

# Zur Kenntnis der aus Ricinussamen darstellbaren Eiweißsubstanzen.

Von

**E. Winterstein.**

(Aus dem agritektur-chemischen Laboratorium des Polytechnikums in Zürich.)

(Der Redaktion zugegangen am 28. April 1905.)

Wie von E. Schulze und mir<sup>1)</sup> nachgewiesen worden ist, bildet sich in den Keimpflanzen der Ricinussamen Ricinin  $C_8H_8N_2O_2$ . Da es für möglich erklärt werden muß, daß die Bildung dieser Base mit dem Abbau der Eiweißstoffe während des Vorgangs der Keimung zusammenhängt, so war es von Interesse, zu untersuchen, ob unter den Spaltungsprodukten, die man bei Hydrolyse der aus Ricinussamen darstellbaren Eiweißstoffe andere eigentümliche Stickstoffverbindungen erhält. Die von mir in dieser Richtung ausgeführten Versuche führten in der Tat zur Auffindung einer Stickstoffverbindung, welche in ihrer Zusammensetzung mit derjenigen des Lysins übereinstimmte, in dem Verhalten aber in einigen Punkten vom Lysin nicht unwesentlich abwich.

Durch Extraktion der entfetteten Ricinussamen mit verdünnter Lauge gehen größere Mengen von Eiweißsubstanzen in Lösung, es wurde daher zur Darstellung der Eiweißsubstanzen die Methode von Ritthausen benutzt. Ich verfuhr wie folgt: die grob gemahlene Samen wurden mit Äther möglichst vollständig entfettet, der dabei verbliebene Rückstand nochmals zerkleinert, in mehrere große Zylinder verteilt und mit 0,2%iger Lauge 24 Stunden digeriert, die trübe Flüssigkeit wurde durch Dekantation vom Rückstand getrennt und letzterer so oft mit verdünnter Lauge (0,5%) behandelt, bis eine Probe der Lösung

<sup>1)</sup> Über das Vorkommen von Ricinin in jungen Ricinuspflanzen, diese Zeitschrift, Bd. LXIII, S. 211.

mit Essigsäure keine Fällung mehr gab. Da die Filtration der alkalischen Flüssigkeit nicht durchführbar war, wurde diese trübe Lösung mit Essigsäure angesäuert, der Niederschlag auf ein Filter gesammelt, mit Wasser wiederholt ausgewaschen und dann mit absolutem Alkohol und Äther entwässert. Es resultierte so ein hellgraues, zerreibliches Pulver.

200 g dieser Substanz wurden durch 8stündiges Kochen mit konzentrierter Salzsäure zersetzt, die braune Zersetzungsflüssigkeit mit Wasser verdünnt und mit ca. 50 ccm konzentrierter Phosphorwolframsäurelösung versetzt, die dabei entstandene dunkle Fällung wurde durch Filtration von der nur noch schwach gefärbten Flüssigkeit getrennt und letzterer so viel Phosphorwolframsäurelösung zugefügt, bis auf weiteren Zusatz erst nach einiger Zeit eine Fällung auftrat. Diese Fällung wurde nach 2tägigem Stehen von der Flüssigkeit getrennt. Ehe ich nun die Darstellung der Base beschreibe, will ich nur einige Worte über die Verarbeitung des aminosäurehaltigen Filtrats mitteilen. Die saure Lösung wurde zunächst auf dem Wasserbade konzentriert, wobei sich eine große Menge von kristallinen Phosphorwolframaten ausschied, welche von der Flüssigkeit getrennt und mit Wasser etwas ausgewaschen wurden. Diese kristallinen Wolframate lösten sich zum großen Teil in Alkohol auf: der im Alkohol unlösliche Rückstand und der im Alkohol lösliche wurden getrennt in bekannter Weise mit Baryt zersetzt, der gelöste Baryt mit Schwefelsäure quantitativ ausgefällt, die Flüssigkeiten beinahe zur Trockne eingedunstet: die ausgeschiedenen Kristalle wurden auf Tonplatten von der geringen Menge Mutterlauge befreit, es resultierten weiße glänzende Blättchen, die vorläufig nicht weiter untersucht wurden. Die von den kristallinen Wolframatn getrennte saure Flüssigkeit wurde in der Wärme mit Baryt schwach alkalisch gemacht, die farblose Lösung von dem schwach blau gefärbten Niederschlag getrennt, letzterer sodann mit viel Wasser ausgekocht, auf der Nutsche abgesogen und gut ausgewaschen, die Lösung wurde durch Schwefelsäure vom gelösten Baryt befreit und zur Sirupkonsistenz eingedunstet. Der schwach gelb gefärbte Sirup wurde nun nach der Methode von E. Fischer verestert.



Bei der Destillation der erhaltenen Ester unter einem Drucke von 8 mm wurden 4 Fraktionen erhalten, welche beim Verseifen Aminosäuren lieferten, die allem Anschein nach die bekannten Monoaminosäuren einschlossen.

Was nun die Verarbeitung des Phosphorwolframsäure-niederschlags anbelangt, so ist folgendes anzugeben. Die Zersetzung dieser gut mit 5%iger Schwefelsäure ausgewaschenen Fällung geschah in bekannter Weise mit Baryt: um die großen Mengen Ammoniak, die bei dieser Eiweißzersetzung auftraten, auszutreiben, wurde während 48 Stunden ein starker Luftstrom durch die Basenlösung durchgeleitet, so daß eine herausgenommene abfiltrierte Probe mit Nesslerischem Reagens nur noch eine schwache Gelbfärbung gab. Die Flüssigkeit wurde nun vom Niederschlag abgesogen, letzterer mit Wasser verrieben und wieder abgenutscht, die vom Baryt befreite Basenlösung wurde mit Salpetersäure neutralisiert und die Basen nach der Methode von Kossel und Kutscher getrennt. Zur Reindarstellung des Histidins fällte ich die beim Zersetzen des Histidinsilberniederschlags mit Schwefelwasserstoff erhaltene konzentrierte Lösung mit Mercurisulfat nach den Angaben von Kossel und Patten<sup>1)</sup> aus; trotzdem ich, wie bemerkt, bei dieser Ausfällung eine sehr konzentrierte Lösung verwendete und die mit Quecksilbersulfat versetzte Lösung längere Zeit stehen ließ, enthielt doch die vom Quecksilbersulfat getrennte Flüssigkeit eine beträchtliche Menge einer Base, welche daraus in folgender Weise isoliert wurde. Aus der Lösung wurde das Quecksilber mit Hilfe von Schwefelwasserstoff und die Schwefelsäure durch Baryt quantitativ ausgefällt,<sup>2)</sup> die farblose Basenlösung wurde mit Salzsäure neutralisiert und zur Kristallisation eingedunstet, aus dem Sirup schieden sich allmählich lange von Mutterlauge durchsetzte Nadeln aus. Ob hier der Ausfällung entgangenes Histidin oder ob eine vom letzteren verschiedene Base vorlag, vermag ich zur Zeit noch nicht zu sagen.

Die Lysinfraktion behandelte ich in etwas anderer Weise, als es von Kossel und Kutscher angegeben ist. Die Flüssig-

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXXVIII, S. 41.

<sup>2)</sup> Der Niederschlag wurde mit heißem Wasser gut ausgewaschen.

keit, in welcher das Lysin enthalten sein mußte, wurde mit Salzsäure ganz schwach sauer gemacht und bis zur Sirupkonsistenz eingedunstet: nach längerem Stehen über Natronkalk erstarrte die Masse nahezu vollständig, sie wurde nun wiederholt mit Methylalkohol ausgekocht, wobei der größte Teil in Lösung ging: die methylalkoholische Lösung gab nach dem Eindunsten Kristalle, die sich als Lysinchlorid erwiesen. Dasselbe wurde durch sein charakteristisches Platindoppelsalz identifiziert. Das in Methylalkohol unlösliche Chlorid hatte ein etwas anderes Aussehen, als das gewöhnliche Lysinchlorid, es bestand aus kugligen Aggregaten. Die Quantität der in beschriebener Weise isolierten Substanz betrug 0,3 g: da diese Quantität für eine weitere Untersuchung nicht ausreichte, wurden noch ca. 300 g Eiweiß in gleicher Weise und ferner 150 g durch Kochen mit Schwefelsäure nach Kossel und Kutscher zersetzt. Im letzteren Falle trennte ich das Arginin und Histidin mit Silbernitrat und Baryt, ohne vorhergehende Fällung der Basen mit Phosphorwolframsäure: ich erhielt nun 0,8 g Substanz, welche noch kleine Menge Ammonchlorid einschlossen. Die Gesamtmenge wurde in möglichst wenig Wasser gelöst, mit einer absolut alkoholischen Lösung von Platinchlorid versetzt, wobei einige Milligramme Ammoniumplatinchlorid sich ausschieden, welche von der Flüssigkeit getrennt wurden: aus der verschlossen aufbewahrten Lösung schied sich auch auf Zusatz von absolutem Alkohol kein weiteres Platindoppelsalz aus, auf Zusatz von Äther entstand eine sirupöse Ausscheidung, die Lösung trocknete im Exsikkator zu einer amorphen elastischen Masse ein. Diese wurde in Wasser gelöst, durch Schwefelwasserstoff vom Platin befreit, die saure Lösung eingedunstet und über Natronkalk aufgestellt, bis nur noch eine kleine Menge Mutterlauge verblieb, die ausgeschiedenen Kristalle wurden auf einer Tonplatte von der Mutterlauge befreit und einmal aus Wasser umkristallisiert.

Die so erhaltene Substanz besaß folgende Eigenschaften. Sie war optisch aktiv. Bei der Bestimmung des spezifischen Drehungsvermögens erhielt ich folgendes Ergebnis. Eine wässrige Lösung der Substanz, welche in 10 ccm 0,6 g ent-



hielt, drehte im 200 mm Rohr  $4,5^\circ$  nach rechts, daraus berechnet sich  $(\alpha)_D = + 12,9^\circ$ . Die wässrige Lösung zeigte folgende Reaktionen:

Phosphorwolframsäure . . .	Weißer, im Überschuß unlösliche, beim Erwärmen lösliche Fällung.
Phosphormolybdänsäure . .	Gelbliche Fällung, von gleichem Verhalten wie obige.
Pikrinsäure . . . . .	)
Goldchlorid . . . . .	)
Platinchlorid . . . . .	)
Quecksilberchlorid . . . .	)
Mercurisulfat . . . . .	)
Gerbsäure . . . . .	)
Gerbsäure + Natronlauge . .	Amorphe Fällung.
Kaliumquecksilberjodid . . .	)
Neflers Reagens . . . . .	Weißer Fällung.
Quecksilberchlorid + Lauge .	» »
Kaliumwismuthjodid . . . .	Zinnoberrote, stark glänzende kristallinische Fällung.

Bei der Analyse der über Natronkalk getrockneten Substanz<sup>1)</sup> erhielt ich folgende Zahlen:

0,1464 g Substanz <sup>2)</sup>	gaben 0,1800 g CO <sub>2</sub> und 0,0947 g H <sub>2</sub> O
Daraus berechnet sich ein Gehalt von 33,54% C und 7,24% H	
0,0979 g Substanz	gaben 11,5 ccm Gas bei 19° und 711 mm = 12,8% N
0,0942 »	» » » 10,95 » » » 19° » 730 » = 12,8% N
0,1130 »	» » » 0,1486 g AgCl = 32,38% Cl.

Diese Zahlen stimmen mit Ausnahme des Kohlenstoffgehaltes sehr gut auf Lysindichlorid.

Berechnet für C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> · 2 HCl:	Gefunden:
C = 32,90%	C = 33,54%
H = 7,38%	H = 7,24%
N = 12,81%	N = 12,80%
Cl = 32,36%	Cl = 32,38%

Bedenkt man, daß die Kohlenstoffbestimmung von chlorhaltigen Substanzen etwas zu hoch ausfallen kann — wegen Substanzmangels wurde die Analyse nicht wiederholt —, so ist

<sup>1)</sup> Hierzu wurde die bei Polarisation benutzte Lösung eingedunstet.  
<sup>2)</sup> Die Substanz wurde mit Bleichromat unter Vorlegung einer Kupfer- und Silberspirale verbrannt.

man auf Grund des Analysenergebnisses wohl berechtigt, anzunehmen, daß die in beschriebener Weise isolierte Substanz ein Isomeres des Lysins<sup>1)</sup> ist. Das erhaltene Dichlorid weicht allerdings nur im Verhalten gegenüber Platinchlorid, mit welchem kein kristallinisches Doppelsalz erhalten werden konnte, und ferner im Verhalten gegenüber Kaliumwismuthjodid ab: mit letzterer Verbindung gibt das salzsaure Salz eine in sechsseitigen Täfelchen kristallisierende dunkelrote, diamantglänzende Doppelverbindung. Die kristallinische Fällung tritt noch bei Anwendung von einem Milligramm Substanz sofort auf. Die Substanz weicht ferner noch im Schmelzpunkt vom Lysin-dichlorid ab. Während das gewöhnliche Lysindichlorid bei 194° schmilzt, begann das in beschriebener Weise von mir dargestellte schon bei 155° zu sintern und schmolz bei 160°, bei 162° trat Aufschäumen ein.

Zur Isolierung des in Lede stehenden Körpers benutzte ich Methylalkohol, in welchem das sauer reagierende Dichlorid des Lysins unlöslich ist. Wie eben gesagt, wurde die aus der Lysinfraktion erhaltene Basenlösung mit Salzsäure bis zur schwach sauren Reaktion versetzt: daher war es möglich, daß nicht alles vorhandene Lysin in das Dichlorid verwandelt wurde: da aber das neutral reagierende Monochlorid des Lysins im Methylalkohol sich nicht löst, so muß es für wahrscheinlich erklärt werden, daß der beim Behandeln der Chloride mit Methylalkohol verbliebene Rückstand noch etwas Lysinchlorid einschloß. Der größte Teil aber bestand wohl aus einem in seinen Reaktionen vom Lysin abweichenden Körper. Wäre dies nicht der Fall gewesen, so würde ich nicht schon mit einem Milligramm dieses Rückstandes die charakteristische rote kristallinische Fällung mit Kaliumwismuthjodid erhalten haben.

Ich habe eine ganze Reihe Lysine verschiedener Herkunft bezüglich des Verhaltens gegenüber Kaliumwismuthjodid geprüft und mich dabei überzeugt, daß keines derselben mit dem genannten Reagens eine Fällung gibt. Ich bin den Herren Kossel.

<sup>1)</sup> Kutscher und Lohmann weisen in ihrer Arbeit über die Pankreasselbstverdauung auf die Existenz verschiedener Lysine hin. Diese Zeitschrift, Bd. XLI (1904), S. 339. Siehe auch Bd. XLIV, S. 383.



Kutscher, Siegfried, Abderhalden zu großem Dank für die Zusendung einiger Lysinpräparate verpflichtet, insbesondere aber möchte ich Herrn Dr. Schenk für die Überlassung einer größeren Kollektion von Lysinpräparaten verschiedener Herkunft meinen besten Dank aussprechen.

Die weitere Fortführung der Untersuchung dieses Körpers dürfte aber vielleicht deshalb auf Schwierigkeiten stoßen, als man so geringe Ausbeuten der bezüglichen Substanz erhält. Der Weg, um diese in ihrem Verhalten vom Lysin abweichende Substanz vom letzteren vollständig zu trennen, ist durch das Verhalten der beiden Chloride gegen Kaliumwismuthjodid gegeben. Ich würde diesen Weg schon eingeschlagen haben, wenn ich genügend Substanz zur Verfügung gehabt hätte.

Ich erwähne noch, daß ich behufs Abkürzung der Darstellung des in Rede stehenden Körpers in einem Falle wie folgt verfuhr: Ein Kilogramm entschälter Ricinussamen wurden entfettet, fein gemahlen, mit Wasser, um das Ricinin zu entfernen, ausgekocht, der nun verbliebene Rückstand mit Salzsäure gekocht und im weiteren, wie oben angegeben, verfahren. Ich erhielt dabei aber kein Chlorid, welches mit Kaliumwismuthjodid eine Fällung gab.

Vielleicht findet sich dasselbe in den in Wasser löslichen Eiweißsubstanzen, welche sich beim Eindunsten des wässerigen Extraktes allmählich ausschieden.

Übrigens sei noch darauf aufmerksam gemacht, daß die aus verschiedenen Mustern der gleichen Samenarten dargestellten Eiweißpräparate auch bei gleicher Behandlung zuweilen recht verschiedene Ausbeuten an einzelnen Basen geben. Während z. B. die aus Erbsen darstellbare Eiweißsubstanz, das Legumin, in einem Falle 5% Lysin gab, lieferte ein aus einer anderen Erbsensorte dargestelltes Eiweißpräparat bei der in gleicher Weise ausgeführten Spaltung nur ungefähr 2% Lysin.

Das von mir aus den Ricinussamen mit Natronlauge isolierte Eiweißpräparat enthielt nur 13.6% Stickstoff: es ist denkbar, daß dasselbe noch kleine Mengen Kohlenhydrate einschloß, welche durch die Natronlauge in Lösung gegangen waren. Dieses Eiweißpräparat lieferte beim Zersetzen mit Säuren größere Aus-

beuten an Arginin, als andere aus Pflanzensamen darstellbare Eiweißsubstanzen; in einem Falle betrug die Ausbeute an Arginin 16,6%. Im Einklang mit diesen hohen Ausbeuten an Arginin steht auch der große Gehalt an Stickstoff, welcher in den Phosphorwolframsäureniederschlag eingeht; dieser auf den «Huminstickstoff», den Ammoniakstickstoff und die Basen entfallende Stickstoff betrug 39% des Gesamtstickstoffs des in beschriebener Weise isolierten Eiweißpräparates.