

Über das Nucleoproteid der Leber.

IV. Mitteilung.¹⁾

Von

J. Wohlgemuth.

(Aus dem chemischen Laboratorium des Pathologischen Instituts zu Berlin.)

Der Redaktion zugegangen am 20. April 1905.)

In dieser bereits angekündigten Mitteilung soll berichtet werden über die Mono- und Diaminosäuren, aus denen das Lebernucleoproteid im wesentlichen besteht. Eine solche Untersuchung erschien wünschenswert, einmal um überhaupt ein Urteil darüber zu bekommen, aus welchen Bausteinen die Kernsubstanz der Leber sich zusammenfügt, dann aber auch um die gefundenen Resultate mit denen an anderen Eiweißkörpern erhobenen vergleichen zu können.

Das zur Hydrolyse verwandte Präparat war der Rest von dem zur Bestimmung der Purinbasen dargestellten und stand mir in der Menge von 97 g zur Verfügung. Ihre prozentuale Zusammensetzung war folgende: C = 45,22%, H = 5,72%, N = 16,67%, P = 3,06%, S = 0,637%.

Diese Substanz wurde nach der Vorschrift von Kossel und Kutscher²⁾ mit dem dreifachen Gewicht Schwefelsäure (300 g) und dem sechsfachen Volumen Wasser (600 ccm) 9 Stunden lang am Rückflußkühler auf einem Baboblech erhitzt. Nach dieser Zeit war die gesamte Substanz in Lösung gegangen und die Biuretreaktion verschwunden. Aus dieser Lösung wurde die Schwefelsäure bis auf einen ganz geringen Rest mit Baryt ausgefällt und das Filtrat und sämtliche Waschwasser vor-

¹⁾ Frühere Mitteilungen siehe: 1. Diese Zeitschrift. Bd. XXXVII, S. 475 (1903); 2. Diese Zeitschrift. Bd. XLII, S. 519 (1904); 3. Berichte d. Deutsch. chem. Gesellsch., Bd. XXXVII, S. 4362 (1904).

²⁾ Kossel und Kutscher, Diese Zeitschrift, Bd. XXXI, S. 165.

sichtig auf dem Wasserbad eingeengt, bis sich Kristalle abschieden. Dieselben erschienen unter dem Mikroskop als typische Tyrosinnadeln. Nach 24stündigem Stehen in der Kälte war die Abscheidung von Tyrosin beendet: die Kristalle wurden scharf abgesaugt, mit kaltem Wasser und Alkohol gewaschen und zur Analyse aus verdünntem Ammoniak unter Zusatz von Knochenkohle umkristallisiert. Die Ausbeute betrug 3,5 g. Das Filtrat vom Tyrosin wurde mit konzentrierter Phosphorwolframsäurelösung im Überschuß versetzt, der Niederschlag abgesaugt und mit verdünnter Phosphorwolframsäure gewaschen. Niederschlag und Filtrat erfuhren dann weiter folgende Bearbeitung.

Niederschlag.

Derselbe wurde in der üblichen Weise mit Baryt zerlegt und der Baryt durch Einleiten von Kohlensäure entfernt. Zur Eliminierung der Purinbasen wurde alsdann das Filtrat mit Salpetersäure schwach angesäuert und mit Silbernitratlösung in geringem Überschuß versetzt. Die Fällung wurde nicht weiter berücksichtigt, das Filtrat dagegen mit H_2S entsilbert und abermals mit Phosphorwolframsäure gefällt. Der Niederschlag wurde wiederum mit Baryt zerlegt und der Baryt durch Kohlensäure niedergeschlagen. In der hieraus resultierenden Lösung mußten die Hexonbasen enthalten sein. Die Trennung der einzelnen Körper von einander geschah so, daß zunächst das Histidin als Quecksilbersalz isoliert wurde. Zu dem Zwecke wurde die Flüssigkeit mit H_2SO_4 leicht angesäuert und dann mit der nach Vorschrift von Kossel und Patten¹⁾ hergestellten Quecksilbersulfatlösung in hinreichender Menge versetzt. Nach 24stündigem Stehen wurde der Niederschlag abgesaugt und mit 5%iger H_2SO_4 mehrmals gewaschen. Alsdann wurde er mit H_2S zersetzt und die hieraus resultierende Lösung bis auf ein kleines Volumen eingeengt. Der in ihm enthaltene N betrug — nach Kjeldahl in einem aliquoten Teil zuvor bestimmt — im ganzen 0,1938 g. Danach berechnet sich die Histidinemenge auf 0,723 g. Aus der zum Sirup eingeengten Lösung

¹⁾ Kossel und Patten, Diese Zeitschrift, Bd. XXXVIII, S. 39.

schieden sich beim längeren Stehen im Exsikkator zahlreiche Kristalle ab, die ganz die Form zeigten, wie sie Kossel¹⁾ für das Histidin beschreibt. Da es nicht gelang, sie von der Mutterlauge befriedigend zu trennen, wurde die ganze Fraktion noch einmal mit Phosphorwölframsäure gefällt und nach Zerlegung durch Baryt mit Quecksilberchlorid behandelt. Beim Zersetzen des Quecksilberniederschlags ging leider die ganze Substanz durch einen Unfall verloren.

Das Filtrat von der Quecksilbersulfatfällung wurde durch H_2S von dem in der Lösung enthaltenen Quecksilber befreit, die Schwefelsäure mittels Baryt ausgefällt und der Baryt durch Kohlensäure vollkommen entfernt. Die Trennung des Arginins und Lysins geschah nun so, daß zunächst das Lysin mittels alkoholischer Pikrinsäurelösung als Pikrat isoliert wurde: es resultierten ca. 3,5 g. Daraus ergibt sich die Menge der freien Diaminosäure zu 1,08 g. Das Pikrat kristallisierte nach zweimaligem Umkristallisieren in schönen glänzenden Nadeln aus.

0.1511 g Substanz gaben 23.9 ccm N (17°, 764 mm)

Gefunden: N = 18.46%

$C_6H_{14}N_2O_2 \cdot C_6H_2(NO_2)_3 \cdot (OH)$ Berechnet: N = 18.67%

Aus dem Filtrat der Lysinfraktion wurde in der üblichen Weise die in Lösung gegangene Pikrinsäure entfernt, und nachdem es durch Kochen mit Knochenkohle von den letzten Beimengungen befreit war, wurde in ihm der N-Gehalt nach Kjeldahl bestimmt. Er berechnete sich für die gesamte Flüssigkeitsmenge 1,0334 g N. Das entspricht einem Arginingehalt von 3,38 g. Das Arginin wurde nach der Vorschrift von Steudel²⁾ als Pikrolonat isoliert: schon nach einmaligem Umkristallisieren gelangte man zu einem kristallinen Produkt.

0.1623 g Substanz gaben 35.2 ccm N (17°, 760 mm)

Gefunden: N = 25.18%

$C_6H_{14}N_4O_2 \cdot C_{10}H_8N_4O_5$ Berechnet: N = 25.57%³⁾

¹⁾ Kossel, Diese Zeitschrift, Bd. XXII, S. 285.

²⁾ Steudel, Diese Zeitschrift, Bd. XXXVII, S. 219, und Bd. XLIV, S. 157. Die Pikrolonsäure habe ich zu einem verhältnismäßig geringen Preise von Dr. Schuchardt-Görlitz bezogen.

³⁾ Der N-Gehalt berechnet sich für 1 Mol. Arginin + 2 Mol. Pikrolonsäure zu 25.26%.

Es waren somit in 95 g Leberprotein enthalten 0,723 g Histidin(?), 1,08 g Lysin und 3,38 g Arginin, vorausgesetzt natürlich, daß sich die nach Kjeldahl bestimmten N-Mengen allein auf Hexonbasen beziehen, und daß nicht durch die Anwesenheit noch bisher unbekannter basischer Spaltprodukte die Werte wesentlich beeinflusst worden sind.

Filtrat.

Dasselbe wurde zunächst von der gelösten Phosphorwolframsäure durch Baryt befreit und der Überschuß von Baryt quantitativ mittels H_2SO_4 entfernt. Filtrat und Waschwasser wurden auf dem Wasserbad bis zum Sirup eingedunstet und der Kristallisation überlassen. Nach 48 Stunden war fast die ganze Masse kristallinisch erstarrt. Sie wurde scharf abgesaugt, mit wenig Eiswasser und mit 60°-igem Alkohol gewaschen. Unter dem Mikroskop betrachtet, bestand sie aus typischen Leucinkugeln. Nach einmaligem Umkristallisieren aus Wasser unter Zusatz von Knochenkohle resultierten 6,0 g Leucin. Ein Teil des Materials wurde zur Darstellung des Kupfersalzes verwandt und das Salz, um auf die Anwesenheit von Isoleucin zu prüfen, nach Ehrlich¹⁾ mit Methylalkohol am Rückflußkühler gekocht: es ging aber nichts in Lösung.

0,2779 g Substanz lieferten 0,0688 g $CuO = 19,77\% Cu$
 $(C_6H_{12} \cdot NO_2)_2Cu$ Berechnet: $Cu = 19,62\%$.

II.

Das Filtrat der Leucinkristallisation nebst Waschwässern wurde auf ein kleines Volumen eingedunstet und nach der Vorschrift von Emil Fischer²⁾ verestert. Zu diesem Zweck wurde der dunkelbraune, sirupöse Rückstand in 500 ccm absolutem Alkohol gelöst und in einem Kolben mit gasförmiger Salzsäure, zuletzt unter Erwärmen auf dem Wasserbad gesättigt. Da bei der Veresterung wieder erhebliche Mengen von Wasser entstehen und diese die Reaktion, wie bekannt, wesentlich

¹⁾ Ehrlich, Ber., Bd. XXXVII, S. 1821.

²⁾ Emil Fischer, Diese Zeitschrift, Bd. XXXIII, S. 151 (1901).

beeinträchtigen, wurde unter vermindertem Druck eingedampft, der Rückstand abermals in 500 ccm absolutem Alkohol gelöst und mit Salzsäure gesättigt. Um eine möglichst günstige Ausbeute zu erzielen, wurde diese Prozedur im ganzen fünfmal vorgenommen. Beim Verdampfen des Alkohols im Vacuum begann die Auskristallisation von salzsaurem Glykokollester, die nach mehrstündigem Stehen beendet zu sein schien. Die Kristalle wurden abfiltriert, mit Alkohol gewaschen und dann in Wasser gelöst. Nach der in der üblichen Weise vorgenommenen Verseifung wurde in der Lösung die HCl mittels Bleikarbonat entfernt, das gelöste Blei durch H_2S ausgefällt und das Glykokoll als Cu-Salz isoliert.

0.2669 g Substanz lieferten 0.1013 g $CuO = 30.31\%$ Cu
 0.1922 „ „ „ 0.1579 „ CO_2 und 0.0676 g H_2O

Gefunden: 22.41% C; 3.91% H; 30.31% Cu

$C_8H_4NO_2Cu$ Berechnet: 22.7% C; 3.78% H; 30.02% Cu

Ausbeute: 0.85 g Cu-Salz = 0.6 g freies Glykokoll.

Das alkoholische Filtrat des salzsauren Glykokollesters wurde zur Destillation der übrigen in ihm noch enthaltenen Ester gänzlich von Alkohol befreit, der Rückstand mit 500 ccm Wasser aufgenommen, unter sorgfältiger Kühlung mit der erforderlichen Menge Natronlauge, dann mit Kaliumkarbonat versetzt und dieses ganze Gemisch mit 500 ccm Äther gründlich durchgeschüttelt. Die Extraktion mit der gleichen Menge Äther geschah dreimal, wobei stets noch etwas festes Kaliumkarbonat zugegeben wurde. Die vereinigten ätherischen Auszüge wurden nach Vorschrift 5 Minuten mit Kaliumkarbonat geschüttelt, dann abgossen und ca. 12 Stunden mit frisch gekühltem Natriumsulfat getrocknet. Nachdem der größte Teil des Äthers durch Destillation entfernt war, wurde der Rückstand bei 14 mm Druck zuerst im Wasserbad, dann über freier Flamme abdestilliert. Die Destillation der Ester ergab folgende Fraktionen:

Fraktion I: von 35—65° = 3 g
 „ II: „ 65—100° = 5 „
 „ III: „ 100—130° = 6 „
 „ IV: „ 130—160° = 5 „

Fraktion I.

wurde durch 6stündiges Kochen mit der 20fachen Menge Wasser verseift, dann die in ihr enthaltene Säure als Kupfersalz isoliert. Sie kristallisierte nach 2maligem Umkristallisieren in glänzenden Prismen und Plättchen, ganz wie das Alaninkupfer, und gab auch für diese Verbindung stimmende Analysenwerte.

0.2456 g Substanz	lieferten	0.0833 g CuO
0.2112 g	»	0.2301 g CO ₂ + 0.1007 g H ₂ O
	Gefunden:	26.68% Cu
		29.77% C
		5.3% H
C ₆ H ₁₂ N ₂ O ₄ Cu	Berechnet:	26.51% Cu
		30.06% C
		5.01% H

Ausbeute: 2.72 g Alaninkupfer = 2.0 g Alanin.

Fraktion II.

Das Produkt wurde mit der 10fachen Menge Wasser 8 Stunden am Rückflußkühler gekocht und, um die in ihm enthaltenen Säuren ebenfalls als Cu-Salze zu isolieren, nach starker Verdünnung mit Kupferkarbonat erhitzt. Vom überschüssigen Cu-Karbonat wurde abfiltriert, das Filtrat zur Trockne eingedampft und das trockne Pulver mit Methylalkohol im Soxhletapparat extrahiert: dabei ging der größte Teil in Lösung. Der Rückstand erwies sich als Leucinkupfer,

0.2779 g Substanz	gaben	0.0688 g CuO
	Gefunden:	19.77% Cu

C₁₂H₂₄N₂O₄ Cu Berechnet: 19.62% Cu,

während das aus dem methylalkoholischen Auszug isolierte Salz α -prolinsaures Kupfer war. Es kristallisierte in schönen Drusen erst nach längerem Stehen im Exsikkator.

0.2644 g Substanz	gaben	0.0722 g CuO
-------------------	-------	--------------

0.1666 g	»	0.2508 g CO ₂ + 0.0899 g H ₂ O
----------	---	--

Gefunden: 21.81% Cu; 41.05% C; 5.6% H

C₁₀H₁₆O₄N₂Cu Berechnet: 21.63% Cu; 41.16% C; 5.49% H.

Da das Kupfersalz in Methylalkohol löslich war,¹⁾ haben wir es mit der aktiven Form des α -Prolins zu tun:

Ausbeute: 0.82 g Cu-Salz = 0.65 g freie Säure.

¹⁾ Emil Fischer, l. c.

Fraktion III.

Das Estergemisch wurde zunächst mit Wasser versetzt und die wässrige Lösung mit Äther extrahiert. Der Ätherextrakt wurde zusammen mit der nächsten Fraktion verarbeitet, während die in Lösung gebliebenen Ester auf dem Wasserbad in der üblichen Weise mit Barytwasser verseift wurden. Nachdem der Baryt zuerst mit Kohlensäure und der Rest quantitativ mittels H_2SO_4 ausgefällt war, wurde das Filtrat eingeeengt und aus der stark konzentrierten Lösung die Glutaminsäure durch Einleiten von Salzsäuregas als Hydrochlorat abgeschieden.

0,1771 g Substanz gaben 0,2117 g CO_2 + 0,0872 g H_2O

Gefunden: 32,61% C; 5,58% H

$C_5H_{10}NO_4Cl$ Berechnet: 32,76% C; 5,47% H.

Ausbeute: 1,24 g Glutaminchlorhydrat = 1,0 g Glutaminsäure.

Das Filtrat des Glutaminsäurechlorhydrats wurde durch Kochen mit Bleikarbonat von der Mineralsäure befreit und das gelöste Blei aus dem Filtrat mit Schwefelwasserstoff entfernt. Aus der zurückbleibenden Flüssigkeit konnte ein schwerlösliches Kupfersalz in geringer Menge gewonnen werden, das nach der Analyse als asparaginsaures Kupfer anzusprechen war.

0,1881 g Substanz gaben 0,2038 g CO_2 + 0,0553 g H_2O

Gefunden: 29,55% C; 3,82% H

$C_5H_{12}N_2O_8Cu$ Berechnet: 29,68% C; 3,71% H.

Ausbeute: 0,25 g asparaginsaures Cu = 0,2 g Asparaginsäure.

Fraktion IV.

Zur Trennung des Phenylalaninesters von den andern leicht löslichen Verbindungen wurde das Gemisch mit der siebenfachen Menge kalten Wassers geschüttelt, das ausgeschiedene Öl durch Filtration abgetrennt, nochmals gewaschen und mit dem ätherischen Auszug der vorigen Fraktion vereinigt. Die Verseifung des Esters geschah mittels Barytwasser und war nach mehrstündigem Erhitzen auf dem Wasserbad beendet. Aus der wässrigen Lösung, die vorher vom Baryt quantitativ durch H_2SO_4 befreit war, gelang es indes nicht, ein kristallinisches Produkt darzustellen. Daß der Sirup eine nicht unbeträchtliche Menge von Phenylalanin enthielt, dafür sprach der stark positive Ausfall der Probe mit Kaliumbichromat und Schwefel-

säure. — Das Filtrat vom Phenylalaninester wurde durch zwei-stündiges Kochen mit Baryt verseift; beim Einengen und Erkalten schied sich ein schwerlösliches Barytsalz in kleinen Plättchen nach Art des glutaminsauren Baryts ab. Eine Analyse konnte bei der geringen Menge nicht ausgeführt werden.

Rückstand.

Beim Überdestillieren der Ester war im Destillationskolben ein Rückstand verblieben, aus dem beim Erhitzen über 160° sich kein Destillat ohne Zersetzung mehr austreiben ließ. Aus diesem war es nach Verseifen des Rückstandes mit Baryt gelungen, zwei Säuren zu isolieren, denen man bisher unter den Eiweißspaltprodukten noch nicht begegnet war, und die mit den neuerdings von Skraup¹⁾ beschriebenen in eine Gruppe gehören, die Oxyaminokorksäure $C_8H_{15}NO_5$ und die Oxydiaminosebazinsäure $C_{10}H_{20}N_2O_5$.²⁾ Beide wurden als Kupfersalze gewonnen, die erste allerdings nur in so geringer Menge, daß sie gerade zur Analyse reichte, die andere dagegen in solcher Ausbeute, daß aus dem Rest des Kupfersalzes die freie Säure kristallinisch dargestellt und analysiert werden konnte. Aus dem Verhältnis von N : Cu : C ist zu schließen, daß es sich in beiden Fällen um Körper der aliphatischen Reihe handelt. Es ist bereits an anderer Stelle über diese beiden Säuren berichtet worden und muß bezüglich der Isolierung und der analytischen Belege auf jene Mitteilung³⁾ verwiesen werden. Hinsichtlich der Oxydiaminosebazinsäure können die bisher gegebenen Daten noch erweitert werden. Sie liefert mit Phosphorwolframsäure eine Fällung, die sich jedoch schon im geringsten Überschuß glatt löst, gibt eine schwache, aber deutliche Pyrrolreaktion und ist völlig geschmacklos. Den mir noch zur Verfügung stehenden Rest von ca. 0,1 g benutzte ich zur Darstellung der Phenyleyanatverbindung. Zu dem Zweck

¹⁾ Skraup, Diese Zeitschrift, Bd. XLII, S. 274 (1904).

²⁾ Die Bezeichnung ist nur auf Grund der Zusammensetzung der Säuren gewählt; ihre Konstitution ist unbekannt. Ich hoffe demnächst über letztere berichten zu können.

³⁾ s. Berichte, Bd. XXXVII, S. 4362 (1904).

wurde die Säure in NaOH gelöst und mit der berechneten Menge Phenylecyanat unter ständiger Kühlung geschüttelt. Vom entstandenen Diphenylharnstoff wurde abfiltriert und aus dem Filtrat durch Zusatz von Salzsäure der neue Körper ausgefällt. Die schneeweiße Verbindung wurde zur Reinigung einmal in Alkohol gelöst und durch Zusatz von Wasser zur Abscheidung gebracht. Dabei gelangte man zu einem schön kristallinischen Produkt, dessen lange rhombische Nadeln holzscheitförmig übereinander gelagert waren. Schmelzpunkt 206° .

0,1065 g Substanz gaben 10,5 ccm N (18° , 760 mm)

Gefunden: N = 11,39%

$C_{24}H_{30}N_4O_7$ Berechnet: N = 11,52%

Ausbeute der Oxydiaminosebazinsäure: 1,5 g Cu-Salz = 1,2 g freie Säure
 „ Oxyaminokorksäure: ca. 0,5 „ = 0,38 „

Ergebnisse.

Wenn wir die Resultate sämtlicher am Leberproteid vorgenommenen Spaltungsversuche noch einmal kurz zusammenfassen, so ist es gelungen, folgende 18 Produkte aus ihm zu isolieren: 1-Xylose, Xanthin, Hypoxanthin, Guanin, Adenin, Histidin(?), Arginin, Lysin, Tyrosin, Leucin, Glykokoll, Alanin, α -Pyrrolidinkarbonsäure, Glutaminsäure, Asparaginsäure, Phenylalanin, Oxyaminokorksäure, Oxydiaminosebazinsäure. Und damit ist sicherlich die Reihe der einzelnen Bausteine, aus denen sich das Nucleoproteid zusammenfügt, noch lange nicht erschöpft. Z. B. konnte bei diesen Spaltungsversuchen gar nicht berücksichtigt werden der schwefelhaltige Komplex, der nach dem Prozentgehalt des Schwefels zu schließen (0,637%) ganz beträchtlich sein dürfte, ferner aus Mangel an Material die neuerdings in verschiedenen Nucleinsäuren entdeckten Körper wie Uracil, Thymin und Cytosin, von denen der eine oder andre aller Wahrscheinlichkeit nach sich auch im Leberproteid finden dürfte. Immerhin geben die bisher isolierten Produkte wenigstens annähernd ein Bild von der Zusammensetzung des Leberproteids. — Was die gefundenen Mengen anbetrifft, so bedeuten dieselben für Histidin und Arginin aus bereits oben angedeuteten Gründen

Maximalwerte, für alle übrigen Spaltprodukte dagegen Minimalwerte. So darf man beispielsweise annehmen, daß die Ausbeute an Glutaminsäure eine weit größere gewesen wäre, wenn man den sonst üblichen Weg der spontanen Auskristallisation eingeschlagen hätte. Am deutlichsten wird der Unterschied der beiden Methoden speziell für diesen Punkt klar, wenn man vergleicht den hohen Wert, den Kutscher¹⁾ für den Gehalt des Thymushistons an Glutaminsäure angibt, und den geringen, den Abderhalden und Rona²⁾ bei der an dem nämlichen Körper angewandten Estermethode gefunden haben. Während Kutscher eine Ausbeute von 3,66% Glutaminsäure erzielt hat, geben die beiden andern Autoren 0,53%, also nur den 7. Teil an! Und dasselbe gilt gewiß für so manches andre Spaltprodukt.

Um so überraschender ist der verhältnismäßig hohe Gehalt an Oxysäuren, speziell an Oxydiaminosebazinsäure, der noch sogar die Glutaminsäuremenge übersteigt. Es muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben, zu entscheiden, ob speziell diese Säure, der man bisher noch niemals unter den Eiweißspaltprodukten begegnet ist, sich nicht auch in andern Eiweißkörpern derselben Kategorie findet. In erster Linie würde man zu diesen Untersuchungen heranziehen müssen die Nucleoproteide andrer Organe und ferner die Histone. Vielleicht, daß sie in all jenen Körpern anzutreffen ist, in denen auch sonst basische Bestandteile in mehr oder minder großer Menge vorhanden sind. Sie würde dann in dieser Hinsicht dem α -Prolin ähneln, das von Emil Fischer³⁾ zuerst im Casein nachgewiesen und von dem er gezeigt hat, daß seine Menge dem Gehalt an Diaminosauren parallel zu gehen pflegt. Auch für das Leberprotein konnte dieser Satz Emil Fischers⁴⁾ durch das Auffinden von α -Prolin bestätigt werden.

¹⁾ Kutscher, Diese Zeitschrift, Bd. XXXVIII, S. 111 (1899).

²⁾ Abderhalden u. Rona, Diese Zeitschrift, Bd. XLI, S. 278 (1904).

³⁾ Emil Fischer, l. c.

⁴⁾ Emil Fischer, Diese Zeitschrift, Bd. XXXVI, S. 276 (1902).