

Weitere Beiträge zur Kenntnis der Zusammensetzung der Proteine.

Von

Emil Abderhalden und Arthur Voitinovici.

(Aus dem chemischen Institut der Universität Berlin.)

(Der Redaktion zugegangen am 6. Juni 1907.)

1. Hydrolyse des Ichthylepidins aus den Schuppen von *Cyprinus Carpio* (Karpfen).

Das Ichthylepidin ist zum erstenmal von C. Th. Mörner aus Fischschuppen dargestellt worden.¹⁾ Es hinterbleibt, wenn man Fischschuppen mit verdünnter Salzsäure behandelt, oder wenn man diese mit Wasser auskocht. Hierbei geht eine leimartige Substanz in Lösung, während das Ichthylepidin zurückbleibt. Bei der Darstellung des Proteins folgten wir genau der Vorschrift von Mörner. Die Schuppen von Karpfen wurden zunächst in Wasser stehen gelassen. Es gelingt dann leicht, sie von ihrer Unterlage abzutrennen und von anhängenden Hautfetzen zu befreien. Die so möglichst gereinigten Schuppen digerierten wir mit 0,5%iger Salzsäure. Nach je 24 Stunden erneuerten wir die Flüssigkeit. Dieser Prozeß wurde mehrere Tage fortgesetzt und dann nach dem Abgießen der Salzsäure und Auswaschen der Schuppen mit Wasser, bis die abfließende Flüssigkeit keine Chlorreaktion mehr gab, die ganze Masse 24 Stunden mit 0,05%iger Kalilösung stehen gelassen. Die Flüssigkeit wurde wiederum abgegossen, die Schuppen mit Wasser dekantiert, mit 0,01%iger Essigsäure gewaschen und dann wiederum mit viel Wasser dekantiert. Auf diese Weise wurde der größte Teil der Mineralsubstanzen, verschiedene Proteine und die Hauptmasse des Guanins entfernt. Die so vorbereitete Substanz wurde nun 10 Tage lang in einem Ther-

¹⁾ C. Th. Mörner, Die organische Grundsubstanz der Fischschuppen, Diese Zeitschrift, Bd. XXIV, S. 125 (1898).

mostaten bei 40° mit 0,1% iger Salzsäure digeriert. Die Lösung erneuerten wir jeden Tag. Sobald kein Glutin mehr nachweisbar war, wurden die Fischschuppen mit viel Wasser und dann mit Alkohol und Äther gewaschen. Das lufttrockene Präparat enthielt 0,06% Asche. Die Analyse ergab folgende Zahlen:

0,4683 g Ichthylepidin gaben 0,8737 g CO₂ und 0,2743 g H₂O
 0,4669 „ „ 64,1 ccm N, t = 18°, B = 756 mm
 0,8637 „ „ 0,0641 g BaSO₄ = 0,0088 g S.

Aus diesen Resultaten ergibt sich folgende Zusammensetzung für das Ichthylepidin:

50,87% C; 6,56% H; 15,69% N; 1,02% S; 25,8% O.

Bei der Hydrolyse dieses Präparates mit Säuren erhielten wir auf 100 g aschefreie und bei 100° bis zur Gewichtskonstanz getrocknete Substanz berechnet, folgende Mengen an Aminosäuren:

5,7% Glykokoll
 3,1% Alanin
 15,1% Leucin
 6,7% Prolin
 1,2% Asparaginsäure
 9,2% Glutaminsäure
 1,0% Tyrosin.

Für die vorliegende Untersuchung verwendeten wir 150 g Ichthylepidin, welches mehrere Tage im Trockenschrank aufbewahrt worden war. Zur Hydrolyse kochten wir es 6 Stunden mit 450 ccm rauchender Salzsäure am Rückflußkühler. Nach starkem Einengen der filtrierten Flüssigkeit unter vermindertem Druck schieden wir zunächst die Glutaminsäure in der üblichen Weise als salzsaures Salz ab. Seine Menge betrug 14,9 g. Die Mutterlauge von der salzsauren Glutaminsäure dampften wir unter vermindertem Druck zum dicken Sirup ein. Dieser wurde in der gewohnten Weise verestert und die Ester mit der auf den vorhandenen Salzsäuregehalt berechneten Menge Natriumäthylat in Freiheit gesetzt. Die fraktionierte Destillation der Ester ergab folgendes Resultat:

I. von	40—60°	des Wasserbades	unter 12 mm Druck	=	264 g
II. „	60—100°	„	„ 12 „	=	2 „
III. bei	105°	Ölbades	„ 0,4 „	=	84 „
IV. von	105—190°	„	„ 0,4 „	=	20 „

Die einzelnen Fraktionen verarbeiteten wir in der gewohnten Weise. Im folgenden geben wir eine Übersicht über die erhaltenen Resultate. Aus Fraktion I, II und III gewannen wir 10,1 g Prolin.

Fraktion I enthielt 4,5 g Glykokoll, das als Esterchlorhydrat zur Abscheidung gelangte, und 1,1 g Alanin. Fraktion II und III enthielten 4,1 g Glykokoll, 3,5 g Alanin, 19,6 g Leucin.

Valin scheint nicht vorhanden zu sein, wenigstens konnten wir es in reinem Zustande nicht darstellen.

Fraktion IV endlich enthielt Asparaginsäure 1,9 g, außerdem gewannen wir noch 2,3 g Glutaminsäure. Dem Serin sind wir nicht begegnet.

Phenylalanin scheint dem Ichthylepidin zu fehlen. Wir erhielten beim Versuch, es in der gewohnten Weise in Form seines Esters von den übrigen Aminosäureestern dieser Fraktion zu trennen, ein sehr unangenehm riechendes, offenbar schwefelhaltiges Öl, das wir nicht näher untersucht haben. Es ist nicht völlig ausgeschlossen, daß dieses Öl Phenylalaninester einschloß. Jedenfalls kann dessen Menge nur klein gewesen sein.

Tyrosinbestimmung. Aus 30 g Ichthylepidin wurden 0,3 g reines Tyrosin erhalten. Die Hydrolyse erfolgte auch hier durch 16 stündiges Kochen mit der fünffachen Menge 25%iger Schwefelsäure.

Die Analysen ergaben:

Alanin:

0,2107 g Substanz gaben 0,3134 g CO_2 und 0,1474 g H_2O

Berechnet für $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2$:	Gefunden:
40,45% C und 7,87% H.	40,56% C und 7,83% H.

0,2557 g Kupfersalz gaben 0,0843 g CuO

Berechnet für $(\text{C}_3\text{H}_6\text{NO}_2)_2\text{Cu}$:	Gefunden:
26,41% Cu.	26,28% Cu.

Leucin:

0,1889 g Substanz gaben 0,3795 g CO_2 und 0,1705 g H_2O

Berechnet für $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_2$:	Gefunden:
54,96% C und 9,92% H.	54,79% C und 10,10% H.

0,2150 g Kupfersalz gaben 0,0527 g CuO

Berechnet für $(\text{C}_6\text{H}_{12}\text{NO}_2)_2\text{Cu}$:	Gefunden:
19,65% Cu.	19,54% Cu.

Prolin:

0,1736 g Substanz (lufttrockene) gaben 0,0179 g H ₂ O	
Berechnet für (C ₅ H ₇ NO ₂) ₂ Cu + 2 H ₂ O:	Gefunden:
10,99% H ₂ O.	10,30% H ₂ O.
0,1557 g bei 120° getrocknetes Prolinkupfer gaben 0,0341 g CuO	
Berechnet für (C ₅ H ₇ NO ₂) ₂ Cu:	Gefunden:
21,81% Cu.	21,91% Cu.

Asparaginsäure:

0,1631 g Substanz gaben 0,2150 g CO ₂ und 0,0778 g H ₂ O	
Berechnet für C ₄ H ₇ NO ₄ :	Gefunden:
36,09% C und 5,26% H.	35,95% C und 5,33% H.

Glutaminsäure:

0,1631 g Substanz gaben 0,2434 g CO ₂ und 0,0900 g H ₂ O	
Berechnet für C ₅ H ₉ NO ₄ :	Gefunden:
40,81% C und 6,12% H.	40,7% C und 6,17% H.

Tyrosin:

0,1023 g Tyrosin gaben 0,2211 g CO ₂ und 0,0597 g H ₂ O	
Berechnet für C ₉ H ₁₁ NO ₃ :	Gefunden:
59,66% C und 6,07% H.	58,95% C und 6,53% H.

2. Hydrolyse des Blutfibrins.

Das Blutfibrin ist im hiesigen Institut bereits von Arnold Brunner¹⁾ unter Anwendung der Estermethode auf seinen Gehalt an Monoaminosäuren untersucht worden. Es gelang ihm, Glykokoll (2,2%), Alanin (3,1%), Leucin (13,0%), Prolin (2,4%), Asparaginsäure (1,7%), Glutaminsäure (6,6%), Phenylalanin (1,2%) und Tyrosin (3,2%) nachzuweisen und ferner das Vorhandensein von Valin und Serin wahrscheinlich zu machen. Wir hatten Gelegenheit, mechanisch möglichst sorgfältig gereinigtes Fibrin aus Pferdeblut zu untersuchen. Das Fibringerinnsel war sofort nach dem Schlagen des Blutes energisch mit Wasser ausgewaschen und dann zerkleinert worden. Die fein zerhackte Masse wurde dann noch wiederholt mit physiologischer Kochsalzlösung dekantiert, bis die abfließende Flüssigkeit ganz farblos war. Das scharf abgepreßte Präparat wuschen wir nun solange mit Wasser, bis das Filtrat keine Chlorreaktion mehr gab. Das mit Alkohol und Äther gewaschene und bei

¹⁾ Arnold Brunner, Hydrolyse des Blutfibrins, Inaug.-Dissert. Berlin 1905.

100° bis zur Gewichtskonstanz getrocknete Präparat enthielt noch 0,5% Asche. Zur Hydrolyse verwandten wir 251,5 g. Diese Menge wurde mit 750 ccm rauchender Salzsäure 6 Stunden am Rückflußkühler gekocht und die Hydrolysenflüssigkeit nach dem Filtrieren unter vermindertem Druck stark eingeeengt. Wir schieden zunächst die Glutaminsäure als salzsaures Salz möglichst quantitativ ab und verarbeiteten dann die Mutterlauge in gewohnter Weise auf die Ester der Monoaminosäuren. Auf freie Glutaminsäure berechnet erhielten wir 26,0 g.

Die Destillation der Ester gab folgendes Resultat:

Fraktion I:	bis 60°	des Wasserbades	und 12 mm Druck	= 40 g
„ II:	100°	„	12 „	= 40 „
„ III:	100°	„	0,2 „	= 55 „
„ IV:	180°	Ölbades	0,2 „	= 30 „

Es sei noch erwähnt, daß die Ester mit Natronlauge und Kaliumcarbonat in Freiheit gesetzt und in Äther aufgenommen worden war. Über die Verarbeitung der einzelnen Fraktionen und die Isolierung der einzelnen Aminosäuren ist neues nicht zu erwähnen. Wir begnügen uns unter Hinweis auf die mehrfachen ausführlichen Beschreibungen mit einer kurzen Mitteilung der Resultate.

Aus Fraktion I—III erhielten wir durch Auskochen mit Alkohol 9,0 g reines Prolin.

Fraktion I enthielt ferner 3,5 g Glykokoll und 2,0 g Alanin.

Aus Fraktion II gewannen wir 4,0 g Glykokoll, 7,0 g Alanin, 1,0 g Valin und 10,0 g Leucin.

Fraktion III enthielt 1,5 g Valin und 27,5 g Leucin.

Aus Fraktion IV isolierten wir 6,25 g Phenylalanin, 5,0 g Asparaginsäure und 2,0 g Serin.

Glykokollesterchlorhydrat: Schmelzpunkt 144° (korr.).

0,1102 g Substanz gaben 0,1400 g CO₂ und 0,0735 g H₂O

Berechnet für C₄H₁₀NO₂ · Cl: Gefunden:

34,42% C und 7,17% H. 34,64% C und 7,41% H.

Alanin: $[\alpha]_{20}^D = + 10,2^\circ$ in 20%iger Salzsäure.

0,1061 g Substanz gaben 0,1571 g CO₂ und 0,0738 g H₂O

Berechnet für C₃H₇NO₂: Gefunden:

40,45% C und 7,87% H. 40,37% C und 7,72% H.

Valin:

0,1730 g Substanz gaben 0,3238 g CO₂ und 0,1489 g H₂O
 Berechnet für C₆H₁₁NO₂: Gefunden:
 51,28% C und 9,40% H. 51,04% C und 9,56% H.

Leucin:

0,1891 g Substanz gaben 0,3798 g CO₂ und 0,1702 g H₂O
 Berechnet für C₆H₁₃NO₂: Gefunden:
 54,96% C und 9,92% H. 54,79% C und 10,00% H.

Kupfersalz des racemischen Prolins:

0,2345 g lufttrockenes Salz verloren bei 120° 0,0258 g H₂O
 0,1208 „ bei 120° getrocknetes Prolinkupfer gaben 0,0329 g CuO
 = 0,0263 g Cu
 Berechnet für (C₅H₈NO₂)₂Cu + 2 H₂O: Gefunden:
 10,99% H₂O. 11,0% H₂O.
 Berechnet für (C₅H₈NO₂)₂Cu: Gefunden:
 21,81% Cu. 21,77% Cu.

Phenylalanin:

0,1640 g Substanz gaben 0,3920 g CO₂ und 0,1010 g H₂O
 Berechnet für C₉H₁₁NO₂: Gefunden:
 65,45% C und 6,66% H. 65,19% C und 6,84% H.

Asparaginsäure:

0,1625 g Substanz gaben 0,2145 g CO₂ und 0,0781 g H₂O
 Berechnet für C₄H₇NO₄: Gefunden:
 36,09% C und 5,26% H. 36,00% C und 5,34% H.

Glutaminsäure:

0,2450 g Substanz gaben 0,3664 g CO₂ und 0,1355 g H₂O
 Berechnet für C₅H₉NO₄: Gefunden:
 40,81% C und 6,12% H. 40,75% C und 6,14% H.

Serin:

0,1924 g Substanz gaben 0,2402 g CO₂ und 0,1191 g H₂O
 Berechnet für C₃H₇NO₃: Gefunden:
 34,28% C und 6,73% H. 34,05% C und 6,87% H.

100 g des gleichen Präparates verwendeten wir zur Bestimmung des Tyrosins. Die Hydrolyse erfolgte durch 16stündiges Kochen mit 500 ccm 25%iger Schwefelsäure. Die Ausbeute an Tyrosin betrug 3,5 g.

Auf 100 g aschefreies, bei 100° bis zur Gewichtskonstanz getrocknetes Fibrin aus Pferdeblut berechnet, ergeben sich somit folgende Mengen an Monoaminosäuren:

Glykokoll	3,0%
Alanin	3,6%
Valin	1,0%
Leucin	15,0%
Prolin	3,6%
Phenylalanin	2,5%
Asparaginsäure	2,0%
Glutaminsäure	10,4%
Serin	0,8%
Tyrosin	3,5%

Es war dies nicht das einzige Fibrinpräparat, das wir untersucht haben. Ein «unreines» Präparat aus Rinderblut ergab ähnliche Werte, während wir bei einem dritten Präparat einen geringeren Wert für Glykokoll (2,0%) und einen höheren für Glutaminsäure (12,5%) fanden. Das Fibrin kann seiner ganzen Entstehung nach kaum als ein auch nur einigermaßen einheitlicher Eiweißkörper angesprochen werden, und es ist daher nicht verwunderlich, wenn verschiedene Präparate Unterschiede in ihrer Zusammensetzung zeigen.