

# Zur Kenntnis der Monoaminosäuren der Barten des Nordwales.

Von

**Emil Abderhalden und Bernhard Landau.**

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

(Der Redaktion zugegangen am 15. März 1911.)

Zum Nachweis der einzelnen Aminosäuren haben wir zwei Versuche ausgeführt. Tyrosin, Cystin und Glutaminsäure bestimmten wir, nachdem das Fischbein durch 16-stündiges Kochen mit 25%iger Schwefelsäure hydrolysiert worden war. Zur Gewinnung der übrigen Aminosäuren verwendeten wir neues Material und hydrolysierten durch Kochen mit rauchender Salzsäure. Bei beiden Versuchen kontrollierten wir etwaige Verluste durch fortgesetzte Stickstoffbestimmungen. Die nach dieser Richtung erhaltenen Resultate ergeben sich aus den unten mitgeteilten Tabellen. Das von uns verwendete Material verlor beim Trocknen bis zur Gewichtskonstanz 13,3% Wasser, die Aschenbestimmung ergab 1,03% und die Stickstoffbestimmung 15,47%. Bei der qualitativen Untersuchung der Asche konnten Natrium, Spuren von Kalium, Calcium und Phosphorsäure nachgewiesen werden.

## 1. Hydrolyse des Fischbeins mit verdünnter Schwefelsäure.

Angewandt wurden auf asche- und wasserfreie Substanz berechnet 85,81 g Fischbein, gleich 13,272 g Stickstoff.

Die Hydrolyse war nach 16-stündigem Kochen mit 1 l 25%iger Schwefelsäure beendet. Das Hydrolysat war dunkelbraun gefärbt. Im Kühler kondensierte sich eine geringe Menge einer krystallinischen, gelb gefärbten Substanz, die sich als stickstoff- und schwefelhaltig erwies. Wie sich aus der unten mitgeteilten Tabelle ergibt, macht der Stickstoffverlust ca. 0,4 g aus. Die Natur des stickstoffhaltigen Anteils

der Abscheidung konnten wir nicht aufklären, wohl aber gelang es, durch Umkrystallisieren aus Alkohol prismatischen Schwefel vom Schmelzpunkt  $120^{\circ}$  zu isolieren.

Bei der Hydrolyse verblieb ein Rückstand von 6,81 g. Sein Aschegehalt betrug 7,17%. Zur Bestimmung des Tyrosins und des Cystins engten wir die gesamte Flüssigkeit nach vorheriger Entfernung der Schwefelsäure mit Baryt bis zur Krystallisation ein. Die Krystallfraktionen enthielten, wie die entsprechenden Proben ergaben, Tyrosin und Cystin. Die Abscheidung der Krystalle wurde solange fortgesetzt, bis die Mutterlauge keine Millonsche Reaktion mehr gab, und die Schwefelbleiprobe nur noch eben angedeutet war. Die gesamten Krystallfraktionen (9,98 g) wurden in 10% igem Ammoniak gelöst und dann vorsichtig Eisessig zugesetzt, bis Abscheidung von Krystallen eintrat. Auffallenderweise fiel zuerst reines Tyrosin aus, während nach den übrigen Erfahrungen zunächst Cystin zu erwarten gewesen wäre. Wir haben so das gesamte Tyrosin vor dem Cystin isoliert. Es scheint, daß die Mengenverhältnisse dieser beiden Aminosäuren ausschlaggebend ist für die Reihenfolge, in der sie sich unter den vorhandenen Bedingungen abscheiden.

Die Ausbeute an Rohtyrosin betrug 5,1 g  
und an Rohcystin            »    4,1 g.

An reinen Substanzen wurden erhalten Tyrosin 4,5 g und Cystin 3,3 g.

Aus der Mutterlauge des Tyrosins und Cystins isolierten wir die Glutaminsäure in Form ihres salzsauren Salzes. Die Ausbeute an Glutaminsäure betrug 7,05 g.

## 2. Hydrolyse des Fischbeins mit rauchender Salzsäure.

Verwendet wurden 343,23 g Fischbein, umgerechnet auf wasser- und aschefreie Substanz. Nach sechsstündigem Kochen am Rückflußkühler verblieben 27,69 g ungelöster Rückstand. Sein Aschegehalt betrug 0,31%. Während des Kochens beobachteten wir das Entweichen von Schwefelwasserstoff. Die weitere Verarbeitung des Hydrolysates wurde in der üblichen Weise nach der Estermethode durchgeführt. Glykokollester-

chlorhydrat konnte nicht abgeschieden werden. Es ist möglich, daß dem ausgefallenen Ammoniumchlorid geringe Mengen davon beigemischt waren. Die Ester setzten wir mit Natronlauge und Kaliumcarbonat in Freiheit. Sie wurden zunächst wie üblich mit Äther so vollständig als möglich extrahiert. Den verbleibenden reichlich Kaliumcarbonat enthaltenden Rückstand schüttelten wir dann noch mit Chloroform aus. Es ging ein ganz beträchtlicher Teil von Aminosäureestern in Lösung. Bemerkenswert sei noch, daß der Chloroformauszug tief braun gefärbt war, während der letzte Ätherauszug keinen Farbstoff mehr aufgenommen hatte. Das nachträgliche Ausziehen mit Chloroform erscheint uns auf alle Fälle vorteilhaft zur Verbesserung der Ausbeute. Es kommt hierbei weniger der Umstand in Betracht, daß manche Aminosäureester wie z. B. Tyrosinäthylester in Chloroform viel leichter löslich sind, als in Äther, denn die Ester der meisten dieser Aminosäuren lassen sich unter den üblichen Bedingungen doch nicht durch Destillation gewinnen. Hierfür spricht auch der große Destillationsrückstand des Chloroformauszuges. Das Chloroform scheint uns eine andere Bedeutung zu haben. Nach dem Aussalzen der Ester verbleibt schließlich eine bröcklige Masse, welche viel Äther einschließt. Läßt man das Gemisch einige Zeit stehen, dann werden noch erhebliche Mengen von Äther ausgepreßt. Wird nun mit Chloroform geschüttelt, dann zerteilt sich die ganze Masse, sie wird dünnflüssiger und läßt sich nun mit größter Leichtigkeit auf die Nutsche bringen und gründlich durchspülen. Besonders auffallend ist die Wirkung des Chloroforms beim Ausschütteln des entsprechenden Rückstandes einer Seidenhydrolyse. Die dicke feste Masse verwandelt sich sofort in einen leicht beweglichen Brei. Auch hier lassen sich im Chloroformauszug wie beim Fischbein noch beträchtliche Mengen an verschiedenen Aminosäuren gewinnen. Wir verweisen auf die Stickstoffwerte in der unten angeführten Tabelle. Aus der Chloroformlösung setzte sich bei der Fischbeinhydrolyse nach einiger Zeit ein Niederschlag ab, welcher beträchtliche Mengen Stickstoff einschloß. Über die Natur der ausgefallenen Substanzen können wir vorläufig noch nichts aussagen.

Die Ester des Ätherauszuges und des Chloroformauszuges wurden getrennt destilliert. Wir versuchten drei Fraktionen zu gewinnen. Von den Estern des Ätherauszuges ging bei 100° des Wasserbades und 0,2 mm Druck nichts über. Über die Isolierung der einzelnen Aminosäuren ist nur in bezug auf das Valin etwas Besonderes auszusagen.

Levene und Slyke<sup>1)</sup> haben eine Methode zur Trennung von Leucin, Isoleucin und Valin angegeben. Bei der von uns durchgeführten Hydrolyse kam die Methode nicht in Betracht, weil die Trennung von Leucin und Valin ohne weiteres durch einfache Krystallisation glückte. Zur Darstellung von d-Valin dürfte es kaum ein besseres Ausgangsmaterial geben als das Fischbein. Wir haben aber doch die von Levene und Slyke angegebene Methode geprüft und gefunden, daß es jedenfalls nicht in allen Fällen möglich ist, reines Leucin und reines Valin unter den gegebenen Bedingungen abzutrennen. Wir haben eine bestimmte Menge von reinem d-Valin mit bekanntem Drehungsvermögen mit einer bestimmten Menge von l-Leucin, dessen Drehungsvermögen wir vorher festgestellt hatten, gemischt und dann nach der Vorschrift von Levene und Slyke mit Hilfe der Bleisalze getrennt. Die Analysenwerte der getrennten Verbindungen stimmten nur für das Valin gut mit den berechneten Werten überein. Die Bestimmung des Drehungsvermögens zeigte jedoch, daß auch dieses trotz der günstigen Bedingungen — wir gingen von reinen Körpern aus, außerdem fehlte Isoleucin — nicht ganz rein war.

Angewandt wurden:

1,5 g l-Leucin ( $[\alpha]_D = + 13,60^\circ$ )  
 und 1,5 g d-Valin ( $[\alpha]_D = + 25^\circ$ ) } in 20%iger Salzsäure.

Aus diesem Gemisch erhielten wir:

2,7240 g Leucinblei.

(1,5 g l-Leucin geben theoretisch 2,668 g Leucinblei).

Durch Zersetzen mit Schwefelwasserstoff gefunden: 1,4 g Substanz.

<sup>1)</sup> P. A. Levene und Donald D. Van Slyke. The leucin fraction of proteins. The journal of Biological Chemistry. Vol. VI. p. 391. 1909.

## Optische Bestimmung.

0,2590 g Subst. 8,188 g Lösung. Spez. Gew. 1,0834.  $\alpha_D = +0,56^\circ$   
 $[\alpha]_D = +16,3^\circ$ .

## Analyse:

0,1600 g Substanz gaben 0,3139 g CO<sub>2</sub> und 0,1412 g H<sub>2</sub>O.

Gefunden:

Berechnet für Leucin:

C = 53,51 H 9,81.

C = 54,92, H 9,99.

Aus dem Fitrat vom Leucinblei erhielten wir 1,2 g Substanz.

## Optische Bestimmung.

0,2676 g Subst. 8,6684 g Lösung. Spez. Gew. 1,0831  $\alpha = +0,73^\circ$   
 $[\alpha]_D = +21,8^\circ$ .

## Analyse:

0,1602 g Substanz gaben 0,3025 g CO<sub>2</sub> und 0,1387 g H<sub>2</sub>O

Gefunden:

Berechnet für Valin:

C = 51,49 H 9,58

C = 51,24 H 9,47.

Ferner ist zu bemerken, daß bei der Hydrolyse von Proteinen mit Säure stets ein Teil der Aminosäuren racemisiert wird. Es dürfte daher eine Berechnung des Gehaltes an bestimmten Aminosäuren auf Grund des Drehungsvermögens stets nicht unerhebliche Fehler in sich einschließen. Wir haben ferner beobachtet, daß das Mengenverhältnis, in dem Valin und Leucin vorhanden sind, von wesentlichem Einfluß ist für die Abscheidung des Bleisalzes des Leucins. Ist viel Valin vorhanden, so fällt auch sein Bleisalz aus. Wir können nach unseren Erfahrungen die Trennung von Valin, Leucin und Isoleucin nach der Methode von Levene und Slyke nicht als quantitative bezeichnen, wohl aber dürfte sie in vielen Fällen gute Dienste zu einer vorläufigen Abtrennung leisten, wenn es nicht gelingen will, das Valin durch einfache Krystallisation zu gewinnen. Bei der von uns durchgeführten Hydrolyse war das Valin erheblich racemisiert worden ( $[\alpha]_D = +22,25^\circ$ ).

Erwähnt sei noch, daß wir uns mit Vorteil der von Levene<sup>1)</sup> angegebenen Methode zur Abscheidung des Glykokolls in Form seines Pikrates bedienen. Allerdings haben

<sup>1)</sup> P. A. Levene, Glycocoll Picrate, The Journal of Biolog. Chemistry, Vol. 1, p. 413, 1906.

wir mit Hilfe des Pikrates keine höheren Ausbeuten erzielt als mit Hilfe der Estermethode:

22,1 g eines Gemisches von Alanin und Glykokoll: 2,17 g Glykokoll (isoliert als Esterchlorhydrat), 2,15 g Glykokoll (isoliert als Glykokollpikrat).

Die Ausbeute an den einzelnen Aminosäuren beträgt auf 100 g wasser- und aschefreie Substanz berechnet:

	Ätherauszug g	Chlorformauszug g	Gesamtausbeute g
Glykokoll	0,68	0,07	0,75
Alanin	5,79	0,63	6,42
Valin	7,87	1,86	9,73
Leucin	2,65	1,11	3,76
Asparaginsäure	2,5		2,5
(Glutaminsäure <sup>1)</sup> )	8,87		8,87
Phenylalanin	0,31	0,16	0,47
Tyrosin <sup>1)</sup> )	5,66		5,66
Prolin	2,10	0,50	2,60
Cystin <sup>1)</sup> )	4,15		4,15
Serin	1,0		1,0
			<hr/> 45,91

Erwähnt sei noch, daß auch Tryptophan nachgewiesen werden konnte. Wurde das Keratin mit 25%iger Schwefelsäure bei 37° aufbewahrt, dann zeigte die Lösung deutlich Glyoxylsäurereaktion.

Die folgenden Tabellen geben einen Überblick über die bei den einzelnen Operationen erhaltenen Ausbeuten und über die eingetretenen Verluste.

Durch die Stickstoffbestimmungen im Laufe der Hydrolysen wurden der Isolierung als Aminosäuren bei der Schwefelsäurehydrolyse 0,1262 g N, bei der Salzsäurehydrolyse 0,6708 g N entzogen, d. h. auf den Stickstoff der Hydrolysate berechnet: 0,99 bzw. 1,28% N.

<sup>1)</sup> Bestimmung erfolgte durch die Schwefelsäurehydrolyse.

## Analytische Belege.

## Glykokollesterchlorhydrat.

0,1576 g Substanz verbrauchen 11,26 ccm  $n_{10}$ -H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
 Gefunden: 10,01% N      Berechnet: 9,97% N.

## Glykokollpikrat (F. P. 195°).

0,1236 g Substanz gaben 19,5 ccm N. T. = 18°, p = 754 mm  
 Gefunden:                      Berechnet für C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>O<sub>9</sub>:  
 18,36% N                      18,43% N.

## Alanin.

0,1272 g Substanz verbrauchen 14,25 ccm  $n_{10}$ -H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
 Gefunden: 15,70% N      Berechnet: 15,73% N.

## Optische Bestimmung.

0,4469 g Substanz. 5,3683 g Lösung (berechnete Menge  
 n-HCl). Spez. Gew. 1,109  $\alpha = 1,21^\circ$

$$[\alpha]_D = + 9,33^\circ.$$

Fischbeinhydrolyse. — Versuch I mit H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (25%ig).  
 Angewandt 85,807 g Substanz (wasser- und aschefrei).

	g	%	Absoluter Prozentgehalt der einzelnen Niederschläge
	Stick- stoff	Stick- stoff	
Gesamtstickstoff . . . . .	13,272	15,47	—
Hydrolysat . . . . .	12,693	14,79	—
Ungelöster Rückstand . . . . .	0,1915	0,22	3,03
Baryumsulfatniederschlag . . . . .	1,184	1,36	0,20
Neutrale Lösung der Aminosäuren . . . . .	11,57	13,48	—
Durch Krystallisation gewonnenes			
Tyrosin . . . . .	0,348	0,41	7,74
Cystin . . . . .	0,379	0,44	11,66
Filtrat vom Tyrosin und Cystin . . . . .	10,48	12,21	—
Durch Krystallisation gewonnenes Glutamin- säurechlorhydrat . . . . .	0,686	0,80	7,63
Filtrat vom Glutaminsäurechlorhydrat . . . . .	7,96	9,29	—

Hydrolyse der Barten des Nordwales mit rauchender HCl.  
Angewandt 343,23 g wasser- und aschefreie Substanz.

	g	%	Absoluter Prozentgehalt der einzelnen Niederschläge
	Stick- stoff	Stick- stoff	
Gesamtstickstoff . . . . .	53,088	15,47	—
Hydrolysat . . . . .	52,52	15,30	—
Ungelöster Rückstand . . . . .	0,4922	0,14	1,78
Lösung der Esterchlorhydrate . . . . .	52,51	15,30	—
Ausgefallenes Ammoniumchlorid <sup>1)</sup> . . . . .	1,705	0,50	24,36
Lösung der Esterchlorhydrate (nach dem Ausfallen des Ammoniumchlorids) . .	50,75	14,79	←
Rückstand nach der Ausätherung der Ester (Salzgemisch und nicht aufgenommene Aminosäureester) . . . . .	19,37	5,64	—
Ätherische Lösung der Aminosäureester .	22,66	6,60	—
Chloroformlösung der Aminosäureester . .	5,796	1,69	—
Aus dem Chloroform ausgefallener Nieder- schlag . . . . .	2,751	0,80	—
Summe . . . . .	50,577	14,73	
Destillation.			
1. Ätherische Lösung der Aminosäureester.			
I. Fraktion (nach Verseifung) bis 100° 10—12 mm . . . . .	8,126	2,37	—
II. Fraktion bis 100° 0,1 mm . . . . .	1,850	0,54	—
Destillationsrückstand . . . . .	9,628	2,81	—
Kondensat aus der mit flüssiger Luft ge- kochten Vorlage . . . . .	0,379	0,11	—
Summe . . . . .	19,983	5,83	
Aminosäuren der I. Fraktion ohne Prolin .	7,187	2,09	—
Glykokoll (isoliert als Pikrat und Ester- chlorhydrat . . . . .	0,40	0,12	18,67
Alanin . . . . .	2,885	0,84	15,73
Leucin . . . . .	0,898	0,26	10,69
Valin . . . . .	2,98	0,87	11,96

<sup>1)</sup> Reines Ammoniumchlorid enthält theoretisch 26,19% N, die Verunreinigung, eventuell durch Glykokollesterchlorhydrat, kann demnach keine wesentliche sein.

	g	%	Absoluter Prozentgehalt der einzelnen Niederschläge
	Stick- stoff	Stick- stoff	
Alkoholische Prolinlösung (extrahiert aus Fraktion I) . . . . .	1,027	0,30	—
Aus dem Prolinauszug isoliertes Alanin .	0,118	0,03	15,73
Aktives Prolin (isoliert als Kupfersalz) . .	0,491	0,14	12,17
Inaktives Prolin (isoliert als Kupfersalz) .	0,273	0,08	12,17
II. Fraktion nach Entfernung des Phenyl- alaninesters . . . . .	1,753	0,51	—
Asparaginsäure . . . . .	0,833	0,24	10,53
Serin . . . . .	0,427	0,12	13,33
Ätherische Lösung des Phenylalaninesters .	0,0935	0,03	—
Phenylalanin (isoliert als Chlorhydrat) . .	0,085	0,02	8,49
2. Chloroformlösung der Aminosäureester. Destillation.			
Beim Abdestillieren des Chloroforms vor- gelegte HCl . . . . .	0,047	0,01	—
I. Fraktion (nach Verseifung) bis 80° 10 bis 12 mm . . . . .	0,412	0,12	—
II. Fraktion (nach Verseifung) bis 100° 0,1 mm	1,400	0,41	—
III. Fraktion bis 200° 0,1 mm . . . . .	0,580	0,17	—
Destillationsrückstand . . . . .	6,436	0,71	—
Kondensat aus der mit flüssiger Luft ge- kochten Vorlage . . . . .	0,24	0,07	—
Summe . . . . .	5,115	1,49	
I. Fraktion nach Entfernung des Prolins .	0,354	0,10	—
Glykokoll (isoliert als Pikrat) . . . . .	0,041	0,01	18,67
Alanin . . . . .	0,315	0,09	15,73
II. Fraktion nach Entfernung des Prolins .	1,192	0,35	—
Leucin . . . . .	0,374	0,11	10,69
Valin . . . . .	0,706	0,21	11,97
Alkoholische Prolinlösung, extrahiert aus Fraktion I und II . . . . .	0,251	0,07	—
Aus dem Prolinauszug isoliertes Alanin .	0,03	0,01	15,73
Prolin (isoliert als Kupfersalz) . . . . .	0,192	0,06	12,17
III. Fraktion (nach Entfernung des Phenyl- alaninesters) . . . . .	0,447	0,13	—
Ätherische Lösung des Phenylalaninesters .	0,055	0,02	—
Phenylalanin (isoliert als Chlorhydrat) . .	0,042	0,01	—

## Aminoisovaleriansäure.

1. 0,1554 g Substanz gaben 0,2917 g CO<sub>2</sub> und 0,1330 g H<sub>2</sub>O  
 0,2191 g Substanz verbrauchten 18,27 ccm <sup>n</sup><sub>10</sub>-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

	C	H	N
Gefunden:	51,19	9,57	11,95
Berechnet:	51,24	9,47	11,97.

2. (Chloroformauszug) 0,2276 g Substanz verbrauchen 19,28 ccm  
<sup>n</sup><sub>10</sub>-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Gefunden: 11,87% N      Berechnet: 11,97% N.

## Optische Bestimmung.

Lösungsmittel 20%ige HCl. 0,4946 g Substanz. 5,9092 g  
 Lösung. Spez. Gew. 1,1062.  $\alpha = 2,06^\circ$

$$[\alpha]_D = + 22,25^\circ.$$

## Leucin.

1. 0,2170 g Substanz verbrauchen 16,41 ccm <sup>n</sup><sub>10</sub>-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Gefunden: 10,60% N      Berechnet: 10,69% N.

2. (Chloroformauszug) 0,1459 g Substanz verbrauchen

11,07 <sup>n</sup><sub>10</sub>-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Gefunden: 10,63% N      Berechnet: 10,69% N.

## Optische Bestimmung.

Lösungsmittel 20%ige HCl. 0,4334 g Substanz. 7,0774 g  
 Lösung. Spez. Gew. 1,106.  $\alpha = + 0,77^\circ$

$$[\alpha]_D = + 11,37^\circ.$$

## Cystin.

0,1520 g Substanz verbrauchen 12,45 ccm <sup>n</sup><sub>10</sub>-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Gefunden: 11,48% N      Berechnet: 11,66% N.

## Glutaminsäure.

0,3008 g Substanz verbrauchen 16,72 ccm <sup>n</sup><sub>10</sub>-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Gefunden: 7,79% N      Berechnet: 7,63 N.

## Tyrosin:

0,1125 g Substanz verbrauchen 6,33 g <sup>n</sup><sub>10</sub>-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Gefunden: 7,88% N      Berechnet: 7,74% N.

## Prolin:

1. 0,2072 g Substanz verbrauchen 14,32 ccm  $n_{10}$ -H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Gefunden: 9,68% N      Berechnet: 9,60% N.

0,2344 g gaben 0,0608 g CuO

Gefunden:

25,94% CuO

Berechnet für (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>NO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>Cu:

25,87% CuO.

2. (Chloroformauszug) 0,1659 g Substanz gaben 0,0427 g CuO

Gefunden:

25,74% CuO

Berechnet für (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>NO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>Cu:

25,87% CuO.