

Über Desamidoedestin

von

Walter Traxl.

Aus dem II. chemischen Universitätslaboratorium in Wien.

(Vorgelegt in der Sitzung am 14. November 1907.)

Die Untersuchungen von Skraup und seinen Schülern über die Einwirkung von salpetriger Säure auf Proteine haben ergeben, daß die so erhaltenen Desamidoproteine bei der Hydrolyse sich scharf von den ursprünglichen Proteinen dadurch unterscheiden, daß jene kein Lysin liefern, während bei den übrigen einfachen Spaltungsprodukten keine oder nur geringe Unterschiede zu bemerken sind.

Ich habe das Edestin in dieser Richtung untersucht und nach der Desamidierung gleichfalls Lysin nicht mehr nachweisen können. Gleichzeitig habe ich aber auch noch andere Veränderungen wahrgenommen.

Während bei den anderen bisher untersuchten Desamidoproteinen die Behandlung mit salpetriger Säure eine Veränderung im Prozentgehalt an Kohlenstoff, Wasserstoff und auch im Stickstoffgehalt nicht herbeigeführt hat, habe ich beim Edestin eine über den Fehlergrenzen liegende Zunahme des Stickstoffes wahrgenommen; sie scheint von einer Nitrosierung nicht herzurühren und kann sie vorläufig nicht weiter erklärt werden.

Weiterhin habe ich bei der Hydrolyse auch eine Abnahme des Arginingehaltes konstatiert. Das Edestin selbst lieferte rund 12⁰/₀ Arginin, das desamidierte im Durchschnitt aus mehreren Versuchen viel weniger, im besten Falle etwas über 1⁰/₀. Histidin dagegen wurde aus dem desamidierten Edestin ungefähr in derselben Menge wie aus intaktem Edestin erhalten.

Die Schlüsse, die Skraup betreffend die nähere Anordnung des Lysins in den Proteinen dahin gezogen hat, daß eine Aminogruppe frei vorhanden ist, lassen sich beim Edestin deshalb auch auf das Arginin, beziehlich auf den größten Teil desselben übertragen.

Versuche, durch systematische fraktionierte Fällung der Pikrate Aminoverbindungen aus dem desamidierten Edestin zu erhalten, die aus dem unveränderten Protein nicht entstehen und die Skraup bei der Gelatine mit Erfolg verwendet hat, schlugen fehl.

Experimenteller Teil.

Das Edestin (aus Hanfsamen) wurde von Höchst bezogen. Ich habe versucht, es durch Umkristallisieren zu reinigen.

1 g Edestin wurde mit 40 cm^3 fünfprozentiger Kochsalzlösung bei 50 bis 60° geschüttelt und dann möglichst schnell abgesaugt. (Das Absaugen machte Schwierigkeiten, da Schäumen eintrat.)

Am Filter blieben 0·227 g, aus dem Filtrat schied sich beim Abkühlen 0·337 g ab. Nach Zusatz von Wasser fielen noch 0·082 g und bei weiterem 24stündigen Stehen 0·005 g aus.

Das trübe Filtrat wurde eingedampft, nach Zusatz der für die verwendete Menge Kochsalz nötigen Menge Wassers blieben 0·162 g ungelöst.]

1 g gab also in Summe 0·813 g Protein.

Bei einem zweiten Versuch wurde 1 g Edestin mit 80 cm^3 Kochsalzlösung behandelt. Bei sonst gleicher Durchführung wurden sub α) 0·233 g, β) 0·213 g, γ) 0·210 g, δ) 0·002 g, ϵ) 0·049 g, in Summe 0·707 g erhalten.

Es scheint das Edestin demnach in Wasser beziehlich Kochsalzlösung relativ leichter lösliche Beimengungen zu enthalten.

Versuche, das verwendete Edestin in deutlichen Kristallen zu erhalten, blieben erfolglos, selbst als es von den geringen Mengen Fett befreit wurde, die es enthält.

Die Aschebestimmung des mit Wasser ausgewaschenen Edestins gab 0·60% Ascherückstand.

Zur weiteren Analyse wurde es mit Wasser angerieben, aufs Filter gebracht und solange mit Wasser gewaschen, bis das Waschwasser nicht mehr die Reaktion auf Cl-Ion. gab. Darauf wurde die lufttrockene Substanz im Vakuum bei 120°

getrocknet. Der Gesamtverlust bei 120° betrug nach 11 Stunden 2·9 %.

Das Edestin gab an Alkohol und Äther geringe Mengen ab. Ob diese wirklich Fett sind, wurde nicht weiter untersucht. Das Edestin wurde so oft mit Alkohol ausgekocht, bis eine Probe, auf dem Uhrglas eingedampft, keinen Rückstand mehr zeigte. Dasselbe wurde dann mit reinem Äther ausgeführt. Die vereinigten alkoholischen und ätherischen Extrakte von 10 g Edestin gaben nach dem Eindampfen am Wasserbad einen Rückstand von nur 0·05 g, also von 0·5 %.

Die Analysen von nicht entfettetem und entfettetem Edestin gaben übrigens fast ganz dieselben Werte.

1. Nichtentfettetes Edestin:

0·1835 g: 0·3441 g CO₂,¹
 0·1454 g: 23·0 cm³ N bei 18° und 772 mm,
 0·4093 g nach Asboth: 0·0325 g BaSO₄.

2. Entfettetes Edestin:

0·1485 g: 0·2776 g CO₂ und 0·0911 g H₂O,
 0·1877 g: 30·9 cm³ N bei 19° C. und 750 mm.
 0·8156 g: 0·0604 g BaSO₄.

	1.	2.
Teile C	51·12	50·98
Teile H	—	6·81
Teile N	18·85	18·99
Teile S	1·09	1·02

Die von mir gefundenen Mittelzahlen stimmen mit den im Cohnheim'schen Buch enthaltenen Analysenwerten gut überein. Der Aschengehalt ist bei allen Analysen nicht in Abrechnung gebracht.

C	H	N	S	
50·92	6·91	18·71	0·82	Ritthausen,
51·63	6·90	18·78	0·90	Chittenden und Mendel,
51·27	6·85	18·76	0·91	Osborne,
51·21	6·87	18·64	0·91	Abderhalden,
51·05	6·81	18·92	1·06	Meine Mittelzahlen.

¹ Die Wasserbestimmung mißglückte.

Behandlung des Edestins mit salpetriger Säure.

Bei dieser habe ich die von Skraup-Hörnnes beim Kasein eingehaltenen Verhältnisse mit gutem Erfolg verwendet.

10 g Edestin wurden in 200 cm^3 kalten Wassers unter fortwährendem Umschütteln eingetragen, dann wurden 14 cm^3 Eisessig zugesetzt und unter Umschütteln am Wasserbad erwärmt. Nach ungefähr 10 Minuten ist eine trübe Lösung entstanden. Dieselbe kann weder durch Papier noch Leinwand filtriert werden, da sehr bald Verklebung stattfindet; ich begnügte mich deshalb, sie durch einen Bausch Glaswolle von größeren Verunreinigungen zu befreien.

Hierauf wurde die Lösung in einen geräumigen Glaskolben gebracht, dessen Kork dreifach durchbohrt war. Durch die eine Bohrung konnte Kohlensäure einströmen, durch die zweite den Kolben verlassen und die dritte enthielt den Tropftrichter. Nachdem die Luft durch Kohlensäure verdrängt war, wurde durch den Trichter langsam im Verlauf von 2 Stunden unter Umschütteln eine Lösung von 8 g Natriumnitrit in 50 cm^3 Wasser gebracht. Schon nach dem ersten Tropfen fiel ein weißer Niederschlag aus der Lösung, der sich alsbald gelb färbte. Nicht lange darauf trat Schaumbildung unter Entweichen von NO_2 -Dämpfen ein.

Nach Zusatz des ganzen Volumens Natriumnitritlösung wurde der Apparat in der Kohlensäureatmosphäre gelassen, bis sich der Schaum gesetzt hatte, hierauf 2 Stunden am Wasserbad erwärmt und der Niederschlag abgesaugt.

Um festzustellen, ob die Essigsäure und die entstandene Salpetersäure unter diesen Umständen tiefer gehend einwirkt, wurde das Filtrat von 50 g derart behandelten Edestins auf 2 l gebracht und zu 100 cm^3 Phosphorwolframsäure gesetzt, so lange als die Entstehung eines Niederschlages bemerkbar war. Das Phosphorwolframat wog 0·245 g, berechnet auf 2 l also 4·9 g.

Da rund 5 g Fällung schätzungsweise 0·5 g organischer Substanz entsprechen, erscheint eine weitergehende Spaltung des Edestins in niedere Produkte der Hydrolyse ausgeschlossen.

Die bei der Desamidierung ausgefallene Substanz wird mit heißem Wasser gewaschen, bis im Waschwasser die rote

Lakmusreaktion ausbleibt und aus Gründen, die später erwähnt werden sollen, weiterhin das Waschwasser Jodkaliumstärkekleister nicht mehr bläut.

Das so ausgewaschene Produkt, welches äußerlich und in Löslichkeitsverhältnissen den bisher beschriebenen Desamido-proteinen ähnelt, wurde nun mit Alkohol dreimal ausgekocht. Beim zweiten und dritten Auskochen zeigte eine entnommene Probe denselben minimalen Abdampfrückstand.

Ebenso wurde noch zweimal mit reinem Äther ausgekocht und dann im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

Die Ausbeute schwankte bei den einzelnen Darstellungen zwischen 70 und 80% des verwendeten Edestins.

Beim Trocknen verloren 0·8527 g Desamidoedestin nach 1 Stunde im Trockenschrank bei 105° 0·0171 g Wasser. Im weiteren Verlaufe wird die Trocknung im Vakuum bis zur Gewichtskonstanz fortgesetzt, wobei der Gesamtverlust an Feuchtigkeit im ganzen 0·0332 g (d. i. in 100 Teilen 3·9 Teile) beträgt. Der Aschengehalt beträgt 0·55%. Er wurde bei Berechnung der Analysen nicht berücksichtigt.

Zunächst wurden Präparate analysiert, die aus nicht entfettetem Edestin dargestellt waren und bei welchen das Waschen nur bis zum Verschwinden der sauren Reaktion geführt war.

Die Analysen der vakuumtrockenen Substanz verschiedener Darstellungen ergaben:

1. 0·2180 g: 0·4087 g CO₂ und 0·1353 g H₂O.
0·1566 g: 27·7 cm³ N bei 731 mm und 23°.
0·5614 g: 0·0422 g BaSO₄.
2. 0·1691 g: 0·3161 g CO₂ und 0·1074 g H₂O.
0·1069 g: 19 cm³ N bei 729 mm und 21°.
1·0035 g: 0·0804 g BaSO₄.

In 100 Teilen:

C	51·13	50·98
H	6·94	7·10
N	19·61	19·79
S	1·03	1·10

Weiterhin wurde Desamidoedestin aus entfettetem Edestin analysiert, das ebenso weit gewaschen war wie das vorher erwähnte.

0·2111 g Substanz gaben 0·3966 g CO₂ und 0·1308 g H₂O.

0·1914 g Substanz bei 17° und 744 mm 32·5 cm³ N.

In 100 Teilen:

Teile C 51·23 H 6·89 N 19·56

Die Zahlen zeigen, daß durch die Desamidierung weder der C- noch der H-Gehalt merklich geändert worden ist, wohl aber eine Zunahme im Stickstoffgehalt eintrat. Deshalb wurde untersucht, ob etwa Nitrosogruppen eingetreten seien. Ein Versuch mit der analysierten Substanz ergab, daß, wenn man sie mit konzentrierter Schwefelsäure anreibt, die Schwefelsäure sodann auf halbe Normalität verdünnt und Jodkaliumstärkekleister zusetzt, schon nach 5 bis 10 Sekunden Blaufärbung eintritt, während bei Zusatz des Reagens zu 1/2-normaler Schwefelsäure die Blaufärbung erst nach 20 Minuten beginnt.

Bei neuerlicher Neudarstellung von Desamidoedestin wurde, wie früher schon erwähnt, das Auswaschen mit heißem Wasser fortgesetzt, bis im abfließenden Wasser keine salpetrige Säure nachzuweisen war. Die Jodkaliumstärkereaktion verschwand, wie auch schon bemerkt worden ist, viel später als die Lakmusreaktion.

Die so gewaschene Substanz, in konzentrierter Schwefelsäure gelöst, reagierte nach dem Verdünnen mit Jodkaliumstärkekleister nicht mehr.

Die Analysen gaben aber fast ganz dieselben Werte.

0·1501 g Substanz: 0·2809 g CO₂ und 0·0948 g H₂O.

0·1204 g Substanz: 20·6 cm³ N bei 19° und 747 mm.

0·1317 g Substanz: 22·6 cm³ N bei 19° und 758 mm.

In 100 Teilen:

C	51·04	—
H	7·01	—
N	19·66	19·48

Im Mittel gefunden:

für Edestin

C: 51·05, H: 6·81, N: 18·92, S: 1·05,

für Desamidoedestin

C: 51·09, H: 6·98, N: 19·62, S: 1·06.

Es können deshalb in den Präparaten der ersten Analysen nur sehr geringe Verunreinigungen vorhanden gewesen sein. Weiterhin ist die Zunahme des Stickstoffgehaltes bei der Desamidierung sichergestellt.

Es sei hervorgehoben, daß das desamidierte Edestin insofern von den anderen Desamidoproteinen abweicht, als bei ihm gegenüber dem Ausgangsmaterial eine Erhöhung des N-Gehaltes über die Fehlergrenze zu verzeichnen ist, während bei anderen Proteinen der N-Gehalt durch die Desamidierung eher etwas abnimmt.

Hydrolyse von Desamidoedestin.

Bei der Untersuchung der Produkte der Hydrolyse habe ich mich auf die Hexonbasen beschränkt. Obwohl die Hexonbasenbestimmung im Edestin, selbst schon mehrere Male gemacht, übereinstimmende Resultate gab, habe ich sie ausgeführt, um die nicht leichte Methode von Kossel und Kutscher¹ kennen zu lernen.

Es wurden hiezu 50 g Edestin mit 150 g konzentrierter Schwefelsäure und 300 g Wasser durch 14 Stunden am Wasserbad erwärmt.

Ich erhielt 1·374 g Histidinchlorhydrat ($C_6H_9N_3O_2 \cdot 2 HCl$), das entspricht 0·938 g Histidin.

Das Arginin wurde durch Titration mit $\frac{1}{4}$ n. Salpetersäure (Faktor 1·112) bestimmt. Verbraucht 124·3 cm^3 , entsprechend 6·02 g Arginin.

Das Lysin wurde als Pikrat gewogen: 0·862 g. Rechnet man die beim Umkristallisieren aus Wasser (80 cm^3) in Lösung verbliebene Menge mit 0·44 g hinzu, hat man im ganzen 0·576 g Lysin. Der Explosionspunkt des Pikrates war 252°.

Dieses Resultat stimmt mit den bisherigen Ergebnissen² überein.

¹ Zeitschrift für physiologische Chemie, Bd. 31, p. 165 ff. Nachtrag ibid. Bd. 38, p. 172 ff.

² Die Tabelle ist der Abhandlung von Kossel und Patten, Zeitschrift für physiologische Chemie, Bd. 38, entnommen.

	Histidin	Arginin	Lysin	
Schulze und Winter- stein ¹	{ 1·35% 0·98	10·70% 11·2	1·09% 1·55	
Abderhalden ²	1·1	11·7	1	
Kossel und Patten	{ 2·63 2·10 2·10	13·97 14·36 —	1·67 1·63 —	
	In dieser Arbeit erhalten	1·87	12·04	1·15

Die Hydrolyse des Desamidoedestin ergab nun folgendes. Als 35 g desselben verwendet wurden, zeigte sich schon bei der Trennung des Arginins und Histidins vom Lysin, daß auffallend weniger Silbersulfat verbraucht wurde.

Gewogen wurde 1·118 g Histidindichlorid, welches Gewicht 0·764 g Histidin entspricht.

Zur Titration des Arginins wurden 1·4 cm³ 1/2 normaler Salpetersäure (vom Faktor 0·9235) verbraucht. Das entspricht 0·1127 g Arginin.

Gewogen wurden 0·122 g Argininnitrat. Das entspricht 0·0895 g Arginin.

Die Lysinfraktion, mit alkoholischer Pikrinsäure angerieben und 12 Stunden stehen gelassen, gab gar keine Kristallisation. Nach einigem Stehen schied sich eine harzige Masse ab, die mit Wasser in der Kälte aufgenommen, bei weiterem Stehen zu einem Kristallbrei erstarrte. Die Kristalle scharf abgesaugt wogen 1·39 g.

Sie ließen sich aus zirka 1 1/2 cm³ heißen Wassers umkristallisieren (Ausbeute 0·62 g).

Der Schmelzpunkt war 194° und blieb konstant, als ein sehr kleiner Teil abermals umkristallisiert wurde. Knapp ober dem Schmelzpunkt tritt Zersetzung und Braunfärbung ein.

Aus der Mutterlauge wurden noch 0·1 g Kristalle vom Schmelzpunkt 189—190° gewonnen.

Analyse der vakuumtrockenen Substanz:

0·1096 g: 0·0402 g H₂O und 0·1418 g CO₂.

0·1046 g: 0·0404 g H₂O und 0·1358 g CO₂.

¹ Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXXIII.

² Ibid. Bd. XXXVII.

0·1212 g: 28·5 cm^3 N bei 30° und 738 mm .

0·0799 g: 18·2 cm^3 N bei 30° und 737 mm .

In 100 Teilen:

Teile C.....	35·29	35·40
Teile H.....	4·07	4·29
Teile N.....	24·63	24·79
Teile O... ..	36·01	35·52

Daraus ergibt sich die einfachste Formel $C_{12}H_{17}N_7O_9$, die dem Argininpikrat entspricht, für welches auch Fp. und andere Eigenschaften stimmen.

	Berechnet	Gefunden im Mittel
C	35·68	35·31
H	4·21	4·18
N	24·42	24·71

Als Mittelwert zwischen dem umkristallisierten und nicht-reinen Argininpikrat beträgt die Ausbeute rund 1 g Pikrat. Das entspricht 0·44 g Arginin. Schlägt man diese 0·44 g Arginin zu dem Mittelwerte des Arginins aus dem Nitrat (mit 0·1), so ist die Gesamtmenge 0·54. Das sind 1·5 Teile Arginin aus 100 Teilen desamidierten Edestin.

Es wurden also gefunden in 100 Teilen Desamidoedestin:

Teile Histidin:	2·18
Teile Arginin:	1·5
Teile Lysin:	0

Bei einer weiteren Hydrolyse wurden 36 g desamidiertes Edestin (aus 50 g Edestin) verwendet.

Nachdem die Hydrolyse beendet und die Hauptmenge Schwefelsäure ausgefällt war, wurde die Flüssigkeit in zwei Hälften geteilt.

Mit dem einen Teil wurde das Kossel-Kutscher'sche Verfahren durchgeführt und dabei erhalten 0·32 g Histidin, 0·05 g Arginin aus dem Nitrat und 0·22 g aus dem wie früher erhaltenen Pikrat.

Lysinpikrat wurde auch diesmal nicht erhalten.

Demnach wurden gefunden in 100 Teilen Desamidoedestin:

Teile Histidin:	1·7
Teile Arginin:	1·5
Teile Lysin:	0

Der zweiten Hälfte der hydrolysierten Flüssigkeit wurde sofort 50prozentige Phosphorwolframsäurelösung zugesetzt, bis kein Niederschlag mehr ausfiel, das Phosphorwolframat wie üblich zersetzt und das Filtrat stark eingedampft. Nach Zusatz alkoholischer Pikrinsäurelösung zeigte sich dieselbe Erscheinung wie bei genauer Einhaltung des Kossel-Kutscher-schen Verfahrens, nämlich Ausbleiben von Kristallisation und Abscheidung eines Harzes.

Es wurde nun versucht, durch fraktionelle Fällung der alkoholischen Lösung mit Äther, durch welche Skraup bei der Desamidogelatine Aminverbindungen erhielt, die bei der Hydrolyse der Gelatine nicht auftreten, analoge Verbindungen nachzuweisen.

Bisher wurden nur geringe Kristallisationen erhalten, welche nach ihrem Schmelzpunkt und sonstigen Eigenschaften Arginin enthalten.
