

69. FRITZ MICHEEL: Über die Bildung von Thiol-Gruppen bei der Hydrolyse von Schlangengiften und Eiweißstoffen (Schlangengifte, X. Mitteil.).

[Aus d. Organ. Abteil. d. Chem. Instituts d. Universität Münster in Westf.]

(Eingegangen am 24. Januar 1939.)

Wie in der vorigen Mitteilung¹⁾ gezeigt wurde, entsteht bei der Hydrolyse von Gift der *Naja tripudians* (indische Kobra) in sauerstoff-freier Atmosphäre ein Stoff mit freier Thiolgruppe (Nachweis durch die Reaktion mit Nitroprussidnatrium und mit Phosphorwolframsäure). Ferner hatte sich ergeben, daß aus anderen vergleichsweise untersuchten Eiweißstoffen ebenfalls ein Stoff erhalten wird, der Phosphorwolframsäure reduziert, während Thiol mit Nitroprussidnatrium seinerzeit nicht nachgewiesen werden konnte, obwohl dies unter Berücksichtigung der Empfindlichkeitsgrenzen beider Reaktionen zu erwarten war (s. Versuchsteil). Die weitere Untersuchung mehrerer Eiweißstoffe und Schlangengifte und die vergleichsweise Behandlung von Aminosäuren unter denselben Bedingungen wie bei der Eiweißhydrolyse, hat zu einer gewissen Klärung der Verhältnisse geführt.

Alle untersuchten Eiweißstoffe und Schlangengifte (Eieralbumin, Casein, Edestin, Gifte von *Naja tripudians*, *Crotalus atrox*, *Bothrops jararaca* und *Bothrops alternata*) reduzieren nach der Hydrolyse mit Ameisensäure-Salzsäure im sauerstoff-freien Kohlensäurestrom Phosphorwolframsäure (bei pH 5.2) kräftig. Die Reaktion mit Nitroprussidnatrium war nur beim Gift von *Naja tripudians* stark, während sie bei den übrigen Stoffen z. Tl. schwach, z. Tl. sehr schwach²⁾ war und in bezug auf ihre Stärke nicht der Phosphorwolframsäure-Reaktion entsprach³⁾ (unter Berücksichtigung der beiderseitigen Empfindlichkeitsgrenzen). Vergleicht man beim Gift der *Naja tripudians* die Reaktionen des nicht dialysierenden, fast inaktiven Begleit-Eiweißes mit denen des durch Cellophan dialysierenden Neurotoxins, so fällt bei letzterem die intensivere Nitroprussid-Reaktion auf. Dies wäre im Sinne der in der vorigen Mitteilung⁴⁾ geäußerten Ansicht über die Bindung eines Teils des Schwefels in der neurotoxischen Gruppe verständlich.

Im Vergleich zu den Hydrolysen der oben angeführten Stoffe wurden einige Aminosäuren, und zwar *l*-Cystin, Glykokoll und *d*, *l*-Alanin der Einwirkung von Ameisensäure-Salzsäure unter den Bedingungen der Hydrolyse unterworfen (CO₂-Atmosphäre). Auch aus diesen Aminosäuren bilden sich Substanzen, die Phosphorwolframsäure bei pH 5.2 reduzieren. Daß im Falle des Cystins daneben auch Thiol entsteht, das z. Tl. für diese Reaktion verantwortlich ist, folgt aus einer, im Verhältnis zur Phosphorwolframsäure-

¹⁾ IX. Mitteil., B. 72, 68 [1939].

²⁾ Beim Edestin-Hydrolysat war die Nitroprussid-Reaktion kräftiger als bei den anderen hydrolysierten Eiweißstoffen. Vergl. das besondere Verhalten des Edestins beim Versuch zur quantitativen Bestimmung der S-Bausteine: Kassel u. Brand, Journ. biol. Chem. 125, 435 [1938].

³⁾ Wegen der Unbeständigkeit der Nitroprussid-Reaktion, die bei Gegenwart von Eiweißhydrolysat noch vergrößert wird, sind quantitativ-zahlenmäßige Vergleiche zunächst nicht möglich.

⁴⁾ B. 72, 68 [1939].

Reaktion jedoch schwachen, Nitroprussid-Reaktion⁵⁾). Das Auftreten von wenig Thiol aus größeren Mengen Cystin unter den Bedingungen der Eiweißhydrolyse läßt es möglich erscheinen, daß die thiolhaltigen Substanzen aller untersuchten Stoffe z. Tl. oder ganz aus S-S-Bindungen entstanden sind, wenn auch beim Neurotoxin letzteres mit Rücksicht auf das sonstige Verhalten seines Schwefels und die Intensität der Thiolreaktion unwahrscheinlich ist.

Was die aus Eiweißstoffen entstehenden, Phosphorwolframsäure reduzierenden Substanzen betrifft, so unterscheiden sie sich vom Cystein durch ihre größere Widerstandsfähigkeit gegenüber Oxydation mit Luftsauerstoff unter den Bedingungen der Hydrolyse. In der vorigen Mitteilung wurde gezeigt, daß Cystein unter diesen Verhältnissen ziemlich rasch und vollständig oxydiert wird. Anders diese Substanzen: Hydrolysen von Eiweißstoffen unter Sauerstoff reduzieren, auch nach länger als 30 Stdn. noch Phosphorwolframsäure, wenn auch nur schwach, also unter Bedingungen, bei denen Cystein vollständig oxydiert ist. Die Bildung einer Phosphorwolframsäure reduzierenden nicht thiolhaltigen Substanz aus den angeführten Eiweißarten und Aminosäuren erscheint also als gesichert. Dies ist von Wichtigkeit für die Auswertung der Cystin- und Cysteinbestimmungen nach der Methode von Folin, die heute zu den am meisten angewandten gehört. Während auf der einen Seite bei der üblichen Art der Ausführung der Eiweißhydrolyse (Luft-Zutritt) Thiolverbindungen oxydiert oder anderweitig verändert werden, werden umgekehrt durch das Auftreten der unbekannten reduzierenden Substanzen mehr schwefelhaltige Gruppen gefunden als vorhanden sind. Dies ist z. B. auch in den Fällen zu berücksichtigen, wo es sich um den Nachweis von SH-Gruppen in denaturiertem Eiweiß handelt⁶⁾.

In welchem Maße die gefundenen Werte für die schwefelhaltigen Bausteine in den verschiedenen Eiweißstoffen durch die in dieser und der vorigen Mitteil. beschriebenen Reaktionen beeinflußt werden, ist zunächst schwer zu sagen. Die bedeutenden Differenzen, die zwischen den nach verschiedenen Methoden bestimmten Cystinwerten von Eiweißstoffen⁷⁾ gefunden werden, mögen z. Tl. ihre Erklärung darin finden.

Über quantitative Versuche an Schlangengiften, die in dieser Richtung liegen, soll demnächst berichtet werden.

Die Deutsche Forschungsgemeinschaft und die Fa. C. F. Boehringer u. Soehne haben die Untersuchungen durch Bereitstellung von Mitteln in dankenswerter Weise gefördert.

Beschreibung der Versuche.

Zur Nachprüfung der Empfindlichkeitsgrenzen des Thiolnachweises mit Phosphorwolframsäure und mit Nitroprussidnatrium wurden die Grenzkonzentrationen an Cysteinhydrochlorid ermittelt, die mit voller Sicherheit zu erkennen waren.

Als Lösungen gelangten zur Anwendung: Cystein-hydrochlorid (1:10⁴) in CO₂-gesättigtem Wasser, Acetatpuffer (pH 5.2), Phosphorwolframsäure nach Folin, 2-n.

⁵⁾ Die Nitroprussid-Reaktion war, wie in der vorigen Mitteil. beschrieben, bei Hydrolyse von etwa 5 mg Cystin negativ, bei etwa 30 mg (s. Versuchsteil) jedoch positiv. Über Zersetzung von Cystinlösungen s. auch Shinohara u. Kilpatrick, Journ. biol. Chem. **105**, 241 [1934]; Routh, Journ. biol. Chem. **126**, 147 [1938].

⁶⁾ Z. B. bei Mirsky u. Anson, Journ. gen. Physiol. **18**, 304 [1935]; **19**, 427, 451, 559 [1936].

⁷⁾ Zusammenstellung z. B. die Tafel XI, S. 133 in J. Lloyd u. A. Shore, Chemistry of the Proteins, II. Aufl., London 1938.

Ammonchlorid-Lösung, 13-n. Ammoniak-Lösung, etwa 5-proz., frisch bereitete Nitroprussidnatrium-Lösung und mit CO_2 gesättigtes Wasser. Die gewünschten Cystein-Konzentrationen wurden durch Verd. mit Wasser bzw. den Puffer- und Reagens-Lösungen erhalten. Das Gesamtvolumen der zu prüfenden Lösung betrug jedesmal 3 ccm. Im Falle der Prüfung mit Nitroprussidnatrium wird am besten die Ammoniaklösung zu der mit wenig Nitroprussidnatrium-Lösung versetzten schwach sauren Prüflösung vorsichtig zufließen gelassen. Konzentrationen von 1:10⁶ ließen sich mit der Nitroprussid-Reaktion eindeutig erkennen. Bei geringeren Konzentrationen sind die Befunde unsicher. Bemerkenswert ist, daß die Farbe bei Gegenwart von Eiweiß-Hydrolysat (z. B. Zusatz von Gelatine-Hydrolysat) wesentlich schneller (in wenigen Sek.) verblaßt. Vielleicht handelt es sich um katalytische Einflüsse. Bei der Prüfung von Eiweiß-Hydrolysaten stört ferner die häufig auch mit Talk nicht zu entfernende Eigenfarbe etwas.

Die Reaktion mit Phosphorwolframsäure erreichte den gleichen Grad an Sicherheit bei einer Verdünnung des Cysteins von 0.5:10⁶. Aber auch bei geringeren Konzentrationen an Cystein trat allmählich noch eine schwache Blaufärbung ein.

Hydrolysen.

Die zu untersuchende Substanz wurde, wie in der vorigen Mitteil. beschrieben, in 6.2 ccm reiner Ameisensäure und 5.8 ccm rauchender Salzsäure (bei größeren Substanzmengen wurde das Doppelte genommen), die vorher durch 1- bis 2-stdg. Durchleiten mit reinem CO_2 gesättigt worden waren, zum Sieden erhitzt (Glycerinbad 120—135°) und gleichzeitig CO_2 durchgeleitet. Die schwefelarmen Eiweißstoffe gelangten bei einigen Versuchen in entsprechend größeren Mengen zur Anwendung als die schwefelreicheren. Dies erwies sich jedoch z. B. beim Edestin als nicht notwendig. Die Mengen je Versuch waren folgende: Gifte von *Naja tripudians* 100—150 mg, von *Crotalus atrox* 150 mg, von *Bothrops alternata* 150 mg, von *Bothrops jararaca* 100 mg; gereinigtes Neurotoxin der *Naja tripudians* 150 mg; nicht dialysierendes Begleiteiweiß aus Gift von *Naja tripudians* 150 mg; Eieralbumin (kryst.) 150—500 mg; Casein 150 bis 500 mg; Edestin 150 mg, Cystin 5—30 mg. Zur Prüfung wurde nach etwa 18 und 30 Stdn. je die Hälfte der Lösung unter CO_2 eingedampft, der Rückstand in 3 ccm Wasser gelöst, zur Entfärbung mit Talk⁸⁾ behandelt, und je 1 ccm mit Phosphorwolframsäure (Folin) und Nitroprussidnatrium in üblicher Weise untersucht. Die Folin'sche Probe war bei allen untersuchten Giften und Eiweißstoffen besonders nach 30-stdg. Hydrolyse kräftig, bei Verwendung von 30 mg Cystin ebenfalls, wenn auch schwächer. Die Nitroprussid-Reaktion war am stärksten beim Gift und Neurotoxin der *Naja tripudians*, schwächer beim Edestin; schwach, aber einwandfrei bei den übrigen Eiweißstoffen (bei Verwendung der größten, oben angegebenen Mengen davon) und beim Cystin (30 mg). Bei der Hydrolyse von Eiweißstoffen im Sauerstoffstrom, also unter Bedingungen, unter denen Cystein schnell oxydiert wird, kann eine Phosphorwolframsäure reduzierende Substanz folgendermaßen nachgewiesen werden: 200 mg Eieralbumin (kryst.) werden in 6.2 ccm Ameisensäure und 5.8 ccm konz. Salzsäure zum Sieden erhitzt und ein langsamer Strom von Sauerstoff durchgeleitet. Je 5 ccm werden nach 30 und 40 Stdn. abgedampft und mit Phosphorwolframsäure bei pH 5 geprüft: Blaufärbung. Die Nitroprussid-Reaktion war natürlich negativ.

⁸⁾ Dabei können geringe Verluste an Thiol eintreten.

Einwirkung von Salzsäure-Ameisensäure auf Aminosäuren.

30 mg Glykokoll (Merck) oder ebensoviel *d, l*-Alanin (synthet.) wurden, wie bei den oben beschriebenen Hydrolysen, mit 6.2 ccm Ameisensäure und 5.8 ccm konz. Salzsäure unter reinem CO_2 zum Sieden erhitzt. Nach 30 und 40 Std. wurden je 5 ccm Lösung unter CO_2 im Vak. abgedampft. Alle Proben gaben mit Phosphorwolframsäure eine einwandfrei positive Reaktion.

70. Richard Siegfried Hilpert und Werner Krüger: Untersuchungen über pflanzliche Samenschalen.

[Aus d. Institut für chem. Technologie d. Techn. Hochschule Braunschweig.]
(Eingegangen am 25. Januar 1939.)

Die Samenschalen der Pflanzen sind chemisch bisher nur wenig untersucht worden. Abgesehen von den wissenschaftlich nicht verwendbaren Bestimmungen nach dem Weender-Verfahren liegt nur eine kürzlich erschienene Arbeit von Voss, Bauer und Pfirschke¹⁾ vor, welche sich im wesentlichen mit den Spaltungsprodukten beschäftigt, die aus den Schalen der Walnüsse, Pflaumen- und Kirschkerne durch Oxydation und darauf folgende Behandlung mit Alkali erhalten werden. Doch bilden die Samenschalen ein sehr interessantes Untersuchungsobjekt. Je nach ihrer Aufgabe variieren die mechanischen Eigenschaften in weiten Grenzen. Viele Fruchtschalen sind sehr hart, wie z. B. bei den Nüssen und den Kernen des Steinobstes, während die braune Haut der Kastanien elastisch ist.

Wir versuchten nun festzustellen, ob zwischen diesen verschiedenen äußereren Eigenschaften und der chemischen Zusammensetzung bestimmte Beziehungen vorhanden sind. Wir haben daher aus verschiedenen Gruppen Vertreter ausgewählt, die uns leicht zugänglich waren, um überhaupt einen Überblick zu erhalten.

Zum Vergleich legen wir zunächst die Methoxylzahl und dann die Elementaranalyse zugrunde, die sonst auf diesem Gebiet niemals hinzugezogen wird, obgleich sie die einzigen wirklich genau bestimmmbaren Zahlen ergibt. Sie ermöglicht vor allem einen Vergleich mit den Hölzern, von denen sich die Samenschalen weitgehend unterscheiden. Daneben wurden noch die Pentosane und Lignine bestimmt. Bei ihrer Bewertung muß man berücksichtigen, daß es sich nicht um quantitative Bestimmungen von Bestandteilen, sondern nur von Reaktionsprodukten handelt. Das gilt nicht nur für das Lignin, sondern auch für die Pentosane²⁾, da die Menge des überdestillierten Furfurols, das selbst durch Säuren verharzt, von der Schnelligkeit abhängt, mit welcher die Pentosane aus dem Pflanzenteil hydrolytisch abgespalten werden, so daß das gebildete Furfurol vor der Wirkung der Säure bewahrt werden kann.

Wir stellen zunächst das Ergebnis verschiedener Bestimmungen in der Tafel 1 zusammen, die nach steigenden Methoxylzahlen geordnet ist. Die

¹⁾ A. 534, 95–135 (1938).

²⁾ B. 71, 1962 (1938).