

# Über die Eihäute von *Scyllium stellare* Günth. und ihre Abbauprodukte.

Von  
**Fritz Pregl.**

(Aus dem Institut für medizinische Chemie der Universität Graz.)

(Der Redaktion zugegangen am 10. April 1908.)

In die große Gruppe der Albuminoide gehören außer den bekannteren Vertretern dieser Gruppe, wie das typische Keratin aus Horn, die membrana testacea des Hühnereies, und das Koilin,<sup>1)</sup> auch die Eihäute der Selachiereier. Letztere sind vollkommen homolog der membrana testacea des Hühnereies, denn sie stellen so wie diese ein erstarrtes Drüsensekret der Eileiterdrüsen dar, die bei den Vögeln sowohl, wie bei den Selachiern einander vollkommen entsprechen. Diese Tatsache lud zu einem biochemischen Vergleiche beider Gebilde ein.

Auf die liebenswürdige Anregung von Herrn Prof. K. B. Hofmann hin unternahm ich es, die Eihäute von *Scyllium stellare* Günth. einer genaueren Untersuchung zu unterziehen. Das Untersuchungsmaterial war aus der Zoologischen Station in Neapel bezogen worden. Die ersten, allerdings dürftigen Angaben über das chemische Verhalten und die elementare Zusammensetzung der Eihäute der Selachiereier verdanken wir Krukenberg.<sup>2)</sup> Es sei hier ausdrücklich darauf hingewiesen, daß *Scyllium stellare* Günth. synonym ist mit *Scyllium Catulus* Cuv., und daß daher aus den Publikationen Krukenbergs nicht mit Sicherheit zu entnehmen ist, welches Material ihm zur Untersuchung vorgelegen hat, da er keine Autorennamen angibt.

<sup>1)</sup> K. B. Hofmann und F. Pregl, Über Koilin, Diese Zeitschrift, Bd. LII, S. 448.

<sup>2)</sup> Krukenberg, Vergleichend-physiologische Studien, II. Reihe, 1. Abt., S. 63—70, Heidelberg 1882; Mitteil. aus d. zool. Station zu Neapel, Bd. VI, 1886, S. 293—296.

Für die Zwecke der vorliegenden Untersuchungen wurden die Eihäute von *Scyllium stellare* zuerst in einprozentiger Salzsäure mehrere Tage quellen gelassen und nach erfolgter Quellung abgespült, aufgeschnitten und vom zurückgebliebenen gallertigen Inhalt mechanisch unter dem Wasserstrahle befreit. Nachdem die Eihäute an der Luft getrocknet waren, erfolgte eine Extraktion mit Alkohol und darauf eine mit Äther. Nach völligem Trocknen an der Luft bis zum konstanten Gewicht hatten diese Eihäute noch einen Wassergehalt von 10,01 % und einen Aschengehalt von 0,1 %.

0,2830 g verloren beim Trocknen bei 120° 0,0285 g H<sub>2</sub>O und hinterließen beim Veraschen 0,0003 g Asche.

Die bei 110° im Vakuum getrocknete Substanz der so gereinigten Eihäute gab bei der Elementaranalyse folgende Werte, die ich der Ermittlung des Herrn Assistenten Buchtala verdanke:

0,1860 g lieferten bei der Verbrennung 0,3677 g CO<sub>2</sub> und 0,1219 g H<sub>2</sub>O.

0,4124 > > 54,8 ccm N (b = 729 mm, t = 15,5°).

0,3300 > > nach dem Schmelzen mit Soda und Salpeter 0,0345 g BaSO<sub>4</sub>.

Danach berechnet sich die elementare Zusammensetzung der Eihäute von *Scyllium stellare* wie folgt:

C = 53,92 %; H = 7,33 %; N = 15,08 %; S = 1,44 %.

#### Löslichkeitsverhältnisse und allgemeine Eiweißkörperreaktionen.

Die Substanz der Eihäute von *Scyllium stellare* ist in den gebräuchlichen Lösungsmitteln, wie Wasser, Alkohol, Äther, Benzol usw., auch in der Wärme unlöslich. In konzentrierten Mineralsäuren lösen sich die Eihäute bei Erwärmen. Verwendet man Salpetersäure und macht nachher mit Ammoniak alkalisch, so tritt typische Xanthoproteinsäurereaktion auf. Hingegen nehmen beim Kochen der Eihäute mit konzentrierter Salzsäure weder die Flüssigkeit, noch die Eihäute eine für die Liebermannsche Reaktion charakteristische Färbung an. Ebenso fällt die Molischsche Probe negativ aus. Diese beiden letzten Befunde stehen im besten Einklange mit der Angabe Krukenbergs, wonach die Kohlehydratgruppe der Substanz der Eihaut fehlen soll. Die Eihäute geben die Millonsche Reaktion

sehr deutlich, entsprechend ihrem hohen Gehalt an Tyrosin, sowie die Tryptophanreaktion von E. Rohde.

Von 33% iger Natronlauge wird die Substanz der Eihäute selbst in der Siedehitze kaum angegriffen. Nach längerer Digestion der Eihäute mit 5% iger Natronlauge bei der Temperatur des Wasserbades erfolgt vollständige Lösung, aus welcher beim Neutralisieren ein flockiger Niederschlag zu erhalten ist. Aus dem Filtrat von diesem Neutralisationsniederschlag ist durch Sättigung mit Ammonsulfat eine weitere Fällung zu erhalten, die nach dem Abfiltrieren in Wasser leicht löslich ist. Diese Lösung gibt die Biuretreaktion, die Millonsche, die Xanthoproteinsäure- und die Tryptophanreaktion von Erwin Rohde, während die Ferrocyankaliumessigsäureprobe, sowie die Reaktion auf bleischwärenden Schwefel negativ ausfallen. Das Filtrat vom Ammonsulfatniederschlag gibt keine Biuretreaktion mehr. In Pepsinsalzsäure, sowie in alkalischen Pankreatinlösungen erleiden die Eihäute keine sichtbare Veränderung.

**Bestimmung der Monaminosäuren nach der Estermethode  
von E. Fischer.**

In Arbeit genommen wurden 150 g der lufttrockenen Eihäute, entsprechend rund 135 g wasser- und aschefreier Substanz, indem sie mit 500 ccm rauchender Salzsäure übergossen, unter öfterem Umschütteln auf dem Wasserbade bis zur erfolgten Lösung digeriert, und hierauf noch 7 Stunden lang am Rückflußkühler gekocht wurden. Nach Entfernung der Salzsäure durch Vakuumdestillation wurde die erste Veresterung mit 500 ccm Alkohol und durch Einleiten von trockenem Salzsäuregas bis zur Sättigung vorgenommen, und nach dem Einengen der Flüssigkeit im Vakuum nochmals verestert. Der durch neuerliche Vakuumdestillation erhaltene Rückstand diente nun zur Gewinnung der freien Ester in der bekannten Weise unter Beobachtung der dabei erforderlichen Kautelen, durch Zerlegung ihrer Chlorhydrate mit Natronlauge und Kaliumcarbonat, und Ausschütteln mit Äther. Die mit geglühtem Natriumsulfat entwässerte ätherische Lösung hinterließ tags darauf nach Abdestillieren des Äthers 110 g Rohester, die nun der fraktionierten Destillation im Vakuum einer guten Wasserstrahlpumpe bei

einem Druck von 11 mm Hg unterzogen wurden. Dabei ergaben sich folgende Fraktionen:

- |    |                                 |      |
|----|---------------------------------|------|
| 1. | bis 123° (Temperatur des Ölbad) | 36 g |
| 2. | von 123 > 185° ( > > > )        | 28 > |
| 3. | Destillationsrückstand          | 29 > |

### I. Fraktion (bis 123°).

Entsprechend einer schon früher von mir mitgeteilten Beobachtung wurde dieses Estergemenge von 36 g, statt eine weitere Trennung durch fraktionierte Destillation anzustreben, mit der dreifachen Menge Wasser verdünnt, dann dreimal mit der gleichen Äthermenge ausgeschüttelt, und die vereinigten ätherischen Ausschüttelungen mehrmals mit wenig Wasser gewaschen. Dadurch wurden zwei Unterfraktionen gewonnen:

Fraktion Ia: die vereinigten wässerigen Esterlösungen, und

Fraktion Ib: der Destillationsrückstand der vereinigten ätherischen Ausschüttelungen.

Fraktion Ia wurde ohne weiteren Zusatz durch sieben Stunden am Rückflußkühler gekocht und hierauf auf dem Wasserbade eingedampft. Die so erhaltene Krystallmasse (6,5 g) wurde nach vollständigem Trocknen mit absolutem Alkohol erschöpfend ausgekocht und diente zuerst zur Abscheidung des Glycins. Zu diesem Ende wurde die getrocknete Krystallmasse mit 20 cm absoluten Alkohols übergossen, trockenes Salzsäuregas bis zur Sättigung eingeleitet, und nach dem Abdestillieren des salzsäurehaltigen Alkohols im Vakuum dieser Vorgang nochmals wiederholt. Beim Einimpfen eines Kryställchens von Glycinesterchlorhydrat erstarrte die ganze Masse zu einem Brei feiner Nadeln, die durch Absaugen von der Mutterlauge getrennt wurden. Durch Einengen der Mutterlauge im Vakuum und neuerliche Veresterung derselben konnte wieder eine erkleckliche Menge von Krystallen erhalten werden. Das so erhaltene Glycinesterchlorhydrat schmolz nach einmaligem Umkrystallisieren aus Alkohol bei 144° und wog 6,6 g, entsprechend 3,5 g freien Glycins.



0,1827 g der im Vakuum über Kalk und Schwefelsäure getrockneten Substanz lieferte bei der Chlorbestimmung 0,1880 g AgCl.

Berechnet für  $C_4H_{10}O_2NCl$ :

25,40% Cl.

Gefunden:

25,41% Cl.

Durch eine Vakuumdestillation wurde aus den Mutterlaugen vom Glycinersterchlorhydrat die alkoholische Salzsäure möglichst entfernt, und der in Wasser gelöste Rückstand wiederholt und anhaltend mit öfters erneuerten Mengen von Bleioxyd gekocht. Das Filtrat vom überschüssigen Bleioxyd und dem gebildeten Bleichlorid wurde mit Schwefelwasserstoff behandelt, und nach Entfernung des gebildeten Bleisulfides konnten durch Einengen der erhaltenen klaren Flüssigkeit Krystallisationen im Gewichte von 2,8 g gewonnen werden, die sich als Alanin erwiesen haben.

0,1616 g lieferten 0,1150 g  $H_2O$  und 0,2393 g  $CO_2$ .

Berechnet für  $C_3H_7NO_2$ :

40,42% C und 7,92% H.

Gefunden:

40,39% C und 7,96% H.

#### Fraktion Ib.

Der Destillationsrückstand der vereinigten ätherischen Ausschüttelung wurde in der mehrfachen Menge Wassers gelöst und durch siebenstündiges Kochen am Rückflußkühler verseift. Durch nachträgliches Einengen, Absaugen, Waschen mit Alkohol und wiederholtes Eindampfen der erhaltenen Mutterlaugen ließ sich eine Krystallmasse erhalten, die nach völligem Trocknen und Pulvern mit der mehrfachen Menge absoluten Alkohols ausgekocht wurde. Durch fraktionierte Krystallisation konnten daraus 7,9 g Leucin und 1,5 g Alanin isoliert werden.

0,1460 g Leucin lieferten bei der Verbrennung 0,1292 g  $H_2O$   
und 0,2944 g  $CO_2$ .

Berechnet für  $C_6H_{13}NO_2$ :

54,92% C und 9,99% H.

Gefunden:

55,00% C und 9,90% H.

Das in der üblichen Weise durch Kochen mit überschüssigem Kupferoxyd erhaltene Kupfersalz des isolierten Leucins erwies sich nach völligem Trocknen als zum Teil löslich in Methylalkohol; es lag daher ein Gemenge des gewöhnlichen Leucins ( $\alpha$ -Aminoisobutyllessigsäure) mit Isoleucin ( $\alpha$ -Aminomethyläthylpropionsäure) vor.

## Fraktion Ic.

Zur Isolierung des Prolins dienten die letzten, nicht krystallisierenden, in Alkohol löslichen Mutterlaugen der Fraktionen Ia und Ib, sowie jene absolut alkoholischen Lösungen, die beim Auskochen der genannten Aminosäurefraktionen erhalten wurden. Von den vereinigten Mutterlaugen und Lösungen wurde der Alkohol durch Destillation im Vakuum möglichst entfernt, der Rückstand wieder in absolutem Alkohol aufgenommen, vom ungelöst gebliebenen abfiltriert und das klare Filtrat wieder im Vakuum eingeengt. Nach dreimaliger Wiederholung dieses Reinigungsverfahrens wurde ein Rückstand erhalten, der sich in absolutem Alkohol völlig klar löste. Nach Einengen dieser Lösung erstlich durch Destillation unter vermindertem Druck, und schließlich durch Eintrocknen im Vakuum über Schwefelsäure bis zum konstanten Gewicht ließ sich ein Rückstand von 6 g erhalten, der bekanntlich seiner Hauptmenge nach aus einem Gemenge von racemischem und aktivem Prolin besteht. Um die ganze Masse in das einheitliche, racemische Produkt überzuführen, wurde der in Wasser gelöste Rückstand mit überschüssigem Baryumhydroxyd durch 5 Stunden unter einem Druck von 4 Atmosphären erhitzt, hierauf nach dem Verdünnen der Baryt mit Schwefelsäure quantitativ entfernt, und das Filtrat vom Baryumsulfat behufs Überführung in das Kupfersalz mit überschüssigem, gefällttem Kupferoxyd anhaltend gekocht, und nach neuerlichem Filtrieren eingedampft. Nach dem Erkalten krystallisierte das racemische Prolinkupfer aus, das nach mehrmaligem Umkrystallisieren folgende Zusammensetzung zeigte:

0,1875 g verloren unter Violettfärbung beim Trocknen im Vakuum bei 100° 0,0208 g an Gewicht und hinterließen nach dem Veraschen 0,0512 g CuO.

Berechnet für  $C_{10}H_{16}N_2O_4Cu + H_2O$ :

10,99%  $H_2O$  und 21,80% Cu.

Gefunden:

11,09%  $H_2O$  und 21,82% Cu.

## II. Fraktion (von 123–185°).

Zur Abscheidung des Phenylalanins wurde diese Estermenge nach dem Verdünnen mit Wasser in der üblichen Weise mit Äther ausgeschüttelt und die ätherischen Auszüge wieder-

holt mit Wasser gewaschen. Der Destillationsrückstand, in einem Überschuß von konzentrierter Salzsäure aufgenommen, lieferte nach mehrstündigem Abdampfen auf dem Wasserbade einen krystallisierten Rückstand, der in halbfeuchtem Zustande auf eine Tonplatte gestrichen und mit wenigen Tropfen kalter konzentrierter Salzsäure gewaschen wurde. Durch Eindampfen des nahezu völlig weiß gewordenen Phenylalaninchlorhydrates mit überschüssigem Ammoniak ließ sich dieses in die freie Aminosäure und Chlorammonium zerlegen, die durch wiederholtes Umkrystallisieren mit Tierkohle getrennt, und erstere dadurch gereinigt wurde. Dabei wurden 4,5g Phenylalanin erhalten.

0,1935 g lieferten 0,1178 g  $H_2O$  und 0,4657 g  $CO_2$ .

Berechnet für  $C_9H_{11}NO_2$ :

Gefunden:

65,41 % C und 6,71 % H.

65,64 % C und 6,81 % H.

Die nach dem Ausschütteln des Phenylalaninesters zurückgebliebene wässerige Lösung, die vor allem die Ester der Glutaminsäure und Asparaginsäure enthielt, wurde zum Zwecke deren Verseifung mit überschüssigem Baryumhydroxyd versetzt und durch mehrere Stunden gekocht. Nach mehrtägigem Stehen dieser Lösung schied sich das Barytsalz der racemischen Asparaginsäure in wohlausgebildeten Krystallen aus, die von der Mutterlauge durch Absaugen und Waschen getrennt und hierauf quantitativ mit Schwefelsäure von Baryt befreit wurden. Durch Eindampfen der schließlich erhaltenen baryt- und schwefelsäurefreien Lösung wurden 3,1 g racemischer Asparaginsäure erhalten.

0,1570 g lieferten 0,0767 g  $H_2O$  und 0,2068 g  $CO_2$ .

Berechnet für  $C_4H_7NO_4$ :

Gefunden:

36,08 % C und 5,30 % H.

35,92 % C und 5,47 % H.

Aus dem Filtrate vom asparaginsäuren Baryum ließen sich nach quantitativer Entfernung des Baryts mit Schwefelsäure und nach dem Einengen der klaren Lösung mit überschüssiger Salzsäure 2 g Glutaminsäurechlorhydrat gewinnen.

0,2181 g lieferten 0,1714 g  $AgCl$ .

Berechnet für  $C_5H_{10}NO_4Cl$ :

Gefunden:

19,31 % Cl.

19,43 % Cl.

### III. Der Rückstand der Esterdestillation.

Dieser lieferte nach achtstündigem Kochen mit überschüssigem Barytwasser bei Gegenwart größerer Mengen von



Tierkohle und nach Entfernung des Baryts mit Schwefelsäure eine Lösung, aus der beim Eindampfen mit überschüssiger Salzsäure noch 7,8 g Glutaminsäurechlorhydrat gewonnen werden konnten.

#### Bestimmung des Tyrosins und der Diaminosäuren.

90 g Eihäute, entsprechend rund 81 g asche- und wasserfreier Substanz, wurden mit einem Gemisch von 180 ccm konzentrierter Schwefelsäure und 900 ccm Wasser zuerst so lange auf dem Wasserbade digeriert, bis vollständige Lösung eingetreten ist, und hierauf 18 Stunden am Rückflußkühler gekocht. Nach dem Ausfällen der Schwefelsäure mit Barytwasser wurde vom entstandenen Baryumsulfat abgesaugt, und dieses so lange mit Wasser ausgekocht, bis der letzte Auszug keine Millonsche Reaktion mehr gab. Das Eindampfen der vereinigten wässerigen Filtrate erfolgte unter Zusatz frisch gebrannter Magnesia, zwecks Verjagens des gebildeten Ammoniaks, was den großen Vorteil bietet, daß zur nachfolgenden Fällung nicht so große Mengen von Phosphorwolframsäure benötigt werden. Die eingeeengte, ammoniakfreie Flüssigkeit wurde filtriert, die überschüssige Magnesia am Filter gewaschen und Filtrat und Waschwasser vereinigt und auf das Volumen eines Liters gebracht. Diese Lösung erhielt nun einen Zusatz von 50 g Schwefelsäure und wurde darauf vollständig mit Phosphorwolframsäure ausgefällt. Der entstandene Niederschlag wurde abgesaugt, mit 5%iger Schwefelsäure gewaschen und noch zweimal mit 5%iger Schwefelsäure angerieben und scharf abgesaugt.

Für die Bestimmung des Tyrosins wurde das mit den Waschflüssigkeiten vereinigte Filtrat vom Phosphorwolframsäureniederschlag mit überschüssigem Barytwasser versetzt, das Filtrat mit Schwefelsäure barytfrei gemacht und noch etwas angesäuert, und schließlich das Filtrat vom entstandenen Baryumsulfat auf ein kleines Volumen eingeeengt. Aus dieser Lösung schied sich, nachdem sie vorerst mit Natronlauge alkalisch und hierauf mit Essigsäure sauer gemacht worden war, das Tyrosin in Nadeln aus, die nochmals in wenig Salzsäure ge-



löst, mit Tierhohle entfärbt und wieder mit Natronlauge und Essigsäure zur Ausscheidung gebracht wurden. Ihr Gewicht betrug nach dem Trocknen 8,6 g.

0,1735 g lieferten 0,0937 g  $H_2O$  und 0,3790 g  $CO_2$ .

Berechnet für  $C_9H_{11}NO_3$ : Gefunden:  
59,66% C und 6,07% H. 59,58% C und 6,04% H.

Der Phosphorwolframniederschlag wurde zuerst mit Wasser sehr fein zerrieben und hierauf mit überschüssigem Barytwasser völlig zerlegt. Nach dem Absaugen erfolgte noch zweimal Extraktion des Niederschlages durch Anreiben mit Barytwasser. Aus den vereinigten Filtraten wurde nun durch Einleiten von Kohlensäure der Barytüberschuß entfernt. Die filtrierte, schwach gelblich gefärbte Flüssigkeit diente nun zur Isolierung der Diaminosäuren nach der bekannten Methode von Kossel und Kutscher. Dabei wurden erhalten:

7,7 g Lysin-pikrat	entsprechend:	3,0 g Lysin
3,7 > Arginin-nitrat		2,6 > Arginin
2,0 > Histidin-chlorid		1,36 > Histidin

Nach dem Mitgeteilten berechnen sich für 100 g wasser- und aschefreier Substanz der Eihäute von *Scyllium stellare* für die isolierten Aminosäuren folgende Werte:

Glycin	2,6 g
Alanin	3,2 >
Leucin und Isoleucin	5,8 >
Prolin	4,4 >
Phenylalanin	3,3 >
Asparaginsäure	2,3 >
Glutaminsäure	7,2 >
Tyrosin	10,6 >
Lysin	3,7 >
Arginin	3,2 >
Histidin	1,7 >
Tryptophan	vorhanden
Cystin	? <sup>1)</sup>

Zum Zwecke des Vergleiches sollen im Nachstehenden noch die Hydrolysenergebnisse am typischen Keratin aus Horn, an der Membrana testacea des Hühnereies, am Koilin und an den Eischalen von *Testudo graeca* angeführt werden:

<sup>1)</sup> Siehe darüber die folgende Publikation von H. Buchtala.

	Membrana testacea <sup>1)</sup>	Testudo graeca <sup>2)</sup>	Horn <sup>3)</sup>	Koilin <sup>4)</sup>
Glycin . . . . .	3,9	vorhanden	0,34	1,2
Alanin . . . . .	3,5	„	1,2	5,8
Leucin . . . . .	7,4	„	18,3	13,2
Prolin . . . . .	4,0	11,8	3,6	5,5
Phenylalanin . . .	?	vorhanden	3,0	2,3
Asparaginsäure . .	1,1	1,2	2,5	2,3
Glutaminsäure . .	8,1	2,9	14,0	5,2
Tyrosin . . . . .	0	0	4,6	5,4
Cystin . . . . .	—	—	6,8	?
Lysin . . . . .	—	—	—	1,64
Arginin . . . . .	—	—	2,25	3,6
Histidin . . . . .	—	—	—	0,034
Tryptophan . . . .	—	—	vorhanden	vorhanden

Beim Vergleiche der mitgeteilten Zahlen ergibt sich als hervorstechendste Eigentümlichkeit der Eihäute von Scyllium der hohe Gehalt an Tyrosin, <sup>5)</sup> welches der Substanz der Membrana testacea des Hühnereies, sowie dem Keratin der Eier von Testudo graeca nach obigen Angaben völlig fehlt, was bei der biologischen Gleichwertigkeit der erstern mit der Membrana testacea bemerkenswert ist. Im übrigen kommen die Zahlen für die Selachiereihäute denen für die Membrana testacea des Hühnereies ziemlich nahe, auch in bezug auf den Leucingehalt, welcher beim Horn und beim Koilin das Doppelte und darüber erreicht.

<sup>1)</sup> E. Abderhalden und Erich Ebstein, Die Monoaminosäuren der Schalenhaut des Hühnereies, Diese Zeitschrift, Bd. XLVIII, S. 530.

<sup>2)</sup> E. Abderhalden und Ed. Strauss, Die Monoaminosäuren des Keratins aus Eiern von Testudo graeca, Diese Zeitschrift, Bd. XLVIII, S. 535.

<sup>3)</sup> Nach den Literaturnachweisen in O. Cohnheims Chemie der Eiweißkörper, II. Aufl., 1904, S. 45.

<sup>4)</sup> K. B. Hofmann und Fritz Pregl, Über Koilin, Diese Zeitschrift, Bd. LII, S. 448, und E. v. Knaffl-Lenz, Über die Diaminosäuren des Koilins, Diese Zeitschrift, Bd. LII, S. 472.

<sup>5)</sup> Gleich hohe Werte hat man bisher nur beim Zein (10,06) und Seidenfibroin (10,0) gefunden.