

Über Cystin.

Von
J. Mauthner.

Aus dem chemischen Laboratorium der Allgemeinen Poliklinik in Wien.
(Der Redaktion zugegangen am 16. März 1912.)

Das Cystin, das zu den im folgenden mitgeteilten Versuchen diente, stammt von einem Cystinuriker, dessen Harn mir Herr Prof. Dr. A. Ritter von Frisch in dankenswerter Bereitwilligkeit zur Verfügung gestellt hat. Es handelte sich um einen jungen Mann, an dem wegen Steinbildung eine Lithotripsie und drei Nephrotomien an einer Niere vorgenommen werden mußten. Der Fall ist kürzlich von Dr. Achilles Müller-Basel beschrieben worden.¹⁾

Aus dem Harn wurde das Cystin als Kupfersalz abgeschieden.²⁾ Der nicht filtrierte Harn wurde mit Essigsäure angesäuert und pro Liter mit je 10 ccm Barfoedschem Reagens (60 g Kupferacetat, 10 ccm Eisessig auf 1000 Wasser) versetzt und 24 Stunden stehen gelassen. Der blaue Niederschlag, der noch das Harnsediment aus Leukocyten, Epithelzellen usw. enthielt, wurde abfiltriert, mit Wasser zweimal gewaschen, vom Filter genommen und mit Salzsäure behandelt. Da sich die salzsaure Lösung von den darin suspendierten organischen Resten nur äußerst schwer durch Filtration trennen ließ, wurde sie zunächst geklärt, indem etwas Ferrocyankalium hinzugefügt wurde. Das ausfallende Ferrocyan Kupfer bewirkte eine bessere Filtrierbarkeit; das Filtrat und die salzsauren Waschflüssigkeiten wurden vereinigt, mit etwas Kupferacetat versetzt, hierauf mit essigsauerm Natrium gefällt. Die so erhaltenen Mengen von Cystinkupfer entsprachen einem Gehalt

¹⁾ Wiener med. Wochenschr. 1911. Nr. 37 u. 38.

²⁾ Zeitschr. für Biol., Bd. 42, S. 176 (1901).

von 0,3 bis 0,46 g Cystin pro Liter Harn. Eine quantitative Gewinnung des Cystins ist mit diesem Verfahren allerdings nicht verbunden, es gestattet aber die Abscheidung seiner Hauptmenge auf einfachem Wege.

Aus der Kupferverbindung wurde durch Auflösen in Salzsäure, Fällern mit Schwefelwasserstoff, Eindampfen der Flüssigkeit auf ein kleines Volumen, Behandeln mit Jodtinktur zur Oxydation des durch den Schwefelwasserstoff gebildeten Cysteins,¹⁾ Fällern mit Natriumacetat und gründliches Waschen mit Wasser das Cystin gewonnen.

Die Analyse und die Bestimmung des Drehungsvermögens zeigten, daß das Produkt rein war.

0,3141 g gaben 0,6062 g Baryumsulfat; für 100 Teile:

Berechnet:	Gefunden:
26,69	26,50

Die Bestimmung der spezifischen Drehung ergab bei Anwendung einer Lösung in Salzsäure von 11,2 g HCl in 100 ccm:

$$\begin{aligned} c &= 1,9656 \\ l &= 2 \\ t &= 21,5^{\circ} \text{ C} \\ \alpha &= -8,07^{\circ} \\ [\alpha]_{\text{D}} &= -205,28^{\circ} \end{aligned}$$

Dies steht mit meiner ersten Bestimmung²⁾ bei Anwendung von Salzsäure gleicher Konzentration ($-205,88^{\circ}$) in genügender Übereinstimmung.

Das gewonnene Cystin diene zu Versuchen über eine Methode der Entschwefelung und über die Einwirkung von Cyankalium.

I.

Entschwefelung.

Der im folgenden beschriebene Versuch wurde durch die bereits mitgeteilte Beobachtung veranlaßt, daß eine am-

¹⁾ Zeitschr. für Biol., Bd. 42, S. 184 (1901).

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 7, S. 225 (1883). Die höheren Zahlen für das Drehungsvermögen, die von K. A. H. Mörner, E. Fischer und N. Suzuki, E. Abderhalden gefunden wurden, sind wahrscheinlich durch die Verwendung verdünnterer Salzsäure als Lösungsmittel bedingt.

moniakalische Lösung von Cystinkupfer schon bei gewöhnlicher Temperatur Schwefelkupfer abscheidet.¹⁾ Es ließ sich erwarten, daß es auf diesem oder einem ähnlichen Wege gelingen könnte, das Cystin glatt in Alanin überzuführen. Auf anderem Wege, durch Erhitzen von salzsaurem Cystein in Wasser auf 140—145°, hat seither schon K. A. H. Mörner²⁾ *r*-Alanin neben α -Thiomilchsäure, etwas β -Thiomilchsäure, Schwefelwasserstoff und Ammoniak erhalten. Nichtsdestoweniger schien mir die Vornahme weiterer Versuche in der angedeuteten Richtung wünschenswert; ein positives Ergebnis, d. i. eine glatte Überführung von Cystin in *d*-Alanin wäre ein weiterer Beitrag zur Kenntnis der Beziehungen, die zwischen den Eiweißspaltprodukten untereinander bestehen. Es braucht hier nur auf die Arbeiten von E. Fischer hingewiesen zu werden und auf die Anschauungen, die Abderhalden zum Ausdruck bringt, indem er die Glycerose mit Serin, Cystein, Alanin und Milchsäure in genetische Beziehungen setzt.³⁾

Das Ergebnis des Versuches entsprach den Erwartungen nur zum Teil: es konnte wohl α -Aminopropionsäure in nicht unerheblicher Menge gewonnen werden, allein sie war inaktiv: es war also durch den Prozeß Racemisierung herbeigeführt worden.

Vorversuche hatten gezeigt, daß eine Lösung von Cystin in starkem Ammoniak; in die Zinkstaub eingetragen war, schon nach 24 Stunden Bleioxyd zu schwärzen vermag. Entfernt man den so nachweisbaren Schwefel, indem man mit Bleioxyd durchschüttelt und absetzen läßt, so zeigt nach 1—2 Tagen eine abgehobene Probe neuerdings Schwärzung mit Bleioxyd; der Prozeß geht also ganz allmählich vor sich. Es wurde nun in folgender Weise verfahren:

10 g Cystin wurden in 400 ccm Ammoniak (spez. G. 0,91) gelöst und die Lösung einige Zeit mit Zinkstaub stehen gelassen. Dann wurde sie häufig mit je 2 g Bleioxyd (pro analysi

¹⁾ Zeitschr. für Biol., Bd. 42, S. 178 (1901).

²⁾ Diese Zeitschrift., Bd. 42, S. 349 (1904).

³⁾ Lehrb. d. physiolog. Chemie, 1906, S. 62 u. 330.

Merck) und hierauf mit einer geringen Menge von frischem Zinkstaub durchgeschüttelt: dies wurde wiederholt, bis in einer abpipettierten Probe eine Schwärzung oder Bräunung von Bleioxyd nicht mehr zu bemerken war. Dies war nach 2 Monaten erreicht. Die filtrierte Lösung wurde nun eingedampft, der Rückstand in Wasser aufgenommen und zur Entfernung von Ammoniak mit Bleiglätte gekocht (wobei keine Bildung von Schwefelblei mehr eintrat), filtriert und mit Schwefelwasserstoff entbleit.

Beim Eindampfen hinterließ die Lösung einen nahezu farblosen, krystallisierten Rückstand, der in wenig Wasser gelöst wurde. Durch Zusatz des mehrfachen Volumens absoluten Alkohols wurde die Substanz, die sich als α -Alanin erwies, in der Form farbloser Nadeln gewonnen.

Die Ausbeute an Alanin betrug 3,05 g, d. i. 41% der theoretischen Menge.

Durch Auflösen in Wasser und Eindampfen auf ein kleines Volumen wurde die Substanz nochmals umkrystallisiert und dann analysiert.

Es wurden folgende Zahlen erhalten:

I. 0,2111 g gaben 0,154 g Wasser und 0,3137 g Kohlensäure:

II. 0,2058 g gaben 28,5 ccm Stickstoff bei 22° C. und 762 mm Druck.

In 100 Teilen:

Berechnet für $C_3H_7NO_2$ (89,08):	Gefunden:
C = 40,41	40,53
H = 7,94	8,18
N = 15,73	15,78

Aus der Mutterlauge der analysierten Krystalle wurde durch Behandeln mit Kupferhydroxyd das dunkelblaue Kupfersalz gewonnen. Die Analyse dieser Verbindung ergab:

I. 0,3215 g gaben 0,1584 g Wasser und 0,3276 g Kohlensäure;

II. 0,2112 g gaben 0,0645 g Kupferoxyd.

In 100 Teilen:

Berechnet für $C_6H_{12}CuN_2O_4 + H_2O$ (257,76):	Gefunden:
C = 27,93	27,79
H = 5,49	5,52
Cu = 24,67	24,40

Das gewonnene Alanin ist inaktiv: eine Lösung, die in 15,3967 g 1,1181 g des Chlorhydrates¹⁾ enthielt, zeigte im 2 dm-Rohr keine Drehung. Im Verlaufe der Reaktion tritt also Racemisierung ein.

II.

Einwirkung von Cyankalium.

Zu den folgenden Versuchen führte die Beobachtung, daß das Cystin ebenso wie durch Schwefelwasserstoff und durch schwellige Säure²⁾ auch durch Cyankalium in der Art verändert wird, daß das Drehungsvermögen rasch sinkt. Cystin löst sich in wässriger Cyankaliumlösung leicht auf, die Lösung zeigt sofort schöne Nitroprussidreaktion³⁾ und die optische Aktivität nimmt ab, so daß die Drehung nach 4 Stunden etwa ein Viertel der anfänglichen beträgt. Es kann nicht daran gezweifelt werden, daß dabei das Cystin in Cystein übergeht. Es handelte sich nun darum, zu ermitteln, welche weiteren Veränderungen mit dem Cystin resp. Cystein durch die Einwirkung des Cyankaliums vor sich gehen.

Schon wiederholt wurde die Wechselwirkung von Cystin und Cyanalkali untersucht, doch hatten die in Betracht kommenden Arbeiten andere Ziele als die Isolierung von Verbindungen, die etwa dabei entstehen könnten. Die Arbeiten von S. Lang⁴⁾ und W. Pascheles⁵⁾ sowie jene von J. Hebting⁶⁾ befassen sich mit der Frage der Entgiftung von Cyanverbindungen durch schwefelhaltige Stoffe, darunter auch Cystin und Cystein,

¹⁾ S. E. Fischer, B. 39, S. 464 (1906).

²⁾ Zeitschr. für Biol., Bd. 42, S. 184 (1901).

³⁾ K. A. H. Mörner, Diese Zeitschrift, Bd. 28; S. 611 (1899).

⁴⁾ Arch. f. exp. Path. u. Pharm., Bd. 34, S. 247 (1894). Bd. 36, S. 75 (1895).

⁵⁾ Arch. f. exp. Path. u. Pharm., Bd. 34, S. 281 (1894).

⁶⁾ Bioch. Zeitschr., Bd. 28, S. 208 (1910). Hier findet sich auch weitere Literatur angeführt.

während die Untersuchungen von A. P. Mathews und Sydney Walker¹⁾ die spontane Oxydation des Cysteins zu Cystin und deren Beeinflussung durch Cyanide zum Gegenstand haben.

Bei meinen Versuchen ergab sich, daß das Cystin durch Aufnahme von Cyan in eine neue Verbindung: 1- α -Amino- β -rhodanpropionsäure übergeht.

Eine Lösung, die in 44 ccm Wasser 1 g Cystin und 1,6248 g Cyankalium enthielt (d. i. für 1 Mol. Cystin 6 Mol. des Cyanids) wurde 8 Wochen lang bei Zimmertemperatur stehen gelassen, dann mit Essigsäure angesäuert und durch Destillation von der überschüssigen Blausäure befreit, eingedampft, der Rückstand mit Wasser, worin er sich klar löste, aufgenommen und mit Barfoedschem Reagens gefällt. Der reichliche graugrüne, krystallinische Niederschlag wurde abfiltriert, gewaschen, in verdünnter Salzsäure gelöst, die Lösung von braunen Flocken abfiltriert und mit Natriumacetat versetzt. Das Kupfersalz schied sich dabei in der Form von mikroskopischen, zum Teil zu Rosetten vereinigten Blättchen aus, die in trockenem Zustande ein blaues, lockeres Pulver im Gewichte von 0,8 g bildeten. Dies entspricht nach der später mitzuteilenden Analyse einer Ausbeute im Betrage von 51% der theoretischen Menge (d. i. bei der Annahme, daß alles Cystin in die neue Verbindung übergeht). Ein zweiter, mit 5 g Cystin in analoger Weise angestellter Versuch, bei dem die Mischung nur 24 Tage stehen blieb, gab eine wesentlich geringere Ausbeute, 33,8% der berechneten Menge.

Das nahezu unlösliche Kupfersalz wurde in Wasser verteilt und mit Schwefelwasserstoff zerlegt, das kolloidal verteilte Schwefelkupfer durch Ansäuern mit Essigsäure und Eindampfen zur flockigen Abscheidung gebracht und abfiltriert. Beim weiteren Eindampfen der Lösung wurde die Aminosäure krystallisiert gewonnen.

Sie scheidet sich beim raschen Abkühlen der konzentrierten Lösung zum Teil in sechseckigen, dem Cystin ähnlichen Täfelchen, zum Teil in flachen Prismen aus. Beim langsamen Krystallisieren bildet sie kurze, dicke, glasglänzende Prismen.

¹⁾ Journ. of biol. Chemistry VI, S. 21, 289 (1909).

Sie ist in kaltem Wasser etwas schwerer, in heißem leicht löslich, so daß sie sich gut daraus umkrystallisieren läßt. Die Krystalle enthalten 1 Mol. Krystallwasser, das bei 100° leicht abgegeben wird.

Die Analyse ergab folgende Zahlen:

1. 0,2204 g gaben 0,024 g Gewichtsverlust
2. 0,2115 g 0,023 g
3. 0,2192 g 0,0236 g

In 100 Teilen:

Berechnet für:	Gefunden:		
$C_4H_6N_2SO_2 + H_2O$	1.	2.	3.
$H_2O = 10,98$	10,89	10,87	10,77

Die Analyse der wasserfreien Substanz ergab:

I. 0,1964 g gaben 0,0701 g Wasser und 0,2381 g Kohlensäure:

II. 0,1867 g gaben 31,7 ccm Stickstoff bei 18,5° C. und 746 mm Druck:

III. 0,1936 g gaben 0,3059 g Baryumsulfat.

In 100 Teilen:

Berechnet für $C_4H_6N_2SO_2$ (146,15):	Gefunden:
C = 32,84	33,06
H = 4,15	3,99
N = 19,17	19,24
S = 21,94	21,72

Die neue Aminosäure ist optisch aktiv und zwar in salzsaurer Lösung linksdrehend. Es ergaben sich für eine Lösung in 2%iger Salzsäure folgende Zahlen:

$$c = 3,096$$

$$l = 2$$

$$t = 18^\circ$$

$$\alpha = -5,15^\circ$$

$$[\alpha]_D^{18} = -83,17^\circ$$

Nach 24 Stunden war die Drehung unverändert.

Erhitzt man die Aminosäure im Kapillarrohr, so tritt bei ca. 180° eine immer zunehmende Bräunung, gegen 220° rasche Zersetzung unter starker Gasentwicklung ein.

Die wässrige Lösung der α -Amino- β -rhodanpropionsäure gibt mit Kupferacetat das schon erwähnte Kupfersalz: dieses zeigt, wenn es sich rasch ausscheidet, wie bei der Fällung in der Kälte die schon erwähnte Form von kleinen Blättchen, bei langsamer Ausscheidung und beim Fällen aus heißer Lösung kleine Nadeln. Die ersteren haben gehäuft eine blaue Farbe, in frischem Zustande mit einem Stich ins Violette, die letzteren eine grünlich-blaue Farbe. Die Blättchen stellen eine labile, die Nadeln die stabile Form vor. Dieses Verhalten erinnert an das des Glykokollkupfers, das ebenfalls in zwei Formen auftritt, von denen die labile Blätter, die stabile Nadeln bildet.¹⁾

Das Kupfersalz der l - α -Amino- β -rhodanpropionsäure enthält Krystallwasser, das bei 100° nur langsam entweicht. Es wurden bei der Bestimmung des Gewichtsverlustes etwas zu geringe Zahlen gefunden: vielleicht ist das Krystallwasser nur einer der beiden Formen eigentümlich und, da meist beide nebeneinander erhalten werden, der Fehler darin begründet.

Es gaben:

1. 0,2210 g	0,0088 g Gewichtsverlust:
2. 0,2045 g	0,0084 g

In 100 Teilen:

Berechnet für $C_8H_{10}N_4S_2O_4Cu + H_2O$:	Gefunden:	
$H_2O = 4,85$	3,98	4,11

Das wasserfreie Salz lieferte folgende Zahlen:

I. 0,1961 g gaben 0,0486 g Wasser, 0,1946 g Kohlensäure und 0,0441 g Kupferoxyd;

II. 0,2116 g gaben 29,5 ccm Stickstoff bei $18^\circ C$. und 741,5 mm Druck:

III. 0,2089 g gaben 0,2762 g Baryumsulfat.

In 100 Teilen

Berechnet für $(C_4H_5N_2SO_2)_2Cu$ (353,85):	Gefunden:	
C = 27,13	27,06	
H = 2,85	2,77	
N = 15,84	15,73	
S = 18,12	18,17	
Cu = 17,97	18,20	

¹⁾ Mauthner u. Suida, Monatshefte. Bd. 41. S. 375 (1890).

Auch mit Kupfersulfat gibt die wässrige Lösung der Aminosäure einen schön blauen, krystallinischen Niederschlag; mit Bleiacetat tritt keine Fällung ein. Quecksilberoxydacetat gibt starken, weißen, krystallinischen Niederschlag, Eisenchlorid gibt starke Dunkelgelbfärbung.

Mit alkalischer Bleilösung tritt erst nach längerem Erhitzen Bildung von Schwefelblei ein; Nitroprussidnatrium gibt keine sichtbare Veränderung. Mit Salzsäure liefert die Aminosäure ein in langen Prismen und Nadeln krystallisierendes, in Wasser sehr leicht lösliches Salz von der Zusammensetzung: $C_4H_6N_2SO_2 \cdot HCl$.

Die Chlorbestimmung ergab:

0,1038 g gaben 0,0749 g Chlorsilber und 0,0048 g Silber;
in 100 Teilen

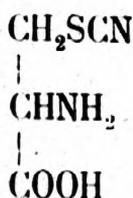
Berechnet:

Cl = 19,42

Gefunden:

19,37.

Es dürfte wohl keinem Zweifel unterliegen, daß der neuen Verbindung die Formel



(in der gewöhnlichen Schreibweise) zu geben ist.

Über den Verlauf der Reaktion scheinen mir noch weitere Versuche erforderlich, mit denen ich beschäftigt bin.