

Die Oxydation des Pseudomucins und Caseins mit Calciumpermanganat.

Von

J. Otori (Tokio).

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Marburg.)

(Der Redaktion zugegangen am 21. August 1904.)

Seitdem wir durch Steudel¹⁾ in den Permanganaten der alkalischen Erden sehr günstig wirkende Oxydationsmittel kennen gelernt haben und durch Kutscher und Zickgraf²⁾ eine Methode ausgearbeitet ist, welche gestattet, die Eiweißstoffe mit Hilfe obiger Reagentien glatt zu oxydieren, bietet es keine sonderlichen Schwierigkeiten mehr, die Ergebnisse der Hydrolyse der Eiweißkörper durch die Oxydation zu kontrollieren. Ich habe dies getan und da ich beim Pseudomucin auf überraschende Ergebnisse stieß, auch das Casein noch in den Kreis meiner Untersuchungen gezogen.

Zunächst versuchte ich festzustellen, ob beim Pseudomucin wie beim Leim die Maximalausbeute an Guanidin und das Verschwinden der Biuretreaktion zusammenfallen. Ich ging dabei ähnlich wie Zickgraf³⁾ vor. Es wurden je 10 g lufttrockenes Pseudomucin entsprechend 8,67 g trockener, aschefreier Substanz in ca. 300 ccm Wasser aufgeschwemmt, die Flüssigkeit zum Sieden erhitzt und langsam in die siedende Flüssigkeit eine 10%ige Lösung von Calciumpermanganat eingetroppt. Nach der Entfärbung des Reaktionsgemisches wurde der Manganschlamm abgesaugt, mehrfach mit Wasser ausgekocht, von neuem abgesaugt und die verschiedenen vereinigten Filtrate auf dem Wasserbade auf ein kleines Volumen gebracht. Es schieden sich im Laufe von 24—48 Stunden, wie schon

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXII, S. 241.

²⁾ Sitzungsber. der Königl. preuß. Ak. der Wissensch. 28. Mai 1903.

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLI, S. 259.

Kutscher und Zickgraf¹⁾ beobachtet haben, schwerlösliche, kalkhaltige Verbindungen ab. Dieselben wurden abgesaugt, vereinigt und zusammen verarbeitet. Ich will diese Verbindungen als «Fraktion der schwerlöslichen Kalkverbindungen» bezeichnen.

Die Filtrate von diesen Substanzen wurden jedes einzeln ohne weitere Vorbehandlung mit Natriumpikrat ausgefällt. Nach 24 Stunden wurden die abgeschiedenen Pikrate abgesaugt, aus wenig Wasser umkristallisiert, wiederum abgesaugt, getrocknet und gewogen. Die Mutterlaugen wurden gemessen und an dem gefundenen Pikrat — es handelte sich nur um Guanidinpikrat — nach Emich²⁾ eine entsprechende Korrektur angebracht. Die Identifizierung des Guanidinpikrates geschah meist durch Schmelzpunktbestimmung, bei der Maximalausbeute auch durch Analyse. Ich gebe die Resultate, die von mir erhalten wurden, in einer Tabelle wieder.

Tabelle I.

Versuche mit Pseudomucin.

| Versuchs-Nr. | I | II | III | IV | V | VI |
|---|----------|---------------|------------------------|----------|-----------|----------|
| Angewandte Substanzmenge | 8,67 g | 8,67 g | 8,67 g | 8,67 g | 8,67 g | 8,67 g |
| Zur Oxydation benutzte Menge von Calciumpermanganat | 30 g | 40 g | 50 g | 60 g | 70 g | 80 g |
| Ausfall der Biuretreaktion | positiv | stark positiv | schwach | schwach | spurenhaf | negativ |
| Ausbeute an Guanidinpikrat | 0,0192 g | 0,2973 g | 0,5041 g ³⁾ | 0,4381 g | 0,4132 g | 0,3519 g |

¹⁾ l. c.

²⁾ Monatshefte f. Chemie 1891, S. 23.

³⁾ Die Analyse des in Versuch III gewonnenen Guanidinpikrates ergab folgenden Wert: 0,0936 g Substanz gaben 24,2 ccm N: T = 18,5° C., Ba. = 755 mm. Demnach N = 28,86% N. Verlangt sind 29,2% N. Der Schmelzpunkt des Pikrates lag bei 314° C.

Ein Blick auf vorstehende Tabelle zeigt zunächst, daß die Maximalausbeute an Guanidinpikrat beim Pseudomucin wohl mit der Abnahme, aber nicht mit dem Verschwinden der Biuretreaktion zusammenfällt. Hier liegen die Verhältnisse also komplizierter als beim Leim, wo Verschwinden der Biuretreaktion und Maximalausbeute an Guanidin sich gerade decken. Zu sehr auffälligen Resultaten kommt man aber weiter, wenn man das Guanidinpikrat in Arginin umrechnet. Die 0,5041 g Guanidinpikrat der Maximalausbeute entsprechen 0,465 g Arginin. Auf 100 g Pseudomucin umgerechnet müßten dieselben demnach eigentlich 5,36 g Arginin enthalten. In Wirklichkeit sind aber bei Säurespaltung nur 0,2875 g resp. 0,7773 g Arginin¹⁾ erhalten worden d. h. ca. nur $\frac{1}{18}$ — $\frac{1}{7}$ der aus dem Guanidin berechneten Menge. Wie erklärt sich diese gewaltige Differenz? Es scheinen sich hierfür, wenn man meine vorstehende Arbeit in Betracht zieht, zwei Erklärungen geben zu lassen, die beide einige Wahrscheinlichkeit für sich haben. Entweder muß man annehmen, daß im Pseudomucin das Arginin, aus dem das Guanidin hervorgegangen sein kann, so fest verkettet ist, daß es sich durch Säuren überhaupt nicht vollkommen abspalten läßt. Für diese Anschauungsweise spricht die höhere Ausbeute an Arginin, die ich mit der eingreifenderen Methode von Hlasiwetz und Habermann²⁾ erhalten habe. In diesem Falle müßte man das Plus an Arginin, das sich aus dem bei der Oxydation gewonnenen Guanidin berechnet, auf das durch Säuren nicht abspaltbare Arginin beziehen. Oder aber man muß im Pseudomucin außer dem Arginin noch einen zweiten, großen Guanidinkern annehmen. Auch hierfür ließen sich die in meiner vorstehenden Arbeit erhaltenen Resultate verwerten. Ich habe ja dort direkt Guanidin bei der Hydrolyse erhalten und dieses könnte dem neuen Guanidinkern entstammen, der durch die Hydrolyse teilweise gesprengt wurde, wodurch etwas Guanidin frei wurde. Im Augenblick wage ich mich weder für die eine noch für die andere dieser beiden möglichen Erklärungen zu entscheiden. Jedentfalls aber geben meine Re-

¹⁾ Siehe vorstehende Arbeit.

²⁾ Liebigs Annalen, Bd. 159, S. 304, u. Bd. 169, S. 240.

sultate eine gute Illustration zu dem Wert jener Arbeiten, in denen nach fehlerhafter Methode, ohne jede Kontrolle durch die Darstellung der kristallinen Substanzen, in ganz ernsthafter Weise, der Amid-, der Diamino- und Monoaminostickstoff der verschiedensten Eiweißstoffe bestimmt wird.

Verarbeitung der «Fraktion der schwerlöslichen Kalkverbindungen».

Bereits durch Zickgraf¹⁾ ist versucht worden, diese Fraktion aufzuteilen. Zickgraf ist dabei zu einem eigenartigen Körper gelangt, doch ist die Methode sehr eingreifend und nur für eine Substanz geeignet. Dagegen ist kürzlich durch Kutscher und Martin Schenck ein Verfahren ausgearbeitet, das eine glatte Aufteilung der Fraktion gestattet.²⁾ Ich habe dieses Verfahren benutzt. Die gesamten gesammelten, schwerlöslichen Verbindungen, deren Ausbeute gering gewesen war, wurden in siedendem Wasser gelöst. In die siedende Lösung wurde Ammoniumkarbonat in Stücken eingetragen. Vom ausgeschiedenen Calciumkarbonat wurde abgesaugt und das Filtrat auf dem Wasserbade eingeengt. Es schied sich zunächst in gelblichen Körnchen ein schwerlöslicher Körper ab, der mit dem Zickgrafschen identisch ist. Nach der Umkristallisation sublimierte er bei ca. 260°. Die Sublimation erfolgte ohne merkliche Zersetzung, denn aus heißem Wasser kristallisierten die sublimierten Massen von neuem in feinen Nadeln, die denen des Ausgangsmaterials vollkommen glichen. Über 300° färbte sich der Körper im zugeschmolzenen Röhrchen dunkel, ohne aber bis 330° erhitzt zu schmelzen.

Das Filtrat von dieser Substanz wurde zur Trockne gebracht. Es hinterließ eine Kristallmasse, welche nach dem Waschen mit Alkohol rein weiß erschien und im Schmelzröhrchen bei 330° C. unter Aufschäumen nach vorgängiger Schwärzung sich zersetzte. Von Kutscher und Schenck ist diese Fraktion beim Leim glatt in die von Zickgraf beobachtete Substanz und oxaminsaures Ammon zerlegt worden. Oxamin-

¹⁾ l. c.

²⁾ Berichte der deutsch. chem. Ges., 1904, Heft 13.

saures Ammon, das bei 226° C. schmilzt, lag danach nicht vor. Um weitere Anhaltspunkte zu erhalten, wurden die Kristalle in Wasser gelöst und mit Silbernitrat gefällt. Die Fällung wurde mit heißem Wasser aufgenommen, dabei blieb ein amorphes Silbersalz zurück, dessen Menge zur Analyse nicht reichte. Beim Einengen des gelösten Silbersalzes reduzierte dieses nicht unbedeutend. Eine Silberbestimmung gab folgenden Wert:

0,1268 g Substanz lieferten beim Glühen 0,1042 g Ag; daraus berechnen sich 82,18% Ag.

Außerdem sind von mir auch noch die Filtrate vom Guanidinpikrat bis zu einem gewissen Grade verarbeitet worden. Sie wurden vereinigt und mit Schwefelsäure stark angesäuert. Dabei trat deutlich ein angenehmer fruchtätherartiger Geruch auf, den die Flüssigkeit vorher nicht besessen hatte. Sie wurde filtriert und der Destillation unterworfen, bis das Destillat schwach sauer überging. Das Destillat wurde von neuem und zwar fraktioniert destilliert. Die I. Fraktion ging bei 90° C. über. Sie enthielt hauptsächlich jene angenehm riechenden Stoffe, deren ich oben Erwähnung getan habe. Die Jodoformprobe und die Probe mit Nitroprussidnatrium wurde von ihr stark gegeben, dagegen vermochte sie o-Nitrobenzaldehyd bei alkalischer Reaktion nicht in Indigo überzuführen. Sie enthielt demnach kein Aceton. Was für Körper in ihr steckten, vermag ich nicht zu sagen, doch erscheint mir das Freiwerden leicht flüchtiger Substanzen beim Ansäuern der Oxydationsflüssigkeit auffällig und der weiteren Verfolgung wert. Die gleiche Beobachtung konnte ich am Casein machen.

Die II. Fraktion enthielt die höher siedenden Teile des Destillates, aus ihr vermochte ich nach dem bekannten Liebigschen¹⁾ Verfahren über das Natronsalz durch fraktionierte Destillation ameisensaures Silber zu erhalten. Ich lasse die Analyse desselben folgen:

0,125 g Silbersalz gaben 0,0884 g Ag = 70,88% Ag. Für ameisensaures Silber werden 70,59% Silber verlangt.

¹⁾ Liebigs Annalen, Bd. 72, S. 42.

Die Oxydation des Caseins.

Die Oxydation des Caseins führte ich wie diejenige des Pseudomucins aus. Auch die Verarbeitung der Oxydationsprodukte geschah in der gleichen Weise. Ich gebe tabellarisch zunächst die Ausbeuten an Guanidinpikrat und das Verhalten der Biuretreaktion wieder. Das verwandte Casein war von Grüber bezogen (Marke, Handels-casein I), es entsprachen 10 g des lufttrockenen Präparates 9,40 g bei 100° C. getrockneter Substanz. Der Stickstoffgehalt in dem trockenen Präparat betrug nach Dumas bestimmt 15,12 %.

Tabelle II.
Versuche mit Casein.

| Versuchs- Nr. | I | II | III | IV |
|---|----------|------------------------|------------|---------|
| Angewandte Caseinmenge | 9,40 g | 9,40 g | 9,40 g | 9,40 g |
| Zur Oxydation benutzte Menge von Calciumpermanganat | 40 g | 50 g | 60 g | 70 g |
| Ausfall der Biuretreaktion | deutlich | schwach | spurenhaft | negativ |
| Ausbeute an Guanidinpikrat | 0,5006 g | 0,5464 g ¹⁾ | 0,4239 g | 0,421 g |

Beim Casein trifft, wie die Tabelle zeigt, das Verschwinden der Biuretreaktion mit der Maximalausbeute an Guanidin ziemlich genau zusammen. Dagegen kommt man, wenn man das gefundene Guanidin auf Arginin umrechnet, ebenfalls zu einem höheren Wert als bei Säurespaltung. Allerdings entfernt sich der letztere vom ersteren nicht so auffällig wie beim Pseudomucin. Von Hart²⁾ ist bei Säurespaltung aus 100 g Casein 4,70 g und 4,84 g Arginin erhalten worden, während nach meinem Oxydationsversuch 100 g Casein zum mindesten 5,38 g Arginin liefern müßten. Für das Plus des Arginins resp. Guanidins,

¹⁾ Die Analyse dieses Präparates gab folgende Werte: 0,118 g Substanz gaben 31 cem N; T. = 17,5° C., Ba. = 750 mm. Daraus berechnen sich 29,56% N. Guanidinpikrat verlangt 29,2% N.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXIII, S. 356.

das sich beim Casein ergibt, gelten natürlich die gleichen Erwägungen, die ich beim Pseudomucin angestellt habe.

Verarbeitung der Fraktion der schwerlöslichen Kalkverbindungen.

Die Aufteilung dieser Fraktion geschah nach der gleichen Methode, die ich beim Pseudomucin anwandte. Die Ausbeute an schwerlöslichen Kalkverbindungen war weit reichlicher gewesen, wie beim Pseudomucin.

Es wurde auch hier der Zickgrafsche Körper gewonnen, der durch qualitative Reaktionen identifiziert wurde. Weiter erhielt ich nicht unbeträchtliche Mengen an oxaminsaurem Silber, dessen Analyse ich folgen lasse.

0,1114 g Substanz gaben beim Glühen 0,0622 Ag
 0,209 „ „ „ 13,2 ccm N; T. = 17° C., Ba. = 748 mm.
 Für $C_2H_9NO_3Ag$.

| Berechnet | Gefunden |
|-------------|-------------|
| Ag = 55,1 % | Ag = 55,8 % |
| N = 7,1 % | N = 6,8 % |

Die Filtrate vom Guanidinpikrat wurden in gleicher Weise wie beim Pseudomucin verarbeitet. Ich habe schon oben hervorgehoben, daß auch beim Casein angenehm nach Fruchtäthern riechende Substanzen von niedrigem Siedepunkt beim starken Ansäuern der Flüssigkeit mit Schwefelsäure frei werden. Dieselben gaben die Jodoformreaktion und Nitroprussidnatriumreaktion wie das Aceton, sie vermochten aber ebenfalls nicht das o-Nitrobenzaldehyd bei alkalischer Reaktion der Flüssigkeit in Indigo überzuführen. Man muß demnach wohl annehmen, daß bei der von mir eingehaltenen Oxydationsmethode aus dem Casein kein Aceton entsteht, oder aber, daß es nicht wie die hier in Betracht kommenden Substanzen gebunden, erst beim Ansäuern der Flüssigkeit frei wird.

Unter den mit Wasserdämpfen flüchtigen Fettsäuren fand sich namentlich Essigsäure, die ich schließlich nach dem Liebigschen Verfahren in Form ihres Silbersalzes gewann und zur Analyse brachte.

0,15054 g Substanz gaben beim Glühen 0,0682 g = 64,82 % Ag.
 Essigsäures Silber verlangt 64,67 % Ag.