

Der Nachweis der Glutaminsäure unter den durch starke Schwefelsäure erzielten Spaltungsprodukten des thierischen Eiweisses.

Von

Fr. Kutscher.

(Aus dem physiologischen Institut zu Marburg.)

(Der Redaction zugegangen am 4. Juli 1899.)

Die Glutaminsäure wurde bekanntlich zuerst von Ritthausen aus einer Reihe pflanzlicher Eiweissstoffe, die durch Kochen mit starker Schwefelsäure zersetzt waren, gewonnen. Dagegen haben Ritthausen, Kreuzler,¹⁾ Hlasiwetz und Habermann²⁾ sich vergeblich bemüht, die gleiche Säure unter den durch starke Schwefelsäure erzielten Spaltungsprodukten der thierischen Eiweisskörper ebenfalls nachzuweisen, und es ist das auch bis heute noch nicht gelungen.

Auf Grund dieser Befunde war Ritthausen³⁾ geneigt, einen tiefgehenden Unterschied in der Constitution der animalen und pflanzlichen Proteinstoffe anzunehmen.

Nachdem jedoch Hlasiwetz und Habermann⁴⁾ durch anhaltendes Kochen mit Salzsäure und Zinnchlorür aus thierischen Proteinstoffen Glutaminsäure in sehr reichlicher Menge darzustellen vermochten, betonte Ritthausen⁵⁾ die bei der Spaltung mit Schwefelsäure sich ergebenden Differenzen zwischen thierischen und pflanzlichen Eiweisskörpern nicht mehr. Meiner

1) Ritthausen. Die Eiweisskörper der Getreidearten, Hülsenfrüchte etc., Bonn 1872, S. 221.

2) Ritthausen. Die Eiweisskörper der Getreidearten, Hülsenfrüchte etc., Bonn 1872, S. 248.

3) Ritthausen. Die Eiweisskörper der Getreidearten, Hülsenfrüchte etc., Bonn 1872, S. 236.

4) Liebig's Annalen, Bd. 169, 1873, S. 150.

5) Ritthausen. Die Eiweisskörper der Getreidearten etc., S. 248.

Ansicht nach mit Unrecht. Denn würden in Wirklichkeit die thierischen Proteinstoffe bei der Spaltung durch Schwefelsäure ein so wohl charakterisirtes Spaltungsprodukt wie die Glutaminsäure ganz vermissen lassen, dann müssten wir wohl oder übel wesentliche Unterschiede in der Configuration der Moleküle der pflanzlichen und der thierischen Eiweisskörper annehmen. Weiter müssten wir, um das reichliche Auftreten der Glutaminsäure bei der Spaltung der thierischen Eiweisskörper durch Salzsäure zu erklären, grosse qualitative Differenzen in der Wirkungsweise der Salz- und Schwefelsäure voraussetzen, während das Erscheinen aller anderen wohl charakterisirten Spaltungsprodukte, wie des Tyrosin, Leucin etc., welche sich aus pflanzlichen und thierischen Eiweisskörpern bilden, gleichgültig ob man die Spaltung mit Salzsäure oder Schwefelsäure vornimmt, höchstens auf quantitative, nicht aber qualitative Unterschiede in den beiden Spaltungsmethoden hinweist.

Bei meinen Arbeiten über das «Antipepton»¹⁾ war mir die grosse Aehnlichkeit aufgefallen, die sich in dem Abbau der Eiweisskörper durch starke Schwefelsäure und das tryptische Ferment der Bauchspeicheldrüse zeigt. Dieselbe geht so weit, dass wir beispielsweise eine alte Schilderung Ritthausens über den nach Auskrystallisation von Leucin und Tyrosin bleibenden Rest der Zersetzungsprodukte des mit Schwefelsäure gesprengten Legumins direkt auf das «Antipepton» anwenden können. Die Angaben Ritthausen's²⁾ lauten wie folgt:

Nach Ausscheidung von Tyrosin und Leucin aus der Zersetzungsflüssigkeit sind andere feste Körper auf keine Weise, weder durch Stehen, Abkühlen oder Behandeln mit Alkohol zu gewinnen.

Es gab der bedeutende Rest (von 60 g Erbsenlegumin ca. 28 g) eine schmierige, gelbliche Masse, bei der Analyse, nachdem bei 100° C. im Wasserstoffstrom getrocknet war, 44,42% C, 7,18% H, 15,66% N.

¹⁾ Zeitschrift für physiol. Chemie, Bd. XXVI, S. 110. Die Endprodukte der Trypsinverdauung, Strassburg 1899.

²⁾ Journal für prakt. Chemie, Bd. 103, Jahrg. 1868, S. 236.

Auch das «Antipepton» soll nach Kühne die Hälfte des durch Trypsin zersetzten Eiweisses ausmachen. Es präsentirt sich gewöhnlich in Form einer schmierigen gelblichen Masse, und die Analysenwerthe können sich zum Theil bis in die zweite Decimale mit den von Ritthausen angeführten decken, wie sich aus nachstehender kleiner Tabelle ergibt.

	Von Ritthausen analys. Rest	Von Kühne ¹⁾ analys. Drüsenpepton
C	44.42%	44.35%
H	7.18%	7.00%
N	15.66%	15.63%

Nun war es mir ohne besondere Schwierigkeit gelungen, aus dem «Antipepton» nach Entfernung der in demselben steckenden organischen Basen die Glutaminsäure in Form ihrer Silberverbindung auszufällen und aus derselben rein zu gewinnen.²⁾ Der Gedanke lag danach nahe, unter Anwendung der gleichen Methode nochmals die Isolirung der Glutaminsäure unter den mit Schwefelsäure erzielten Spaltungsprodukten der thierischen Eiweisskörper zu versuchen.

Das Material für meine Versuche war mir in freundlicher Weise von Herrn Halsey, Assistenten am hiesigen pharmakologischen Institut, zur Verfügung gestellt worden, wofür ich ihm meinen verbindlichsten Dank ausspreche. Herr Halsey hatte zu anderem Zweck 300 g Casein nach dem Verfahren von Ritthausen³⁾ mit Schwefelsäure gespalten, (Herr Halsey hatte die Schwefelsäure etwas länger wie Ritthausen auf das Casein einwirken lassen, nämlich 10—14 Stunden) einen grossen Theil der organischen Basen durch Phosphorwolframsäure ausgefällt, das Filtrat von den Phosphorwolframverbindungen mit Baryt genau von Schwefelsäure und überschüssiger Phosphorwolframsäure befreit und danach aus demselben Leucin und Tyrosin durch Krystallisation entfernt. Die Mutterlauge von

¹⁾ Zeitschrift für Biologie, Bd. XXIX, Jahrg. 1892, S. 323.

²⁾ S. die Endprodukte der Trypsinverdauung, Strassburg 1899.

³⁾ Ritthausen, Die Eiweisskörper der Getreidearten etc., S. 213.

den letzten Leucinkrystallisationen wurde mir von Herrn Halsey übergeben. Die Reaction der Flüssigkeit war gegen mein Erwarten schwach alkalisch. Es hatte also die Fällung mit Phosphorwolframsäure nicht genügt, um die bei der Spaltung des Caseins entstehenden Basen so weit zu entfernen, dass die bei der Spaltung ebenfalls entstehenden Säuren die Ueberhand erhielten.

Um aus der Flüssigkeit die Glutaminsäure zu gewinnen, verdünnte ich sie zunächst auf einen Liter, erhitze sie in einer Porzellanschale zum Sieden und trug kohlensaures Kupfer bis zur Sättigung ein. Die heisse Flüssigkeit filtrirte ich vom überschüssigen Kupfercarbonat ab. Nach dem Erkalten fällte ich vorsichtig mit Bleiessig unter Vermeidung eines Ueberschusses des genannten Reagens. Die sehr voluminöse Fällung (Fällung I) wurde abfiltrirt, gut ausgewaschen, in Wasser aufgeschwemmt und mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Vom Schwefelblei wurde abgesaugt, die erhaltene Flüssigkeit stark concentrirt, worauf sie binnen 12 Stunden zu einer blättrigen weichen Krystallmasse erstarrte. Um aus derselben gut charakterisirte Substanzen abzuscheiden, nahm ich die ganze Masse mit heissem Wasser wieder auf, erhitze zum Kochen und gab Kupfercarbonat im Ueberschuss zu der siedenden Flüssigkeit. Vom ungelösten Kupfercarbonat wurde heiss abfiltrirt. Nachdem ich das Filtrat stark concentrirt hatte, schied sich noch während des Erkaltes in sechsseitigen Blättchen eine Verbindung ab, die nur Spuren von Kupfer aufgenommen hatte. Sie liess sich durch schnelles Absaugen von der Mutterlauge trennen, bevor sich aus derselben wesentliche Mengen anderer Substanzen abgeschieden hatten. Durch Umkrystallisiren aus verdünnter Salzsäure wurde sie leicht in schneeweissen, kupferfreien Blättchen gewonnen. Ich habe sie bisher nicht näher untersucht, doch scheint es sich um eine reichlich Phosphor enthaltende Verbindung zu handeln.

Die kupferhaltige Mutterlauge davon erstarrte nach einiger Zeit zu einem Krystallbrei, welcher der Hauptsache nach aus den charakteristischen Nadelbüscheln des asparaginsauren Kupfers gebildet war (s. die Analyse S. 129). Die Ausbeute davon betrug 2,49 g. Auch das asparaginsaure Kupfer wurde

abgesaugt. Aus dem davon erhaltenen, noch tiefblau gefärbten Filtrat wurde das Kupfer durch Schwefelwasserstoff entfernt. Die vom Schwefelkupfer befreite und concentrirte Flüssigkeit setzte nach kurzer Zeit kleine, stark glänzende, in kaltem Wasser schwer lösliche Krystalle in reichlicher Menge ab. Dieselben waren nach einmaliger Umkrystallisation aus wenig siedendem Wasser analysenrein. Die Ausbeute betrug 1,49 g.

Bei der Analyse gaben 0,2146 g Substanz 0,3193 g Kohlensäure und 0,1175 Wasser.

Für $C_5H_9NO_4$

Berechnet:
C = 40,81 %
H = 6,12 %

Gefunden:
C = 40,59 %
H = 6,13 %

Um das Resultat dieser Analyse, nach der die isolirte Substanz freie Glutaminsäure sein musste, noch mehr zu stützen, führte ich einen kleinen Theil der Verbindung in das salzsaure Salz über.

Davon gaben 0,207 g an AgCl 0,1632 g.

Für $C_5H_9NO_4.HCl$

Berechnet:
Cl = 19,34 %

Gefunden:
Cl = 19,49 %

Der Schmelz- und Zersetzungspunkt der salzsauren Verbindung lag bei 191° C. (uncorrig.), während salzsaure Glutaminsäure bei 193° C. unter gleichzeitiger Zersetzung schmilzt.

Durch vorstehende Daten war die Frage, ob die Glutaminsäure auch bei der Spaltung der thierischen Eiweisskörper durch starke Schwefelsäure entsteht oder nicht, bereits entschieden. Um jedoch ihre bei der Zersetzung des Caseins durch Schwefelsäure auftretende Menge möglichst quantitativ zu bestimmen, versuchte ich noch auf das Filtrat von Fällung I das von mir bei meinen Arbeiten über das «Antipepton» geübte Verfahren der Abscheidung der Glutaminsäure in Form ihrer Silberverbindung anzuwenden.

Zu diesem Zweck schied ich aus dem Filtrat von Fällung I Blei und Kupfer durch Schwefelwasserstoff ab. Darauf concentrirte ich es stark, um die aus dem Bleiessig stammende Essigsäure möglichst zu entfernen. Schliesslich füllte ich es

auf 250 ccm. auf. Davon verarbeitete ich 125 ccm. Dieselben liessen auf Zusatz von 10 % Silbernitratlösung zunächst einen geringen, sich schnell schwärzenden Niederschlag fallen. Derselbe wurde abfiltrirt, das Filtrat von Neuem mit Silbernitratlösung versetzt. Nachdem ich ca. 10 g Silbernitrat in Lösung zugefügt hatte, begann sich eine weisse Fällung abzuscheiden, die sich auf weiteren Zusatz von Silbernitratlösung noch vermehrte. Erst die Anwendung von 22 g Silbernitrat genügte, um diese Fällung (Fällung H) zu beenden.

Fällung H wurde abfiltrirt, mit Wasser gewaschen, in Wasser aufgeschwemmt und mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Aus der vom Schwefelsilber ablaufenden Flüssigkeit krystallisirte nach der Concentration in kleinen, aus feinen Nadeln bestehenden Drusen eine in kaltem Wasser ziemlich schwer lösliche Substanz, deren Analyse für eine molekulare Verbindung von Glutaminsäure und Asparaginsäure sprach.

Es gaben nämlich 0,1518 g Substanz bei der Verbrennung 0,2236 g Kohlensäure und 0,0849 g Wasser.

0,1646 g Substanz lieferten bei der volumetrischen Stickstoffbestimmung 14,2 ccm. Stickstoff bei 13° C. und 746 mm. Barometerstand, als Sperrflüssigkeit diente 25° eige Kalilauge.

Für $(C_5H_9NO_4)_5.C_4H_7NO_4$

Berechnet:	Gefunden:
C = 40,09 %	C = 40,18 %
H = 5,99 %	H = 6,26 %
N = 9,68 %	N = 10,05 %

Die Ausbeute an dieser Substanz hatte ca. 0,7 g betragen. Von den in ihr vorhandenen Componenten vermochte ich jedoch nur mit Sicherheit die Glutaminsäure nachzuweisen. Denn als ich versuchte, dieselben durch ihre Kupferverbindungen zu trennen, schied sich wider Erwarten zunächst ein in Wasser unlösliches Kupfersalz der Glutaminsäure ab und es gelang mir, nur 0,049 g eines in Wasser löslichen Kupfersalzes zu erhalten, das in lufttrockenem Zustand bei der Analyse 0,0131 g Kupferoxyd, also nur 21,84 % Kupfer, enthielt, während lufttrockenes asparaginsaures Kupfer 23,02 % verlangt.

Aus der in Wasser unlöslichen Kupferverbindung liess sich dagegen nach der Entkupferung durch Schwefelwasserstoff die salzsaure Verbindung der Glutaminsäure darstellen.

Es gaben davon 0,2114 g Substanz 0,1685 g Chlorsilber.

Für $C_5H_9NO_4 \cdot HCl$

Berechnet:
Cl = 19,34 %

Gefunden:
Cl = 19,59 %

Das Filtrat von Fällung II, das noch den Haupttheil der Glutaminsäure enthalten musste, fällte ich schliesslich durch abwechselnden vorsichtigen Zusatz von Baryt- und Silbernitratlösung. Die ausgefallenen Silberverbindungen wurden abfiltrirt, ausgewaschen, in Wasser aufgeschwemmt und mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Die vom Schwefelsilber ablaufende Flüssigkeit wurde durch Schwefelsäure genau vom Baryt befreit und erstarrte nach ihrer Concentration zu einer weichen Krystallmasse. Aus derselben schied ich die Asparaginsäure in Form ihres Kupfersalzes, die Glutaminsäure als freie Glutaminsäure nach dem zur Trennung des aus der Bleifällung erhaltenen Gemenges benutzten Verfahren ab. Ich gewann schliesslich aus der Silberfällung 1,23 g asparaginsaures Kupfer und 1,98 g freie Glutaminsäure.

Zur Analyse mengte ich das aus der Blei- und Silberfällung erhaltene asparaginsaure Kupfer. Davon gaben 0,2805 g lufttrockener Substanz 0,0808 g Kupferoxyd.

Für $C_4H_5NO_4 \cdot Cu + 4 \frac{1}{2} H_2O$

Berechnet:
Cu = 23,02 %

Gefunden:
Cu = 23,00 %

Die aus der Silberfällung erhaltene Glutaminsäure identifizierte ich, indem ich einen kleinen Theil in die salzsaure Verbindung überführte.

Davon gaben 0,210 g Substanz 0,1622 g Chlorsilber.

Für $C_5H_9NO_4 \cdot HCl$

Berechnet:
Cl = 19,34 %

Gefunden:
Cl = 19,10 %

Es waren demnach von den 300 g Casein durch Schwefelsäurespaltung zum Mindesten $1,49 \text{ g} + 1,98 \text{ g} \cdot 2 = 5,45 \text{ g}$ oder 1,8 % Glutaminsäure geliefert worden.

Schieben wir diesen Werth in die Tabelle Ritthausen's, die die Ausbeute an Glutaminsäure aus den verschiedenen pflanzlichen Eiweisskörpern angibt, ein, so sehen wir, dass das Milcheasein nicht einmal zu unterst in derselben steht. Ich lasse die Tabelle²⁾ folgen:

Es gaben 100 Gewichtstheile:

1. Mucedin	25 %	Glutaminsäure.
2. Maisfibrin	10 %	
3. Gemisch der in Weingeist löslichen Kleberproteinstoffe	8,8 %	
4. Gluten-Casein	5,3 %	
5. Conglutin	3—5 %	
6. Legumin	1,5 %	
7. Milcheasein	1,8 %	

Es fragt sich nun, warum die Isolirung der Glutaminsäure aus den durch Schwefelsäure erzielten Spaltungsprodukten der thierischen Eiweisskörper bisher nicht gelungen ist. Ich glaube diese Frage auf Grund unserer jetzigen, durch Kossel angebahnten Kenntnisse über die Spaltungsprodukte der thierischen Eiweisskörper durch Schwefelsäure genügend beantworten zu können. Wir wissen nämlich, dass dabei in reich-

1) Ritthausen. Die Eiweisskörper der Getreidearten u. s. w., S. 222.

2) Ritthausen hat in der Tabelle Werthe zusammengestellt, die unter einander nicht eigentlich vergleichbar sind, da die Werthe von 1, 2, 3, 4, 5 nur die freie Glutaminsäure angeben, welche bei dem Mucedin u. s. w. bei der Spaltung durch Schwefelsäure entsteht. Ueber die Gesamtmenge der aus 1, 2, 3, 4, 5 hervorgehenden Glutaminsäure erfahren wir aber dadurch nichts. Dagegen entspricht beim Legumin der gefundene Werth wahrscheinlich der aus dem Legumin sich bildenden Gesamtmenge an Glutaminsäure, die beim Legumin schon völlig an basische Substanzen gebunden sein muss. Ritthausen musste daher bereits zu ihrer Isolirung die aus dem Legumin hervorgehende Glutaminsäure aus ihrer anderweitigen Bindung durch Ueberführung in das Barytsalz befreien. Das Legumin leitet also zu den thierischen Eiweisskörpern über, und der von mir für das Milcheasein bestimmte Werth bezieht sich wie beim Legumin auf die überhaupt gebildete Glutaminsäure.

3) Zeitschrift für physiol. Chemie, Bd. XXII, S. 176, Bd. XXV, S. 165, und Deutsche medicinische Wochenschrift, Jahrg. 1898, Nr. 37, S. 581.

licher Menge organische Körper stark basischer Natur entstehen, die bei der Spaltung auftretenden organischen Säuren binden müssen. Nun herrschen jedenfalls im Gegensatz zu den in der Tabelle aufgeführten pflanzlichen Eiweisskörpern bei den thierischen niemals die bei der Spaltung sich bildenden organischen Säuren vor, sondern dieselben werden wahrscheinlich immer von den organischen Basen abgesättigt. Es kann daher auch nicht freie Glutaminsäure aus den Spaltungsprodukten der thierischen Eiweisskörper, wie es bei den pflanzlichen geschieht, auskrystallisiren. Wir müssen vielmehr zwecks ihrer Isolirung zunächst die organischen Basen nach Möglichkeit entfernen und sie danach noch durch geeignete Fällungsmittel in schwerlösliche Verbindungen überführen. Diesen beiden Forderungen wurde in meinem Versuche genügt und daher gelang die Reindarstellung der Glutaminsäure aus dem durch Schwefelsäure gespaltenen Casein ohne sonderliche Mühe.

Auffallend bleibt übrigens, wie ausserordentlich die von mir an Glutaminsäure erhaltene Menge gegen die nach Salzsäurespaltung aus dem Casein gewonnene zurückbleibt, denn bei Salzsäurespaltung aus dem Casein sich bildenden 29% Glutaminsäure¹⁾ stehen nur 1,8% gegenüber, und ich glaube nicht, dass aus dem Casein durch Spaltung mit Schwefelsäure wesentlich mehr zu erhalten ist. Die Ursache für diese gewaltige Differenz vermag ich leider noch nicht anzugeben.

Fasse ich die von mir erarbeiteten Resultate kurz zusammen, so ergibt sich,

1) dass entgegen der bisherigen Ansicht auch aus thierischen Eiweisskörpern sich bei der Spaltung durch Schwefelsäure Glutaminsäure bildet. Niemals entsteht jedoch dabei die Glutaminsäure aus den thierischen Eiweisskörpern in so grosser Menge, dass freie Glutaminsäure sich abscheiden kann,

2) dass die bei Spaltung der thierischen Eiweisskörper durch starke Schwefelsäure zu erzielende Ausbeute an Glutaminsäure gegenüber der durch Salzsäurespaltung gewinnbaren nur eine geringe ist.

1) Hlasiwetz u. Habermann, Liebigs Annalen, Bd. 169, S. 166.