

# Die Monoaminosäuren des Keratins aus Pferdehaaren.

Von

Emil Abderhalden und H. Gideon Wells, Chicago.

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

(Der Redaktion zugegangen am 5. August 1905.)

Aus der umfangreichen und recht heterogenen Gruppe der sogenannten «Albuminoide» sind bis jetzt nur vier Eiweißarten, der Leim,<sup>1)</sup> das Seidenfibroin,<sup>2)</sup> das Horn<sup>3)</sup> und das Elastin<sup>4)</sup> eingehender auf ihre Zusammensetzung untersucht. Was ihren Gehalt an bekannten Monoaminosäuren anbetrifft, so stehen alle 4 Körper einander sehr nahe, in der quantitativen Zusammensetzung zeigen sich jedoch große Unterschiede. Leim z. B. enthält 16,5% Glycocoll, Horn nur 0,34%. Es schien uns von Interesse, zu prüfen, ob wenigstens in der äußerlich etwas einheitlicher erscheinenden Gruppe der Keratine eine annähernde Übereinstimmung im Gehalt an den einzelnen Aminosäuren anzutreffen sei. Es konnten bei der Hydrolyse des Keratins aus Pferdehaaren durch rauchende Salzsäure Glycocoll, Alanin, Aminovaleriansäure, Leucin, Prolin, Glutaminsäure, Asparaginsäure und Serin isoliert werden, dagegen gelang es nicht, Phenylalanin mit Sicherheit nachzuweisen. Jedenfalls ist seine Menge eine sehr geringe. Ferner wurde Tyrosin bestimmt. Mit dem Keratin aus Horn zeigt das Haarkeratin wenig Übereinstimmung. So sind in ersterem nur

<sup>1)</sup> Emil Fischer, P. A. Levene und R. H. Aders. Über die Hydrolyse des Leims. Diese Zeitschrift, Bd. XXXV, S. 70, 1902.

<sup>2)</sup> Emil Fischer und Aladar Skita. Über das Fibroin der Seide. Ebenda, Bd. XXXIII, S. 177, 1901, und Über das Fibroin und den Leim der Seide. Ebenda, Bd. XXXV, S. 221, 1902.

<sup>3)</sup> Emil Fischer und Theodor Dörpinghaus. Hydrolyse des Hornes. Ebenda, Bd. XXXVI, S. 462, 1902.

<sup>4)</sup> Emil Abderhalden und A. Schittenhelm. Die Abbauprodukte des Elastins. Ebenda, Bd. XLI, S. 293, 1904.

0,34% Glycocoll aufgefunden, während wir im Keratin aus Pferdehaaren 4,7% nachweisen konnten. Der Phenylalanin Gehalt des Hornes ist ein ganz beträchtlicher (ca. 3%), während wir hier Phenylalanin völlig rein nicht isolieren konnten.

Zur Verwendung kam 1 kg schwarzer Pferdehaare. Bei 100° verloren sie 11,5% Wasser. Sie besaßen einen Aschengehalt von 1,43%. Beim sechsstündigen Kochen mit der dreifachen Menge rauchender Salzsäure (von spez. Gew. 1,19) blieb ein Teil ungelöst als schwarze Masse («Melanin») zurück. Ihre Menge betrug 3,57% des Ausgangsmateriales. Die filtrierte Hydrolysenflüssigkeit wurde unter vermindertem Druck stark eingeeengt, dann in der bekannten Weise mit absolutem Alkohol und trockenem Salzsäuregas verestert. Die Veresterung wurde noch dreimal wiederholt, und schließlich aus den Hydrochloraten der Ester die freien Ester in der üblichen Weise mit Alkali und Kaliumkarbonat in Freiheit gesetzt und in Äther aufgenommen. Die fraktionierte Destillation der Ester gab folgendes Resultat:

Fraktion I	bis 60°	des Wasserbades	und 12 mm	Druck	83 g
» II	60 » 100°	»	»	12 »	60 »
» III	105°	» Ölbad	»	0,5 »	130 »
» IV	105 » 200°	»	»	0,5 »	80 »

Bei der Destillation unter stark vermindertem Druck (0,5 mm) sammelten sich in der mit flüßiger Luft gekühlten zweiten Vorlage große Mengen von intensiv riechenden schwefelhaltigen Produkten an. Im Destillationskolben selbst verblieb ein stark nach Estern riechender, zäher, tiefbrauner Rückstand.

Die drei ersten Fraktionen wurden sofort mit dem fünffachen Volumen Wasser solange am Rückflußkühler gekocht, bis die Flüssigkeit nicht mehr alkalisch reagierte. Die vierte Fraktion wurde mit dem fünffachen Volumen Wasser versetzt und nun mit dem gleichen Volumen Äther ausgeschüttelt, der Äther dreimal mit Wasser gewaschen, und die mit Natriumsulfat getrocknete, ätherische Lösung abgedampft. Es hinterblieb ein ziemlich reichlicher Rückstand, der sofort mit rauchender Salzsäure übergossen und eingedampft wurde. Die verbleibende, bald zum größten Teil kristallinisch erstarrende Masse enthielt nach

den bisherigen Erfahrungen das Phenylalaninchlorhydrat. Durch Eindampfen mit Ammoniak suchten wir die freie Aminosäure zu gewinnen, deren Abtrennung vom gebildeten Chlorammonium durch Auflösen in heißem Wasser und Abkühlen erfolgte. Die isolierte Aminosäure hatte nicht das Aussehen des Phenylalanins. Sie zersetzte sich beim Erhitzen im Kapillarrohr gegen  $290^{\circ}$  und gab folgende Analysenzahlen:

0,1619 g Substanz gaben 0,1448 g  $H_2O$  und 0,3233 g  $CO_2$

Berechnet für $C_6H_{13}NO_2$ :	Gefunden:
54,96% C und 9,92% H.	54,45% C und 9,93% H.

Die gesamte Substanzmenge wog roh 16,1 g.

Weitere Fraktionen ergaben ebenfalls Zahlen, welche ziemlich gut auf Leucin stimmten. Die Analysenzahlen der sich zuletzt ausscheidenden Kristallmassen näherten sich denen des Phenylalanins. Es gelang jedoch nicht, ein ganz reines Präparat herzustellen.

Da die Entwicklung großer Mengen schwefelhaltiger Produkte die Destillation der Ester bei 0,5 mm Druck durch Verstopfung der in flüssige Luft getauchten Vorlage wiederholt störte, glaubten wir den ungewöhnlichen Befund von Leucin in dieser hohen Fraktion auf diesen Umstand zurückführen zu müssen. Wir haben deshalb den ganzen Versuch mit 200 g Pferdehaaren wiederholt, das Resultat war genau dasselbe. Mit der genaueren Untersuchung der isolierten Produkte dieses Teiles der über  $100^{\circ}$  des Ölbad bei 0,5 mm Druck destillierten Ester sind wir noch beschäftigt.

Die vereinigten wässerigen Auszüge der vierten Fraktion wurden, wie üblich, durch zweistündiges Kochen mit überschüssigem Baryt verseift, und dann die Lösung längere Zeit aufbewahrt, wobei allmählich am Boden des Gefäßes neben Baryt die Kristalldrüsen des asparaginsäuren Barytes erschienen.

### Fraktion 1.

Aus der ersten Fraktion wurden durch Eindampfen der durch Kochen mit Wasser verseiften Ester 20 g eines süßschmeckenden, bei  $244^{\circ}$  (korr.) schmelzenden Rückstandes erhalten. Er wurde mit 15 ccm absolutem Alkohol übergossen,

und nun bis zur Sättigung trockenes Salzsäuregas eingeleitet. Nach kurzer Zeit erfolgte beim Stehen in einer Kältemischung und nach erfolgter Einimpfung eines Kriställchens von Glycocollesterchlorhydrat reichliche Kristallisation. Nach 24 Stunden war die ganze Masse zu einem lockeren Kristallbrei erstarrt, der abgesaugt, mit kaltem Alkohol und Äther gewaschen und über Kalk im Exsikkator getrocknet wurde. Schmelzpunkt  $144^{\circ}$  (korr.). Das Filtrat vom Glycocollesterchlorhydrat wurde unter vermindertem Druck zur Trockene verdampft, und aus dem Rückstand in gewohnter Weise die Ester mit Alkali und Kaliumcarbonat in Freiheit gesetzt und in Äther aufgenommen. Der Äther wurde mit wässriger Salzsäure ausgeschüttelt, und die salzsaure Lösung zur Trockene verdampft. Es hinterblieb ein nur sehr geringer Rückstand. Offenbar lagen außer Glycocoll nur Spuren anderer Aminosäuren vor.

### Fraktion 2.

Sie wurde völlig zur Trockene verdampft, und der Rückstand mit absolutem Alkohol ausgekocht.

Auf diese Weise wurde die  $\alpha$ -Pyrrolidincarbonsäure isoliert, die ins Kupfersalz verwandelt wurde. Beim Auskochen des gewonnenen Prolinkupfers gingen 0,5 g in Lösung, 3,0 g blieben ungelöst.

Der in absolutem Alkohol unlösliche Teil dieser Fraktion bestand aus Glycocoll (20 g), Alanin (5 g), Leucin (3 g) und Spuren von Aminovaleriansäure. Die Trennung dieser einzelnen Aminosäuren erfolgte durch fraktionierte Kristallisation. Das isolierte Glycocoll schmolz bei  $240^{\circ}$ . Zur weiteren Charakterisierung wurde es in das Esterchlorhydrat verwandelt.

0,1975 g Substanz gaben 0,2508 g  $\text{CO}_2$  und 0,1297 g  $\text{H}_2\text{O}$ .

Berechnet für  $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{NO}_2 \cdot \text{Cl}$ :

34,94% C und 7,28% N.

Gefunden:

34,62% C und 7,29% H.

### Fraktion 3.

Sie enthielt die Hauptmenge des Prolins und des Leucins. Ersteres wurde durch Auskochen der zur Trockene eingedampften Lösung der Aminosäuren mit absolutem Alkohol abgetrennt.



Die Gewinnung reiner Aminovaleriansäure aus einem Gemische von Alanin und Leucin ist mit großen Schwierigkeiten verknüpft. Vor allem ist darauf zu achten, daß sehr leicht Gemische von Alanin und Leucin erhalten werden können, deren Analysenzahlen sehr genau auf Aminovaleriansäuren stimmen. Wir haben in jedem Falle die Produkte, die nach Aussehen und Schmelzpunkt einheitlich zu sein schienen und deren Analysenzahlen mit denen der Aminovaleriansäure übereinstimmten, in mehrere Fraktionen geteilt und jede getrennt für sich analysiert.

#### Fraktion 4.

Die mit Baryt verseiften, wässerigen Auszüge dieser Fraktion wurden zunächst vom ausgeschiedenen asparaginsäuren Baryt abfiltriert. Seine Menge war sehr gering. Zur Darstellung der freien Säure wurde das Barytsalz durch Kochen mit Schwefelsäure zerlegt, und dann die überschüssige Schwefelsäure nach dem Abfiltrieren des Baryumsulfates quantitativ gefällt. Auf diese Weise wurden 3 g reine Asparaginsäure erhalten.

0,1958 g Substanz gaben 0,2595 g  $\text{CO}_2$  und 0,0887 g  $\text{H}_2\text{O}$

Berechnet für  $\text{C}_4\text{H}_7\text{O}_4\text{N}$ :  
36,09% C und 5,26% H.

Gefunden:  
36,14% C und 5,03% H.

Aus dem Filtrat vom asparaginsäuren Baryt wurde der Baryt mit Schwefelsäure quantitativ gefällt, vom Baryumsulfat abfiltriert, und das Filtrat sehr stark unter vermindertem Druck eingeeengt. Zur Abscheidung der Glutaminsäure wurde nun gasförmige Salzsäure bis zur Sättigung eingeleitet. Nach einigen Tagen erfolgte reichliche Kristallisation von Glutaminsäurechlorhydrat. Seine Menge betrug auf freie Glutaminsäure berechnet 15 g.

Die Mutterlauge vom Glutaminsäurechlorhydrat wurde in üblicher Weise durch Kochen mit gelbem Bleioxyd von der Salzsäure befreit, das gelöste Blei mit Schwefelwasserstoff gefällt und nun zur Kristallisation eingeeengt. Hierbei zeigte sich ein ausgesprochener, an Fleischextrakt erinnernder Geruch. Die Flüssigkeit selbst schmeckte stark süß. Das isolierte Produkt zersetzte sich nach mehrmaligem Umkristallisieren aus

Wasser gegen  $245^{\circ}$ , nachdem es schon bei  $220^{\circ}$  sich gebräunt hatte. Es lag Serin vor, wie die Analyse zeigte. Seine Menge betrug 5 g.

0.3021 g Substanz gaben 0,3770 g $\text{CO}_2$ und 0,1900 g $\text{H}_2\text{O}$ .	
Berechnet für $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_3$ :	Gefunden:
34,28% C und 6,66% H.	34,03% C und 6,9% H.

#### Destillationsrückstand.

Der beim Abdestillieren der Ester verbleibende dunkelbraunrot gefärbte Rückstand wurde heiß in Wasser gelöst und dann mehrere Stunden mit überschüssigem Baryt gekocht. Nach dem quantitativen Ausfällen des Baryts mit Schwefelsäure engten wir das Filtrat des Baryumsulfats stark ein. Hierbei schieden sich Kristalle aus, die nach Aussehen und Verhalten Leucin (6 g) waren. Das Filtrat des ausgeschiedenen Leucins wurde weiter konzentriert, dann gasförmige Salzsäure bis zur Sättigung eingeleitet. Nach dem Impfen eines Kriställchens von Glutaminsäurechlorhydrat und mehrtägigem Stehen im Eisschrank erstarrte die ganze Masse kristallinisch. Auf Glutaminsäure umgerechnet wurden 16,0 g reine Säure erhalten.

0.1891 g Substanz gaben 0,2259 g $\text{CO}_2$ und 0,0927 g $\text{H}_2\text{O}$ .	
Berechnet für $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4 \cdot \text{HCl}$ :	Gefunden:
32,7% C und 5,4% H.	32,6% C und 5,4% H.

Aus der Mutterlauge des Glutaminsäurechlorhydrates wurde die Salzsäure durch Kochen mit Bleioxyd entfernt. Es hinterließ beim Eindampfen der vom gelösten Blei mit Schwefelwasserstoff befreiten Lösung ein braungelb gefärbter, intensiv bitter schmeckender Sirup. Ein Teil wurde mit frisch gefälltem Kupferoxyd im Überschuß gekocht. Es entstand eine blaue Lösung. Es gelang jedoch weder ein gut kristallisierendes Kupfersalz zu erhalten, noch aus dem mit Schwefelwasserstoff zerlegten Kupfersalz ein einheitlich aussehendes Produkt zu gewinnen.

#### Bestimmung des Tyrosins.

500 g Pferdehaare (= 417,5 g nach Abzug des Wassers, der Asche und des Melanins) wurden 15 Stunden mit  $3 \mid 25^{\circ}$  iger Schwefelsäure gekocht, und dann die Schwefelsäure quantitativ

mit Baryt gefällt. Der Niederschlag wurde abgesaugt, scharf abgepreßt und so lange mit Wasser ausgekocht, bis das Filtrat keine erhebliche Reaktion mit Millons Reagens mehr gab. Die vereinigten wässerigen Lösungen wurden dann bis zur Kristallisation eingeengt. Das so gewonnene Rohtyrosin wurde dann in 2400 ccm Wasser gelöst und soviel Schwefelsäure zugesetzt, bis die Lösung 5%ig war und nun mit Phosphorwolframsäure gefällt. Es entstand ein reichlicher Niederschlag, der abgesaugt, scharf abgepreßt und dann mit Baryt zerlegt wurde. Im Filtrat der Fällung wurde der überschüssige Baryt mit Schwefelsäure quantitativ entfernt und nun das Filtrat vom Baryumsulfat bis zur Kristallisation eingeengt. Erhalten wurden 2,5 g Rohprodukt. Nach mehrmaligem Umkristallisieren aus heißem Wasser gab die Substanz folgende Zahlen:

0,1185 g Substanz gaben 0,2293 g  $\text{CO}_2$  und 0,1010 g  $\text{H}_2\text{O}$   
 0,1665 " " " " 14,8 ccm N [20°, 759 mm Hg]  
 Gefunden: 52,77% C, 9,47% H und 10,15% N.

Beim Erhitzen im Capillarrohr fing die Substanz gegen 260° an sich zu bräunen, gegen 270° sublimierte sie vollständig weg.

Es ist wohl möglich, daß hier dieselbe Aminosäure vorliegt, wie sie beim Casein als Begleiter des Tyrosins<sup>1)</sup> aufgefunden worden ist. Leider reichte die Substanzmenge zu weiteren Versuchen nicht aus. Zur genaueren Identifizierung soll die Darstellung wiederholt werden.

Aus dem Filtrat der Phosphorwolframsäurefällung wurde die überschüssige Phosphorwolframsäure mit Baryt entfernt, und der Überschub von Baryt quantitativ mit Schwefelsäure ausgefällt. Durch Einengen des Filtrats des Baryumsulfates erhielten wir 13,5 g reines Tyrosin, das nach einmaligem Umlösen aus heißem Wasser folgende Zahlen gab:

0,1936 g Substanz gaben 0,4240 g  $\text{CO}_2$  und 0,1060 g  $\text{H}_2\text{O}$   
 Berechnet für  $\text{C}_9\text{H}$ : Gefunden:  
 59,66% C und 6,08% H. 59,71% C und 6,08% H.

Berechnet man die gefundenen Mengen an einzelnen Aminosäuren auf 100 g asche-, wasser- und melaninfreies Kera-

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

tin, so erhält man die folgenden Werte. Wir bemerken noch, daß bei einer zweiten Hydrolyse mit nur 200 g Pferdehaaren die Ausbeuten etwas höher gefunden wurden, aber doch im großen und ganzen verhältnismäßig dieselben Werte.

Glycocoll	4.7 g
Alanin	1.5 »
Aminovaleriansäure	0.9 »
Leucin	7.1 »
Prolin	3.4 »
Asparaginsäure	0.3 »
Glutaminsäure	3.7 »
Tyrosin	3.2 »
Serin	0.6 » <sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Die Werte für Serin sind in allen Fällen bedeutend zu niedrig. Man erhält stets eine ziemlich beträchtliche Mutterlauge, aus der kristallinische Produkte nicht zu erhalten sind. Es ist wohl möglich, daß durch das Kochen mit Bleioxyd ein Teil des Serins zersetzt wird.