

Über die partielle Hydrolyse von Edestin

von

Zd. H. Skraup und **A. Wöber**.

Aus dem II. chemischen Universitätslaboratorium in Wien.

(Vorgelegt in der Sitzung am 18. Februar 1909.)

Durch gemäßigte Einwirkung von verdünnter Schwefelsäure auf Gelatine hat der eine von uns mit F. Hummelberger¹ Albumosen und Peptone dargestellt, welche bei vollständiger Hydrolyse gewisse Verschiedenheiten in ihrer quantitativen Zusammensetzung gezeigt haben. Einige von diesen sind verhältnismäßig gering und möglicherweise von Versuchsfehlern herrührend; dagegen konnte mit Sicherheit festgestellt werden, daß die mit Ammonsulfat leichtest aussalzbare Albumose am ärmsten an Glutaminsäure, am reichsten an Glykokoll ist, daß die schwerer aussalzbare relativ mehr Glutaminsäure, dafür weniger Glykokoll enthält und daß das überhaupt nicht aussalzbare Pepton am meisten Glutaminsäure enthält. Auch für das Lysin wurden Unterschiede aufgefunden; das nicht aussalzbare Pepton hat am meisten, die leichtest aussalzbare Albumose am wenigsten Lysin.

Es schien wünschenswert, ähnliche Versuche mit anderen Proteinen vorzunehmen. Bei diesen stießen wir anfänglich auf die Schwierigkeit, solche in starken Säuren ohne anhaltendes Erhitzen in Lösung zu bringen. Diese ließ sich aber sehr leicht überwinden, als statt wässrigen Säuren Gemische dieser mit Eisessig angewendet wurden. Wir haben verschiedene Proteine,

¹ Monatshefte für Chemie, 1908.

wie Eialbumin, Kasein, Edestin und Serumglobulin, in dieser Richtung untersucht und übereinstimmend gefunden, daß, wenn diese mit dem sechsfachen Gewicht eines Gemenges von gleichen Raumteilen rauchender Salzsäure und Eisessig übergossen und dann geschüttelt werden, der größte Teil sehr rasch in Lösung geht und bei Anwendung einer Schüttelmaschine in wenig Stunden auch der Rest in Lösung gegangen ist. Schon nach sehr kurzer Zeit tritt die bekannte Tiefviolett-färbung ein. Ein Gemisch von gleichen Raumteilen Schwefelsäure und Eisessig löst dagegen selbst nach tagelangem Stehen außerordentlich wenig und erst nach einigen Tagen ist eine schwache Färbung wahrzunehmen. Wird die essigsalzsäure Lösung nach dem Verdünnen mit Wasser mit Ammoniak nahezu neutralisiert, so fallen amorphe Massen aus; schon nach eintägigem Stehen der sauren Lösung bei Zimmer-temperatur wiegen sie viel weniger als das ursprüngliche Protein. Im Laufe der Einwirkung nimmt das Gewicht der Fällung immer mehr ab, um endlich ziemlich konstant zu werden.

So betrogen die bei 100° getrockneten Fällungen, die in ziemlich roher Weise vorgenommen wurden, nach 1, 2, 4, 5 und 7 Tagen aus je 1 g:

Tage...	1	2	4	5	7
Eialbumin.....	0·44	0·32	0·24	0·18	0·14
Serumglobulin.....	0·34	0·28	0·11	0·10	0·08
Edestin.....	0·69	0·26	0·17	0·12	0·11

Von den nach viertägiger Einwirkung entstehenden Fällungen sowie den ursprünglichen Proteinen wurden mit Hilfe der eben nötigen Menge Ätzkali 2% wässrige Lösungen bereitet und mit diesen die bekannteren Farbenreaktionen auf Eiweißstoffe ausgeführt (siehe folgende Seite).

Die Reaktionen wurden bei den verschiedenen Proteinen in genau derselben Weise ausgeführt und traten die Unterschiede auch bei den Wiederholungen immer wieder auf.

Reaktion	Eieralbumin	Fällung aus diesem	Serumglobulin	Fällung aus diesem	Edestin	Fällung aus diesem
Biuret.....	violett	rotviolett	violett	rotviolett	violett	rotviolett
Xanthoprotein.....	lichtgelb	gelb (etwas dunkler als beim ursprünglichen Eiweiß)	lichtgelb	gelb	lichtgelb	gelb
Millon.....	schwach rosa	rot	rot	rosa	rot	rosa
Thymol.....	rotgelb	rotgelb (etwas dunkler als beim ursprünglichen Eiweiß)	rotgelb	dunkelrot	rotgelb	dunkelrot
α -Naphthol.....	schwarzviolett	rotviolett	schwarzviolett	rotviolett	braun	rotbraun
nach Hopkins ...	violett	dunkelviolett	blauviolett	rotviolett	rotviolett	dunkelviolett

Wir wollen auf die Unterschiede, die zwischen den ursprünglichen Proteinen und den aus ihnen entstandenen »Fällungen« auftreten, an dieser Stelle nicht weiter eingehen und begnügen uns, darauf aufmerksam zu machen, daß solche Farbenunterschiede in quantitativer Richtung Schlüsse zulassen. Beim Edestin wurde beispielsweise beobachtet, daß es eine lebhaftere Tyrosinreaktion gibt als die aus ihm entstehende »Fällung«. Und in der Tat wurde bei der Hydrolyse gefunden, daß die »Fällung« nur 1·4% Tyrosin liefert, statt 2·1% wie das ursprüngliche Edestin. Damit erhalten auch andere Unterschiede in der Intensität der Farbenreaktionen, so die bei den »Kohlenhydratreaktionen«, einige Bedeutung.

Wir haben beim Edestin die Einwirkung von Essigsäure weiter verfolgt und gefunden, daß neben der in Wasser sehr schwer löslichen Fällung, welche der Protalbinsäure, die aus Eiereiweiß und anderen Proteinen bei der Einwirkung von Alkalien entsteht, vergleichbar ist, auch eine Albumose und ein Pepton entsteht. Wegen experimenteller Schwierigkeiten sind diese zwei im allgemeinen nicht getrennt, sondern als Gemenge untersucht worden.

Es sei bemerkt, daß im Filtrat der »Protalbinsäure« auch bei Ganksättigung mit Ammonsulfat eine sehr geringe Fällung entstand und diese so schwer filtrierbar war, daß wir auf eine Beseitigung der Albumose verzichtet haben. Als aber das »Pepton« isoliert war, zeigte es sich, daß es zu 73% aus einer durch Ammonsulfat fällbaren Albumose bestand. Vielleicht behindern in der mit Ammoniak abgestumpften ursprünglichen Lösung die massenhaft vorhandenen Ammonsalze der Salz- und Essigsäure die Fällung der Albumose.

Aus 100 Teilen Edestin erhielten wir 13 Teile der in Wasser fast nicht löslichen »Protalbinfraktion« und 27 Teile des in Wasser leicht löslichen Albumose-Pepton-Gemenges. Wir wollen der Kürze halber letzteres in der Folge schlechtweg Stoff *B*, die »Protalbinfraktion« Stoff *A* benennen. Daß abgesehen vom Peptongehalt in der Albumose auch sonst in den untersuchten Stoffen chemische Individuen nicht vorliegen, braucht wohl nicht hervorgehoben zu werden.

Um zu erfahren, ob und in welcher Weise bei der Hydrolyse das im Edestin vorhandene Verhältnis der Aminosäuren verändert wird, wurde die Hydrolyse der beiden Fraktionen vorgenommen. Folgende Tabelle enthält die erhaltenen Zahlen, welchen die Angaben über das Edestin aus dem Cohnheimischen Lehrbuche beigelegt sind.

	Edestin	Stoff A	Stoff B
Histidin.....	2·19 ⁰ / ₀	2·2 ⁰ / ₀	3·6 ⁰ / ₀
Arginin.....	14·17	5·6	12·97
Lysin.....	1·65	0·81	0·85
Tyrosin.....	2·13	1·4	2·1
Glutaminsäure.....	6·3	1·5	10·86
Prolin.....	1·7	1·69	0·73
Phenylalanin.....	2·4	0·18	0·39
Aminosäuren (Leucin-Alanin-Glykokoll).....	11·1 ¹	9·35	8·49

Der Histidingehalt nimmt innerhalb sehr enger Grenzen kontinuierlich zu, so daß Stoff *B* den Höchstgehalt an Histidin zeigt. Wesentlichere Unterschiede sind beim Arginin vorhanden. Beim Übergang des Eiweißkörpers in Stoff *A* werden etwa 8⁰/₀

¹ Bei Berechnung dieser Zahlen haben wir bei der Hydrolyse der Stoffe *A* und *B* bloß jene Aminosäuren berücksichtigt, die aus den bei 12 *mm* bis 100° übergehenden Fraktionen erhalten wurden, weil Skraup und Hummelberger dieselbe Rechnung beim Eiweiß angewendet haben. Die von Abderhalden beim Edestin mitgeteilten Zahlen sind nicht ohne weiteres vergleichbar, da Abderhalden die Destillation von 60° aufwärts bei viel niedrigerem Druck (0·2 *mm*) vorgenommen hat als wir (12 *mm*). Der in der Tabelle für das Edestin aufgenommene Prozentgehalt von 11·1⁰/₀ berechnet sich aus den bis 60° (bei 10 *mm*) aufgefangenen Fraktionen. Die bis 100° bei demselben Druck übergehende ist nicht mitberücksichtigt, wodurch die von Abderhalden für das Leucin, Alanin und Glykokoll ermittelten Zahlen von uns zweifellos zu niedrig berechnet werden. Wenn man, was wohl zulässig ist, von der für die Fraktion bis 100° bei 0·2 *mm* übergehenden Menge annimmt, daß die Hälfte bei einem Drucke von 12 *mm* bis 100° übergegangen, also mit unserer Zahl für die Stoffe *A* und *B* vergleichbar wäre, berechnet sich für das Edestin an Leucin und Alanin statt 11⁰/₀ etwa 19⁰/₀.

Arginin abgespalten. Im Stoff *B* ist der ursprüngliche Wert fast wieder erreicht; der Unterschied im Arginingehalt zwischen Stoff *B* und dem Edestin beträgt nur etwa 1%, ein Wert, der von Versuchsfehlern herrühren kann. Der Lysingehalt in Stoff *A* und *B* ist ziemlich der gleiche; es zeigt sich aber eine kleine Abnahme bei Stoff *A* und *B* gegenüber dem Edestin selbst. Tyrosin ist in *A* geringer, in *B* fast gleich wie im Edestin. Ersteres stimmt, wie früher erwähnt, mit dem Ausfall der Millon'schen Reaktion.

Beim Prolin zeigt sich eine kontinuierliche Verminderung, die bei Stoff *B* außerhalb der Fehlergrenze liegen dürfte. Ähnliches gilt für das Phenylalanin, das sowohl im Stoff *A* wie im Stoff *B* um etwa den gleichen Betrag von 2% verringert ist. Große Unterschiede zeigen sich weiter in bezug auf den Glutaminsäuregehalt. Im Stoff *A* ist dieser dem Edestin gegenüber auf etwa $\frac{1}{3}$ gesunken, im Stoff *B* aber fast doppelt so hoch als im ursprünglichen Edestin.

Leucin, Alanin etc., die zusammen im rohen Zustande gewogen wurden, sind im Stoff *A* und *B* in ungefähr gleicher Menge vorhanden, aber sicher in geringerer als im Edestin (siehe Anmerkung auf p. 293 der Abhandlung).

Folgende Tabelle enthält eine Übersicht der Ausbeuten an Ester und der Aminosäuren (bei letzteren sind Prolin, Glutaminsäure und Phenylalanin nicht mitgerechnet) aus den einzelnen Fraktionen. Die Angaben für das Edestin sind der Arbeit von Abderhalden¹ entnommen. Wie schon bemerkt, hat Abderhalden bei viel kleinerem Drucke (0·2 mm) gearbeitet als wir (12 bis 10 mm). Die Vergleiche sind daher nur annähernd.

	I. Fraktion (bis 100°): entspricht bei Abderhalden etwa der 1., 2. und 3. Fraktion	II. Fraktion (100 bis 125°): entspricht bei Abderhalden etwa der 4. Fraktion	III. Fraktion (125 bis 170°): entspricht bei Abderhalden etwa der 5. Fraktion
Edestin	49·2% ²	9·9%	7·1%
Stoff <i>A</i>	13·2	5·8	6·6
Stoff <i>B</i>	10·6	9·8	18·2

¹ Zeitschr. f. physiol. Chemie, 37, 499 (1902).

² Vgl. die Anwendung auf p. 293 dieser Abhandlung.

Obzwar wir, wie schon erwähnt, auf eine eingehendere Trennung der flüchtige Ester liefernden Aminosäuren verzichtet haben, läßt der Vergleich der einzelnen Zahlen den Schluß zu, daß gegenüber dem Edestin in den Stoffen *A* und *B* die als Ester niedriger siedenden Aminosäuren (Glykokoll, Alanin und Leucin) vermindert, die höher siedenden (Asparaginsäure und das Serin) dagegen vermehrt sind.

Wie schon früher erwähnt wurde, weisen auch die Farbenreaktionen deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Stoffen auf. Bevor auf die einzelnen Unterschiede eingegangen wird, ist noch folgendes zu erwähnen: Erb¹ gibt an, daß beim Edestin die Reaktionen nach Molisch, Adamkiewicz und Liebermann negativ ausfallen; ähnliches gibt Osborne² an. Unser Edestin (aus Hanfsamen, Präparat von Höchst) gibt alle diese Reaktionen, wenn auch die nach Molisch in schwachem Grade. Durch viermaliges Auflösen des Edestins in verdünntem Ammoniak und Wiederausfällen desselben mit verdünnter Schwefelsäure (um etwa Verunreinigungen zu entfernen) wurde zwar die Reaktion mit α -Naphtol abgeschwächt, deutlich aber blieben die Reaktionen mit Thymol, nach Adamkiewicz-Hopkins und die von Liebermann.

Bei den Farbenreaktionen wurden sowohl gleiche Mengen der Probelösungen wie der Reagenzien benützt. Je 1.5 g eines jeden Stoffes wurde in der eben nötigen Menge Kalilauge gelöst und auf 20 cm^3 gebracht.

	Edestin	Stoff A	Stoff B
Biuretreaktion: 2 cm^3 KOH und 4 Tropfen verd. CuSO ₄ -Lösung	blauviolett	rotbraun	dunkelrot
Xanthoproteinreaktion: mit 2 cm^3 konz. HNO ₃ erwärmt	gelb	dunkelgelb	dunkelgelb. Etwas lichter wie bei Stoff A

¹ Zeitschr. f. Biol., 41, 309 (1901).

² Cohnheim, Eiweißkörper, 2. Aufl., 175.

	Edestin	Stoff A	Stoff B
Millon'sche Reaktion: 5 Tropfen Reagenz	schwach rosa	sehr schwach rosa	schwach rosa. Ungefähr gleich wie beim Edestin selbst
Thymolreaktion: 3 Tropfen Thymol und 2 cm ³ konz. H ₂ SO ₄	dunkelgelb. Etwas rötlich	intensiv dunkelrot	sehr schwache rötliche Färbung
α -Naphtholreaktion: 3 Tropfen α -Naphthol und 2 cm ³ konz. H ₂ SO ₄	braun mit violetter Farbtönen	intensiv violettbraun	Reaktion negativ
Reaktion nach Hopkins: Tryptophanreaktion. 3 Tropfen Glyoxylsäure und 2 cm ³ konz. H ₂ SO ₄	dunkelbraun	schmutzigbraun mit etwas violetter Farbtönen	blauviolett
Schwefelblei-reaktion: Die Lösung wurde mit alkalischer Bleilösung auf dem Wasserbade gekocht	Die ursprünglich lichtgelbe Lösung wurde dunkelbraun gefärbt	Die ursprünglich braune Lösung wurde etwas dunkler gefärbt	Die ursprünglich dunkelgelbe Lösung wurde gerade noch etwas dunkler gefärbt
Liebermann'sche Reaktion: In allen Fällen gleiche Mengen der Trockensubstanz	schwach blauviolett	braun mit violetter Farbtönen	lichtbraun

Die Biuretreaktion ist bei Stoff A und B positiv. Stoff B zeigt die reine rote Färbung, die den Albumosen und Peptonen eigen ist. Die Xanthoproteinreaktion ist ebenfalls positiv, am stärksten bei Stoff A. Die Millon'sche Reaktion ist dafür bei Stoff A am schwächsten, bei Stoff B ist sie ungefähr gleich stark wie beim ursprünglichen Eiweiß. Die Schwefelblei-reaktion ist beim Edestin sehr deutlich, bei den Stoffen A und B dagegen sehr schwach.

Was die Reaktion von Molisch betrifft, so gibt Stoff *A* mit Thymol eine intensive dunkelrote, mit α -Naphthol eine intensive violettbraune Färbung. Stoff *B* zeigt mit Thymol eine nur sehr schwache rötliche Färbung, mit α -Naphthol so gut wie keine Färbung. Es scheint also, daß die Kohlehydratgruppe im Stoff *A* reichlich vorhanden, im Stoff *B* dagegen abgespalten ist. Das gleiche beweist auch die Liebermann'sche Reaktion. Bei Stoff *B* tritt nur eine leichte Farbenveränderung, bei Stoff *A* dagegen eine satte violettbraune Färbung auf. Die Tryptophanreaktion nach Hopkins ist bei Stoff *B* sehr intensiv blauviolett, bei Stoff *A* sieht man eine schmutzigbraune Färbung mit etwas violettem Farbenton.

Da der Stoff *B* ein Gemenge einer Albumose und eines Peptons ist, war es anzunehmen, daß diese zwei Bestandteile die Farbenreaktionen mit verschiedener Intensität geben. Es wurde das Gemenge in Wasser gelöst, mit Schwefelsäure schwach angesäuert, mit konzentrierter Ammonsulfatlösung vollständig ausgefällt, im Filtrat mit reinem Baryt die Schwefelsäure genau ausgefällt und das Filtrat vom Bariumsulfat zur Trockene eingedampft. Mit dem so erhaltenen Pepton wurden unter den früher erwähnten Bedingungen die Farbenreaktionen wiederholt, aber keine besonderen Abweichungen wahrgenommen.

Wenn man die Reaktionen von Molisch und Liebermann als beweiskräftig für die Anwesenheit des Kohlenhydratkomplexes ansieht, spricht ihre verschiedene Stärke bei den Stoffen *A* und *B* dafür, daß der Kohlenhydratkomplex des Edestins in dem schwerer löslichen Stoff *A* noch vorhanden, in dem leichter löslichen Stoff *B* (Albumose und Pepton) nicht oder doch untergeordnet anwesend sei.

Skraup und Hummelberger haben bei Hydrolyse von Eiereiweiß mit Natronlauge aber gerade entgegengesetzte Verhältnisse aufgefunden. Die in Wasser schwer lösliche Protalbinsäure (vergleichbar dem Stoffe *A*) gibt die Reaktionen von Molisch und Liebermann kaum merklich; diese treten deutlich bei der Lysalbinsäure, noch stärker bei dem Pepton auf.

Es war nicht unmöglich, daß dieser Gegensatz daher kommt, daß die Hydrolyse beim Edestin mit starken Säuren,

beim Oxalbumin mit Alkalien durchgeführt wurde. Um darüber Aufschluß zu erhalten, haben wir das Edestin ganz in derselben Art mit Natronlauge behandelt wie Skraup und Hummelberger das Oxalbumin. Es entstanden auch hier drei in Löslichkeitsverhältnissen sehr verschiedene Stoffe, eine in Wasser sehr schwer lösliche Fraktion (Protalbinsäure), eine wasserlösliche, mit Ammonsulfat aussalzbare Albumose, Lysalbinsäure und ein nicht aussalzbares Pepton.

Mit diesen drei Fraktionen wurden die früher beschriebenen Farbenreaktionen ausgeführt. (Die Lysalbinfraktion und das Pepton waren mit Ammonsulfat verunreinigt, letzteres auch noch mit Aminosäuren.)

	Edestin	Protalbinsäure	Lysalbinsäure	Lysalbinpepton
Biuretreaktion: 2 <i>cm</i> ³ konz. KOH und 3 Tropfen verd. CuSO ₄ - Lösung	blauviolett	rotviolett	violett	violett
Xanthoproteinreaktion: Die Lösung wurde auf dem Wasserbade mit 2 <i>cm</i> ³ konz. HNO ₃ erwärmt	schwach gelb	schwach gelb	schwach gelb	schwach gelb
Millon'sche Reaktion: 5 Tropfen Reagenz	rosa	Die Reaktion wird immer schwächer		keine Reaktion
Thymolreaktion: 3 Tropfen Thymol und 2 <i>cm</i> ³ konz. H ₂ SO ₄	rotgelb	dunkelrotgelb	gelb mit etwas rötlichem Farbenton	gelb mit nur ganz schwach rötlichem Farbenton
α-Naphtolreaktion: 3 Tropfen α-Naphtol und 2 <i>cm</i> ³ konz. H ₂ SO ₄	braun mit deutlich violettem Farbenton	braun mit dunkelviolettem Farbenton	braun mit rotem Farbenton	braun

	Edestin	Protalbin- säure	Lysalbin- säure	Lysalbin- pepton
Reaktion nach Hopkins: 3 Tropfen Glyoxylsäure und 2 cm^3 konz. H_2SO_4	dunkelblau	ebenso	ebenso	ebenso
Schwefelblei-reaktion: die Lösung wurde mit alkalischer Bleilösung auf dem Wasserbade gekocht	braun	Die ursprüng- lich bräunliche Lösung wird etwas dunkler gefärbt	Keine Farbenveränderung. Reaktion negativ	
Reaktion nach Liebermann: gleiche Sub- stanzmengen wurden mit 2 cm^3 rauchen- der HCl auf dem Wasser- bad erhitzt	schwach violett	gelb mit schwach violetter Farbenton	gelb mit sehr schwach röt- lichem Farbent- on	negativ

Wie aus der Tabelle hervorgeht, bestehen bei den mit Protalbin-, Lysalbinsäure und Lysalbinpepton bezeichneten Fraktionen dieselben Unterschiede in den Farbenreaktionen, die für den Kohlenhydratrest charakteristisch sind, wie bei den Stoffen *A* und *B* der sauren Hydrolyse. Es macht infolgedessen beim Edestin für die Verteilung des Kohlenhydratrestes nichts aus, ob die Hydrolyse mit alkalischen oder sauren Mitteln erfolgt, und wenn nun zwischen dem Edestin und dem Oxalbumin der Unterschied besteht, daß bei der partiellen Hydrolyse des ersten die Kohlenhydratreste sich in den in Wasser schwerer löslichen Produkten der Hydrolyse anhäufen, bei dem zweiten aber umgekehrt in den leichter löslichen, so ist man wohl berechtigt, dieses verschiedene Verhalten auf Konstitutionsunterschiede zurückzuführen.

Wenn man die Verteilung der verschiedenen einfachsten Spaltungsstücke im Edestin sowie in den Stoffen *A* und *B* mit jener vergleicht, die im Eiweiß und seinen durch alkalische Hydrolyse entstehenden Abkömmlingen (Protalbin, Lysalbin und Pepton) besteht, so stellt sich folgendes heraus:

Geht Eiweiß in die Protalbinsäure über, so steigt der Gehalt an Histidin, Tyrosin, an Phenylalanin und Aminosäuren (Leucin, Alanin) in einem über die Fehlergrenze hinausgehenden Grade, die Glutaminsäure nimmt ab.

Bei dem vergleichbaren Übergange von Edestin in den Stoff *A* nimmt ebenfalls die Glutaminsäure ab, es findet aber im Gegensatz zum Eiereiweiß auch eine Verminderung von Tyrosin, Phenylalanin und den Aminosäuren statt und das Arginin, welches bei der alkalischen Hydrolyse des Eiweißes in allen Produkten dieser in fast gleicher Menge vorhanden ist, wird bei der sauren Hydrolyse des Edestins durch den Übergang in den Stoff *A* sehr wesentlich vermindert.

Beim Eiweiß wurde beobachtet, daß für alle die bekannteren einfachen Spaltungsprodukte die Regelmäßigkeit gilt, daß sie insgesamt in der Reihenfolge Protalbinsäure, Lysalbin und Pepton abnehmen, so daß letzteres von ihnen überhaupt nur sehr kleine Mengen enthält.

Beim Edestin ist diese Regelmäßigkeit zum Teil geradezu verkehrt.

Im Stoff *B* (Gemenge von Albumose und Pepton) nehmen im Vergleich zum Stoff *A* (der Protalbinsäure vergleichbar) das Histidin merklich, Arginin, Glutaminsäure sehr erheblich zu und über das Maß der zu erwartenden Versuchsfehler.

Ob diese Unterschiede ausschließlich der verschiedenen Konstitution des Edestins und Eiweißes oder teilweise, wenn nicht ganz der verschiedenen Art der Hydrolyse zufallen, beim Edestin durch Säuren, beim Eiweiß durch Alkalien, soll durch weitere Versuche ermittelt werden.

Schließlich sei noch bemerkt, daß nach Abderhalden und Reinhold¹ Edestin aus Sonnenblumen mit Pankreassaft hydrolysiert, relativ rasch das ganze Tyrosin und wohl auch

¹ Zeitschr. f. physiol. Chemie, 44, 284.

die ganze Glutaminsäure abscheidet. Was die Glutaminsäure anbelangt, liegen vergleichbare Zahlen nicht vor, da Abderhalden und Reinhold die Glutaminsäure aus diesen Verdauungsversuchen nur im rohen Zustande gewogen haben. Unsere Versuche zeigen, daß wenigstens bei saurer Hydrolyse das Tyrosin nicht sofort vollständig abgespalten, sondern in einem pepton- oder albumoseartigen Zwischenprodukt vorübergehend aufgespeichert wird.

Experimenteller Teil.

500 g lufttrockenes Edestin (= 446 g Trockensubstanz) wurden in die zehnfache Menge eines Gemisches von gleichen Raumteilen Eisessig und rauchender Salzsäure unter fortwährendem Schütteln eingetragen. Nach 5 Stunden war die Substanz vollständig mit rotvioletter Farbe gelöst. Nach 96-stündigem Stehen bei gewöhnlicher Temperatur wurde die Lösung unter guter Eiskühlung mit Ammoniak bis zur schwach sauren Reaktion versetzt.

Der ausfallende Niederschlag wurde trocken genutscht, dann mit $\frac{1}{2}$ l Wasser angerieben und nochmals abgenutscht. Die lufttrockene Fällung wog 407 g. Sie enthielt 28% Wasser, sehr erhebliche Mengen von Chlorammonium (45%) und etwas Ammoniumacetat (0.5%), also nur rund 25% = 99.7 g organische Substanz, was mit den Ergebnissen der im kleinen Maßstab ausgeführten Vorversuche recht gut stimmt.

Der Niederschlag wurde fein gepulvert, in 1 l heißen Wassers eingetragen, wobei er halbweich wurde, und in diesem gut verrührt. Nach Wiederholung dieser Operation betrug das Gewicht der Fällung lufttrocken 130 g. Um die letzten Reste von Chlorammonium wegzubringen, mußte noch fünfmal mit etwa je 400 cm^3 heißen Wassers verrührt werden. Im letzten Washwasser war dann kein Chlor mehr nachzuweisen.

Der in Wasser schwer lösliche Stoff (Stoff A) hatte nun im feuchten Zustand ein Gewicht von 78 g und enthielt

58 g Trockensubstanz. Jedes der fünf letzten Waschwässer wurde separat eingedampft. Sie hinterließen an Rückstand: das erste Waschwasser 16 g, die folgenden 10, 3, 1 und 0.7 g.

Aus diesen Daten geht hervor, daß der Hauptbestandteil der Ammoniakfällung in Wasser praktisch kaum löslich ist und durch die beschriebenen Operationen von leichter löslichen Beimengungen der Hauptsache nach befreit werden konnte. Nach seinen Eigenschaften entspricht er der Protalbinsäure, die durch Hydrolyse mit Alkalien aus Proteinen zu erhalten ist.

Filtrat und die allerersten Waschwässer vom Stoff *A* wurden eingedampft, bis sich Chlorammonium reichlich abschied. Von der klaren Flüssigkeit wurden 300 cm^3 entnommen und mit fein gepulvertem Ammonsulfat gesättigt. Es fiel auch nach längerem Stehen nur ein sehr geringer Niederschlag aus. Deshalb wurde vom Aussalzen der Albumosen mit Ammonsulfat abgesehen und die Flüssigkeit durch weiteres Eindampfen von Chlorammonium befreit und solches fortgesetzt, solange noch erhebliche Mengen desselben auskrystallisierten. Um Verluste an organischer Substanz möglichst zu vermeiden, wurde das trocken gesaugte Salz mit 50% Alkohol angerührt und wieder scharf abgenutscht. Um das in der Flüssigkeit noch enthaltene Chlorammonium und Ammonacetat zu entfernen, wurde endlich die Lösung der Dialyse unterworfen. In einem Vorversuche wurden zuerst 70 cm^3 der Flüssigkeit durch entsprechendes Verdünnen auf etwa 10% gebracht und in einem Schlauch von Pergamentpapier dialysiert. Das Außenwasser wurde nach jedesmaligem Ablassen auf die Höhe des Innenschlauches nachgefüllt. In einem Teile der abgelassenen Flüssigkeit wurde der Chlorgehalt bestimmt, der Rest eingedampft. Zum Schlusse nahm der Chlorgehalt im Außenwasser so gut wie nicht mehr ab, der Chlorgehalt im Innenschlauch ebenfalls nicht. Letzterer war schließlich erheblicher als der in der Außenflüssigkeit.

Das Dialysierwasser aus dem äußeren Mantel wurde abgelassen nach	Volumen des Dialysierwassers	Gesamtchlorgehalt des Dialysierwassers	Gewicht des Rückstandes vom eingedampften Dialysierwasser	Gesamtchlorgehalt der im Innern des Schlauches befindlichen Flüssigkeit
12 ^h	227 <i>cm</i> ³	1·12 <i>g</i>	} 11·2 <i>g</i>	
2.12	288	0·8		
3.12	310	0·59		
5.12	333	0·33		
6.12	358	0·28	0·92	
7.12	368	0·09	0·58	0·126 <i>g</i>
9.12	360	0·03	0·56	0·044
11.12	346	0·02	0·53	0·028
13.12	322	0·015	0·34	0·024

Nach diesem Vorversuche wurde nun die übrige Flüssigkeit nach der Verdünnung auf 10% der Dialyse unterworfen. Ihr Gesamtvolumen war dann 7116 *cm*³. Nach je 24 Stunden wurde das Wasser gewechselt. Nach 8 Tagen war auch diesmal im Innern der Schläuche fast kein Chlor nachzuweisen. Die Dialysierwässer wurden eingedampft und der Rückstand gewogen.

Der Rückstand des Dialysierwassers wog nach 24 Stunden 271 *g*, nach 2.24 Stunden 149 *g*, nach 3.24 Stunden 76 *g*, nach 4.24 Stunden 46·5 *g*, nach 5.24 Stunden 30 *g*, nach 6.24 Stunden 20 *g*, nach 7.24 Stunden 13 *g*, nach 8.24 Stunden 5 *g*.

Der Inhalt der Dialysierschläuche wurde nach der Unterbrechung der Dialyse bei möglichst geringer Temperatur auf dem Wasserbad eingedunstet. Der zurückgebliebene Stoff (Stoff *B*) wog in feuchtem Zustand 134·6 *g*. Nach dem Vorversuche waren 127·5 *g* zu erwarten. In 100 Teilen des feuchten Stoffes waren noch 10·5% Wasser enthalten. Demnach entsprechen 134·6 *g* feuchte Substanz 120·5 *g* trockener Substanz. Dieser Stoff, der in Wasser sehr leicht löslich ist, erwies sich, wie schon erwähnt, als ein Gemenge von Albumose und Pepton. Um das Verhältnis beider Stoffe festzustellen,

wurden 1·494 g trockene Substanz in der eben nötigen Menge Wasser gelöst, mit Schwefelsäure angesäuert, dann gesättigte Ammonsulfatlösung zugesetzt, solange eine Fällung zu beobachten war. Vom Niederschlage wurde abfiltriert, im Filtrat mit reinem Ätzbaryt die Schwefelsäure genau ausgefällt und das Filtrat vom Bariumsulfat zur Trockene gedampft. Der Rückstand (ein durch Ammonsulfat nicht fällbares Pepton) wurde bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und betrug 0·415 g.

100 Teile des Stoffes *B* enthalten daher 73 Teile Albumose und 27 Teile Pepton.

Hydrolyse der Stoffe *A* und *B*.

Die Hydrolyse behufs Nachweises der einfachsten Spaltungsstücke erfolgte nach Kossel-Kutscher, ebenso die Bestimmung der Hexonbasen. Die übrigen Aminverbindungen haben wir im wesentlichen in der Art bestimmt, wie es Skraup und Hummelberger bei der Untersuchung der Protalbinsäure etc. beschrieben haben. Kleine Abänderungen werden bei den einzelnen Analysen erwähnt. Beim Auskrystallisieren der rohen salzsauren Glutaminsäure wurde durchschnittlich 8 Tage im Eisschrank belassen.

Um die Zusammensetzung des von uns benützten Edestins kennen zu lernen (Präparat der Höchster Farbwerke aus Hanfsamen), wurde die Kossel-Kutscher'sche Trennungsmethode der Hexonbasen mit dem Edestin ausgeführt. Verwendet 60 g trockenes Edestin mit 180 g konzentrierter Schwefelsäure und 360 g Wasser. Kochdauer 14 Stunden. In folgender Tabelle sind auch die in der Literatur vorliegenden Analysenzahlen¹ angegeben.

	Histidin	Arginin	Lysin
Schulze und Winterstein.	1·350%	10·7 %	1·090%
Abderhalden	0·98	11·2	1·55
	1·1	11·7	1
	2·6	13·97	1·67
Kossel und Platten	2·1	14·36	1·63
	2·1	—	—
Skraup und Wöber	1·2	12·2	0·9

¹ Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. 38.

Stoff A.

40·4 g lufttrockene Substanz (= 30 g Trockensubstanz!), dreifaches Gewicht konzentrierte Schwefelsäure, sechsfaches Gewicht Wasser, Kochen am Rückflußkühler 14 Stunden. Es wurde gefunden: 0·968 g Histidinchlorhydrat, gleich 0·661 g Histidin.

Arginin: Berechnet aus der Titration (48·46 cm^3 $\frac{1}{5}$ n. Salpetersäure vom Faktor 1·016) 1·684 g Arginin.

Der Trockenrückstand der neutralisierten Lösung war 2·529 g Argininnitrat ($C_6H_{14}N_4O_2 \cdot HNO_3 \cdot \frac{1}{2}H_2O$) gleich Arginin 1·79 g.

Lysin: Rohpikrat 0·9729 g. Durch Umkrystallisieren aus Wasser zunächst 0·491 g. Aus den Mutterlaugen noch 0·137 g, zusammen also 0·6289 g Lysinpikrat vom Explosionpunkte 257 bis 258°.

Tyrosin: Rohkrystallisation 9·5 g (feucht gewogen). Daraus wurde durch systematisches Umkrystallisieren 0·429 g reines Tyrosin erhalten.

Filtrate und Mutterlaugen vom Tyrosin bis zu 45 cm^3 eingedampft und dann mit Salzsäure gesättigt. Durch systematisches Umkrystallisieren und Eindampfen der Rohkrystallisation erhalten 0·238 g reines Glutaminsäurechlorhydrat, d. i. 0·19 g freie Glutaminsäure.

Das Filtrat vom Glutaminsäurechlorhydrat hinterließ beim Eindampfen einen 19·5 g schweren Rückstand, der durch die Veresterung 23 g Esterchlorhydrate lieferte. Aus diesen wurden nach E. Fischer 13·3 g Rohester und endlich durch Destillation im Vakuum bei 10 bis 12 mm Druck 7·7 g reiner Ester erhalten, und zwar:

1. Fraktion bis 100° 3·972 g, 2. Fraktion 100 bis 125° 1·731 g, 3. Fraktion 125 bis 170° 2·002 g.

Aus der 1. Fraktion wurde 0·325 g Prolin, aus der 2. 0·182 g, zusammen also 0·507 g Prolin gewonnen.

Die petrolätherischen Auszüge der 2. und 3. Fraktion lieferten durch die Verseifung mit Salzsäure 0·341 g Phenylalaninchlorhydrat. Daraus wurde durch Umkrystallisieren 0·054 g Phenylalanin gewonnen vom Schmelzpunkte 258 bis

259°. (Nach der Literaturangabe besitzt reines Phenylalanin den Schmelzpunkt 263°.) Mit Chromsäure und Schwefelsäure erhitzt, lieferte es Phenylacetaldehydgeruch. Aus den Mutterlaugen konnte kein Phenylalanin mehr gewonnen werden (Schmelzpunkt der nächsten Krystallisation 240°).

Aus der 3. Fraktion wurde noch 0·109 g Glutaminsäurechlorhydrat abgeschieden; das entspricht 0·09 g freier Glutaminsäure.

Außer den bis jetzt bestimmten Aminosäuren lieferte noch die 1. Fraktion 2·807 g, die 2. Fraktion 1·199 g, die 3. Fraktion 1·007 g Aminosäuren, zusammen wurden also 5·013 g Aminosäuren erhalten.

Aus dem im Fraktionierkolben verbliebenen Rückstande (3·3 g) wurde noch 0·206 g reines Glutaminsäurechlorhydrat, d. i. 0·16 g Glutaminsäure, abgeschieden. In diesem Glutaminsäurechlorhydrat wurde das Chlor bestimmt.

0·2053 g Glutaminsäurechlorhydrat lieferte 0·16 g Chlorsilber.

Daher in 100 Teilen:

	Gefunden	Berechnet
Cl.....	19·24	19·309

Stoff B.

35 g Trockensubstanz wurden 14 Stunden mit der dreifachen Menge konzentrierter Schwefelsäure und der sechsfachen Menge Wasser gekocht.

Es wurden 1·855 g Histidinechlorhydrat ($C_6H_9N_3O_2 \cdot 2HCl$) gefunden, das entspricht 1·2663 g Histidin.

Zur Titration des Arginins wurden 130·149 cm^3 einer $\frac{1}{5}$ n. Salpetersäure verbraucht. Demzufolge wurden 4·528 g Arginin gefunden. Beim Eindampfen der Lösung hinterblieben 7·031 g Argininnitrat (gewogen als $C_6H_{14}N_4O_2 \cdot HNO_3 \cdot \frac{1}{2}H_2O$). Daraus berechnen sich 4·97 g Arginin.

Lysin, als Rohpikrat gewogen, 3·9 g. Daraus wurde durch Umkrystallisation aus Wasser 0·7645 g reines Lysin-pikrat (Explosionspunkt 249 bis 250°) erhalten. Das aus der

Mutterlauge erhaltene Produkt erwies sich im wesentlichen als Bariumpikrat.

Bei der Tyrosinkrystallisation wurden 10 g Rohkrystallisation erhalten, aus dieser durch wiederholte fraktionierte Krystallisation 0·741 g Reintyrosin. Das Filtrat vom Tyrosin sowie dessen Mutterlaugen wurden bis auf 40 cm^3 eingedampft und dann nach der bekannten Methode die Glutaminsäure abgeschieden. Rohkrystallisation 3·57 g. Mit Baryt erwärmt, trat stark Geruch nach Ammoniak auf. Um deshalb das anhaftende Chlorammonium zu zerstören, wurde die Rohkrystallisation in Wasser gelöst und mit Ätzbaryt zur Vertreibung des Ammoniaks gekocht. Das Barium wurde dann mit Schwefelsäure entfernt. Es wurde hernach durch fraktionierte Krystallisation 2·292 g reines Glutaminsäurechlorhydrat gefunden, d. i. 1·83 g freie Glutaminsäure.

Chlorbestimmung im Chlorhydrat:

0·2676 g Chlorhydrat ergaben 0·2093 g Chlorsilber.

Daher in 100 Teilen:

	Gefunden	Berechnet
Cl.....	19·31	19·30

Das Filtrat vom Glutaminsäurechlorhydrat hinterließ beim Eindampfen im Vakuum einen Rückstand, der 28 g wog. Durch Veresterung dieses wurden 32·5 g Esterchlorhydrate erhalten und aus diesen 23 g Rohester. Durch Destillation im Vakuum bei 10 bis 12 mm Druck wurden endlich 13·6 g reiner Ester gewonnen, und zwar:

Fraktion bis 100° 3·73 g Ester, 100 bis 125° 3·44 g, 125 bis 170° 6·39 g. Aus der 1. Fraktion wurde 0·258 g Prolin gewonnen, in der 2. Fraktion wurde keines gefunden.

Die petrolätherischen Auszüge der 2. und 3. Fraktion, mit viel Salzsäure eingedampft, lieferten 1·179 g rohes Phenylalaninchlorhydrat. Daraus wurde 0·3059 g unreines Phenylalanin erhalten. Dieses wurde weiter fraktioniert umkrystallisiert. Die erste Krystallisation (Schmelzpunkt 271 bis 273°) wog 0·044 g, die zweite (Schmelzpunkt 271 bis 273°) wog

0·06 g, die dritte (Schmelzpunkt 264 bis 266°) wog 0·035 g. Es wurde also im ganzen 0·139 g reines Phenylalanin erhalten, das, mit Chromsäure und Schwefelsäure erhitzt, Phenylacetaldehydgeruch lieferte.

Aus der 3. Fraktion wurde noch 0·171 g Glutaminsäurechlorhydrat, d. i. 0·13 g Glutaminsäure abgeschieden.

Von den übrigen Aminosäuren (Leucin etc.) lieferte die 1. Fraktion 2·973 g, die 2. Fraktion 2·065 g, die 3. Fraktion 3·414 g; zusammen also wurden 8·45 g Aminosäuren erhalten.

Der Rückstand, der im Kolben nach der Esterdestillation verblieb, betrug 6·3 g. Aus ihm wurde 2·298 g reines Glutaminsäurechlorhydrat, d. i. 1·84 g freie Glutaminsäure, erhalten.

Hydrolyse des Edestins mit 6% Natronlauge.

20 g Edestin (= 17·8 g Trockensubstanz) wurde genau nach den Angaben von Skraup und Hummelberger¹ für das Eialbumin mit 6% Natronlauge hydrolysiert. Beim Übergießen der Substanz mit der fünffachen Menge Wasser und der berechneten Menge festen Ätznatrons trat schon in der Kälte nach kurzer Zeit Lösung ein. Während der Hydrolyse war starker Ammoniakgeruch zu bemerken.

Beim Ausfällen mit 33% und schließlich mit 25% Schwefelsäure trat leichter Geruch nach Schwefelwasserstoff auf. Die ausgefällten Klumpen wurden auf Leinwand scharf abgesaugt. In feuchtem Zustande betrug sie 22% des Ausgangsmaterials. Zur Reinigung wurden sie zweimal unter Wasser umgeschmolzen (Protalbinsäure).

Das Filtrat von der Fällung wurde nach dem Neutralisieren mit Ammoniak ungefähr auf das dreifache Gewicht des Ausgangsmaterials eingedampft und dann mit fein gepulvertem Ammonsulfat in der Hitze ausgefällt. Dabei fiel ein harziger Niederschlag aus, der sich beim Umrühren zu Klumpen vereinigte. Von ihm wurde in der Hitze abgegossen. Sein Gewicht betrug 30 g. Die Fällung wurde in der 1·5-fachen Gewichtsmenge Wasser heiß gelöst und 30 g Ammonsulfat eingetragen.

¹ Monatshefte für Chemie, 1909.

Der Niederschlag wog jetzt $15\frac{1}{2}$ g und verminderte sich bei neuerlicher Umfällung auf 13 g (Lysalbinsäure). Die Filtrate von der Lysalbinsäure wurden vereinigt und bis auf ein kleines Volumen eingedampft, wobei sich eine kleine Menge braunes Harz abschied, welches abgeschöpft wurde. Von der reichlichen Ammonsulfatkrystallisation wurde abfiltriert und dieses mit 50% Alkohol ausgewaschen. Durch noch zweimaliges gleiches Verfahren wurde die Lösung von weiteren kleineren Harzmengen und der Hauptmenge des Ammonsulfates befreit. Der Rest des letzteren wurde durch Zusatz von etwa dem gleichen Volumen Alkohol abgeschieden, dem etwa 5% des Volums Ammoniak zugefügt war. Das Filtrat vom abgeschiedenen Ammonsulfat wurde abermals eingedampft und in der gleichen Weise behandelt. Hernach wurde das Filtrat, welches neben dem Pepton die durch vollständigen Zerfall entstehenden Aminosäuren enthält, zur Trockene eingedampft. Der Rückstand (in Ammonsulfat lösliches Pepton, Lysalbinpepton) betrug $5\frac{1}{2}$ g.

Es lieferten also 100 Teile Edestin 22 Teile Säurefällung, Protalbinsäure, 72 Teile Albumose, Lysalbinsäure und 30 Teile Pepton, Lysalbinpepton, letztere beide mit Ammonsulfat verunreinigt.
