

Einige Bemerkungen über das Histidin.

Von

A. Kossel und S. Edlbacher.

Bei den Untersuchungen über den Nachweis des Histidins, welche K. Inouye im hiesigen Institut anstellte,¹⁾ ergaben sich folgende Tatsachen: Die von H. Pauly beschriebene²⁾ Kuppelung des Histidins mit Diazobenzolsulfosäure, welche zur Bildung eines roten Farbstoffs führt, tritt auch beim Monobenzoylhistidin ein. Diese Reaktion erfolgt jedoch nicht, wenn das im Proteinmolekül gebundene Histidin nach vorheriger Anwendung der Schotten-Baumannschen Reaktion mit Benzoylchlorid und Natronlauge der Einwirkung der Diazobenzolsulfosäure unterworfen wird. Ebenso wie das intraprotein gebundene Histidin verhält sich der Histidinmethyläther.

Inouye zog hieraus den Schluß, daß es die Peptidbindung der Carboxylgruppe ist, «welche den Eintritt der Benzoylgruppe in den Imidazolkern in einer solchen Weise ermöglicht, daß nunmehr die Reaktion mit Diazobenzolsulfosäure nicht mehr erfolgen kann».³⁾

Bald nach dem Erscheinen dieser Mitteilung machte Herr A. Windaus uns durch Übersendung seiner 1910 erschienenen «Notiz über die Aufspaltung des Imidazolringes»⁴⁾ auf eine von ihm beobachtete Tatsache aufmerksam, welche eine Erklärung für das Verhalten des Histidins zu geben schien. Herr Windaus war nämlich durch seine Untersuchungen über das Verhalten des Imidazypropionsäureamids zu Benzoylchlorid und Natronlauge zu dem Schluß gekommen, daß unter diesen Umständen «die Beständigkeit der Imidazolcarbonsäuren durch das Vorhandensein einer freien Carboxylgruppe bedingt ist und durch Veresterung der Carboxylgruppe zum Verschwinden gebracht wird». Hiernach müßte auch der Imidazolring des Histidins durch Benzoylchlorid und Alkali in der von Bam-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 83, S. 79 (1912).

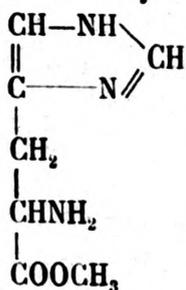
²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 42, S. 508 (1904).

³⁾ Nach unseren Beobachtungen wird das Eintreten der Rotfärbung nicht — wie Inouye angibt — durch überschüssiges Benzoylchlorid, wohl aber durch Natronlauge beeinträchtigt.

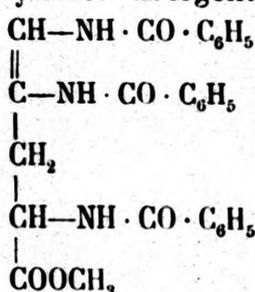
⁴⁾ Chem. Ber., Bd. 43, S. 499 (1910).

berger und Berlé festgestellten Weise¹⁾ aufgespalten werden, wenn die Carboxylgruppe dieser Amidosäure gebunden ist. Hingegen sollte die Aufspaltung nicht erfolgen, wenn die Carboxylgruppe frei ist. Da nun nach Pauly die Reaktion des Histidins mit Diazobenzolsulfosäure auf dem Vorhandensein eines Imidazolkerns beruht, so müßte die Rotfärbung durch dieses Reagens unter diesen Umständen verloren gehen und es wäre somit eine Erklärung für die von Inouye beschriebenen Erscheinungen gegeben.

Wir haben einige Versuche über das Verhalten des Histidins angestellt, welche diese Auffassung bestätigen. Unsere Versuche zeigen, daß der Histidinmethylester durch Benzoylierung in einen Tribenzoyltriamidosäuremethylester übergeht.



Histidinmethylester



Tribenzoylprodukt

Zur Darstellung des Benzoylprodukts wurden 4 g Histidinmethylesterdichlorhydrat²⁾ in 100 g Wasser gelöst und 40 g kristallisierte Soda gepulvert eingetragen.

In diese Lösung wurden unter beständigem Schütteln allmählich 20 g Benzoylchlorid eingetropft. Nun wurde noch ungefähr eine Stunde im offenen Gefäß kräftig geschüttelt, wobei sich das Reaktionsprodukt in weißen Krümmeln ausscheidet. Nachdem das Tribenzoylprodukt über Nacht gestanden hatte, wurde die alkalische Flüssigkeit abgegossen und die ausgeschiedene Masse mit Äther in der Reibschale verrieben, um eingeschlossenes unverändertes Benzoylchlorid zu entfernen. Dann wurde abgesaugt und aus verdünntem Alkohol umkristallisiert. Die Ausbeute entspricht ungefähr 60% der Theorie an reinem Produkt. Wie zu erwarten war, gab das reine Produkt keine Farbenreaktion mit Diazobenzolsulfosäure.

¹⁾ Ann. der Chem. 273, 342 (1893).

²⁾ Pauly, l. c.

Mit zunehmender Reinheit nimmt die Löslichkeit in Alkohol ab. Die Substanz ist unlöslich in Wasser und in Äther, relativ leicht löslich in Eisessig. Sie krystallisiert in langen verfilzten Nadeln vom Schmelzpunkt 219° (unscharf). Sie löst sich bei ganz geringem Erwärmen in wässrigen Alkalien und in konzentrierter Salzsäure. Trotz der vorhandenen Doppelbindung scheint sie nur schwierig Brom zu addieren, während sie von Kaliumpermanganat und Soda leicht angegriffen wird.

Die Analysen nach Pregl lieferten folgende Zahlen:

2,88 mg gaben 0,217 ccm N (748 mm, 16°) gef.: 8,76% N

Für $C_{27}H_{25}N_3O_5$ berechnet: 8,91% N

5,510 mg gaben 2,73 mg H_2O und 13,88 mg CO_2 , gef.: 5,54% H; 68,70% C

Für $C_{27}H_{25}N_3O_5$ berechnet: 5,35% H; 68,76% C

Der durch die obige Reaktion geöffnete Imidazolring scheint sich beim trocknen Erhitzen des Tribenzoylprodukts leicht wieder zu schließen, offenbar geht hier eine Reaktion vor sich, welche der Schließung des Glyoxalidinringes beim Erhitzen der Acylderivate des Äthylendiamins und anderer Diamine analog ist.¹⁾ Erhitzt man das Tribenzoylprodukt im trockenen Reagensglas, so erhält man einen Rückstand, welcher die Rotfärbung mit Diazobenzolsulfosäure und Alkalicarbonat gibt.

Das Carnosin, welches nach den Untersuchungen von Gulewitsch²⁾ eine Verbindung von Histidin mit β -Alanin ist, verhält sich bei dieser Reaktion ebenso, wie das freie Histidin, d. h. der Imidazolring wird durch Benzoylchlorid weder bei Gegenwart von Natriumcarbonat, noch von Natronhydrat geöffnet. Eine Entscheidung der Frage, welcher der beiden Bausteine des Carnosins als Acyl vorhanden ist, läßt sich auf diesem Wege nicht erbringen, denn es ist selbstverständlich nicht ausgeschlossen, daß auch die freie Carboxylgruppe einer mit dem Histidin peptidartig verbundenen Amidosäure eine schützende Wirkung auf den Imidazolring ausüben kann.

Im Anschluß an diese Ergebnisse wollen wir erwähnen, daß die Carboxylgruppe des Histidins einen ähnlichen Einfluß auf die Reaktion des Imidazolkerns gegen den Formaldehyd

¹⁾ A. W. Hofmann, Chem. Ber. 21, S. 2332 (1888).

²⁾ W. v. Gulewitsch, Diese Zeitschrift, 73, S. 434 (1911).

hat. Wir halten dies mit Rücksicht auf die Formoltitration der Proteinstoffe und ihrer nächsten Spaltungsprodukte für bemerkenswert.

Das Imidazol selbst reagiert mit Formaldehyd. Wenn man eine $\frac{n}{10}$ -Lösung von Imidazol mit Salzsäure auf Lackmusneutralität bringt und sodann mit Formaldehyd versetzt, so wird die zur Neutralisation erforderliche Salzsäuremenge annähernd wieder frei. Bei unsern Versuchen entsprach die freiwerdende Säuremenge¹⁾ 84—85% der auf ein basisches Äquivalent des Imidazols berechneten Säuremenge. Von den beiden Stickstoffatomen des Imidazols wird also das eine, welches die alkalische Reaktion bedingt, annähernd vollständig mit Formaldehyd gekuppelt.

Da nun das Alanin, wie Sörensen zuerst gezeigt hat, ebenfalls ein mit Formaldehyd reagierendes Stickstoffatom enthält, so könnte man erwarten, daß das Imidazylalanin oder Histidin zwei mit Formaldehyd kuppelnde Stickstoffatome besitzen würde. Dies ist aber nicht der Fall. Nach den Untersuchungen von Sörensen reagiert nur eines der drei Stickstoffatome des Histidins mit Formaldehyd. Bei drei Versuchen fand Sörensen:²⁾ 97; 96; 94,3% der für ein reagierendes Stickstoffatom berechneten Menge. Henriques und Gjaldbäk³⁾ gaben später eine höhere Zahl an, nämlich 131—152% der für ein reagierendes Stickstoffatom berechneten Menge (43—50,8% des gesamten Stickstoffs). Wegen dieser mangelnden Übereinstimmung haben wir die Formoltitrierung des Histidins (unter Anwendung von Phenolphthalein und Thymolphthalein) noch einmal geprüft und hierbei in 4 Versuchen die Werte: 118; 118; 116; 133% der auf ein reagierendes Stickstoffatom berechneten Menge gefunden.

Bedeutend höhere Werte ergaben sich jedoch, als wir den Methylester des Histidins untersuchten. Hier erhielten wir bei 2 Versuchen 174 und 200%. Nach diesen Versuchen

¹⁾ Thymolphthalein als Indikator.

²⁾ Sörensen, Comptes rendus du laboratoire de Carlsberg, 7, 1 (1907), s. auch Biochemische Zeitschr., Bd. 7, S. 77.

³⁾ Henriques und Gjaldbäk, Diese Zeitschr., Bd. 75, S. 379 (1911).

nähert sich die gefundene Zahl der Formaldehydbindung von zweien der drei im Histidin enthaltenen Stickstoffatome. Die Ungenauigkeit der Zahlenwerte sind mindestens zum Teil auf die Schwierigkeit der Lackmusneutralisation zurückzuführen.¹⁾ Vergleicht man die Werte, welche für das Imidazol, das Imidazolalanin und den Imidazolalaninester gefunden sind, so ergibt sich trotz dieser Ungenauigkeiten, daß die Gegenwart einer freien Carboxylgruppe auch in diesem Fall die Reaktionsfähigkeit des Imidazolkerns mit Formaldehyd herabsetzt, ähnlich wie dies beim Benzoylchlorid der Fall ist.

Neuerdings haben Obermayer und Willheim die Ansicht geäußert, daß es mit Hilfe der Formoltitrierung gelingt, «die endständigen Amidogruppen in einer bestimmten Eiweißmenge zu titrieren». ²⁾ Diesem Satz widersprechen die Ergebnisse der Untersuchungen von A. Kossel und Gawrilow;³⁾ denn es hat sich gezeigt, daß diejenigen Proteine, bei denen der reichste Gehalt an freien Amidogruppen nachgewiesen werden konnte, z. B. die Protamine der Salmingruppe, überhaupt nicht mit Formaldehyd unter den Bedingungen der Sörensenschen Formoltitrierung reagieren. Es sind also im Proteinmolekül Amidogruppen vorhanden, welche durch die Formoltitrierung nicht angezeigt werden, andererseits kann die Formolbindung aber auch in solche Teile des Proteinmoleküls eintreten, welche keine Amidogruppen enthalten. Ersteres ist der Fall bei der freien Amidogruppe des im Protein gebundenen Guanidins, letzteres beim Imidazolring des im Protein enthaltenden Histidins, dessen Carboxylgruppe peptidartig gebunden ist. Einige Erfahrungen, welche später mitgeteilt werden sollen, weisen darauf hin, daß noch andere formolbindende Gruppen im unzersetzten Proteinmolekül auftreten können. —

¹⁾ Auch Henriques und Gjaldbäk weisen auf diese Schwierigkeit hin.

²⁾ Obermayer und Willheim, *Biochemische Zeitschrift*, Bd. 50, S. 384 (1913), s. auch ebenda, Bd. 38, S. 338 (1912).

³⁾ A. Kossel und Gawrilow, *Diese Zeitschrift*, Bd. 81, S. 274 (1912).