

Über die freien Amidogruppen der Eiweißkörper.

(Schluß.)

Von

S. Edlbacher.

Mit 1 Figur.

(Aus dem Institut für Eiweißforschung, Stiftung Fritz Behringer, der Universität Heidelberg.)

(Der Redaktion zugegangen am 14. Dezember 1920.)

Die Fragen, die in den vorangegangenen Untersuchungen¹⁾ über dieses Thema behandelt wurden, gewannen durch die inzwischen von K. Felix²⁾ und J. Herzig³⁾ mitgeteilten Resultate eine zweifache Bedeutung.

Einerseits ist es durch die von Felix ermittelten Lysinwerte bei verschiedenen Proteinen nun wohl ziemlich sichergestellt, daß die von Kossel und Gawrilow⁴⁾ gemachte Feststellung über die Beziehung zwischen freien Amidogruppen und Lysingehalt richtig ist. Das Ergebnis dieser Untersuchung steht in Übereinstimmung mit meinen Beobachtungen.

Andererseits ist nach Herzig die Möglichkeit einer Monomethylierung der Proteine durch Dimethylsulfat ins Auge zu fassen. Eindeutig bewiesen ist weder meine, noch Herzigs Anschauung.

Skraup⁵⁾ hat schon methylierte Proteine hydrolysiert

¹⁾ Diese Zeitschr. Bd. 107, S. 52 (1919); Bd. 108, S. 287 (1919); Bd. 110, S. 153 (1920).

²⁾ Diese Zeitschr. Bd. 110, S. 217 (1920).

³⁾ Diese Zeitschr. Bd. 111, S. 224 (1920).

⁴⁾ Diese Zeitschr. Bd. 75, S. 457 (1912).

⁵⁾ M. Bd. 30, S. 447 (1909); M. Bd. 31, S. 1035 (1910).

und ich habe diese Versuche wieder aufgenommen und bin zu ähnlichen Resultaten gelangt wie dieser.

Ich hydrolysierte Methylcasein und erhielt dabei in der „Lysinfraktion“ eine größere Menge einer sirupösen Masse von schwach fischartigem Geruch, aus der es auf keinerlei Weise gelang, definierte Substanzen abzuscheiden.

Die drei Fraktionen, die man durch Phosphorwolframsäure und das Silberbarytverfahren erhält, nämlich die „Monoamino-“, die „Histidin-Arginin-“ und die „Lysinfraktion“ habe ich nun auf die „N-Methylzahl“ untersucht und es ergab sich dabei das Folgende:

1. In der Monoaminosäurefraktion ist die N-Methylzahl = 0.
2. In der Histidin-Argininfraktion ist die N-Methylzahl = 7,5.
3. In der Lysinfraktion ist die N-Methylzahl = 73,4.

Die Frage, ob im wesentlichen am Stickstoff trimethyliertes Casein vorlag, ist dadurch natürlich nicht eindeutig entschieden. Immerhin aber gestattet die Tatsache, daß fast alles Methylierte in Form von starken Basen wiedergefunden wurde, den Schluß, daß wohl wahrscheinlich eine große Menge von betainartigen Substanzen sich gebildet haben muß.

Da andererseits aber Herzig und Landsteiner¹⁾ bei der Behandlung von Diazomethan und Aminosäuren nur Monosubstitution finden, wäre es vielleicht doch möglich, daß die Übereinstimmung zwischen den früheren Zahlen dieser Autoren und meinen nur eine zufällige ist.

Selbstverständlich schließt das aber nicht aus, daß auch bei meinem Verfahren eine geringe Menge von N-Atomen monomethyliert wird.

Zusammenfassend seien hier nochmals die wichtigsten Ergebnisse dieser Untersuchungsreihen angeführt:

1. Durch die Methylierungsmethode mit Dimethylsulfat gelingt es, Unterschiede zwischen Proteinen zu finden, die sich den bisherigen Methoden entzogen haben.

¹⁾ Biochem. Zeitschr. Bd. 105, S. 111 (1920).

2. Es besteht eine Beziehung zwischen freien Amidogruppen und Lysingehalt.
3. Im Proteinmolekül besteht ein primärer Zustand, der, wenn einmal gelöst, einem sekundären Zustande weicht.
4. Zwischen N-Methylzahl und Formolzahl der Proteine und ihrer Hydrolysate bestehen gesetzmäßige Beziehungen, die bei einzelnen Klassen von Proteinen verschiedenen Regeln zu folgen scheinen.
5. Ich vermute, daß die Hauptmenge der eintretenden Methylgruppen als Trimethylaminogruppen gebunden wird.

Experimenteller Teil.

1. Darstellung von Methylcasein.

200 g bestes Kahlbaumsches Casein wurden in 2 l destilliertem Wasser suspendiert und unter starkem Turbinieren und Eiskühlung allmählich 1 l 10%iger Natronlauge, die ebenfalls auf -5° abgekühlt war, im Laufe von $\frac{1}{2}$ Stunde zugetropft. In diese stark alkalische Lösung wurden nun im Verlauf einer weiteren $\frac{1}{2}$ Stunde und unter fortgesetzter starker Kühlung 200 g Dimethylsulfat zugetropft. Dann wurde noch 15 Minuten lang turbiniert und nun mit gut gekühlter 10%iger Schwefelsäure angesäuert. Die dicke weiße Ausflockung wurde durch ein Faltenfilter abfiltriert. Der Filterrückstand wurde 3mal in je 1 l Eiswasser suspendiert und mit eisgekühlter 10%iger Natronlauge gelöst, wieder mit verdünnter Schwefelsäure und Natriumsulfatlösung gefällt, die Fällung jedesmal auszentrifugiert und endlich noch 2mal in gesättigter Natriumsulfatlösung aufgeschwemmt und wieder auszentrifugiert. Schließlich wurde in einem Tuche gut ausgepreßt. Während dieser ganzen Manipulation wurde immer etwas Toluol zugesetzt, um sekundäre Zersetzungen hintanzuhalten.

Endlich wurde das Produkt in 80%igem Alkohol in der Hitze gelöst, mit Äther gefällt und im Vakuum getrocknet. Ausbeute 170 g.

Das so erhaltene Produkt ist ein fast rein weißes Pulver, das in Wasser gut, noch viel schneller in heißem Wasser

löslich ist. Die wäßrige Lösung reagiert sauer und wird durch Säure und Salzlösungen gefällt. In Alkalien ist das Methylcasein leicht löslich.

Die Paulysche Diazoreaktion sowie die Glyoxylsäureprobe sind positiv, während die Millonsche Probe erst nach längerem Kochen positiven Ausschlag gibt.

2. Hydrolyse des Methylcaseins.

100 g Methylcasein wurden mit 300 g konzentrierter Schwefelsäure und 600 g Wasser zunächst am Wasserbade 6 Stunden, dann am Paraffinbade 20 Stunden lang hydrolysiert. Aus dem von der Schwefelsäure mit Baryt befreiten Hydrolysat ließen sich beim Einengen größere Mengen von Leucin isolieren. In den sich ausscheidenden Kristallmassen war die Schwefelblei- und Millonreaktion immer negativ.

Das ausgeschiedene Leucin wurde dann wieder mit der Flüssigkeit vereinigt und die auf 1 l verdünnte Lösung in der üblichen Weise mit Phosphorwolframsäure gefällt, wozu ca. 400 g von diesem Reagens notwendig waren.

Aus dem Filtrate vom Phosphorwolframsäureniederschlag wurden 55,5 g Kristallmasse gewonnen. In dieser „Monoaminosäurefraktion“ ergab eine Methylimidbestimmung, daß kein Methylimid vorhanden war.

Die ausgefällten Phosphorwolframate wurden nach dem Kosselschen Silberbarytverfahren in die Histidin- + Argininfraktion und in die Lysinfraktion zerlegt.

Arginin- + Histidinfraktion: Diazoreaktion positiv. Die Lösung wurde auf 100 ccm gebracht.

20 ccm dieser Lösung ergaben nach Kjeldahl: 60,4 ccm n/10 Säure = 84,56 mg N.

20 ccm auf 50 ccm verdünnt, davon 1 ccm: 2,13 mg AgJ.
Es berechnet sich daraus eine N-Methylzahl = 7,5.

Lysinfraktion: Diese stellte einen fast farblosen Sirup von 16 g dar, der fischartigen Geruch zeigte. Mit alkoholischer Pikrinsäure entsteht eine harzige Fällung; ebenso entstehen rotbraune Fällungen mit Kalium-Wismuth-Jodid und Jodjodkalium. Es gelang durchaus nicht, daraus irgendwelche

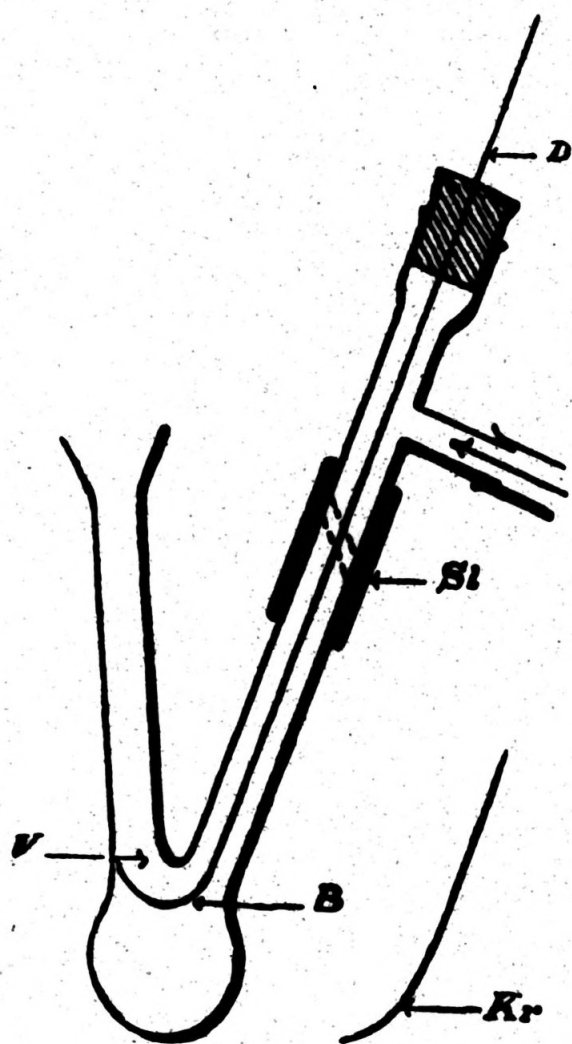
kristallisierte Verbindungen abzuscheiden (siehe Skraup loc. cit.). 20 g Sirup wurden auf 100 ccm verdünnt.

20 ccm dieser Lösung ergaben nach Kjeldahl: 42,4 ccm n/10 Säure = 59,36 mg N.

20 ccm auf 50 ccm verdünnt, davon 1 ccm: 14,60 mg AgJ.
Daraus berechnet sich eine N-Methylzahl = 73,4.

3. Bemerkungen zur Ausführung der Methylimidbestimmung.

In dem von mir¹⁾ modifizierten Preglschen²⁾ Apparate von Herzig-Meyer kommt es manchmal, besonders gegen Ende der Reaktion, zu einer Verstopfung des aufsteigenden Schenkels des Quarzkölbchens.



Dies tritt, soweit meine Erfahrung reicht, niemals ein, wenn man mit kristallisierten einfachen Substanzen arbeitet, wohl aber, wenn es sich um schwer zersetzliche Produkte handelt, wie Peptone und Eiweißkörper, oder Organe, Serum usw. Um nun dieses lästige Hindernis auszuschalten, ist es notwendig, einerseits nur eine geringe Menge Jodammonium in das Kölbchen zu geben (ca.

20 mg), und andererseits habe ich die folgende einfache Änderung an dem Apparate angebracht (siehe die Figur).

Auf das Kölbchen wird durch ein Schlauchstück (Sl) ein T-förmiges Rührchen fest aufgesetzt. Das obere Ende des-

¹⁾ Diese Zeitschr. Bd. 101, S. 278 (1918).

²⁾ F. Pregl, Die quantitative organische Mikroanalyse (Springer, Berlin 1917).

selben ist durch einen Kork verschlossen, durch den durch eine feine Bohrung ein Kupferdraht (*D*) geführt wird, der an seinem unteren Ende (etwa dort, wo die beiden Teile des Apparates schräg aneinanderstoßen) einen Platindraht aufgelötet trägt. Hat man die Jodwasserstoffsäure eingefüllt, so setzt man das $\bar{\top}$ -Röhrchen auf, nachdem man dem Platindraht zuerst eine schwache Krümmung am unteren Ende erteilt hat, so daß er gerade noch durch den engen Schenkel des Kölbchens durchgeführt werden kann (*Kr*). Hierauf drückt man den Draht, bei *D* fassend, stark gegen den Boden des Kölbchens; der Platindraht krümmt sich nun nach aufwärts und man zieht nun bei *D* wieder leise zurück, bis das Ende des Platindrahtes in den andern Schenkel des Kölbchens reicht. Verstopft sich nun im Laufe der Bestimmung der Apparat, so tritt das immer an der Stelle *V* ein; man braucht dann nichts weiter zu tun, als bei *D* fest nach oben zu ziehen. Die gekrümmte Spitze des Platindrahtes reißt dann die festgebackenen Massen los.
