

Ein Beitrag zur Erforschung der Constitution des Eiweissmoleküls.

Von
Fr. Pröscher.

(Aus dem Laboratorium von Prof. v. Bunge in Basel.)

Der Redaction zugegangen am 16. Februar 1899.

Bei den bisherigen Untersuchungen über die Constitution des Eiweissmoleküles sind zwei Punkte vernachlässigt worden: Erstens ist man nicht von reinem, krystallisirtem Eiweiss ausgegangen und zweitens hat man eine möglichst genaue quantitative Bestimmung der bis jetzt bekannten Spaltungsprodukte unterlassen.

Auf Anregung von Prof. v. Bunge habe ich es nun versucht, das Eiweissmolekül abzubauen, unter Berücksichtigung der oben erwähnten Punkte.

Als Ausgangsmaterial zur Untersuchung wurde krystallisirtes Hämoglobin verwendet. Dasselbe wurde nach der Methode von Zinoffsky¹⁾ dargestellt und doppelt umkrystallisirt. Ich versuchte zuerst das Eiweiss des Hämoglobins vom Hämatin zu trennen. Das Ausziehen des Hämatins mit alkoholischem Ammoniak ist äusserst umständlich und erfordert für kleine Mengen Hämoglobin viel Alkohol. Ich wandte folgende Methode an, um das Eiweiss des Hämoglobins vom Hämatin zu trennen: Das noch feuchte Hämoglobin wird eine Zeit an der Luft stehen gelassen, oder es wird ein Luftstrom durchgeleitet, um den Alkohol zu entfernen. Darauf wird das Hämoglobin mit 10 bis

¹⁾ O. Zinoffsky, Ueber die Grösse des Hämoglobinmoleküls. Zeitschr. f. physiolog. Chemie 1886, Bd. X, S. 16—34.

12% iger Salzsäure digerirt und auf dem Wasserbade bei einer Temperatur von 45—50° das Eiweiss extrahirt. Das Hämatin bleibt ungelöst am Boden des Gefässes; man decantirt die Flüssigkeit ab und neutralisirt mit Natronlauge und kocht; das Eiweiss fällt in grau-weissen Flocken aus. Man extrahirt nun das zurückgebliebene Hämatin so lange mit Salzsäure, bis bei der Neutralisation keine Trübung mehr entsteht. Diese Methode ist zur Gewinnung kleiner Mengen Eiweiss verwendbar, aber, um grössere Quantitäten darzustellen, zu zeitraubend. Ich habe deshalb diese Methode wieder verlassen und das Hämoglobin direkt mit Zinnchlorür und Salzsäure zerlegt. Das Hämoglobin wurde nicht frisch verarbeitet, sondern erst getrocknet, dann möglichst fein pulverisirt und in die kochende Lösung von Zinnchlorür und Salzsäure allmählich eingetragen. Zum Erhitzen wurde eine Glasretorte angewandt, die mit einem Rückflusskühler versehen wurde. Zur Verwendung kamen 240 gr. doppelt umkrystallisirtes, bei 120° getrocknetes Hämoglobin, das in 1100 ccm. einer ca. 20% igen Salzsäure, welcher 50 gr. Zinnchlorür zugesetzt waren, 76 Stunden lang am Rückflusskühler erhitzt wurde. Das dunkelrothbraune Reactionsprodukt wurde nun auf ca. 5 Liter verdünnt und das Zinn mit Schwefelwasserstoff ausgefällt. Das Filtrat war schwach weingelb gefärbt. Das Hämatin bleibt fast ganz ungelöst und findet sich als feinkörniges Pulver am Boden des Gefässes. Die geringe Menge, welche mit in Lösung geht, wird durch das Schwefelzinn mit niedergerissen, so dass die Lösung nach dem Filtriren fast völlig farblos ist. Sodann wurde das Filtrat auf dem Wasserbade etwas eingeengt und darauf mit 1500 gr. krystallisirter Phosphorwolframsäure¹⁾ versetzt, die in wenig Wasser gelöst war, wobei der Anfangs entstehende Niederschlag sich löste und erst bei weiterem Zusatz von Phosphorwolframsäure abschied. Das Ganze wurde erkalten gelassen, wobei die halbflüssige Masse zu einem theils körnigen, theils krystallinischen

1) M. Siegfried, Zur Kenntniss der Spaltungsprodukte der Eiweisskörper. Ber. der d. chem. Gesellschaft, Bd. 24, S. 418—432. — E. Fischer, Ueber Spaltungsprodukte des Leucins. Inaug.-Dissert. 1890.

Brei erstarrte. Der Niederschlag wurde abgesaugt und mit 5%iger Schwefelsäure, welche mit Phosphorwolframsäure versetzt war, chlorfrei gewaschen. Der chlorfreie Niederschlag wurde dann in heissem Wasser suspendirt, wobei ein Theil sich löste. Die kochende Lösung wurde mit einem geringen Ueberschuss von Barythydrat versetzt und einige Minuten im Sieden erhalten. Nach dem Erkalten wurde filtrirt, das Filtrat mit Kohlensäure gesättigt, 15 Minuten zur Abscheidung des kohlensauren Baryums erwärmt und filtrirt. Das Filtrat wurde mit einer Lösung von 40 gr. salpetersauren Silbers versetzt. Sogleich fiel ein amorpher, gelbweisser Niederschlag aus, der nach 24 Stunden abfiltrirt, salpetersäurefrei gewaschen und über Schwefelsäure getrocknet wurde.

Die Menge des Niederschlags betrug 15,7275 gr. = 6,533% der ursprünglichen Hämoglobinmenge.

Die Analyse ergab folgende Werthe:

0,1760 gr. Subst. gaben: 0,0335 H₂O
und 0,1230 CO₂.

0,1595 gr. Subst. gaben: 16,5 ccm. N bei 22° u. 738,8 mm. Hg.

0,1640 gr. Subst. gaben: 0,0932 Ag.

19,03% C

2,21% H

11,35% N

10,59% O

56,82% Ag.

Das Filtrat von diesem Niederschlag war schwach trüb und wurde auf dem Wasserbade zum dünnen Syrup eingedampft, wobei sich ein Theil des Silbers als schwarzer, schmieriger Niederschlag abschied. Derselbe wurde abfiltrirt und das weingelbe Filtrat allmählich mit Alkohol versetzt. Nach einiger Zeit entstand ein schwach gelbweisser, amorpher Niederschlag, der sich nach mehrstündigem Stehen nicht vermehrt hatte. Es wurde nun Aether zugegeben und einige Tage stehen gelassen. Der Niederschlag hatte sich noch etwas vermehrt. Derselbe wurde abgesaugt, mit Alkohol und Aether gewaschen und über Schwefelsäure getrocknet.

Die Menge des Niederschlags betrug 1,9087 gr. = 0,795%

0.1759 gr. Subst. gaben: 0.0380 gr. H_2O
und 0.1265 gr. CO_2

0.2215 gr. Subst. gaben: 38.5 ccm. N bei 22° u. 738.8 mm. Hg.

0.0382 gr. Subst. gaben: 0.0197 Ag.

19.55 % C

2.40 % H

19.097 % N

7.383 % O

51.57 % Ag

Das Filtrat von diesem Niederschlag gab auf weiteren Zusatz von Aether keinen Niederschlag mehr. Es wurde nun der grösste Theil des Aethers und Alkohols auf dem Wasserbade abdestillirt, der Destillationsrückstand erkalten gelassen, filtrirt und nochmals mit Aether und Alkohol versetzt. Sofort fiel ein weissgelber amorpher Niederschlag aus, welcher nach vier- und zwanzigstündigem Stehen abgesaugt, mit Alkohol und Aether gewaschen und getrocknet wurde.

Die Menge des Niederschlags betrug 2,1480 gr. = 0,895 %.

Die Analyse ergab folgende Werte:

0.1590 gr. Subst. gaben: 0.0310 gr. H_2O

und 0.1240 gr. CO_2 .

0.2655 gr. Subst. gaben: 36 ccm. N bei 22° u. 738.8 mm. Hg.

0.1640 gr. Subst. gaben: 0.0932 gr. Ag.

21.25 % C

2.14 % H

14.887 % N

12.873 % O

48.85 % Ag

Das Filtrat von letzterem Niederschlag wurde nochmals der Destillation unterworfen und gab auf abermaligen Zusatz von Aether nur noch eine geringe Menge Niederschlag. Eine genauere Untersuchung der einzelnen Silbersalze werde ich noch ausführen. Die vorliegenden Mengen waren zu gering, um eingehendere Studien damit anzustellen. Der Alkohol und Aether wurde nun auf dem Wasserbade völlig verjagt, der zurückbleibende Syrup mit Wasser verdünnt und mit Schwefelwasserstoff behandelt, um den Rest des Silbers auszufällen. Nachdem die Flüssigkeit durch Erwärmen vom Schwefelwasserstoff befreit war, wurde dieselbe zum dicken Syrup eingedampft,

mit absolutem Alkohol behandelt, wobei sie sich fast völlig löste. Die Lösung wurde nun mit alkoholischer Quecksilberchloridlösung¹⁾ versetzt. Es entstand nach einiger Zeit ein weisser, flockiger Niederschlag, der einige Tage stehen blieb, dann filtrirt und mit Schwefelwasserstoff zerlegt wurde. Das Schwefelquecksilber wurde abfiltrirt und das Filtrat zur Trockene verdampft. Es hinterblieben 0,5680 gr. eines in weissen Blättchen krystallisirenden Körpers, welcher auf Cholin und Betain geprüft wurde, aber keine sichere Reaction auf dieselben gab.

Filtrat vom Phosphorwolframsäureniederschlag.

Die überschüssige Phosphorwolframsäure wurde mit Barythydrat entfernt, das Filtrat mit Schwefelsäure versetzt, um den überschüssigen Baryt auszufällen, und mit kohlsaurem Blei behandelt, um den grössten Theil der Salzsäure zu entfernen. Das Bleichlorid wurde abfiltrirt, das Filtrat mit Schwefelwasserstoff entbleit und der Rest der Salzsäure mit Silberoxyd entfernt. Die salzsäurefreie Lösung wurde auf dem Wasserbade zum dicken Syrup eingedampft und einige Tage in der Kälte stehen gelassen, um das Tyrosin zur Abscheidung zu bringen. Der zu einem Brei erstarrte Syrup wurde nun in wenig Wasser gelöst, wobei das Tyrosin zurückblieb. Dasselbe wurde abfiltrirt, mit Wasser, Alkohol und Aether gewaschen, bei 100° getrocknet und gewogen. Die Menge desselben betrug 3,639 gr. = 1,52% o, umkrystallisirt aus verdünntem Ammoniak 1,7728 = 0,738% o. Die Stickstoffbestimmung nach Warrentrapp-Will ergab aus 0,0772 gr. Substanz $0,095 \text{ PCl}_6(\text{NH}_4)_2 = 7,64\% \text{ N}$. N aus der Formel des Tyrosins berechnet = 7,73% o.

Zur Trennung von Leucin, Glutaminsäure, Asparaginsäure und Phenylamidopropionsäure wurde folgendes Verfahren angewandt. Das Filtrat vom Tyrosin wurde auf ca. 2 Liter verdünnt und mit einer gesättigten Lösung von salpetersaurem Quecksilberoxyd versetzt. Das salpetersaure Quecksilberoxyd

¹⁾ J. E. Schulze, Ueber basische Stickstoffverbindungen aus dem Samen von *Vicia sativa* und *Pisum sativum*. Zeitschrift für physiologische Chemie, Bd. XV, S. 140—161, 1891 u. Bd. XVII, S. 193—216, 1893.

fällt die Asparaginsäure, Glutaminsäure und einen Theil der Phenylamidopropionsäure¹⁾ aus, während das Leucin in Lösung bleibt. Der Niederschlag wird gut ausgewaschen, mit Schwefelwasserstoff zerlegt, das Filtrat eingeeengt und mit einer ammoniakalischen Silberlösung versetzt. Der entstehende Niederschlag besteht, wie Siegfried²⁾ gezeigt hat, aus asparaginsaurem Silber. Die auf diese Weise gewonnene Asparaginsäure betrug 0,4697 gr. = 0,1950% . Eine Stickstoffbestimmung war mir leider nicht möglich zu machen, da mir ein Theil der Substanz beim Umkrystallisiren verloren ging. Aus dem Filtrat der Asparaginsäure wurde das Silber mit Schwefelwasserstoff entfernt und die Salpetersäure mit Bleioxydhydrat. Nach Entfernung des Bleies mit Schwefelwasserstoff wurde die Lösung mit Salzsäure versetzt und zwei Monate im Eisschrank stehen gelassen. Nach dieser Zeit hatte sich eine geringe Menge salzsaurer Glutaminsäure ausgeschieden, die abfiltrirt, mit Silberoxyd zur Entfernung der Salzsäure behandelt, eingedampft und getrocknet wurde. Ihre Menge betrug 0,0265 gr. = 0,011% Glutaminsäure. Eine Stickstoffbestimmung auszuführen, war bei der geringen Menge nicht möglich. Das Filtrat der salzsaurer Glutaminsäure wurde, nach Abscheidung der Salzsäure mit Silberoxyd, zur Prüfung auf Phenylamidopropionsäure verwandt. Da bis jetzt die Phenylamidopropionsäure nur in geringer Menge gefunden worden und die Reingewinnung mit beträchtlichen Schwierigkeiten verbunden ist, sah ich von einer quantitativen Bestimmung ab. Es wurde der Rückstand mit chromsaurem Kali und Schwefelsäure am Rückflusskühler erhitzt. Nach wenigen Minuten trat der deutliche Geruch nach Benzaldehyd auf. Nach halbstündigem Kochen wurde die Flüssigkeit erkaltet gelassen. Dieselbe hatte deutlichen Geruch nach Benzoesäure. Eine Ausscheidung der Benzoesäure fand wegen der geringen Menge nicht statt. Auch Ausschütteln mit Benzol ergab einen

1) E. Schulze, Ueber die Amidosäuren, welche bei der Zersetzung der Eiweissstoffe mit Salzsäure und Barytwasser entstehen. Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. IX, S. 63—121.

2) M. Siegfried, Zur Kenntniss der Spaltungsprodukte der Eiweisskörper. Berichte der d. chem. Gesellsch. Bd. 24. 418—432.

minimalen Rückstand, der keine deutliche Reaction auf Benzoesäure zeigte.

Filtrat vom Quecksilberniederschlag.

In die vom ersten Quecksilberniederschlag abgelautene Flüssigkeit wurde Schwefelwasserstoff eingeleitet zur Entfernung des Quecksilbers. Das Filtrat vom Schwefelquecksilber wurde mit Bleioxydhydrat behandelt, um die Salpetersäure zu entfernen, und eingedampft. Die Flüssigkeit erstarrte zu einem krystallinischen Brei, der der Hauptmenge nach aus Leucin bestand. Die ganze Masse wurde auf das Saugfilter gebracht, abgesaugt und mit wenig Wasser nachgewaschen. Das Filtrat wurde nochmals mit salpetersaurem Quecksilberoxyd versetzt. Es entstand noch ein geringer Niederschlag, welcher abfiltrirt und mit Schwefelwasserstoff zersetzt wurde. Das Filtrat vom Schwefelquecksilber gab mit ammoniakalischer Silberlösung keinen Niederschlag mehr; auch bei längerem Stehen im Eisschrank schieden sich keine Krystalle ab. Ich dampfte die Flüssigkeit ein und oxydirte den geringen Rückstand mit chromsaurem Kali und Schwefelsäure. Sogleich nach dem Erwärmen trat der deutliche Geruch nach Benzaldehyd auf. Nach halbstündigem Erhitzen wurde die Flüssigkeit erkalten gelassen, wobei sich eine geringe Menge Benzoesäure in feinen Blättchen ausschied. Die Flüssigkeit wurde dann mit Aether ausgeschüttelt und der Aether verdunstet. Der Rückstand hatte stechenden Geruch nach Benzoesäure und gab mit Eisenchlorid den bekannten rostbraunen Niederschlag. Eine Schmelzpunktbestimmung war wegen der geringen Menge nicht möglich, da beim Umkrystallisiren zu viel verloren gegangen wäre und auch geringe Verunreinigungen den Schmelzpunkt bedeutend herabdrücken. Die vom zweiten Quecksilberniederschlag abgelautene Flüssigkeit musste den Rest des Leucins enthalten und wurde wie oben behandelt. Diese Leucinmenge wurde mit der früher gewonnenen zusammen aus alkoholischem Ammoniak umkrystallisirt; die Summe beider Mengen betrug 100,077 gr. 41,7% Leucin. Die Stickstoffbestimmung ergab folgende Werthe:

54.72 C

6.99 H

17.52 N

0.59 S

19.73 O

0.42 Fe.

Eine Kohlenstoff- und Wasserstoffbestimmung vom Hämoglobin habe ich selbst ausgeführt und folgende Werthe erhalten:

0.2794 gr. Subst. gaben 0.5620 CO_2 und 0.1720 H_2O . =
54.86% C u. 6.83% H.

Vergleichen wir nun die gefundenen Werthe mit der procentischen Zusammensetzung des Hämoglobins, so ergibt sich, dass wir beinahe die Hälfte Kohlenstoff, circa die Hälfte Stickstoff, $\frac{2}{3}$ Wasserstoff und etwas mehr als die Hälfte Sauerstoff in den Spaltungsprodukten wiedergefunden haben. Die andere Hälfte der Spaltungsprodukte fehlt uns also noch. Die quantitative Bestimmung ist eben in Folge der Verluste, die sich nicht umgehen lassen, und aus Mangel an präzisen Methoden zur Isolirung der einzelnen Spaltungsprodukte sehr erschwert. Ich möchte diese Untersuchung nur als den Anfang zu meinen weiteren Arbeiten über die möglichst genaue Bestimmung der einzelnen Spaltungsprodukte ansehen. Denn nur auf diese Weise wird es gelingen, nach und nach alle im Eiweissmolekel vorhandenen Radicale zu isoliren. Das Hämoglobin wird sich als Ausgangsmaterial am besten dazu eignen, da es leicht in grösseren Mengen rein zu gewinnen ist. Reines Material ist ein Hauptfactor, denn nur auf solchem kann eine genaue quantitative Bestimmung der einzelnen Spaltungsprodukte fussen.