

# Eine Methode, das Lysin zu isoliren, nebst einigen Bemerkungen über das Lysatinin.

Von

S. G. Hedin.

(Der Redaction zugegangen am 13. Oktober 1895.)

Bekanntlich sind die beiden basischen Körper Lysin und Lysatinin zunächst von Drechsel unter den Spaltungsproducten des Caseïns beim Kochen mit Salzsäure entdeckt worden<sup>1)</sup>. Die basischen Reactionsproducte wurden mit Phosphorwolframsäure ausgefällt, worauf die aus dem Niederschlage mit Barythydrat erhaltene alkalische Lösung mit Schwefelsäure vom Baryt befreit und dann mit Salzsäure neutralisirt und concentrirt wurde. Daraus wurde auf Zusatz von Alkohol das Chlorid  $C_6H_{14}N_2O_2.HCl$  erhalten und aus demselben das Platinsalz dargestellt. Aus der Mutterlauge vom Chlorid konnte nach Versetzen mit Silbernitrat das Lysatinin in Form des in Alkohol und Aether unlöslichen Silbersalzes  $AgNO_3 + C_6H_{13}N_2O_2.HNO_3$  isolirt werden. Hauptsächlich nach dem Verfahren von Drechsel hat Ernst Fischer dieselben Basen unter den Spaltungsproducten des Leims nachgewiesen<sup>2)</sup>.

Siegfried untersuchte in derselben Beziehung Conglutin, Glutenfibrin, Hemiprotein, Oxyprotsulfonsäure und Eieralbumin<sup>3)</sup>. Die Untersuchungsmethode wurde aber in der

<sup>1)</sup> Arch. f. Anat. u. Physiol. 1891. S. 254, und Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. 23, S. 3096.

<sup>2)</sup> Ueber neue Spaltungsproducte des Leims, Inaug.-Dis., Leipzig 1890.

<sup>3)</sup> Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. 24, S. 418.

Weise abgeändert, dass die aus dem Phosphorwolframsäure-niederschlag mit Barythydrat erhaltene alkalische Lösung durch Einleiten von Kohlensäure und Kochen vom Barytüberschusse befreit und darauf mit Silbernitrat versetzt wurde. Das Filtrat vom hierbei entstandenen Niederschlag wurde stark concentrirt und mit Alkohol versetzt, wobei sich zunächst ein silberhaltiges Oel ausschied. Beim fortgesetzten Zusatz von Alkohol krystallisirte allmählig ein weisses Salz aus, das nach Umkrystallisiren sich als das Lysatininsalz  $\text{AgNO}_3 + \text{C}_6\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_2 \cdot \text{HNO}_3$  erwies. Aus dem silberhaltigen Oel konnte nach Entfernung des Silbers und Zusatz von Platinchlorid, Alkohol und Aether das Lysinsalz  $\text{PtCl}_4 \cdot \text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2 \cdot 2\text{HCl} + \text{HO} \cdot \text{C}_2\text{H}_5$  erhalten werden.

Nach derselben Methode hat Schwarz aus den Spaltungsproducten des Elastins das Lysatininsilbersalz dargestellt<sup>1)</sup>.

In der Hauptsache nach dem Verfahren von Siegfried habe ich aus Hornsubstanz Lysin und Lysatinin bekommen<sup>2)</sup>. Das silberhaltige Oel erstarrte aber hier krystallinisch, und ich konnte aus demselben kein Platinsalz erhalten. Darum wurde das Platin entfernt und der in Alkohol schwerlösliche Theil der Chloride zur Darstellung des Lysinplatinsalzes verwendet.

Ausserdem habe ich in den tryptischen Verdauungsproducten des Fibrins das Lysin nachgewiesen, sowie auch eine Silberverbindung erhalten, dessen Analyse mit der Formel des Lysatininsilbersalzes übereinstimmte<sup>3)</sup>.

Später habe ich unter den Spaltungsproducten von verschiedenen Proteïnsubstanzen noch eine andere Base — Arginin — aufgefunden<sup>4)</sup>. Dieselbe wurde in Form des schwerlöslichen Silbersalzes  $\text{AgNO}_3 + \text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2 + \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$  isolirt, und zwar in der Weise, dass der mit Phosphorwolframsäure erhaltene Niederschlag durch Barythydrat zerlegt und der Barytüberschuss mit Schwefelsäure genau entfernt wurde. Hierauf

1) Diese Zeitschrift, Bd. 18, S. 487.

2) Lunds Universitets årsskrift, Tom. 29.

3) Om Trypsin digestionen, Lunds Universitets årsskrift, T. 29.

4) Diese Zeitschrift, Bd. 20, S. 186, und Bd. 21, S. 155.

wurde Silbernitrat zugegeben, filtrirt und concentrirt. Beim Stehen der Lösung schied sich das eben erwähnte alkalisch reagirende Silbersalz aus. Weil aber das Arginin auch ein leichtlösliches, schwach sauer reagirendes Silbersalz von der Zusammensetzung  $\text{AgNO}_3 + \text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2 \cdot \text{HNO}_3$  gibt, kam mir viel darauf an, dass die Bildung dieses Salzes verhindert wurde. Zu dem Zweck versetzte ich die Mutterlauge vom schwerlöslichen Silbersalze mit Barythydrat bis zur bleibenden Trübung, wonach Kohlensäure eingeleitet, erwärmt und von kohlensaurem Baryt filtrirt wurde. Nach Concentriren der Lösung wurde kein schwerlösliches Argininsalz mehr erhalten, wohl aber schied sich ein anderes Silbersalz aus, das in Wasser ziemlich schwer löslich war.

Da ich wünschte, mir grössere Mengen von diesem Salze zu verschaffen, wurden 500 gr. Casein in üblicher Weise 72 Stunden mit Salzsäure und Zinn gekocht und wie oben angegeben behandelt. Das eben erwähnte Verfahren wurde nur in so weit abgeändert, dass der silbernittrathaltigen Lösung vor dem Auskrystallisiren des Argininsalzes Barythydrat zugegeben wurde, wonach Kohlensäure eingeleitet, erhitzt und filtrirt wurde. Nach Concentriren der Lösung schied sich zunächst ziemlich viel Baryumnitrat aus. Danach setzte sich das Argininsalz als sehr harte Krystallkrusten auf dem Boden des Gefässes ab. Nach Umkrystallisiren betrug die ganze Menge Argininsalz etwa 8 gr., was von der ganzen Caseinmenge etwa 0,8% Arginin entspricht<sup>1)</sup>.

Beim fortgesetzten freien Verdunsten der Lösung schied sich das leichter lösliche Silbersalz entweder als eine ziemlich weiche Krystallmasse auf dem Boden des Gefässes oder auch als Häute auf die Oberfläche der Lösung aus. Das Salz wurde ein Mal umkrystallisirt; da es aber dennoch kein ganz reines Aussehen darbot, wurde die Base in dieser Form nicht

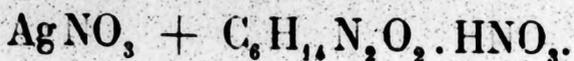
<sup>1)</sup> Etwa dieselbe Argininmenge habe ich vorher aus «Albumin aus Eiweiss» und eingetrocknetem Blutserum erhalten (diese Zeitschr., Bd. 21, S. 165). Bei einem an derselben Stelle erwähnten Versuche mit 500 gr. Casein gelang es mir nicht, das Argininsalz in dieser Weise zu isoliren. Erst auf einem Umwege konnte ich dasselbe darstellen und bekam im Ganzen etwa 2,5 gr. (= 0,25% Arginin).

analysirt. Die Wasserlösung reagirte stark alkalisch. Unter dem Mikroskope zeigte sich das Salz als grösstentheils aus sehr feinen Nadeln bestehend; die übrige Masse war un- deutlich krystallinisch. Beim Versuche, das Salz durch Zusatz von Alkohol zu der concentrirten Wasserlösung zum Krystallisiren zu bringen, wurde nur ein flockiger Niederschlag erhalten, worin auch unter dem Mikroskope keine deutlichen Krystalle zu sehen waren. Wie eben erwähnt, gibt das Arginin zwei Salze mit Silbernitrat:  $\text{AgNO}_3 + \text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2 + \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{AgNO}_3 + \text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2 \cdot \text{HNO}_3$ , von welchen das erste stark alkalische Reaction besitzt und in Wasser schwerlöslich ist, während das andere schwach sauer reagirt und sich leicht in Wasser löst. Da nun die aus der Mutterlauge des Argininsalzes,  $\text{AgNO}_3 + \text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2 + \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$  krystallisirende Verbindung durch alkalische Reaction und Schwerlöslichkeit sich dem Argininsalze analog erwies, war zu vermuthen, dass die darin enthaltene Base auch ein dem Argininsalze  $\text{AgNO}_3 + \text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2 \cdot \text{HNO}_3$  entsprechendes Salz geben würde. Zur Darstellung dieses Salzes wurde folgendermaassen verfahren.

Da die Krystallmasse noch ein wenig Baryumnitrat enthielt, wurde dasselbe mit Schwefelsäure genau zerlegt; dann wurde Salpetersäure bis zur schwach sauren Reaction zugegeben, stark concentrirt und mit Alkohol bis zur bleibenden Trübung versetzt. Allmählig schieden sich schöne Krystallnadeln aus, die auf Zusatz von neuen Mengen Alkohol und schliesslich von Aether sich immer vermehrten. Nach einmaligem Umkrystallisiren aus Wasser unter Zusatz von Alkohol und Aether wurde das Salz über Schwefelsäure getrocknet und analysirt.

1. 0,1525 gr. gaben 0,0436 gr. Ag.
2. 0,2494 gr. gaben 0,0712 gr. Ag, 0,0872 gr.  $\text{H}_2\text{O} = 0,00969$  gr. H und 0,1736 gr.  $\text{CO}_2 = 0,04735$  gr. C.
3. 0,2177 gr. gab nach der Methode von Schlösing-Tiemann 26,8 ccm. NO (bei  $15^\circ$  und 759 mm. Hg)  $= 0,01566$  gr. N. Der Rückstand gab nach Kjeldahl behandelt Ammoniak, das durch 11 ccm.  $\frac{1}{10}$  normale Schwefelsäure neutralisirt wurde  $= 0,0154$  gr. N.

Hieraus berechnet sich die Formel



Berechnet:		Gefunden:		
		1.	2.	3.
Ag	108	28,50	28,59	28,55
H <sub>15</sub>	15	3,96	—	3,88
C <sub>6</sub>	72	19,00	—	18,99
N <sub>2</sub>	28	7,39	—	—
N <sub>2</sub>	28	7,39	—	7,19
O <sub>8</sub>	128	—	—	7,08
379		—	—	—

Der Formel nach sollte also ein Salz von Lysin —  $C_6H_{14}N_2O_2$  — vorliegen, welches Salz dem Argininsalze  $AgNO_3 + C_6H_{14}N_2O_2 \cdot HNO_3$  völlig analog wäre. Wenn dem so ist, muss aber dasselbe Salz auch aus reinem Lysin erhalten werden. Lysinchlorid wurde also aus dem Lysinplatin-salz nach Fällen des Platins durch Krystallisiren aus sehr concentrirter Wasserlösung dargestellt. Die Analyse ergab:

Berechnet		für $C_6H_{14}N_2O_2 \cdot 2HCl$ .	
C	32,55	32,87	%
H	7,22	7,31	»
Cl	32,19	32,42	»

Die Wasserlösung des stark sauer reagirenden Chlorids wurde bis zur alkalischen Reaction mit Silberoxyd in der Wärme behandelt, vom entstandenen Niederschlag filtrirt, mit Salzsäure schwach angesäuert, Silbernitrat in Ueberschuss zugegeben, von Chlorsilber filtrirt und concentrirt. Unter Zusatz von Alkohol und Aether schieden sich schöne, nadel-förmige Krystalle aus, die ganz das Aussehen des oben er-wähnten Salzes besaßen.

0,1738 gr. gaben 0,0497 gr. Ag = 28,60%. Berechnet wird für  $AgNO_3 + C_6H_{14}N_2O_2 \cdot HNO_3$  28,50% Ag.

Wenn man beim Herstellen des Salzes aus dem Lysin-chloride die Lösung stark salpetersauer macht, z. B. wenn man die ganze Chlormenge durch Silbernitrat ausfällt, bekommt man ein Product, dass zu wenig Silber enthält. Wahrscheinlich krystallisirt dabei neben dem Silbersalze auch etwas Lysin-nitrat aus. Die Lösung des reinen Lysin-silbersalzes reagirt schwach sauer.

Es kann demnach als bewiesen angesehen werden, dass Lysin ein Silbersalz von der Zusammensetzung  $\text{AgNO}_3 + \text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2 \cdot \text{HNO}_3$  gibt. Die in oben angegebener Weise aus 500 gr. Casein erhaltene Lysinsilbersalzmenge machte etwa 16 gr. aus.

Bei der Untersuchung der Mutterlauge vom alkalisch reagirenden Lysinsilbersalze habe ich gefunden, dass dieselbe nach Entfernung des Silbers keinen Niederschlag mit Quecksilberoxydnitrat gibt; wird aber nach Zusatz des Quecksilbersalzes die Lösung mit Natronlauge neutralisirt, entsteht ein sehr voluminöser, weisser Niederschlag. Dieser wurde abfiltrirt und, in Wasser aufgeschlemmt, mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Das sauer reagirende Filtrat vom Schwefelquecksilber wurde, wie oben angegeben, zur Herstellung des alkalisch reagirenden Lysinsilbersalzes mit Silbernitrat, Barythydrat und Kohlensäure behandelt; beim Stehen der concentrirten Lösung krystallisirte zunächst Baryumnitrat aus, dann aber eine Krystallmasse von dem Aussehen des Lysin-salzes, die auch in angegebener Weise das Lysin-salz  $\text{AgNO}_3 + \text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2 \cdot \text{HNO}_3$  gab.

Analysen: 0,1504 gr. gaben 0,0434 gr. Ag = 28,92%. Die Formel fordert Ag = 28,50%.

Die so erhaltene Menge Lysin-salz betrug etwa 5 gr.; im Ganzen wurden also aus 500 gr. Casein etwa 21 gr. Lysin-salz erhalten, was ungefähr 8 gr. Lysin entspricht.

Dieselbe Lysin-Verbindung habe ich in eben angegebener Weise auch aus den Spaltungsproducten von Conglutin, Albumin aus Eigelb, Albumin aus Eiweiss und eingetrocknetes Blutserum erhalten.

Analysen des Silbersalzes  $\text{AgNO}_3 + \text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2 \cdot \text{HNO}_3$ :

Aus Conglutin:

0,1859 gr. 0,0528 gr. Ag = 28,40%, berechnet 28,50%.

Aus Albumin a. Eigelb:

0,1753 gr. gaben 0,0504 gr. Ag.

0,2378 gr. gaben 30,7 ccm. NO (bei 23° u. 755 mm. Hg) = 0,01717 gr. N.

Das aus dem Rückstand erhaltene Ammoniak wurde durch 12,5 ccm.

$\frac{1}{10}$  normale Schwefelsäure neutralisirt = 0,0175 gr. N.

	Berechnet:	Gefunden:
Ag	28,50	28,75 %.
N <sub>2</sub>	7,39	7,22 »
N <sub>2</sub>	7,39	7,36 »

## Aus Albumin a. Eiweiss:

0,2047 gr. gaben 0,0571 gr. Ag.

0,2235 gr. gaben 28,5 cbcm. NO (bei 22° u. 755 mm. Hg) = 0,01603 gr. N.

Das aus dem rückständigen Stickstoff erhaltene Ammoniak entsprach 11,7 cbcm.  $\frac{1}{10}$  normale Schwefelsäure = 0,0168 gr. N.

	Berechnet:	Gefunden:
Ag	28,50	27,89 %.
N <sub>2</sub>	7,39	7,17 »
N <sub>2</sub>	7,39	7,33 »

## Aus eingetrocknetem Blutserum:

0,2073 gr. gaben 0,0597 gr. Ag = 28,80 %, berechnet 28,50 %.

Wie ersichtlich, beruht die oben angegebene Methode das Lysin zu isoliren, auf der Eigenschaft desselben, mit Silbernitrat zwei Verbindungen zu geben, welche dem alkalisch reagirenden Argininsalze  $\text{AgNO}_3 + \text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2$  und dem sauer reagirenden  $\text{AgNO}_3 + \text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2 \cdot \text{HNO}_3$  analog zu sein scheinen. Die dem ersten Argininsalze entsprechende Lysinverbindung ist in Wasser ziemlich schwerlöslich, aber bei weitem nicht in dem Grade wie das Argininsalz. Dadurch kann dieselbe vom Arginin, sowie von den in Wasser leichtlöslichen Substanzen befreit werden. Natürlich kann dies nicht ohne Verlust stattfinden, und das Verfahren ermöglicht demnach in keiner Weise das Isoliren der ganzen vorhandenen Lysinmenge. Einen Theil — vielleicht auch den grössten Theil — der in der Lösung zurückgebliebenen Lysinmenge kann man dadurch gewinnen, dass die Lösung mit Quecksilberoxydnitrat und Natronlauge fällt, den Niederschlag mit Schwefelwasserstoff zerlegt und dann wie vorher die Silbersalze darstellt. Quecksilberoxydnitrat für sich ruft in sauren Lysinlösungen keine Fällung hervor; dagegen werden sowohl Arginin als Lysin durch Quecksilberoxydnitrat und Natronlauge als flockige, weisse Niederschläge gefällt.

Aus dem Filtrate vom alkalisch reagirenden Silbersalze des Lysins versuchte ich durch Ausfällen des Baryts, schwachen Ansäuern mit Salpetersäure, Concentriren und Zusatz von Alkohol das Lysatininsalz  $\text{AgNO}_3 + \text{C}_6\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_2 \cdot \text{HNO}_3$  zu gewinnen. Es schied sich aber nur ein Syrup aus, in dem nach einigen Tagen spärliche Krystallgruppen zu sehen waren. Auch nach Zusatz von Aether schieden sich keine deutlichen Krystalle aus. Auch habe ich das Filtrat vom Niederschlage mit Quecksilberoxydnitrat in derselben Beziehung untersucht. Zunächst wurde das Quecksilber entfernt und, weil die Lösung sehr grosse Mengen Natriumnitrat enthielt, mit Phosphorwolframsäure gefällt. Der nicht sehr bedeutende Niederschlag bestand aus mikroskopischen Nadeln nebst feinen Körnchen. Derselbe wurde wie üblich mit Barythydrat zerlegt, der Barytüberschuss entfernt, mit Salpetersäure schwach angesäuert, Silbernitrat zugegeben und allmählig Alkohol und dann Aether zugefügt. Zunächst schied sich ein Oel aus und später nadelartige Krystalle, die aber für eine Analyse nicht ausreichten. Es ist mir demnach nicht gelungen, in diesem Falle das Lysatinin unter den Spaltungsproducten des Fibrins nachzuweisen. Die spärlichen Krystalle, welche in beiden Fällen erhalten wurden, können als Lysinsalz erklärt werden, das noch in der Lösung zurückgeblieben war.

Aus 500 gr. Casein habe ich also etwa 8 gr. des Arginin-salzes  $\text{AgNO}_3 + \text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2 + \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$  und etwa 21 gr. des Lysinsalzes  $\text{AgNO}_3 + \text{C}_6\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_2 \cdot \text{HNO}_3$  bekommen. Dagegen konnte das Lysatinin nicht nachgewiesen werden. Andererseits war Casein die Proteinsubstanz, in deren Spaltungsproducten das Lysatinin entdeckt wurde. Dabei wurde aber das Lysatinin aus einer Lösung erhalten, die noch beträchtliche Mengen Lysin, sowie auch das Arginin enthielt. Da wir nun aus meinen Versuchen ersehen, dass das Lysatinin nicht nachgewiesen werden kann, wenn vorher das Arginin und Lysin entfernt worden sind, und ausserdem nunmehr wissen, dass die genannten Basen Silbersalze,  $\text{AgNO}_3 + \text{C}_6\text{H}_{11}\text{N}_4\text{O}_2 \cdot \text{HNO}_3$  und  $\text{AgNO}_3 + \text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2 \cdot \text{HNO}_3$ , geben, welche dem Lysatininsalze  $\text{AgNO}_3 + \text{C}_6\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_2 \cdot \text{HNO}_3$  völlig analog sind, kann

man schwerlich den Gedanken abwehren, dass das von Drechsel, Siegfried, Fischer, Schwarz und mir aus verschiedenen Proteinkörpern gewonnene Lysatininsilbersalz lediglich eine Mischung aus dem Arginin und Lysin Salz sei. Diese Salze werden unter ganz denselben Verhältnissen erhalten wie das Lysatininsalz, d. h. sie krystallisiren aus einer concentrirten Wasserlösung auf Zusatz von Alkohol und Aether. Dem Aussehen nach sind die drei Verbindungen von einander gar nicht zu unterscheiden: sie krystallisiren alle in sehr feinen Nadeln. Dass eine Mischung von etwa gleichen Theilen Arginin und Lysin Salz Analysenwerthe geben muss, die mit der Formel des Lysatininsalzes übereinstimmen, ist ohne Weiteres aus den Formeln zu ersehen und ergibt sich auch aus folgenden Procentzahlen, die sich für die drei Formeln berechnen lassen:

	Argininsalz.	Lysatininsalz.	Lysin Salz.
Ag	26,54	27,55	28,50
C	17,69	18,37	19,00
H	3,69	3,57	3,96
N	20,64	17,86	14,78

Dass das Lysatinin nach der Darstellung des gut krystallisirenden Silbersalzes für ein chemisches Individuum genommen wurde, erklärt sich leicht, weil es damals nicht bekannt war, weder dass Arginin unter den Spaltungsproducten der Proteinkörper auftritt, noch dass diese Base, sowie das Lysin dem Lysatininsalze völlig analoge Verbindungen geben. Wohl geht es aus meinen Versuchen nicht unzweideutig hervor, dass das Lysatinin als chemisches Individuum nicht existirt, aber so viel scheint doch bewiesen zu sein, dass das Lysatininsalz, nach üblichen Methoden dargestellt, beträchtliche Mengen Arginin und Lysin enthalten muss.

Lund, medicinisch-chemisches Laboratorium,  
im Oktober 1895.