

Über das Desamidoglutin

von

Zd. H. Skraup,

w. M. k. Akad.

Aus dem chemischen Institute der k. k. Universität Graz.

(Vorgelegt in der Sitzung am 10. Mai 1906.)

Die Einwirkung von salpetriger Säure auf Kasein hat gezeigt,¹ daß dieses hiebei eine Veränderung erleidet, die sich schon in der Zusammensetzung, am auffälligsten aber nach der Hydrolyse, und zwar darin zeigt, daß nach dieser zwar die meisten Aminosäuren nachzuweisen sind, wie sie sonst aus dem ursprünglichen Kasein entstehen, nicht aber das Tyrosin (vielleicht auch Alanin) und daß von den Diaminverbindungen Histidin in anscheinend unveränderter Menge, Arginin in verminderter auftreten, das Lysin aber gar nicht auftritt. Die Reaktion ist infolge dieses, für die Konstitution des Kaseins nicht unwichtigen Resultates auf andere Proteine ausgedehnt worden. In dieser Mitteilung soll über ähnliche Versuche mit dem Glutin berichtet werden.

Wird Glutin mit salpetriger Säure behandelt, so geht es anscheinend ohne wesentliche Gewichtsänderung in einen Stoff, das Desamidoglutin, über, das ähnliche Löslichkeitsverhältnisse zeigt wie das Glutin, welches aber keine Klebkraft besitzt. Es gibt die Biuretreaktion ebenso intensiv wie das Glutin, nur mehr rotstichig. Der Schwefelgehalt ist ungefähr auf ein Drittel reduziert, das Verhältnis zwischen Kohlenstoff,

¹ Skraup und Hörnes, Monatshefte für Chemie, 1906.

Wasserstoff, Stickstoff und Sauerstoff aber nicht wesentlich anders wie im Glutin.

Nach der Hydrolyse mit Salzsäure sind ätherlösliche Säuren mit Sicherheit nicht nachweisbar, nur Oxalsäure scheint entstanden zu sein.

Auf die Monoaminosäuren wurde nicht besonders untersucht, daß Glycocoll in großen Mengen vorhanden ist, war aber leicht nachzuweisen.

Bei der Untersuchung auf Histonbasen wurde Histidin und Arginin aufgefunden, Lysin aber nicht. Es ist das also derselbe negative Befund wie beim Kasein. Aus dem Phosphorwolframat, welches bei Ausführung des Kossel-Kutscherischen Verfahren sonst das Lysin enthält, ließ sich statt des Lysinpikrates ein anderes, sehr gut kristallisierendes Pikrat erhalten, welches unbedingt von jenem verschieden ist, welches bei wiederholtem Umkristallisieren weder im Schmelzpunkte noch in der Zusammensetzung wesentliche Änderungen zeigte, welches aber doch ein Gemisch sein dürfte. Die Analysen stimmen zwar am besten auf ein Pikrat einer Aminovaleriansäure, nach Zerlegung mit Schwefelsäure und Abscheidung der Pikrinsäure kristallisierte aber ein Gemisch mehrerer Substanzen, von welchen die eine bei 252°, eine andere aber bei etwa 220° schmilzt und von denen die höher schmelzende die Zusammensetzung einer Oxyaminovaleriansäure hat. Es werden Untersuchungen in größerem Maßstab ausgeführt, um diese Unsicherheit zu beheben. Mit einiger Sicherheit läßt sich aber doch schon annehmen, daß auch im Glutin der Lysinrest mit anderen Resten derart kombiniert ist, daß zum wenigsten eine Aminogruppe frei beweglich ist.

Experimenteller Teil.

200 g Gelatine (Merck, Goldmarke) wurden in 1 l Wasser heiß gelöst, sodann mit einem zweiten Liter Wasser verdünnt, abgekühlt, eine Lösung von 200 g Natriumnitrit in 1 l Wasser zugefügt und endlich 140 g Eisessig allmählich eingegossen. Es trat mäßige Gasentwicklung ein, der lose verstopfte Kolben blieb über Nacht stehen. Die anfänglich rötlichbraun gewordene

Flüssigkeit war am Morgen lichter und ausgesprochen mehr gelb gefärbt.

Die nahezu völlig klare Lösung wurde 2 Stunden am Wasserbad erwärmt; die beim Erwärmen lebhafter gewordene Gasentwicklung war dann fast beendet.

Bei einem Vorversuche zeigte sich, daß eine konzentrierte Lösung von Ammonsulfat relativ leicht ausfällt. Entsprechend den dabei ermittelten Mengen wurde die Reaktionsflüssigkeit auf 1 kg festes Ammonsulfat gegossen und dieses durch Umrühren zur Lösung gebracht. Dabei tritt sehr lebhaftes Schäumen ein, bei vorsichtigem Zugießen ist das Übersteigen aber leicht zu vermeiden. Es scheidet sich ein zähes, lichtgelbes Harz ab; beim Umrühren tritt fast völlige Klärung ein und die Flüssigkeit gibt bei weiterem Eintragen von Ammonsulfat eine so geringe Trübung, daß auf die Gewinnung dieses Restes verzichtet werden kann.

Das halb feste Harz wurde zerteilt, auf Leinwand filtriert und, um anhängendes Nitrit zu entfernen, in 400 cm^3 warmen Wassers gelöst und in dieses neuerlich 200 g Ammonsulfat eingetragen. Das Ausgefällte wurde in 500 g Wasser gelöst und nun 300 g Ammonsalz eingetragen. Fällungen mit anderen Salzen sind viel geringer, es wurde deshalb auf eine vollständige Entfernung von Ammonsulfat für Zwecke der Hydrolyse verzichtet.

Für die Analyse wurde die Darstellung mit 10 g Gelatine wiederholt, die Ausfällung mit Ammonsulfat im ganzen viermal vorgenommen und die letzterhaltene Fällung in etwa 400 cm^3 kalten Wassers gelöst, mit mehrfach umkristallisiertem Ätzbaryt vermischt, bis der Niederschlag sich nicht mehr vermehrte, und dann Kohlendioxyd eingeleitet.

Das Gemenge von Baryumsulfat und Carbonat setzte sich nur zum geringsten Teile zu Boden, Filtrieren erwies sich als ganz unmöglich. Das Gefäß wurde, um Ammoniak und Ammoniumcarbonat möglichst schonend zu entfernen, über Schwefelsäure ins Vakuum gebracht. Aber auch nach einwöchentlichem Stehen war weder Klärung eingetreten noch Filtration möglich. Die im Vakuum auf die Hälfte konzentrierte Flüssigkeit wurde nun bei sehr gelinder Wärme soweit ein-

gedunstet, bis eine Probe mit etwa dem doppelten Volum Alkohol vermischt, in der Hitze gerade noch klar war, beim Erkalten aber eine harzige Fällung gab. Als nun die ganze Menge rasch fast bis zum Kochen erhitzt und Alkohol in dem genannten Verhältnisse zugefügt wurde, trat beim Erkalten völlige Klärung ein und die hellgelbe Flüssigkeit ließ sich vom Bodensatz abgießen. Sie wurde in einer Platinschale bei gelinder Wärme zum Sirup gedampft, der über Schwefelsäure im Vakuum bald hart und leicht zerreiblich wurde.

Die erste Fällung wurde in Wasser wieder aufgelöst, die Fällung mit Alkohol wiederholt und so im ganzen vier Fraktionen erhalten, die fast die ganze Menge der organischen Substanz enthielten. In der Reihenfolge, in der sie erhalten wurden, sollen sie mit 4, 3, 2 und 1 bezeichnet werden, wobei 1 die schwerstlösliche Fraktion, 4 die leichtestlösliche ist. Die vier Fällungen hatten das Gesamtgewicht von 10·7 g. Der Wassergehalt beträgt etwa 10⁰/₀. Es geht demnach die Gelatine fast vollständig in die Desamidoverbindung über, während dieses beim Kasein nicht der Fall ist. Vermutlich spielt beim Kasein die Kohlenhydratgruppe dabei mit.

Alle vier waren hellbräunlichgelbe, amorphe Harze, die zerrieben ein fast ungefärbtes Pulver gaben. Sie ließen sich erst durch langandauerndes Trocknen auf 125° im Vakuum auf konstantes Gewicht bringen.

Fraktion 4:

0·2470 g gaben 38·8 cm^3 N bei 16·5° und 734·5 mm.

Fraktion 3:

0·1729 g gaben 25·8 cm^3 N bei 16·5° und 730·5 mm.

0·1719 g gaben 0·3188 g CO₂ und 0·1043 g H₂O.

Fraktion 2:

0·2717 g gaben 40·6 cm^3 N bei 17° und 733 mm.

1·0056 g gaben 0·0106 g BaSO₄.

Fraktion 1:

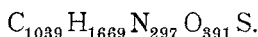
0·2540 g gaben 37·2 cm^3 N bei 17·5° und 731 mm.

0·1664 g gaben 0·3094 g CO₂ und 0·1077 g H₂O.

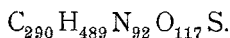
In 100 Teilen:

	Gefunden			
	1	2	3	4
C	50·72	—	50·58	—
H	7·24	—	6·48	—
N	16·67	16·96	—	17·88
S	—	0·14	—	—

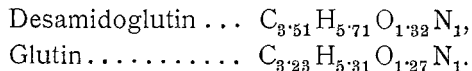
Unter der Annahme, daß ein einheitlicher schwefelhaltiger Stoff vorliegt und nicht etwa ein Gemisch eines schwefelhaltigen und eines schwefelfreien, berechnet sich das Atomverhältnis



Aus dem Mittel der für Glutin in dem Cohnheim'schen Buch angeführten Analysen ist das Atomverhältnis für Glutin



Läßt man den Schwefel außer Betracht und berechnet das Atomverhältnis auf $N = 1$, so ergibt sich für



Eine auffallende Veränderung ist deshalb — vom Schwefelgehalt abgesehen — nicht eingetreten und es wäre auch der Name Desamidoglutin nicht gerechtfertigt, wenn nicht die hydrolytische Spaltung Anhaltspunkte geben würde, daß in einer bestimmten Richtung doch Desamidierung angenommen werden kann.

Das Desamidoglutin löst sich in Wasser sehr leicht, ein Aufquellen ist dabei nicht zu beachten. Der wässerigen Lösung gehen auch klebrige Eigenschaften so gut wie ab. In Weingeist ist es um so schwerer löslich, je stärker er ist.

Die wässrige Lösung aller vier Fraktionen gibt die Biuretreaktion gleich stark; sie ist nicht schwächer wie die des Ausgangsmaterials, nur spielt sie noch mehr ins Rotviolette.

Hydrolyse des Desamidoglutins.

Das, wie früher beschrieben, aus 200 g Gelatine erhaltene und durch wiederholtes Ausfällen mit Ammonsulfat gereinigte

Harz wurde in 600 g rauchender Salzsäure gelöst und 13 Stunden im kochenden Wasserbad erwärmt. Die Lösung wurde sodann im Vakuum eingedampft, auf 1 l wieder verdünnt und viermal mit Äther ausgeschüttelt. Die wässrige Lösung sowohl wie die Ätherauszüge fluoreszieren stark, das unveränderte Glutin zeigte bei einem Parallelversuche diese Eigenschaft nicht. Der Rückstand der Ätherextrakte betrug bloß 0·3 g. Er zeigte Spuren von Kristallisation, beim Anrühren mit Wasser trat Harzabscheidung ein.

Die mit Äther ausgeschüttelte Flüssigkeit wurde auf ein Viertel eingedampft, wobei Ammonsulfat auskristallisierte. Es wurde das gleiche Volum Alkohol und das doppelte Volum Äther zugesetzt.

Die Ätheralkohollösung wurde abgedampft, wieder in Alkohol gelöst; es wurde nochmals mit Äther gefällt, der Ätheralkohol wieder abdestilliert, der Rückstand in Wasser gelöst und im Schacherl'schen Apparat anhaltend mit Äther extrahiert. Es gingen auch jetzt nur sehr geringe Mengen in den Äther, diese waren chlor- und stickstoffhältig. In einzelnen Fraktionen zeigten sich geringe Kristallisationen, die die Reaktionen der Oxalsäure gaben.

Die erste Ätheralkoholfällung löste sich, mit Alkohol übergossen, größtenteils; das nicht gelöste ist Ammonsulfat.

Die alkoholische Lösung eingedampft und mit viel Alkohol angerührt, hinterließ jetzt 30 g einer Kristallisation, die durch Ätzbaryt und Kohlensäure vom beigemengten Ammonsulfat beziehlich überschüssigem Ätzbaryt befreit und dann zur Kristallisation gedampft wurde.

Nach mehrfachem Umkristallisieren lag der Schmelzpunkt bei 234°.

Die Analyse bestätigte, daß Glycocoll vorliegt.

0·2565 g gaben 0·2989 g CO₂ und 0·1698 g H₂O.

In 100 Teilen:

	Berechnet	Gefunden
C	32·0	31·78
H	6·7	7·40

Die Rückstände der verschiedenen alkoholisch-ätherischen Lösungen wurden vereinigt und der nach dem Eindampfen hinterbleibende Rückstand auf 300 cm^3 gebracht.

Ein Teil wurde mit Phosphorwolframsäure ausgefällt, der Niederschlag mit 5% Schwefelsäure chlorfrei gewaschen, sodann in üblicher Weise zersetzt und dann dem Kossel-Kutschersehen Verfahren zur Trennung der Histonbasen unterworfen.

Parallel wurden dieselben Operationen mit einer gleichen Menge von Glutin, die gleichfalls mit Salzsäure hydrolysiert worden war, ausgeführt.

Die Untersuchung mit diesen zwei Phosphorwolframatengab nun, was das Histidin und Arginin betrifft, keine besonders auffälligen Unterschiede, wohl aber was das Lysin betrifft.

Aus dem nicht desamidierten Glutin wurde in dem nach Abscheidung von Histidin und Arginin dargestellten Phosphorwolframate unschwer ein in Alkohol und Wasser schwerlösliches Pikrat von den charakteristischen Eigenschaften der Lysinverbindung erhalten, die 3 g wog. Es wurde aus Wasser umkristallisiert und im Vakuum getrocknet. Es verpufft im Kapillarrohre bei 253°.

0·1821 g gaben 31 cm^3 N bei 25° und 739 mm.

In 100 Teilen:

	Gefunden	Berechnet
N	18·3	18·6

Aus desamidiertem Glutin ließ sich auf Zusatz von alkoholischer Pikrinsäure in keiner Weise die dem Lysinpikrat charakteristische Kristallisation gewinnen.

Dafür erhält man unschwer ein anderes Pikrat, wenn man folgendermaßen verfährt.

Die aus 50 g Glutin herrührende, aus der Fällung mit Phosphorwolframsäure erhaltene »Lysinfraktion« wird in wenig Wasser gelöst, mit 60 cm^3 einer 5% alkoholischen Pikrinsäure vermischt. Es fällt ein Harz aus, welches in Wasser recht leicht löslich ist, unter Umständen kristallisiert, aber bestimmt kein Lysinpikrat ist.

Die alkoholische Lösung wird abgegossen, stark konzentriert und noch warm mit Äther vermischt.

Es scheidet sich ein kanariengelbes, kristallinisch erstarrendes Harz ab. Die Alkoholäther-Mutterlauge, verdampft, liefert eine gleiche Kristallisation. Beide sind identisch und liefern, aus Wasser umkristallisiert, schöne, gelbe, dicke Prismen.

Die Darstellung dieser Verbindung läßt sich dadurch wesentlich vereinfachen, daß man, ohne erst nach dem Kossel-Kutscher'schen Verfahren Histidin und Arginin abzutrennen, die aus dem ursprünglich ausgefällten Phosphorwolframat durch Baryt freigemachte Aminoverbindung direkt in die Pikrate überführt.

Die aus 15 Teilen Desamidoglutin erhaltenen Diaminoverbindungen wurden mit Wasser zum Sirup verrührt, 44 cm^3 5% alkoholische Pikrinsäurelösung zugesetzt und vollständig eingedampft. Man fügt unter Umrühren Alkohol zu, so lange sich noch ein in Alkohol schwer lösliches Harz abscheidet. Die abgegossene alkoholische Lösung wird konzentriert und mit etwa dem gleichen Volum Äther vermischt. Das ausfallende Öl erstarrt meist zu dem gesuchten Pikrate. Wenn das nicht der Fall ist, so tritt nach dem Abdestillieren des Ätheralkohols Kristallisation ein. Die Kristalle werden mit etwas Wasser angerührt und von der Mutterlauge abgesaugt. Diese scheidet, mit Wasser verdünnt, ein Öl ab. Die überstehende Flüssigkeit, abermals konzentriert, gibt eine neue Kristallisation.

Das erst abgeschiedene, in Alkohol nicht lösliche Öl kristallisiert nach einiger Zeit, wenn es in sehr verdünntem Alkohol gelöst wird. Es dürfte Argininpikrat sein.

Das in Rede stehende Pikrat ist, durch öfteres Umkristallisieren aus Wasser gereinigt, von reingelber Farbe. Es bildet bei rascher Kristallisation spröde, zugespitzte Nadeln, bei langsamer dicke Prismen. In Wasser ist es in der Kälte ziemlich schwer, in der Hitze aber sehr leicht löslich, ebenso in Alkohol.

Das Pikrat schmilzt nach einmaligem Umkristallisieren bei 145 bis 147° zu einer dicken, roten Flüssigkeit, nach viermaligem Umkristallisieren hatte sich der Schmelzpunkt auf 149 bis 150° erhöht. Auch die Zusammensetzung war fast ganz dieselbe geblieben.

Trotzdem ist es zweifelhaft, ob es einheitlich ist, da die nach Beseitigung der Pikrinsäure erhaltene Aminoverbindung ein Gemenge zweier Substanzen ist, deren Trennung bisher große Schwierigkeiten bereitete.

Zur Analyse wurde im Vakuum bei 100° getrocknet. Substanz 1 ist einmal, 2 zweimal, 3 viermal aus Wasser umkristallisiert worden.

Substanz 1:

0·1464 g gaben 0·2014 g CO₂ und 0·0477 g H₂O.

0·2642 g gaben 39·2 cm³ N bei 18° und 729 mm.

Substanz 2:

0·1531 g gaben 0·2103 g CO₂ und 0·0503 g H₂O.

Substanz 3:

0·2124 g gaben 0·2964 g CO₂ und 0·0708 g H₂O.

0·2265 g gaben 31 cm³ N bei 18° und 739 mm.

In 100 Teilen:

	Gefunden		
	1	2	3
C	37·52	37·46	38·06
H	3·67	3·67	3·72
N	16·69	—	15·61

Die Pikrinsäurebestimmung erfolgte derart, daß 3·1 g in Wasser gelöst, mit überschüssiger verdünnter Schwefelsäure vermischt, die Pikrinsäure durch siebenmaliges Schütteln mit Äther extrahiert und die ätherischen Lösungen in einem tarierten Kolben bei gewöhnlicher Temperatur im Luftstrome verdampft, der Rückstand dann bei gelinder Wärme getrocknet wurde. Es hinterblieben 2·10 g, das sind rund 70% Pikrinsäure.

Die mit Äther erschöpfte Lösung wurde mit reinstem Ätzbaryt genau ausgefällt und zur Krystallisation gedampft. Die ausgeschiedenen Nadeln ließen sich durch Alkohol, in welchem sie sehr schwer löslich sind, von der Mutterlauge befreien, die bei wiederholtem Eindampfen weitere Kristallisationen lieferte. Der anfängliche Schmelzpunkt der ersten Kristallisation von etwa 218° hob sich allmählich auf 252°.

Sie reagiert neutral und kristallisiert in Blättern; die späteren Anschüsse reagieren alkalisch und bilden langgestreckte Prismen.

Die Analyse der höher schmelzenden, schwerer löslichen Substanz, getrocknet im Vakuum bei 100°, ergab:

0·0962 g gaben 0·1646 g CO₂ und 0·0657 g H₂O.

0·0717 g gaben 6·8 cm³ N bei 18° und 738 mm.

In 100 Teilen:

	Gefunden	Berechnet für $\frac{2}{3}\text{ON}_{11}\text{H}_5\text{C}$
C	46·66	45·1
H	7·64	8·2
N	10·80	10·8

Diese Analyse stimmt am besten auf die Formel C₅H₁₁NO₃, also einer Oxyaminovaleriansäure, während die Analyse des Pikrates wieder besser auf die Pikrinsäureverbindung einer Aminovaleriansäure stimmt.

In 100 Teilen:

	Berechnet für $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_9$	· Gefunden im Mittel
C	38·3	37·7
H	4·0	3·7
N	16·2	16·2
Pikrinsäure ..	66·2	70·0

Das Pikrat ist deshalb wahrscheinlich ein Gemenge. Es soll in größeren Quantitäten beschafft und eingehender untersucht werden.
