückstand | 2,35 | 12,2 |
| Barytniederschlag | 3,29 | 17,1 |
| Barytfiltrate | 12,06 | 62,7 |
| Ammoniak | 1,65 | 8,1 |

Auffallend ist der hohe Ammoniakgehalt. Er wurde durch Stickstoffanalysen der baryt- und schwefelsäurefreien Filtrate des Baryumsulfatniederschlags vor und nach dem Einengen im Vakuum und durch direktes Abdestillieren des Ammoniaks und Auffangen in $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$ bestimmt. Bei der grauen Substanz konnten nur geringe Mengen Ammoniak nachgewiesen werden.

Bestimmung von Histidin, Arginin und Lysin.

Lysinpikrat: 6,3576 g = 2,47 g Lysin. Fp.: Gegen 245° Zersetzung.

| | g N | % von 1. | % von 2. |
|---|-------|----------|----------|
| 1. Ausgangsmaterial | 10,33 | 100 | — |
| Hydrolysenfiltrate | 6,49 | 62,7 | — |
| Hydrolysenrückstand und BaSO ₄ | 3,03 | 29,3 | — |
| 2. Phosphorwolframsäureniederschlag | 21,4 | 20,7 | 100 |
| Filtrat der Fällung | 4,35 | 42 | — |
| Basenlösung | 1,98 | 19,2 | 99,7 |
| Histidin | 0,145 | 1,4 | 6,8 |
| Arginin | 0,775 | 7,6 | 36,7 |
| Lysin | 0,474 | 4,5 | 22,1 |

Histidinpikrolonat: Fp. gegen 223° Schmelzen, bei 235° Zersetzung.

Argininpikrolonat: Fp. gegen 235° Zersetzung unter Aufschäumen.

Nachweis von Tryptophan.

100 g frische Substanz wurden in 300 ccm 1%iger Soda-lösung und 10 g Pankreatin unter Toluol im Thermostaten bei 37° aufbewahrt; nach 5 Tagen deutliche Violettfärbung mit Bromwasser.

Analytische Belege.

| | Substanz g | Verbraucht ccm $n/_{10}\text{-H}_2\text{SO}_4$ | Berechnet | | Gefunden |
|--------------------|---------------|--|--------------------------------------|-------|----------|
| | | | für | % N | % N |
| Alanin | 0,1860 | 20,95 | $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2$ | 15,73 | 15,80 |
| Valin | 0,2038 | 17,25 | $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_2$ | 11,96 | 11,84 |
| Leucin | 0,1462 | 11,1 | $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_2$ | 10,69 | 10,61 |
| Asparaginsäure . . | 0,1054 | 7,85 | $\text{C}_4\text{H}_7\text{NO}_4$ | 10,53 | 10,42 |
| Glutaminsäure . . | 0,2302 | 15,75 | $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4$ | 9,53 | 9,58 |
| Tyrosin | 0,1362 | 7,6 | $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_3$ | 7,74 | 7,81 |
| Phenylalanin . . . | 0,1436 | 8,55 | $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_2$ | 8,49 | 8,34 |
| Serin | 0,1270 | 11,75 | $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_3$ | 13,33 | 12,98 |