

## Über einige Nitroderivate von Proteinen.

Von

A. Kossel und F. Weiss.

Die Untersuchungen über die Einwirkung von Salpetersäure auf Protamine haben zu dem Ergebnis geführt, daß die Nitrogruppe leicht in das Molekül des Clupeins, des Salmis und des Sturins eingeführt werden kann und daß hierbei Produkte von sauren Eigenschaften entstehen, welche bei der Hydrolyse ein Nitroderivat des Arginins liefern.<sup>1)</sup> Es schien uns wünschenswert, unsere Untersuchungen auf diesem Gebiet nach zwei Richtungen fortzuführen. Zunächst erhob sich die Frage, ob diese an den niederen und argininreichen Proteinen erhaltenen Reaktionen bei den höheren typischen Eiweißkörpern in ähnlicher Weise verlaufen, und weiterhin bedurfte der Ort des Eintritts der Nitrogruppe in das intraprotein gebundene Arginin noch einer genaueren Feststellung. Für die letztere Untersuchung bot sich eine Möglichkeit in dem Verhalten dieser Nitroprodukte zu Natronlauge. Bei der Einwirkung dieses Reagens trat eine Umsetzung ein, welche nicht nur über die Stellung der NO<sub>2</sub>-Gruppe gewisse Aufklärungen gab, sondern auch gleichzeitig eine quantitative Bestimmung der in den Guanidinrest eingetretenen Nitrogruppe gestattete.

### I.

**Nitroprodukt aus Histon.** Die Nitrierung wurde in kleinen Portionen vorgenommen: Ein Gramm Histon wird mit 10 ccm konzentrierter Schwefelsäure unter Zusatz von 5 ccm rauchender Schwefelsäure sorgfältig verrieben. Man setzt so-

<sup>1)</sup> A. Kossel und E. L. Kennaway, Diese Zeitschr., Bd. 72 (1911), S. 486. — E. Wechsler, Diese Zeitschr., Bd. 78 (1912), S. 53. — A. Kossel und F. Weiss, Diese Zeitschr., Bd. 78 (1912), S. 402.

dann 2,5 ccm rauchender Salpetersäure unter starker Kühlung hinzu und läßt das Gemisch eine Viertelstunde bei Zimmertemperatur stehen. Hierauf gießt man die Flüssigkeit in Eiswasser. Es bildet sich ein weißer Niederschlag; derselbe wird nach einigen Stunden abgesaugt, mit Wasser gewaschen und sodann in sehr verdünnter Natronlauge gelöst. Die filtrierte Lösung wird mit Schwefelsäure gefällt, durch Dekantieren ausgewaschen und endlich mit Alkohol und Äther getrocknet. Das trockene Produkt stellte ein hellbräunliches Pulver dar, die Ausbeute betrug 60—70% des Ausgangsmaterials.

Zur Prüfung auf Nitroarginin wurde 7,5 g des nitrierten Histons mit einer Mischung von 45 g konzentrierter Schwefelsäure und 90 g Wasser 14 Stunden gekocht. Die Reaktionsflüssigkeit wurde in bekannter Weise auf die Argininfraction verarbeitet. Aus dieser Fraktion wurde 0,02 g Nitroarginin nach dem Umkrystallisieren in reinem Zustand mit dem Schmelzpunkt 229° gewonnen, daneben war eine geringe Menge nicht nitrierten Arginins nachweisbar.

Nitroprodukt aus Edestin. Die Einwirkung der Salpetersäure verläuft beim Edestin glatter wie beim Histon. Zur Darstellung des Nitroproduktes wurden 5 g Edestin mit 25 ccm konzentrierter und 15 ccm rauchender Schwefelsäure sorgfältig angerührt und sodann unter Abkühlung 8 ccm rauchender Salpetersäure hinzugefügt. Nach 5 Minuten wurde die Flüssigkeit in ein Liter Eiswasser gegossen. Es entstand ein weißer Niederschlag, der mit Wasser gewaschen und mit Alkohol und Äther getrocknet wurde (Präp. A). Zur Reinigung wurde er sodann in 1%iger Natronlauge gelöst, filtriert, mit sehr verdünnter Schwefelsäure ausgefällt, mit Wasser ausgewaschen und von neuem mit Alkohol und Äther getrocknet (Präp. B). Ausbeute 5 g.

Das nicht umgelöste Präp. A ist ein weißes Pulver mit leichtem Stich ins Gelbliche, die aus Natronlauge umgelöste Substanz B besitzt eine ausgesprochen gelbe Farbe. Die Stickstoffbestimmung ergab bei beiden Präparaten die gleichen Zahlen:

Präparat A. 0,1782 g Substanz: 27,2 ccm Stickstoff (17°; 765 mm) d. i. 17,68% N.

Präparat B. 0,1536 g Substanz: 23,3 ccm N (14,5°: 755 mm) d. i. 17,64% N.

Zur Spaltung wurden 40 g des Nitroproduktes (Präp. A) mit einem Gemisch der dreifachen Gewichtsmenge konzentrierter Schwefelsäure und der sechsfachen Menge Wasser 14 Stunden am Rückflußkühler gekocht. Die Reaktionsflüssigkeit, welche nach der Entfernung der Huminsubstanzen intensive Gelbfärbung zeigte, wurde mit Hilfe des Baryt-Silberverfahrens verarbeitet. Das Nitroarginin fand sich diesmal in der Histidinfraktion vor. Nach wiederholtem Umkrystallisieren wurde es in einer Menge von 0,8 g rein erhalten. Es schmolz scharf bei 229° unkor. (Nitrobestimmung siehe unten). Die Argininfraktion enthielt kein Nitroarginin und etwa den zehnten Teil des im Edestin enthaltenen Arginins im nicht nitrierten Zustand.

Es ergibt sich somit, daß die Arginingruppe im Molekül der höheren Proteine der Nitrierung ebenso zugänglich ist, wie bei den Protaminen.

## II.

Die Amidgruppe des Arginins ist, wie frühere Untersuchungen aus dem hiesigen Institut ergeben haben, in gewissen Proteinen und speziell in den Protaminen in freiem Zustand vorhanden und läßt sich durch die Einwirkung von Alkalien aus ihnen abspalten; hierbei entsteht ein Proteinderivat, welches bei der Hydrolyse an Stelle von Arginin Ornithin liefert. Ein analoger Prozeß geht bei den Nitroderivaten der Proteine vor sich und läßt sich in diesen Fällen leicht verfolgen, weil er von einer Gasentwicklung begleitet ist.

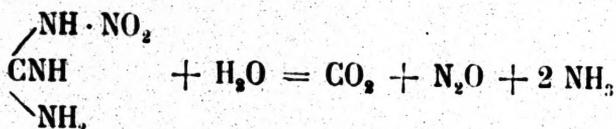
Läßt man ein Dezigramm des nitrierten Clupeins<sup>1)</sup> («Nitroclupein») in einer annähernd normalen Natronlauge gelöst bei Brütotemperatur in einem Gärungsröhrchen stehen, so beobachtet man eine Gasentwicklung, welche nach 24 Stunden beendet ist. Ebenso verhält sich Nitroarginin, ferner die Produkte, welche beim Nitrieren des Sturins<sup>2)</sup> und des Edestins<sup>3)</sup> erhalten werden. Thiele, welcher einen analogen Vorgang

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 72, S. 486 (1911).

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 78, S. 409 (1912).

<sup>3)</sup> Siehe oben.

beim Nitroguanidin beobachtete,<sup>1)</sup> nimmt an, daß diese Reaktion nach folgender Gleichung verläuft:



Beim Nitroarginin und bei den von uns untersuchten Nitroderivaten der Protamine konnten wir nachweisen, daß das durch Natronlauge entwickelte Gas Stickoxydul ist und daß daneben Ammoniak entsteht. Ließen wir anstatt Natronlauge Barythydrat auf «Nitroclupein» einwirken, so erhielten wir außerdem einen reichlichen Niederschlag von Baryumcarbonat. Ferner entstand bei dieser Reaktion aus dem «Nitroclupein» ein protonartiger Körper, welcher bei der Hydrolyse an Stelle des Arginins Ornithin lieferte.

Für diesen Versuch wurden 2 g des nitrierten Clupeins 24 Stunden mit 50 ccm Normalnatronlauge bei 38° digeriert, die Lösung sodann neutralisiert und mit Natriumpikrat unter Zusatz von wässriger Pikrinsäure ausgefällt. Das als klebriger Niederschlag ausgeschiedene Pikrat wurde in Aceton gelöst und mit Schwefelsäure als Sulfat abgeschieden, das Sulfat in Wasser gelöst und mit Alkohol gefällt. Dieser Körper gab starke Biuretreaktion, seine Menge betrug 0,8 g. Die Substanz wurde durch 12stündiges Kochen mit starker wässriger Schwefelsäure hydrolysiert und das Reaktionsgemisch mit dem Silber-Baryt-Verfahren aufgeteilt. Es enthielt kaum Spuren von Arginin. Die durch Silbersulfat und Baryt nicht fällbare Fraktion gab mit Phosphorwolframsäure einen langsam entstehenden Niederschlag, welcher in bekannter Weise zerlegt wurde. Aus ihm wurden 0,22 g eines gut krystallisierten Platinsalzes dargestellt, welches die Eigenschaften des Ornithinplatinchlorids zeigte. Die Platinbestimmung ergab folgendes:

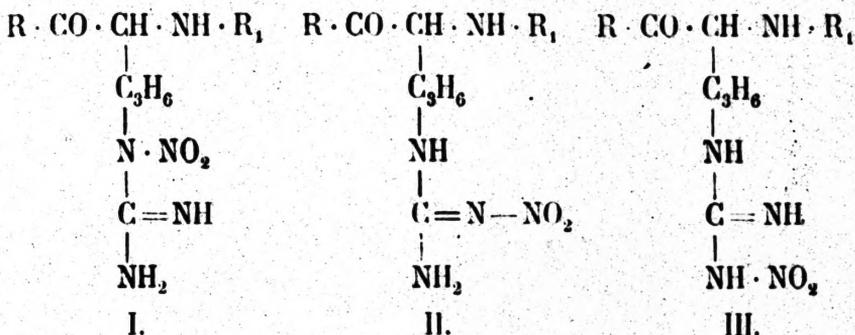
Berechnet für  $\text{C}_5\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2 \cdot \text{H}_2\text{PtCl}_6$ : 36,0% Pt

Gefunden: 36,1% Pt.

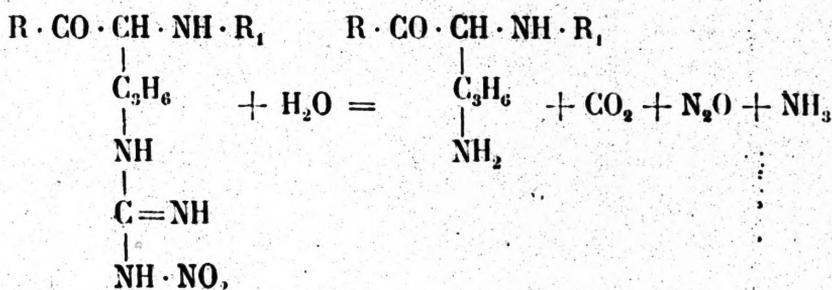
Die Analogie dieser Reaktion mit der von Thiele angenommenen Umsetzung des Nitroguanidins durch Alkalien ist

<sup>1)</sup> Thiele, Liebigs Annalen, Bd. 270, S. 18 (1892).

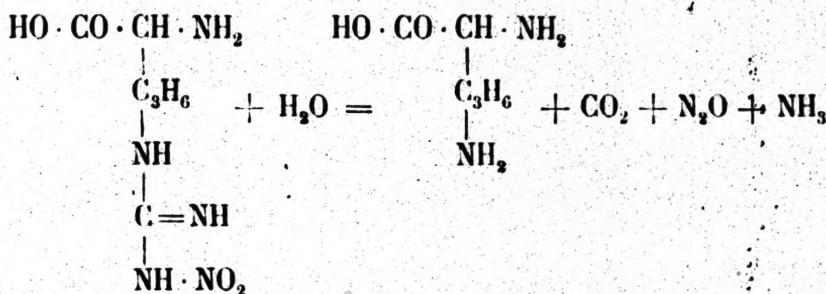
unverkennbar. Man kann sich den Eintritt der Nitrogruppe in den Argininrest der Proteine nach folgenden Formeln vorstellen:



Die durch obigen Versuch erwiesene Entstehung eines Ornithinderivats unter gleichzeitiger Bildung von Stickoxydul schließt die Formel I aus, es muß also entweder der im Guanidin doppelt gebundene Stickstoff (Formel II) oder die Amidogruppe (Formel III) Träger der Nitrogruppe sein. Nach der Analogie des Nitroguanidins ist die letztere Annahme wahrscheinlicher. Unter dieser Voraussetzung ist die Reaktion, welche bei Einwirkung von Alkalien auf die nitrierten Proteine eintritt, durch folgende Formelgleichung darzustellen:



Für das Nitroarginin würde sich die Reaktion folgendermaßen gestalten:



## III.

Da diese Reaktion einen ziemlich glatten Verlauf zu nehmen schien, haben wir einige Versuche angestellt, um die Natur und Menge des entwickelten Gases zu prüfen. Es zeigte sich, daß das Gas aus Stickoxydul bestand und daß seine Menge beim Nitroguanidin und Nitroarginin mit der angenommenen Reaktionsgleichung befriedigend übereinstimmte.

Diese Untersuchung wurde in der Weise ausgeführt, daß wir die Natronlauge im Vakuum auf eine abgewogene Menge des Nitroprodukts einwirken ließen, das entwickelte Gas sammeln, maßen und analysierten. Für die Versuche diente eine Quecksilberpumpe, wie sie zur Blutgasanalyse benutzt wird, und zwar stand uns die von Barcroft konstruierte Vorrichtung zur Verfügung. Wir brachten 0,1 g Nitroarginin und 1,5 g Natronhydrat, jedes für sich in einem dünnwandigen, einerseits offenen Platin- oder Glasröhrchen in den Rezipienten und stellten sodann das Vakuum her. Hierauf ließen wir etwa 14 ccm ausgekochtes Wasser in das Vakuum einströmen und leiteten dadurch die Reaktion ein. Um eine vorzeitige Verdunstung des Wassers zu vermeiden, schlossen wir den Hahn zwischen dem Rezipienten und den übrigen Teilen des Apparates und tauchten sodann den Rezipienten in ein Wasserbad, dessen Temperatur andauernd auf 38° erhalten wurde. Nach 24 Stunden wurde der Hahn zu den übrigen Teilen des Apparates geöffnet und somit auch die Kommunikation zu dem Schwefelsäuregefäß hergestellt. Jetzt konnte das während der Reaktion gebildete Ammoniak von der Schwefelsäure aufgenommen werden. Das Gas wurde sodann über Quecksilber in eine Hempelsche Bürette übergeführt und gemessen. In einzelnen Fällen wurde das Gas durch Verpuffung mit Wasserstoff in einer Hempelschen Explosionspipette analysiert.

Die am Nitroarginin ausgeführten Analysen führten zu folgenden Werten:

1. 0,1 g Nitroarginin aus Nitroclupein gab 10,7 ccm Gas bei 20° und 758 mm d. i., 19,08%  $N_2O$ .
2. 0,1 g Nitroarginin aus Nitrosturin gab 11,0 ccm Gas bei 21,0° und 762 mm, d. i. 19,63%  $N_2O$ .

3. 0,1 g Nitroarginin, durch Nitrieren von Arginin dargestellt, gab 11,2 ccm bei 20,2° und 757 mm, d. i. 19,95%  $N_2O$ .

4. 0,1 g Nitroguanidin gab 24,75 ccm Gas bei 20,5° und 752 mm, d. i. 43,78%  $N_2O$ .

5. 0,1 g Nitroguanidin gab 24,8 ccm Gas bei 20,5° und 757 mm, d. i. 44,2%  $N_2O$ .

In Prozenten der angewandten Substanz:

	Stickoxydul gefunden:			Nach obiger Gleichung berechnet:
Nitroarginin:	19,1	19,6	19,9	20,1
Nitroguanidin:	43,8	44,2		42,3

Behufs näherer Untersuchung wurde das Gas aus Analyse 3 (Nitroarginin) mit einer gemessenen Menge Wasserstoff gemischt verpufft. Hierbei erhielten wir folgende Zahlen:

Die zur Analyse benutzte Gasmenge betrug 7,7 ccm; bei der Verpuffung verschwanden 7,0 ccm; beide Volumina auf 0° und 1 m Druck berechnet. Bei der Verpuffung von reinem Stickoxydul sollte die Kontraktion gleich der ursprünglichen Gasmenge sein, die Übereinstimmung ist also keine scharfe, doch hinreichend, um die Annahme zu rechtfertigen, daß das Gas völlig oder fast völlig aus Stickoxydul bestanden hat.

Diese Versuche zeigen, daß das Verfahren zur annähernden Bestimmung der Nitrogruppe im Nitroguanidin dienen kann, und wir haben es daher auch benutzt, um die Menge der Nitroamino-Gruppen in nitrierten Proteinen festzustellen.

1. 0,25 g nitriertes Clupein lieferten 21,0 ccm Gas bei 17° und 743 mm, d. i. 14,9%  $N_2O$ ; davon wurden für die Analyse entnommen: 8,3 ccm, die Kontraktion nach der Verpuffung mit Wasserstoff betrug 7,8 ccm.

2. 0,25 g nitriertes Clupein lieferten 22,8 ccm Gas bei 22,0° und 753 mm, d. i. 15,98% Stickoxydul; davon wurden für die Analyse entnommen: 15,5 ccm, die Kontraktion nach der Verpuffung betrug 14,6 ccm.

Gleichzeitig wurde eine Stickstoffbestimmung in dem nitrierten Clupein ausgeführt, welche folgendes ergab:

0,1505 g nitriertes Clupein gab 39,9 ccm Stickstoff bei 15,5° und 759 mm, d. i. 30,7% N.

Nach Maßgabe der gefundenen Mengen Stickoxydul entfallen von diesen 30,7 Teilen Stickstoff 5,0 Teile auf die Nitrogruppe und somit 25,7 Teile auf den Clupeinstickstoff. Aus den früheren Untersuchungen ergibt sich, daß von 100 Teilen Clupeinstickstoff 88 bis 89 Teile im Arginin enthalten sind. Hätte jedes Argininmolekül eine  $\text{NO}_2$ -Gruppe aufgenommen, so müßte die Menge der Nitrogruppen 18,5% des Nitroclupeins betragen, die gefundene Menge des Stickoxyduls entsprach jedoch nur 16,2% des Nitroclupeins, d. h. sie war so groß, als ob nur etwa 90% des Arginins im Clupein eine Nitrogruppe aufgenommen hätte.

Anders gestaltete sich das Resultat bei dem nitrierten Edestin des Hanfsamens. Wir überzeugten uns zunächst, daß 1 g des ursprünglichen nicht nitrierten Edestins bei 24 stündiger Digestion mit Natronhydrat im Vakuum bei  $38^\circ$  unter den obigen Versuchsbedingungen keine in Betracht kommenden Mengen Gas entwickelte. Hingegen erhielten wir beim nitrierten Edestin folgende Zahlen:

1. 0,5 g nitriertes Edestin (Präp. B, s. oben) gab 10,5 ccm Gas bei  $18^\circ$  und 762 mm, d. i. 3,8% Stickoxydul.

2. 0,5 g nitriertes Edestin (Präparat B) gab 11,0 ccm Gas bei  $14,0^\circ$  und 765 mm, d. i. 4,1% Stickoxydul.

3. 0,5 g nitriertes Edestin (Präparat A) gab 10,9 ccm Gas bei  $19,0^\circ$  und 759,5 mm, d. i. 3,91% Stickoxydul; davon 7,6 ccm für die Analyse: die Kontraktion betrug nach der Verpuffung mit Wasserstoff: 7,2 ccm.

Legt man die oben (S. 2 u. 3) mitgeteilten Stickstoffanalysen des nitrierten Edestins der Berechnung zugrunde, so ergibt sich, daß von den 17,6% N des nitrierten Edestins 1,2% der Nitrogruppe, also 16,4% dem ursprünglichen Edestinmolekül angehören. Da nun in dem Edestin der vierte Teil der Stickstoffatome auf das Arginin entfällt, so enthält das Nitroedestin 4% Argininstickstoff. Hätte jedes Molekül Arginin eine Nitrogruppe aufgenommen, so müßten hiernach in 100 Teilen Nitroedestin 3,3 Teile  $\text{NO}_2$  als Nitroamin enthalten sein. Der aus dem Stickoxydul berechnete Gehalt an  $\text{NO}_2$  beträgt jedoch 4,1%. Die Menge der Nitroamingruppen ist also größer, als

dem Gehalt an Arginingruppen entspricht, und dieser Überschuß an Nitroamingruppen ist sogar noch größer, als die angeführten Zahlen erkennen lassen, denn es war bei der Hydrolyse des Nitroedestins noch eine gewisse Menge nicht nitrierten Arginins aufgefunden worden (siehe oben S. 3): ein Teil des Arginins war der Nitrierung entgangen.

Nach den heute vorliegenden Untersuchungen sind außer dem Arginin nur noch zwei Proteinbausteine bekannt, welche die Nitrogruppe beim Nitrieren des ganzen Proteinmoleküls aufnehmen, nämlich das Tyrosin (Inouye)<sup>1)</sup> und wahrscheinlich das Phenylalanin<sup>2)</sup>. Beide können jedoch ihrer Konstitution nach nicht als Ursprung des Stickoxyduls betrachtet werden. Zum Überfluß haben wir uns durch einen mit 0,5 g Nitrotyrosin ausgeführten Versuch davon überzeugt, daß dieser Körper unter den oben angeführten Bedingungen mit Natronhydrat kein Gas entwickelt.

Die nächstliegende Erklärung dieser Ergebnisse ist die, daß außer der Guanidingruppe des Arginins noch eine andere Guanidingruppe im Edestinmolekül vorkommt, welche die Nitrogruppe unter Bildung eines Nitroamins aufnimmt. Diese Annahme liegt um so näher, da nach den Untersuchungen von Otori<sup>3)</sup> im Pseudomucin, wahrscheinlich auch im Casein und in der Gelatine neben dem Arginin noch ein zweiter Guanidinkern vorhanden ist.

#### IV.

Läßt man statt der Natronlauge wässriges Ammoniak auf das nitrierte Clupein einwirken, so bildet sich ein Körper, welcher zum Unterschied von dem durch Natronhydrat oder Baryhydrat erhaltenen Reaktionsprodukt schwer löslich ist, aber auch in diesem Falle wird die Guanidingruppe aus dem Proteinrest abgespalten, wie die folgenden Untersuchungen zeigen.

<sup>1)</sup> Inouye, Diese Zeitschrift, Bd. 81, S. 81 (1912).

<sup>2)</sup> Nencki und Sieber, Ber. d. dtsh. chem. Ges., Bd. 18 (1885), S. 394.

<sup>3)</sup> Otori, Diese Zeitschrift, Bd. 42 (1904), S. 453, Bd. 43 (1904), S. 74.

Das nitrierte Clupein wurde auf dem Wasserbade mit wässriger Ammoniaklösung erhitzt und das verdunstende Ammoniak ersetzt. Der Nitrokörper löste sich zunächst auf, später bildete sich ein Niederschlag, der in Wasser unlöslich, in Natronlauge löslich und aus dieser durch Salzsäure fällbar war.

14,5 g des durch Ammoniak gebildeten Niederschlages, durch Auswaschen mit Wasser und Auskochen mit Alkohol möglichst von Beimengungen befreit, wurde mit einer Mischung von 45 g konzentrierter Schwefelsäure und 90 g Wasser 14 Stunden am Rückflußkühler gekocht. Die Verteilung des Stickstoffs unter den Reaktionsprodukten war folgende:

In Prozenten des Gesamtstickstoffs:

Ammoniakstickstoff . . . . .	3,0
Im Silber-Baryt-Niederschlag (Argininfraktion) . . . . .	37,0
Im Filtrat vom Silberniederschlag . . . . .	48,0
Davon durch Phosphorwolframsäure fällbar . . . . .	37,4
Nicht fällbar (Monoamidosäurefraktion) . . . . .	10,6

In der Argininfraktion war kein Nitroarginin mehr nachweisbar, wohl aber wurde gut krystallisiertes Argininpikrolonat (vom Schmelzpunkt 225°) daraus erhalten; neben dem Arginin waren aber in dieser Fraktion noch andere unbekannte Basen enthalten.

Die Phosphorwolframsäurefällung wurde in der Weise ausgeführt, daß der sofort entstandene Niederschlag von dem später entstehenden gesondert wurde. Aus beiden Niederschlägen wurde ein gut krystallisiertes Chloroplatinat erhalten, welches sich als Ornithinplatinchlorhydrat erwies.

	Aus Fraktion I	Aus Fraktion II	Berechnet für Ornithinplatinchlorhydrat
Pt	35,6	35,4	35,9%

Die Menge des «Monoamidostickstoffs» war ungefähr ebenso groß, wie beim ursprünglichen Clupein, doch war ein viel größerer Anteil des Gesamtstickstoffs in die Huminsubstanzen übergegangen und dadurch undefinierbar geworden.