

Die Monoaminosäuren des Keratins aus Gänsefedern.

Von

Emil Abderhalden und E. R. Le Count, Chicago.

(Aus dem I. Chemischen Institut der Universität Berlin)

(Der Redaktion zugegangen am 5. August 1905.)

Im Vergleich zu dem jüngst¹⁾ untersuchten Keratin aus Pferdehaaren schien es uns von Interesse, ein aus anderer Quelle stammendes Keratin auf seine Zusammensetzung, speziell auf seinen Gehalt an Monoaminosäuren, zu untersuchen, um festzustellen, ob innerhalb ein und derselben Gruppe von Eiweißarten eine gewisse Übereinstimmung auch in der quantitativen Zusammensetzung nachzuweisen ist. Mit Hilfe der Estermethode isolierten wir nach erfolgter Hydrolyse mit rauchender Salzsäure Glycocoll, Alanin, Aminovaleriansäure, Leucin, α -Pyrrolidincarbonsäure, Asparaginsäure, Glutaminsäure und Serin. Ferner bestimmten wir den Tyrosin-gehalt. Phenylalanin dürfte nach unseren Beobachtungen wohl vorhanden sein, wir konnten es jedoch weder rein darstellen, noch seine Menge auch nur annähernd bestimmen. Wie die am Schlusse der Arbeit angeführte Übersicht der prozentischen Zusammensetzung des Keratins aus Gänsefedern an Monoaminosäuren zeigt, entspricht dieses Keratin dem in den Pferdehaaren vorhandenen in seinem Gehalt an Monoaminosäuren recht gut.

Experimenteller Teil.

1070 g Gänsefedern mit einem Wassergehalt von 8,87% und einem Aschegehalt von 2,63% wurden in der dreifachen Menge konzentrierter Salzsäure (spez. Gew. 1,19) gelöst, und

¹⁾ Emil Abderhalden und H. G. Wells, Die Monoaminosäuren des Keratins aus Pferdehaaren, Diese Zeitschrift, Bd. XLVI, S. 31, 1905.

die Lösung sechs Stunden am Rückflußkühler gekocht, dann unter stark vermindertem Druck zum dicken Sirup eingedampft, nachdem ein Versuch, aus der stark konzentrierten Lösung die Glutaminsäure als Chlorhydrat direkt zur Abscheidung zu bringen, kein befriedigendes Resultat ergeben hatte. Der Rückstand wurde mit 3 l absolutem Alkohol übergossen und bis zur vollkommenen Sättigung trockenes Salzsäuregas eingeleitet. Nun wurde die salzsaure alkoholische Lösung wiederum bei 12 mm Druck eingedampft, der ganze Prozeß noch zweimal wiederholt, und schließlich die Ester mit Alkali und Kaliumkarbonat in der üblichen Weise in Freiheit gesetzt und in Äther aufgenommen. Das nach dem Abdestillieren des Äthers verbleibende Estergemisch wurde nun der fraktionierten Destillation unterworfen:

Fraktion I	bis 55°	des Wasserbades	und 12 mm Druck	10,0 g
II	100°	"	12 "	160,0 "
III	105°	Ölbades	0,5 "	85,0 "
IV	105°	200°	0,5 "	160,0 "

Im Destillationskolben verblieb ein dunkelbraun gefärbter Rückstand, der beim Erkalten vollständig hart wurde. Er zeigte noch ausgesprochenen Estergeruch.

Fraktion 1.

Die erste Fraktion wurde sofort mit wässriger Salzsäure übergossen und zur Trockene verdampft. Es hinterließ nur ein sehr geringer Rückstand. Die Hauptmasse dieser Fraktion bestand aus Alkohol und Äther.

Fraktion 2.

Sie wurde sofort durch achtstündiges Kochen mit der siebenfachen Menge Wasser am Rückflußkühler verseift, dann durch Einengen in einzelne Fraktionen geteilt, die alle nach völligem Trocknen mit absolutem Alkohol ausgekocht wurden. Die alkoholischen Auszüge wurden vereinigt, dann im Vacuum zur Trockene verdampft, nochmals in absolutem Alkohol gelöst, vom Ungelösten abfiltriert und nun wieder verdampft. Man kann durch Wiederholung des Abdampfens und Wiederauflösen in absolutem Alkohol mitgelöste andere Aminosäuren,

außer Prolin, zur Abscheidung bringen und so das Prolin reinigen. Zu seiner Identifizierung wurde der Rückstand des alkoholischen Auszuges in Wasser aufgelöst, mit überschüssigem Kupferoxyd gekocht und vom ungelösten Kupferoxyd abfiltriert. Die dunkelblau gefärbte Lösung wurde nun zur Trockene eingedampft, und dann mit absolutem Alkohol das Kupfersalz des aktiven Prolins herausgelöst. Auf freie α -Pyrrolidincarbonensäure berechnen sich aus beiden Kupfersalzen 8,9 g.

0,1232 g racemisches, lufttrockenes Kupfersalz gaben 0,0296 g CuO
 = 0,0236 g Cu

Berechnet für $C_{10}H_{16}O_4N_2Cu + 2H_2O$:
 19,41% Cu.

Gefunden:
 19,1% Cu.

Die in absolutem Alkohol unlöslichen Aminosäuren wurden in zahlreiche Fraktionen zerlegt. Es konnten durch systematische Kristallisation erhalten werden: 24,5 g Leucin, 9,0 g Alanin und 25,0 g Glycocol; ferner ließen die Analysenzahlen verschiedener Fraktionen auf das Vorhandensein von Amino-valeriansäure schließen.

Das Glykokoll wurde aus den am leichtesten löslichen Gemischen als Esterchlorhydrat abgeschieden.

0,1331 g Substanz gaben 0,1680 g CO_2 und 0,0861 g H_2O
 Berechnet für $C_4H_{10}NO_2 \cdot Cl$: Gefunden:

34,41% C und 7,17% H.

34,4% C und 7,2% H.

Das isolierte Alanin zersetzte sich gegen 296° (korr.).

0,1858 g Substanz gaben 0,2754 g CO_2 und 0,1329 g H_2O
 Berechnet für $C_3H_7NO_2$: Gefunden:
 40,45% C und 7,87% H. 40,42% C und 7,95% H.

Das gewonnene Leucin zersetzte sich gegen 297° (korr.).

0,1876 g Substanz gaben 0,3761 g CO_2 und 0,1660 g H_2O
 Berechnet für $C_6H_{13}NO_2$: Gefunden:
 54,96% C und 9,92% H. 54,67% C und 9,83% H.

Fraktion 3.

Sie wurde mit der siebenfachen Menge Wasser solange am Rückflußkühler gekocht, bis die alkalische Reaktion verschwunden war, dann unter vermindertem Druck völlig zur Trockene verdampft und aus dem Gemisch durch Auskochen mit absolutem Alkohol das α -Prolin, dessen Menge 24,5 g betrug, entfernt. Der unlösliche Rückstand bestand aus Alanin

(8,0 g), Leucin (16,0 g) und Aminovaleriansäure (5,0 g). Die Trennung dieser Aminosäuren erfolgte durch wiederholte fraktionierte Kristallisation.

Die isolierte, wiederholt umkristallisierte und in mehrere Fraktionen getrennte Aminovaleriansäure gab folgende Analysenwerte:

0,1500 g Substanz gaben 0,2799 g CO ₂ und 0,1245 g H ₂ O	
Berechnet für C ₅ H ₁₁ NO ₂ :	Gefunden:
51,28% C und 9,40% H.	50,89% C und 9,22% H.

Fraktion 4.

Sie wurde sofort mit dem fünffachen Volumen Wasser versetzt und dann mit dem gleichen Volumen Äther geschüttelt. Der im Scheidetrichter abgetrennte Äther wurde, wie üblich, mit Wasser wiederholt gewaschen, und hierauf die vereinigten wässerigen Extrakte durch zweistündiges Kochen mit überschüssigem Barythydrat verseift. Aus der ätherischen Lösung wurde der Äther abdestilliert, der gelbbraun gefärbte ölige Rückstand mit konzentrierter Salzsäure zur Trockene verdampft, der zum größten Teil kristallinischer Rückstand, in dem wir das Hydrochlorat des Phenylalanins vermuteten, durch Eindampfen mit Ammoniak zerlegt und schließlich durch Auflösen der ganzen Massen, Kochen mit Tierkohle und fraktionierte Kristallisation die freie Aminosäure vom gebildeten Chlorammonium getrennt. Die sich ausscheidenden Kristallisationen hatten nicht das Aussehen des Phenylalanins, auch gaben sie, mit verdünnter Schwefelsäure und einem Körnchen Kaliumbichromat gekocht, nicht den charakteristischen Geruch des Phenylacetaldehydes. Der Zersetzungspunkt der einzelnen Kristallisationen lag gegen 290°. Wie verschiedene Analysen ergaben, lag Leucin vor und zwar in großen Mengen. Wir haben hier dieselbe Erscheinung vor uns, wie bei der Untersuchung des Keratins aus Pferdehaaren.¹⁾ Die genauere Natur des isolierten Leucins ist noch nicht aufgeklärt. Im ganzen wurden isoliert: 34,0 g.

0,1550 g Substanz gaben 0,3115 g CO ₂ und 0,1389 g H ₂ O	
Berechnet für C ₆ H ₁₃ NO ₂ :	Gefunden:
54,96% C und 9,92% H.	54,80% C und 9,80% H.

¹⁾ l. c.

Aus den leichter löslichen Kristallfraktionen wurden Produkte isoliert, welche einen höheren Kohlenstoffgehalt besaßen als das Leucin. Die Analysenzahlen näherten sich denen des Phenylalanins sehr, so daß angenommen werden darf, daß Phenylalanin vorhanden ist, jedoch offenbar nur in kleinen Mengen.

Aus den mit Baryt verseiften wässerigen Extrakten hatte sich im Laufe der Zeit asparaginsaures Baryt ausgeschieden, das abfiltriert und durch Kochen mit Schwefelsäure zerlegt wurde. Durch quantitatives Füllen der überschüssigen Schwefelsäure mit Baryt erhielten wir reine Asparaginsäure (8,5 g).

0,1823 g Substanz gaben 0,2410 g CO ₂ und 0,0883 g H ₂ O	
Berechnet für C ₄ H ₇ O ₄ N:	Gefunden:
36,09% C und 5,26% H.	36,05% C und 5,32% H.

Aus dem Filtrat vom asparaginsauren Baryt wurde der Baryt quantitativ mit Schwefelsäure ausgefällt, das Filtrat vom schwefelsauren Baryt stark eingengt und zur Abscheidung der Glutaminsäure als Chlorhydrat mit gasförmiger Salzsäure gesättigt. Nach längerem Stehen und Impfen mit einem Kriställchen von Glutaminsäurechlorhydrat erfolgte reichliche Kristallisation. Auf reine Glutaminsäure berechnet betrug die Ausbeute 12,0 g. Ein Teil des Hydrochlorates wurde in der bekannten Weise durch Kochen mit gelbem Bleioxyd in die freie Säure verwandelt.

0,1696 g Substanz gaben 0,2534 g CO ₂ und 0,0957 g H ₂ O	
Berechnet für C ₅ H ₉ O ₄ N:	Gefunden:
40,81% C und 6,12% H.	40,75% C und 6,26% H.

Die Mutterlauge vom Glutaminsäurechlorhydrat wurde zur Entfernung der Salzsäure mit gelbem Bleioxyd gekocht, filtriert, vom gelösten Blei durch Einleiten von Schwefelwasserstoff befreit, und das Filtrat vom Bleisulfid zur Kristallisation eingengt. Die erste Kristallisation schmeckte deutlich sauer und zeigte in Kristallform und im Aussehen des Kupfersalzes das Verhalten der Asparaginsäure (2,0 g). Die Mutterlauge von der Asparaginsäure roch ausgesprochen nach Fleischextrakt und schmeckte stark süß. Die durch weiteres Einengen erhaltenen Kristallmassen zeigten das Verhalten des Serins. Gegen 225° bräunte sich die Substanz, um sich gegen 245° völlig zu zersetzen.

0,1643 g Substanz gaben 0,2076 g CO ₂ und 0,0991 g H ₂ O.	
Berechnet für C ₉ H ₇ NO ₃ :	Gefunden:
34,28% C und 6,66% H.	34,4% C und 6,7% H.
Ausbeute 4,5 g.	

Verarbeitung des Destillationsrückstandes.

Der im Destillationskolben verbliebene dunkelbraunrot gefärbte, feste Rückstand wurde, wie üblich, in Wasser aufgenommen und mit 400 g Baryt 6 Stunden am Rückflußkühler gekocht, dann der Baryt quantitativ mit Schwefelsäure gefällt, und das Filtrat vom schwefelsauren Baryt stark eingengt. Hierbei schieden sich zunächst Kristallmassen ab, die nach wiederholtem Umkristallisieren aus heißem Wasser unter Anwendung von Tierkohle ganz das Aussehen des Leucins zeigten (2 g). Das Filtrat dieser Kristallmassen wurde weiter eingengt, und dann zur Abscheidung der Glutaminsäure mit gasförmiger Salzsäure gesättigt. Es erfolgte nach mehrtägigem Stehen auf Eis und Einimpfen eines Kriställchens von Glutaminsäurechlorhydrat reichliche Kristallisation. Auf reine Glutaminsäure berechnet wurden isoliert: 10,0 g. Das Filtrat vom Glutaminsäurechlorhydrat wurde mit Bleioxyd zur Entfernung der Salzsäure gekocht. Beim Einengen der von dem gelösten Blei durch Einleiten von Schwefelwasserstoff getrennten Lösung erhält man einen dunkelbraunen, intensiv und recht unangenehm bitter schmeckenden Sirup. Bis jetzt ist es uns nicht gelungen, aus denselben Verbindungen zu isolieren, welche einen einheitlichen Eindruck gemacht hätten.

Bestimmung des Tyrosins.

500 g Gänsefedern (= 442,5 g asche- und wasserfreies Keratin) wurden mit 3 l 25%iger Schwefelsäure 15 Stunden am Rückflußkühler erhitzt, dann mit Baryt die Schwefelsäure quantitativ gefällt. Das abfiltrierte Baryumsulfat kochten wir solange aus, bis das Filtrat keine Reaktion mit Millons Reagens mehr gab, und dampften dann alle Filtrate bis zur Kristallisation ein.

Das so gewonnene Rohtyrosin, das, in 5%iger Schwefelsäure gelöst, mit Phosphorwolframsäure eine starke Fällung

gab, wurde in heißem Wasser gelöst, mit Tierkohle gekocht und nun durch Einengen der Lösung zur Abscheidung gebracht. Erhalten wurden 16,0 g Tyrosin.

0,1425 g Substanz gaben 0,3118 g CO_2 und 0,0822 g H_2O

Berechnet für $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_3$:

Gefunden:

59,66% C und 6,07% H.

59,6% C und 6,40% H.

Berechnet man die gefundenen Mengen an einzelnen Aminosäuren auf 100 g asche- und wasserfreies Keratin, so erhält man folgende Werte:

	Keratin aus Gänsefedern	Keratin aus Pferdehaaren ¹⁾
Glycocoll	2,6 g	4,7 g
Alanin	1,8 »	1,5 »
Aminovaleriansäure	0,5 »	0,9 »
Leucin	8,0 »	7,1 »
Prolin	3,5 »	3,4 »
Glutaminsäure	2,3 »	3,7 »
Asparaginsäure	1,1 »	0,3 »
Tyrosin	3,6 »	3,2 »
Serin	0,4 »	0,6 »

Vergleicht man diese Zahlenwerte, welche selbstverständlich keine absoluten Größen darstellen, mit den aus dem Keratin der Pferdehaare gewonnenen, so findet man eine recht gute Übereinstimmung dieser beiden Eiweißstoffe in den quantitativen Verhältnissen der einzelnen Aminosäuren. Daß aus dem Keratin der Federn bedeutend weniger Glycocoll gewonnen wurde, dürfte, wie das Resultat der Verarbeitung der ersten Fraktion zeigt, auf einen Verlust zurückzuführen sein, auch hatten wir versäumt, den von den Estern abdestillierten Äther auf Glycocoll zu untersuchen.

¹⁾ l. c.