

Zur Kenntnis des Cystins.

Von

Emil Fischer und Umetarō Suzuki.

(Aus dem I. Chemischen Institut der Universität Berlin.)

(Der Redaktion zugegangen am 29. Juni 1905.)

Wie wir vor einiger Zeit gezeigt haben,¹⁾ läßt sich das Cystin durch Kombination mit den Chloriden der Chloressigsäure, Brompropionsäure und Brom-iso-capronsäure vereinigen, und durch nachträgliche Behandlung der Produkte mit Ammoniak entstehen die Polypeptide, welche als Di-glycyl- Di-alanyl- und Di-leucyl-Cystin bezeichnet wurden.

Um diese Synthese zu erweitern, haben wir jetzt in der üblichen Weise den Dimethylester des Cystins bereitet. Er ist ein stark alkalischer Syrup, bildet aber schön kristallisierende Salze, die so charakteristisch sind, daß sie sich recht gut zur Identifizierung des Cystins eignen. Wir haben sie benutzt, um die durch die Untersuchungen von Neuberg und Mayer²⁾ aktuell gewordene Frage nach der Identität oder Verschiedenheit des Cystins aus Proteinstoffen und aus Cystinsteinen zu prüfen.

Ein solcher Stein wurde uns in freundlichster Weise von Herrn Prof. Oscar Liebreich aus der Sammlung des Pharmakologischen Instituts der hiesigen Universität zur Verfügung gestellt, wofür wir ihm auch hier unseren besten Dank aussprechen. Der Vergleich dieses Materials mit dem reinen optisch aktiven Cystin aus Roßhaar hat uns zur Überzeugung geführt, daß völlige Gleichheit besteht. Auf die gleichlautenden Beobachtungen von Rothera und die etwas abweichenden Angaben von Neuberg und Mayer werden wir unten zurückkommen.

¹⁾ Berichte, Bd. XXXVII, Heft 17, 4575.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLIV, S. 472.

Cystin-di-methylester.

Suspendiert man 10 g gepulvertes reines aktives Cystin in 250 ccm trockenem Methylalkohol, und leitet ohne Abkühlung trockenes Salzsäuregas bis zur Sättigung ein, so findet klare Lösung statt, und nach einiger Zeit, besonders bei Abkühlung, beginnt die Kristallisation des salzsauren Dimethylesters. Um die Abscheidung zu vervollständigen, ist es vorteilhaft, das doppelte Volumen trockenen Äthers zuzusetzen. Das Produkt besteht aus farblosen Prismen, die bei langsamer Kristallisation eine Länge von mehreren Zentimetern haben können. Sie werden abgesaugt, mit trockenem Äther gewaschen und im Vacuumexsikkator getrocknet. Die Ausbeute beträgt 90—95% der Theorie.

Für die Analyse war das Präparat nochmals in wenig warmem Methylalkohol gelöst, mit etwas Tierkohle entfärbt, dann mit Äther abgeschieden, und im Vacuum bei 80° C. getrocknet.

0,1911 g Substanz gaben 0,1949 g CO₂ : 0,0916 g H₂O

0,1913 » » » 13,4 ccm N (21°, 760 mm).

0,2470 » » » 0,2047 g AgCl.

C₈H₁₆N₂S₂O₄·2HCl: Berechnet C 28,15, H 5,28, N 8,21, Cl 20,82

Gefunden » 27,82, » 5,33, » 7,97, » 20,50

Das Salz löst sich außerordentlich leicht in Wasser, und die Flüssigkeit hat eine stark saure Reaktion. Es löst sich auch leicht in warmem Methylalkohol, etwas schwieriger in Äthylalkohol, sehr schwer in Essigäther und in Benzol und fast gar nicht in Äther und Petroläther. Das frisch bereitete und vor Feuchtigkeit sorgfältig geschützte Salz schmilzt gegen 170° (korr. 173°) unter starkem Schäumen und nachfolgender Braunfärbung. Der Schmelzpunkt wird aber herabgedrückt, wenn das Präparat kurze Zeit in feuchter Luft steht. Für die Bestimmung des Drehungsvermögens diente eine Lösung in trockenem Methylalkohol.

I. 0,3016 g Substanz in 7,8558 g Methylalkohol bei gewöhnlicher Temperatur gelöst. Drehung im 1 dm-Rohr bei 20° und Natriumlicht 1,14° nach links. Spezifisches Gewicht der Lösung 0,8113.

Die Drehung war nach einer Stunde unverändert.

II. 0,830 g Substanz in 13,71 g Methylalkohol. Drehung bei 20° im 2 dm-Rohr 3,61° nach links. Spezifisches Gewicht 0,8230.

	I.	II.
Mithin $[\alpha]_D^{20^\circ} =$	— 38,0°	— 38,4°

In wässriger Lösung ist die spezifische Drehung annähernd eben so groß, aber sie ändert sich, höchst wahrscheinlich weil teilweise Verseifung erfolgt. Gefunden wurde nämlich:

10 Minuten nach der Auflösung	$[\alpha]_D^{20^\circ}$	— 39,2°
25 „ „ „ „ „		— 40,9°
1 ³ / ₄ Stunden „ „ „ „		— 43,7°
5 ³ / ₄ „ „ „ „		— 44,2°

Zur Bereitung des freien Cystin-dimethylesters löst man das Salz in wenig Methylalkohol in der Kälte, versetzt mit der für das Chlor berechneten Menge einer 2%igen Auflösung von Natriummethylat in Methylalkohol und fügt dann sofort zur Fällung des Natriumchlorid das doppelte Volumen trockenen Äthers hinzu. Die filtrierte Flüssigkeit hinterläßt beim Verdampfen unter stark vermindertem Druck den Cystin-dimethylester als schwach gelben Sirup. Zur Reinigung wird er in Äther gelöst, wobei eine amorphe gefärbte Masse zurückbleibt, und die Lösung im Vacuum verdunstet. Der so erhaltene Ester ist farblos, reagiert alkalisch und löst sich leicht in Wasser und Alkohol, ziemlich leicht in Äther, aber sehr schwer in Petroläther. Er gleicht in diesen Eigenschaften den Estern der gewöhnlichen Aminosäuren. Beim Aufbewahren im geschlossenen Gefäß, auch bei Abschluß der Luft färbt er sich schon nach ein bis zwei Tagen allmählich gelb, später gelbbrot, und entwickelt etwas Ammoniak. Viel rascher erfolgt dieselbe Veränderung in der Wärme. Beim starken Abkühlen, z. B. in flüssiger Luft, erstarrt der Ester, aber ohne deutliche Kristallbildung.

Beim Erhitzen der wässrigen Lösung zersetzt er sich unter Abscheidung eines Öls, das gleichzeitig gelbbraun wird. Ob dabei Cystin gebildet wird, haben wir nicht geprüft. Jedenfalls ist die Verseifung keineswegs so glatt wie bei den gewöhnlichen Aminosäuren. Sehr leicht erfolgt aber die Verseifung des Esters durch Alkalien. Löst man ihn z. B. in kaltem Wasser, fügt in mäßigem Überschuß Natronlauge zu und übersättigt nach

fünf Minuten langem Stehen mit Essigsäure, so fällt eine große Menge Cystin aus.

Außer dem Hydrochlorat haben wir Nitrat, Sulfat und Oxalat kristallinisch erhalten. Das Nitrat fällt aus der ätherischen Lösung des Esters auf Zusatz von starker Salpetersäure erst als Sirup, erstarrt aber bald. In warmem Methylalkohol ist es leicht löslich. Fügt man zu dieser Lösung Äther bis zur Trübung, so scheidet sich das Salz zumal beim Abkühlen in farblosen, mikroskopischen Kristallen ab, die meist spießartig ausgebildet, und öfters sternförmig verwachsen sind. Das Sulfat wird in ähnlicher Weise erhalten. Es ist in heißem Methylalkohol ziemlich schwer löslich und scheidet sich aus der eingeengten Lösung als weiße Masse ab, in der man unter dem Mikroskop hauptsächlich kuglige Aggregate von äusserst feinen Kriställchen sieht.

Das Oxalat ist im Gegensatz zu den vorhergenannten Salzen in kaltem Wasser ziemlich schwer löslich. Fügt man also zu der konzentrierten wässerigen Lösung der Base eine starke wässerige Lösung von Oxalsäure, so fällt nach einiger Zeit, besonders beim Reiben, das Salz als weiße kristallinische Masse, die aus mikroskopischen Nadeln oder Prismen besteht.

Bringt man den Ester in alkoholischer Lösung mit Pikrinsäure zusammen und fügt Äther hinzu, so fällt nach einiger Zeit das Pikrat in sehr kleinen, gelben, spitzen Kriställchen, die aber meist zu dichten kugligen Aggregaten von undeutlich kristallinischem Gefüge vereinigt sind.

Phosphorwolframsäure erzeugt in der sauren wässerigen Lösung des Esters einen dichten weißen Niederschlag, der in überschüssigen Mineralsäuren nicht löslich ist und beim Kochen der Flüssigkeit schmilzt.

Vergleich des Cystins aus Roßhaar und aus Stein.

Das Haarcystin war in der üblichen Weise durch Hydrolyse mit Salzsäure dargestellt und sorgfältig nicht allein von Tyrosin, sondern auch von racemischem Cystin befreit. Das Cystin aus Stein wurde durch Lösen in Ammoniak und durch Fällen mit Essigsäure oder auch durch Verdunsten der ammoniakalischen Lösung kristallisiert. In allen Fällen erhielten wir nur die

bekanntem charakteristischen mikroskopischen sechsseitigen Formen, aber keine Nadeln, und das Präparat aus Stein gab auch mit Millons Reagens nicht die rote Färbung des Tyrosins. Dieselbe Übereinstimmung zeigte die optische Untersuchung.

I. 0,3172 g Haarcystin in 11,9228 g Normalsalzsäure gelöst. Spezifisches Gewicht der Lösung 1,029. Drehung bei 20° und Natriumlicht im 2 dm-Rohr 11,84° nach links.

II. 0,3176 g Steincystin in 16,3975 g Normalsalzsäure gelöst. Spezifisches Gewicht der Lösung 1,024. Drehung bei 20° und Natriumlicht im 2 dm-Rohr 8,70° nach links.

	Haarcystin	Steincystin
$[\alpha]_D^{20^\circ}$	— 221,9	— 223,6

Diese Zahlen stimmen mit dem Wert¹⁾ von Mörner — 223 bis 224,3° ziemlich gut überein. Die kleine Differenz könnte durch die Temperatur und die verschiedene Konzentration der Salzsäure bedingt sein.

Eine ähnliche Übereinstimmung zeigte sich bei dem salzsauren Dimethylester. Das Präparat aus Cystinstein wurde genau so dargestellt, wie es für Haarcystin vorher beschrieben ist. Der Schmelz- und Zersetzungspunkt war genau derselbe wie bei dem Präparate aus Haarcystin. Ebenso gab die optische Untersuchung eine befriedigende Übereinstimmung.

0,147 g salzsaurem Dimethylester aus Steincystin war gelöst in 3,9953 g Methylalkohol. Die Lösung hatte bei 20° das spezifische Gewicht 0,8116 und drehte in 1 dm-Rohr 1,07° nach links.

$$\text{Mithin } [\alpha]_D^{20^\circ} = - 37,2^\circ,$$

während für das Präparat aus Haarcystin — 38,0° gefunden war (s. oben).

Nach diesen Beobachtungen können wir nicht daran zweifeln, daß die von uns untersuchten Präparate aus Roßhaar und aus Stein identisch sind. Zum gleichen Schluß ist kürzlich Rothera gelangt.²⁾ Er fand ebenfalls für Cystin aus Stein und Haar im Aussehen der Kristalle, im physiologischen Verhalten und in der spezifischen Drehung der salzsauren Lösung keinen Unterschied. Leider sind aber seine Angaben über die spezifische Drehung nicht ganz einwandfrei. Wir wollen davon absehen,

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXVIII, S. 604 und Bd. XXXIV, S. 207.

²⁾ C. H. Rothera. Journal of Physiology. Bd. XXXII, S. 177.

daß die Berechnung seiner Werte eine doppelt so große spezifische Drehung ergibt, als die von ihm mitgeteilte Zahl, weil hier wahrscheinlich ein Druckfehler vorliegt. Aber die von ihm angegebene spezifische Drehung der salzsauren Lösung

$$[\alpha]_D = \begin{array}{l} - 252.2^\circ \text{ für Steincystin} \\ - 251.1^\circ \text{ » Haarcystin} \end{array}$$

weicht erheblich ab von dem Werte, den K. A. H. Mörner festgestellt hat, und den wir bestätigen konnten. Ob das an dem Präparate Rotheras oder der Konzentration der Salzsäure oder an der Ausführung der Beobachtung liegt, entzieht sich unserem Urteile.

Was nun die Beobachtungen von Neuberg und Mayer¹⁾ betrifft; so haben sie zum Schlusse geführt, daß manche Cystinsteine neben Proteincystin in wechselnden Verhältnissen eine isomere Verbindung enthalten, die in Nadeln kristallisiert, eine geringere spezifische Drehung (in salzsaurer Lösung — 206°), andere Löslichkeitsverhältnisse besitzt und auch Derivate von abweichenden Eigenschaften liefert. Obschon es bei den bestimmten und ausführlichen Angaben der Herren Neuberg und Mayer sehr gewagt erscheinen muß, die Existenz dieser Verbindung in Zweifel zu stellen, wenn man nicht Gelegenheit gehabt hat, eine ganze Reihe von Cystinsteinen zu untersuchen, so glauben wir doch eine Beobachtung anführen zu müssen, die für die Beurteilung der Frage nicht ganz gleichgültig sein dürfte. Von Herrn Prof. Gabriel erhielten wir eine kleine Probe des Steincystins, das ihm Herr Neuberg zum Vergleich mit dem synthetisch bereiteten Isocystin übergeben hat, und das zum Teil aus den als charakteristisch angesehenen Nadeln besteht.²⁾ Dieses Präparat zeigt nun, wie wir gefunden haben, mit Millons Reagens eine starke Rotfärbung, wie sie dem Tyrosin eigentümlich ist, dem reinen gewöhnlichen Cystin aber gänzlich fehlt. Wir halten es deshalb für sehr wahrscheinlich, daß es außer Cystin auch Tyrosin enthält, obschon die geringe Menge des uns zur Verfügung stehenden Materials eine Isolierung des letzteren nicht gestattete.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLIV, S. 472.

²⁾ Neuberg und Mayer, Diese Zeitschrift, Bd. XLIV, S. 478, 479.

Über das Vorkommen von Tyrosin in Cystinsteinen liegt unseres Wissens bisher keine Beobachtung vor, und wir sind auch weit davon entfernt, für alle Cystinsteine einen solchen Gehalt anzunehmen, denn der einzige Stein, den wir untersuchen konnten, gibt Millons Reaktion gar nicht. Er gehört aber auch nach den Kristallisationsproben zu den Steinen, die nach Neuberg und Mayer nur aus Proteincystin bestehen. Dagegen vermuten wir, daß Millons Probe positiv ausfallen wird bei den Präparaten, die das in Nadeln kristallisierende sog. Steincystin enthalten, und wir können uns nicht verhehlen, daß ein etwaiger Tyrosingehalt in den Präparaten der Herren Neuberg und Mayer manche Beobachtungen dieser Herren auch ohne die Annahme eines besonderen «Steincystins» erklären würde.

Was endlich das gleichzeitige Auftreten von Cystin und Tyrosin im Harn betrifft, so freuen wir uns, eine Erfahrung der Herren Abderhalden und Schittenhelm mit deren Erlaubnis hier anführen zu können, die als Bestätigung unserer Beobachtung gelten kann. Sie fanden nämlich in dem Harn eines Cystinurikers eine erhebliche Menge von Tyrosin.