

Hydrolyse des Edestins.

Von

Emil Abderhalden.

(Aus dem I. chemischen Institute der Universität Berlin)

(Der Redaction zugegangen am 5. März 1902.)

Es war im Anschluss an die vorliegenden Arbeiten über die Hydrolyse thierischer Eiweissstoffe durch Salzsäure von hohem Interesse, pflanzliche Eiweissstoffe nach ein und derselben Methode aufzuspalten. Als Ausgangsmaterial wurde das Edestin, der Haupteiweissbestandtheil des Hanfsamens, gewählt. Dasselbe lässt sich sehr leicht krystallisirt erhalten.¹⁾

500,0 g zweimal unkrystallisirtes Edestin wurden in der bekannten Weise mit rauchender Salzsäure hydrolysirt und hierauf verestert. Bei der Veresterung blieb ein in absolutem Alkohol unlöslicher Rückstand zurück. Derselbe bestand aus Chlorammonium und Glutaminsäurehydrochlorat. Seine Menge betrug 35,5 g. Zur Entfernung der Salzsäure wurde der Rückstand mit Bleioxyd gekocht, das gelöste Blei mit Schwefelwasserstoff entfernt. Es verblieben 11,5 g Glutaminsäure.

Bei der Destillation der Ester wurden folgende Fractionen erhalten:

1. Fraction:	bis 40° (Temp. der Dämpfe gemessen bei 10 mm. Druck)	12,0 g
2. „	40—60° („ „ „ „)	10 „ 36,0
3. „	bis 100° („ des Wasserbades)	0,2 „ 126,0
4. „	100—130° („ „ Oelbades)	0,2 „ 35,0
5. „	130—160° („ „ „)	0,2 „ 21,0

Die bei der Isolirung der Ester zurückbleibende dickflüssige, braun gefärbte Masse wurde in genau derselben Weise, wie dies beim Hämoglobin²⁾ beschrieben wurde, von den an-

1) Die Methode der Darstellung betreffend, vergl. R. Leipziger, Ueber Stoffwechselfersuche mit Edestin, Pflüger's Archiv, Bd. 78, 1899, S. 402. Das untersuchte Präparat hatte folgende Zusammensetzung: C 51,21, H 6,87, N 18,64, S 0,91.

2) Diese Zeitschrift, Bd. XXXVII, S. 485, 1903.

organischen Verbindungen befreit und die Mutterlauge wiederum verestert.

Die Destillation der Ester ergab folgendes Resultat:

1. Fraction:	bis 40° Temp. der Dämpfe gemessen bei 10 mm. Druck	8.0 g
2. "	40—60° " " " " " " " " " "	13.0 "
3. "	bis 100° (des Wasserbades) " " " " " "	51.0 "
4. "	100—130° " Ölbad) " " " " " "	14.5 "
5. "	130—160° (" " " " " " " " " "	11.5 "

Die aus den beiden Destillationen erhaltenen, einander entsprechenden Fractionen wurden nach erfolgter Verseifung vereinigt. Die einzelnen Fractionen ergaben folgende Resultate:

Fraction 1 (bis 40°).

Dieselbe wurde zur Verseifung der Ester mit Salzsäure eingedampft, der Rückstand mit Alkohol und Salzsäure versetzt. Nach dem Einimpfen eines Kryställchens von salzsaurem Glycocollester erfolgte nach 24stündigem Stehen im Eisschrank Krystallisation. Isolirt wurden aus dieser Fraction 8.2 g Glycocoll. In der Mutterlauge wurde die Salzsäure mit Bleioxyd und das Blei im Filtrat mit Schwefelwasserstoff entfernt. Durch Krystallisation aus Wasser wurde Alanin erhalten und zwar 6.0 g.

0.1315 g Substanz gaben 0.1953 g CO_2 und 0.0940 g H_2O .

Berechnet für $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2$:

Gefunden:

40.45% C und 7.87% H. 40.50% C und 8.01% H.

Schmelzpunkt: 293° (uncorr.).

Fraction 2 (40 bis 60°).

Durch fractionirte Krystallisation aus Wasser wurden erhalten 12.0 g Alanin, 10.8 g Glycocoll und 12.7 g Leucin.

0.1112 g Substanz gaben 0.1301 g CO_2 und 0.0662 g H_2O .

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

Gefunden:

32.00% C und 6.66% H. 31.90% C und 6.67% H.

Zersetzungspunkt: 242° (uncorr.).

Die optische Bestimmung des salzsauren Salzes ergab, dass ein Gemisch von d-Alanin und racemischem Alanin vorlag.

Fraction 3 (bis 100°).

Isolirt wurden 92.0 g Leucin und 8.6 g α -Pyrrolidincarbonsäure.

0.2112 g Substanz gaben 0.4259 g CO_2 und 0.1902 g H_2O .

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

Gefunden:

54.96% C und 9.92% H. 54.99% C und 10.09% H.

Schmelzpunkt: 297° (uncorr.).

Die optische Untersuchung der salzsauren Lösung ergab, dass ein Gemisch von l-Leucin und racemischem Leucin vorlag.

0.1009 g Substanz gaben 0.1927 g CO_2 und 0.0718 g H_2O .

Berechnet für $\text{C}_6\text{H}_9\text{NO}_2$:

Gefunden:

52.18% C und 7.83% H. 52.08% C und 7.97% H.

Schmelzpunkt: 208° (uncorr.).

Der bei weitem grösste Theil der Pyrrolidincarbonsäure war, wie das Verhalten des Kupfersalzes zeigte, racemisiert.

Fraction 4 (100 bis 130°).

Aus den entsprechenden Fractionen beider Destillationen wurde zunächst in der bekannten Weise der Phenylalaninester abgeschieden. Erhalten wurden 6,7 g Phenylalanin.

0.1225 g Substanz gaben 0.2942 g CO_2 und 0.0731 g H_2O .

Berechnet für $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_2$:

Gefunden:

65.45% C und 6.66% H. 65.49% C und 6.68% H.

Die übrigen Ester wurden in der üblichen Weise durch Kochen mit Baryt verseift, der ausgeschiedene asparaginsäure Baryt abfiltrirt und im Filtrat der Baryt mit Schwefelsäure quantitativ gefällt. Die Mutterlauge wurde auch hier in zwei Theilen verarbeitet. Aus dem einen Theil wurde Glutamin- und Asparaginsäure isolirt. Aus dem anderen Theil wurde das Serin als β -Naphthalinsulfoverbindung abgeschieden. Erhalten wurden 5,8 g Glutaminsäure, 6,1 g Asparaginsäure und 1,4 g β -Naphthalinsulfoserin = 0,5 g Serin.

Die Elementaranalysen dieser drei Verbindungen ergaben folgende Werthe:

0.1874 g Substanz gaben 0.2796 g CO_2 und 0.0101 g H_2O .

Berechnet für $\text{C}_5\text{H}_5\text{NO}_4$:

Gefunden:

40.81% C und 6.12% H. 40.68% C und 6.03% H.

0.2134 g Substanz gaben 0.2817 g CO_2 und 0.1010 g H_2O .

Berechnet für $\text{C}_4\text{H}_7\text{NO}_4$:

Gefunden:

36.09% C und 5.26% H. 36.09% C und 5.30% H.

0.1945 g Substanz gaben 0.3760 g CO_2 und 0.0781 g H_2O .

Berechnet für $C_{13}H_{13}C_5NS$:

52,88 % C und 4,41 % H.

Gefunden:

52,72 % C und 4,50 % H.

Schmelzpunkt: 213° (uncorr.).

Fraction 5 (130 bis 160°).

Diese Fraction wurde in genau derselben Weise verarbeitet, wie Fraction 4.

Es wurden erhalten 5,2 g Phenylalanin, 4,1 g Glutaminsäure, 5,2 g Asparaginsäure und 0,9 g β -Naphthalinsulfoserin — 0,32 g Serin.

Die bei der Destillation der Ester zurückbleibende, beim Erkalten erstarrende, hellgelb gefärbte Masse wurde in siedendem absoluten Alkohol gelöst. Beim Einengen und Erkalten der Lösung schieden sich voluminöse, büschelförmige Krystallmassen ab. Schmelzpunkt 302° (uncorr.). Die Reactionen und die Analyse ergaben, dass es sich um Leucinimid handelte. Gewonnen wurden 9,2 g.

0,1324 g Substanz gaben 0,3092 g CO_2 und 0,1137 g H_2O .

Berechnet für $C_{12}H_{22}N_2O_2$:

63,71 % C und 9,73 % H.

Gefunden:

63,69 % C und 9,62 % H.

Die bei der Ausätherung der Ester zurückbleibende, hauptsächlich aus Kalisalzen und den Diaminosäuren bestehende Masse wurde nach Entfernung aller anorganischen Verbindungen und nach mehrmaligem Eindampfen im Vacuum mit Wasser aufgenommen. ¹ 5 der gesammten Lösung wurde zur vollständigen Entfernung der Salzsäure mit Silbersulfat geschüttelt. Nach Entfernung des überschüssigen Silbers mit Schwefelwasserstoff, und nach Verjagen des letzteren wurde die Lösung mit Phosphorwolframsäure gefällt. Der abgesaugte Phosphorwolframsäureniederschlag wurde in der bekannten Weise mit Baryt zersetzt, und die Diaminosäuren nach Kossel isolirt. Gefunden wurden 1,0 g Lysin, 11,7 g Arginin und 1,1 g Histidin ¹⁾.

Das Filtrat vom Phosphorwolframsäureniederschlag wurde

¹⁾ E. Schulze und E. Winterstein fanden im Mittel 1,3 g Lysin, 11,7 g Histidin und 11,0 g Arginin. Ueber die Ausbeute an Hexonbasen, die aus einigen pflanzlichen Eiweissstoffen zu erhalten ist, Diese Zeitschrift, Bd. XXXIII, S. 547, 1901.

mit überschüssigem Baryt und Kohlensäure behandelt. Das Filtrat wurde nach quantitativer Fällung des Baryts im Vacuum eingeengt.

Es schieden sich hierbei Krystalle aus, welche sich als Tyrosin erwiesen. Erhalten wurden 0,5 g. Die Mutterlauge wurde weiter eingeengt. Nach mehrtägigem Stehen im Vacuum-exsiccator begann der hellbraun gefärbte Syrup zu krystallisieren.

0,1211 g Substanz gaben 0,2032 g CO_2 und 0,0752 g H_2O .

Berechnet für $\text{C}_9\text{H}_9\text{O}_3\text{N}$:

45,80% C. und 6,86% H.

Gefunden:

45,76% C. und 6,96% H.

Schmelzpunkt: 271° (uncorr.).

Isolirt wurden 2,0 g Oxy- α -Pyrrolidincarbonsäure.

Bestimmung des Tyrosins.

Das Tyrosin wurde in derselben Weise, wie beim Hämoglobin¹⁾ angegeben worden ist, bestimmt. Verwendet wurden 150,0 g Edestin. Isolirt wurden 3,2 g Tyrosin.

0,1111 g Substanz gaben 0,2428 g CO_2 und 0,0600 g H_2O .

Berechnet für $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_3$:

59,66% C. und 6,07% H.

Gefunden:

59,61% C. und 6,05% H.

Zersetzungspunkt: 315° (uncorr.).

Bestimmung des Cystins.

Zum Nachweis des Cystins dienten 200,0 g Edestin. Die Isolirung erfolgte in der beim Hämoglobin²⁾ angeführten Weise. Erhalten wurden 0,5 g Cystin.

0,1431 g Cystin gaben 0,2779 g BaSO_4 = 0,0382 g S.

Berechnet für $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{S}_2\text{O}_4$:

26,66% S.

Gefunden:

26,69% S.

Nachweis des Tryptophans.

Das Tryptophan konnte auch hier in analoger Weise, wie dies beim Hämoglobin geschildert wurde, festgestellt werden.

Erhalten wurden pro 100,0 g Edestin berechnet folgende Spaltungsproducte:

1) Diese Zeitschrift, Bd. XXXVII, S. 490, 1903.

2) Diese Zeitschrift, Bd. XXXVII, S. 491, 1903.

Glycocoll	3,8
Alanin	3,6
Leucin	20,9
α -Pyrrolidincarbonsäure	1,7
Phenylalanin	2,4
Glutaminsäure	6,3
Asparaginsäure	4,5
Cystin	0,25
Serin	0,33
Oxy- α -Pyrrolidincarbonsäure	2,0
Tyrosin	2,13
Lysin	1,0
Histidin	1,1
Arginin	11,7
Tryptophan	vorhanden
Summa	61,71 %.

Leucinimid wurden im Ganzen 1,8 % erhalten.

Auf der folgenden Tabelle sind die bei der hydrolytischen Spaltung des Oxyhämoglobins resp. Globins, des Edestins und des Serumalbumins erhaltenen pro 100,0 g berechneten Werthe zusammengestellt.

	Globin aus Oxyhämog- lobin	Serum- albumin	Edestin
Glycocoll	—	—	3,8
Alanin	4,19	2,68	3,6
Leucin	29,04	20,00	20,9
α -Pyrrolidincarbonsäure	2,34	1,04	1,7
Phenylalanin	4,24	3,08	2,4
Glutaminsäure	1,73	1,52	6,3
Asparaginsäure	4,43	3,12	4,5
Cystin	0,31	2,3	0,25
Serin	0,56	0,6	0,33
Oxy- α -Pyrrolidincarbonsäure	1,04		2,0
Tyrosin	1,33	2,1	2,13
Lysin	4,28		1,0
Histidin	10,96		1,1
Arginin	5,42		11,7
Tryptophan	vorhanden	vorhanden	vorhanden

Ein Blick auf die vorliegende Tabelle zeigt, dass die drei untersuchten Eiweisskörper qualitativ sehr ähnlich zusammengesetzt sind. Auch in quantitativer Beziehung finden sich grosse Uebereinstimmungen. Die Hauptmenge repräsentirt das Leucin. Sehr interessant ist das bedeutende Ueberwiegen des Phenylalanins über das Tyrosin. Die vorliegenden Untersuchungen zeigen ferner, dass Alanin, α -Pyrrolidincarbonsäure, Serin, Oxy- α -Pyrrolidincarbonsäure und Tryptophan ganz allgemein verbreitete Complexe des Proteinmoleküls sind.

Edestin und Oxyhämoglobin weichen ganz besonders in den Mengenverhältnissen der einzelnen „Hexonbasen“ von einander ab. Im Oxyhämoglobin prävalirt das Histidin, im Edestin das Arginin.

Oxyhämoglobin resp. Globin und Serumalbumin stehen einander sehr nahe. Die Aehnlichkeit der Zusammensetzung beider zeigt sich am besten, wenn den beim Serumalbumin erhaltenen Werten die auf die entsprechende Weise (nur einmalige Ausätherung der Ester) beim Globin erhaltenen Zahlen gegenübergestellt werden.

	Globin 1)	Serum- albumin
Alanin	2,99 %	2,68 %
Leucin	20,88 „	20,00 „
α -Pyrrolidincarbonsäure	1,52 „	1,04 „
Phenylalanin	3,53 „	3,08 „
Glutaminsäure	1,11 „	1,52 „
Asparaginsäure	3,43 „	3,12 „

Bestimmte Schlüsse auf einen eventuell directeren Zusammenhang von Globin und Serumalbumin lassen sich einstweilen, bei dem immer noch bedeutenden Procentsatze an noch nicht bekannten Bausteinen des Proteinmoleküls, nicht ziehen. Die grosse Aehnlichkeit in der Zusammensetzung der thierischen Eiweissstoffe — Globin und Serumalbumin — und der pflanzlichen Proteinstoffe einerseits und der bis jetzt untersuchten thierischen Eiweisskörper untereinander andererseits vereinfacht unsere Vorstellung über die Assimilation der Eiweissstoffe im thierischen Körper ganz wesentlich.

1) Emil Fischer und Emil Abderhalden, Hydrolyse des Oxyhämoglobins durch Salzsäure. Diese Zeitschrift, Bd. XXXVI, S. 275, 1902.