

Über die Einwirkung von Brom auf Eiweißkörper und Aminosäuren.

Von

M. Siegfried und H. Reppin.

(Aus der chemischen Abteilung des Physiologischen Institutes der Universität Leipzig.)
(Der Redaktion zugegangen am 17. Juni 1915.)

Unseren Untersuchungen lag das Bestreben zugrunde, zu einem neuen Wege, den Gang der Hydrolyse von Proteinkörpern verfolgen zu können, zu gelangen. Wir können dies bisher durch Bestimmung des Carbaminoquotienten,¹⁾ durch Formoltitrierung²⁾ und durch Bestimmung des durch salpetrige Säure abspaltbaren Stickstoffes.³⁾ Alle diese Methoden lassen im großen und ganzen das Auftreten von NH_2 -Gruppen bei der Hydrolyse wie bei der Spaltung von Peptidbindungen erkennen. Im allgemeinen gehen die Resultate der Methode von Soerensen und Slyke parallel, mit einigen Unterschieden. So reagiert Sarkosin gegen Slyke nicht, wohl aber — im Gegensatz zu Loeb⁴⁾ — quantitativ nach Soerensen, wie der eine von uns mit Herrn Schunke festgestellt hat, und inzwischen von Clementi⁵⁾ angegeben wurde. Die Methode von Siegfried läßt dadurch in oft sehr prägnanter Weise den Eintritt einer Spaltung sichtbar werden, daß bei der Bestimmung des Carbaminoquotienten ein Teil der Spaltungsprodukte als Calciumsalze der Carbaminoderivate im Kalkniederschlag entfernt werden, sodaß der Quotient nur für einen

¹⁾ M. Siegfried und C. Neumann, Diese Zeitschrift, Bd. 54, S. 423 (1907).

²⁾ S. P. L. Soerensen, Biochem. Zeitschr., Bd. 7, S. 43 (1907).

³⁾ D. v. Slyke, Berl. Ber., Bd. 43, S. 3170 (1910).

⁴⁾ W. Loeb, Biochem. Zeitschr., Bd. 51, S. 116 (1913).

⁵⁾ Chem. Zentralblatt 1915, S. 1089.

Teil der Spaltungsprodukte erhalten wird, wodurch die Differenzen der Werte zwischen nichtgespaltener und gespaltener Verbindung oft sehr große und damit leicht erkennbare werden.¹⁾

Ein Bromverbrauch bei der Einwirkung von Brom auf Eiweißkörper und deren Spaltungsprodukte kann beruhen 1. auf Oxydation unter Bildung von Bromwasserstoff, 2. auf Bromaddition unter Sprengung von doppelten Bindungen, 3. auf Substitution von Brom.

Für unseren Zweck kam es nicht darauf an, Bedingungen anzuwenden, unter denen etwa ein möglichst hoher Bromverbrauch zu erzielen ist, sondern solche, die sich gleichmäßig genau bei den verschiedenen Bestimmungen einhalten lassen. Deshalb wurden die Bedingungen der Methode der Koppeschaarschen Phenolbestimmung gewählt.

Methodisches.

Die Bromidbromatlösung wurde teils, wie bei der Methode von Koppeschaar, von einer solchen Konzentration verwendet, daß 50 ccm derselben 30 ccm $\frac{n}{10}$ -Thiosulfatlösung entsprachen, teils, was vorzuziehen ist, von doppelter Konzentration. Das Volumen der Lösung der zu untersuchenden Substanz hat ungefähr 50 ccm zu betragen. Ist die Substanz schwer löslich, wie Glutaminsäure, so löst man sie unter Zusatz von etwas Salzsäure und stumpft dann diese vor dem Hinzufügen der Bromidbromatlösung möglichst mit Natronlauge ab. Ein Zusatz von Ammoniak ist auf alle Fälle zu vermeiden. Die Titration geschieht in farblosen, enghalsigen Flaschen mit gut eingeschliffenen Stopfen. Die Bromidbromatlösung, 50 ccm bzw. von der doppeltkonzentrierten 25 ccm, läßt man langsam, etwa 60 Tropfen in der Minute, ausfließen, indem die Ausflußspitze der Bürette an den Flaschenhals angelegt wird, um ein Spritzen zu vermeiden. Nach Abspritzen des Halses gibt man aus einer Pipette 5 ccm 25%ige Salzsäure dazu, setzt den Stopfen auf, schüttelt um und läßt bei Zimmertemperatur in zerstreutem Tageslicht eine Viertelstunde stehen. Treten Fällungen ein, schüttelt man ab und zu um.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 84. S. 292 (1913).

Um jeden Bromverlust zu vermeiden, verfährt man dann folgendermaßen weiter: Durch Abkühlen der verschlossenen Flasche an der Wasserleitung erzeugt man in der Flasche einen geringen Unterdruck, gießt von 10 ccm einer 12,5%igen Jodkaliumlösung etwas zwischen Flaschenhals und Stopfen und lüftet jetzt den Stopfen langsam, indem man gleichzeitig den Rest der Jodkaliumlösung nachfließen läßt. Auf diese Weise gelingt es, ohne daß Bromdämpfe entweichen, die Jodkaliumlösung in die Flasche zu bringen. Das Jodkalium ist vorher auf Abwesenheit von Kaliumjodat zu prüfen.

Zurücktitriert wird mit n_{10} Natriumthiosulfat.

Die Maßflüssigkeiten wurden durch Phenolbestimmungen nach Koppeschaar kontrolliert.

Bei der Titration mancher Substanzen, besonders von Gelatine, entstehen nach Jodkaliumzusatz klumpende Schmierer, die sich nicht titrieren lassen. Dieser Übelstand läßt sich durch Zusatz von 1 bis 2 Teelöffel Talkumpulver vor dem Zusatze der Salzsäure vermeiden.

Der Quotient $\frac{N}{Br}$

Der Quotient $\frac{N}{Br}$ gibt das Verhältnis der Anzahl der Atome N in der untersuchten Substanz zu der Anzahl der Atome verbrauchten Broms an. Da n_{10} -Lösung Thiosulfat einer n_{10} -Lösung Brom entspricht, so ist

$$\frac{N}{Br} = \frac{a}{b-c}$$

wenn a die bei der Kjeldahlbestimmung gefundenen Anzahl Kubikzentimeter n_{10} -Säure, b die Anzahl der Kubikzentimeter Thiosulfatlösung, welche der zugesetzten Menge Bromidbromatlösung entspricht, c die Anzahl der zurücktitrierten Kubikzentimeter Thiosulfat ist.

Beispiel: Gelatine. 15 ccm der Lösung der Gelatine entsprachen 142,5 ccm n_{10} -Säure nach Kjeldahl. Zugesetzt 50 ccm Bromidbromatlösung = 30 ccm n_{10} -Thiosulfatlösung. Zurücktitriert 9,0 ccm Thiosulfatlösung.

$$\frac{N}{Br} = \frac{142,5}{30-9} = 15,84.$$

Diese Berechnung gilt für Versuche mit Substanzen, bzw. Lösungen, deren Stickstoff bestimmt werden muß. Handelt es sich um Substanzen, deren N-Gehalt bekannt ist, wie um Aminosäuren, so berechnet man entweder die der angewandten Menge Substanz entsprechende Anzahl Kubikzentimeter n_{10} -Stickstoff und benutzt die obige Formel, oder man rechnet nach dieser:

$$\frac{N}{Br} = \frac{\text{Gew. d. Subst. i. Gramm} \times \text{Zahl d. i. 1 Mol. enth. Atome N}}{\text{Molekulargewicht d. Subst.} \times (b-c) \times 0,0001}$$

wenn wieder b die Anzahl der Kubikzentimeter Thiosulfatlösung, welche der zugesetzten Menge Bromidbromatlösung entspricht, c die Anzahl der zurücktitrierten Kubikzentimeter Thiosulfatlösung ist.

Dieser Quotient ist aus rein praktischen Gründen gewählt, weil der Stickstoff der Proteinkörper und seiner Spaltungsprodukte leicht genau zu bestimmen ist und bei den Proteinkörpern wegen seines annähernd konstanten Gehaltes ein Maß für die Menge des Proteinkörpers abgibt. Selbstverständlich soll er nicht ausdrücken, daß die Bromreaktion eine Reaktion der N-Gruppen ist.

Untersuchung von Aminosäuren.

a) Aminosäuren ohne ringförmigen Komplex.

Bei folgenden untersuchten Aminosäuren wurde, wenn die Bromeinwirkung, entsprechend der Vorschrift $\frac{1}{4}$ Stunde dauerte, der Quotient $= \infty$ gefunden, d. h. es wurde kein Brom verbraucht: Glykokoll, Sarkosin, Betain, dl-Alanin, dl- α -Aminovaleriansäure, Leucin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Lysin, Arginin.

Bei der Anwendung der Methode auf Gemische von Eiweißspaltung sind also diese Aminosäuren ohne ringförmige Komplexe ohne Einfluß auf den Verbrauch von Brom.

Bei lang andauernder Einwirkung von Brom auf die genannten Aminosäuren wird jedoch Brom verbraucht. So sank der Quotient nach 154tägiger Einwirkung beim Glykokoll und Alanin auf ungefähr 4 herab, bei der Glutaminsäure nach 123 Tagen sogar auf 0,4, bei der Asparaginsäure nach 104 Tagen auf 0,7.

b) Aminosäuren mit ringförmigem Komplex.

Mehrere Untersuchungen¹⁾ haben sich mit dem Brombindungsvermögen von Tyrosin, Tryptophan und Histidin unter verschiedenen, aber von den unseren abweichenden Bedingungen beschäftigt. In der Regel ist da unter Zusatz von Alkalicarbonaten oder kaustischen Alkalien gearbeitet worden. Für unseren Zweck kam es nicht darauf an, maximalen Bromverbrauch zu erzielen, sondern festzustellen, wie groß der Bromverbrauch unter den festgelegten Bedingungen ist.

1. Phenylalanin. Käufliche Präparate verbrauchten relativ große Mengen Brom. Von uns wiederholt aus heißem Wasser umkrystallisiertes Phenylalanin band jedoch kein Brom.

$$\frac{N}{Br} = \infty.$$

2. Phenylglykokoll. Die von Kahlbaum bezogenen Präparate verbrauchten auch nach den verschiedensten Reinigungen durch Umkrystallisieren und Extraktion mit Äther große Mengen Brom. Auf 1 Molekül Phenylglykokoll berechnet bis 7 Atome Brom, so wurden erhalten für $\frac{N}{Br} = 0,24; 0,15; 0,23; 0,14$. Erst ein von uns synthetisch dargestelltes, völlig farbloses Produkt, das sorgfältig gereinigt und wiederholt umkrystallisiert war (N gefunden 9,61 % ber. 9,27 %), verbrauchte kein Brom.

$$\frac{N}{Br} = \infty.$$

¹⁾ Wheeler und Jamiešou, J. Am. Chem. Soc., Bd. 33, S. 325 (1905), Brown and Millard, Journ. of the chem. Soc. Lond., 1906, S. 145, A. Oswald, Diese Zeitschrift, Bd. 58, S. 290 (1908) und Bd. 59, S. 320 (1909), Neuberg und Popowski, Biochem. Zeitschr., Bd. 2, S. 357 (1906), H. Pauly, Berl. Ber., Bd. 43, S. 2243 (1910).

3. Tyrosin. Dieses Präparat hatten wir durch Hydrolyse aus Casein mit Salzsäure gewonnen, wiederholt mit Tierkohle aus heißem Wasser umkrystallisiert (N gef. 7,50 % und 7,60 % anstatt ber. 7,74 %). 0,5127 g über Schwefelsäure getrocknetes Tyrosin wurden unter Zusatz einiger Tropfen Salzsäure in Wasser gelöst, auf 250 ccm aufgefüllt.

a) zur Bestimmung wurden 15 ccm der Lösung genommen; Bromidbromatlösung: 50 ccm (Titer 29,80). Thiosulfatlösung zurücktitriert: 21,8 ccm $\frac{N}{Br} = 0,21$.

b) von derselben Tyrosinlösung 25 ccm, 100 ccm Bromidbromatlösung (Titer 29,80), 10 ccm 25 %ige Salzsäure, 20 ccm 12,5 %ige Jodkaliumlösung. Zurücktitriert: 46,1 ccm Thiosulfat. $\frac{N}{Br} = 0,21$.

c) 0,0539 g desselben Tyrosins, 50 ccm Bromidbromatlösung (Titer 30,00). Zurücktitriert: 16,98 ccm Thiosulfatlösung $\frac{N}{Br} = 0,23$.

d) 0,0542 g Tyrosin, 50 ccm derselben Bromidbromatlösung. Zurücktitriert: 16,57 ccm Thiosulfat. $\frac{N}{Br} = 0,22$.

Man sieht also, daß der Quotient auch bei relativ großem Bromüberschusse (s. Best. 3) konstant 0,21—0,23 gefunden wird, d. h. es werden für 1 Molekül Tyrosin beinahe 5 Atome Brom verbraucht.

4. Tryptophan war von uns als farblose, stark glänzende, leichte Schuppen genau nach der Vorschrift von Hopkins und Cole¹⁾ durch tryptische Verdauung von Casein gewonnen (N gef. 13,33 %, ber. 13,73 %).

a) 0,0547 g Substanz, 50 ccm Bromidbromatlösung (Titer 30,00). Zurücktitriert: 9,25 ccm Thiosulfat $\frac{N}{Br} = 0,25$.

b) 0,0600 g Substanz, 50 ccm Bromidbromatlösung (Titer 30,00). Zurücktitriert 18,2 ccm, $\frac{N}{Br} = 0,27$.

¹⁾ Journ. of Physiol., Bd. 27, S. 418 (1901); Bd. 29, S. 451 (1903).

Das Tryptophan verbraucht also ca. 4 Atome Brom auf 1 Atom N, also 8 für das Molekül Tryptophan.

5. Histidin aus Blut durch Hydrolyse mit Salzsäure dargestellt.

a) 0,2126 g Substanz, 50 ccm Bromitbromatlösung (Titer 29,98); zurücktitriert 0,35 ccm Natriumthiosulfatlösung $\frac{N}{Br} = 1,39$.

b) 0,1029 g Substanz, 50 ccm Bromidbromatlösung; zurücktitriert 14,15 ccm, $\frac{N}{Br} = 1,26$.

Das Histidin verbraucht also etwas mehr als 2 Atome Brom.

Ferner wurde als Peptid Glycylglycin untersucht, das, wie zu erwarten, kein Brom band.

Untersuchung von Proteinkörpern und intermediären Spaltungsprodukten.

Es kam uns darauf an, zu ermitteln, ob die ungespaltenen bzw. teilweise gespaltenen Proteinmoleküle mehr oder weniger Brom verbrauchten, als die Summe der Spaltungsprodukte. Den Tyrosinkomplex enthaltende Proteinkörper sollen nach Brown und Millard¹⁾ unter anderen als den von uns gewählten Bedingungen weniger Brom verbrauchen, als die Summe ihrer Spaltungsprodukte, weil Tyrosin in gebundenem Zustande kein Brom verbrauchen soll. Hierauf gehen wir weiter unten ein. Um unabhängig von diesem Faktor zu sein, untersuchten wir zunächst Gelatine und ihre Spaltungsprodukte.

Für alle Bestimmungen ausreichende Mengen Gelatine wurden in kleine Stücke geschnitten und diese gut durchgemischt. In den zu untersuchenden Lösungen wurde der Stickstoff jedesmal nach Kjeldahl bestimmt. Zu allen Versuchen wurden die Lösungen der Gelatine bei genau 33° abpipettiert. Die Gelatinelösungen ließen sich ohne Schwierigkeit bromieren, zeigten hierbei weder Gelatinierung noch Fällung, sobald aber die Jodkaliumlösung zugegeben wurde, trat Trübung ein und

¹⁾ J. H. Millard, Trans. Guinness. research Lab. 1903 I. part. 1; A. J. Brown und E. Th. Millard, Journ. of the chem. Soc. Lond. 1906 S. 145; J. M. Auld und Th. Duncan, ebenda 1913, S. 281.

es bildeten sich schwarze, zähe Klumpen, die an den Glaswandungen klebten und der Einwirkung der Thiosulfatlösung nicht zugänglich waren. Nach anderen vergeblichen Versuchen gelang es, in dem Zusatze von Talkum ein Mittel zu finden, die Klumpenbildung zu vermeiden (s. Methodisches).

Gelatine.

25 g Gelatine zu 250 ccm bei 33° gelöst. Je 15 ccm dienten zu jedem der 6 Versuche. Angewandt 50 ccm Bromidbromatlösung (Titer 30,00). Zurücktitiert: 21,00; 21,00; 21,10; 20,90; 21,05; 21,00 ccm Thiosulfatlösung.

Zur N-Bestimmung wurden 10 ccm der Lösung auf 50 ccm verdünnt, je 5 ccm hiervon kjeldahlisiert; verbraucht im Mittel 9,5 ccm $\frac{N}{Br}$ S. $\frac{N}{Br}$ im Mittel: 15,85.

Völlig hydrolysierte Gelatine.

1. 20 g Gelatine mit 200 ccm 12,5%iger Salzsäure 10 Stunden am Rückflußkühler gekocht. Von der Lösung je 15 ccm zur Bromierung (unter Zusatz von Talkum), zur N-Bestimmung je 2 ccm verwendet. 50 ccm Bromidbromatlösung (Titer 30), zurücktitiert im Mittel von 2 Bestimmungen 7,47 ccm. 2 ccm erf. nach Kjeldahl i. M. 20,1 ccm $\frac{N}{Br}$ S.

$$\frac{N}{Br} = 20,15.$$

2. 20 g Gelatine, 200 ccm 12,5%iger Salzsäure + 3 g Zinnchlorür 10 Stunden gekocht. Zinn mit Schwefelwasserstoff entfernt usw.

$$\frac{N}{Br} = 21,77 \text{ i. M.}$$

3. Gelatine mit 25%iger Salzsäure 10 Stunden gekocht.

$$\frac{N}{Br} = 19,62 \text{ i. M.}$$

4. Wie 3, jedoch unter Zusatz von Zinnchlorür.

$$\frac{N}{Br} = 20,53 \text{ i. M.}$$

5. Wie 4. $\frac{N}{Br} = 20,44$ i. M.

6. Gelatine mit 10%iger Schwefelsäure 10 Std. gekocht.
 $\frac{N}{Br} = 20,32$ i. M.

7. Mit 25%iger Schwefelsäure zersetzt.
 $\frac{N}{Br} = 19,9$ i. M.

Diese Versuche zeigen eindeutig, daß Gelatine mehr Brom verbraucht als die Summe ihrer Spaltungsprodukte.

Die Differenz ist bedeutend. Während als Quotient für Gelatine im Mittel 15,85 gefunden wurde, beträgt er im Mittel für die Summe der Spaltungsprodukte 20,4, ist also um rund 29% größer als der erstere. Man muß hieraus schließen, daß im Glutin Komplexe vorhanden sind, auf die Brom reagiert, die aber bei der Hydrolyse so verändert werden, daß Brom nicht mehr reagiert. Es ist an ringförmige Komplexe zu denken, die bei der Hydrolyse aufgespalten werden. Ein solcher Komplex, der bei der Hydrolyse durch Säuren zerstört wird, ist bei anderen Proteinkörpern bekannt, das Tryptophan, dieses fehlt jedoch im Glutin.

Es ergibt sich die Aufgabe, nach solchen Komplexen zu suchen. In dieser Absicht haben wir zunächst ein Produkt der allmählichen Hydrolyse des Glutins untersucht, ein mit Hilfe der Eisenmethode dargestelltes Trypsinglutinpepton. Dasselbe besaß direkt in 12,5%iger Salzsäure gelöst den Quotienten 12,71 bzw. 12,88. Der Bromverbrauch ist also größer als bei dem Ausgangsmaterial, dem Glutin. Nach 10stündigem Kochen dieser salzsauren Lösung war der Quotient auf 18,1 gestiegen; die Differenz des Bromverbrauches der Summe der Spaltungsprodukte und des ungespaltenen Peptons ist also noch wesentlich größer als die Differenz des Bromverbrauches der Gelatine und ihrer Spaltungsprodukte.

Dasselbe Gesetz wurde bei anderen Peptonen bzw. Albumosen bestätigt gefunden. Witte-Pepton gab für den

Quotienten die Zahl 2,09—2,24, für die Summe der Spaltungsprodukte 2,98. Ein Pepton, durch Pepsinverdauung von Blut hergestellt, lieferte $\frac{N}{Br} = 2,72$, die Spaltungsprodukte 4,56; Trypsinfibrinpepton (Millon negativ) $\frac{N}{Br} = 2,96$, die Spaltungsprodukte 3,60.

Das allmähliche Ansteigen des Quotienten während der Hydrolyse zeigen folgende Versuche.

Pepton, aus Blut durch Pepsinverdauung gewonnen, mit der Eisenmethode abgeschieden, lieferte bei der Zersetzung mit 12,5%iger Salzsäure

Nach Tagen	$\frac{N}{Br}$
0	2,67
2	2,96
12	3,42
38	4,05

Auch das tyrosinreiche Edestin verbraucht mehr Brom als die Summe der tryptischen Spaltungsprodukte.

10 g Edestin wurden in 1 l 0,5%iger Natriumcarbonatlösung gelöst, filtriert; ferner 0,5 g Trypsin in 50 ccm 0,5%iger Natriumcarbonatlösung gelöst, beide Lösungen getrennt auf 40° gebracht, unter Zusatz einiger Tropen Chloroforms vermischt und sofort 50 ccm zur Bromierung, und je 20 ccm zur Kjeldahlbestimmung verwendet.

Je 20 ccm der Lösung erford. nach Kjeldahl 21,4 und 21,1 ccm $\frac{N}{10}$ -Säure. Zu den Bromierungen wurden je 50 ccm Bromidbromatlösung (Titer 30,00) verwendet.

Dauer der Trypsinwirkung in Stunden	Umgesetztes Brom in ccm $\frac{N}{10}$	$\frac{N}{Br}$
0	16,46	3,20
0,5	15,75	3,37
24	14,85	3,58
2 \times 24	14,86	3,57
4 \times 24	14,51	3,66
35 \times 24	14,00	3,70

Das Resultat, daß der Bromverbrauch auch bei tyrosinhaltigem Eiweiß bei der Hydrolyse sinkt, ist auffallend, wenn man berücksichtigt, daß die Arbeiten von J. H. Millard und E. Th. Millard und A. J. Brown (l. c.) darauf fußen, daß Tyrosin in gebundener Form, wie im Eiweiß, der Bromierung nicht zugänglich ist, wohl aber in freiem Zustande. Die Bestimmungen genannter Autoren, welche die Ermittlung der abgespaltenen Tyrosinmengen bezwecken, ergeben einen steigenden Bromverbrauch während der Verdauung.

Daß in unseren Versuchen der Bromverbrauch während der Verdauung sinkt, kann erklärt werden, indem man annimmt, daß die Fähigkeit der untersuchten Lösung, Brom umzusetzen, zwar durch die Abspaltung von Tyrosin steigt, aber durch eine durch Aufhebung bromverbrauchender Bindungen bedingte überwiegende Abnahme des Bromverbrauches im ganzen sinkt.

Es ist übrigens zu berücksichtigen, daß Brown und Millard unter ganz anderen Bedingungen als wir gearbeitet haben. Sie setzen tropfenweise eine Kaliumbromatlösung ($\frac{n}{5}$) zu der mit Kaliumbromidlösung vermischten Untersuchungslösung hinzu, bis durch Tüpfeln mit Jodkaliumstärkelösung eben ein geringer Bromüberschuß erkannt wird, während nach unserem Verfahren auf die Substanz ein großer Bromüberschuß einwirkt.
