

Ist α -Thiomilchsäure ein unmittelbares Spaltungsprodukt der Proteinstoffe?

Von

K. A. H. Mörner.

(Aus dem chemischen Laboratorium des Karolinischen med.-chir. Institutes
in Stockholm.)

(Der Redaktion zugegangen am 7. Juli 1904.)

Einmal hat Suter¹⁾ bei der Bearbeitung von Hornsubstanz aus Tyrosinmutterlauge, die Fäulnisgeruch zeigte und an deren Oberfläche Schimmelpilze reichlich wucherten, α -Thiomilchsäure darstellen können. Da dies aber nicht bei der Bearbeitung von frischer Tyrosinmutterlauge gelang, schloß er, daß die Thiomilchsäure sekundär durch die Pilze gebildet worden war. Seitdem hat Friedmann²⁾ die Frage zu neuer Bearbeitung aufgenommen. Er konnte aus Rinderhorn, Gänsefedern, Menschenhaaren und Wolle durch Kochen mit Salzsäure α -Thiomilchsäure (oder deren Disulfid) darstellen; daneben glaubt er Thio-glykolsäure gefunden zu haben. Seine Schlußfolgerung, daß die α -Thiomilchsäure primär abgespalten wird, setzt aber die Richtigkeit der Angaben Suters voraus, daß keine Bindung von Schwefel bei der Behandlung der Hornzersetzungsflüssigkeiten mit Schwefelwasserstoff stattfindet und weiter, daß keine Bildung von Brenztraubensäure bei der Zersetzung der Proteinstoffe vorkomme. Die erste dieser Angaben ist aber wenig überzeugend, da Suter dieselbe durch keinen Beleg stützt³⁾ und die unumgänglichen Fehler bei der Ausführung der Analysen

¹⁾ F. Suter, Diese Zeitschrift, 1895, Bd. XX, S. 577.

²⁾ E. Friedmann, Beiträge zur chem. Physiologie u. Pathologie, 1902, Bd. III, S. 184.

³⁾ Suter, Diese Zeitschrift, 1895, Bd. XX, S. 574.

die Entscheidung verhindern dürften. Daß die zweite dieser Angaben nicht stichhaltig ist, habe ich¹⁾ nachgewiesen.

Da die Frage über die Abspaltung von α -Thiomilchsäure aus den Proteinstoffen für die Kenntnis der Bindung von deren Schwefel Bedeutung hat, habe ich die Frage zu erneuerter Prüfung aufgenommen, wodurch ich zu der Anschauung gekommen bin, daß keine Abspaltung von α -Thiomilchsäure bei der Zersetzung durch Erwärmen mit Salzsäure primär vorkommt.

Die Prüfung auf Thiomilchsäure wurde mit der Untersuchung auf Brenztraubensäure, welche ich vor kurzem beschrieben habe,¹⁾ verbunden. Zur Zersetzung wurden die Proteinstoffe, wie ich früher für die Cystindarstellung beschrieben habe, mit 2—4 Teilen Salzsäure (von 25%) und Wasser (die Konzentration der Säure war etwa 15% oder weniger) in einem verschlossenen Kolben, welcher auf einem kochenden Wasserbade stand, mehrere Tage erhitzt: die Temperatur des Kolbeninhalts war etwa 90°: nach einer Woche war die Biuretreaktion im allgemeinen gänzlich oder beinahe gänzlich verschwunden. Ich finde dieses langwierige Erhitzen bei einer etwas niedrigeren Temperatur und mit einer schwächeren Säure vorteilhafter als das von anderen oft gebrauchte Kochen mit konzentrierter Salzsäure während einer kürzeren Zeit, wie z. B. 4 Stunden. Wenigstens habe ich bei der Cystindarstellung bessere Resultate erhalten. Nach meinem Verfahren habe ich eine reichlichere Ausbeute an Cystin bekommen. So habe ich²⁾ aus der Substanz des Rinderhorns bis 6% Cystin isolieren können, während Friedmann³⁾ nach dem eben erwähnten Verfahren aus dieser Substanz nur 0.95—2.9% Cystin erhielt. Beiläufig sei erwähnt, daß ich auch reichliche Mengen von Eiweißbasen (Arginin und Lysin) darstellen konnte. Sei es nun, daß die niedrige Ausbeute, welche Friedmann erhielt, durch eine unzureichende oder eine allzu weit gegangene Spaltung bedingt wurde, so muß mein Verfahren für die

¹⁾ K. A. H. Mörner, Diese Zeitschrift, 1904, Bd. XLII, S. 121.

²⁾ K. A. H. Mörner, Diese Zeitschrift, 1902, Bd. XXXIV, S. 219.

³⁾ E. Friedmann, Beiträge z. chem. Physiologie und Pathologie, 1902, Bd. III, S. 16.

Prüfung auf Thiomilchsäure besser geeignet sein. Da nach meinem Verfahren die Zersetzung des Proteinstoffes ohne Entwicklung von Schwefelwasserstoff noch Ausscheidung von freiem Schwefel durchgeführt werden kann, ist eine Zersetzung von eventuell gebildeter Thiomilchsäure nicht zu befürchten.

Nach beendeter Erhitzung wurde die Lösung des Proteinstoffes mit Äther ausgeschüttelt. Nach dem Waschen der Ätherlösung mit ein wenig Wasser wurde der größere Teil des Äthers abdestilliert: den Rest des Äthers ließ ich nach Zusatz von ein wenig Wasser freiwillig verdunsten. Die wässrige Lösung, welche ich auch auf Brenztraubensäure untersuchte, wurde auf Thiomilchsäure geprüft. Die Reaktionen auf Thiomilchsäure mit Eisenchlorid, mit Kupfersulfat und die besonders empfindliche Reaktion mit Nitroprussidalkali und Natronlauge wurden ausgeführt; auch habe ich mit Natronlauge und Bleiacetat erhitzt, um auf die Gegenwart von dem Disulfid der Thiomilchsäure zu prüfen: die Möglichkeit der Gegenwart von dem Disulfid der Thiomilchsäure habe ich auch durch Reduktion und nachherige Prüfung auf Thiomilchsäure beachtet.

Durch besondere Versuche habe ich mich davon überzeugt, daß die α -Thiomilchsäure leicht in Äther übergeht, so daß weniger als ein Teil der Thiomilchsäure in 10000 Teilen der Zersetzungsflüssigkeit sicher nachgewiesen werden konnte (für 100 g des Proteinstoffes weniger als 50 mg Thiomilchsäure).

Mehrmals habe ich die Zersetzungsflüssigkeit zum zweiten und sogar zum dritten Mal einige Tage erhitzt und jedesmal die Prüfung auf Thiomilchsäure wiederholt.

Ich habe die Substanz des Rinderhorns (500 g), Menschenhaare (200 g), Eiweiß des Blutserums (200 g), Casein (500 g <Proton> der Aktiengesellschaft Separator) untersucht. Das Ergebnis dieser Untersuchungen kann ich kurz dahin zusammenfassen, daß ich keine oder nur eine ganz minimale Bildung von Thiomilchsäure oder deren Disulfid finden konnte. In den Fällen, wo ich Andeutungen davon beobachten konnte, wie bei der Hornsubstanz, war es erst nach zweimaligem oder dreimaligem Erhitzen, also zu einer Zeit, wo Schwefelwasserstoff, wenn auch in geringer Menge, gebildet wird und freier

Schwefel ausgeschieden werden kann. Nach meinen Beobachtungen kann ich nicht der Auffassung von einer primären Bildung von Milchsäure (sei es der α - oder der β -Säure) noch von deren Disulfiden aus den Proteinstoffen beitreten. Dagegen habe ich gesehen, daß eine Hornzersetzungsflüssigkeit, in welcher ich keine Thiomilchsäure noch deren Disulfid fand, nach Sättigung mit Schwefelwasserstoff bei dem Ausschütteln mit Äther zu diesem eine Substanz abgab, welche nach der Reduktion starke Reaktionen auf α -Thiomilchsäure gab; die Operationen waren dabei die folgenden: Sättigung mit Schwefelwasserstoff, Kochen bei niedrigem Drucke zur Entfernung des Schwefelwasserstoffes, Ausschütteln mit Äther, Reduktion des Ätherrückstandes mit Zink- und Salzsäure, Ausschütteln mit Äther, Waschen der Ätherlösung mit ein wenig Wasser; der Rückstand der Ätherlösung gab jetzt starke Reaktionen mit Eisenchlorid und mit Nitroprussidalkali und Natronlauge; mit Kupfersulfat wurde eine bleibende violette Farbe erhalten. Es lag also α -Thiomilchsäure vor. Daß diese durch die Einwirkung von Schwefelwasserstoff gebildet wurde, kann nicht verwundern, da die Flüssigkeit Brenztraubensäure enthielt, welche bei der Behandlung mit Schwefelwasserstoff und Reduktion des Reaktionsprozesses α -Thiomilchsäure gibt.

Ogleich ich schon nach dieser Erfahrung über die von mir ausgeführte Zersetzung der Proteinstoffe jedenfalls bestreiten muß, daß eine Bildung von Thiomilchsäure primär stattfindet, habe ich einen Versuch ausgeführt, wobei die Hornsubstanz nach Friedmanns Methode zerkoht wurde: 40 g Hornspäne und 120 ccm konzentrierter Salzsäure wurden am Rückflußkühler 4 Stunden gekocht. Es fand dabei eine mäßige Entwicklung von Schwefelwasserstoff statt. Die Biuretreaktion war verschwunden. Aus dieser Flüssigkeit nahm Äther keine Substanz auf, die mit Nitroprussidalkali und Natronlauge, mit Eisenchlorid oder mit Kupfersulfat eine Spur der Thiomilchsäurereaktionen gab, oder mit Natronlauge und Bleiacetat Bleisulfid abschied. Auch nach diesem Verfahren konnte ich also nicht die Beobachtungen Friedmanns bestätigen.

Die von Friedmann gefundene α -Thiomilchsäure kann

entweder durch eine Einwirkung von Schwefelwasserstoff auf Brenztraubensäure oder durch eine Spaltung des Cystins entstanden sein; nach meinen in jüngster Zeit mitgeteilten Untersuchungen ist man berechtigt, an beide Möglichkeiten zu denken.

Friedmanns Annahme, daß neben der α -Thiomilchsäure auch Thioglykolsäure gebildet werde, stützt sich nur auf die Farbenreaktion mit einer Spur Eisenchlorid und Ammoniak. Wie ich¹⁾ mitgeteilt habe, wird diese Reaktion ebenso schön von der α -Thiomilchsäure gegeben.

Die von mir jetzt mit »Nein« beantwortete Frage, ob eine primäre Abspaltung von α -Thiomilchsäure aus den Proteinstoffen geschehe, ist von Bedeutung für die Aufklärung der Bindung des Schwefels in den Proteinstoffen. Vor einigen Jahren habe ich meine Untersuchungen über die Bindung des Schwefels in verschiedenen Proteinstoffen veröffentlicht.²⁾ Ich fand, daß aus den untersuchten Proteinstoffen, welche beim Erhitzen mit Natronlauge und Bleiacetat Schwefelblei gaben, Cystin dargestellt werden konnte. Nachdem das Cystin so vollständig entfernt worden war, wie es mit unseren jetzigen, noch unvollkommenen Methoden geschehen konnte, wurde beim Erhitzen mit Bleiacetat und Natronlauge Bleisulfid gebildet. Aus Gründen, welche ich näher angab, hielt ich es für wahrscheinlich, daß auch dieser Schwefel der cystingebenden Gruppe in dem Proteinstoffe angehöre. Ich fand, daß für einige Proteinstoffe, wie Serumalbumin, Serumglobulin, die Substanz des Rinderhorns und der Menschenhaare man mit nicht wenig Wahrscheinlichkeit annehmen konnte, daß der ganze Schwefelgehalt des Proteinstoffes in der cystingebenden Gruppe enthalten sei; die alte Annahme von zwei verschiedenen Bindungsformen des Schwefels war für diese Proteinstoffe unhaltbar. Ein anderes Verhalten wiesen aber andere untersuchte Proteinstoffe (Fibrinogen, Ovalbumin, Casein und die Substanz der Schalenhaut des Hühnereies) auf.

Bei diesen Untersuchungen habe ich die Möglichkeit in Erwägung gezogen, daß der nach dem Fällen des Cystins rück-

¹⁾ K. A. H. Mörner. Siehe die vorangehende Abhandlung.

²⁾ K. A. H. Mörner. Diese Zeitschrift, 1902. Bd. XXXIV. S. 295.

ständige Schwefel zum Teil als Thiomilchsäure gebunden war. Zu einer Zeit glaubte ich sogar Zeichen von der Gegenwart von Thiomilchsäure gesehen zu haben; diese Zeichen traten aber nur dann hervor, wenn Schwefelwasserstoff in Verwendung kam; ich fand mich dadurch veranlaßt, den Gedanken an eine primäre Abspaltung von Thiomilchsäure aus den Proteinstoffen aufzugeben. Nach den oben mitgeteilten Untersuchungen finde ich es noch mehr berechtigt, die ganze Menge des schwarzen Schwefels in den Proteinstoffen als der cystingebenden Gruppe des Proteinstoffes zugehörig zu betrachten.

Daß das Cystin unvollständig ausgefällt wurde, schien mir durch die experimentell nachgewiesene Verschiedenheit der Löslichkeit von stereoisomeren Cystinen hinreichend erklärt werden zu können. Jetzt muß man außerdem an die Möglichkeit denken, daß strukturisomere Cystine verschiedene Löslichkeit haben, da man gegenwärtig, nach meiner in diesem Heft mitgeteilten Untersuchung, sowohl mit Cystin, welches von α -Thiomilchsäure ein Derivat ist, wie mit Cystin, welches von β -Thiomilchsäure hergeleitet ist, rechnen muß.

Stockholm, im Juni 1904.