

Über den sogenannten Amidstickstoff der Proteine

von

Zd. H. Skraup und E. v. Hardt-Stremayr.

Aus dem II. chemischen Universitätslaboratorium in Wien.

(Vorgelegt in der Sitzung vom 6. Februar 1908.)

Es ist schon lange bekannt, daß bei der Spaltung der Eiweißkörper ein Teil des Stickstoffes als Ammoniak austritt und die beim Kochen mit Mineralsäuren abgespaltene Menge desselben wurde auch schon oft quantitativ bestimmt. Er wird Amidstickstoff genannt, obzwar der Nachweis, daß er Amiden entstammt, bisher nicht geführt worden ist.

Bei allen bisherigen Untersuchungen stand die Frage nach der Maximalmenge des Amidstickstoffes und sekundären Einflüssen auf seine Menge im Vordergrund und in dieser Richtung hat sich z. B. herausgestellt, daß im allgemeinen beim Kochen der Proteine mit der etwa 20fachen Menge rauchender Salzsäure nach fünf Stunden ein Maximum so gut wie erreicht ist.¹ Diese Maximalmengen sind von großer Bedeutung, denn sie sind bei den einzelnen Proteinen recht verschieden. Die verschiedenen Bestandteile des Weizenklebers geben bis zu 4·4 Amidstickstoff (als Ammoniak gerechnet), die meisten anderen Proteine weniger, meist unter 2%, manche noch viel weniger, so das Glutin, für welches bis 0·4% angegeben ist und in welchem wir, wie weiter gezeigt werden soll, Amidstickstoff überhaupt nicht finden konnten.

Wie die Mengen des Amidstickstoffes bei kürzerer und auch sonst weniger energischer Hydrolyse sind, wurde merkwürdigerweise niemals in Untersuchung gezogen. Wir haben

¹ Hausmann, Z. f. phys. Chem., 27, 91, 29, 136; Henderson, Ebend., 29, 47; Kutscher, Ebend., 31, 215; Gumbel, Hofmeister's Beiträge, 5, 297.

diese Lücke durch Untersuchung von Kasein, Edestin, Serumglobulin, kristallisiertes Eieralbumin, Gelatine, sowie der Lysalbinsäure und Protalbinsäure von Paal auszufüllen gesucht.

Die Hydrolyse erfolgte durchwegs mit Salzsäure, mit rauchender rund 40% (genauer 39·8%), mit einfach und doppelt verdünnter, durch fünf Stunden und darüber und in kürzerer Zeit bis zu einer Viertelstunde und darunter.

Dabei hat sich zunächst herausgestellt, daß wir in allen den untersuchten Proteinen den Amidstickstoff geringer fanden als bisher.

So enthält die Cohnheim'sche Tabelle für Kasein, Edestin, Serumglobulin, Eieralbumin und Gelatine die Zahlen 1·8, 1·7, 1·5, 0·4, wir fanden 1·6, 1·6, 1·0, 1·1 und 0·0.

Es sei bemerkt, daß die Maximalzahlen der früheren Untersuchungen untereinander aber auch nicht unwesentlich abweichen.

Die Suche nach einem experimentellen oder rechnerischen Fehler unsererseits war ohne Resultat.

Unsere Maximalzahlen stehen aber für die meisten der Proteine untereinander ungefähr in demselben Verhältnisse wie die anderer Chemiker, so daß diese Differenz die bei weniger energischer Hydrolyse ermittelten Verhältnisse wesentlich nicht beeinflussen kann.

Bei kürzerer Einwirkung konzentrierter und auch verdünnter Säuren fanden wir nun, daß schon nach 15 Minuten, in ersterem Falle selbst nach fünf Minuten schon rund zwei Drittel und darüber des überhaupt leicht abspaltbaren Stickstoffes ausgetreten sind und das letzte Drittel des Wertes von da ab erst bei gesteigerter Einwirkung austritt.

Weniger auffällige Unterschiede bei verschiedener Konzentration sollen im experimentellen Teile erwähnt werden.

Die erwähnte bisher ganz übersehene Tatsache scheint uns ziemlich wichtig zu sein.

Da der Verlauf der vollständigen Hydrolyse in ihren einzelnen Stadien bei den Proteinen nur sehr unvollkommen bekannt und vor allem nicht sichergestellt ist, aus welchen Atomkomplexen der »Amidstickstoff« entsteht, so ist es dormalen kaum möglich anzugeben, welches die Ursachen der bei

energischerer Einwirkung noch immer wahrnehmbaren Zunahme des sogenannten Amidstickstoffes sind.

Wohl läßt sich aber mit einiger Wahrscheinlichkeit erklären, in welchem Stadium die größere Menge des »Amidstickstoffes«, rund zwei Drittel, austritt.

Nach allem, was man über die Hydrolyse weiß, werden anfänglich die Proteine in Albumosen übergeführt. Bei manchen Proteinen sind verschiedene solcher Albumosen nachgewiesen worden. Vermutlich sind auch diese Albumosen keine einheitlichen Verbindungen, sie sind aber durch Löslichkeitsverhältnisse und durch Farbenreaktionen doch so weit unterschieden, daß man sie mindestens als verschiedene Gattungen auseinanderhalten muß.

Ob diese Albumosen nebeneinander oder hintereinander auftreten, ob schon bei ihrer Entstehung primäre Bestandteile (Aminosäuren, Diaminosäuren etc.) auftreten, ob Analoges für jene Phasen gilt, in welchen die sogenannten Peptone entstehen, ist alles noch sehr unbestimmt. Daß aber ein stufenweiser Abbau erfolgt, ist außer allem Zweifel, seitdem unter den Produkten der Hydrolyse relativ komplizierte Polypeptide von E. Fischer und seinen Schülern aufgefunden worden sind. Und weiter kann als sicher betrachtet werden, daß auch bei der Einwirkung konzentrierter Säuren und bei erhöhter Temperatur annähernd dieselbe Reihe von Prozessen sich abspielen wird wie bei der Einwirkung von Enzymen.

Und so läßt sich der Schluß ziehen, daß die Hauptmenge des Amidstoffes bei jenen ersten Spaltungen des Proteïn moleküls frei wird, bei welchen das Proteïn zunächst in Albumosen übergeht.

Infolgedessen ist die Bildung der Albumosen kein ausschließlich hydrolytischer Prozeß, sondern begleitet von einer Ammoniakabspaltung und so lange Gegen Gründe nicht bekannt sind, kann man vorläufig auch weiter annehmen, daß die Ammoniakspaltung mit der Bildung der Albumosen direkt verknüpft ist. Daß sie ebensogut auch sekundär aus den Albumosen erfolgen könnte, ist selbstverständlich.

Da für die eine oder andere dieser Annahmen Tatsachen nicht vorliegen, hätte es wenig Bedeutung, weiter über die bei

fortschreitender Hydrolyse zunehmende Menge des Amidstickstoffes Vermutungen anzustellen.

Der Verlauf der Bildung von Amidstickstoff aus Lysalbinsäure und Protalbinsäure gibt aber dafür doch einigen Anhaltspunkt.

Lysalbin- und Protalbinsäure haben in ihrem Verhalten Ähnlichkeit mit den Albumosen. Hierüber soll bei anderer Gelegenheit berichtet werden.

Aus den im experimentellen Teile mitgeteilten Daten geht hervor, daß bei ihrer Hydrolyse durch Säuren gleichfalls die Hauptmenge des Amidstickstoffes schon anfänglich austritt. Man kann deshalb die Vermutung anschließen, daß die Abspaltung von Amidstickstoff auch vor sich geht, wenn die primären Albumosen weiter abgebaut werden. Hiefür stimmen auch die Mengen von Amidstickstoff, die Henderson¹ für Albumosen mitteilt.

Experimenteller Teil.

Von den einzelnen Proteinen wurde durch Trocknen bei 105 bis 110° der Wassergehalt ein für allemal bestimmt, für die Versuche aber lufttrockene Substanz abgewogen. Die bei den einzelnen Versuchen angegebenen Mengen sind die durch Umrechnung erhaltenen wasserfreien Mengen.

Die Ausführung der Versuche war folgende:

Je 2 g, bei manchen Versuchen 3 g, wurden mit 40 cm^3 der Säure unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Es wurden stets Kautschukstöpsel verwendet. Dann wurde unter Kühlung mit Wasser etwas überschüssiges, vorher ausgeglühtes und dann mit Wasser ausgekochtes Magnesiumoxyd eingetragen, ein geräumiger Tropfenfänger aufgesetzt und das Ammoniak mit Wasserdampf übergetrieben; in der Vorlage befand sich eine titrierte Menge überschüssiger $\frac{1}{10}$ n. HCl.

Um das starke Schäumen zu mäßigen, wurde Paraffin zugesetzt. Paraffin und Magnesiumoxyd hatten sich in blinden

¹ Z. f. phys. Chem., 29, 49.

Versuchen frei von Ammoniak erwiesen, ebenso die zur Hydrolyse verwendeten Proteine.

Wir haben auch Destillationen im luftverdünnten Raume versucht, sie aber aufgegeben, weil bei diesen das Übersäumen noch schwieriger zu verhüten war.

Über die bei wechselnden Konzentrationen und Zeiten erhaltenen Mengen von Ammoniak sei dem früher schon Erwähnten noch zugefügt; daß bei relativ kurzer Dauer der Hydrolyse (bis gegen eine Stunde) kein merklicher Unterschied zu sehen ist zwischen konzentrierter (40%) und auf die Hälfte verdünnter (20%) Salzsäure, während dagegen bei zirka 10% HCl bedeutend weniger Ammoniak abgespalten wurde. Dagegen scheint bei längerer Dauer des Kochens konzentrierte Salzsäure etwas stärker einzuwirken als 20prozentige und auch durch einen großen Überschuß an Salzsäure die abgespaltene NH_3 -Menge etwas größer zu werden.

Länger als fünf Stunden wurde das Erhitzen nur einmal beim Kasein fortgesetzt und war die abgespaltene Ammoniakmenge nach zehnstündigem Kochen nicht größer als bei fünfständigem.

Kasein (nach Hammarsten, Merck'sches Präparat).

Bei den Versuchen kamen jedesmal 3 g in Anwendung. In der Cohnheim'schen Tabelle (2. Auflage) ist für Amidstickstoff (als NH_3 berechnet) als Maximum 1·8% angegeben.

Dauer der Hydrolyse	Konzentration der HCl	Verbrauchte Kubikzentimeter $\frac{1}{10}$ n.HCl	N in Prozenten		NH_3 in Prozenten der Substanz
			der Substanz	des Gesamtstickstoffes ¹	
5 Minuten	konzentriert	16·7	0·85	5·4	1·02
$\frac{1}{4}$ Stunde	$\frac{1}{2}$ verdünnt	18·1	0·92	5·9	1·11
	konzentriert	18·4	0·94	6·0	1·13
$\frac{1}{2}$ »	$\frac{1}{4}$ verdünnt	10·0	0·51	3·2	0·61

¹ Bei der Berechnung von Prozenten des Gesamtstickstoffes wurden die Durchschnittszahlen aus dem Cohnheim'schen Buche zu Grunde gelegt.

Dauer der Hydrolyse	Konzentration der HCl	Verbrauchte Kubikzentimeter $\frac{1}{10}$ n. HCl	N in Prozenten		NH ₃ in Prozenten der Substanz
			der Substanz	des Gesamtstickstoffes ¹	
$\frac{1}{2}$ Stunde	$\frac{1}{2}$ verdünnt	18·6	0·95	6·1	1·14
	konzentriert	18·6	0·95	6·1	1·14
1 »	$\frac{1}{2}$ verdünnt	16·9	0·86	5·5	1·03
	konzentriert	19·1	0·97	6·2	1·17
2 Stunden	»	21·6	1·10	7·0	1·33
3 Stunden	»	20·4	1·04	6·7	1·25
4 »	»	21·2	1·08	6·9	1·30
5 «	verdünnt	19·6	1·00	6·4	1·21
	konzentriert	24·1	1·23	7·9	1·38
10 »	»	26·5	1·34	8·5	1·62
	»	26·2	1·33	8·4	1·61

Anschließend an diese Versuche wurden auch solche mit der halben Menge (20 *cm*³ auf 3 g Kasein) der 40prozentigen Säure ausgeführt. Die Mengen an Amidstickstoff fanden auch wir geringer als unter sonst gleichen Verhältnissen mit der größeren Menge von Säure.

Dauer der Hydrolyse	Verbrauchte Kubikzentimeter $\frac{1}{10}$ n. HCl	N in Prozenten der Substanz	des Gesamt-N	NH ₃ in Prozenten der Substanz
$\frac{1}{2}$ Stunde	14·2	0·69	4·4	0·84
1 »	14·9	0·74	4·8	0·88
2 »	16·5	0·83	5·3	0·99
3 »	17·7	0·90	5·8	1·08

Edestin (von Höchst).

Beim Edestin ist bei Cohnheim 1·74% Ammoniak angegeben; wir fanden nach einer Viertelstunde 1·20% und nach fünf Stunden 1·59%; verdünnte Salzsäure wirkt merklich schwächer als konzentrierte.

Angewendet je 3 g Trockensubstanz.

¹ Bei der Berechnung von Prozenten des Gesamtstickstoffes wurden die Durchschnittszahlen aus dem Cohnheim'schen Buche zu Grunde gelegt.

Dauer der Hydrolyse	Konzentration der HCl	Verbrauchte Kubikzentimeter $\frac{1}{10}$ n. HCl auf 3 g	N in Prozenten		NH ₃ in Prozenten der Substanz
			der Substanz	des Gesamtstickstoffes	
$\frac{1}{4}$ Stunde	$\frac{1}{2}$ verdünnt	17·6	0·91	4·9	1·09
	konzentriert	19·1	0·99	5·3	1·20
$\frac{1}{2}$ »	»	19·3	1·00	5·4	1·21
	$\frac{1}{4}$ verdünnt	8·8	.	.	0·46
1 »	$\frac{1}{2}$ »	15·8	0·82	4·4	0·98
	konzentriert	22·5	1·18	6·4	1·41
5 Stunden	verdünnt	16·2	0·85	4·5	1·02
	konzentriert	22·3	1·16	6·2	1·39
	»	25·4	1·32	7·0	1·59

Serumglobulin (von Höchst).

Beim Serumglobulin sind die Zahlen bedeutend niedriger als die von Hausmann gefundenen. Während er 1·75% Ammoniak angibt, erhielten wir im Maximum nur 1·06%.

Angewendet je 2 g Trockensubstanz.

Dauer der Hydrolyse	Konzentration der HCl	Verbrauchte Kubikzentimeter $\frac{1}{10}$ n. HCl auf 2 g	N in Prozenten		NH ₃ in Prozenten der Substanz
			der Substanz	des Gesamtstickstoffes	
5 Minuten	konzentriert	6·9	0·53	3·4	0·64
$\frac{1}{2}$ Stunde	$\frac{1}{2}$ verdünnt	7·9	0·60	3·8	0·72
	konzentriert	7·8	0·60	3·8	0·72
5 Stunden	$\frac{1}{2}$ verdünnt	9·2	0·71	4·5	0·85
	konzentriert	11·5	0·88	5·6	1·06

Gelatine (Goldmarke).

Bei der Gelatine sind von E. Hart¹ 0·43% angegeben. Wir fanden in zwei Versuchen Amidstickstoff überhaupt nicht.

¹ Z. f. phys. Chem., 33, 347 (1901).

Kristallisiertes Eialbumin.

Kristallisiertes Eialbumin, das wiederholt umkristallisiert war, wurde in heißem Wasser denaturiert und dann bis über das Verschwinden der Schwefelsäurereaktion mit Wasser gewaschen. Hier ist die im Maximum abgespaltene Ammoniakmenge 1·09 besonders geringer als bei Hausmann, welcher 1·5% fand.

Bei der Hydrolyse wurde je 2 g Trockensubstanz verwendet.

Dauer der Hydrolyse	Konzentration der HCl	Verbrauchte Kubikzentimeter $\frac{1}{10}n$. HCl auf 2 g	N in Prozenten		NH ₃ in Prozenten der Substanz
			der Substanz	des Gesamtstickstoffes	
$\frac{1}{4}$ Stunde	konzentriert	8·2	0·60	4·0	0·72
	$\frac{1}{2}$ verdünnt	8·2	0·60	4·0	0·72
5 Stunden	konzentriert	12·8	0·90	6·0	1·09

Zum Schlusse wurden noch protalbinsaures und lysalbinsaures Natrium untersucht.

Verwendet wurden käufliche Präparate von Kalle & Comp. in Biebrich, bei jedem Versuche 2 g Trockensubstanz.

Dauer der Hydrolyse	Konzentration der HCl	Protalbinsaures Na			Lysalbinsaures Na		
		Verbrauchte Kubikzentimeter $\frac{1}{10}n$. HCl	Prozent N	Prozent NH ₃	Verbrauchte Kubikzentimeter $\frac{1}{10}n$. HCl	Prozent N	Prozent NH ₃
$\frac{1}{4}$ Stunde	verdünnt	5·8	0·42	0·50	7·2	0·54	0·65
$\frac{1}{2}$ »	»	5·9	0·42	0·50	7·6	0·57	0·69
	konzentriert	6·1	0·43	0·51	7·6	0·57	0·69
5 Stunden	»	8·3	0·58	0·70	11·3	0·86	1·04