

Ueber Proteinstoffe. Einwirkung des nascirenden Chlors auf Casein.

Von

J. Habermann und R. Ehrenfeld.

Aus dem Laboratorium für allgemeine und analytische Chemie der k. k. technischen Hochschule in Brünn.

(Der Redaction zugegangen am 11. April 1901.)

Es ist eine dem forensischen Chemiker geläufige Thatsache, dass trotz der intensiven Einwirkung des nascirenden Chlors auf die Eiweisssubstanz, wie sie in Form von Leichentheilen vorliegt, die Zerstörung derselben nur insofern eine weitergehende ist, als durch die Behandlung der Objecte mittelst Salzsäure und Kaliumchlorat auf dem erwärmten Wasserbade eine Flüssigkeit resultirt, welche durch Reste von Zellstoff und Fett getrübt ist. Beim ruhigen Stehen dieser Flüssigkeit sondern sich die suspendirten Partikelchen theils an der Oberfläche, theils als Bodensatz ab, und es restirt eine völlig klare Flüssigkeit, welche theils durch Abhebern, theils durch Filtration gewonnen werden kann. Verdünnt man diese ganz klare Flüssigkeit hinlänglich stark mit Wasser, so wird sie fast ausnahmslos durch Ausscheidung einer weissen, flockigen Masse neuerdings mehr oder weniger stark getrübt. Diese flockige Substanz lässt sich durch Filtration leicht absondern. Durch dieses Verhalten ist die bei der Zerstörung von Leichentheilen mittelst Salzsäure und Kaliumchlorat angewandte Vorschrift begründet: nach beendigter Zersetzung und noch vor der Filtration die Zersetzungsflüssigkeit mit destillirtem Wasser entsprechend zu verdünnen. Diese von dem einen von uns wiederholt beobachtete Thatsache gab den Anstoss zum Studium des Verhaltens der unveränderten Eiweissstoffe, speciell des Caseins, gegenüber der Einwirkung von Chlor, welches, durch Zusammenbringen von Salzsäure und Kaliumchlorat erzeugt, *in statu nascendi* auf den Proteinkörper zur Einwirkung gelangt. Dass das Studium dieser Reaction genügendes Interesse darbietet, scheint uns schon in dem Umstande begründet, dass die Einwirkung eines so kräftigen Agens, wie das nascirende Chlor es ist, vielleicht Aufschluss über die oft und mit Be-

ziehung auf die mannigfaltigsten Reagentien behauptete leichte Veränderlichkeit des gesammten Eiweissmoleküls geben kann, und vielleicht auch über eine andere Anschauung zu orientiren vermag, die dahin geht, dass das Eiweissmolekül im gewissen Sinne aus einer leicht veränderlichen Hülle und einem ungleich festeren Kerne besteht, welcher selbst der Einwirkung des nasirenden Chlors gegenüber sich als widerstandsfähig erweist.

Die Einwirkung von Chlor und der anderen Halogene auf die Proteinstoffe war, wie bekannt, schon ziemlich häufig Gegenstand des Studiums. Mulder¹⁾ hatte das Chlor herangezogen bei seinen Bestrebungen: «das Atomgewicht des Proteins mit Gewissheit zu bestimmen», und in neuerer Zeit ist die Einwirkung der Halogene auf die Eiweissstoffe namentlich in der Absicht studirt worden, um durch Ermittlung der maximalen Aufnahmefähigkeit des Eiweisscomplexes gegenüber den Halogenen einen einigermaßen verlässlichen Massstab für die Grösse seines Molekulargewichtes zu gewinnen.²⁾

Dass sich die Tendenz der vorliegenden Arbeit nicht in dieser Richtung bewegt, geht schon aus den vorher gemachten Bemerkungen hervor, und es genügt anzuführen, dass unser Ziel zunächst dahin gerichtet war, eines oder das andere jener Zersetzungsprodukte kennen zu lernen, welche entstehen, wenn Kaliumchlorat und Salzsäure unter Verhältnissen einwirken, wie sie durch jene Vorschriften bedingt sind, die in den Lehrbüchern und Anleitungen der gerichtlichen Chemie zur Zerstörung der organischen Substanz als vorbereitende Operation bei der Prüfung auf Metallgifte empfohlen werden. Dass diese Vorschriften nicht ohne weiteres und buchstäblich auf unsere Untersuchungen angewendet werden konnten, wird sofort einleuchten, wenn man die Verschiedenheit der Ausgangsmaterialien ins Auge fasst. In dem einen Falle, für welchen die Vor-

1) Erdmann's Journal f. prakt. Chemie, Bd. XX, Jahrg. 1849.

2) Siehe unter anderen die Abhandlungen von Loew, Journ. f. prakt. Chemie [2] 31; Hopkins, Berl. Berichte, XXX, S. 1860; Hopkins und Pinkus, Berl. Berichte, XXXI, S. 1311; Blum, Münch. medic. Wochenschrift, 1896, Nr. 45; ferner Blum und Vaubel, Journ. f. prakt. Chemie [2] 56, 57.

schrift geschaffen wurde, sind die Ausgangsmaterialien Produkte mit 70 und mehr Procent Wasser, während in unserem Falle das fast wasserfreie Casein das Ausgangsmaterial bildete. Es war daher erforderlich, durch eine Reihe von Vorversuchen jene Vorschriften für unseren Zweck zu adaptiren, und es scheint uns nicht überflüssig, einiges über diese Vorversuche mitzutheilen. Bei einem der ersten dieser Vorversuche wurde das möglichst fein gepulverte Casein in einer Porzellanschale mit einer 8—10%igen Salzsäure übergossen, eine entsprechende Menge von Kaliumchlorat hinzugefügt, das Ganze zu einem gleichmässigen Brei durchgerührt und durch etwa 24 Stunden sich selbst überlassen, worauf die Schale auf dem Wasserbade erwärmt und von Zeit zu Zeit Kaliumchlorat in kleinen Antheilen unter fleissigem Umrühren eingetragen wurde. Es gelang nicht, auf diesem Wege eine vollständige Lösung des Caseins zu erzielen. Es hinterblieb vielmehr in jedem Falle ein Rückstand von etwas grauer Farbe, dessen Menge selbst die Hälfte des angewandten Caseins betragen konnte. Gestützt auf diese Erfahrungen, wurde das Ziel, zunächst eine klare Lösung des Proteinkörpers zu erhalten, dadurch zu erreichen gesucht, dass nicht das Casein selbst, sondern Magermilch zum Ausgangspunkte des Vorversuches gewählt wurde. Im Uebrigen wurde bei diesem zweiten Vorversuche so vorgegangen, dass ein Liter Magermilch mit einigen Grammen Kaliumchlorat versetzt und trockenes Chlorwasserstoffgas eingeleitet wurde. Nach vier bis fünf Stunden war die geronnene Milch in eine klare, gelbe Lösung verwandelt und somit der Beweis erbracht, dass das Casein unter der Einwirkung von Salzsäure und Kaliumchlorat vollständig in Lösung gebracht werden kann. Unter sinngemässer Berücksichtigung der bei der Milch gemachten Erfahrungen wurde bei den nun folgenden Versuchen in der Weise verfahren, dass das Casein mit verdünnter Kalilauge von gewöhnlicher Temperatur bis zur Lösung verrieben und nach dem Zusatze einer gesättigten Lösung von Kaliumchlorat Chlorwasserstoffgas eingeleitet wurde. Das Chlorwasserstoffgas wurde bei allen diesen Versuchen in einem dickwandigen Kolben, der zur Hälfte mit concentrirter Salz-

säure gefüllt war, durch eintropfende, concentrirte Schwefelsäure entwickelt, behufs Zurückhaltung mitgerissener Schwefelsäure durch einen leeren, völlig trockenen Rundkolben, und aus diesem in den Zersetzungskolben geleitet. Wie zu erwarten stand, wurde als erstes Stadium das Coaguliren der alkalischen Caseinlösung beobachtet. Mit der fortschreitenden, intensiven Chlorentwicklung wurde die coagulierte Masse bald von rothen und braungelben Flocken durchsetzt, worauf sich allmählich ein gelber Kuchen bildete, der schliesslich vollständig in Lösung ging. Das Ende der Zersetzung ist durch das Entstehen einer gelben Lösung gekennzeichnet, die je nach den Concentrationsverhältnissen bei Anwendung grösserer Mengen von Kaliumchlorat von etwas krystallinisch ausgeschiedenem Chlorkalium in geringen Maasse getrübt erscheint. Der ganze Process wurde bei Zimmertemperatur durchgeführt, indem der Zersetzungskolben in einer Schale stand, in welcher Kühlwasser stetig erneuert wurde. Ein zeitweises Durchrühren des am Beginne des Processes ausgeschiedenen Kuchens mit Hilfe eines Glasstabes, sowie häufiges Umschwenken des Zersetzungsgefässes beschleunigen den Gang der Reaction, die in allen Fällen in gleicher Weise und bei Anwendung von nicht mehr als 100 g Casein auch völlig glatt vor sich ging, so dass sie etwa in 48 Stunden zu Ende geführt war. Schliesslich gelangten wir dazu, stets nach folgender Regel zu verfahren: 100 g Casein wurden in circa 700 cem. einer etwa 5%igen Kalilauge bei gewöhnlicher Temperatur gelöst, 50 g Kaliumchlorat im feingepulverten Zustand hinzugefügt, nach erfolgter Lösung desselben mit dem Einleiten des Chlorwasserstoffgases begonnen und damit so lange fortgefahren, bis die vollständige Lösung erfolgt war, worauf neuerdings kleine Mengen von Kaliumchlorat eingetragen wurden. Diese letzten Mengen Kaliumchlorat bewirkten ein auffällig starkes Schäumen der Flüssigkeit. Die stark chlorhaltige, gelbgefärbte Lösung, welche bei der gekennzeichneten Reaction resultirt, ist, wie schon vorhin angedeutet, durch geringe Mengen von krystallinisch abgeschiedenem Chlorkalium getrübt, welches sich beim ruhigen Stehen vollständig zu Boden setzt. Die Flüssigkeit wurde von

dem aus Chlorkalium bestehenden Bodensatz abgegossen und mit Wasser verdünnt, worauf sich sofort ein voluminöser, flockiger, rein weisser Niederschlag absonderte, der leicht durch Filtration gewonnen werden konnte. Dieses Produkt bildete den Gegenstand unserer Untersuchungen.

Der Körper löst sich im frischen Zustande, so lange er noch feucht ist, in Alkohol, namentlich beim Erwärmen, unter Zusatz von etwas Salzsäure. Er löst sich beim Erwärmen in Wasser, wobei er sich Anfangs zu einer harzartigen Masse zusammenballt, die sodann mit braunrother Farbe in Lösung geht. Diese wässerige Lösung liefert beim Zusatz von Salzsäure einen braunen, flockigen Niederschlag, während in der alkoholischen Lösung durch Wasserzusatz ein flockiger Körper ausgeschieden wird. Eine von Salzsäure freie, alkoholische Lösung scheidet auf Zusatz reichlicher Mengen an Aether ein gelbes Oel ab, das im Vacuum zu einer braunen, gummiartigen Masse eintrocknete, ohne krystallinische Structur anzunehmen. Die Versuche, den Körper mit Hülfe anderer Lösungsmittel, wie z. B. Eisessig etc., in krystallinischer Form zu erhalten, lieferten kein positives Resultat, ebenso blieben die Versuche zur Herstellung von krystallinischen Metallverbindungen resultatlos. Der Körper löst sich mit grösster Leichtigkeit in Aetzlaugen und wässerigem Ammoniak; aus diesen Lösungen wird er durch Salzsäure wieder flockig gefällt. Zur Reinigung wurde der Körper in mässig grossen Wassermengen gelöst, mit Salzsäure gefällt, filtrirt, neuerlich in Wasser gelöst und so weiter. Alle Versuche, den Körper in krystallinischer Form zu gewinnen, und auch die zur Reinigung des Körpers angewandten Methoden liessen uns die unangenehme Thatsache erkennen, dass die Substanz beim Stehen an der Luft ziemlich rasch einer Veränderung unterliegt, was sich äusserlich durch fortschreitende Braunfärbung zu erkennen gibt. Durch diese Veränderung verliert der Körper sein Löslichkeitsvermögen in Wasser und in Alkohol und bildet mit Wasser von gewöhnlicher Temperatur eine aufgequollene Masse. Ebenso erfolglos blieben die Versuche, mit Hülfe von Acetylchlorid, Benzoylchlorid, Alkohol und Chlorwasserstoff-

säure esterartige Derivate zu gewinnen. Bei der Einwirkung von Natriumamalgam auf die wässrige Lösung des Körpers konnten durch den Geruch und mittelst Eisenchlorid Spuren von Phenol nachgewiesen werden. Das Braunfärben der Substanz, das Verschwinden ihrer Löslichkeit in Wasser, die Quellbarkeit der veränderten Substanz im Wasser erinnern lebhaft an jene Vorgänge, welche wir im Allgemeinen als Humificirung der organischen Substanz bezeichnen, ein Vorgang, welchem ja bekanntlich auch die geformten Eiweissderivate unter entsprechenden Verhältnissen unterliegen. Diese Erwägungen führten uns zur Vorstellung, dass der Körper, welcher bei der Einwirkung von nascirendem Chlor auf Casein entsteht und sich durch Wasser aus der salzsauren Lösung abscheiden lässt, und umgekehrt durch Salzsäure aus der wässrigen Lösung sich abscheiden lässt, dem ursprünglichen Proteinstoff noch ziemlich nahe steht. Bevor wir auf die Beschreibung jener Versuche eingehen, welche dazu dienen sollten, den eben ausgesprochenen Gedanken experimentell zu prüfen, wollen wir die Ergebnisse der Analyse des Körpers mittheilen.

Die vollkommen aschenfreie Substanz wurde Anfangs im Vacuum über gebranntem Kalk von dem grössten Theile ihrer Feuchtigkeit und der ihr von ihrer Darstellungsweise mechanisch anhaftenden Salzsäure befreit und sodann bei 100° C. im Vacuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Sie stellt dann ein braungelbes, stark hygroskopisches Pulver von äusserst bitterem Geschmacke dar, das die Biuretreaction deutlich zeigt. Die Verbrennung dieses Pulvers im offenen Rohre mit vorgelegter Silberspirale, die volumetrische Bestimmung des Stickstoffs nach Dumas, sowie die Chlorbestimmung nach Carius, ergaben die folgenden Resultate in vier verschiedenen Produkten, die separat dargestellt und gereinigt worden waren:

I.

0.2022 g gaben 0.3194 g CO₂ und 0.1072 g H₂O, entsprechend: 43.07 % C und 5.89 % H.

0.2048 g gaben 21.8 ccm. N bei 16° C. und 746 mm. Druck, entsprechend: 12.16 % N.

0.203 g gaben 0.1096 AgCl, entsprechend: 13.34 % Cl.

II.

0.2714 g gaben 0.428 g CO_2 und 0.125 g H_2O , entsprechend: 42.92% C und 5.15% H.

0.201 g gaben 22.7 ccm. N bei 21.5° C. und 749.8 mm. Druck, entsprechend: 12.64% N.

0.2028 g gaben 0.1152 g AgCl, entsprechend: 14.04% Cl.

III.

0.2318 g gaben 0.7342 g CO_2 und 0.115 g H_2O , entsprechend: 44.02% C und 5.50% H.

0.2354 g gaben 25.4 ccm. N bei 15° C. und 740.7 mm. Druck, entsprechend: 12.30% N.

0.2112 g gaben 21.8 ccm. N bei 19° C. und 737.5 mm. Druck, entsprechend: 12.31% N.

0.2196 g gaben 0.118 g AgCl, entsprechend: 13.28% Cl.

IV.

0.247 g gaben 0.3934 g CO_2 und 0.1214 g H_2O , entsprechend: 43.43% C und 5.46% H.

0.3006 g gaben 31.3 ccm. N bei 18° C. und 747 mm. Druck, entsprechend: 12.50% N.

0.2006 g gaben 0.111 g AgCl, entsprechend: 13.68% Cl.

Die vorhergehende qualitative Analyse hatte der Erwartung gemäss die völlige Abwesenheit des Schwefels ergeben.

Mit Rücksicht auf die leichte Veränderlichkeit der Substanz und die erheblichen Schwierigkeiten ihrer Reindarstellung ist die Uebereinstimmung der in der Tabelle enthaltenen Resultate eine genügende, um mit Sicherheit auf die constante Zusammensetzung des Produktes und die Verlässlichkeit seiner Darstellungsmethode schliessen zu dürfen. Es erübrigte somit nur noch, die Verwandtschaft des Reactionsproduktes von Casein und nascirendem Chlor mit den unveränderten Eiweissstoffen im gewissen Sinne qualitativ nachzuweisen, zu welchem Zwecke die Hlasiwetz-Habermann'schen Zersetzungsmethoden der Proteinstoffe mittelst Salzsäure und Zinnchlorür¹⁾ und mittelst Brom und Wasser,²⁾ sowie die Zersetzung der Eiweisssubstanz mittelst schmelzendem Aetzkali herangezogen wurden. Das für diesen Theil der Untersuchung verwendete Produkt wurde in der Weise gewonnen, dass der aus der

1) Annal. d. Chemie u. Pharmacie, Bd. 169.

2) Annal. d. Chemie u. Pharmacie, Bd. 159.

ursprünglichen Lösung gefällte Niederschlag jedesmal in Leinwand eingeschlagen, mittelst einer Schraubenpresse von der anhaftenden Flüssigkeit befreit und ohne weitere Reinigung verwendet wurde. Die Zersetzung mittelst Salzsäure, unter Zusatz von Zinnchlorür, ergab nach der Entfernung des Zinns eine farblose Flüssigkeit, die beim Eindampfen am Wasserbade eine schön violette Farbe annahm, ähnlich jener Farbe, wie sie beim Uebergiessen des Caseins mit concentrirter Salzsäure entsteht. Der syrupöse Abdampfrückstand dieser Flüssigkeit erstarrte bald krystallinisch: seine weitere Verarbeitung, die sich genau an die vorgeschriebene Methode hielt, ergab eine grössere Menge von salzsaurer Glutaminsäure, die in den bekannten, schönen, schiefen Prismen aus der mit Salzsäure versetzten, wässrigen Lösung herauskrystallisirte. Zur Constatirung ihrer Identität genügte die Bestimmung ihres Chlorgehaltes, welche nach der Carius'schen Methode ausgeführt wurde.

0.3 g gaben 0,2326 g AgCl, entsprechend 19,17% Cl. Die Formel $C_5H_9NO_4 \cdot HCl$ verlangt: 19,25% Cl.

Da die Glutaminsäure als das am meisten charakteristische Produkt angesehen werden kann, welches bei der Spaltung der Proteinstoffe mittelst Salzsäure und Zinnchlorür entsteht, glaubten wir von dem Suchen nach den anderen Spaltungsprodukten dieser Reaction absehen zu können, ohne der Stärke unserer Beweisführung Abbruch zu thun.

Bei der Spaltung mittelst Brom und Wasser musste es sich nur um den Nachweis der Bildung reichlicher Mengen von Bromoform und Bromanil handeln. In den Champagnerflaschen, in denen die Zersetzung unter Druck vorgenommen worden war, lag in allen Fällen das Bromanil, durch humöse Substanz verunreinigt, in Form harziger Massen am Boden, aus welchen durch Zerdrücken unter Alkohol die schönen goldgelben, glänzenden Blättchen des Bromanils gewonnen werden konnten. Sie zeigten alle jene Eigenschaften, wie sie vom Bromanil thatsächlich bekannt sind, demnach insbesondere das so überaus charakteristische Verhalten gegenüber verdünnter Kalilauge. Die Zersetzungsflüssigkeit, welche vom Bromanil durch Abgiessen getrennt worden war, gab bei der Destillation eine

relativ grosse Menge an Bromoform, das nach dem Waschen mit verdünnter Lauge durch seinen Geruch, seinen Siedepunkt und namentlich durch seine leichte Umwandlung in Tetrabromkohlenstoff als solches sichergestellt wurde.

Die Schmelze mittelst Aetzkali endlich, ergab die Bildung von verhältnissmässig reichen Mengen an Phenol, das nach dem Ansäuern der kalischen Lösung mit Schwefelsäure und Ausschütteln mittelst Aether, durch den charakteristischen Geruch, sowie durch die bekannten Phenolreactionen mit aller Sicherheit nachzuweisen war. Dass nach dem Auftreten relativ reichlicher Mengen an Phenol in der Kalischmelze die Nachweisung von Tyrosin nicht gelang, konnte aus leicht begreiflichen Gründen nicht überraschen und bedarf keiner weiteren Erörterungen.

Wir haben somit durch eine Einwirkung von 50 g Kaliumchlorat mit Salzsäure auf 100 g Casein, entsprechend einer Menge von 87 g Chlor, deren allmähliche Entwicklung innerhalb eines Zeitraumes von 48 Stunden sich vollzog, einen Körper erhalten, welcher bei der Spaltung mittelst Salzsäure und Zinnchlorür, mittelst Brom und Wasser, sowie bei der Zersetzung mittelst schmelzendem Aetzkali die gleichen Zersetzungsprodukte lieferte wie die unveränderten Eiweissstoffe, oder zu mindestens die nahestehenden Derivate dieser Zersetzungsprodukte, wie beispielsweise das Phenol. Zieht man nun in Betracht, dass der Zersetzungsprocess, dem das Casein unterworfen worden war, eine der energischsten und intensivsten Reactionen darstellt, dann ist wohl der Beweis erbracht, dass die Regel von der leichten Veränderbarkeit des Eiweissmoleküles und dem labilen Gleichgewichtszustande seiner Hauptbestandtheile, wie sie zumeist noch in allen Lehr- und Handbüchern betont wird, keine allgemeine Geltung besitzen kann.

Nach allen Beobachtungen scheint das Albumin und auch andere Eiweissstoffe ein dem Casein analoges Verhältniss bei der Einwirkung von nasirendem Chlor zu zeigen. Wir hoffen in der Lage zu sein, demnächst darüber, sowie über andere Zersetzungs Vorgänge von Eiweissstoffen berichten zu können.