

Die Monoaminosäuren des kristallisierten Eieralbumins.

Von

Emil Abderhalden und **Fritz Pregl**, Graz.

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

(Der Redaktion zugegangen am 2. August 1905.)

Zu der vorliegenden Untersuchung wurde dreimal unkristallisiertes, nach der durch F. G. Hopkins und S. N. Pinkus¹⁾ modifizierten Methode von Hofmeister²⁾ dargestelltes Eieralbumin verwendet. Zur möglichsten Befreiung von Salzen wurde das Eieralbumin koaguliert und mehrere Tage gegen laufendes Wasser dialysiert. Bei der Hydrolyse mit Säure sind isoliert worden: Alanin, Leucin, α -Pyrrolidinkarbonsäure, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Phenylalanin, Tyrosin und Cystin. Das Vorhandensein von Aminovaleriansäure konnte nicht ganz exakt erwiesen werden. Phenylalanin und Prolin waren im nicht kristallisierten Eieralbumin bereits von E. Fischer³⁾ nachgewiesen worden, Cystin und Tyrosin von K. A. Mörner⁴⁾ im kristallisierten Eieralbumin. Im Vergleich zum bereits untersuchten Serumalbumin⁵⁾ ist es

¹⁾ F. G. Hopkins und S. N. Pinkus. Bemerkungen über die Kristallisation tierischer Albuminstoffe, *Journal of Physiol.*, Bd. XXIII, S. 130, 1898.

²⁾ Franz Hofmeister, Über die Darstellung von kristallisiertem Eieralbumin und die Kristallisierbarkeit kolloidaler Stoffe, *Diese Zeitschrift*, Bd. XIV, S. 165, 1889, und Über die Zusammensetzung des kristallinen Eieralbumins, *Ebenda*, Bd. XVI, S. 187, 1891.

³⁾ Emil Fischer, Über die Entstehung von α -Pyrrolidinkarbonsäure und Phenylalanin bei der Hydrolyse des Eieralbumins, *Diese Zeitschrift*, Bd. XXXIII, S. 412, 1901.

⁴⁾ K. A. H. Mörner, Zur Kenntnis der Bindung des Schwefels in den Proteinstoffen, *Diese Zeitschrift*, Bd. XXXIV, S. 207, 1901.

⁵⁾ Emil Abderhalden, Hydrolyse des kristallisierten Serumalbumins aus Pferdeblut, *Diese Zeitschrift*, Bd. XXXVII, S. 495, 1903.

von Interesse, daß auch hier Glycocoll nicht aufgefunden werden konnte. Offenbar liegt hier ein dieser Gruppe von Eiweißkörpern gemeinsames Verhalten vor.

Experimenteller Teil.

480 g lufttrockenes, mehrmals umkristallisiertes Eialbumin, mit einem Wassergehalt von 14.99% und einem Aschengehalt von 0.58%, wurden mit 1500 ccm rauchender Salzsäure übergossen und nach eingetretener Lösung 6 Stunden am Rückflußkühler gekocht. Nach dem Einengen der Flüssigkeit im Vacuum bis zur Sirupkonsistenz wurde dieser Rückstand mit 1500 ccm absolutem Alkohol übergossen und bis zur Sättigung gasförmige trockene Salzsäure eingeleitet. Nach nochmaliger Veresterung wurden die Ester in der üblichen Weise in Freiheit gesetzt und in 8 l Äther aufgenommen. Nach dem Abdestillieren des Äthers verblieben 328 g Rohester.¹⁾ Bei der Destillation im Vacuum ergaben sich folgende Fraktionen:

1. Fraktion	bis 60° (Temperatur des Wasserbades)	bei 11 mm Druck	48 g
2.	60 - 100° (" " " ")	11 "	40 "
3.	" 107° (" " Ölbad)	0.5 "	50 "
4.	107 - 170° (" " " ")	0.5 "	75 "

Gewicht der abdest. Ester 213 g

Der bald zum Teil kristallinisch erstarrende, braune Destillationsrückstand wog 103 g, er, sowie die erhaltenen Esterfraktionen wurden sofort in folgender Weise verarbeitet.

1. Fraktion.

Sie wurde durch 8stündiges Kochen mit der 5fachen Menge Wasser am Rückflußkühler verseift und lieferte nach

¹⁾ Das ätherische Destillat wurde mit wässriger Salzsäure ausgeschüttelt, diese dann vom Äther getrennt, zur Trockene verdampft und der sehr geringe Rückstand mit absolutem Alkohol übergossen, und nun bis zur Sättigung trockene gasförmige Salzsäure eingeleitet. Auch nach längerem Stehen auf Eis und Impfen eines Kriställchens von Glycocoll-esterchlorhydrat erfolgte keine Kristallisation. Wir haben besonders sorgfältig auf Glycocoll geprüft, weil das nicht durch Kristallisation gereinigte, »gewöhnliche« Eialbumin Glycocoll enthält.

dem Abdampfen eine Kristallisation im Gewichte von 5,9 g, welche aus fast reinem Alanin bestand. $F = 296^\circ$ (korr.).

0,1978 g Substanz gaben 0,1398 g H_2O und 0,2930 g CO_2	
Berechnet für $C_3H_7NO_2$:	Gefunden:
40,42% C, 7,92% H.	40,40% C, 7,90% H.

Zur Prüfung auf Glycocolle wurde sowohl ein Teil der aus der ersten Esterfraktion erhaltenen Kristallisation, als auch die letzte zur Trockene verdampfte Mutterlauge, die sich bei der Reinigung des Alanins ergab, mit Alkohol und gasförmiger Salzsäure verestert. Nach dem Impfen eines Kriställchens von Glycocollesterchlorhydrat und nach mehrtägigem Stehen im Eisschranke trat keine Kristallisation ein.

2. Fraktion.

Sie wurde wie die erste Esterfraktion verseift und zur Trockene abgedampft. Nach dem Auskochen mit Alkohol wog die kristallinische Masse der Aminosäuren 24 g. Durch fraktionierte Kristallisation aus Wasser konnten daraus geringe Mengen (2,1 g) Leucin ($F = 297^\circ$) (korr.) und als Hauptmenge Alanin (21,0 g) isoliert werden.

Das isolierte Leucin hatte folgende Zusammensetzung:

0,1454 g Substanz lieferten 0,2927 g CO_2 und 0,1288 g H_2O	
Berechnet für $C_6H_{13}NO_2$:	Gefunden:
54,92% C, 9,99% H.	54,90% C, 9,91% H.

3. Fraktion.

Das nach dem Verseifen, Abdampfen und Auskochen mit Alkohol erhaltene Aminosäurengemisch lieferte neben 27 g Leucin 6 g Alanin. Aminovaleriansäure konnte mit völliger Sicherheit nicht nachgewiesen werden. Es gelang zwar durch sorgfältige, fraktionierte Kristallisation ein Produkt zu erhalten, das die Analysenzahlen der Aminovaleriansäure gab.

0,1002 g Substanz gaben 0,1881 g CO_2 und 0,0865 g H_2O	
Berechnet für $C_5H_{11}NO_2$:	Gefunden:
51,28% C und 9,40% H.	51,19% C und 9,59% H.

Die Menge dieser Verbindung war zu gering, um in überzeugender Weise festzustellen, ob ein einheitliches Produkt

vorlag, oder nicht vielmehr ein Gemisch von Aminosäuren (z. B. von Alanin und Leucin), eine Möglichkeit, die bei der großen Neigung der einzelnen Aminosäuren, Mischkristalle zu bilden, sehr in Betracht fällt.

Das isolierte Leucin ($F = 297^{\circ}$) (korr.) zeigte folgende Zusammensetzung:

0,1891 g Substanz gaben 0,3812 g CO_2 und 0,1667 g H_2O	
Berechnet für $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_2$:	Gefunden:
54,92% C, 9,99% H.	54,98% C, 9,86% H.

Die aus Fraktion 2 und 3 erhaltenen, vereinigten alkoholischen Auszüge wurden zwecks Gewinnung der Pyrrolidin-carbonsäure im Vacuum zur Trockene verdampft und wiederholt mit absolutem Alkohol aufgenommen. Der Rückstand der alkoholischen Auszüge gab, mit Wasser und überschüssigem, frisch gefälltem Kupferoxyd gekocht, eine tiefblaue Lösung, welche nach dem Abfiltrieren des ungelösten Kupferoxyds bei vermindertem Druck zur Trockene gebracht wurde. Durch Auskochen dieses Rückstandes mit absolutem Alkohol konnte die Trennung des aktiven (8,2 g) vom racemischen Kupfersalz (4 g) bewirkt werden.

Das racemische Kupfersalz zeigte folgende Zusammensetzung:

0,1150 g Substanz verloren bei 120° 0,0127 g an Gewicht und lieferten darauf 0,0533 g H_2O und 0,1542 g CO_2 ; im Schiffchen verblieben 0,0280 g CuO

Berechnet für $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4\text{Cu} + 2\text{H}_2\text{O}$:

10,99% H_2O ; 41,12% C; 5,53% H; 21,80% Cu

Gefunden:

11,04% H_2O ; 41,11% C; 5,83% H; 21,87% Cu.

0,1033 g des aktiven Kupfersalzes hinterließen beim Veraschen 0,0282 g Kupferoxyd

Berechnet für $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_4\text{N}_2\text{Cu}$:

21,80% Cu.

Gefunden:

21,82% Cu.

4. Fraktion.

Zum Zwecke der Abscheidung des Phenylalaninesters wurde diese Fraktion mit dem fünffachen Volumen Wasser übergossen und mit Äther der Phenylalaninester ausgeschüttelt. Der mit Wasser wiederholt gewaschene Ätherauszug wurde mit

Natriumsulfat getrocknet, dann der Äther abdestilliert, und der Destillationsrückstand durch wiederholtes Abdampfen mit rauchender Salzsäure in das Phenylalaninchlorhydrat übergeführt. Durch dessen Abdampfen mit überschüssigem Ammoniak und Entfernung des Chlorammons mit kaltem Wasser konnten daraus 18 g freies Phenylalanin erhalten werden.

0.1323 g Substanz lieferten 0.0815 g H_2O und 0.3181 g CO_2

Berechnet für $C_9H_{11}NO_2$:

65.41% C, 6.71% H.

Gefunden:

65.57% C, 6.89% H.

Die wässerigen vom Phenylalaninester befreiten Lösungen, welche die Ester der Asparaginsäure und Glutaminsäure enthielten, wurden durch mehrstündiges Kochen mit überschüssigem Barytwasser verseift: nach mehrtägigem Stehen wurde das abgeschiedene Barytsalz der Asparaginsäure abfiltriert, und sowohl Niederschlag als Filtrat quantitativ mit Schwefelsäure vom Baryt befreit. Aus den eingeeengten Filtraten vom schwefelsauren Baryt kristallisierte einerseits Asparaginsäure, 3,7 g, andererseits konnten nach dem Sättigen mit gasförmiger Salzsäure 10 g Glutaminsäurechlorhydrat erhalten werden. Aus der durch Kochen mit Bleioxyd von Salzsäure befreiten Mutterlauge wurden noch 2,5 g aktiver Asparaginsäure gewonnen.

Analyse der Asparaginsäure:

0.1622 g Substanz lieferten 0.2136 g CO_2 und 0.0785 g H_2O

Berechnet für $C_4H_7NO_4$:

36.08% C, 5.30% H.

Gefunden:

35.91% C, 5.41% H.

Das Chlorhydrat der Glutaminsäure zeigte folgende Zusammensetzung:

0.1812 g Substanz lieferten 0.2161 g CO_2 und 0.0886 g H_2O

Berechnet für $C_5H_{10}NO_4Cl$:

32.68% C, 5.49% H.

Gefunden:

32.53% C, 5.47% H.

Der Rückstand, der nach dem Abdestillieren der Ester zurückgeblieben war, wurde in wenig Alkohol gelöst und mit überschüssigem Barytwasser 12 Stunden lang gekocht. Nach dem Filtrieren und quantitativen Entfernen des Baryts mit Schwefelsäure, Einengen und Sättigen mit Salzsäure konnten daraus im Laufe von Wochen noch 31 g Glutaminsäurechlorhydrat abgeschieden werden.

Bestimmung des Tyrosin.

100 g Eieralbumin (asche- und wasserfrei) wurden mit 1 l 25%iger Schwefelsäure 12 Stunden am Rückflußkühler gekocht, dann die Schwefelsäure quantitativ mit Baryt entfernt, und das Filtrat bis zur Kristallisation eingeengt. Der Baryumsulfatniederschlag wurde solange mit Wasser ausgekocht, bis das Filtrat keine Reaktion mit Millons Reagens mehr zeigte, und die Waschwässer mit der ursprünglichen Lösung vereinigt. Erhalten wurden 1,5 g Rohtyrosin. Durch Füllen mit Phosphorwolframsäure¹⁾ wurde das erhaltene Produkt gereinigt und aus dem Filtrat der nicht sehr bedeutenden Fällung, nach Entfernung der überschüssigen Phosphorwolframsäure mit Baryt und quantitative Fällung des überschüssigen Baryts mit Schwefelsäure, durch Einengen 1,1 g reines Tyrosin erhalten.

0,2105 g Substanz gaben 0,4612 g CO₂ und 0,1135 g H₂O

Berechnet für C₉H₁₁NO₃:

Gefunden:

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

59,7% C und 5,99% H.

Bestimmung des Cystins:

100 g Eieralbumin (asche- und wasserfrei) wurden mit 300 g konzentrierter Salzsäure (spez. Gew. 1,19) 6 Stunden am Rückflußkühler gekocht, dann die Lösung mit dem vierfachen Volumen Wasser verdünnt, mit reichlichen Mengen Tierkohle gekocht, und die entfärbte Lösung mit Natronlauge bis zur noch schwach sauren Reaktion versetzt. Nach kurzer Zeit trat Abscheidung von Kristallen ein. Nach 6 Tagen wurde abfiltriert und das Rohprodukt, das neben Cystin noch Tyrosin enthielt, in 10%igem Ammoniak heiß gelöst, stark abgekühlt unter Zusatz von soviel Eisessig, daß die Reaktion alkalisch blieb. Es fiel bald ein Niederschlag aus, der aus Tyrosin bestand. Das Filtrat wurde nun mit Eisessig übersättigt und so das Cystin gefällt. Erhalten wurden 0,20 g Cystin. Die Ausbeute ist nicht annähernd quantitativ, denn es konnte aus der ursprünglichen Flüssigkeit durch Zusatz von Eisessig auch Cystin abgeschieden werden, aber in nicht völlig reinem Zustande.

¹⁾ Emil Fischer und Emil Abderhalden. Notizen über Hydrolyse von Proteinstoffen, Diese Zeitschrift, Bd. XLII, S. 540, 1904.

0,3012 g Substanz gaben 0,5900 g BaSO₄ = 0,0810 g S

Berechnet für C₆H₁₂N₂S₂O₄:

26,66% S.

Gefunden:

26,8% S.

Auf 100 g aschefreies, bei 100° getrocknetes kristallisiertes Eialbumin berechnen sich aus den vorliegenden Befunden:

Alanin	2,1 g
Leucin	6,1 »
Prolin	2,25 »
Asparaginsäure	1,5 »
Glutaminsäure	8,0 »
Phenylalanin	4,4 »
Tyrosin	1,1 »
Cystin	0,2 »