

Hydrolyse des Keratins aus Horn und aus Wolle.

Von

Emil Abderhalden und **Arthur Voitnovici.**

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

(Der Redaktion zugegangen am 4. Juni 1907.)

Es ist wiederholt an dieser Stelle betont worden, daß keine Gruppe der Proteine so heterogene Vertreter aufweist, wie diejenige der sogenannten Albuminoide. Während bei den übrigen Proteinen eine Trennung nach Löslichkeit und anderen Eigenschaften durchführbar war, sind wir bei der erwähnten Klasse von Proteinen ganz besonders auf die Ergebnisse der chemischen Analyse angewiesen, um eine gewisse Gruppierung auf Grund einer ähnlichen Zusammensetzung durchführen zu können. Wir müssen uns allerdings vorläufig mit einer Vergleichung der Mengenverhältnisse an einzelnen Aminosäuren begnügen. Diese ist nicht ganz einwandfrei, indem die zur Verfügung stehenden Methoden einstweilen nur bei einigen Aminosäuren eine quantitative Bestimmung gestatten. Wir haben wiederholt auf diesen Mangel hingewiesen, jedoch zugleich betont, daß die von uns angewandte Estermethode, wenn sie sorgfältig und unter stets recht ähnlichen Bedingungen durchgeführt wird, innerhalb gewisser Grenzen recht gut vergleichbare Werte liefert. Die Hydrolyse ein und desselben Proteins, die wiederholt ausgeführt worden war, hatte stets Resultate ergeben, die unter sich recht gut übereinstimmten. Wir freuen uns, mitteilen zu können, daß in neuester Zeit Osborne und Clapp¹⁾ einen Eiweißkörper, das Phaseolin, untersucht haben und zwar unter Anwendung der Estermethode, den der eine von uns

¹⁾ Thomas B. Osborne and S. H. Clapp, Hydrolysis of Phaseolin, American Journ. of Physiol., Bd. XVIII, S. 295, 1907.

bereits in Gemeinschaft mit Babkin¹⁾ auf Monoaminosäuren verarbeitet hätte, und daß dabei die genannten Autoren zu Werten gekommen sind, die mit unseren Angaben über die Mengen an Aminosäuren in recht engen Grenzen in Einklang stehen. Daß kleine Differenzen bei einigen schwer trennbaren Aminosäuren vorhanden sind, ist nicht auffällig. Jedenfalls beweist die angeführte Arbeit, daß wir den Resultaten der Estermethode einen vergleichenden Wert wohl beimessen dürfen. Selbstverständlich ist die Vergleichung der Mengen an Aminosäuren einstweilen nur ein Notbehelf. Es ist klar, wie wir schon wiederholt betont haben, daß die Resultate der totalen Hydrolyse kein Bild über den Aufbau der einzelnen Proteine geben, indem z. B. bei gleichen Mengen an einzelnen Aminosäuren deren Verknüpfung untereinander — Reihenfolge — doch eine ganz andere sein kann. Immerhin bedeutet diese Art der Vergleichung der einzelnen Proteine gegenüber der früher üblichen Gegenüberstellung der Elementaranalysen verschiedener Proteine einen großen Fortschritt. Einen weiteren, viel exakteren Einblick in die Verwandtschaft der einzelnen Proteine wird uns unzweifelhaft die partielle Hydrolyse, d. h. die Gewinnung größerer Komplexe geben. Der Ausbau dieser Forschungsrichtung wird am ehesten die Möglichkeit bieten, eine Einteilung der Proteine, fußend auf deren Zusammensetzung, vorzunehmen.

Wir haben im folgenden zwei Keratinarten untersucht, nämlich das Keratin aus Hammelhorn und dasjenige aus Wolle vom Schaf. Bei der Untersuchung dieser Proteine folgten wir den früher schon oft beschriebenen Methoden. Von einer Reinigung dieser Eiweißkörper kann natürlich, ausgenommen einer rein mechanischen, keine Rede sein. Wir geben in der folgenden Übersicht einen Überblick über die erhaltenen Resultate.

Hydrolyse des Keratins aus Schafwolle:

0,58%	Glykokoll
4,4%	Alanin
2,8%	Valin

¹⁾ Emil Abderhalden und Boris Babkin, Die Monoaminosäuren des Legumins, Diese Zeitschrift, Bd. XLVII, S. 354, 1906.

11,5 ⁰ / ₀	Leucin
4,4 ⁰ / ₀	Prolin
0,1 ⁰ / ₀	Serin
2,3 ⁰ / ₀	Asparaginsäure
12,9 ⁰ / ₀	Glutaminsäure
2,9 ⁰ / ₀	Tyrosin
7,3 ⁰ / ₀	Cystin

Es ist von Interesse, diesen Werten die früher bei der Hydrolyse des Keratins aus Pferdehaaren und aus Gänsefedern erhaltenen Zahlen gegenüberzustellen.

Hydrolyse des Keratins aus Pferdehaaren:¹⁾

4,7 ⁰ / ₀	Glykokoll
1,5 ⁰ / ₀	Alanin
0,9 ⁰ / ₀	Valin
7,1 ⁰ / ₀	Leucin
3,4 ⁰ / ₀	Prolin
0,6 ⁰ / ₀	Serin
0,3 ⁰ / ₀	Asparaginsäure
3,7 ⁰ / ₀	Glutaminsäure
3,2 ⁰ / ₀	Tyrosin

Hydrolyse des Keratins aus Gänsefedern:²⁾

2,6 ⁰ / ₀	Glykokoll
1,8 ⁰ / ₀	Alanin
0,5 ⁰ / ₀	Valin
8,0 ⁰ / ₀	Leucin
3,5 ⁰ / ₀	Prolin
0,4 ⁰ / ₀	Serin
1,1 ⁰ / ₀	Asparaginsäure
2,3 ⁰ / ₀	Glutaminsäure
3,6 ⁰ / ₀	Tyrosin

Die Unterschiede in der Zusammensetzung dieser Keratine verschiedener Herkunft sind ziemlich beträchtlich. Auf den Wert an Glutaminsäure beim Keratin aus Pferdehaaren und aus Gänsefedern ist kein großes Gewicht zu legen, indem er

¹⁾ Emil Abderhalden und H. Gideon Wells, Die Monoamino-säuren des Keratins aus Pferdehaaren, Diese Zeitschrift, Bd. XLVI, S. 31 (1905).

²⁾ Emil Abderhalden und E. R. Le Count, Die Monoamino-säuren des Keratins aus Gänsefedern, Diese Zeitschrift, Bd. XLVI, S. 40 (1905).

sicher viel zu klein ist, wie uns eine direkte Bestimmung der Glutaminsäure in diesen Keratinarten ergab. Es unterliegt keinem Zweifel, daß die untersuchten Keratinsubstanzen sehr unreine Proteine sind, und manche unserer Beobachtungen machen es sehr wahrscheinlich, daß das Alter der «Keratine» auch von Einfluß auf ihre Zusammensetzung ist. Jedenfalls ist ein Gemenge von verschiedenartigen Proteinen am Aufbau der sogenannten Keratinsubstanzen der untersuchten Gebilde beteiligt. Wir werden versuchen, eine Trennung herbeizuführen.

Zu einem ähnlichen Resultat führt die Vergleichung der Zusammensetzung des Keratins aus Hammelhorn mit dem des Rinderhorns, wie die folgende Übersicht zeigt.

Hydrolyse des Keratins aus Horn vom Hammel:

0,45%	Glykokoll
1,6%	Alanin
4,5%	Valin
15,3%	Leucin
3,7%	Prolin
1,1%	Serin
1,9%	Phenylalanin
2,5%	Asparaginsäure
17,2%	Glutaminsäure
3,6%	Tyrosin
7,5%	Cystin
2,7%	Arginin
0,2%	Lysin

Zur Vergleichung seien die bei der Hydrolyse des Rinderhorns¹⁾ erhaltenen Mengen an Monoaminosäuren angeführt.

0,34%	Glykokoll
1,2%	Alanin
5,7%	Valin
18,3%	Leucin
3,6%	Prolin
0,7%	Serin
3,0%	Phenylalanin
2,5%	Asparaginsäure
3,0%	Glutaminsäure
4,6%	Tyrosin

¹⁾ Emil Fischer und Th. Dörpinghaus, Hydrolyse des Horns, Diese Zeitschrift, Bd. XXXVI, S. 462 (1902).

Die Übereinstimmung ist eine im ganzen befriedigende. Der niedere Wert für Glutaminsäure beim Keratin aus Rinderhorn erklärt sich aus der angewandten Methode. In Wirklichkeit kommen ihm nach unseren Bestimmungen 16—18% zu. Wir haben Keratin von Hörnern von Hammeln verschiedenen Alters untersucht und gefunden, daß der Glutaminsäuregehalt schwankt. So fanden wir bei der Hydrolyse von Hörnern junger Tiere z. B. 15,6% Glutaminsäure und bei älteren 18,5 und wie eben angeführt 17,2% dieser Aminosäure. Jedenfalls dürfte auch die Keratinsubstanz der verschiedenartigen Hornarten ein Gemenge verschiedenartiger Proteine darstellen. Immerhin scheinen so große Unterschiede wie beim Keratin aus Haaren nicht vorzukommen. Wir setzen unsere Untersuchungen in dieser Gruppe von Proteinen fort und hoffen der vergleichenden physiologischen Chemie neue Gebiete erschließen zu können.

Experimenteller Teil.

I. Hydrolyse des Keratins aus Schafwolle.

Die Ausführung der Hydrolyse und die Isolierung der Ester erfolgten in der üblichen Weise. Ohne Anwendung der Estermethode haben wir das Tyrosin bestimmt. Zu diesem Zwecke hydrolysierten wir die Wolle mit 25%iger Schwefelsäure und krystallisierten das Tyrosin nach quantitativer Entfernung der Schwefelsäure mit Baryt aus. Auf direktem Wege haben wir ferner den Gehalt an Cystin festgestellt, und ferner an Glutaminsäure. Letztere schieden wir als Hydrochlorat ab. Vergleicht man die so erhaltenen Werte an Glutaminsäure mit den nach der Estermethode erhaltenen, so wird besonders scharf klar, daß man unter keinen Umständen die erhaltenen Mengen an Aminosäuren als absolute Werte betrachten darf. Wie früher schon nachgewiesen wurde, lassen sich die Ausbeuten an Aminosäuren ganz wesentlich steigern, wenn der ganze Veresterungsprozeß wiederholt wird.¹⁾ Die Ausbeute an Glutaminsäure läßt sich auch bei der Estermethode zu einer fast quantitativen gestalten, wenn der bei der Destillation der Ester

¹⁾ Emil Abderhalden, Hydrolyse des krystallisierten Hämoglobins aus Pferdeblut, Diese Zeitschrift, Bd. XXXVII, S. 484 (1903).

verbleibende Rückstand mit einer konzentrierten Barytlösung längere Zeit gekocht wird.¹⁾ Nach quantitativer Entfernung des Baryts mit Schwefelsäure läßt sich dann aus dem stark eingengten Filtrat des Baryumsulfats ein großer Teil der gesamten Glutaminsäure als salzsaures Salz abscheiden.

Wir wollen noch bemerken, daß die Ester aus den Esterchlorhydraten der Aminosäuren nach der üblichen Methode unter Zusatz von Natronlauge und Kaliumcarbonat in Freiheit gesetzt und sofort in Äther aufgenommen wurden.

Die verwendete Schafwolle verlor beim Trocknen bei 105° bis zur Gewichtskonstanz an Gewicht 4,15% und enthielt 0,19% Asche.

400 g dieses Präparates wurden 6 Stunden am Rückflußkühler mit 1½ l starker Salzsäure vom spezifischen Gewicht 1,19 gekocht, nachdem die Wolle durch Erwärmen des Gemisches auf dem Wasserbade zur völligen Lösung gebracht worden war. Hierbei bildete sich eine dunkelbraune Lösung. Sie wurde filtriert, auf dem Filter verblieben 8,1 g einer dunkelbraun gefärbten Masse. Das Filtrat kochten wir mit Tierkohle auf und engten dann die etwas heller gefärbte Flüssigkeit unter vermindertem Druck bei einer 40° nicht übersteigenden Temperatur des Wasserbades auf ein kleines Volumen ein. Durch Einleiten von gasförmiger Salzsäure bis zur Sättigung der Lösung brachten wir die Glutaminsäure als salzsaures Salz zur Abscheidung. Nach längerem Stehen bei 0° und dem Einimpfen eines Kryställchens von salzsaurer Glutaminsäure erstarrte bald die ganze Masse. Der noch ziemlich stark gelb gefärbte Krystallbrei wurde auf Koliertuch abgenutscht und scharf abgepreßt. Die Mutterlauge engten wir ein, sättigten wiederum mit Salzsäure und überließen dann die Lösung der Krystallisation. Dieser Prozeß wurde solange wiederholt, bis keine Abscheidung von Krystallen mehr erfolgte. Die vereinigten Krystallmassen lösten wir in Wasser, kochten die leicht gelb gefärbte Lösung mit Tierkohle auf, engten dann das wasserklare Filtrat auf ein

¹⁾ Emil Abderhalden und Otto Rostoski, Die Monoamino-säuren des Edestins aus Baumwollsamensamen und dessen Verhalten gegen Magensaft, Diese Zeitschrift, Bd. XLIV, S. 265 (1905).

kleines Volumen ein und leiteten wiederum bis zur Sättigung gasförmige Salzsäure ein. Auch hier wurde die Mutterlauge der ersten Krystallisation des nunmehr ganz reinen Glutaminsäurechlorhydrats, wie oben angeführt, weiter verarbeitet.

Die gesamte Ausbeute an reiner salzsaurer Glutaminsäure betrug 59,6 g. Zur Analyse wurde aus dem salzsauren Salz die Glutaminsäure selbst dargestellt.

0,2208 g Substanz gaben 0,3300 g CO₂ und 0,1226 g H₂O

Berechnet für C₅H₉NO₄:

Gefunden:

40,81% C und 6,12% H.

40,86% C und 6,21% H.

Die Mutterlauge der Krystallisation des rohen Glutaminsäurechlorhydrates engten wir unter vermindertem Druck bis zum zähen Sirup ein. Den Rückstand übergossen wir mit der dreifachen Menge absoluten Alkohols und leiteten in diesen bis zur Sättigung sorgfältig getrocknete gasförmige Salzsäure ein. Hierbei ging alles in Lösung. Wir ließen diese 24 Stunden stehen und verdampften dann unter vermindertem Druck bei 40° des Wasserbades bis zur Trockne. Die Veresterung wurde noch dreimal wiederholt. Die Ester setzten wir, wie oben erwähnt, in Freiheit. Die Destillation der Ester ergab folgende Fraktionen:

I.	bis 60°	des Wasserbades	und 12 mm Druck	= 70,0 g
II.	60 » 100°	»	» 12 » »	= 73,7 »
III.	» 105°	» Ölbades	» 0,2 » »	= 17,0 »
IV.	106 » 200°	»	» 0,2 » »	= 32,0 »

Im Destillationskolben verblieb ein dunkelbraun gefärbter Rückstand. Er wog 65 g. Beim Auskochen mit absolutem Alkohol ging fast alles in Lösung. Die braunrot gefärbte Flüssigkeit verdampften wir unter vermindertem Druck zur Trockne und kochten den Rückstand mit Essigäther aus. Beim Abkühlen der erhaltenen Lösung fiel eine voluminöse, flockige Krystallmasse aus. Sie erwies sich als Leucinimid, das höchstwahrscheinlich sich sekundär gebildet hat.

Die drei ersten Fraktionen verseiften wir sofort durch Kochen mit dem fünffachen Volumen Wasser bis zum Verschwinden der alkalischen Reaktion. Die klaren Lösungen, welche nunmehr die freien Aminosäuren enthielten, verdampften

wir einzeln unter vermindertem Druck völlig zur Trockne. Die so erhaltenen Rückstände kochten wir mit absolutem Alkohol zur Gewinnung des Prolins aus. Die vereinigten, zunächst klaren Lösungen trübten sich bald, eine Beobachtung, die fast in allen Fällen bei der Prolingewinnung gemacht worden ist. Sie hat ihre Ursache darin, daß stets in mehr oder weniger umfangreichem Maße Aminosäuren in dem heißen Alkohol mit gelöst werden, welche an und für sich in Alkohol gänzlich unlöslich sind. Um das Prolin in wirklich reinem Zustande zu erhalten, wurde dieser erste alkoholische Auszug von den geringen ausgeschiedenen Massen abfiltriert. Das Filtrat nochmals in Vakuum zur Trockne verdampft und der Rückstand wiederum mit Alkohol ausgekocht. Hierbei verblieb ein geringer Rest an unlöslichen Produkten. Die nunmehr klar bleibende alkoholische Lösung verdampften wir wiederum unter vermindertem Druck völlig zur Trockne. Der verbleibende, zum Teil krystallinische, zum Teil sirupöse Rückstand enthält das aktive und racemische Prolin. Zur Trennung dieser beiden Formen eignet sich am besten das Kupfersalz, das wir durch Kochen der wässerigen Lösung des genannten Rückstandes mit überschüssigem Kupferoxyd darstellten. Die dunkelblaue Lösung engten wir unter vermindertem Druck bis zur völligen Entfernung des Wassers ein und lösten aus dem zum großen Teil krystallisierten Rückstand das Kupfersalz des aktiven Prolins mit absolutem Alkohol heraus. Zurück blieb die racemische Kupferverbindung, die wir aus Wasser umkrystallisierten. Das so erhaltene Präparat verwendeten wir lufttrocken zur Analyse. Es enthält in diesem Zustande zwei Moleküle Wasser.

0,1152 g Substanz verloren bei 120° 0,0126 g H₂O

Berechnet für C ₁₀ H ₁₆ O ₄ N ₂ Cu + 2 H ₂ O:	Gefunden:
10,99% H ₂ O.	10,94% H ₂ O.

0,1026 g bei 120° getrocknetes Kupfersalz gaben 0,0281 g CuO

Berechnet für C ₁₀ H ₁₆ O ₄ N ₂ Cu:	Gefunden:
,21,81% Cu.	21,93% Cu.

Die Ausbeute an aktivem plus racemischem Prolin betrug 16,7 g.

Der in Alkohol unlösliche Teil der I. Fraktion bestand aus Glykokoll und Alanin. Das Glykokoll wiesen wir als Ester-

chlorhydrat nach, indem wir einen aliquoten Teil der Fraktion mit dem dreifachen Volumen absoluten Alkohols übergossen und bis zur Sättigung trockene gasförmige Salzsäure einleiteten. Nach dem Impfen mit einem Kryställchen von Glykokollesterchlorhydrat und längerem Stehen auf Eis erfolgte bald Krystallisation. Das erhaltene Produkt zeigte den Schmelzpunkt 144° . Die gesamte Fraktion enthielt 2,2 g Glykokoll.

Das Alanin isolierten wir zunächst in Form seines Kupfersalzes.

0,2451 g Kupfersalz gaben 0,0815 g CuO

Berechnet für $(C_3H_6NO_2)_2Cu$:

26,41% Cu.

Gefunden:

26,52% Cu.

Das Alanin selbst gab folgende Zahlen:

0,2011 g Substanz gaben 0,2975 g CO_2 und 0,1438 g H_2O

Berechnet für $C_3H_7NO_2$:

40,45% C und 7,87% H.

Gefunden:

40,35% C und 8,00% H.

Die gesamte Ausbeute an Alanin betrug 8,3 g.

Die II. Fraktion enthielt Alanin, Valin und Leucin. Die Trennung der beiden letzteren Aminosäuren bereitete große Schwierigkeiten, weil sie die große Neigung besitzen, Mischkrystalle zu bilden. Diese können sehr leicht einheitliche Substanzen vortäuschen. Zur Gewinnung von reinem Leucin benutzten wir zunächst die fraktionierte Krystallisation. Wir erhielten mehrere Krystallfraktionen, welche aus völlig reinem Leucin bestanden. Die weiteren Fraktionen erwiesen sich als Gemische von Leucin und Valin. Am raschesten orientiert in solchen Fällen die Gewinnung des Kupfersalzes und dessen Analyse. Sie gibt über die Art des vorliegenden Gemisches ein Bild. Auch ist die Darstellung der Kupfersalze und deren fraktionierte Krystallisation ein sehr wertvolles Hilfsmittel zur Trennung von Leucin und Valin. Noch bedeutendere Schwierigkeiten bietet die Abtrennung von Valin und Alanin. Auch hier findet ein Zusammenkrystallisieren statt. Dasselbe gilt von den Kupfersalzen. Ganz wesentlich kompliziert wird die Reindarstellung des vorliegenden Gemisches von Alanin, Valin und Leucin durch den Umstand, daß jede dieser Aminosäuren in mehr oder weniger umfangreichem Maße in zwei Formen vor-

liegt, in der optisch aktiven und der racemischen Form. Die Menge der letzteren ist sehr wechselnd und fällt der Methode zur Last.

Nach vieler Mühe sind wir zu folgenden Ausbeuten an reinen Aminosäuren gelangt: 8,2 Alanin, 10,9 Valin, 25,2 Leucin.

Vom Alanin haben wir das Kupfersalz untersucht.

0,1055 g Kupfersalz gaben 0,0344 g CuO	
Berechnet für $(C_3H_6NO_2)_2Cu$:	Gefunden:
26,41 % Cu.	25,91 % Cu.

Das isolierte Valin ergab folgendes Drehungsvermögen: 0,5017 g Substanz in 5,3565 g 20% Salzsäure gelöst, (mithin 8,56%) und 1,09 spezifisches Gewicht drehten im Dezimeterrohr $2,4^\circ$ nach rechts. Also

$$[\alpha]_D^{20} = + 25,7.$$

Die Analyse ergab:

0,1611 g Kupfersalz gaben 0,0432 g CuO	
Berechnet für $(C_5H_{10}NO_2)_2Cu$:	Gefunden:
21,51 % Cu.	21,60 % Cu.
0,2049 g Substanz gaben 0,3830 g CO ₂ und 0,1741 g H ₂ O	
Berechnet für C ₅ H ₁₁ NO ₂ :	Gefunden:
51,28 % C und 9,40 % H.	51,10 % C und 9,5 % H.

Vom Leucin haben wir das Kupfersalz und die freie Aminosäure untersucht.

0,0912 g Kupfersalz gaben 0,0224 g CuO	
Berechnet für $(C_6H_{12}NO_2)_2Cu$:	Gefunden:
19,6 % Cu.	19,50 % Cu.
0,1127 g Substanz gaben 0,2269 g CO ₂ und 0,1034 g H ₂ O	
Berechnet für C ₆ H ₁₃ NO ₂ :	Gefunden:
54,96 % C und 9,92 % H.	54,91 % C und 10,26 % H.

Die III. Fraktion endlich bestand, wie es scheint, ganz aus Leucin (11,8 g). Wenigstens konnten wir keine andere Aminosäure außer dem bereits durch Auskochen mit Alkohol entfernten Prolin mit Sicherheit nachweisen.

0,1446 g Kupfersalz gaben 0,0353 g CuO	
Berechnet für $(C_6H_{12}NO_2)_2Cu$:	Gefunden:
19,65 % Cu.	19,44 % Cu.

Bei der Verarbeitung der IV. Fraktion suchten wir zunächst in der gewohnten Weise den Phenylalaninester abzutrennen, indem wir das gewonnene Destillat mit der fünffachen

Menge Wasser versetzten und das Gemisch mit dem gleichem Volumen Äther ausschüttelten. Den Äther wuschen wir wiederholt mit dem gleichen Volumen Wasser. Die ätherische Lösung trockneten wir zunächst mit Natriumsulfat und destillierten hierauf den Äther ab. Den verbleibenden Rückstand verseiften wir durch Eindampfen mit konzentrierter Salzsäure. Die verbleibende salzsaure Aminosäure verwandelten wir durch Übergießen mit Ammoniak in die freie Säure. Das gebildete Chlorammonium laugten wir mit wenig eiskaltem Wasser aus und krystallisierten dann den Rückstand aus Wasser um. Die Abscheidung der Krystalle erinnerte stark an Leucin und in der Tat zeigte die Analyse, daß diese Aminosäure vorlag. Phenylalanin konnten wir nicht auffinden. Die Oxydation einer Probe mit Kaliumbichromat in schwefelsaurer Lösung ergab kein positives Resultat für Phenylalanin. Jedenfalls war der Geruch nach Phenylacetaldehyd nicht mit Sicherheit wahrnehmbar. Die Menge des isolierten Leucins betrug 7,1 g.

0,1451 g Substanz gaben 0,2918 g CO₂ und 0,1311 g H₂O

Berechnet für C₆H₁₃NO₂:

Gefunden:

54,96% C und 9,92% H.

54,85% C und 10,11% H.

0,1241 g Kupfersalz gaben 0,0302 g CuO

Berechnet für (C₆H₁₂NO₂)₂Cu:

Gefunden:

19,6% Cu.

19,40% Cu.

Zur völligen Sicherstellung haben wir das gewonnene Leucin auf sein optisches Verhalten geprüft:

0,5482 g Substanz in 4,5611 g 20% Salzsäure, mithin 10,72% Gehalt, drehte im Dezimeterrohr 1,9° nach rechts. Spez. Gewicht der Lösung 1,09.

$$[\alpha]_D^{20} = 16,25.$$

Die vereinigten wässerigen Lösungen dieser IV. Fraktion verseiften wir durch zweistündiges Kochen mit Baryt. Wir verwendeten etwa die zweifache Menge des Gewichtes der gesamten Esterfraktion an Baryt. Die verseifte Lösung ließen wir mehrere Tage stehen. Es erfolgte allmählich Ausscheidung von Krystalldrüsen. Von diesen filtrierten wir ab und setzten das vorliegende Baryumsalz der Asparaginsäure durch Kochen mit überschüssiger Schwefelsäure in Freiheit. Aus dem Filtrat

des Baryumsulfats entfernten wir die überschüssige Schwefelsäure quantitativ mit Baryt und engten nun das Filtrat vom Baryumsulfat bis zur Krystallisation ein. Die Menge der so erhaltenen Asparaginsäure betrug 2,2 g.

Die Mutterlauge vom asparaginsauren Baryum befreiten wir mit Schwefelsäure quantitativ vom Baryt und engten das Filtrat stark ein. Die Lösung schmeckte deutlich nach Glutaminsäure. Ein Rest an dieser Aminosäure war offenbar der eingangs erwähnten direkten Abscheidung als Chlorhydrat entgangen. Zur Gewinnung dieses Restes an Glutaminsäure leiteten wir gasförmige Salzsäure bis zur Sättigung in die genannte Lösung ein. Wir erhielten noch 3,8 g Glutaminsäurechlorhydrat. Die Mutterlauge der krystallinischen Abscheidung der salzsauren Glutaminsäure befreiten wir durch Kochen mit gelbem Bleioxyd von der Salzsäure, filtrierten dann und fällten das gelöste Blei mit Schwefelwasserstoff. Die vom abgeschiedenen Bleisulfid filtrierte Lösung engten wir stark ein. Es folgte Krystallisation von Asparaginsäure. Die Ausbeute war 6,4 g.

Die Analyse ergab:

0,2137 g Substanz gaben 0,2814 g CO₂ und 0,1035 g H₂O

Berechnet für C₄H₇O₄N:

Gefunden:

36,09% C und 5,26% H.

35,91% C und 5,41% H.

Die Mutterlauge der Asparaginsäure verarbeiteten wir auf Serin, das offenbar vorhanden war, dessen Reindarstellung jedoch nicht gelang.

Bestimmung des Tyrosins.

Zur Bestimmung des Tyrosins wurden 100 g Wolle desselben Präparates, das zur eben beschriebenen Hydrolyse mit Salzsäure gedient hatte, mit 500 ccm 25%iger Schwefelsäure 12 Stunden gekocht. Die gelbbraun gefärbte Lösung wurde nun filtriert, das Filtrat mit Wasser verdünnt und die Schwefelsäure quantitativ mit Baryt entfernt. Den Baryumsulfatniederschlag kochten wir wiederholt mit Wasser aus, bis das Filtrat mit Millons Reagens keine Rotfärbung mehr gab. Die vereinigten Filtrate engten wir nun bis zur beginnenden Krystallisation ein und filtrierten von der bei längerem Stehen in der Kälte ausgeschiedenen Krystallmasse ab. Diese Krystalli-

sation wurde durch weiteres Einengen der Mutterlauge solange wiederholt, bis das Filtrat tyrosinfrei war. Das so erhaltene rohe Tyrosin krystallisierten wir unter Anwendung von Tierkohle aus heißem Wasser um. Die gesamte Ausbeute an reinem Tyrosin betrug 2,8 g.

Analyse:

0,1505 g Substanz gaben 0,3284 g CO₂ und 0,0828 g H₂O

Berechnet für C₉H₁₁NO₃:

Gefunden:

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

59,51% C und 6,15% H.

Bestimmung des Cystins.

100 g Wolle wurden mit 300 ccm konzentrierter Salzsäure vom spezifischen Gewicht 1,19 6 Stunden am Rückflußkühler gekocht. Die filtrierte Lösung engten wir unter vermindertem Druck stark ein und nahmen den Rückstand in etwa 1500 ccm Wasser auf. Die erhaltene Lösung entfärbten wir durch Kochen mit Tierkohle. Nun versetzten wir die schwach gelbbraun gefärbte Lösung mit soviel Kalilauge, bis die Lösung nur noch schwach sauer reagierte. Nach zweitägigem Stehen schieden sich die charakteristischen hexagonalen Krystalle des Cystins ab. Ihre Menge betrug 1,2 g. Sie wurden zur Reinigung in 10%igem Ammoniak gelöst und durch Zusatz von Eisessig wieder abgeschieden. Das erhaltene Cystin war frei von Tyrosin. Es zeigte folgendes optisches Verhalten: 0,3112 g Substanz, in 11,6522 g Normalsalzsäure gelöst, mithin 2,67%. Spezifisches Gewicht der Lösung = 1,028, Drehung bei Natriumlicht im Dezimeterrohr 5,88° nach links.

$$[\alpha]_D^{20} = - 220,2^\circ.$$

Die Mutterlauge des abfiltrierten Cystins zeigte bei längerem Stehen weitere Krystallabscheidung und zwar erhielten wir zunächst noch 2,3 g Cystin. Die Krystalle zeigten zum Teil die bekannten hexagonalen Platten, zum Teil fanden sich Nadeln. Durch Einengen der Mutterlauge der genannten Cystinfraktion erhielten wir noch 3,4 g reines Cystin. Die gesamte Ausbeute an Cystin betrug 6,9 g.

0,1220 g Substanz gaben 0,2374 g BaSO₄, entspr. 0,0326 g S

Berechnet für C₆H₁₂N₂S₂O₄:

Gefunden:

26,67% S

26,72% S.

Wir haben noch ein weiteres Präparat von Schafwolle aus Rumänien auf seinen Cystingehalt untersucht und fanden hier eine beträchtlich höhere Ausbeute, nämlich auf 100 g Wolle 12,5 g Cystin. Wir müssen es dahingestellt sein lassen, ob wir verschiedene Keratine untersucht haben oder aber, ob das eine Präparat irgendwie technisch gereinigt worden war. Jedenfalls war das letztere Präparat keiner weiteren Reinigung unterworfen worden. Es ist natürlich nicht ausgeschlossen, daß auch die verschiedenen Rassen, von denen die beiden Präparate stammten, ausschlaggebend sind.

II. Hydrolyse des Keratins aus Hörnern vom Hammel.

Es ist bereits ein Keratin aus Hornsubstanz eingehend mit Hilfe der Estermethode untersucht worden, nämlich das Keratin aus dem Horn vom Rinde. Emil Fischer und Dörpinghaus,¹⁾ welche die betreffende Untersuchung durchgeführt haben, stellten bereits das Vorhandensein der folgenden Aminosäuren fest: Glykokoll, Alanin, Valin, Leucin, Prolin, Serin, Phenylalanin, Asparaginsäure und Glutaminsäure. Außerdem hat Mörner²⁾ nachgewiesen, daß dem Keratin aus Horn, entsprechend seinem hohen Schwefelgehalt, ein reichlicher Gehalt an Cystin zukommt. Was nun unsere Untersuchung anbetrifft, so ist zu bemerken, daß möglichst gereinigte Hörner vom Hammel zur Anwendung kamen. Der Gang der Untersuchung war im wesentlichen genau derselbe, wie bei der eben beschriebenen Hydrolyse des Keratins aus Schafwolle. Wir können uns deshalb kurz fassen. Bemerken wollen wir nur, daß wir die Hydrolyse mehrmals ausgeführt haben und in einem Mal zur Vergleichung die Ester aus den Esterchlorhydraten mit Hilfe der auf die vorhandene Salzsäure berechneten Menge von Natriumäthylat in Freiheit gesetzt haben.³⁾ Die Mengen an

¹⁾ E. Fischer und Th. Dörpinghaus, Hydrolyse des Horns, Diese Zeitschrift, Bd. XXXVI, S. 462 (1902).

²⁾ K. A. H. Mörner, Zur Kenntnis der Bindung des Schwefels in den Proteinstoffen, Diese Zeitschrift, Bd. XXXIV, S. 207 (1901).

³⁾ Vgl. Emil Abderhalden und O. Rostowski, Beitrag zur Kenntnis des Bence-Jonesschen Eiweißkörpers, Diese Zeitschrift, Bd. XLVI, S. 125 (1905).

Aminosäuren waren etwas größer als bei der Infreiheitsetzung der Ester mit Hilfe von Natronlauge und Kaliumcarbonat. Der Unterschied war jedoch nicht sehr beträchtlich. Ferner sei erwähnt, daß wir in einem Fall versucht haben, nach der von Fischer angegebenen Methode Oxyprolin zu isolieren.¹⁾ Der Erfolg war allerdings kein eindeutiger und wir müssen es offen lassen, ob dem Keratin aus dem Horn das Oxyprolin zukommt. Zu gleicher Zeit haben wir den Gehalt des untersuchten Keratins an Diaminosäuren und Histidin festgestellt. Letztere Verbindung konnten wir nicht isolieren, dagegen sind Arginin und Lysin vorhanden, wie das auch schon Hedin²⁾ nachgewiesen hat.

Wir führen hier nur diejenige Untersuchung an, bei welcher neben der Bestimmung der Monoaminosäuren auch auf Oxyprolin gefahndet und der Gehalt an Diaminosäuren bestimmt wurde. Außer dieser einen Hydrolyse haben wir noch zwei weitere ausgeführt. Die bei diesen erhaltenen Resultate stimmen im wesentlichen mit den Werten der hier mitgeteilten Hydrolyse überein.

Zu der vorliegenden Untersuchung verwendeten wir 500 g Hornsubstanz, welche mehrere Tage im Trockenschrank blieb. Sie verlor beim Trocknen bis zur Gewichtskonstanz bei 110° 5,12% an Gewicht und beim Veraschen ergab sich ein Aschegehalt von 0,19%. Die angeführte Menge an Keratin wurde mit der dreifachen Menge konzentrierter Salzsäure 6 Stunden am Rückflußkühler gekocht und die abgekühlte, dunkelbraun gefärbte Hydrolysenflüssigkeit nach dem Filtrieren unter verringertem Druck stark konzentriert. Nun leiteten wir zur Abscheidung der Glutaminsäure gasförmige Salzsäure bis zur Sättigung ein. Nach einiger Zeit erfolgte reichliche Krystallisation. Nach dem Abfiltrieren des Krystallbreies wurde auch hier die Mutterlauge eingeengt und wiederum gasförmige Salzsäure eingeleitet. Dieser Prozeß wurde solange wiederholt, bis keine

¹⁾ Emil Fischer, Über eine neue Aminosäure aus Leim, Berichte der Deutsch. chem. Ges., Jg. XXXV, S. 2660 (1902).

²⁾ S. G. Hedin, Über ein neues Spaltungsprodukt der Hornsubstanz, Diese Zeitschrift, Bd. XX, S. 186 (1895), und Eine Methode, das Lysin zu isolieren, Ebenda, Bd. XXI, S. 297 (1896).

krystallinische Abscheidung mehr erfolgte. Das Rohprodukt der salzsauren Glutaminsäure lösten wir in Wasser, kochten mit Tierkohle auf und schieden dann die Glutaminsäure wiederum als Hydrochlorat ab. Die Ausbeute an diesem betrug 103,5 g.

0,1673 g Substanz gaben 0,2024 g CO_2 und 0,0837 g H_2O

Berechnet für $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4 \cdot \text{HCl}$:

Gefunden:

32,69% C und 5,45% H.

32,99% C und 5,68% H.

Die Mutterlauge des Rohproduktes an salzsaurer Glutaminsäure engten wir dann unter vermindertem Druck bis zum dicken Sirup ein. Den Rückstand veresterten wir in der gewohnten Weise und wiederholten den ganzen Prozeß viermal. Die Ester setzten wir in diesem Fall mit Natronlauge und Kaliumcarbonat in Freiheit. Die Destillation der Ester ergab folgendes Resultat:

I.	bis 60° des Wasserbades und	12 mm Druck =	151 g
II.	von 60 » 100° »	» »	= 80,5 »
III.	» 105° » Ölbad	» 0,2—0,4 »	= 54,6 »
IV.	von 105 » 180° »	» 0,2—0,4 »	= 28,0 »

Im Kolben verblieb ein dunkelbraun gefärbter Rückstand; er wog 90 g. Bei der Verarbeitung der einzelnen Fraktionen verfahren wir genau so, wie es bei der Wolle beschrieben ist. Wir begnügen uns deshalb mit der Angabe der isolierten Aminosäuren. Aus Fraktion I, II und III gewannen wir in der gewohnten Weise 15,1 g Prolin. Analysiert wurde das racemische Kupfersalz.

0,3618 g lufttrockenes Kupfersalz verloren bei 120° 0,0382 g H_2O

Berechnet für $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_4\text{N}_2\text{Cu} + 2\text{H}_2\text{O}$:

Gefunden:

10,99% H_2O .

10,56% H_2O .

0,3236 g bei 120° getrocknetes Kupfersalz gaben 0,0883 g CuO

Berechnet für $(\text{C}_5\text{H}_8\text{NO}_2)_2\text{Cu}$:

Gefunden:

21,81% Cu.

21,76% Cu.

Fraktion I enthielt 1,6 g Glykokoll, das als Esterchlorhydrat isoliert wurde. Sein Schmelzpunkt war 144°. Außerdem gewannen wir 4,9 g Alanin und Spuren von Valin. Die Analyse des Alanins und von dessen Kupfersalz gab folgendes Resultat:

0,1853 g Substanz gaben 0,2739 g CO_2 und 0,1305 g H_2O

Berechnet für $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2$:

Gefunden:

40,45% C und 7,87% H.

40,31% C und 7,88% H.

Die beim Ausäthern der Ester zurückbleibende dickbreiige Masse lösten wir in Wasser, übersättigten schwach mit Salzsäure und dampften das Gemisch auf dem Wasserbad ein. Von Zeit zu Zeit filtrierten wir die ausgeschiedenen Salze ab. Der zuletzt übrig bleibende, dunkelgefärbte Sirup wurde mit ungefähr der dreifachen Menge salzsäurehaltigem Alkohol übergossen. Das ausgeschiedene Salz filtrierten wir ab und engten dann das Filtrat unter vermindertem Druck ein. Den Rückstand versetzten wir wiederum mit der dreifachen Menge Alkohol und leiteten bis zur Sättigung gasförmige, trockene Salzsäure ein. Der hierbei verbleibende Rückstand an Salzen wurde abfiltriert und dann die Veresterung wiederholt. Die Ester wurden nun wieder mit Natronlauge und Kaliumcarbonat in Freiheit gesetzt, in Äther aufgenommen, die erhaltenen Ester wiederum fraktioniert, destilliert. Die folgende Übersicht gibt das Resultat der Destillation wieder:

I.	bis 100°	des Wasserbades	und 12 mm Druck	= 66 g
II.	bis 100°	»	» 0,4 »	= 16,8 »
III.	von 105 bis 180°	» Ölbad	» 0,4 »	= 6 »

Aus den einzelnen Fraktionen haben wir folgende Arten und Mengen von Aminosäuren erhalten:

Aus den Fraktionen I und II 1,4 g Prolin.

Fraktion I 0,1 g Glykokoll, 0,6 g Alanin, 3,5 g Valin und 10,3 g Leucin. Fraktion II 12 g fast reines Leucin. Fraktion III 1,0 g Phenylalanin, 2 g Glutaminsäure, 0,6 g Asparaginsäure und Spuren von Serin.

Um die Diaminosäuren, das Histidin und das Oxyprolin, zu gewinnen, verwandten wir den Rückstand, aus dem wir die Ester mit Äther extrahiert hatten. Wir entfernten zunächst die Salze möglichst vollkommen in der eben beschriebenen Weise. Der zuletzt verbleibende dunkelbraune salzsäurehaltige Sirup wurde nun mit 1 1/2 l Wasser verdünnt und dann soviel Schwefelsäure zugesetzt, bis die Lösung davon 5% enthielt. Nun fällten wir solange mit einer Lösung von Phosphorwolframsäure, als ein Niederschlag entstand. Der Niederschlag wurde abgenutscht, mit 5%iger Schwefelsäure gut ausgewaschen, scharf abgepreßt und dann in der Reibschale mit der zweifachen Gewichtsmenge

des erhaltenen Niederschlages an Baryt innig verrieben. Das Gemisch füllten wir nun mit etwa einem Liter Wasser in eine Flasche und brachten diese 12 Stunden auf eine Schüttelmaschine. Das gebildete phosphorwolframsaure Baryum saugten wir nun ab und fällten im Filtrat den Baryt quantitativ mit Schwefelsäure. Das Filtrat vom Baryumsulfat verarbeiteten wir genau nach der Vorschrift von Kossel und Kutscher¹⁾ auf Histidin, Lysin und Arginin. Histidin schien nicht vorhanden zu sein. Das Lysin wiesen wir als Pikrat nach und vom Arginin bildeten wir das Nitrat und das Kupfersalz. Die Ausbeute an Lysin betrug 1,1 g und an Arginin 12,6 g.

Das Filtrat der Phosphorwolframsäurefällung verarbeiteten wir auf Oxyprolin. Wir entfernten zunächst die überschüssige Phosphorwolframsäure mit Baryt und dessen Überschuß nach Filtration des phosphorwolframsauren Baryums mit Schwefelsäure. Das nun erhaltene Filtrat enthielt noch Salzsäure. Diese entfernten wir durch Schütteln der Flüssigkeit mit Silbersulfat. Im Filtrat des Chlorsilbers und des ungelöst gebliebenen Silbersulfats entfernten wir das gelöste Silber mit Schwefelwasserstoff. Das Filtrat von Silbersulfid engten wir unter vermindertem Druck stark ein und ließen dann den erhaltenen Sirup mehrere Tage im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure stehen. Allmählich erfolgte Krystallisation. Die abgeschiedenen Krystalle zeigten nicht das Aussehen des Oxyprolins. Zur genaueren Identifizierung der erhaltenen Verbindung stellten wir ihr β -Naphthalinsulfoderivat dar.²⁾ Das erhaltene Produkt zeigte die Eigenschaften des β -Naphthalinsulfoserins. Es schmolz gegen 209°.

0,1601 g Substanz gaben 0,3124 g CO₂ und 0,0648 g H₂O

Berechnet für C₁₃H₁₃O₅NS:

52,88% C und 4,41% H.

Gefunden:

53,21% C und 4,53% H.

Es bleibt unentschieden, ob neben dem Serin Oxyprolin vorhanden war. Jedenfalls kann seine Menge nicht groß gewesen sein. Die Ausbeute an Serin betrug 4,6 g.

¹⁾ A. Kossel und F. Kutscher, Beiträge zur Kenntnis der Eiweißkörper, Diese Zeitschrift, Bd. XXXI, S. 165, (1900/01).

²⁾ E. Fischer und P. Bergell, Über die β -Naphthalinsulfoderivate der Aminosäuren, Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXV, S. 3779 (1902).

Bestimmung des Tyrosins.

Angewandt wurden 100 g Hornsubstanz. Die Hydrolyse erfolgte durch Kochen mit der fünffachen Menge 25% iger Schwefelsäure am Rückflußkühler. Die Isolierung des Tyrosins bewirkten wir nach Entfernung der Schwefelsäure mit Baryt in der gewohnten Weise durch Krystallisation. An reinem Tyrosin wurden 3,3 g erhalten.

0,1558 g Substanz gaben	0,3401 g CO ₂	und	0,0863 g H ₂ O
Berechnet für C ₉ H ₁₁ NO ₃ :	Gefunden:		
59,66% C und 6,07% H.	59,54% C	und	6,19% H.

Bestimmung des Cystins.

100 g Hornsubstanz wurden mit der dreifachen Menge konzentrierter Salzsäure 6 Stunden am Rückflußkühler gekocht. Die weitere Verarbeitung war dieselbe, wie sie bei der Wolle beschrieben worden ist. Die Ausbeute an reinem Cystin betrug 7,2 g.

Analyse:

0,1483 g Substanz gaben	0,2903 g BaSO ₄
Berechnet für C ₆ H ₁₂ N ₂ S ₂ O ₄ :	Gefunden:
26,67% S.	26,84% S.

