

Weiterer Beitrag zur Kenntnis der bei der partiellen Hydrolyse von Proteinen entstehenden Spaltprodukte.

Von
Emil Abderhalden.

(Aus dem physiologischen Institut der tierärztlichen Hochschule, Berlin.)

(Der Redaktion zugegangen am 24. März 1911.)

Wird Seidenfibroin mit 70% iger Schwefelsäure vier Tage bei 25° aufbewahrt, dann erhält man nach der Entfernung der Schwefelsäure mit Baryt regelmäßig d-Alanyl-glycin. Dieser Befund wurde zunächst bei der partiellen Hydrolyse von italienischem Seidenfibroin erhoben.¹⁾ Neuerdings gelang die Darstellung von d-Alanyl-glycin auf dem gleichen Wege auch aus Fibroin der degommierten Canton-Seide und der Bengal-Seide.

1. Canton-Seide:

0,1167 g Substanz verbrauchten 16,2 ccm 1/10-n-Schwefelsäure.

0,1172 „ „ gaben 0,1762 g CO₂ u. 0,0738 g H₂O.

Berechnet für C₅H₁₀N₂O₃: 41,07% C, 6,90% H, 19,18% N.

Gefunden: 41,00% C, 6,99% H, 19,45% N.

0,4730 g Substanz gelöst in Wasser. Gesamtgewicht der

Lösung 5,3434 g. α im 1 dm-Rohr + 4,14°. $[\alpha]_{20}^D = +46,7^\circ$.

Bengal-Seide:

11,77 mg Substanz gaben 17,78 mg CO₂ u. 6,87 mg H₂O,

12,30 „ „ „ 18,59 „ „ „ 7,53 „ „ „

0,1201 g Substanz verbrauchten 16,6 ccm 1/10-n-Schwefelsäure.

Berechnet für C₅N₁₀N₂O₃:

41,07% C, 6,90% H und 19,18% N.

Gefunden:

41,20% C u. 41,22% C; 6,53% H u. 6,85% H; 19,35% N.

¹⁾ Vgl. Emil Abderhalden, Weiterer Beitrag usw. Diese Zeitschrift, Bd. LXV, S. 417, 1910.

Die C- und H-Bestimmungen verdanke ich der Freundlichkeit von Herrn Prof. Pregl.

0,2122 g Substanz in Wasser gelöst. Gesamtgewicht der Lösung 2,0411 g. $d = 1,031$. $\alpha = 5,20^\circ$ nach rechts im 1 dm-Rohr bei Natriumlicht. $[\alpha]_{20}^D = + 49,47^\circ$.

Der Schmelzpunkt beider Dipeptide lag höher, als er bei den früher gewonnenen Präparaten gefunden worden ist, nämlich gegen 250° , nachdem bei 245° Sinterung eingetreten war. Wir fanden diesen hohen Schmelzpunkt nur bei Präparaten, die aus 50%igem Alkohol in großen, derben Krystallen sich abgeschieden hatten, während die aus Wasser durch starkes Einengen gewonnene Substanz gegen 240° sich zersetzte. Eine ähnliche Beobachtung machten wir auch beim d-Alanin, das sich in sehr großen Krystallen züchten läßt.

Das aus der Canton-Seide und das aus der Bengal-Seide gewonnene Dipeptid wurden vollständig hydrolysiert. Es konnten nur Alanin und Glykokoll in fast genau den auf das Dipeptid Alanyl-glycin berechneten Mengen nachgewiesen werden. Zur Trennung des Glykokolls vom Alanin benutzten wir die Schwerlöslichkeit des Glykokollpikrates (Levene). Auch die Spaltung mit Hefepreßsaft gab identische Werte, wie im Vergleichsversuch mit synthetisch dargestelltem d-Alanyl-glycin.

Die Ausbeuten an d-Alanyl-glycin sind schwankende. Wir haben es bei der Darstellung des Seidenpeptons nach unserer Vorschrift nie vermißt.

Aus den Mutterlaugen der Seidenpeptonfällungen konnte neben dem d-Alanyl-glycin ein Tyrosin enthaltender Körper nachgewiesen werden. Er beeinträchtigte die Ausbeute an dem genannten Dipeptid. Wir beobachteten diese zunächst meist amorphe Substanz fast immer beim Einengen der wässerig-alkoholischen Mutterlauge des d-Alanyl-glycins. Wir hielten sie zunächst für Glycyl-l-tyrosin, weil wir dieses Dipeptid auch in den Mutterlaugen des Seidenpeptons gefunden hatten. In der Tat konnten wir auch wiederholt dieses Dipeptid von den amorphen Fällungen abtrennen. Immer blieb jedoch eine leichter lösliche, meist gallertig aussehende Substanz übrig, die mit

Millons Reagens Rotfärbung gab. Es ist nun nach zweijähriger ununterbrochener Arbeit geglückt, diese Substanz nach ihrer Zusammensetzung vollständig aufzuklären. Ihre Eigenschaften, ihr Molekulargewicht, ihre Zusammensetzung und alle sonstigen Daten stehen im Einklang mit den entsprechenden Werten und Befunden, wie sie bei dem synthetisch gewonnenen Tripeptid d-Alanyl-glycyl-l-tyrosin von Emil Fischer¹⁾ angegeben worden sind. Eine Differenz findet sich nur im Drehungsvermögen. Das durch partielle Hydrolyse gewonnene Präparat zeigt ein höheres Drehungsvermögen als das synthetisch dargestellte Tripeptid. Ferner ist es geglückt, das analytisch dargestellte Präparat zu krystallisieren, während das durch Synthese gewonnene Tripeptid bis jetzt allen Versuchen, es in Krystallform zu bringen, trotzte. Es ist wohl möglich, daß das durch partielle Hydrolyse gewonnene Tripeptid optisch reiner ist, als das synthetisch dargestellte, und daß darauf die größere Tendenz, zu krystallisieren, beruht.

Das d-Alanyl-glycyl-l-tyrosin ist das erste Tripeptid, das aus einem Protein durch partielle Hydrolyse gewonnen worden ist. Vielleicht stellt es eine weitere Abbaustufe des von Emil Fischer und mir aus Seidensfibroin gewonnenen Tetrapeptids — bestehend aus l-Tyrosin, d-Alanin und zwei Molekülen Glykokoll — dar.²⁾ Die Erfahrungen, die wir bei der Gewinnung und Identifizierung des genannten Tripeptids gemacht haben, zeigen, daß es mit den zurzeit zur Verfügung stehenden Methoden fast unmöglich ist, komplizierter gebaute Abbauprodukte aus Eiweiß nach jeder Richtung in ihrer Zusammensetzung und vor allem in ihrem Aufbau eindeutig aufzuklären. Schon das genannte Tripeptid bereitete große Schwierigkeiten. Es war zufälligerweise geglückt, das Tripeptid vor zwei Jahren in Form von Krystallen abzuschneiden.

¹⁾ Emil Fischer, Synthese von Polypeptiden. XXI. Derivate des Tyrosins und der Glutaminsäure. Ber. d. Deutsch. chem. Gesellschaft, Jg. XL, S. 3704, 1907.

²⁾ Emil Fischer und Emil Abderhalden, Bildung von Polypeptiden bei der Hydrolyse der Proteine. Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Jg. XL, S. 3545, 1907.

Die Ausbeute an Rohprodukt betrug 1 g. Nach dem Umkrystallisieren verblieben noch 0,8 g. Hiermit wurde eine Drehungsbestimmung und eine vollständige Analyse ausgeführt. Letztere gab sehr gut auf das genannte Tripeptid stimmende Werte. Mit diesen Befunden allein ließ sich natürlich eine Identifizierung des Präparates nicht vornehmen. Wir haben nun systematisch alle Seidenpeptonmutterlaugen aufgearbeitet. Wir hielten uns an die kürzlich gegebene Vorschrift bei der Gewinnung des Peptons.¹⁾ Seidenabfälle wurden mit der fünffachen Menge 70%iger Schwefelsäure übergossen. Nach viertägigem Stehen wurde die Schwefelsäure mit Baryt entfernt. Das Filtrat vom Baryumsulfat wurde dann unter vermindertem Druck bis zum Sirup verdampft. Diesen trugen wir in absoluten Alkohol ein. Die Fällung wurde abgesaugt und das Filtrat eingeeengt. Aus dieser Mutterlauge schieden sich nach mehrtägigem Stehen, oft auch innerhalb weniger Stunden, Krystalle von d-Alanyl-glycin ab. Von diesen wurde abfiltriert. Sie waren meist analysenrein. Bei weiterem, freiwilligem Verdunsten folgten dann regelmäßig weitere Krystallabscheidungen. Sobald sich solche zeigten, wurde filtriert. Die Krystalle prüften wir stets mit Millons Reagens und ferner mit Kupfersulfat und Natronlauge. Solange weder Rotfärbung auftrat, noch Biuretprobe sich zeigte, setzten wir die Verarbeitung in gleicher Weise fort, um möglichst viel d-Alanyl-glycin zu gewinnen. Die weiteren Krystallisationen waren meist sehr derb und gelb gefärbt. In einigen Fällen folgte der Abscheidung des d-Alanyl-glycins Krystallisation von Glycyl-l-tyrosin und in einem Falle glauben wir auch, d-Alanyl-l-tyrosin beobachtet zu haben. Die letztere Verbindung ist noch nicht nach jeder Richtung sicher gestellt. Es fehlt noch die totale Hydrolyse. Auch gab die Analyse keine ganz scharfen Werte. Das Drehungsvermögen und das Molekulargewicht stimmen dagegen gut auf das erwähnte Dipeptid. Leider sind wir diesem Dipeptid bis jetzt nicht mehr begegnet.

¹⁾ Vgl. Emil Abderhalden und Eugen Steinbeck, Weitere Untersuchungen über die Verwendbarkeit des Seidenpeptons zum Nachweis proteolytischer Fermente. Diese Zeitschrift, Bd. LXVIII, S. 312, 1910.

Sobald die Abscheidungen Millons Reaktion gaben, filtrierten wir nicht mehr so oft. Beim Abnutschen verdampft stets ein Teil der Lösung in kurzer Zeit. Dabei scheiden sich dann in der Saugflasche amorphe Massen ab. Diese lassen sich nur schwer trennen. Die besten Resultate erhielten wir, wenn wir das Filtrat, sobald möglichst alles d-Alanyl-glycin durch Krystallisation entfernt war, ganz langsam verdunsten ließen. Wie schon erwähnt, erhielten wir gleich bei einer der ersten Aufarbeitungen der Mutterlaugen von d-Alanyl-glycin eine krystallinische Substanz. Sie sah körnig-pulverig aus. Unter dem Mikroskop zeigten sich feine Nadelchen. Die Krystalle waren luftbeständig und zeigten die Zusammensetzung eines aus Glykokoll, Alanin und Tyrosin bestehenden Tripeptids.

0,2310 g Substanz gaben 0,4618 g CO₂ und 0,1325 g H₂O.

0,1012 » » » verbrauchten 9,6 ccm ¹/₁₀-n-Schwefelsäure.

Berechnet für C₁₄H₁₉O₅N₃ (309,2):

54,34% C, 6,19% H, 13,59% N.

Gefunden: 54,52% C, 6,37% H, 13,45% N.

0,2202 g Substanz in Wasser gelöst. Gesamtgewicht der Lösung 2,205 g. $\alpha = 4,5^\circ$ nach rechts im 1 dm-Rohr bei Natriumlicht. $[\alpha]_D^{20} = +45,1^\circ$.

Die Substanz fing bei 135° an sich schwach gelb zu färben. Bei weiterem Erhitzen trat bei 145° Aufschäumen ein. Der Schaum färbt sich dann intensiver gelb und wird bei 185° braun. Millon und Biuretprobe positiv.

Hätten wir keine aus Tyrosin, Glykokoll und Alanin aufgebaute Polypeptide gekannt, dann wäre es ganz unmöglich gewesen, das isolierte Produkt auch nur vermutungsweise zu identifizieren. Bekannt sind bis jetzt die beiden Tripeptide d-Alanyl-glycyl-l-tyrosin¹⁾ und Glycyl-d-alanyl-l-tyrosin.²⁾ Von diesen dreht das erstere 41,9° nach rechts, das letztere 4,83° nach links. Das letztere Tripeptid

¹⁾ Emil Fischer, l. c.

²⁾ Emil Abderhalden und Alfred Hirszowski, Synthese von Polypeptiden. Derivate des Glykokolls, d-Alanins, l-Leucins und l-Tyrosins. Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Jg. XLI, S. 2840, 1908.

kommt somit nicht in Betracht. Es wäre denkbar, daß unter den bis jetzt noch nicht dargestellten aus Glykokoll, d-Alanin und l-Tyrosin bestehenden Tripeptiden sich noch solche finden, die die gleichen Eigenschaften aufweisen, wie das von uns isolierte Produkt. Die Annahme, daß ein Tripeptid vorlag, war auch noch wenig gestützt und nur aus dem Ergebnisse der Elementaranalyse erschlossen worden. Es war somit die ganze Beobachtung eine keineswegs gesicherte. Es ist dies nicht der einzige Befund dieser Art. Wir verfügen noch über weitere Versuche, bei denen es glückte, teils aus Seide, teils aus Horn und Elastin, aber auch aus Casein und Hämoglobin krystallisierte, biuretgebende Körper zu isolieren und auch annähernd zu identifizieren. Jedoch weisen alle Beobachtungen Lücken auf, sodaß wir vorläufig nicht in der Lage sind, die Ergebnisse zu verwerten.

Die Hauptschwierigkeit besteht stets in der Beschaffung des Materials. Für die totale Hydrolyse braucht man bei komplizierteren Verbindungen, sollen die Ergebnisse beweisend sein, stets mehrere Gramm. Schon durch die Analysen gehen nicht unbeträchtliche Substanzmengen verloren. Hier dürfte die von Pregl ausgearbeitete Mikroanalyse in vielen Fällen unschätzbare Dienste erweisen.

Der oben beschriebenen Substanz sind wir noch zweimal begegnet. Es gelang, sie in größeren Mengen zu sammeln. Das ausgeschiedene Produkt war zunächst amorph. Es gab in konzentrierter wässriger Lösung eine flockige Fällung mit einer konzentrierten Ammonsulfatlösung. Auch mit einer 10%igen Phosphorwolframsäurelösung trat Trübung ein. Es schied sich ein öliges Produkt aus, das sich im Überschuß des Lösungsmittels nur schwer löste. Wir fällten nunmehr die etwa 1%ige wässrige Lösung, die etwa 8 g der rohen Substanz enthielt, mit einem Überschuß an 10%iger Phosphorwolframsäure. Das ausgefallene, klebrige Öl setzte sich an den Wänden des Gefäßes fest. Die Flüssigkeit ließ sich ohne weiteres abgießen. Sie wurde durch Zusatz eines Überschusses an Baryt von der Phosphorwolframsäure befreit und dann der Überschuß an Baryt genau mit Schwefelsäure entfernt. Das Filtrat vom

Baryumsulfat verdampften wir unter vermindertem Druck zur Trockene. Es verblieb ein hygroskopischer Sirup. Die wässrige Lösung drehte nach rechts und gab Millon- und Biuretprobe.

Der Rückstand wurde nun in wenig Wasser gelöst, in der Kälte mit wenig Tierkohle geschüttelt und dann nach erfolgter Filtration Alkohol zugefügt, bis eine auch beim Erhitzen beständige Trübung auftrat. Nun ließen wir langsam abkühlen. Es schied sich eine flockige Substanz ab. Sie wurde abfiltriert. Ihre Menge betrug etwa $\frac{1}{2}$ g. Die Mutterlauge ließen wir nun im Laufe mehrerer Tage langsam bei Zimmertemperatur verdunsten. Ganz allmählich schied sich eine gallertig aussehende Masse ab, die im Laufe der Zeit ein mehr opakes und dann weißes körniges Aussehen annahm. Unter dem Mikroskop zeigten sich feine Nadelchen. Die Ausbeute an dieser Substanz betrug 4,5 g. Sie drehte in wässriger Lösung $42,5^{\circ}$ nach rechts und gab Analysenwerte, welche ziemlich gut auf ein aus Glykokoll, Alanin und Tyrosin bestehendes Tripeptid stimmten. Nur der Kohlenstoffgehalt zeigte eine Differenz von 0,8. 2 g der Substanz unterwarfen wir der totalen Hydrolyse mit 10 ccm 25%iger Schwefelsäure. Wir kochten 10 Stunden am Rückflußkühler. Dann wurde die Schwefelsäure genau mit Baryt entfernt, und das Filtrat vom Baryumsulfat mit den Washwässern vereinigt und eingeengt. Es schieden sich Tyrosinkristalle ab. Es gelang leicht, eine tyrosinfreie Mutterlauge zu gewinnen. Diese wurde zur Trockene verdampft, in wenig Wasser aufgenommen und mit Pikrinsäure (berechnet auf Glykokoll, entsprechend dem Gehalt eines Tripeptids der vermuteten Zusammensetzung) gekocht. Das ausgeschiedene Glykokollpikrat wurde abfiltriert. Dem Filtrat gaben wir nach erfolgtem Einengen noch etwas Pikrinsäure zu, kochten auf und ließen die Lösung 24 Stunden im Eisschrank stehen. Es war nur noch eine ganz geringfügige Abscheidung eingetreten. Das Filtrat versetzten wir mit Schwefelsäure und ätherten aus. Die von Pikrinsäure befreite Lösung wurde eingedampft, der Rückstand in Wasser gelöst, und die Lösung mit Tierkohle gekocht. Das Filtrat verdampften wir dann zur Trockene und bestimmten den Zersetzungspunkt (297°) und das Drehungs-

vermögen des in der berechneten (auf Alanin berechnet) Menge Salzsäure aufgenommenen Produktes. Es betrug $+ 8,97^{\circ}$.

Die Ausbeute an den einzelnen Aminosäuren war die folgende:

Glykokoll	0,38 g
Alanin	0,56 »
Tyrosin	1,08 »

Berechnet für ein aus Glykokoll, Alanin und Tyrosin bestehendes Tripeptid

Glykokoll	0,48 g
Alanin	0,56 »
Tyrosin	1,16 »

Die Molekulargewichtsbestimmung ergab folgende Werte: 324, 318, 326, 330. Berechnet für das genannte Tripeptid: 309,2.

Das Präparat zeigte keinen Schmelzpunkt und auch keinen scharfen Zersetzungspunkt. Bei raschem Erhitzen schäumte es gegen 145° auf. Der Schaum wurde dann gegen 185° braun. Die Substanz löste sich in etwa 2 Teilen kaltem Wasser. Das amorphe Produkt war leichter löslich. In absolutem Alkohol, in Essigäther, Äther, Chloroform war es unlöslich. Mit Ammonsulfat gab die gesättigte wässrige Lösung eine ölige, beim Stehen in Eis fest werdende Fällung. Sie trat nur bei sehr konzentrierten Lösungen auf.

Alle Beobachtungen decken sich ziemlich gut mit den bei dem Tripeptid d-Alanyl-glycyl-l-tyrosin gemachten Feststellungen. Bei all den ausgeführten Operationen hatten wir das Präparat bis auf die letzten Spuren aufgebraucht.

Es gelang uns, das gleiche Produkt ein drittes Mal aus den Mutterlaugen von Seidenpeptondarstellungen zu gewinnen. Es waren 3 kg Seidenabfälle verarbeitet worden. Die Ausbeute an Rohprodukt betrug 25 g. Es drehte nur $23,5^{\circ}$ nach rechts. Wir haben auch hier mit Phosphorwolframsäure gereinigt. Die weitere Verarbeitung erfolgte in genau der gleichen Weise, wie im vorher geschilderten Falle. Unter großen Verlusten und immer wiederholtem Fraktionieren glückte es, 5,6 g einer $44,5^{\circ}$ nach rechts drehenden Substanz zu gewinnen.

Wir nahmen die Substanz dann als einheitlich an, wenn

sie, in drei Fraktionen geteilt, das Drehungsvermögen nicht mehr änderte. Die Analyse allein gibt keine Gewähr für einheitliche Präparate. Wiederholt erhielten wir Analysenzahlen, die mit berechneten Werten vorzüglich in Einklang standen. Auch die Resultate der vollständigen Hydrolyse bestätigten die Anwesenheit des vermuteten Polypeptids. Wurde jedoch das Präparat fraktioniert, dann ließ sich wiederholt beweisen, daß ein Gemisch vorlag. Ja in einzelnen Fällen konnten sogar freie Aminosäuren im Gemisch nachgewiesen werden. Man darf sich somit nach unseren Erfahrungen weder auf Analysenwerte noch auf die Resultate der totalen Hydrolyse allein verlassen. Nur dann, wenn die fraktionierte Krystallisation zu Fraktionen führt, die in engen Grenzen das gleiche Drehungsvermögen zeigen, darf geschlossen werden, daß höchstwahrscheinlich ein einheitliches Produkt vorliegt.

Die Analyse des erwähnten Präparates gab folgende Werte:

0,1432 g Substanz gaben 0,2838 g CO₂ und 0,0792 g H₂O.

0,1227 „ „ verbrauchten 11,6 ccm ¹/₁₀-n-Schwefelsäure.

Berechnet für C₁₄H₁₅O₃N₃ (309,2):

54,34% C, 6,19% H und 13,59% N.

Gefunden: 54,05% C, 6,14% H „ 13,25% N.

Molekulargewichtsbestimmung:

312,5; 320,6; 312; 315; 320; 309. Berechnet 309,2.

Bei der totalen Hydrolyse von 2 g des Tripeptids mit 25%iger Schwefelsäure isolierte Aminosäuren:

		Berechnet:
Glykokoll	0,40 g	0,48 g
d-Alanin		
([α] _D ^{20°} des salzsauren Salzes + 8,95°)	0,58	0,56
l-Tyrosin	1,18	1,16

Wir haben schließlich das Präparat mit Hefepreßsaft gespalten. Das Drehungsvermögen stieg zunächst etwas an, um dann abzufallen. Es läßt sich in diesem Falle nicht entscheiden, über welche Abbaustufen der Fermentabbau geht, weil sowohl d-Alanyl-glycin als auch Glycyl-l-tyrosin etwa 50°

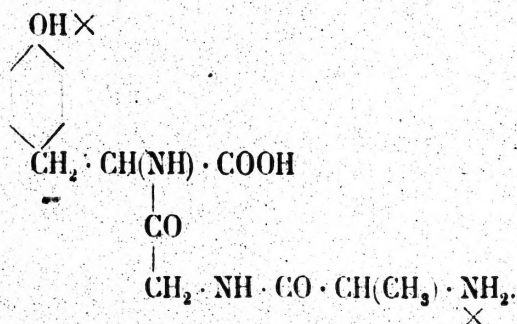
nach rechts drehen. Eine Entscheidung der beiden Möglichkeiten könnte nur die Isolierung der Abbauprodukte geben, dazu reichte das uns zur Verfügung stehende Material nicht aus. Einige Versuche wurden durch Abscheidung von Tyrosin gestört. Das spricht dafür, daß der Abbau mit frühzeitiger Abspaltung von Tyrosin einsetzt.

Wir glauben auf Grund aller Beobachtungen den Schluß ziehen zu dürfen, daß es geglückt ist, bei der partiellen Hydrolyse von Fibroin aus italienischer Seide ein Tripeptid, bestehend aus Glykokoll, d-Alanin und l-Tyrosin, abzutrennen. Alle Eigenschaften des isolierten Tripeptids sprechen dafür, daß ihm die Zusammensetzung d-Alanyl-glycyl-l-tyrosin zukommt.

Schließlich ließen wir auf das Tripeptid noch den wässrigen Extrakt von *Russula delica* einwirken. Es trat nach kurzer Zeit Rosafärbung auf, die allmählich in ein tieferes Rot überging.

Zur Identifizierung von Polypeptiden stehen uns zur Verfügung: 1. die Molekulargewichtsbestimmung; 2. die Elementaranalyse; 3. die totale Hydrolyse und die möglichst quantitative Bestimmung der einzelnen Aminosäuren; 4. die partielle Hydrolyse, sei es durch weiteren Abbau durch Säuren oder Alkalien oder durch Fermente; 5. die Eigenschaften; 6. die Darstellung von Derivaten mit nachfolgender Hydrolyse.¹⁾ Das Wesentliche bleibt dann der Vergleich mit dem entsprechend aufgebauten synthetisch gewonnenen Polypeptid.

Wir haben auch hier versucht, nach Punkt 6 das β -Naphthalinsulfoderivat des Tripeptids zu gewinnen. Das d-Alanyl-glycyl-l-tyrosin:



¹⁾ Vgl. Emil Abderhalden und Casimir Funk. Weiterer Beitrag

kann zwei β -Naphthalinsulfogruppen aufnehmen. Eine bindet sich mit der Hydroxylgruppe des Tyrosins und die andere mit der Aminogruppe des Alanins. Bei der Spaltung wären somit Mononaphthalinsulfo-l-tyrosin, Naphthalinsulfoalanin und freies Glykokoll zu erwarten. Es ist leider nicht gelungen, auf dieser Grundlage einen weiteren Anhaltspunkt für die angenommene Struktur des Tripeptids zu erlangen. Die Ausbeute an Kuppelungsprodukt war auffallend gering. 2 g Tripeptid ergaben nur 1 g amorphes β -Naphthalinsulfoderivat. Bei der Spaltung dieses Produktes durch Kochen mit 10%iger Salzsäure konnten wir freies Glykokoll nachweisen und ferner die erwarteten β -Naphthalinsulfoderivate. Da jedoch eine quantitative Durchführung des Versuches durch die schlechten Ausbeuten verhindert war, verlieren die Resultate sehr an Beweiskraft. Es wird nötig sein, mit Hilfe der synthetisch aufgebauten Polypeptide mehr Erfahrung auf diesem Gebiete zu sammeln.

Im Anschluß an die Ergebnisse der partiellen Hydrolyse von Seidenfibroin, sei noch kurz auf einen Befund beim stufenweisen Abbau von Horn aus Kuhklauen hingewiesen.

Mechanisch gereinigte, zerkleinerte Klauen wurden nach Zusatz der etwa 10fachen Menge einer heiß gesättigten Barytlösung 24 Stunden auf dem Wasserbad erwärmt. Die Temperatur betrug im Inneren des Gefäßes etwa 85. Beim Abkühlen schied sich Baryt ab. Von ihm und dem Ungelösten wurde abfiltriert. Aus dem Filtrat entfernten wir den Baryt genau mit Schwefelsäure. Das Filtrat vom Baryumsulfat wurde mit 10%iger Phosphorwolframsäure gefällt. Die Lösung enthielt nach einer Trockensubstanzbestimmung etwa 2% organische Substanz. Filtrat und Fällung wurden getrennt verarbeitet. Im Filtrat fanden sich zum größten Teil Aminosäuren. Sie waren alle racemisiert. Der Phosphorwolframsäureniederschlag wurde in der üblichen Weise mit Baryt in der Kälte zerlegt. Das Filtrat vom phosphorwolframsauren Baryt befreiten wir mit Schwefelsäure vom überschüssigen Baryt. Das Filtrat vom Baryumsulfat wurde unter vermindertem Druck bis zur

Trockene verdampft, nachdem vorher noch einmal in der stark eingeeengten Lösung auf Schwefelsäure und Baryt geprüft worden war.

Der Rückstand stellte eine blättrig-schaumige Masse dar. Ein Teil war sirupös. Wir nahmen nun den ganzen Rückstand in wenig Wasser auf. Die Lösung gab alle Eiweißreaktionen. Mit Ammonsulfatlösung trat bei vollständiger Sättigung Fällung ein. Zur weiteren Trennung gossen wir die konzentrierte wässerige Lösung vorsichtig in absoluten Alkohol. Wir gaben die Lösung tropfenweise zu und hörten mit dem Zugießen auf, sobald sich ölige Massen abschieden. In diesem Falle setzten wir das weitere Zutropfen mit frischem Alkohol fort. Bei dieser Verarbeitung, die wir zweimal bis jetzt durchgeführt haben, beobachteten wir eine Abscheidung von eigenartig gebogenen, großen Krystallen. Sie gleichen langgestreckten Fasern. Es gelang zunächst nicht, sie umzukrystallisieren. In der faserigen Form war die Substanz luftbeständig. Wurde sie aus verdünntem Alkohol umgelöst, dann fiel sie amorph aus. In diesem Zustand war sie sehr hygroskopisch. Schließlich ist es gelungen, das Produkt durch Lösen in wenig Wasser und vorsichtiges Eintropfen in absoluten Alkohol wieder in langen, gebogenen Nadeln zu erhalten. Das bei der ersten Fällung gelb-braun gefärbte Produkt wurde beim Umkrystallisieren weiß. Der anfänglich ziemlich hohe Aschengehalt ließ sich ganz beseitigen.

Das gereinigte Produkt schmolz ohne beträchtliche Zersetzung gegen 275. Es besaß kein Drehungsvermögen (Hydrolyse mit Baryt!). Mit Bromwasser fiel eine flockige Substanz. Auch mit Quecksilbersulfat trat Fällung auf. Die wässerige Lösung gab mit Glyoxylsäure und Schwefelsäure eine positive Reaktion (Violettärbung). Mit Millons Reagens trat eine weinrote Färbung auf. Die konzentrierte wässerige Lösung gab mit einer konzentrierten Ammonsulfatlösung keine Fällung. Die Biuretprobe gab eine rote Färbung. Die Schwefelbleiprobe war auch positiv. Durch vollständige Hydrolyse ließen sich Tyrosin, Cystin, Tryptophan und Glutaminsäure mit Sicherheit nachweisen. Daneben waren sicher noch andere Aminosäuren vorhanden, doch gelang es nicht, diese exakt zu iden-

tifizieren. Es liegt somit ein zweifellos noch sehr kompliziert gebautes Pepton vor, das die Tendenz zu krystallisieren zeigt. Die Analyse des Produktes vermochte auch keine Anhaltspunkte für eine Berechnung zu geben. Die Molekulargewichtsbestimmung gab wenig übereinstimmende Werte. Der Umstand, daß das Produkt racemisiert worden war, erschwert die weitere Untersuchung außerordentlich. Vor allem ist es sehr schwierig, festzustellen, ob das Produkt einheitlich ist. Bei optisch aktiven Abbauprodukten läßt sich die Einheitlichkeit durch mehrfaches Fraktionieren und Bestimmung des Drehungsvermögens der einzelnen Fraktionen leicht feststellen. Man wird aus diesem Grunde die Hydrolyse mit Säuren und Fermenten zum Studium der beim stufenweisen Abbau von Proteinen auftretenden Spaltprodukte im allgemeinen vorzuziehen haben.

Endlich sei noch kurz mitgeteilt, daß es geglückt ist, bei der Verdauung von Casein mit Pankreatin einen in perlmutterglänzenden Blättchen krystallisierenden Körper zu isolieren. Er war bei der Fällung des Verdauungsgemisches mit Quecksilbersulfat (Tryptophandarstellung) in den Niederschlag übergegangen. Die Substanz zeigt äußerlich Ähnlichkeit mit Leucin. Sie schmilzt gegen 290° . Die Verbindung unterscheidet sich scharf vom Leucin durch die größere Löslichkeit in Wasser und vor allem durch ihren Schwefelgehalt. Die von Herrn Prof. Pregl ausgeführten Analysen ergaben für die erste Krystallfraktion folgende Werte:

10.63 mg Substanz	gaben	17.10 mg CO_2	und	6.93 mg H_2O
10.04 „	„	16.20 „	„	7.05 „
9.49 „	„	15.24 „	„	6.58 „
6.90 „	„	0.702 ccm N	(719 mm und 20°)	
4.03 „	„	4.92 mg BaSO_4		
5.56 „	„	6.79 „		

Gefunden: C = 43.88%, 44.01%, 43.80%;
 H = 7.30%, 7.86%, 7.76%;
 N = 11.21%;
 S = 16.77% und 16.78%.

Diese Zahlen stimmen am besten auf einen Körper der Zusammensetzung: $\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{S}_2\text{N}_3\text{O}_5$ (43.93% C, 7.38% H, 10.99% N und 16.78% S). Die Schwefelbleiprobe war negativ.

Eine zweite Krystallisation ergab:

9.59 mg Substanz	gaben	14.98 mg CO_2	und	6.64 mg H_2O
12.10 „	„	18.97 „	„	7.85 „
7.50 „	„	0.765 ccm N	(705 mm, 19°)	

5,62 mg Substanz gaben	0,576 ccm N (702 mm, 20°)
3,13 » » »	0,324 » » (704 » 17°)
7,68 » » »	10,42 mg BaSO ₄
7,53 » » »	10,25 » »
5,19 » » »	7,10 » »
5,18 » » »	7,12 » »

Gefunden: C = 42,60%, 42,76%, 42,64%;
 H = 7,75%, 7,26%, 7,67%;
 N = 11,06%, 11,04%, 10,98%;
 S = 18,66%, 18,70%, 18,82%, 18,88%.

Diese Zahlen würden noch am besten auf einen Körper der Formel C₁₂H₂₀N₂S₂O₄ (C 42,31%, H 7,70%, N 12,35%, S 18,84%) stimmen. Es wäre denkbar, daß der isolierte Körper Beziehungen zu der Säure C₁₂H₂₀N₂O₅¹⁾ besitzt. Wir teilen diesen Befund jetzt schon mit, obwohl wir außerstande sind, Anhaltspunkte für seine Zusammensetzung zu geben, weil vielleicht andere Forscher Gelegenheit haben, dem gleichen Körper nachzuspüren. Er erscheint uns besonders interessant, weil er Schwefel enthält.

¹⁾ Emil Fischer und Emil Abderhalden, Notizen über Hydrolyse von Proteinstoffen, Diese Zeitschrift, Bd. XLII, S. 540, 1904.