

## Hydrolyse des Oxyhämoglobins durch Salzsäure.

Von

**Emil Fischer** und **Emil Abderhalden.**

Aus dem I. chem. Institut der Universität Berlin.)

(Der Redaction zugegangen am 5. August 1902.)

Von allen thierischen Proteinstoffen ist das Oxyhämoglobin am leichtesten krystallisirbar und die schöne Ausbildung der Krystalle gewährt auch eine verhältnismässig grosse Garantie, dass hier ein einheitliches chemisches Product vorliegt. Es schien deshalb von Interesse, die Hydrolyse des Oxyhämoglobins mit den neuen Methoden für die Isolirung der Aminosäuren zu studiren. Der Vergleich mit den Resultaten, die bei anderen Proteiden, wie Casein,<sup>1)</sup> Seidenfibrin,<sup>2)</sup> Leim<sup>3)</sup> etc., erhalten worden waren, konnte zumal zur Aufklärung der Frage beitragen, ob die Zusammensetzung der Proteinstoffe wirklich so complicirt sei, wie man es nach der grossen Zahl von Spaltproducten bei jenen Materialien annehmen musste. Allerdings ist das Oxyhämoglobin eine Verbindung des Farbstoffs Hämatin mit einem Eiweissstoff, für den F. N. Schulz<sup>4)</sup> den Namen Globin vorgeschlagen hat. Da aber der Farbstoff beim Erwärmen mit Salzsäure keine Spaltung erfährt, so darf man

1) Confer. Emil Fischer. Ueber Hydrolyse des Caseins durch Salzsäure. Diese Zeitschrift, Bd. XXXIII, S. 151, 1901.

2) Emil Fischer und Aladar Skita. Ueber das Fibroin der Seide. Diese Zeitschrift, Bd. XXXIII, S. 177, 1901.

3) Emil Fischer, P. A. Levene und R. H. Aders. Ueber die Hydrolyse des Leims. Diese Zeitschrift, Bd. XXXV, S. 70, 1902.

4) Fr. N. Schulz. Der Eiweisskörper des Hämoglobins. Diese Zeitschrift, Bd. XXIV, 1898, S. 449.

die bei der Hydrolyse des Oxyhämoglobins entstehenden Körper sämmtlich als Zertrümmerungsproducte des Globins betrachten. Von diesem Gesichtspunkte aus ist auch die Arbeit von Pröscher<sup>1)</sup> ausgeführt, welcher, wie es scheint, sich bisher allein mit der totalen Hydrolyse des Oxyhämoglobins beschäftigt hat. Da er sich aber mit der alten Methode für die Isolirung der Aminosäuren begnügen musste, so sind seine Resultate nicht allein lückenhaft, sondern auch zum Theil unsicher geblieben. Mit Bestimmtheit nachgewiesen ist durch den Versuch von Pröscher die Bildung von Tyrosin, Leucin und Asparaginsäure, während die Entstehung des Phenylalanins nur durch eine recht unsichere Geruchsprobe, und die der Glutaminsäure durch die Isolirung einer minimalen Quantität eines salzsauren Salzes, das nicht einmal analysirt wurde, signalisirt werden konnte.

Ganz anders gestaltet sich das Resultat der Hydrolyse, wenn zur Isolirung der Monoaminosäuren die fractionirte Destillation der Ester verwendet wird. Mit Hülfe dieser Methode gelang es, in reinem Zustande Alanin, Leucin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Phenylalanin und  $\alpha$ -Pyrrolidincarbonsäure zu isoliren, und auch annähernd das Mengenverhältniss derselben zu bestimmen. Mit demselben Grade von Genauigkeit war es möglich, die Abwesenheit von Glycocoll festzustellen. Rechnet man dazu noch das von Pröscher nachgewiesene Tyrosin, so ergibt sich bereits die Anwesenheit von sieben Monoaminosäuren im Molekül des Globins. Da ausserdem noch Diaminosäuren vorhanden sind, wie Pröscher durch die Bildung eines Phosphorwolframsäureniederschlages nachgewiesen hat, und da auch das Vorhandensein von Oxyaminosäuren, auf die bisher nicht geprüft wurde, keineswegs unwahrscheinlich ist, so ergibt sich, dass in der That das Molekül des Globins eine ähnlich complicirte Zusammensetzung haben muss, wie man es für die nicht krystallisirbaren Proteinstoffe nach den hydrolytischen Spaltungsproducten bisher annahm.

1) Friedr. Pröscher. Ein Beitrag zur Erforschung der Constitution des Eiweissmoleküls. Diese Zeitschrift, Bd. XXVII, 1899, S. 114.

### Experimenteller Theil.

Für die Hydrolyse wurden 900 g Pferdeoxyhämoglobin, welches nach der Methode von Zinoffsky<sup>1)</sup> dargestellt und zweimal umkrystallisirt war, verwendet. Da der Wassergehalt 27,7% betrug, so entspricht die obige Menge 650,7 g trockenem Material. Dasselbe wurde mit 2700 g rauchender Salzsäure vom specifischen Gewicht 1,19 übergossen, 12 Stunden stehen gelassen, bis klare Lösung eingetreten war, und dann 6 Stunden am Rückflusskühler gekocht. Nachdem die Lösung bei 14 mm Druck zum dicken Syrup eingedampft war, wurde die Masse mit 2700 g absolutem Alkohol übergossen, mit gasförmiger Salzsäure gesättigt und zum Schlusse noch auf dem Wasserbade eine Stunde erhitzt. Auch hierbei erfolgte klare Lösung, welche mit der Veresterung der Aminosäuren Hand in Hand ging. Die Flüssigkeit war durch das Hämatin dunkelroth gefärbt. Um das bei der Veresterung entstehende Wasser möglichst zu entfernen, wurde die Lösung abermals unter vermindertem Drucke verdampft, dann wieder mit 2700 g absolutem Alkohol übergossen und mit Salzsäuregas gesättigt. Durch diese wiederholte Operation wird erfahrungsgemäss die Bildung der Ester vervollständigt. Nach 12stündigem Stehen theilt man zweckmässig die Flüssigkeit wegen der leichteren späteren Verarbeitung in vier Portionen, verdampft jede unter stark vermindertem Druck zum Syrup, und isolirt dann die Ester durch Zusatz von Aether, Kaliumcarbonat und sehr concentrirter Natronlauge unter sehr sorgfältiger Kühlung genau in der Art, wie es beim Casein<sup>2)</sup> und Leim beschrieben wurde.

Die fractionirte Destillation der Ester wurde zuerst unter einem Drucke von 12 mm aus dem Wasserbade und nachher bei einem Drucke von 0,2—0,5 mm anfangs wieder aus dem Wasserbade und später aus dem Oelbade ausgeführt, wobei folgende Fractionen resultirten:

1 C. Zinoffsky. Ueber die Grösse des Hämoglobinmoleküls. Diese Zeitschrift, Bd. X, 1886, S. 16.

2) l. c.

1.	Fraction bis 40°	(Temp. d. Dämpfe gemessen)	bei 12 mm Druck	26.0 g
2.	» 40—60°	( » » » » » )	bei 12 mm	57.5 »
3.	» bis 100°	( » des Wasserbades )	bei 0.2 mm <sup>1)</sup>	180.0 »
4.	» 100—130°	( » » Oelbades )	bei 0.5 mm	46.2 »
5.	» 130—160°	( » » » » » )	bei 0.5 mm	52.5 »

Fraction 3 wurde nochmals bei 12 mm Druck in folgende beide Theile geschieden:

3 a.	60—80°	(Temp. der Dämpfe gemessen)	bei 12 mm Druck	95.0 g
3 b.	80—100°	( » » » » » )	bei 12 mm	84.2 »

Die Untersuchung der einzelnen Fractionen geschah im Wesentlichen wie beim Casein und Leim.

Im Besonderen ist dazu Folgendes zu bemerken:

#### Fraction 1 (bis 40°.)

Dieselbe enthielt noch viel Alkohol und etwas Aether. Sie wurde zur Verseifung der Ester mit Salzsäure eingedampft. Von dem festen Rückstande dienten 2 g zur Prüfung auf Glycocoll. Sie wurden zu diesem Zwecke mit Alkohol und Salzsäure versetzt und nach Einimpfen eines Kryställchens von salzsaurem Glycocollester 24 Stunden bei 0° gehalten. Das Resultat war negativ.

Der Hauptbestandtheil der Aminosäuren war Alanin; welches nach der Entfernung der Salzsäure mit Bleioxyd und Fällung des gelösten Bleies im Filtrate mit Schwefelwasserstoff durch Krystallisation aus Wasser in reinem Zustande abgeschieden wurde. Die Menge betrug 4 g. Der Schmelzpunkt war 294° (uncorr.).

0.1467 g Substanz gaben 0,2178 g CO<sub>2</sub> und 0,1040 g H<sub>2</sub>O.

Berechnet für C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub>:

Gefunden:

40.45% C und 7.87% H

40.49% C und 7.94% H.

#### Fraction 2 (40—60°.)

Nachdem eine Probe auf Glycocoll auch hier negativ ausgefallen war, wurden die Ester durch Kochen mit der fünf-

1) Für die Destillation unter diesem geringen Drucke diente der in den Berichten der deutschen chem. Gesellschaft Jg. 35, 1902, S. 2158 beschriebene Vacuumapparat.

fachen Menge Wasser verseift, und die Aminosäuren durch Krystallisation aus Wasser getrennt. Isolirt wurden auf diese Weise Alanin und Leucin. Die Menge des ersteren betrug 10,5 g. Schmelzpunkt  $293^{\circ}$  (uncorr.).

0,2032 g Substanz gaben 0,3024 g  $\text{CO}_2$  = 40,58% C und 0,1465 g  $\text{H}_2\text{O}$  = 8,08% H.

Für die optische Bestimmung diente das salzsaure Salz, für welches gefunden wurde  $[\alpha]_D^{20} = +8,7$ . Es handelte sich mithin um das gewöhnliche d-Alanin, dem aber eine kleine Menge des Racemkörpers beigemischt war.

Leucin wurden erhalten 19,7 g.

### Fraction 3a (60—80°).

Nach der Verseifung mit Wasser wurden die Aminosäuren durch Krystallisation in der bekannten Weise getrennt und erhalten 60,0 g Leucin, 4,2 g Alanin und 7,5 g  $\alpha$ -Pyrrolidincarbonensäure.

Die Analysen des Leucins und seines Kupfersalzes gaben folgende Zahlen:

0,1511 g Substanz gaben 0,3047 g  $\text{CO}_2$  und 0,1348 g  $\text{H}_2\text{O}$ .

Berechnet für  $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_2$ :

Gefunden:

54,96% C und 9,92% H

54,99% C und 10,0% H.

0,1875 g Kupfersalz gaben 0,0459 g  $\text{CuO}$ .

Berechnet für  $\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_4\text{Cu}$ :

Gefunden:

19,60% Cu

19,63% Cu.

Der Schmelzpunkt wurde im geschlossenen Capillarrohre bei  $298^{\circ}$  (uncorr.) gefunden.

Die optische Untersuchung der salzsauren Lösung ergab, dass es sich um ein Gemisch von l-Leucin und racemischem Leucin handelte.

Die Pyrrolidincarbonensäure war zum grössten Theil racemisch. Zur Abtrennung der activen Säure diente, wie früher, das Kupfersalz. Analysirt wurde nur die racemische Verbindung und ihr Kupfersalz.

0,2011 g Substanz gaben 0,3836 g  $\text{CO}_2$  und 0,1417 g  $\text{H}_2\text{O}$ .

Berechnet für  $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_2$ :

Gefunden:

52,18% C und 7,83% H

52,02% C und 7,89% H.

0.2619 g lufttrocknes Kupfersalz gaben 0,0635 g CuO.

Berechnet für $C_{10}H_{16}O_4N_2Cu + 2 H_2O$ :	Gefunden:
19,36% Cu	19,32% Cu.

0.5118 g Substanz verloren bei 120° 0,0573 g H<sub>2</sub>O.

Berechnet für $C_{10}H_{16}O_4N_2Cu + 2H_2O$ :	Gefunden:
10,99% H <sub>2</sub> O	11,19% H <sub>2</sub> O.

Der Schmelzpunkt lag bei 207° (uncorr.).

#### Fraction 3b (80—100°).

Sie bestand im Wesentlichen aus denselben Producten, wie die vorhergehende Fraction. Isolirt wurden 50,5 g Leucin und 2,0 g  $\alpha$ -Pyrrolidincarbonsäure.

#### Fraction 4 (100—130°).

Sie enthielt die Ester von Phenylalanin, Glutaminsäure und Asparaginsäure. Für die Abtrennung des ersteren diente die früher angewandte Methode mit folgender Abänderung.

Das Estergemisch wird mit der fünffachen Menge Wasser versetzt, wobei fast vollständige Lösung eintritt, weil der Phenylalaninester durch die beiden anderen Ester in Wasser löslich gemacht wird. Man schüttelt dann die Flüssigkeit mit dem gleichen Volumen Aether. Dabei geht der Phenylalaninester so gut wie vollständig, die beiden anderen Ester dagegen nur in relativ kleiner Menge in den Aether über. Um diese letzteren zu entfernen, wird die abgetrennte ätherische Lösung drei Mal mit dem gleichen Volumen Wasser ausgeschüttelt. Die ätherische Lösung hinterlässt beim Verdampfen den Phenylalaninester frei von Glutaminsäure- und Asparaginsäureester und in nahezu quantitativer Menge. Zur Isolirung des Phenylalanins ist es am bequemsten, den Ester in starker Salzsäure zu lösen, auf dem Wasserbade abzudampfen und das zurückbleibende Hydrochlorat aus warmer starker Salzsäure umzukrystallisiren. Verdampft man das so isolirte Hydrochlorat mit überschüssigem Ammoniak auf dem Wasserbade, so bleibt ein Gemenge von Chlorammonium und Phenylalanin zurück, welches leicht durch kaltes Wasser zu trennen ist. Nach dem Umkrystallisiren aus Wasser gibt das Phenylalanin sofort die richtigen Analysenzahlen:

0.2023 g Substanz gaben 0,4868 g  $\text{CO}_2$  und 0.1219 g  $\text{H}_2\text{O}$ .

Berechnet für $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_2$ :	Gefunden:
65,45% C und 6,66% H	65,62% C und 6,75% H.

Der Zersetzungspunkt lag bei  $281^\circ$  (uncorr.).

Dieses Verfahren ist die bei weitem bequemste Methode, Phenylalanin zu erkennen, und gestattet, auch noch recht geringe Mengen dieser Aminosäure aus complicirten Gemischen zu isoliren.

Erhalten wurden aus dieser Fraction 8,5 g Phenylalanin.

Die vereinigten wässerigen Lösungen, welche den Asparaginsäure- und Glutaminsäureester enthielten, wurden mit einer concentrirten Lösung von Barythydrat im Ueberschusse zwei Stunden auf dem Wasserbade erwärmt und zur Krystallisation des asparaginsäuren Baryts mehrere Tage bei gewöhnlicher Temperatur aufbewahrt. Aus dem Filtrate des Barytsalzes wurde zuerst der Baryt mit Schwefelsäure quantitativ gefällt, dann eingedampft und aus der concentrirten Lösung die Glutaminsäure durch Einleiten von Salzsäuregas abgeschieden. Die aus dem umkrystallisirten Hydrochlorat isolirte Glutaminsäure betrug 6,9 g.

0.2005 g Substanz gaben 0.2991 g  $\text{CO}_2$  und 0.1080 g  $\text{H}_2\text{O}$ .

Berechnet für $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4$ :	Gefunden:
40,81% C und 6,12% H	40,68% C und 6,04% H.

Die Asparaginsäure findet sich zum Theil im unlöslichen Barytsalz, zum Theil in der salzsauren Mutterlauge, die nach der Ausfällung der Glutaminsäure bleibt. Aus dem Barytsalz gewinnt man sie durch einfache Zersetzung mit Schwefelsäure. Dagegen muss aus der salzsauren Mutterlauge die Mineralsäure durch Kochen mit Bleioxyd entfernt und das gelöste Blei aus dem Filtrate mit Schwefelwasserstoff gefällt werden. Die gereinigte Asparaginsäure gab folgende Zahlen:

0.2101 g Substanz gaben 0.2787 g  $\text{CO}_2$  und 0.0998 g  $\text{H}_2\text{O}$ .

Berechnet für $\text{C}_4\text{H}_7\text{NO}_4$ :	Gefunden:
36,09% C und 5,26% H	36,18% C und 5,33% H.

#### Fraction 5 (130—160°).

Sie wurde genau so verarbeitet, wie die vorhergehende Fraction. Sie gab noch 13,5 g Phenylalanin und etwas Aspa-

raginsäure, während Glutaminsäure hier nicht isolirt werden konnte. Aus Fraction 4 und 5 zusammen wurden 21,4 g Asparaginsäure erhalten.

Die Gesammtmenge der isolirten Monoaminosäuren betrug für 650,7 g trockenes Oxyhämoglobin:

	Berechnet:	
	in Gramm	in Procent
Alanin . . . . .	18,7	2,87
Leucin . . . . .	130,2	20,01
$\alpha$ -Pyrrolidincarbonsäure . . . . .	9,5	1,46
Phenylalanin . . . . .	22,0	3,38
Glutaminsäure . . . . .	6,9	1,06
Asparaginsäure . . . . .	21,4	3,29
In Summa . . . . .	208,7 g	32,07%

Nimmt man mit F. N. Schulz<sup>1)</sup> an, dass die Menge des Hämatins 4,2%, des Oxyhämoglobins des Pferdes beträgt, so berechnen sich für Globin die obigen Monoaminosäuren in folgender Art:

Alanin . . . . .	2,99%
Leucin . . . . .	20,88%
$\alpha$ -Pyrrolidincarbonsäure . . . . .	1,52%
Phenylalanin . . . . .	3,53%
Glutaminsäure . . . . .	1,11%
Asparaginsäure . . . . .	3,43%
In Summa . . . . .	33,46%

Es verdient noch bemerkt zu werden, dass diese Zahlen nur Minimalwerthe sind, da nicht allein bei der Isolirung der Ester, sondern auch bei der Trennung der Aminosäuren durch Krystallisation Verluste unvermeidlich sind. Wir schätzen den gesammten Verlust auf etwa  $\frac{1}{3}$  der Menge der Aminosäuren, die bei der Hydrolyse in Wirklichkeit entstehen.

Aus obigen Resultaten ergibt sich in Uebereinstimmung mit früheren Beobachtungen bei anderen Proteinstoffen, dass ausser  $\alpha$ -Pyrrolidincarbonsäure das Alanin und Phenylalanin regelmässige Bestandtheile des Proteinmoleküls sind. Ihnen begegnet man in der That häufiger als dem Tyrosin

1) l. c. S. 469.

und Glycocoll, die früher als besonders verbreitete Aminosäuren betrachtet wurden. Sie werden an biologischer Bedeutung nur übertroffen durch das Leucin, welches ebenso regelmässig in den Proteinstoffen vorhanden ist, aber an Menge in der Regel überwiegt.

Vielleicht erklärt sich das gemeinsame Vorkommen von Leucin und Alanin aus der Aehnlichkeit ihrer Zusammensetzung mit den Kohlenhydraten, denn das erstere kann man sich entstanden denken aus einer Hexose durch Zutritt von Ammoniak und partielle Reduction, während das Alanin das stickstoffhaltige Analogon der Milchsäure ist, die bekanntlich leicht aus den Hexosen durch Alkali oder Fermente entsteht. Will man diese Betrachtung auf Glutaminsäure und Asparaginsäure ausdehnen, so liegt der Gedanke am nächsten, dass sie aus dem Leucin durch nachträgliche Oxydation gebildet werden.

Grössere Schwierigkeiten macht die Ableitung des Phenylalanins, da die Bildung des Benzolkerns aus Kohlenhydratgruppen complicirtere chemische Vorgänge voraussetzt. Anders liegen die Verhältnisse wieder bei der  $\alpha$ -Pyrrolidincarbonsäure, deren chemische Verwandtschaft mit dem Ornithin und Arginin unverkennbar ist, und deren Auftreten unter den hydrolytischen Spaltungsproducten der Proteide auch in quantitativer Beziehung mit dem Vorhandensein der Diaminosäuren nach den bisherigen Beobachtungen zusammenfällt. Derartige Beziehungen weiter zu verfolgen, wird gewiss zu den künftigen chemischen Aufgaben der Biologie gehören.

Diese Untersuchung soll auf die Diaminosäuren und Oxyaminosäuren ausgedehnt werden.