

Über Desamidoglobulin

von

H. Lampel.

Aus dem II. chemischen Laboratorium der k. k. Universität in Wien.

(Vorgelegt in der Sitzung am 25. April 1907.)

Die Ergebnisse der Untersuchungen über Desamidokasein¹ und Desamidoglutin² haben das Interesse hauptsächlich auf das Verhalten der Hexonbasen bei der Einwirkung von salpetriger Säure auf Eiweißkörper gelenkt. Diese Einwirkung besteht bei beiden erwähnten Stoffen übereinstimmend darin, daß das Lysin vollständig zerstört wird, während Arginin und Histidin wenigstens zum Teil erhalten bleiben. Die einfachste Erklärung findet diese geringe Widerstandsfähigkeit des Lysins in der Annahme, daß wenigstens eine seiner Amidogruppen frei ist und deshalb von salpetriger Säure angegriffen werden kann, daß also wirklich eine Desamidierung eintritt. Der Umstand, daß der Lysinrest in zwei so verschieden gearteten Eiweißkörpern, wie Kasein und Glutin, die als typische Vertreter der Hemigruppe einerseits, der Antigruppe andererseits so weit voneinander abstehen, doch in gleicher Weise reagiert, ließ die Vermutung entstehen, daß es sich hier um eine allgemeine Eigenschaft der Proteide handle und daß dementsprechend auch die Schlüsse verallgemeinert werden müßten, die hinsichtlich der Bindung der Amidogruppen im Lysin gezogen wurden. Die Untersuchung eines Globulins aus Pferdeblut, über die in dieser Mitteilung berichtet werden soll, gibt eine Bestätigung dieser Ansicht.

¹ Skraup und Hoernes, Monatshefte für Chemie, 27, 631.

² Skraup, ebenda, 27, 653.

Wird Globulin unter Umständen, die eine weitgehende Hydrolyse ausschließen, mit salpetriger Säure behandelt, so geht es zu ungefähr drei Viertel seines Gewichts in eine dem Desamidokasein auch äußerlich recht ähnliche Verbindung über. Dieselbe stellt ein bräunliches, leichtes Pulver vor, welches in verdünnten Säuren so gut wie unlöslich ist und selbst in stark verdünnten Alkalien, ohne sich zu lösen, unter intensiver, beim Neutralisieren wieder verschwindender Rotfärbung aufquillt. Von den gewöhnlichen Eiweißreaktionen ist nur die Schwefelbleireaktion deutlich, die Biuret- und die Millon'sche Reaktion ganz unsicher, da eine etwa eintretende Färbung durch die starke eigene Farbe verdeckt wird. Nitrosoreaktion wurde, wie bei den andern bisher untersuchten desamidierten Proteiden, auch hier nicht gefunden. In der prozentischen Zusammensetzung weicht der Körper nur wenig vom Globulin ab, wie ein Vergleich mit den für das Globulin in Cohnheim's »Eiweißkörper« angeführten Zahlen ergibt. Der Schwefel- und Wasserstoffgehalt zeigt keine wesentliche Änderung, dagegen ist bei Kohlenstoff und Stickstoff eine die Fehlergrenzen überschreitende Abnahme bemerkbar.

Das Desamidoglobulin wurde nach dem Verfahren von Kossel und Kutscher¹ quantitativ auf Hexonbasen untersucht. Aus dem Phosphorwolframate, das sonst das Lysin enthält, ließ sich dieses in keiner Weise gewinnen, überhaupt konnte keine kristallisierte Substanz daraus abgeschieden werden. Dagegen wurde Arginin in unveränderter, Histidin in etwas geringerer Menge gefunden als im Globulin, von dem, da keine Angaben vorlagen, zum Vergleich ebenfalls eine quantitative Hexonbasenbestimmung gemacht wurde. Ob diese Differenz beim Histidin der Einwirkung der salpetrigen Säure zuzuschreiben ist oder nicht, muß dahingestellt bleiben. Auffallend ist der unveränderte Gehalt an Arginin, da' beim Desamidokasein eine sehr erhebliche Abnahme beobachtet wurde. Vielleicht besteht hier eine Beziehung zu der Tatsache, daß das Globulin im Gegensatz zum Kasein zu den schwer angreifbaren Eiweißkörpern gehört.

¹ A. Kossel und F. Kutscher, Zeitschrift f. physiol. Chemie, 31, 165, (1900) u. 38, 39 (1903).

Experimenteller Teil.

Bestimmung der Hexonbasen im Globulin.

50 g lufttrockenes Globulin, welches beim Trocknen im Vakuum bei 120° 9·8% Feuchtigkeit und beim Extrahieren mit Äther im Soxhletapparat 0·5% Fett abgab, wurden nach Kossel und Kutscher mit Schwefelsäure ohne Salzzusatz hydrolysiert und weiter verarbeitet. Die das Arginin enthaltende Flüssigkeit wurde mit $\frac{1}{5}$ normaler HNO_3 mit Lackmus als Indikator titriert und dann in gewogener Kristallisierschale zum Sirup eingedampft, der nach kurzer Zeit kristallisierte. Der Rückstand wurde im Vakuum über H_2SO_4 getrocknet, gewogen und als neutrales Argininnitrat in Rechnung gebracht. Das durch Quecksilbersulfat gereinigte Histidin wurde als Dichlorid nach dem Trocknen im Vakuum gewogen. Das rohe Lysin-pikrat wurde einmal aus Wasser umkristallisiert und bei 100° getrocknet. Es explodierte bei raschem Erhitzen im Kapillarrohre bei 254°.

I. Arginin:

a) Zur Titration wurden verbraucht 31·5 cm^3 $\frac{1}{5}$ normaler HNO_3 (F. = 0·987), entsprechend...	1·083 g Arginin
dazu Korrektur infolge Löslichkeit der Arginin-Ag-Verbindung für 4 l	0·144 > >
Zusammen....	1·227 g Arginin.

b) Durch Wägung wurde gefunden 1·650 g Arginin-nitrat	1·167 g Arginin
Korrektur	0·144 > >
Zusammen....	1·311 g Arginin.

II. Histidin:

Gewogen wurden 2·266 g Histidindichlorid
entsprechend 1·542 g Histidin.

III. Lysin:

Gewogen wurden.....	4·461 g Lysin-pikrat
Korrektur für 75 cm^3 wässriger Lösung.	0·405 > >
Zusammen....	4·866 g Lysin-pikrat
entsprechend	1·896 g Lysin.

Die nachstehenden Prozentzahlen beziehen sich auf getrocknetes Globulin.

In 100 Teilen Globulin:

Arginin	2·7 2·9	} im Mittel 2·8
Histidin	3·4	
Lysin	4·2	

Eine Probe des Lysinpikrates wurde zweimal aus Wasser umkristallisiert und eine N-Bestimmung gemacht.

0·1096 g gaben 17·8 cm^3 trockenen N bei 18·5° und 739 mm.

In 100 Gewichtsteilen:

	Berechnet	Gefunden
N	18·70	18·49

Desamidierung des Globulins.

Um das in verdünnten Salzlösungen durch langes Aufbewahren bereits gänzlich unlöslich gewordene Globulin in eine zur Desamidierung geeignete Form zu bringen, wurde die auch beim Kasein mit Erfolg durchgeführte Behandlung mit Wasser und Eisessig benützt. Durch Vorversuche wurde das geeignetste Verhältnis ausfindig gemacht, welches gestattete, bei Anwendung von möglichst wenig Säure eine möglichst konzentrierte Lösung herzustellen.

20 g Globulin wurden unter Schütteln in 600 cm^3 Wasser eingetragen, 20 cm^3 Eisessig zugefügt und unter häufigem Umschütteln ungefähr 3 Stunden auf dem Wasserbade erwärmt, nach welcher Zeit fast alles in Lösung gegangen war. Die trübe braune Flüssigkeit konnte weder durch Faltenfilter noch mit Hilfe der Saugpumpe filtriert werden und wurde daher mittels Durchsaugen durch einen Bausch Glaswolle von Verunreinigungen so gut als möglich befreit. Nach dem völligen Erkalten wurde die Luft aus dem Kolben durch CO_2 verdrängt und unter andauerndem Durchleiten eines langsamen Stromes von Kohlensäure eine kalte Lösung von 16 g $NaNO_2$ in 200 cm^3 Wasser mit Hilfe eines Tropftrichters allmählich zugefügt. Sehr

bald fiel wie beim Kasein ein weißer, flockiger Niederschlag aus, der sich rasch gelb färbte. Zur Vervollständigung der Reaktion wurde nach kurzem Stehen ungefähr 2 Stunden auf dem Wasserbade erhitzt, bis die Gasentwicklung und intensive Schaumbildung aufhörte und der jetzt hellbraun und körnig gewordene Niederschlag sich vollständig absetzte. Erst jetzt wurde mit dem Durchleiten von Kohlensäure aufgehört. Der Niederschlag wurde noch heiß abgesaugt und auf der Nutsche mehrmals mit Wasser gewaschen, hierauf vom Filter genommen, mit viel Wasser angerieben und einige Zeit auf dem Wasserbade erhitzt, dann wieder abgesaugt und nochmals gewaschen. Eine gewogene Probe der feuchten Substanz wurde im Vakuum bei 120° getrocknet, wobei sie sich zu einer hornigen Masse zusammenballte, und aus dem Gewichtsverlust und dem Gesamtgewicht der feuchten Substanz die Rohausbeute an Desamidoglobulin zu 75% berechnet, bezogen auf trockenes Globulin. Eine zweite Bestimmung gab ein übereinstimmendes Resultat.

Bei der Prüfung der letzten Waschwässer mit Jodkaliumstärkelösung zeigte sich folgende Erscheinung. Obwohl bei der Desamidierung ein Überschuß von Säure angewendet worden war, die Lösung also kein unzersetztes Natriumnitrit enthalten konnte, gab das Waschwasser auf Zusatz des Reagens erst beim Ansäuern mit einer Mineralsäure, nicht aber mit Essigsäure, eine deutliche, sofort eintretende Blaufärbung. Durch Kontrollversuche mit reinem Wasser, Jodkaliumstärkelösung und Säure wurde dem Verdacht begegnet, daß es sich um eine Verunreinigung der Säure oder eine rasche Oxydation handle.

Als daraufhin das Anreiben des Niederschlages mit Wasser, Auskochen und Waschen in der angegebenen Weise fortgesetzt wurde, trat bei 4- bis 5maliger Wiederholung dieser Operation ein Punkt ein, wo das Waschwasser auch beim Ansäuern keine Blaufärbung mehr gab. Es liegt somit die Vermutung nahe, daß dem rohen Desamidoglobulin durch Nebenreaktionen entstandene, durch verdünnte Säuren zersetzbare Nitroverbindungen beigelegt seien.

Das auf solche Weise mit Wasser gereinigte Desamidoglobulin wurde noch zweimal mit Alkohol und einmal mit Äther ausgekocht; doch hinterließen sämtliche Auszüge beim

Eindampfen nur minimale amorphe Rückstände. Die im Vakuum bei 120° getrocknete Substanz gab folgende Analysenwerte, denen zum Vergleich die aus Cohnheim's »Eiweißkörper« entnommenen Zahlen für Globulin im Mittel beigelegt sind.

- I. 0·1961 *g* gaben 0·3750 *g* CO₂ und 0·1201 *g* H₂O,
 0·1654 » » 21·5 *cm*³ trockenen N bei 22·4° und 751·6 *mm*,
 1·1939 » » nach Asboth¹ 0·1032 *g* BaSO₄.
- II. 0·2855 *g* gaben 0·5444 *g* CO₂ und 0·1697 *g* H₂O,
 0·2275 » » 29·8 *cm*³ trockenen N bei 20° und 745 *mm*,
 1·0657 » » 0·0922 *g* BaSO₄.
- III. 0·2918 *g* gaben 0·5571 *g* CO₂ und 0·1777 *g* H₂O,
 0·3579 » » 45·8 *cm*³ trockenen N bei 18·5° und 759 *mm*.

In 100 Gewichtsteilen:

	I.	II.	III.	<u>Globulin</u>
C	52·15	52·00	52·07	52·71
H	6·85	6·65	6·81	7·01
N	14·86	14·96	14·97	15·83
S	1·19	1·19	—	1·15

Versuche, aus der Mutterlauge des Desamidoglobulins durch Aussalzen mit Ammonsulfat und Natriumacetat oder durch Fällung mit Phosphorwolframsäure etwas abzuscheiden, hatten keinen Erfolg.

Hexonbasenbestimmung im Desamidoglobulin.

100 *g* Globulin wurden genau so, wie oben beschrieben, desamidiert und mit Wasser, Alkohol und Äther gereinigt. 50 *g* der erhaltenen Substanz, welche fein zerrieben und vom anhaftenden Äther bei 100° zum größten Teil befreit worden war, wurden zur Untersuchung verwendet, eine gewogene Probe der gleichen Substanz bei 120° im Vakuum getrocknet. Die Bestimmung ergab einen Feuchtigkeitsgehalt von 12·9 %.

Die Hydrolyse und die quantitative Bestimmung des Arginins und Histidins wurde genau in der gleichen Weise wie

¹ Chem. Ztg., 19, 2040 (1895).

beim Globulin durchgeführt, sowohl Argininnitrat als auch Histidindichlorid wurden in den charakteristischen Kristallformen erhalten.

I. Arginin:

a) Zur Titration wurden verbraucht 28 cm^3 $\frac{1}{5}$ normaler HNO_3 (F. = 0·987)	0·963 g Arginin
Korrektur für 4 l	0·144 » »
<hr/>	
Zusammen	
1·107 g Arginin.	
b) Gewogen wurden 1·614 g Argininnitrat	1·142 g Arginin
Korrektur	0·144 » »
<hr/>	
Zusammen	
1·286 g Arginin.	

II. Histidin.

Gewogen wurden 1·527 g Histidindichlorid = 1·039 g Histidin.

In 100 Teilen trockenem Desamidoglobulin:

Arginin	2·6 } im Mittel 2·8
	3·0 }
Histidin	2·4

Dagegen konnte in dem Anteil, welcher sonst das Lysin enthält, auf keine Weise Lysin entdeckt werden.

Schon der Phosphorwolframsäureniederschlag war wesentlich geringer als beim Globulin, desgleichen der Abdampfrückstand nach der Zersetzung mit Baryt und Entfernung des Überschusses desselben durch Kohlensäure. Dieser Rückstand wurde mit sehr wenig Wasser zu einem gleichmäßigen Brei angerieben und dann 20 cm^3 einer gesättigten alkoholischen Pikrinsäurelösung allmählich zugesetzt, bis sich der Niederschlag nicht mehr vermehrte. Derselbe bestand aus einem schwarzen Harz und einer kleinen Menge brauner amorpher Flocken, welche so gut als möglich von dem übrigen getrennt und aus heißem Wasser umgelöst wurden. Jedoch konnten auf keine Weise Kristalle erhalten werden. Die Mutterlauge der ersten Fällung wurde samt dem Harz zur Trockene eingedampft, der Rückstand mit heißem Wasser aufgenommen und von einer

kleinen Menge Harzes abfiltriert, aus welchem sich ebenfalls keine definierbaren Substanzen abscheiden ließen. Das Filtrat wurde mehrmals mit Äther ausgeschüttelt, um überschüssige Pikrinsäure zu entfernen, und dann zur Trockene eingedampft. Der Rückstand löste sich bis auf einen harzigen Rest in heißem Alkohol, beim Erkalten fiel wieder ein Harz aus.

Somit scheint die Anwesenheit irgend erheblicher Mengen von Lysin im desamidierten Globulin ausgeschlossen.
