

Die Monoaminosäuren des Avenins.

Von

Emil Abderhalden und Yuho Hämäläinen, Helsingfors.

(Aus dem Chemischen Institut der Universität Berlin.)

(Der Redaktion zugegangen am 15. Juli 1907.)

Das zur vorliegenden Untersuchung verwendete Protein war analog dem Legumin aus Hafer nach Ritthausens Methode gewonnen worden und zwar in der Weise, daß Hafer mit verdünnter Kalilauge extrahiert und aus der Lösung das Avenin mit Essigsäure abgeschieden wurde. Dieser Prozeß wurde mehrmals wiederholt. Wir können natürlich nichts über die Reinheit des angewandten Präparates aussagen, da die ganze Art der Darstellung wenig Gewähr für eine wirkliche Reinigung bietet. Wir haben diese Untersuchung deshalb durchgeführt, um festzustellen, ob Proteine, die nach der gleichen Methode aus verschiedener Quelle dargestellt worden sind, eine ähnliche Zusammensetzung besitzen oder aber, ob beträchtliche Unterschiede sich finden können. Eine Vergleichung des Gehaltes des Avenins an Monoaminosäuren mit den entsprechenden des analog dargestellten Legumins¹⁾ aus weißen Bohnen zeigt, daß in der Tat die gleichartige Gewinnungsweise keinen Rückschluß auf etwaige Ähnlichkeit der betreffenden Proteine zuläßt.

Das verwendete Avenin verlor beim Trocknen bei 100° bis zur Gewichtskonstanz 9,57% an Gewicht und hinterließ beim Veraschen 1,28% Asche.

Auf 100 g aschefreies, bei 100° bis zur Gewichtskonstanz getrocknetes Avenin ergaben sich folgende Ausbeuten an Aminosäuren:

¹⁾ Emil Abderhalden und Boris Babkin, Die Monoaminosäuren des Legumins, Diese Zeitschrift, Bd. XLVII, S. 354, 1906.

Glykokoll	1,0 g
Alanin	2,5 »
Valin	1,8 »
Leucin	15,0 »
Prolin	5,4 »
Asparaginsäure	4,0 »
Glutaminsäure	18,4 »
Phenylalanin	3,2 »
Tyrosin	1,5 »

100 g aschefreies, bei 100° bis zur Gewichtskonstanz getrocknetes Legumin enthalten:

Glykokoll	1,0 g
Alanin	2,8 »
Valin	1,0 »
Leucin	8,2 »
Prolin	2,3 »
Asparaginsäure	4,0 »
Glutaminsäure	16,3 »
Phenylalanin	2,0 »
Tyrosin	2,8 »

Ein Blick auf die vorliegende Zusammenstellung zeigt, daß die Unterschiede im Gehalte speziell an Tyrosin und Leucin so groß sind, daß sie nicht der angewandten Methode zur Last fallen können.

435 g Avenin wurden 6 Stunden mit 1500 ccm rauchender Salzsäure vom spez. Gewicht 1,19 am Rückflußkühler gekocht. Die dunkelbraun gefärbte Flüssigkeit wurde nach dem Filtrieren unter vermindertem Druck bei 40° des Wasserbades zum Sirup eingedampft und der Rückstand in der gewohnten Weise mit Alkohol und gasförmiger Salzsäure verestert. Der ganze Prozeß wurde viermal wiederholt. Die Ester setzten wir mit Natronlauge und Kaliumcarbonat in Freiheit. Ihre Destillation ergab folgende Fraktionen:

Fraktion I	bis 60° des Wasserbades und 12 mm Druck =	65,7 g
» II	» 100° » » » 12 » » =	78,0 »
» III	» 105° » Ölbad » 0,5 » » =	69,5 »
» IV	105 » 200° » » » 0,5 » » =	125,5 »

Der Destillationsrückstand wog 44,0 g.

Die einzelnen Fraktionen wurden in genau der gleichen Weise verarbeitet, wie es schon oft an dieser Stelle beschrieben

worden ist. Wir begnügen uns deshalb, die ganze Verarbeitung in ihren Umrissen anzugeben. Fraktion I—III verseiften wir sofort nach ihrer Gewinnung durch Kochen mit der 7fachen Menge Wasser bis zum Verschwinden der alkalischen Reaktion. Meistens genügen 6—8 Stunden. Alle drei Fraktionen wurden dann, nachdem aus der dritten Fraktion 8,75 g ausgeschiedenes Leucin abfiltriert worden waren, für sich unter vermindertem Druck völlig zur Trockene verdampft und der Rückstand wiederholt mit absolutem Alkohol ausgekocht. Auf diese Weise gewinnt man das Prolin. Es ist im allgemeinen empfehlenswerter, zuerst auf diese Weise das Prolin zu entfernen und dann die in Alkohol unlöslichen Aminosäuren durch fraktionierte Krystallisation zu trennen, als das umgekehrte Verfahren einzuschlagen. Im letzteren Falle erhält man sehr frühzeitig prolinhaltige Krystallfraktionen. Man ist dann genötigt, jede einzeln mit Alkohol auszukochen, wodurch vermehrte Verluste unvermeidlich sind. Aus allen drei Fraktionen erhielten wir nach dem Verdampfen des Alkohols 26,0 g Rückstand. Auch hier lösten wir diesen wieder in Alkohol auf, wobei eine nicht unbeträchtliche Menge ungelöst blieb. Zur weiteren Reinigung stellten wir durch Kochen mit überschüssigem Kupferoxyd das Kupfersalz des Prolins dar und trennten das aktive Prolinkupfer von der Racemform durch Auskochen mit Alkohol. Das racemische Prolinkupfer reinigten wir weiterhin durch fraktionierte Krystallisation aus Wasser. Es ließ sich eine kleine Menge von Leucinkupfer abtrennen. Die Ausbeute an reinem Prolin betrug 21 g.

Die erste Fraktion wog nach dem Auskochen mit Alkohol 1,6 g. 1 g hiervon übergossen wir mit absolutem Alkohol und leiteten bis zur Sättigung in diesen gasförmige, trockene Salzsäure ein. Es ging alles in Lösung. Nach dem Impfen mit einem Kryställchen von Glykokollesterchlorhydrat erfolgte beim Stehen auf Eis bald Krystallisation. Erhalten wurden 0,15 g Glykokollesterchlorhydrat vom Schmelzpunkt 144°. Aus der Mutterlauge setzten wir nach dem Eindampfen die Ester in der üblichen Weise in Freiheit und verwandelten diese durch Eindunsten mit wässriger Salzsäure in die salzsauren Aminosäuren. Der verbleibende Rückstand zeigte $[\alpha]_{20}^D = +9,2^\circ$.

Es lag somit offenbar recht reines d-Alanin vor. Seine Anwesenheit konnten wir durch fraktionierte Krystallisation aus den verbliebenen 0,6 g direkt nachweisen. Die Ausbeute an reinem Alanin betrug auf die ganze Fraktion berechnet 1,4 g, an Glykokoll 0,1 g.

Die zweite Fraktion enthielt 44,4 g in absolutem Alkohol unlösliche Aminosäuren. Durch fraktionierte Krystallisation ließen sich isolieren: 3,0 g Glykokoll, 5,0 g Alanin, 4,0 g Valin, 30,0 g Leucin. Auch hier wurden zur Trennung und Orientierung sehr oft in aliquoten Teilen der Gesamtfaktionen die Kupfersalze dargestellt. Um einen Überblick über die Verarbeitung dieser zweiten Fraktion zu geben, sei erwähnt, daß zunächst durch Eindampfen der mit Tierkohle gekochten wässrigen Lösung 6 Hauptfraktionen dargestellt wurden. Von jeder wurde zunächst der Schmelzpunkt genommen. Die drei ersten Fraktionen erwiesen sich als fast reines Leucin. Die Analyse des Kupfersalzes bestätigte diese Vermutung. Bei den übrigen 3 Fraktionen zeigte schon der Schmelzpunkt, daß Gemische vorlagen. Die Analyse der dargestellten Kupfersalze zeigte die Berechtigung dieser Annahme. Schließlich haben wir bei den leichter löslichen Krystallfraktionen auf Glykokoll gefahndet und zwar suchten wir es als Esterchlorhydrat abzuscheiden. Nur die am leichtesten lösliche Partie gab einen positiven Ausfall.

Die dritte Fraktion wog nach dem Auskochen mit Alkohol 31,0 g. Wir erhielten 1,0 g Glykokoll, 5,0 g Alanin, 3,0 g Valin und 20,0 g Leucin. 8,75 g Leucin waren bei der Verseifung der Ester bereits ausgefallen und durch Filtration entfernt worden.

Aus der vierten Fraktion entfernten wir zunächst in der üblichen Weise den Phenylalaninester und verseiften den Rest der Ester mit Barytlösung.

Die Ausbeute an reinem Phenylalanin betrug 12,5 g. An Rohprodukt hatten wir beträchtlich mehr erhalten. Wir gewannen aus dieser Fraktion noch 15,5 g reine Asparaginsäure und ferner 57 g salzsaure Glutaminsäure. Serin konnten wir nicht isolieren.

Wir haben auch hier den Destillationsrückstand verarbeitet. Wir kochten ihn zunächst mit Essigäther aus und gewannen 0,3 g Leucinimid. Den in Essigäther unlöslichen Teil kochten wir 2 Tage lang mit überschüssigem Baryt und Wasser und gewannen nach der quantitativen Entfernung des Baryts mit Schwefelsäure und Sättigen des eingedampften Filtrates vom Baryumsulfat mit Salzsäure 3,0 g Glutaminsäurechlorhydrat.

Tyrosin- und Glutaminsäurebestimmung: 100 g Avenin desselben Präparates, das zur eben angeführten Untersuchung gedient hatte, wurden 16 Stunden mit 600 ccm 25%iger Schwefelsäure am Rückflußkühler gekocht, dann filtriert und aus dem Filtrat mit Baryt die Schwefelsäure quantitativ entfernt. Der Baryumsulfatniederschlag wurde wiederholt mit Wasser ausgekocht. Durch Einengen der leicht gelb gefärbten Lösung bis zur Krystallisation gewannen wir vier Fraktionen von Tyrosin (1,95 g, 0,61 g, 0,17 g und 0,1 g). Sie wurden vereinigt und aus heißem Wasser unter Anwendung von Tierkohle umkrystallisiert. Das reine Tyrosin wog 1,35 g.

Die Mutterlauge des Rohthyrosins vereinigten wir mit derjenigen des reinen Tyrosins, engten sie stark ein und leiteten bis zur Sättigung gasförmige Salzsäure ein. Bald erfolgte beim Stehen auf Eis Krystallisation. Die Krystalle waren jedoch sehr klein und durchtränkt von einer sirupösen Mutterlauge, die sich nur schwer quantitativ entfernen ließ. Wir verdünnten deshalb die ganze Masse mit Wasser, brachten alles wieder in Lösung und schüttelten nun zur Entfernung der Hauptmasse der Salzsäure die Lösung mit einem kleinen Überschuß von Kupferoxydul. Aus dem Filtrat entfernten wir das gelöste Kupfer mit Schwefelwasserstoff und erhielten nun eine schwach gelb gefärbte Lösung, aus der beim Einengen und Sättigen mit gasförmiger Salzsäure nunmehr das Glutaminsäurechlorhydrat leicht abzuscheiden und zu trennen war. Wir erhielten an Rohprodukt 39 g. Nach dem Umkrystallisieren verblieben 20,74 g reines salzsaures Salz = 16,6 g Glutaminsäure.

Im folgenden geben wir im Zusammenhange die Resultate der Analyse der einzelnen Aminosäuren wieder:

Glykokollesterchlorhydrat:

0,1322 g Substanz gaben 0,1680 g CO₂ und 0,0856 g H₂OBerechnet für C₄H₁₀NO₂Cl: Gefunden:

C = 34,41%, H = 7,17%. C = 34,66%, H = 7,24%.

Alanin:

0,1466 g Substanz gaben 0,2180 g CO₂ und 0,1050 g H₂OBerechnet für C₃H₇NO₂: Gefunden:

C = 40,45%, H = 7,87%. C = 40,56%, H = 8,01%.

0,3020 g Alaninchlorhydrat in 4,8423 g 20%iger Salzsäure drehen
+ 0,67. d = 1,116. $[\alpha]_{20}^D = + 9,64^\circ$.

Valin:

0,1728 g Substanz gaben 0,3257 g CO₂ und 0,1446 g H₂OBerechnet für C₅H₁₁NO₂: Gefunden:

C = 51,28%, H = 9,40%. C = 51,40%, H = 9,28%.

Leucin:

0,1546 g Substanz gaben 0,3113 g CO₂ und 0,1368 g H₂OBerechnet für C₆H₁₃NO₂: Gefunden:

C = 54,96%, H = 9,92%. C = 54,92%, H = 9,9%.

0,1692 g Leucin in 6,4553 g 20%iger Salzsäure drehen + 0,62.
d = 1,1132. $[\alpha]_{20}^D = + 16,7^\circ$.

Prolin:

0,1686 g Substanz verloren bei 120° 0,0188 g H₂OBerechnet für C₁₀H₁₆O₄N₂Cu + 2 H₂O: Gefunden:H₂O = 10,99%. H₂O = 11,16%.

0,1250 g bei 120° getrocknetes Cu-Salz gaben 0,0339 g CuO

Berechnet für C₁₀H₁₆O₄N₂Cu: Gefunden:

Cu = 21,8%. Cu = 21,6%.

Asparaginsäure:

0,1719 g Substanz gaben 0,2278 g CO₂ und 0,0782 g H₂OBerechnet für C₄H₇NO₄: Gefunden:

C = 36,09%, H = 5,26%. C = 36,3%, H = 5,09%.

Phenylalanin:

0,1323 g Substanz gaben 0,3170 g CO₂ und 0,0781 g H₂OBerechnet für C₉H₁₁NO₂: Gefunden:

C = 65,45%, H = 6,66%. C = 65,42%, H = 6,60%.