

Die Monoaminosäuren der Schalenhaut des Hühnereies.

Von

Emil Abderhalden und Erich Ebstein, Göttingen.

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

(Der Redaktion zugegangen am 30. Juli 1906.)

Die Schalenhaut der Vogeleier wird nach dem allgemeinen Usus zu der Gruppe der Keratine gerechnet und mit diesen zu den Albuminoiden. Für diese Einteilung sind hauptsächlich physikalische Eigenschaften maßgebend gewesen. Keine Gruppe der Proteine ist so heterogen zusammengesetzt, wie gerade die der Albuminoide. Es ist zu hoffen, daß diese zum großen Teil willkürlich gewählte und zusammengesetzte Gruppe bald einer Einteilung weicht, deren Grundlage eine mehr chemische ist und einstweilen die Zusammensetzung der verschiedenartigen Vertreter dieser Gruppe berücksichtigt. Die vorliegende Untersuchung soll einen Beitrag nach dieser Richtung liefern.

Das Ausgangsmaterial stellten wir aus ca. 25 000 Eierschalen vom Huhne wie folgt dar.¹⁾ Die Eierschalen wurden mechanisch zerkleinert und hierauf in einem Kessel mit Wasser mehrere Stunden mit einem großen Rührer in beständiger Bewegung gehalten. Hierbei blieben die Schalenhäute zum großen Teil am Rührer hängen, während die harten Schalenstücke sich am Boden des Gefäßes absetzten. Die gesammelten und von anhaftenden Schalenteilen soweit als möglich gereinigten Häute wurden nun mit 5%iger Salzsäure längere Zeit stehen gelassen, dann mit 5%iger Essigsäure 5 Stunden auf dem Wasserbade gekocht und nun solange mit Wasser ausgewaschen, bis das Filtrat keine saure Reaktion mehr gab. Die Häute wurden dann getrocknet, in einer Handmühle zerkleinert und

¹⁾ Vergl. V. Lindwall, Beitrag zur Kenntnis des Keratins. Upsala. Läkarep. förh. 16.

schließlich durch ein Sieb gerieben. Das schließlich erhaltene Produkt stellte ein feines, gelbliches Pulver dar. Es gab mit Alkali gekocht beim Zusatz von Bleiacetat eine intensive Schwefelbleireaktion. Beim Kochen mit Millons Reagens trat wohl Gelb-, aber nicht Rotfärbung auf.

450 g des so dargestellten sogenannten «Ovokeratins» — berechnet auf die bei 100° bis zur Gewichtskonstanz getrocknete Substanz und nach Abzug der Asche (0,51 %) — wurden 12 Stunden mit 3 l 25%iger Schwefelsäure am Rückflußkühler gekocht. Die Lösung färbte sich dunkelbraun und hinterließ beim Filtrieren 20,0 g einer dunkelschwarz gefärbten Substanz. Im Filtrat entfernten wir die Schwefelsäure quantitativ mit Baryt und engten, nachdem der Baryumsulfatniederschlag wiederholt ausgekocht worden war, sämtliche Filtrate stark ein. Die Lösung gab beim Kochen mit Millons Reagens keine Rotfärbung. Tyrosin war somit nicht nachzuweisen und jedenfalls nicht vorhanden. Schließlich wurde die Flüssigkeit unter vermindertem Druck völlig zum Sirup verdampft, und der Rückstand in gewohnter Weise mit Alkohol und gasförmiger Salzsäure verestert. Die Veresterung wurde zweimal wiederholt und versucht, beim Einengen der alkoholischen Lösung der Esterchlorhydrate der Aminosäuren Glykokollesterchlorhydrat zur Abscheidung zu bringen. Es schieden sich beim Einimpfen von Krystallen von Glykokollesterchlorhydrat und beim Aufbewahren auf Eis wohl Krystalle ab, doch nicht in so reinem Zustande, daß eine direkte Bestimmung sich gelohnt hätte. Wir verdampften deshalb bei vermindertem Druck zum dicken Sirup und setzten die Ester, wie gewohnt, mit Alkali und Kaliumcarbonat in Freiheit. Die Destillation der Ester gab folgendes Resultat:

Fraktion I:	bis 100°	des Wasserbades	und 20 mm	Druck	=	150 g
> II:	> 105°	> Ölbad	> 0,2	> >	=	87 >
> III:	> 200°	> >	> 0,2	> >	=	98 >

Im Destillationskolben verblieb ein dunkelrotbraun gefärbter Rückstand. In großer Menge gingen bei der Destillation der Ester unter stark vermindertem Druck (0,2 mm) schwefelhaltige, intensiv riechende Produkte über. Sie kondensierten sich erst in der zweiten, mit flüssiger Luft gekühlten Vorlage. Ihre Natur wurde nicht näher festgestellt.

Die Untersuchung der einzelnen Fraktionen erfolgte in der gewohnten Weise. Die zwei ersten Fraktionen wurden durch Kochen mit der 8fachen Menge Wasser verseift. Aus der dritten Fraktion wurde zunächst nach etwaigem Phenylalaninester gefahndet und der Rest der Fraktion mit Baryt verseift. Die Verarbeitung der verseiften Fraktionen war die übliche. Vor allem wurde durch fraktionierte Krystallisation eine Trennung der einzelnen Aminosäuren herbeigeführt. War die Reinheit einer Verbindung trotz gut stimmender Analysen zweifelhaft, so verwandelten wir sie in das Kupfersalz, fraktionierten dieses und verwandelten es schließlich durch Behandlung mit Schwefelwasserstoff wiederum in die Aminosäure zurück. Es ließ sich so manches scheinbar ganz einheitliche Produkt in seine Komponenten zerlegen. Prolin stellten wir, wie schon oft beschrieben, durch Auskochen der eingedampften beiden ersten Fraktionen mit Alkohol dar und trennten das durch wiederholtes Auflösen des isolierten Prolins mit Alkohol von beigemengten anderen Aminosäuren möglichst befreite Gemisch von aktivem und racemischem Prolin durch Darstellung des Kupfersalzes. Beim Auskochen des Prolinkupfers mit Alkohol bleibt das racemische Prolin zurück. Es wurde aus Wasser umkrystallisiert. Das Glykokoll schieden wir als Esterchlorhydrat ab und die Glutaminsäure als Chlorhydrat.

Wir wollen gleich erwähnen, daß es uns nicht gelungen ist, Phenylalanin mit genügender Sicherheit nachzuweisen. Die Untersuchung muß nach dieser Richtung wiederholt werden.

Fraktion I enthielt 9,9 g Leucin, 9,5 g Alanin und 16,75 g Glykokoll.

Leucin:

0,1768 g Substanz gaben 0,3545 g CO₂ und 0,1600 g H₂O.

Berechnet für C ₆ H ₁₃ NO ₂ :	Gefunden:
54,96% C und 9,92% H.	54,69% C und 10,05% H.

Alanin:

0,1848 g Substanz gaben 0,2742 g CO₂ und 0,1302 g H₂O.

Berechnet für C ₃ H ₇ NO ₂ :	Gefunden:
40,45% C und 7,86% H.	40,42% C und 7,82% H.

Glykokollesterchlorhydrat, Schmelzpunkt 144° (korr.):

0,1998 g Substanz gaben 0,2525 g CO₂ und 0,1318 g H₂O.

Berechnet für C ₄ H ₁₀ NO ₂ Cl:	Gefunden:
34,41% C und 7,17% H.	34,47% C und 7,33% H.

Aus der II. Fraktion gewannen wir: 5,0 g Aminovaleriansäure, 5,5 g Alanin, 22,0 g Leucin.

Aminovaleriansäure:

0,1825 g Substanz gaben 0,3416 g CO₂ und 0,1528 g H₂O.

Berechnet für C ₅ H ₁₁ NO ₂ :	Gefunden:
51,28% C und 9,40% H.	51,05% C und 9,30% H.

Aus Fraktion I und II wurden zusammen 17,2 g Prolin gewonnen. Analysiert wurde das racemische Kupfersalz:

0,1424 g Substanz verloren bei 120° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet
0,0142 g Wasser.

0,0926 g bei 120° getrocknetes Kupfersalz gaben 0,0251 g CuO.

Berechnet für C ₁₀ H ₁₆ O ₄ N ₂ Cu + 2 H ₂ O:	Gefunden:
10,90% H ₂ O.	9,98%.

Berechnet für C ₁₀ H ₁₆ O ₄ N ₂ Cu:	Gefunden:
21,8% Cu.	21,61% Cu.

Aus der III. Fraktion wurden 25,0 g Glutaminsäure und 4,91 g Asparaginsäure isoliert.

Asparaginsäure:

0,1720 g Substanz gaben 0,2263 g CO₂ und 0,0848 g H₂O.

Berechnet für C ₄ H ₇ NO ₄ :	Gefunden:
36,09% C und 5,26% H.	35,88% C und 5,51% H.

Glutaminsäurechlorhydrat:

0,1733 g Substanz gaben 0,2086 g CO₂ und 0,0896 g H₂O.

Berechnet für C ₅ H ₁₀ NO ₄ Cl:	Gefunden:
32,69% C und 5,45% H.	32,82% C und 5,55% H.

Nach der Abscheidung des Glutaminsäurechlorhydrates wurde die Salzsäure durch Kochen mit Bleioxyd entfernt und in der filtrierten Lösung das gelöste Blei mit Schwefelwasserstoff entfernt. Beim Einengen der vom Bleisulfid abfiltrierten Lösung krystallisierte zunächst Asparaginsäure aus. Im Filtrat fahndeten wir auf Serin. Es war unzweifelhaft vorhanden. Doch stimmte die Analyse des isolierten Produktes nicht völlig. Dieser Versuch muß wiederholt werden.

Schließlich haben wir auch hier den Destillationsrückstand in der gewohnten Weise untersucht und nach dem Kochen mit

Baryt und dessen quantitativer Entfernung mit Schwefelsäure Glutaminsäure als Chlorhydrat abgeschieden. Die Ausbeute an Glutaminsäure betrug 10,0 g. Durch einen Unfall ging die Mutterlauge des Glutaminsäurechlorhydrats verloren. Sie enthielt ohne Zweifel noch mehr Glutaminsäure und wahrscheinlich noch Leucin.

Berechnet man die gefundenen Mengen von Aminosäuren auf 100 g bei 100° getrocknetes, aschefreies «Ovokeratin», so erhält man folgende Zahlenwerte:

Glykokoll	3,9%
Alanin	3,5%
Aminovaleriansäure	1,1%
Leucin	7,4%
Prolin	4,0%
Glutaminsäure	8,1%
Asparaginsäure	1,1%

Wir geben diese Zahlen mit dem Vorbehalt an, daß sie Minimalzahlen darstellen und zwar nicht nur deshalb, weil die Estermethode an und für sich keine quantitativen Ausbeuten ermöglicht, sondern weil an mehreren Stellen der Durchführung dieser Hydrolyse die Reindarstellung der einzelnen Produkte mit besonderen Verlusten verknüpft war. Wie schon betont, dürfte auch Serin vorhanden gewesen sein. Über das Vorkommen von Phenylalanin gestattet uns diese Untersuchung kein abschließendes Urteil.



Die Monoaminosäuren des Keratins aus Eiern von *Testudo graeca*.

Von

Emil Abderhalden und Eduard Strauss.

(Aus dem I. Chemischen Institut der Universität Berlin)

(Der Redaktion zugegangen am 30. Juli 1906.)

Durch die Güte des Herrn Dr. Hasselwander in München gelangten wir in den Besitz von Eierschalen von *Testudo graeca*. Uns interessierte die Frage, ob die Schalenhaut dieses Reptils eine ähnliche Zusammensetzung aufweist, wie diejenige des Huhnes.¹⁾ Wir können gleich bemerken, daß die Untersuchung auf Monoaminosäuren, sowie die gewöhnlichen Eiweißreaktionen eine weitgehende Übereinstimmung dieser beiden Proteine vermuten läßt. Die uns zur Verfügung stehende Ovokeratinmenge war zu gering, um diesen Nachweis exakter zu gestalten. Die Darstellung des Ovokeratins erfolgte teils durch mechanische Entfernung der harten Schalen, teils durch deren Lösung in verdünnter Salzsäure. Die verbleibenden Schalenhäute wurden durch Aufkochen mit verdünnter Essigsäure von anhaftendem Eiereiweiß befreit, dann mit Alkohol und Äther ausgekocht und bei 110° getrocknet. Die gepulverte Substanz gab eine sehr intensive Schwefelbleiprobe. Die Millonsche Probe fiel negativ aus.

17 g des gewonnenen Ovokeratins wurden mit rauchender Salzsäure unter den gewohnten Bedingungen hydrolysiert und nach dem Eindampfen der Hydrolysenflüssigkeit der Rückstand verestert. Zur Befreiung der Ester wurde nach zweimaliger Veresterung die alkoholische Lösung der Esterchlorhydrate völlig zur Trockene verdampft, der Rückstand in absolutem Äthylalkohol gelöst und die braune Lösung nach dem Kochen mit Tierkohle auf genau 100 ccm aufgefüllt. Nun bestimmten wir in einem

¹⁾ Vergl. S. 530 dieses Heftes dieser Zeitschrift.

aliquoten Teil den Gehalt an Salzsäure und setzten mit der berechneten Menge einer 2½%igen Natriumäthylatlösung die Ester in Freiheit. Die Ester wurden destilliert und zwar in vier Fraktionen.

Die erste (bis 60° des Wasserbades und 12 mm Druck) enthielt hauptsächlich Alkohol. Sie wurde nach Zusatz von wässriger Salzsäure zur Trockene verdampft. Es verblieb ein kleiner Rückstand, der mit Alkohol versetzt würde. Nach dem Einleiten von gasförmiger Salzsäure, dem Impfen eines Kryställchens von Glykokollesterchlorhydrat und dem Stehen in Eis erfolgte bald eine bei 144° (korr.) schmelzende Abscheidung von feinen Nadelchen.

Die zweite Fraktion (bis 100° des Wasserbades und 12 mm Druck) gab nach dem Verseifen und Auskochen des Rückstandes der eingedampften Lösung mit Alkohol Glykokoll, das als Esterchlorhydrat nachgewiesen wurde.

Aus der dritten Fraktion (bis 105° des Ölbadens und 0,4 mm Druck) isolierten wir Leucin, dessen Kupfersalz wir analysierten:

0,0897 g Substanz gaben 0,0224 g CuO.

Berechnet für $(C_6H_{12}NO_2)_2Cu$:	Gefunden:
19,9% Cu.	19,65% Cu.

Auch diese Fraktion hatten wir zuerst zur Trockene verdampft und mit Alkohol ausgekocht. Die alkoholische Lösung aus Fraktion 2 und 3 ergab 2 g Prolin.

0,0325 g bei 120° getrocknetes, racemisches Prolin gaben 0,0088 g CuO.

Berechnet: 21,8% Cu.	Gefunden: 21,6% Cu.
----------------------	---------------------

Alanin war wahrscheinlich auch vorhanden, konnte jedoch nicht identifiziert werden.

Die vierte Fraktion endlich enthielt Asparaginsäure 0,2 g und 0,5 g Glutaminsäure. Letztere wurde als Chlorhydrat nachgewiesen. Phenylalanin wurde mit Hilfe der Phenylacetaldehydreaktion wahrscheinlich gemacht.

