

Über einen krystallisierten Eiweißkörper aus dem Milchsafte der *Antiaris toxicaria*.

Von

Y. Kotake und F. Knoop.

(Aus der medicin. Abteilung des chemischen Laboratoriums Freiburg i. B.)

(Der Redaktion zugegangen am 12. Oktober 1911.)

Von Eiweißkörpern, für deren Einheitlichkeit hinreichende Kriterien der Reinheit gegeben scheinen, sind bisher so wenige bekannt, daß jeder neue Befund Interesse verdient, besonders wenn Eigenschaften vorliegen, die den neuen Körper charakteristisch unterscheiden. Eine solche Substanz haben wir aus dem Milchsafte der *Antiaris toxicaria* darstellen können, und dieser Befund erscheint uns wertvoll, weil sich aus Pflanzensäften in Zukunft wohl öfter einheitliche Substanzen gewinnen lassen werden, die für die Eiweißchemie von Bedeutung sein können.

Aus dem genannten Milchsaft, der in Ostindien Ipooh genannt und als schnell wirkendes Pfeilgift verwandt wird, hat H. Kiliani¹⁾ bereits 1896 das wirkzame Prinzip Antiarin, ein schön krystallisierendes, strophantinartig wirkendes Glykosid, ferner Antiarol, ein Trimethoxyphenol, sowie ein krystallisiertes Antiarharz, das Windaus und Welsch²⁾ später als Zimmtsäureester des α -Amyrins charakterisierten, und endlich Kalisalpeter zu isolieren vermocht. Die nach Kilianis Vorschrift (l. c. S. 444) mit 85%igem Alkohol erschöpften, an der Luft und im Vakuum getrockneten Rückstände solchen Saftes³⁾ waren unser Ausgangsmaterial; wir danken Herrn Geheimrat Kiliani auch hier, daß er uns für die nachfolgende Untersuchung 450 g zur Verfügung gestellt hat.

¹⁾ Kiliani, Arch. d. Pharm., Bd. 234, S. 438 (1896).

²⁾ Arch. d. Pharm., Bd. 246, S. 504 (1908).

³⁾ Vgl. auch Ber. d. chem. Ges., Bd. 43, S. 3576 (1910).-

Diese Antiarrückstände, die sich schlecht in Wasser lösten, lieferten nach kurzem Kochen mit Wasser ein braun gefärbtes Absud, das reichlich Stickstoff enthielt und Farbenreaktionen gab, die für die Anwesenheit eiweißartiger Substanzen sprachen: Biuretreaktion, Millons Reaktion und die Schwefelbleiprobe. Wir haben daraus durch wiederholtes Auskochen mit 0,8%iger Essigsäure eine schön krystallisierende Substanz gewonnen, die der Träger dieser Farbenreaktionen ist. Sie scheidet sich beim Einengen des Absudes an der Oberfläche als Krystallhaut ab, läßt sich aus heißem Wasser umkrystallisieren und erscheint dann in Nadeln oder derben, charakteristischen Prismen von einheitlicher Form, die 15,73% Krystallwasser enthalten, sauer reagieren und fast aschefrei sind. Gänzlich aschefrei läßt sich die Substanz durch Umkrystallisieren aus Normalsalzsäure gewinnen: sie löst sich schnell bei vorsichtigem Erwärmen und scheidet sich beim Abkühlen sofort in ganz veränderter, aber einheitlicher Krystallform — kleinen festen Polyedern — ab, die salzsäurefrei sind und auf dem Platinblech ohne jeden Rückstand verbrennen. Aus diesen Krystallen läßt sich durch Auflösen in essigsäurehaltigem, heißem Wasser die ursprüngliche Krystallform durch Eindampfen wiedergewinnen. Im Gegensatz zu anderen Eiweißkörpern gewinnt die Krystallisationsfähigkeit mit dem Umkrystallisieren aus destilliertem, essigsäurehaltigem Wasser. In kaltem Eisessig löst sich der Eiweißkörper leicht, sehr leicht in heißem, bei Zusatz von Wasser oder organischen Lösungsmitteln fällt er unverändert wieder aus. Er läßt sich mit Ammonsulfat amorph aussalzen (Sättigungsgrenzen 30—50%) und geht dann beim Stehen in Krystallform über. Er liefert alle Eiweißfarbenreaktionen außer der von Molisch.

Die Aussalzbarkeit reiht die Substanz in Verbindung mit ihrer Hitzebeständigkeit nach der alten Einteilungsweise unter die «Albumosen» ein, aber ihr Verhalten schon gegen andere «Albumosenfällungsmittel» zeigt sofort auch hier das völlig Unzulängliche dieser alten Definitionsweise: ¹⁾ Pikrinsäure, Ferro-

¹⁾ Fällbarkeit durch Neutralsalz kann kein abgrenzendes Klassifizierungsprinzip sein, auf das sich eine Systematik gründen läßt; das ist schon öfters von Abderhalden u. a. betont worden und zeigt sich hier wiederum deutlich.

cyankalium + Essigsäure und auch Salpetersäure fallen nicht, nur Phosphorwolframsäure verhält sich positiv. Zunächst ließen uns alle diese Eigenschaften vermuten, daß eine Substanz von relativ niedrigem Molekulargewicht vorlag, und wir hofften schon einen ziemlich einfachen Eiweißkörper vor uns zu haben, der ja möglicherweise im Saft nicht präformiert war, sondern vielleicht ein partielles Abbauprodukt darstellt, das allmählich durch Milchsäurefermente gebildet ist: darüber läßt sich vorläufig nichts aussagen. Wir versuchten nun eine Molekulargewichtsbestimmung mittels der Gefrierpunktmethode in reinstem Eisessig. Aber diese mißlang, so oft wir sie auch wiederholten. Der Eisessig wollte nicht gleichmäßig gefrieren, auch bei starker Unterkühlung begann kein schnelles Abscheiden von Krystallen und kein plötzlicher Anstieg des Quecksilberfadens, vielmehr schieden sich selbst beim Impfen der unterkühlten Lösung erst oben am Rande einzelne Krystalle ab, dann auch wohl einige, die in der Lösung flottierten, aber auch bei starker Unterkühlung war nie eine, auch nur einigermaßen gleichmäßige Krystallbildung zu erreichen; das Ganze sah aus, als wenn man etwa Wasser aus einem wasserhaltigen Äther ausfrieren läßt. Es handelte sich also wohl kaum um eine echte Lösung. Bei näherer Untersuchung zeigte sie kolloidalen Charakter, sie opalisierte und gab Tyndallphänomen.

Ein hohes Molekulargewicht war auch nach dem Schwefelgehalt anzunehmen, der 7,20% betrug. War dieser nur als Cystin vorhanden, so mußte das Molekül mit 7,2% S ca. 28% Cystin enthalten ($S_2 = 64$, Cystin = 240), und da Cystin das Molekulargewicht 240 hat, so berechnete sich, wenn diese $240 = 28\%$ des Gesamtmoleküls bilden, bei der Annahme von nur einem Molekül Cystin ein Molekulargewicht von ca. 900 als Minimum. Über die Kompliziertheit des Moleküls hätte uns am ehesten eine Hydrolyse Auskunft geben können. Obwohl wir bei der geringen Menge Material nicht erwarten konnten, irgendwie quantitativ verwertbare Ergebnisse zu erhalten, haben wir doch mit kaum 16 g den Versuch unternommen, leider zudem bezüglich der Esterdestillation unter den ungünstigsten Bedingungen. Uns fehlte eine Ölpumpe oder flüssige Luft, um

ein hohes Vakuum zu erzeugen, es stand nur die Wasserstrahlpumpe zur Verfügung und das bei dem Wassermangel im Juli 1911. Der eine von uns (Kotake) hat trotzdem äußerer Umstände halber diese vorläufige Untersuchung nicht ohne einen Versuch in dieser Richtung abschließen wollen: er hofft in Japan neues Ausgangsmaterial zu erhalten und bald mit mehr Substanz die Untersuchung weiterführen zu können; immerhin können wir doch mit Sicherheit schon jetzt die Anwesenheit von Cystin, Tyrosin, Lysin, Glykokoll, Alanin, Prolin und Valin mitteilen. Auch nach diesem Befunde kann das Molekül kein sehr einfaches sein. Trotzdem glauben wir, daß die günstigen physikalischen Eigenschaften der Substanz zusammen mit ihrem Krystallwasser- und hohen Schwefelgehalt eine völlige Aufklärung von Molekulargewicht und quantitativer Zusammensetzung ermöglichen, wenn einmal mehr Material zur Verfügung steht. Die Milchsäfte anderer, besser zugänglicher Pflanzen auf ähnliche Eiweißkörper zu untersuchen, erscheint aussichtsvoll.

Experimenteller Teil.

450 g (vakuumtrockener) Antiarrückstand wurde mit 2 l 0,8% iger Essigsäure in einem Kolben im Wasserbade mehrere Stunden erhitzt, nach dem Erkalten abgesaugt. Der Rückstand wurde nochmals mit 2 l der Essigsäure behandelt. Das vereinigte Filtrat, welches braun gefärbt war, wurde ohne weiteres auf dem Wasserbade eingedampft. Als die Flüssigkeit ungefähr 600 ccm erreichte, trat ein geringer flockiger Niederschlag — amorph — ein. Er wurde abfiltriert und das Filtrat wurde auf dem Wasserbade weiter verdampft, wobei auf der Oberfläche der Flüssigkeit immer eine Krystallhaut gebildet wurde. Die Flüssigkeit wurde jetzt oft umgerührt, dabei ging ein Teil der Krystalle in Lösung. Als sie nicht mehr in Lösung ging, wurde die Flüssigkeit einige Tage unter einem umgekehrten Trichter stehen gelassen. Die ausgeschiedene, leicht gefärbte Krystallmasse, welche unter dem Mikroskop ganz einheitlich aussah, wurde abgesaugt und ausgewaschen. Zur Umkrystallisation wurde sie in ca. 1½ l Wasser auf dem Wasserbade gelöst, von der Verunreinigung abfiltriert und eingedampft. Die

abgeschiedenen Krystalle wurden nach 24 stündigem Stehen abgesaugt, ausgewaschen, über Schwefelsäure und dann bei 100° C. getrocknet. Die Ausbeute betrug 15,25 g.

Der Rückstand, der in der verdünnten Essigsäure ungelöst geblieben war, wurde noch 5 mal mit der Essigsäure ausgezogen. Aus den vereinigten Lösungen haben wir noch 5,20 g der einmal aus Wasser umkrystallisierten Substanz gewonnen.

Schließlich wurde die Masse noch einmal mit 2%iger Essigsäure auf dem Wasserbade erhitzt, nach dem Erkalten abgesaugt und eingedampft, aber eine weitere Krystallisation trat nicht mehr ein. Die dabei ausgeschiedene amorphe Substanz wurde mit Wasser aufgenommen, filtriert, mit Ammonsulfat halb gesättigt und stehen gelassen. Der erzeugte Niederschlag war unter dem Mikroskop wieder amorph.

Die gewonnene krystallisierte Substanz ist schwer löslich in kaltem (bei 13° zu 0,58%), besser in heißem Wasser, etwas in verdünntem Alkohol und nicht in Äther. Die wässrige Lösung reagiert schwach sauer. Die Substanz scheidet sich aus wässriger Lösung bei der schnelleren Auskrystallisation in Nadeln, bei der langsameren in Prismen aus, sie ist ziemlich leicht löslich in einer verdünnten Essigsäure und krystallisiert beim Eindampfen ohne Veränderung aus — bisweilen bekommt man auch einen amorphen Rückstand, welcher bei der Befeuchtung mit Wasser bald krystallinisch wird. — Die konzentrierte wässrige Lösung beginnt sich bei 30%iger Sättigung mit Ammonsulfat zu trüben, die Fällung ist bei 50%iger Sättigung beendet und praktisch vollständig, der Niederschlag wird beim Stehenlassen krystallinisch. Die Substanz ist löslich in verdünnter Salzsäure und verdünnter Schwefelsäure, leicht löslich in Natronlauge und Ammoniak. Aus der warmen Lösung in Normalsalzsäure scheidet sie sich beim Erkalten in veränderter, einheitlich polyedrischer Krystallform frei von Salzsäure ab.

Die Substanz wird aus einer wässrigen Lösung weder durch Pikrinsäure, noch durch Ferrocyankalium und Essigsäure gefällt, ebensowenig durch Salpetersäure. Sie gibt alle Farbenreaktionen der Eiweißstoffe mit Ausnahme der Molischschen Reaktion.

Die aus Wasser krystallisierte Substanz enthält Krystallwasser.

0,3826 g der an der Luft getrockneten Substanz verloren bei 100° C. 0,0602 g H₂O.

$$\text{H}_2\text{O} = 15,73\%$$

Die Analysen der mehrmals aus Wasser umkrystallisierten und bei 100° C. zum konstanten Gewicht getrockneten Substanz gaben die folgenden Werte.

0,1525 g Substanz gaben 0,2685 g CO₂ und 0,0785 g H₂O.

$$\text{C} = 48,02\%$$

$$\text{H} = 5,71\%$$

0,1420 g Substanz gaben 18,7 ccm N bei T. = 16° C., B. = 765 mm.

$$\text{N} = 15,38\%$$

In zwei weiteren Bestimmungen nach Kjeldahl verbrauchten 0,1890 g 20,95 ccm und 0,1866 g Substanz 20,9 ccm ¹/₁₀ N-Säure.

$$\text{N} = 15,60\%$$

$$\text{N} = 15,72\%$$

0,1961 g Substanz gaben 0,1029 g BaSO₄.

$$\text{S} = 7,20\%$$

Will man aus den Ergebnissen der Analyse eine Formel berechnen und dabei S₂ zugrunde legen, so findet sich eine gute Übereinstimmung für die Formel (C₃₆H₅₀N₁₀S₂O₁₃)_n.

Berechnet: C 48,27 H 5,63 N 15,69 S 7,16 O 23,25%

Gefunden: C 48,02 H 5,71 N 15,60 S 7,20 [O 23,47%].

$$15,72$$

Für den Krystallwassergehalt würden 9 H₂O anzunehmen sein: C₃₆H₅₀N₁₀S₂O₁₃ + 9 H₂O.

$$\text{Berechnet: H}_2\text{O } 15,35\%$$

$$\text{Gefunden: H}_2\text{O } 15,73\%$$

Die Substanz ist linksdrehend.

0,3272 g Substanz in 17 ccm 20%iger Salzsäure in 2 dcm-Rohr drehte — 45'.

$$[\alpha]^D = - 19,25^\circ$$

Hydrolyse.

16 g des schneeweißen, umkrystallisierten Präparates wurden mit 150 ccm 25%iger Schwefelsäure 16 Stunden gekocht. Die dunkelgefärbte klare Lösung hierauf mit Wasser auf die 5fache Menge verdünnt, wobei die Flüssigkeit klar blieb. Die Lösung wurde mit Baryt von Schwefelsäure quantitativ befreit. Der Baryumniederschlag wurde mehrmals ausgekocht und dann getrocknet. Er betrug 69,5 g.

20 g des Niederschlags verbrauchten bei der Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl 34,6 ccm n_{10} -Schwefelsäure

$$N = 0,0484 \text{ g}$$

in 69,5 g Niederschlag

$$N = 0,1683 \text{ g.}$$

Das Filtrat wurde auf dem Wasserbade auf ca. 100 ccm eingeeengt. Der dabei ausgeschiedene Niederschlag, welcher unter dem Mikroskop in äußerst feinen Nadeln krystallisierte, wurde abgesaugt (Niederschlag 1). Die Menge betrug 1,10 g.

Das Filtrat wurde weiter eingedampft, bis die Hauptmasse des Tyrosins abgeschieden war und die Mutterlauge nur eine ganz schwache Millonsche Reaktion gab, sie wurde abgesaugt (Niederschlag 2). Die Menge betrug 1,12 g.

Der Niederschlag 1 war kaum in Wasser, ganz leicht löslich in verdünntem Ammoniak. Er wurde in einer geringen Menge Ammoniak gelöst, mit Tierkohle entfärbt und im Vakuumexsikkator langsam verdunstet, wobei er in sechsseitigen Tafeln auskrystallisierte. Die Krystalle gaben Schwefelbleiprobe und bestanden aus Cystin.

0,2100 g verbrauchten bei N-Bestimmung nach Kjeldahl 17,4 ccm n_{10} -Schwefelsäure.

Gefunden:	Berechnet für $C_6H_{12}N_2S_2O_4$:
N = 11,60%	N = 11,67%

Der Niederschlag 2 wurde in kochendem Wasser gelöst und unter Anwendung von Tierkohle umkrystallisiert. Er stellte eine Gemenge von Cystin und Tyrosin dar und gab Millons Reaktion und Schwefelbleiprobe. Die Trennung von beiden geschah durch fraktionierte Krystallisation und zum letzten

Male unter Anwendung von Ammoniak und Essigsäure. Daraus haben wir 0,43 g Tyrosin und 0,58 g Cystin isoliert.

Die Mutterlauge des Tyrosins wurde mit verdünnter Schwefelsäure bis zu einem Gehalt von 5% an Schwefelsäure — die ganze Flüssigkeitsmenge betrug 350 ccm — und mit Phosphorwolframsäurelösung gefällt. Der Niederschlag wurde nach 24 Stunden abgesaugt, mit schwefelsäurehaltigem Wasser gut ausgewaschen.

Der Niederschlag wurde mit Barytwasser zerlegt und nach der bekannten Methode auf die Diaminosäuren untersucht, merkwürdigerweise konnten wir kein Arginin finden. Auch Histidin ist wahrscheinlich nicht vorhanden, die Bromreaktion war negativ, nur eine schwache Diazoreaktion wies auf die Möglichkeit hin, daß geringe Mengen von Histidin vorhanden sein könnten. Ein reines Pikrolonat ließ sich nicht gewinnen. Dagegen wurde Lysin als Pikrat isoliert. Die Menge des Pikrates betrug 0,56 g = 0,22 g Lysin. Charakteristisch zersetzte es sich mit bekannter Heftigkeit bei langsamem Erhitzen bei 252° C.

Die Mutterlauge vom Phosphorwolframsäureniederschlag wurde mit Barytwasser von überschüssiger Phosphorwolframsäure, dann von überschüssigem Baryt befreit und auf dem Wasserbade eingedampft.

Ein kleiner Teil des Rückstandes wurde in einer geringen Menge Wasser gelöst, erwärmt, mit gesättigter alkoholischer Pikrinsäurelösung versetzt und bei 0° C. stehen gelassen, wobei sich kleine Kugeln, aber keine Nadeln von Glykokollpikrat ausschieden.

Der Rückstand, der einen zähen Sirup darstellte, wurde mit konzentrierter Salzsäure aufgenommen (ca. 20 ccm), mit Salzsäuregas gesättigt, mit einigen Krystallen von salzsaurer Glutaminsäure geimpft und 3 Tage im Eisschrank stehen gelassen, aber eine Auskrystallisation trat nicht ein.

Die Salzsäurelösung wurde im Vakuum vollständig eingedampft, nach der Vorschrift von Abderhalden mit der 3fachen Menge absolutem Alkohol versetzt und getrocknetes Salzsäuregas eingeleitet, einige Zeit stehen gelassen und unter vermindertem Druck abdestilliert. Der Rückstand wurde noch-

mals mit absolutem Alkohol und Salzsäuregas behandelt und abdestilliert.

Das so gewonnene Esterchlorhydrat wurde genau nach der Vorschrift unter starker Abkühlung unter Anwendung von Natronlauge und Kaliumcarbonat von Salzsäure befreit, mit Äther aufgenommen. Die ätherische Lösung wurde mit ausgeglühtem Natriumsulfat getrocknet.

Der Rückstand wurde mit Äther erschöpft, nochmals verestert, ausgeäthert und der Äther getrocknet.

Die vereinigte ätherische Esterlösung wurde bei 40° destilliert. Der Rückstand wurde sofort der fraktionierten Destillation bei 12—13 mm Druck unterworfen.

Die erste Fraktion bis 60° C. betrug 1,58 g, die zweite bis 100° C. 2,69 g, die dritte bis 150° C. 0,72 g, die vierte bis 180° C. eine geringe Menge.

Zur Verseifung wurden die erste, zweite und dritte Fraktion jede für sich mit der 10fachen Menge Wasser am Rückflußkühler bis zum Verschwinden der alkalischen Reaktion gekocht. Nach dem Erkalten blieben alle drei Fraktionen ganz klar. Sie wurden verdampft und die Rückstände mehrmals mit absolutem Alkohol ausgekocht.

Die vereinigte alkoholische Lösung ließ beim Verdampfen 0,73 g Substanz zurück, welche in das Kupfersalz übergeführt wurde. Dieses wurde mit absolutem Alkohol ausgekocht und dadurch das aktive vom racemischen Prolin getrennt. Das letzte wurde aus Wasser umkrystallisiert und an der Luft getrocknet.

0,1409 g Kupfersalz gaben 0,0345 g CuO.

Gefunden: Berechnet für $(C_5H_8O_2N)_2Cu + 2 H_2O$:

Cu = 19,56%

Cu = 19,48%

Der in Alkohol unlösliche Rückstand der ersten Fraktion — Menge: 0,44 g — wurde in 20 ccm Wasser heiß gelöst und mit gesättigter alkoholischer Pikrinsäurelösung versetzt, 24 Stunden bei 0° C. stehen gelassen. Hier schieden sich nun doch typische Glykokollpikratnadeln in der geringen Menge von 0,18 g ab, die bei 190° schmolzen. Also haben wir aus dieser Fraktion 0,05 g Glykokoll gewonnen.

Das Filtrat von Glykokollpikrat wurde mit Salzsäure ver-

setzt und ausgeäthert. Die von der ätherischen Lösung abgetrennte Flüssigkeit wurde mit gelbem Bleioxyd von der Salzsäure, dann durch Schwefelwasserstoff vom gelöstem Blei befreit und eingedampft. Die zuerst auskrystallisierte Substanz wurde analysiert.

0,1403 g Substanz verbrauchten bei der N-Bestimmung nach Kjeldahl 15,6 ccm n_{10} -Schwefelsäure.

Gefunden: Berechnet für $C_3H_7O_2N$:

N = 15,57% N = 15,73%

Der in Alkohol unlösliche Rückstand der zweiten Fraktion, die in Wasser sehr leicht löslich war, wurde mit Methylalkohol ausgekocht und nach dem Erkalten filtriert. Die unlösliche Substanz haben wir in das Kupfersalz übergeführt, welches in Nadeln krystallisierte und leicht löslich war. Die Menge des Salzes betrug 1,42 g.

0,1864 g des krystallwasserfrei getrockneten Kupfersalzes gaben 0,0624 g CuO.

Gefunden: Berechnet für $(C_3H_6NO_2)_2Cu$:

Cu = 26,74% Cu = 26,51%

Aus der Löslichkeit der freien Säure und den Eigenschaften des Kupfersalzes ist das Vorhanden des Leucins in dieser Fraktion ausgeschlossen.

Die methylalkoholische Lösung wurde auf dem Wasserbade eingedampft. Der Rückstand krystallisierte in Blättchen — Menge: 0,27 g. Das daraus gewonnene Kupfersalz des Valins krystallisierte in Blättchen.

0,1562 g des bei 100° C. getrockneten Kupfersalzes gaben 0,0432 g CuO.

Gefunden: Berechnet für $(C_3H_{10}NO_2)_2Cu$:

Cu = 22,09% Cu = 21,52%

Wir haben also einen etwas hohen Kupferwert für Valinkupfer gefunden. Das kommt wahrscheinlich von Alanin, welches in geringer Menge in den Methylalkohol überging.

Den in Alkohol unlöslichen Rückstand der dritten Fraktion haben wir wie den der zweiten Fraktion behandelt. Aus der methylalkoholischen Lösung wurde 0,12 g Valin gewonnen. Das Kupfersalz, welches aus dem in Methylalkohol unlöslichen Teil

hergestellt war, war schwer löslich in Wasser und krystallisierte in Blättchen. Wegen des Mangels an Material konnten wir es nicht identifizieren.

Es ließen sich demnach an Spaltungsprodukten mit Sicherheit feststellen:

Substanz	Erhaltene Menge g	Berechnet für 100 g Eiweißkörper g
Cystin	1,69	10,60
Tyrosin	0,43	2,68
Lysin	0,22	1,38
Glykokoll	0,05	0,31
Alanin	1,44	8,99
Prolin	0,73	4,56
Valin	0,39	2,43