

# Die Monoaminosäuren des krystallisierten Oxyhämoglobins aus Hundeblood.

Von

Emil Abderhalden und Louis Baumann, New-York.

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

(Der Redaktion zugegangen am 27. März 1907.)

Aus der Gruppe des «Globins», dem Eiweißkomponenten der Blutfarbstoffe, ist bis jetzt nur das Globin des Pferdeoxyhämoglobins<sup>1)</sup> eingehend auf seinen Gehalt an Aminosäuren untersucht worden. Es hatte sich gezeigt, daß dieses Globin vor allen anderen bis jetzt untersuchten Proteinen durch einen sehr hohen Gehalt an Histidin ausgezeichnet ist. Im übrigen waren dieselben Aminosäuren aufgefunden worden, wie bei allen bis jetzt untersuchten Eiweißarten, nur das Glykokoll wurde vermißt. Es ist sehr fraglich, ob wir berechtigt sind, das Globin als eine einheitliche Verbindung aufzufassen. Es unterliegt zwar keinem Zweifel, daß durch wiederholtes Umkrystallisieren der Oxyhämoglobinkrystalle manche Beimengungen, namentlich von anderen Proteinen aus den roten Blutkörperchen, sich entfernen lassen, es darf jedoch nicht übersehen werden, daß die Fähigkeit zu krystallisieren an die Bindung des Globins mit dem Hämatin geknüpft ist. Das freie Globin ist bis jetzt trotz vielfacher Bemühungen nicht krystallinisch erhalten worden. Es ist möglich, daß das Globin insofern als einheitliches Protein aufgefaßt werden darf, als es ein Gemisch gleichartig zusammengesetzter Eiweißkörper darstellt, es spricht jedoch auch nichts dagegen, daß das Globin aus einer Reihe verschiedenartiger Proteine besteht, und wir halten

<sup>1)</sup> Emil Abderhalden, Hydrolyse des krystallisierten Oxyhämoglobins aus Pferdeblut, Diese Zeitschrift, Bd. XXXVII, S. 484, 1903.

<sup>2)</sup> Vgl. u. a. Hans Aron, Über die Lichtabsorption und den Eisengehalt des Blutfarbstoffes, Biochemische Zeitschrift, Bd. III, S. 1, 1907.

es nicht für ausgeschlossen, daß die neuerdings beobachteten Unterschiede im Verhalten des Hämoglobins im Gasstoffwechsel in letzter Linie mit auf Unterschiede in der Zusammensetzung des Eiweißkomponenten und dessen Bindung mit dem Hämatin zurückzuführen sind. Wir heben diese Möglichkeiten deshalb besonders hervor, weil es vielfach als festgestellte Tatsache angesehen wird, daß das krystallisierte Oxyhämoglobin eine einheitliche Verbindung darstellt und vor allem das Verhältnis von Hämatin zum Globin ein ganz feststehendes ist. Diese Anschauung hat so festen Fuß gefaßt, daß das Oxyhämoglobin zum Ausgangspunkt von Berechnungen des Molekulargewichtes der Proteine gemacht worden ist.

Einstweilen ist es mit unseren jetzigen Methoden ganz unmöglich, das Globin mit Sicherheit in verschiedenartige Proteine aufzulösen. Ein Versuch nach dieser Richtung führte zu keinem eindeutigen Resultate. Der Umstand, daß es gelingt, durch Fällung mit Salzlösungen oder durch Lösungsmittel ein Protein in verschiedene Bestandteile aufzulösen, gibt oft keine Garantie, daß tatsächlich der ursprüngliche Eiweißkörper aus verschiedenen Komponenten zusammengesetzt war. Es bleibt sehr oft der Einwand bestehen, daß die Art der Trennung zu Denaturierungsvorgängen führt und so scheinbar verschiedenartige Proteine sich nachweisen lassen. Wir haben uns aus diesen Gründen vorläufig damit begnügt, das Oxyhämoglobin aus Hundeblood als solches zur Untersuchung zu verwenden und seine Zusammensetzung mit derjenigen des Oxyhämoglobins aus Pferdeblood zu vergleichen.

Das Oxyhämoglobin war genau nach der von A. Jaquet<sup>1)</sup> gegebenen Vorschrift gewonnen worden. Das erhaltene Rohprodukt wurde noch zweimal umkrystallisiert und das unter dem Mikroskop nunmehr einheitlich aussehende Oxyhämoglobin bei 100° getrocknet. Einen aliquoten Teil trockneten wir völlig bis zur Gewichtskonstanz und bestimmten an dieser Probe auch den Aschengehalt. Letzterer betrug 1,0%. Zur Hydrolyse verwendeten wir 280 g Oxyhämoglobin, berechnet auf das bei

<sup>1)</sup> Alfred Jaquet, Beiträge zur Kenntnis des Blutfarbstoffes, Diese Zeitschrift, Bd. XII, S. 285, 1888.

100° bis zur Gewichtskonstanz getrocknete Produkt. Diese Menge wurde 6 Stunden mit der 3fachen Menge rauchender Salzsäure vom spezifischen Gewicht 1,19 am Rückflußkühler gekocht. Die filtrierte Lösung hinterließ 2,3 g eines braunschwarzen Rückstandes.

Das dunkelrotbraun gefärbte Hydrolysat verarbeiteten wir in genau derselben Weise, wie es oft an dieser Stelle beschrieben worden ist, und wir beschränken uns deshalb darauf, den Verlauf der einzelnen Operationen nur schematisch wiederzugeben. Zunächst stellten wir in der gewohnten Weise die Esterchlorhydrate der Aminosäuren dar. Die Veresterung wurde dreimal durchgeführt. Der Versuch, Glykokoll als Esterchlorhydrat abzuscheiden, hatte keinen Erfolg. Die Ester setzten wir mit Natronlauge + Kaliumcarbonat in Freiheit.

Die Destillation der Ester gab folgendes Resultat:

1. Fraktion:	0— 60°	des Wasserbades bei 12 mm Druck	=	27.2 g
2	: 60—100°	» » » 12 » »	=	30.8 »
3.	: —100°	» » » 0.2 » »	=	84.2 »
4	: —200°	Ölbades 0.2 »	=	51.0 »

Die ersten drei Fraktionen wurden durch Kochen mit der 7fachen Menge Wasser verseift. Aus der vierten Fraktion trennten wir den Phenylalaninester durch Ausäthern ab und verseiften die übrigen Ester dieser Fraktion durch Kochen mit Barytwasser. Zu bemerken ist, daß jede einzelne der 3 ersten Fraktionen unter vermindertem Druck völlig zur Trockene verdampft wurde. Bei der dritten Fraktion wurde zuerst von ausgeschiedenem Leucin abfiltriert. Die erhaltenen Rückstände kochten wir dann zur Gewinnung des Prolins mit absolutem Alkohol aus. Wir bemerken auch hier, daß stets neben Prolin andere Aminosäuren in mehr oder weniger großer Menge in Lösung gehen und unbedingt ein nochmaliges Eindampfen des alkoholischen Auszuges und eine Wiederaufnahme des Rückstandes in absolutem Alkohol nötig ist, um ganz reines Prolin zu erhalten. Es gelingt so stets, in Alkohol an und für sich unlösliche Aminosäuren, welche mitgelöst waren, zur Abscheidung zu bringen. Die in Alkohol unlöslichen Aminosäuren trennten wir zunächst durch Krystallisation in eine größere Zahl von

Fraktionen. Durch Bestimmung der Schmelz- resp. Zersetzungspunkte stellten wir die Reinheit der einzelnen Produkte fest. Ein guter Wegweiser ist auch die Geschmacksprobe, welche gestattet, die Leucinfraaktionen wenigstens roh von den die niederen Aminosäuren enthaltenden Fraktionen abzugrenzen. Meistens stellten wir auch Kupfersalze dar und fraktionierten diese wieder. Wir arbeiteten fast in allen Fällen nicht mit den gesamten Fraktionen, sondern mit aliquoten Teilen. Aus den gefundenen Mengen an Aminosäuren berechneten wir dann die Gesamtausbeute. Man erhält auf diese Weise meist zu geringe Werte, weil stets ein kleiner Rest an nicht entwirrbaren Aminosäuren übrig bleibt und bei dem wiederholten Umkrystallisieren Verluste nicht zu umgehen sind. Es scheint uns jedoch korrekter, uns an die wirklich in reinem Zustande isolierten Aminosäuremengen zu halten, als auf Grund willkürlicher Schätzungen die Gesamtausbeute an Rohprodukten als Grundlage zu wählen. Wir halten es nicht für überflüssig, zu betonen, daß die Estermethode, selbst von derselben Hand ausgeführt, durchaus keine scharfen Zahlen gibt. Man darf die gefundenen Werte stets nur als Annäherungswerte betrachten und nicht erwarten, daß bei ein und demselben Protein bei wiederholter Bestimmung genau dieselben Mengen an den einzelnen Aminosäuren gefunden werden. Wir haben das Oxyhämoglobin aus Hundeblood zweimal verarbeitet und zum Teil nicht unerheblich abweichende Resultate erhalten. Immerhin bleibt die Tatsache bestehen, daß das Oxyhämoglobin sehr reich an Leucin ist, und die übrigen Aminosäuren stehen zu diesem in beiden Bestimmungen in ungefähr dem gleichen Verhältnis. Daß an eine quantitative Ausbeute auch in dem Sinne nicht gedacht werden darf, daß man bei Wiederholung der Hydrolyse eines bestimmten Proteins unter möglichst denselben Bedingungen ganz gleiche Werte erhält, geht schon aus der Beobachtung des einen<sup>1)</sup> von uns hervor, daß man bei Wiederholung der Veresterung des nach Abscheidung der Ester verbleibenden Rückstandes wiederum Monoaminosäureester erhält und auch dann noch, wenn der ganze Prozeß nochmals wiederholt wird. Wir heben diese Umstände deshalb so sehr hervor, weil es den Anschein gewinnt,

<sup>1)</sup> Emil Abderhalden, l. c.

als würde den gewonnenen Zahlen ein zu großes Gewicht beigelegt und der Wert von etwas höheren oder niedrigeren Ausbeuten zu hoch eingeschätzt.

Im folgenden geben wir die Ausbeuten an einzelnen Aminosäuren der verschiedenen Fraktionen wieder.

Fraktion I. Ihr Gewicht betrug nach dem Auskochen mit Alkohol 5,0 g. 1 g wurde auf Glykokoll geprüft. Es gelang, Spuren von Glykokollesterchlorhydrat vom Schmelzpunkt  $144^{\circ}$  (korr.) nachzuweisen. Der übrige Teil der Fraktion, 4,5 g, bestand aus Alanin. Zersetzungspunkt  $295^{\circ}$  (korr.).

0,1700 g Substanz gaben 0,2529 g  $\text{CO}_2$  und 0,1209 g  $\text{H}_2\text{O}$

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

40,45% C und 7,86% H. 40,57% C und 7,90% H.

Fraktion II. Sie enthielt 3,5 g Alanin, 1,0 g Valin und 10,0 g Leucin.

Das isolierte Leucin gab folgende Zahlen:

0,1571 g Substanz gaben 0,1382 g  $\text{H}_2\text{O}$  und 0,3146 g  $\text{CO}_2$

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

54,96% C und 9,92% H. 54,61% C und 9,79% H.

Das Valin, das wiederholt fraktioniert worden war und dessen Kupfersalz in mehreren Fraktionen den richtigen Kupfergehalt zeigte, gab folgende Zahlen:

0,1501 g Substanz gaben 0,2799 g  $\text{CO}_2$  und 0,1248 g  $\text{H}_2\text{O}$

Berechnet für  $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_2$ : Gefunden:

51,28% C und 9,40% H. 50,86% C und 9,24% H.

Fraktion III. Ausgeschieden hatten sich 22,8 g Leucin. Es wurden ferner isoliert 13,6 g Leucin und 1,65 g Valin.

Aus allen drei Fraktionen erhielten wir 12,0 g Prolin. Die aktive Form wurde von der racemischen durch die Löslichkeit des Kupfersalzes der ersteren in Alkohol abgetrennt. Zur Analyse gelangte das racemische Kupfersalz.

0,3036 g lufttrockenes Prolinkupfer verloren bei  $120^{\circ}$  0,0331 g  $\text{H}_2\text{O}$

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

10,99%  $\text{H}_2\text{O}$ . 10,90%  $\text{H}_2\text{O}$ .

0,2642 g bei  $120^{\circ}$  getrocknete Substanz gaben 0,0721 g  $\text{CuO} = 0,0575$  g Cu

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

21,81% Cu. 21,75% Cu.

Fraktion IV. Erhalten wurden 13,25 g Phenylalanin, 6,9 g Asparaginsäure und 3,2 g Glutaminsäure. Serin war wohl

vorhanden, konnte jedoch nicht völlig rein erhalten werden. Ein Verlust beeinträchtigte die Ausbeuten an den einzelnen Aminosäuren dieser Fraktion beträchtlich.

Phenylalanin:

0,1559 g Substanz ergaben 0,3736 g CO<sub>2</sub> und 0,0920 g H<sub>2</sub>O

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

Gefunden:

65,41% C und 6,71% H.

65,36% C und 6,56% H.

Asparaginsäure:

0,1805 g Substanz gaben 0,2373 g CO<sub>2</sub> und 0,0866 g H<sub>2</sub>O

Berechnet für C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>4</sub>:

Gefunden:

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

35,85% C und 5,33% H.

Glutaminsäure:

0,1762 g Substanz gaben 0,2630 g CO<sub>2</sub> und 0,0972 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.

40,70% C und 6,13% H.

Auch hier wurde der Destillationsrückstand verarbeitet und 16 Stunden mit Barytwasser am Rückflußkühler energisch gekocht. Nach Entfernung des Baryts mit Schwefelsäure dampften wir das Filtrat unter vermindertem Druck stark ein und leiteten dann zur Abscheidung von Glutaminsäure gasförmige Salzsäure bis zur Sättigung ein. Es schied sich wohl ein salzsaures Salz ab, jedoch in sehr unreinem Zustande. Es gelang uns nicht, das Glutaminsäurechlorhydrat analysenrein zu gewinnen. Seine Menge schmolz beim Umkrystallisieren stark zusammen. Es ist uns vorläufig auch nicht gelungen, ein anderes Produkt aus dem Destillationsrückstand völlig rein darzustellen.

Aus den gegebenen Ausbeuten berechnen sich folgende Mengen an einzelnen Aminosäuren auf 100 g trockenes, aschefreies Globin, wobei der Hämingehalt des Oxyhämoglobins mit 4,2% in Abzug gebracht ist.<sup>1)</sup>

Glykokoll	Spuren
Alanin	3,0 g
Valin	1,0 »
Leucin	17,5 »
Prolin	4,5 »
Asparaginsäure	2,5 »
Glutaminsäure	1,2 »
Phenylalanin	5,0 »

<sup>1)</sup> Vgl. Fr. N. Schulz, Der Eiweißkörper des Hämoglobins, Diese Zeitschrift, Bd. XXIV, S. 449, 1898.

Es ist fraglich, ob das gefundene Glykokoll dem Globin zukommt. Wir erinnern daran, daß wir auch beim Globin aus Pferdeoxyhämoglobin Glykokoll fanden, sofern wir nicht die Vorsicht gebrauchten, die Oxyhämoglobinkristalle wiederholt umzukrystallisieren. Auch vom Hundeoxyhämoglobin enthielt ein Präparat offenbar kein Glykokoll, wenigstens ließ es sich nach der Estermethode nicht nachweisen. Immerhin muß zugegeben werden, daß mit Hilfe der Estermethode sehr geringe Glykokollmengen dem Nachweis entgehen können.

Wenn wir die vorliegenden Ausbeuten an Aminosäuren mit denjenigen vergleichen wollen, die wir bei der Hydrolyse des Oxyhämoglobins aus Pferdeblut erhalten haben, dann müssen wir die zuerst veröffentlichte Arbeit <sup>1)</sup> in Betracht ziehen, weil hier gleichfalls die Ester nur einmal isoliert worden waren, während bei der Wiederholung der Untersuchung <sup>2)</sup> der Rückstand, der bei der Infreiheitsetzung der Ester mit Natronlauge und Kaliumcarbonat verblieb, nach Entfernung der Salze nochmals verestert wurde. Die Ausbeuten an Aminosäuren waren entsprechend viel höhere als bei nur einmaliger Estergewinnung.

100 g Globin aus Pferdeoxyhämoglobin gaben:

Alanin	3,0 g
Leucin	20,9 »
$\alpha$ -Prolin	1,5 »
Glutaminsäure	1,1 »
Asparaginsäure	3,4 »
Phenylalanin	3,5 »

Im ganzen ist die Übereinstimmung eine recht gute. Ob die größeren Ausbeuten an Prolin und Phenylalanin, die wir beim Globin aus Hundeoxyhämoglobin gefunden haben, von Bedeutung sind, d. h. auf eine verschiedene Zusammensetzung der beiden hier verglichenen Globine hinweisen, müssen weitere Untersuchungen ergeben, denen auch die Aufgabe zufällt, die Diaminosäuren und das Histidin im Globin des Hundeoxyhämoglobins zu bestimmen.

<sup>1)</sup> Emil Fischer und Emil Abderhalden, Hydrolyse des Oxyhämoglobins durch Salzsäure. Diese Zeitschrift, Bd. XXXVI, S. 268, 1902.

<sup>2)</sup> Emil Abderhalden, l. c., Diese Zeitschrift, Bd. XXXVII, S. 484, 1903.