

Ueber die Einwirkung von verdünnter Salpetersäure auf Casein und die Bildung von Oxyglutarsäure.

Von

J. Habermann und R. Ehrenfeld.

(Mittheilung aus dem Laboratorium für allgemeine und analytische Chemie der k. k. technischen Hochschule in Brünn.)

(Der Redaction zugegangen am 19. März 1902.)

Das Studium der Einwirkung von Salpetersäure auf Protein-
stoffe war bislang von der Tendenz geleitet, Produkte kennen
zu lernen, welche im Sinne der älteren Anschauungsweise als
Verbindungen des Proteinmoleküles mit dem Salpetersäure-
molekül, von neueren Gesichtspunkten aus als Nitrosubstitutions-
derivate der Proteinstoffe aufzufassen wären, und somit noch
im nahen Zusammenhange mit der Muttersubstanz stünden.
Die älteste Angabe in Betreff dieser Materie rührt zweifelsohne
von Hatschett¹⁾ her. Er beobachtete, dass sehr schwache
Salpetersäure sich in Berührung mit Eiereiweiss in Wochen
gelb färbte, wobei der Proteinkörper in eine gelbe Masse über-
ging, welche sich nach dem Auswaschen mit kaltem Wasser
in heissem löste und beim Erkalten der Lösung gelatinirte. Er
beobachtete ferner, dass überschüssige Salpetersäure das durch
Erhitzen oder durch die Salpetersäure selbst coagulirte Eiweiss
in der Wärme unter Entwicklung von Salpetergas, Stickgas,
Kohlensäure und Blausäure zu einer dunkelgelben Flüssigkeit
löste, welche durch Wasser und dunkelbraun durch Ammoniak
gefällt wurde und bei längerer Dauer des Zersetzungs Vorganges
Kleesäure enthielt.

¹⁾ Philosophical Transactions 1799; Allgemeines Journal der Chemie,
herausgegeben von Scherer, Bd. VI. S. 305.

Im Jahre 1805 berichteten Fourcroy und Vauquelin¹⁾ über die Herstellung eines gelben Körpers aus proteinhaltigen Stoffen mittelst Salpetersäure, den sie *Acide jaune* nennen. Später untersuchte Berzelius²⁾ diesen Körper und fand, dass derselbe nach gelindem Waschen mit kohlensaurer Kalkerde digerirt, eine Auflösung von Kalksalzen gab, woraus Alkohol zuckersaure Kalkerde fällte, während salpetersaure Kalkerde in der Auflösung zurückblieb. In der Folge wurde der gelbe Körper von Mulder³⁾ sowohl in Bezug auf seine Herstellungsweise als auch in Bezug auf seine chemischen Eigenschaften des Näheren untersucht, und seine Verbindungen mit Säuren und mit Basen dargestellt. Mulder versuchte sogar die Bildung der Xanthoproteinsäure, mit welchem Namen er den gelben Körper belegte, aus 1 Atom Protein, 2 Atomen Salpetersäure und 1 Atom Wasser, in einer Gleichung auszudrücken. Unter Mulder's Leitung stellte späterhin Van der Pant⁴⁾ die Xanthoproteinsäure aus den verschiedensten proteinhaltigen, thierischen Stoffen her.

Stillingfleet⁵⁾ dialysirte Eierweiss durch 24 Stunden gegen verdünnte Salpetersäure und erhielt ein Produkt, aus dessen Zusammensetzung er schloss, dass ein Molekül Albumin $C_{72}H_{112}N_{18}SO_{22}$ sich mit zwei Molekülen Salpetersäure verbindet. Theilweise als Analogon hierzu berichtet Obermayer⁶⁾ über ein Produkt, das er durch Eingiessen von Eiereiweiss in Salpetersäure erhalten hat.

Loew⁷⁾ beschrieb einige Derivate des Albumins, die aus

1) Annal. de Chimie Bd. LV. 1805 S. 330 und Bd. LVI. 1805 S. 37.

2) Berzelius' Jahresbericht über die Fortschritte der physischen Wissenschaften Bd. XIX. S. 654. Siehe auch Lehrbuch der Chemie von J. J. Berzelius, übersetzt von F. Woehler, IX. Band, S. 821. 40. Aufl. 1840.

3) Journal für prakt. Chemie Bd. XX. Berzelius' Jahresbericht Bd. XIX. S. 651.

4) Scheikund Ouderzoek. Bd. 5, 2. Stuck 136, und Jahresbericht über die Fortschritte der Chemie, herausgegeben von Liebig und Kopp 1849, S. 507.

5) Chem. Soc. Journ. (2). Bd. XII, S. 734.

6) Centralblatt f. Physiologie Bd. VI, 1892 S. 300.

7) Journal f. prakt. Chemie N. F. Bd. III, S. 180 und Bd. V, S. 433.

demselben theils durch Einwirkung von Salpetersäure und Schwefelsäure, theils durch Einwirkung von Salpetersäure allein gewonnen wurden und zur Muttersubstanz noch in «nächster Relation» stehen sollen. Es sind dies die Hexanitroalbuminsulfonsäure, welche mittelst Schwefelammonium zur Hexaamidoalbuminsulfonsäure reducirt wird, und das Trinitroalbumin, welches letzteres Loew als «blosses Nitrosubstitutionsprodukt» des Albumins anspricht.

In neuester Zeit hat Fürth¹⁾ in einer umfangreichen Arbeit an die älteren Versuche über die Einwirkung von Salpetersäure auf Proteinstoffe angeknüpft. Er sucht einerseits eine gleichmässige Einwirkung der Salpetersäure auf Eiweissstoffe zu erzielen, bei welcher die Bildung von salpetriger Säure mittelst Harnstoff hintangehalten erscheint, andererseits legt er sich die Frage vor, ob es möglich sei, die Einwirkung der Salpetersäure so zu leiten, dass eine einfache Nitrirung ohne gleichzeitige tiefgreifende Spaltung möglich sei.

Nencki und Sieber²⁾ haben durch Einwirkung von rauchender Salpetersäure auf Eiweissstoffe Para-Nitrobenzoesäure erhalten, neben Oxalsäure und Zuckersäure somit das dritte krystallinische Produkt, das bisher aus Eiweissstoffen mittelst Salpetersäure gewonnen wurde.

Im Folgenden soll nun eine Methode der Zersetzung von Casein mittelst wässriger Salpetersäure beschrieben werden, die von allem Anfang an dahin abzielte, das Eiweissmolekül gänzlich zu zerlegen und womöglich in krystallinische Spaltungsprodukte abzubauen. Es handelte sich daher in erster Linie darum, eine Methode ausfindig zu machen, die es ermöglichen sollte, das Casein mit Hülfe von verdünnter Salpetersäure dergestalt in Lösung zu bringen, dass zu Ende eine klare Flüssigkeit resultirte, welche selbst nach dem Zusatz von Wasser keinerlei Trübung aufwies. Nach mehrfachen Vorversuchen erwies sich hierzu folgendes Verfahren als das zweckmässigste:

1) Ueber die Einwirkung von Salpetersäure auf Eiweissstoffe von Dr. Otto v. Fürth. Strassburg, Habilitationsschrift 1899.

2) Berliner Berichte Bd. XVIII 1, S. 394.

50 g Casein wurden im lufttrockenen Zustande in einem Kochkolben mit 250 ccm. Wasser übergossen und durch etwa eine halbe Stunde umgerührt, hierauf 50 ccm. Salpetersäure vom specifischen Gewicht 1,40 hinzugefügt, und das Ganze nach Verbindung mit einem Rückflusskühler auf dem Wasserbade bei ca. 70° C. durch 4—4½ Stunden digerirt. Nach dieser Zeit hatte sich das Casein bis auf einen geringen Bodensatz zu einer gelben Flüssigkeit gelöst, wobei die Entwicklung von Stickoxyddämpfen nur gering war. Nach diesem Zeitraume wurden weitere 200 ccm. derselben Salpetersäure hinzugefügt, und das Wasserbad, in welches der unterste Theil des Kolbens vollständig eingesenkt war, voll angeheizt. Es erfolgte nun bald die vollständige Lösung des Caseins; nebenher läuft die Bildung nicht allzu erheblicher Mengen von rothen Dämpfen der Untersalpetersäure und die ziemlich lebhafte Entwicklung kleiner Gasbläschen. Nach mehreren Stunden blieb eine Probe der gelben Flüssigkeit beim Verdünnen mit Wasser völlig klar. Die sattgelbe Zersetzungsflüssigkeit wurde nun mit Wasser sehr stark verdünnt und mit reichlichen Aethermengen wiederholt ausgeschüttelt, wobei der Aether eine intensive Gelbfärbung aufwies. Das Ausschütteln wurde solange fortgesetzt, bis der Aether ungefärbt blieb, die ätherische Lösung von der wässrigen Flüssigkeit im Scheidetrichter getrennt und vorsichtig und nur zum Theil abdestillirt, denn es hatte sich ergeben, dass die ätherische Lösung bei einer bestimmten Concentration während des Destillirens stürmisch Dämpfe von Untersalpetersäure entwickelte. Durch Abkühlen des Destillationskolbens konnte diese Entwicklung von rothbraunen Dämpfen unterdrückt werden, wobei der Kolbeninhalt meistens krystallinisch erstarrte. Die mässig concentrirte, ätherische Lösung wurde daher in einer flachen Schale der Selbstverdunstung überlassen, oder auf dem bis höchstens 30° C. erwärmten Wasserbade weiter eingeeengt, bis sie zu einem Krystallbrei erstarrte, welcher der Hauptmasse nach aus Oxalsäurekrystallen bestand und daneben von gelben, nadelförmigen Kryställchen durchsetzt erschien. Zur Trennung von der Oxalsäure wurde der ganze Krystallbrei wiederholt mit neuen Mengen Aether abgerührt,

wobei die gelben Kryställchen in Lösung gingen und die Oxalsäure schliesslich in der Hauptmenge als rein weisse Masse zurückblieb, von welcher der Aether farblos ablief. Die vereinigten, ätherischen Auszüge wurden nun wieder einer Destillation unterzogen, bei welcher die vorhin erwähnte, stürmische Entwicklung von Untersalpetersäure vermieden blieb. Die concentrirte, tief gelb gefärbte ätherische Lösung wurde der Selbstverdunstung so lange überlassen, bis der Aether verschwunden war und eine Flüssigkeit zurückblieb, welche den charakteristischen Geruch der Leucinsäure, d. h. einen eigenthümlichen, sauren Schweissgeruch an sich trug. Sie wurde mit Wasser verdünnt und in der Siedehitze mit Zinkoxyd abgesättigt, heiss filtrirt und das gelbbraun gefärbte Filtrat mässig stark eingedampft. Beim Stehen an einem staubfreien Orte dunstete die Flüssigkeit zu einem dicken Syrup ein, welcher keine Spur einer Krystallisation zeigte. Dieser Syrup wurde schliesslich mit ca. 95 %igem Alkohol versetzt, wobei sich eine flockige, kleberartige Masse ausschied, welche nach wiederholt erneuertem Zusatz von Alkohol zu einem Pulver zerrieben werden konnte. Dieses Pulver wurde mittelst Hahntrichter auf einem Filter gesammelt, mit Alkohol gewaschen, in heissem Wasser gelöst, wobei nur eine geringe Menge von Flöckchen zurückblieb, und filtrirt. Im Filtrate schieden sich nach mässig starkem Concentriren auf dem Wasserbade und nach einfüggigem Stehen an einem staubfreien Orte an den Wänden der Schale braune, krümliche Krystallkrusten aus. Diese Krystallkrusten konnten durch mehrmaliges Umkrystallisiren aus Wasser in Form rein weisser Nadeln erhalten werden. Selbst wenn das Concentriren des Filtrats zu weit getrieben worden war und es anscheinend in Form eines braunen Syrups erstarrte, konnten die Krystalle noch immer in der Weise erhalten werden, dass der Syrup mit möglichst wenig Wasser schwach erwärmt wurde, wodurch die humöse Masse mit gelber Farbe in Lösung ging, und sich die Krystalle am Boden des Gefässes absetzten. Die Elementaranalyse sowie die Krystallwasserbestimmung ergaben, dass die Zusammensetzung der Krystalle der Formel $C_5H_6O_3Zn + 3H_2O$ entsprach, diese somit oxyglutarsaures Zink sind.

Zur Bestimmung des Krystallwassers wurden die Krystalle im Vacuum über Schwefelsäure bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und sodann im Luftbade bei einer Temperatur von 120° C. das Krystallwasser gänzlich ausgetrieben. Nach erlangter Gewichtskonstanz ergab sich:

0.1144 g der Substanz lieferten 0,0234 g H₂O,
entsprechend 20,45% H₂O.

Die Formel C₅H₆O₅ Zn + 3H₂O verlangt: 20,35% H₂O.

Die Verbrennung ergab Folgendes:

- I. 0,2588 g bei 120° C. getrockneter Substanz lieferten 0,271 g CO₂,
0,064 g H₂O und 0,1 g ZnO.
- II. 0,2364 g bei 120° C. getrockneter Substanz lieferten 0,2485 g CO₂,
0,058 g H₂O und 0,0913 g ZnO.

Berechnet für C ₅ H ₆ O ₅ Zn:	Gefunden:		
	I.	II.	Im Mittel:
Zn: 30,92 %	31,01 %	31,02 %	31,01 %
C: 28,37 %	28,55 %	28,66 %	28,60 %
H: 2,85 %	2,76 %	2,74 %	2,75 %

Es ist schon vorhin erwähnt worden, dass beim Ausschütteln der salpetersauren Zersetzungsflüssigkeit des Caseins mittelst Aethers in die intensiv gelb gefärbte ätherische Lösung zweifelsohne eine Substanz überging, welche den Geruch der Leucinsäure an sich trug, der beim Abdestilliren und Eindunsten der ätherischen Lösung überaus deutlich zu Tage trat. Jedoch blieben alle Versuche, die Leucinsäure als solche oder in Form ihres Zink- oder Barytsalzes zu isoliren, völlig erfolglos. Es stand zu vermuthen, dass sich leucinsaures Zink in der alkoholischen Lösung vorfinden werde, welche mit tief rothbrauner Farbe beim vorhin beschriebenen Zerreiben des oxyglutarsauren Zinks abgelassen war. Doch ergab diese alkoholische Lösung beim Abdestilliren und Eindunsten stets nur syrupöse Rückstände, ohne eine Spur einer Krystallisation zu zeigen. Das Barytsalz wurde in der Weise herzustellen versucht, dass die vom oxyglutarsauren Zink getrennte alkoholische Lösung mit einigen Tropfen verdünnter Schwefelsäure versetzt und mit Aether ausgeschüttelt wurde. Die ätherische Lösung wurde nun ihrerseits mit einer nicht zu geringen

Menge von Barytwasser geschüttelt und im Scheidetrichter von der wässerigen Lösung getrennt, welche letztere beim Verdunsten jedoch keinerlei Krystallisation aufwies.

Wurde die ursprüngliche salpetersaure Zersetzungsflüssigkeit des Caseins einer lebhaften und stundenlangen Destillation im Wasserdampfstrom unterworfen und das Destillat mit Aether ausgeschüttelt, dann hinterblieb beim Abdestilliren und Verdunsten der gelbgefärbten ätherischen Lösung eine nur geringe Menge einer gelbgefärbten Flüssigkeit, welche den Geruch nach Essigsäure und beim Erwärmen daneben den charakteristischen Geruch der Benzoesäure zu erkennen gab. Angesichts der geringen Mengen dieser Flüssigkeit konnte an eine weitere Verarbeitung vorerst nicht gedacht werden. Mit Eisenchloridlösung versetzt gab die Flüssigkeit einen starken flockigen Niederschlag von isabellgelber Farbe, der für die Benzoesäure einigermaßen charakteristisch ist. Es scheint somit die Bildung von geringen Mengen von Benzoesäure bei der Zersetzung des Caseins durch verdünnte Salpetersäure nicht ausgeschlossen: dass diese Mengen aber jedenfalls nur gering sind, kann aus der Unmöglichkeit gefolgert werden, die Benzoesäure ausser mit Hülfe der erwähnten Eisenchloridreaction und dem Geruche sonst noch irgendwie nachzuweisen.

Es mag fernerhin das Auftreten einer Substanz nicht unerwähnt bleiben, welche sich beim Abstumpfen der siedend heissen, wässerigen Lösung der Oxyglutarsäure mittelst Zinkoxyds in einigen Fällen und immer nur in sehr geringen Mengen in Form von wenigen öligen Tropfen zu erkennen gab. Diese öligen Tropfen erstarrten beim Erkalten der Flüssigkeit zu rothgelben Klümpchen von fettigsaurem Geruch, welche abfiltrirt und ausserordentlich leicht wieder in Aether gelöst werden konnten. Nach dem theilweisen Abdunsten des Aethers sammelten sie sich am Boden des Gefässes. Ihr Schmelzpunkt lag bei 143° C. (uncorr.). Mit Wasserdämpfen schien die Substanz leicht flüchtig zu sein. Ihrem sonstigen Aussehen und Eigenschaften nach dürfte sie vielleicht ein Nitrosubstitutionsprodukt einer höheren Fettsäure darstellen.

Noch ein wichtiger Punkt mag nicht unberührt bleiben,

es ist die völlige Abwesenheit der Xanthoproteinsäure bei der Zersetzung des Caseins mittelst verdünnter Salpetersäure nach jener Methode, wie sie des Eingehenden beschrieben worden ist. Denn mit dem Abbau der Xanthoproteinsäure scheint die Bildung von Zuckersäure respective deren Abbau-Produkt der Oxalsäure im engsten Zusammenhange zu stehen. Berzelius weist in seinem Lehrbuche Seite 825 auf diesen Punkt hin, gelegentlich der Citirung der Mulder'schen Gleichung über die Bildung der Xanthoproteinsäure aus: «1 Atom Protein, 2 Atomen Salpetersäure und 1 Atom Wasser», welche zusammen: «1 Atom wasserhaltige Xanthoproteinsäure, 3 Atome Oxalsäure, 3 Doppelatome Ammoniak und 2 Atome Stickstoff als Gas» liefern. «Es versteht sich», bemerkt Berzelius, «dass diese Aufstellung sich auf die Periode bezieht, wo der ganze Gehalt von Zuckersäure in Oxalsäure verwandelt ist. Ueber diese Periode hinaus wird auch die Xanthoproteinsäure zerstört.» Thatsächlich war die Bildung von Oxalsäure durch den eingehend geschilderten Zersetzungsprocess des Caseins mittelst verdünnter Salpetersäure eine ausserordentlich reichliche; es konnten rund 15 g in schön ausgebildeten, rein weissen Krystallen aus 50 g des angewandten Zersetzungsmaterials gewonnen werden, während das Bestreben, Zuckersäure in der Zersetzungsflüssigkeit nachzuweisen, bisher völlig ergebnisslos geblieben ist.

Fasst man die Analogie zwischen dem ergebnissreichsten Zersetzungsprocesse der Eiweissstoffe, dem mittelst verdünnter Salzsäure, und dem voranstehenden ins Auge, so drängt sich vor Allem die Beobachtung auf, dass jener Theil des Caseinmoleküles, welcher im ersten Falle die Glutaminsäure in der bekannten reichlichen Menge liefert, auch im zweiten Falle seine Resistenz gegenüber der Einwirkung von verdünnter Salpetersäure insoferne gezeigt hat, als die Bildung von Oxyglutarsäure aller Wahrscheinlichkeit nach ihren Ursprung in dem primären Auftreten von Glutaminsäure findet, aus welcher

durch die gleichzeitige und nicht zu vermeidende Anwesenheit von salpetriger Säure die Aminogruppen entfernt werden. Ein ähnlicher Process mag mit dem Leucin vor sich gehen. Wenn es auch bisher nicht gelang, die Leucinsäure in der entsprechenden Form zu isoliren, so kann doch ihr Auftreten bei der geschilderten Zersetzung des Caseins mittelst verdünnter Salpetersäure nicht als ausgeschlossen betrachtet werden, und nur die Ausbeute an Zersetzungsprodukten aromatischer Natur war merkwürdiger Weise eine ausserordentlich minimale.

Die Fortsetzung des Studiums der Einwirkung von verdünnter Salpetersäure auf Casein und die Ausdehnung dieser Untersuchung auf andere Eiweissstoffe sind bereits im Gange.