

# Nachweis von Histidin und Lysin unter den Spaltungsprodukten der aus Coniferensamen dargestellten Proteinsubstanzen.

Von

E. Schulze und E. Winterstein.

Aus dem agriculturchemischen Laboratorium des Polytechnikums in Zürich.  
(Der Redaction zugegangen am 28. August 1899.)

Durch N. Rongger und E. Schulze<sup>1)</sup> ist nachgewiesen worden, dass die aus Fichten- und Weisstannensamen nach Ritthausen's Verfahren dargestellten Proteinsubstanzen beim Kochen mit Salzsäure sehr grosse Quantitäten von Basen liefern und dass unter den letzteren sehr viel Arginin sich findet. Ob neben dem Arginin auch Histidin und Lysin sich vorfinden, war unentschieden geblieben. Das grosse Interesse, das sich an die bei der Spaltung der Eiweisskörper entstehenden organischen Basen knüpft, veranlasste uns, diese Frage einer Prüfung zu unterwerfen. Mit Hülfe der von A. Kossel<sup>2)</sup> angegebenen Methoden gelang es uns leicht, aus den Spaltungsprodukten der aus Fichtensamen dargestellten Proteinsubstanz Histidin und Lysin zu isoliren.

Zur Gewinnung des Histidins versetzten wir die mit Kohlensäure gesättigte wässrige Lösung der aus dem Phosphor-

1) Eine ausführliche Mittheilung N. Rongger's über die von ihm bei Untersuchung der Fichtensamen und der daraus dargestellten Proteinsubstanz erhaltenen Resultate findet sich in den Landwirthschaftlichen Versuchsstationen, Bd. 51, S. 81 ff. Eine ganz kurze Mittheilung über die Ergebnisse, die N. Rongger, z. Th. unter Mitwirkung von E. Schulze, bei der Spaltung der aus Fichten- und Weisstannensamen dargestellten Proteinstoffe erhielt, ist von E. Schulze in dieser Zeitschrift, Bd. XXIV, S. 276 und Bd. XXV, S. 360 gemacht worden.

2) Diese Zeitschrift, Bd. XXV, S. 179 und XXVI, S. 586.

wolframsäureniederschlag abgeschiedenen Basen mit Quecksilberchlorid bis zur schwachsauren Reaction. Der durch dieses Reagens erzeugte Niederschlag wurde abfiltrirt und ausgewaschen, sodann in Wasser vertheilt und durch Schwefelwasserstoff zersetzt. Das Filtrat vom Schwefelquecksilber lieferte, nachdem es im Wasserbade stark eingeengt worden war, bald schöne, glänzende Krystalle, welche aus Wasser umkrystallisirt wurden. Nach einer von Herrn Professor E. Grubenmann auf unsere Bitte ausgeführten krystallographischen Untersuchung entsprachen die Formen dieser Krystalle den Angaben, die von M. Bauer<sup>1)</sup> über die Krystallform des Monochlorhydrats des Histidins gemacht worden sind. Dass das Monochlorhydrat der genannten Base vorlag, wurde auch durch eine Chlorbestimmung bewiesen:

0.3335 g Substanz (über Schwefelsäure getrocknet) gaben 0.2260 g $\text{AgCl}$ .	
Berechnet für	Gefunden
$\text{C}_6\text{H}_6\text{N}_3\text{O}_2 \cdot \text{HCl} + \text{H}_2\text{O}$	
Cl 16.90%	16.76%

Als dem Filtrat vom Chlorsilber noch Silbernitrat und sodann tropfenweise Ammoniakflüssigkeit zugesetzt wurde, schied sich ein weisser, amorpher Niederschlag aus, welcher abfiltrirt, ausgewaschen und hierauf bei  $100^\circ$  getrocknet wurde. Der Silbergehalt dieses Produktes entsprach der von Hedin<sup>2)</sup> für die Silberverbindung des Histidins aufgestellten Formel  $\text{Ag}_2\text{C}_6\text{H}_7\text{N}_3\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}$ , wie aus folgenden Angaben zu ersehen ist.

a) 0.2510 g Substanz gaben 0.1400 g Ag;	
b) 0.2800 " " " " 0.1560 " "	
Berechnet	Gefunden
Ag 55.77%	a) 55.77% b) 55.71%

Aus diesen Thatsachen ist mit Sicherheit zu schliessen, dass Histidin vorlag.

Aus dem Filtrat vom Quecksilberchloridniederschlag stellten wir Arginin dar, und zwar theils nach der von A. Kossel gegebenen Vorschrift (Ausfällen des Arginins mit Silberlösung und Barytwasser), theils nach der Methode von

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXII, S. 182.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXII, S. 194.



Hedin (Ueberführung des Arginins in die schwerlösliche basische Silberverbindung  $C_6H_{14}N_4O_2, AgNO_3$ ). Wendet man das letztere Verfahren auf die Basenlösung an, ohne aus dieser zuvor das Histidin zu entfernen, so findet sich, wie schon von Hedin angegeben worden ist, Histidin in dem Niederschlag vor, welcher in der Basenlösung durch Silbernitrat hervorgebracht wird. Auch aus diesem Niederschlag haben wir Histidin darstellen können, indem wir denselben durch Schwefelwasserstoff zerlegten, das Filtrat vom Schwefelsilber mit Phosphorwolframsäure versetzten und den durch dieses Reagens hervorgebrachten Niederschlag in bekannter Weise verarbeiteten.<sup>1)</sup>

Zur Darstellung des Lysins verwandten wir das Filtrat von dem argininhaltigen Niederschlag, welcher durch Silbernitrat und Barytwasser in der Basenlösung hervorgebracht worden war. Dieses Filtrat wurde vom Silber befreit, hierauf mit Phosphorwolframsäure versetzt, der dadurch hervorgebrachte Niederschlag in bekannter Weise durch Barythydrat zerlegt, die dabei erhaltene Basenlösung vom Baryt befreit, stark eingeeengt und sodann mit einer alkoholischen Pikrinsäurelösung bis zur neutralen Reaction versetzt. Bald schieden sich feine Krystallnadeln in beträchtlicher Menge aus, welche abfiltrirt und hierauf mehrmals aus heissem Wasser umkrystallisirt wurden. Der Stickstoffgehalt des in dieser Weise erhaltenen Pikrats überstieg den von der Formel  $C_6H_{14}N_2O_2, C_6H_3N_3O_7$  geforderten Werth, was wohl auf eine Beimengung von Argininpikrat<sup>2)</sup> zurückzuführen ist. Wir verwandelten daher jenes

1) Ein auf diesem Wege erhaltenes Chlorhydrat hat der eine von uns (F. Schulze) schon vor einigen Jahren Herrn Dr. S. G. Hedin übersendet, der sich für die Darstellung von Histidin aus dem Coniferenprotein interessirte. Nach einer gefälligen brieflichen Mittheilung Hedin's hatte dieses Chlorhydrat ungefähr die Zusammensetzung eines Histidindichlorids. Ein solches Salz, welches jedoch nur schwierig von einer der Formel genau entsprechenden Zusammensetzung zu erhalten ist, wurde inzwischen auch von F. Kutscher (diese Zeitschrift, Bd. XXV, S. 199) dargestellt.

2) Da nach W. Gulewitsch (diese Zeitschrift, Bd. XXVII, S. 209) das Argininsilber nicht ganz unlöslich in Wasser ist, so muss in dem lysinhaltigen Filtrat vom Argininsilberniederschlag etwas

Produkt unter Hinzunahme der aus der Mütterlauge noch gewonnenen Krystalle durch Schütteln mit wässriger Salzsäure und Aether nach der von A. Kossel gegebenen Vorschrift in das Chlorhydrat. Die wässrige Lösung dieses Chlorhydrats wurde eingedunstet, der Verdampfungsrückstand mit Methylalkohol behandelt, wobei eine sehr kleine Quantität anorganischer Substanz ungelöst blieb. Die Lösung wurde wieder eingedunstet, der Verdampfungsrückstand in wenig Wasser gelöst, die Flüssigkeit mit einer concentrirten Platinchloridlösung versetzt. Als dann absoluter Alkohol zugefügt wurde, schied sich binnen 12 Stunden ein Chloroplatinat in schönen gelbrothen Prismen aus — eine Erscheinung, die in Uebereinstimmung mit den von E. Drechsel<sup>1)</sup> gemachten Angaben steht. Nach Siegfried<sup>2)</sup> schliesst das so dargestellte Lysinplatinchlorid Krystallalkohol ein. Zur Entfernung des letzteren trockneten wir das Salz, welches beim Liegen über Schwefelsäure verwitterte, zuerst bei 100, dann noch bei 130°. Sein Gehalt an Stickstoff, sowie auch an Platin entsprach nun der Formel  $C_6H_{14}N_2O_2 \cdot 2 HCl \cdot PtCl_4$ , wie aus folgenden Angaben zu ersehen ist:<sup>3)</sup>

Arginin sich finden; die Quantität des letzteren wird insbesondere dann nicht ganz unbedeutend sein, wenn man das Arginin durch Silbernitrat oder Silbersulfat und Barytwasser aus stark verdünnter Lösung ausgefällt und den Niederschlag anhaltend mit Wasser ausgewaschen hat. Letzteres ist also bei Ausführung der zur Trennung des Arginins vom Lysin dienenden Operationen zu vermeiden. Wir haben dies stets gethan; bei Ausführung des oben beschriebenen Versuchs lag aber eine Angabe über die Löslichkeit des Argininsilbers noch nicht vor. Es ist noch darauf aufmerksam zu machen, dass mehr Argininsilber in Lösung bleiben wird, wenn die bezügliche Flüssigkeit nicht frei von Ammoniak ist.

1) Archiv für Anatomie und Physiologie, 1891, physiologische Abtheilung, S. 259.

2) Ebendasselbst, S. 272.

3) Wie aus den oben gemachten Angaben hervorgeht, gelang die Gewinnung von reinem Lysinplatinchlorid, obgleich das als Ausgangsmaterial dienende Pikrat wahrscheinlich durch Argininpikrat verunreinigt war; dass die Anwesenheit von Arginin in solchem Falle nicht schädlich wirkt, ist auch aus folgendem Versuch zu schliessen: Wir vermischten



1) 0,2402 g Substanz gaben 11,5 ccm. feuchtes Stickstoffgas bei 23° und 728 mm. Quecksilberdruck.

2) 0,2695 g Substanz gaben 0,0950 g Pt.

	Berechnet	Gefunden
N	5,05 %	5,17 %
Pt	35,05 %	35,25 %

Aus den im Vorigen mitgetheilten Versuchsergebnissen geht hervor, dass unter den Spaltungsprodukten, welche die aus Fichtensamen dargestellte Proteinsubstanz beim Erhitzen mit Salzsäure liefert, neben Arginin auch Histidin und Lysin sich finden. Das Gleiche gilt nach einer von O. Meyer in unserem Laboratorium ausgeführten Untersuchung<sup>1)</sup> auch für die Spaltungsprodukte der aus dem Samen der Seekiefer (*Pinus maritima*) dargestellten Proteinsubstanz.

Was die Ausbeute an den genannten Basen betrifft, so erhielten wir aus einem Proteinsubstanzpräparat, welches jedenfalls etwas mehr als 300 g Trockensubstanz enthielt, ungefähr 3 g Histidinchlorid, 19 g Argininnitrat und 3 g noch unreines Lysinpicrat. Bei der Spaltung der Proteinsubstanz war also Arginin in viel grösserer Menge entstanden, als die beiden anderen Basen. Dieses Resultat steht im Einklang mit den von N. Rongger (*loc. cit.*) gemachten Beobachtungen. Die Ausbeute an Arginin, obwohl immer noch recht hoch, war aber ohne Zweifel beträchtlich niedriger als diejenige, welche Rongger bei Zersetzung des von ihm aus Fichtensamen dargestellten Proteinpräparates erhielt. Die Ursache für diese Differenz muss wohl in erster Linie in einer ungleichartigen Beschaffenheit der von Rongger und von uns verwendeten Proteinsubstanzpräparate, für deren Darstellung zwei verschiedene Muster von Fichtensamen gedient hatten, gesucht werden.

Eine Lösung von Argininchlorid mit der zur Bildung des Chloroplatinats erforderlichen Platinchloridmenge, engten die Flüssigkeit stark ein und liessen dann viel absoluten Alkohol zu. Dabei entstand bei mehrtägigem Stehen keine Ausscheidung von Krystallen eines Chloroplatinats.

1) Die Ergebnisse dieser Untersuchung, in welcher es sich nicht allein um die Identificirung der aus der bezüglichen Proteinsubstanz entstehenden Spaltungsprodukte, sondern auch um die Erreichung anderer Ziele handelte, sollen später an anderer Stelle veröffentlicht werden.

Man kann kaum daran zweifeln, dass man aus den Fichtensamen nach dem Verfahren Ritthausen's ein Gemenge von Proteinstoffen erhält: es ist aber sehr wohl möglich, dass dieses Gemenge nicht die gleiche Zusammensetzung besitzt, wenn zu seiner Darstellung Fichtensamen verschiedener Herkunft gedient haben. Von Einfluss auf die Beschaffenheit der Präparate kann aber auch die specielle Art und Weise sein, in der man die Extraction der Samen ausführt. Wenn man nämlich, wie dies sowohl von Rongger als von uns geschah, die zerkleinerten Samen behufs Extraction der Proteinstoffe wiederholt mit sehr verdünnter Alkalilauge behandelt, so ist es möglich, ja sogar wahrscheinlich, dass die ersten Extracte bei der Ausfällung durch Säure andere Proteinstoffe liefern, als die später dargestellten Auszüge: die durch Vereinigung der verschiedenen Fällungen erhaltenen Präparate können also eine ungleiche Beschaffenheit haben, je nachdem man die Behandlung der Samen mit Alkalilauge öfter oder weniger oft wiederholt hat. Uebrigens ist darauf aufmerksam zu machen, dass es sich in diesen Fällen nicht um genaue Ermittlung der bei Zersetzung der Proteinsubstanzen entstandenen Argininquantität, sondern nur um Bestimmung der Ausbeute an Argininmütrat handelt. Wer aber solche Darstellungen, bei denen man nur durch eine Reihe von aufeinanderfolgenden Operationen zum Ziele gelangt, schon öfter ausgeführt hat, der weiss auch, dass auf die Ausbeute an dem bezüglichen Produkt zufällige Umstände zuweilen einen nicht unbeträchtlichen Einfluss ausüben. Schliesslich ist noch daran zu erinnern, dass Rongger nicht nur die Ausbeute an Arginin, sondern auch die Stickstoffmenge bestimmt hat, welche im Phosphorwolframsäureniederschlag in Form von organischen Basen sich vorfand.

---