

# Beitrag zur Kenntnis der Zusammensetzung des Conglutins aus Samen von *Lupinus*.

Von

Emil Abderhalden und J. B. Herrick, Chicago.

(Aus dem I. Chemischen Institut der Universität Berlin.)

(Der Redaktion zugegangen am 23. Juli 1905.)

Im Vergleich zu den bis jetzt untersuchten Eiweißkörpern schien es uns nicht ohne Interesse, Vertreter weiterer Gruppen von Pflanzeneiweißstoffen zu untersuchen, speziell auch in Hinsicht auf Fragen nach der Bildung und Umwandlung der Eiweißstoffe im pflanzlichen Organismus. Die Methode der Veresterung der Aminosäuren kombiniert mit der direkten Bestimmung der entweder direkt oder durch charakteristische Verbindungen isolierbaren Eiweißabbauprodukte (Glycocoll als Glycocollesterchlorhydrat, Glutaminsäure als Chlorhydrat, Tyrosin und die basischen Spaltprodukte) wird ohne Zweifel bei der systematischen Untersuchung der Eiweißstoffe von Samen und Keimlingen verschiedenen Alters uns einen Einblick in die sich vollziehenden Umwandlungen und damit in den Eiweiß-Ab- und -Aufbau der Pflanze geben. Untersuchungen in dieser Richtung sind bereits im Gange.

Zu der vorliegenden Hydrolyse diente nach Ritthausen aus Lupinensamen dargestelltes, sorgfältig gereinigtes Eiweiß. Es gilt für diesen, unter dem Namen Conglutin bekannten Eiweißkörper, wie überhaupt für fast alle und vielleicht auch für alle bis jetzt untersuchten Eiweißsubstanzen die Bemerkung, daß irgendwelche Kriterien für die Einheitlichkeit des angewandten Produktes nicht vorhanden sind. Der untersuchte Eiweißkörper ist nur charakterisiert durch seine Darstellungsmethode und seine Herkunft.

Bei der Spaltung des Conglutins durch rauchende Salzsäure wurden mit Hilfe der Estermethode isoliert: Glycocoll, Alanin, Leucin, Aminovaleriansäure, Prolin, Phenylalanin, Asparaginsäure und Glutaminsäure. Tyrosin wurde in einer Probe durch Hydrolyse mit 25%iger Schwefelsäure ebenfalls nachgewiesen, seine Menge jedoch nicht bestimmt: ebenso wurde auf Cystin auch nur qualitativ in einer Probe der mit kochender Salzsäure hergestellten Hydrolysenflüssigkeit geprüft. Ferner wurde eine Probe des Conglutins in Wasser suspendiert und mit Toluol und Pankreassaft 10 Tage im Brutraum aufbewahrt. Sie gab mit Bromwasser ausgesprochene Tryptophanreaktion. Von E. Schulze und E. Winterstein sind früher<sup>1)</sup> schon im Conglutin Histidin (0,63%), Arginin (6,9%) und Lysin (2,1%) nachgewiesen worden.

Es zeigt sich auch hier, daß das Conglutin dieselben Spaltprodukte aufweist, wie alle bis jetzt untersuchten komplizierten Eiweißarten. Es wird von Interesse sein, die Zusammensetzung des Conglutins speziell, was die Mengenverhältnisse der einzelnen Aminosäuren anbetrifft, mit anderen auf dieselbe Art dargestellten Eiweißstoffen aus Samen anderer Pflanzenarten zu vergleichen. Herr Dr. Boris Babkin wird demnächst über die Zusammensetzung des Legumins berichten.

In der vorliegenden Untersuchung wurden 400 g asche- und wasserfreies Conglutin aus Lupinensamen (der Wassergehalt des verwendeten Materiales betrug 8% und sein Aschegehalt 0,65%) mit der dreifachen Menge rauchender Salzsäure am Rückflußkühler 6 Stunden gekocht. Es fand fast keine Ausscheidung von «Melaninen» statt. Die Hydrolysenflüssigkeit wurde nun, wie üblich, eingedampft, der Rückstand mit absolutem Alkohol übergossen, gasförmige, trockene Salzsäure bis zur Sättigung eingeleitet, und dieser letztere Prozeß nach jedesmaligem Eindampfen der Flüssigkeit unter vermindertem Druck und einer 40° nicht übersteigenden Temperatur noch zweimal

<sup>1)</sup> E. Schulze und Winterstein: Über die Ausbeute an Hexonbasen, die aus einigen pflanzlichen Eiweißstoffen zu erhalten ist. Diese Zeitschrift, Bd. XXXIII, S. 547. 1901.

wiederholt. Die Ester wurden in der bekannten Weise in Freiheit gesetzt. Die Destillation der Ester ergab folgende Fraktionen:

Fraktion I.	0— 60°	des Wasserbades	und 12 mm Druck	=	18,4 g
» II.	60—100°	»	» 12 »	=	33,8 »
» III.	100—105°	» Ölbades	» 0,6 »	=	44,7 »
» IV.	105—200°	»	» 0,6 »	=	112,0 »

Im Destillationskolben verblieb eine beim Abkühlen völlig festwerdende dunkelbraun gefärbte, zähe Masse. Ihr Gewicht betrug 77 g.

Die einzelnen Fraktionen wurden in der üblichen Weise durch fraktionierte Kristallisation, Darstellung von Kupfersalzen usw. zerlegt.

#### Fraktion I.

Sie bestand zum größten Teil aus Alkohol. Sie wurde mit dem gleichen Volumen konzentrierter Salzsäure übergossen und auf dem Wasserbad völlig zur Trockene verdampft. Der kristallinische Rückstand wurde mit 10 cem absolutem Alkohol übergossen und bis zur völligen Sättigung trockenes Salzsäuregas eingeleitet. Nach dem Abkühlen der Flüssigkeit wurde ein Kriställchen von Glycocollesterchlorhydrat eingetragen. Nach kurzer Zeit erfolgte beim Stehen auf Eis reichliche Kristallisation. Die Menge des isolierten Glycocols (umgerechnet vom Glycocollesterchlorhydrat) betrug 2,5 g. Das Filtrat vom Glycocollesterchlorhydrat wurde in der üblichen Weise durch Kochen mit gelbem Bleioxyd von der Salzsäure befreit. Es enthielt Alanin vom Schmelzpunkt 293° (korr.). Seine Menge betrug 2,0 g.

#### Fraktion II.

Sie wurde nach der Verseifung durch 7stündiges Kochen mit dem sechsfachen Volumen Wasser am Rückflußkühler auf dem Wasserbade eingeengt, bis reichliche Kristallisation erfolgte. Die Mutterlauge der ersten Kristallisation wurde unter vermindertem Druck und einer 40° nicht übersteigenden Temperatur völlig zur Trockene verdampft. Der Rückstand wurde zur Gewinnung des Prolins mit absolutem Alkohol ausgekocht, und der alkoholische Auszug mit dem bei der Fraktion III er-

haltenen vereinigt. Der in Alkohol unlösliche Teil wurde in Wasser heiß gelöst und in der üblichen Weise durch fraktionierte Kristallisation in die einzelnen Komponenten zerlegt. Die erste aus Wasser erhaltene Kristallisation bestand aus reinem Leucin. Isoliert wurden: 12,5 g Leucin, 5 g Alanin, 2,5 g Amino-valeriansäure und 0,75 g Glycocoll. Letzteres wurde aus einer der gesamten Fraktion aliquoten Menge als Esterchlorhydrat isoliert. Das isolierte Leucin schmolz gegen  $297^{\circ}$  (korr.).

0,1641 g Substanz gaben	0,1423 g H <sub>2</sub> O	und	0,3299 g CO <sub>2</sub>
Berechnet für C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub> :	Gefunden:		
54,96% C und 9,92% H.	54,83%	C und	9,77% H.

Das bei  $293^{\circ}$  (korr.) schmelzende Alanin gab folgende Zahlen:

0,1839 g Substanz gaben	0,2728 g CO <sub>2</sub>	und	0,1273 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.	40,45%	C und	7,69% H.

Aminoisovaleriansäure:

0,1120 g Substanz gaben	0,2102 g CO <sub>2</sub>	und	0,0961 g H <sub>2</sub> O
Berechnet für C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub> :	Gefunden:		
51,28% C und 9,40% H.	51,10%	C und	9,53% H.

Glycocollesterchlorhydrat:

0,1835 g Substanz gaben	0,2298 g CO <sub>2</sub>	und	0,1230 g H <sub>2</sub> O
Berechnet für C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> NO <sub>2</sub> Cl:	Gefunden:		
34,43% C und 7,18% H.	34,16%	C und	7,48% H.

### Fraktion III.

Sie wurde nach Verseifung mit Wasser unter vermindertem Druck völlig zur Trockene verdampft, und der Rückstand mit absolutem Alkohol ausgekocht. Der so erhaltene alkoholische Auszug wurde mit dem entsprechenden Extrakte aus Fraktion II vereinigt und unter vermindertem Druck die ganze Flüssigkeit zur Trockene verdampft, der Rückstand nochmals in absolutem Alkohol gelöst, vom ungelöst Gebliebenen abfiltriert, und das Filtrat nochmals eingedampft. Der verbleibende Rückstand wurde nunmehr in Wasser gelöst, die wässrige Lösung mit überschüssigem Kupferoxyd gekocht, vom ungelöst gebliebenen Kupferoxyd abfiltriert, und das Filtrat zur Kristallisation eingeengt. Das so erhaltene Prolinkupfer entsprach einer

Menge von 10,5 g  $\alpha$ -Pyrrolidincarbonsäure. Die Trennung in die aktive und racemische Form erfolgte, wie üblich, durch Auskochen mit absolutem Alkohol.

1,2210 g racemisches Prolinkupfer verloren bei 120° 0,1360 g H<sub>2</sub>O  
 = 11,13% H<sub>2</sub>O.

Berechnet für C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>O<sub>4</sub>N<sub>2</sub>Cu + 2 H<sub>2</sub>O : 10,99% H<sub>2</sub>O.

0,1250 g bei 120° getrocknetes Prolinkupfer ergaben 0,0341 g CuO  
 = 0,0272 Cu = 21,7% Cu.

Berechnet für C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>O<sub>4</sub>N<sub>2</sub>Cu : 21,8% Cu.

Aus dem in absolutem Alkohol unlöslichen Teil wurden durch fraktionierte Kristallisation 14,5 g Leucin, 3 g Alanin, 2 g Aminoisovaleriansäure erhalten.

#### IV. Fraktion.

Diese Fraktion, die die Ester der Glutaminsäure, der Asparaginsäure und des Phenylalanins und höchst wahrscheinlich des Serins enthielt, wurde, wie bereits wiederholt geschildert, zunächst vom Phenylalaninester befreit, und die übrigen Ester mit Baryt verseift. Vom Phenylalanin wurden 12,5 g erhalten.

0,1509 g Substanz gaben 0,3612 g CO<sub>2</sub> und 0,0895 g H<sub>2</sub>O.

Berechnet für C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub>:

Gefunden:

65,45% C und 6,66% H.

65,28% C und 6,59% H.

Aus der mit Baryt verseiften Lösung fiel beim längeren Stehen asparaginsaurer Baryt in Kristalldrüsen aus. Durch Umsetzen mit Schwefelsäure wurden 2 g reine Asparaginsäure gewonnen:

0,1800 g Substanz gaben 0,2380 g CO<sub>2</sub> und 0,0877 g H<sub>2</sub>O.

Berechnet für C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>O<sub>4</sub>N:

Gefunden:

36,09% C und 5,26% H.

36,06% C und 5,41% H.

Das Filtrat vom asparaginsauren Baryt wurde mit Schwefelsäure quantitativ vom Baryt befreit, stark eingedampft, mit Salzsäuregas gesättigt und in der Kälte mehrere Tage aufbewahrt. Die ganze Masse hatte sich in einen dicken Kristallbrei verwandelt. Auf freie Glutaminsäure berechnet, betrug die Ausbeute 22,0 g.

0,1855 g Substanz gaben 0,2752 g CO<sub>2</sub> und 0,1009 g H<sub>2</sub>O.

Berechnet für C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>4</sub>:

Gefunden:

40,81% C und 6,12% H.

40,47% C und 6,08% H.

Aus der Mutterlauge des Glutaminsäurechlorhydrates wurde durch Kochen mit Bleioxyd die Salzsäure entfernt und aus der filtrierten, vom gelösten Blei befreiten Lösung durch Einengen noch 10 g Asparaginsäure gewonnen. Aus dem Filtrat der Asparaginsäure wurde durch weiteres Einengen eine süß schmeckende Verbindung isoliert, welche beim Erhitzen im Kapillarrohr sich von 215° an bräunte und bei 240° (korr.) völlig geschmolzen war. Offenbar lag Serin vor. Leider gab die Analyse keine gut stimmenden Werte.

#### Destillationsrückstand.

Der Destillationsrückstand wurde, wie bereits wiederholt beschrieben, mehrere Stunden mit Baryt am Rückflußkühler gekocht, dann der Baryt quantitativ mit Schwefelsäure entfernt, und das Filtrat vom Baryumsulfat stark eingeeengt. Hierbei schied sich eine schwer lösliche, dem Leucin ähnliche Verbindung ab, welche auch das charakteristische blaßblaue Kupfersalz des Leucins gab. Durch Einleiten von gasförmiger Salzsäure in die konzentrierte Lösung und nach längerem Stehen auf Eis wurde eine reichliche Kristallisation von Glutaminsäurechlorhydrat erhalten. Auf Glutaminsäure umgerechnet betrug die Ausbeute 4,2 g. Das Filtrat des Glutaminsäurechlorhydrates wurde durch Kochen mit Bleioxyd von der Salzsäure befreit. Es enthält die Mutterlauge der Glutaminsäure neben geringen Mengen von Asparaginsäure, Produkte, welche weder selbst kristallisieren, noch gut kristallisierbare Derivate z. B. Kupfersalze geben. Diese Produkte sind regelmäßig bei fast allen ausgeführten Hydrolysen von Eiweißkörpern beobachtet worden, ohne daß es uns bis jetzt gelungen wäre, diese höchst wahrscheinlich sekundär entstandenen Produkte so charakterisieren zu können, daß eine genaue Definition derselben möglich gewesen wäre, obwohl wiederholt Analysenresultate erhalten worden sind, welche wohl Berechnungen zuließen. Da jedoch jede Gewähr für eine Einheitlichkeit dieser Produkte und jeder Einblick in ihre Entstehungsart fehlt, haben wir es unterlassen, Schlüsse aus unseren Analysen zu ziehen.

Berechnet man die gefundenen Mengen an Aminosäuren auf 100 g reines Conglutin, so erhält man folgende Werte:

Glycocoll	0.8 %
Alanin	2.5 %
Aminovaleriansäure	1.1 %
Leucin	6.75 %
Prolin	2.6 %
Phenylalanin	3.1 %
Glutaminsäure	6.5 %
Asparaginsäure	3.0 %

Nachschrift: Nach Abschluß dieser Untersuchung ist eine denselben Eiweißkörper betreffende Arbeit von E. Winterstein und E. Pantanelli<sup>1)</sup> erschienen, deren Resultate mit den unsrigen übereinstimmen. Eine Ausnahme macht nur das Glycocoll, das die genannten Autoren vermißten.

---

<sup>1)</sup> E. Winterstein und E. Pantanelli. Über die bei der Hydrolyse der Eiweißsubstanz der Lupinensamen entstehenden Monoamino-säuren. Diese Zeitschrift, Bd. XLV, S. 61, 1905.