

Weiteres über das Invertin.

Von

Dr. M. Külle.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Tübingen.)

(Der Redaction zugegangen am 10. Mai 1900.)

In seiner Arbeit über das Invertin hat W. A. Osborne¹⁾ gezeigt, dass das von ihm dargestellte Ferment weder eiweiss- noch peptonartiger Natur, sondern vielmehr eine Substanz eigener Art ist, deren stets vorhandener Aschengehalt regellos auf- und abschwankt, daher jedenfalls nur als mechanische Beimengung betrachtet werden darf, während hingegen die Resultate der Elementaranalysen verschiedener Präparate auf eine constante Zusammensetzung des eigentlich wirksamen Körpers und auf das regelmässige Auftreten von Stickstoff unter seinen Bestandtheilen hinweisen. Besonders bemerkenswerth aber war die von Osborne zuletzt angeführte Beobachtung, dass die Substanz beim Erwärmen mit Salzsäure einen reducirenden Körper liefert, somit also vielleicht eine glykosidartige Verbindung ist.

Da Osborne selbst aus Mangel an hinreichendem Material leider nicht mehr im Stande war, die wahre Natur des reducirenden Körpers festzustellen, so habe ich es unternommen, diese Lücke nachträglich auszufüllen.

Die nöthige Menge des gereinigten Stoffs verschaffte ich mir nach dem gleichen Verfahren, das Osborne angewendet und in seiner Arbeit ausführlich beschrieben hat: wobei auch mir als Ausgangsmaterial ein von Merck auf besonderen Wunsch frisch dargestelltes Rohpräparat diente, dargestellt unter Be-

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. XXVIII, S. 399.

rücksichtigung der Erfahrungen, von denen bei Osborne die Rede ist. Leider war der Materialverlust, der während und in Folge der Reinigung stattfand, immer sehr bedeutend; denn mit den anorganischen Salzen diffundirte während der mehrtägigen Dialyse durch die mir zu Gebote stehenden Pergamentschläuche jedesmal auch eine ziemlich reichliche Menge wirksamer organischer Substanz. Es ergab sich ausserdem, dass die von Merck nacheinander bezogenen Präparate nicht durchweg die gleiche Beschaffenheit besaßen. Zwar erwiesen sich alle in hohem Grade wirksam, allein die Menge des in Wasser löslichen Antheils und ebenso der Aschengehalt waren bei den einzelnen merklich verschieden, was ja wohl mit der Art und Beschaffenheit der jedesmal verarbeiteten Hefe zusammenhängen mag.

Auch fand ich, wie aus dem Folgenden hervorgeht, die elementare Zusammensetzung meiner gereinigten Produkte, wenn ich sie auf aschenfreie Substanz berechnete, etwas abweichend von derjenigen der Osborneschen Präparate: indessen betraf diese Abweichung wesentlich nur den Stickstoff- und Wasserstoffgehalt, während der mittlere Kohlenstoffgehalt (44,58%) etwa der gleiche, wie bei Osborne (44,69%) blieb. Dieser Umstand legt den Gedanken nahe, dass das von mir gefundene Plus an Wasserstoff und Stickstoff von dem Ammoniak des bei der Darstellung erzeugten Tripelphosphats herrühren mochte, das, durch Fällung und Dialyse nur unvollständig aus der Lösung entfernt, später zugleich mit der organischen Substanz durch den Alkohol gefällt worden war.¹

Ich analysirte nacheinander 3 verschiedene aus 2 verschiedenen Sendungen von Rohmaterial dargestellte Präparate.

1) Dagegen, dass man diese Erklärung gegen die Annahme eines Stickstoffgehaltes der Substanz überhaupt geltend machen könnte, spricht der Umstand, dass dann, wie eine einfache Rechnung zeigt, auch der Wasserstoffgehalt stark herabgedrückt werden würde und zwar bis unter 5% — so dass derselbe keineswegs mehr dem des Traubenzuckers (6,6%), ja nicht einmal dem der Stärke oder des Glykogens (6,17%) gleichkäme —, ein Umstand, der der sonstigen Natur der untersuchten Substanz durchaus widerspräche.

1. Aschenbestimmung.

Präparat I: 1,0225 g trockner Substanz hinterliessen 0,0632 g Asche, entsprechend 6,18%.

Präparat II: 1,9556 g trockner Substanz hinterliessen 0,0776 g Asche, entsprechend 3,96%.

Präparat III: 1,091 g trockner Substanz hinterliessen 0,1166 g Asche, entsprechend 10,68%.

Die Asche bestand aus Phosphorsäure, Kalium und Magnesium. Von Eisen habe ich keine Spur gefunden.

2. Elementaranalyse.

- I. 0,1960 g trockner Substanz, enthaltend 0,0121 g Asche, lieferten 0,1145 g Wasser und 0,302 g Kohlensäure.
- II. a) 0,1978 g trockner Substanz, mit 0,0078 g Asche, lieferten 0,1255 g Wasser und 0,3146 g Kohlensäure.
b) 0,1545 g trockner Substanz, mit 0,0061 g Asche, lieferten 0,0950 g Wasser und 0,2484 g Kohlensäure.
- III. a) 0,2601 g trockner Substanz, mit 0,0278 g Asche, gaben 0,1510 g Wasser und 0,3807 g Kohlensäure.
b) 0,2525 g Trockensubstanz, mit 0,0269 g Asche, gaben bei 11,5° und 730 mm. Bar. 16,5 ccm. Stickstoff.
c) 0,2140 g Trockensubstanz, mit 0,0228 g Asche, gaben 0,1206 g Wasser und 0,3115 g Kohlensäure.
d) 0,3530 g Trockensubstanz, mit 0,0377 g Asche, gaben bei 10° und 732 mm. Bar. 23,5 ccm. Stickstoff.
e) 0,2135 g Trockensubstanz, mit 0,0353 g Asche, gaben bei 16° und 733 mm. Bar. 21,5 ccm. Stickstoff.

Es ergibt sich sonach für die verschiedenen Präparate folgende procentische Zusammensetzung:

Nummer des Präparates	Kohlenstoff	Wasserstoff	Stickstoff	Asche	Bemerkungen
I	44,73 %	6,91 %	—	6,18 %	} Ueber Schwefelsäure im Vacuum bei Zimmertemperatur getrocknet.
II	45,15 %	7,34 %	—	} 3,96 %	
	45,65 %	7,22 %	—		
III	44,69 %	7,22 %	8,46 %	} 10,68 %	
	44,43 %	7,00 %	8,67 %		
	43,90 %	6,45 %	8,32 %		Im Vacuum bei 80° getrocknet. Bei 105° im Wasserstoffstrom getrocknet.

Ueber die Ausführung der Analysen sei bemerkt, dass ich die Substanz stets mit etwas dichromsaurem Kali und chromsaurem Blei gemengt im Schälchen verbrannte, und in Betreff des vorherigen Trocknens der Substanz, dass ich einzelne Proben bei Zimmertemperatur im Vacuum über Schwefelsäure, andere im Vacuum bei höherer Temperatur (80°), wieder andere im Wasserstoffstrom im Toluolbade bei 105° getrocknet habe. Im ersteren wie im letzteren Falle wurde das Gewicht der Substanz je nach der Menge derselben erst nach 3 bis 6 Wochen, im zweiten dagegen schon nach 5 bis 6 Tagen constant. Bemerkenswerth war dabei der Umstand, dass während des langen Trocknens im Toluolbade das Präparat sich bräunte und auch eine deutliche Einbusse an Wirksamkeit erlitt, was bei den andern Trocknungsarten keineswegs der Fall war.

Die Asche wurde von jedem Präparat besonders bestimmt. Es geschah dies nach der bekannten Methode von Strecker.¹⁾

Ich liess also zunächst 1 bis 2 Grammen der Substanz bei ganz schwacher Flamme und ohne Rothgluth im Porzellantiegel verkohlen, setzte dann soviel einer frisch bereiteten und titrirten, concentrirten Lösung von Aetzbaryt hinzu, dass mindestens um die Hälfte mehr Baryumoxyd vorhanden war, als die in der Asche enthaltene Phosphorsäure in der Regel 50° zu binden vermochte, dampfte die Lösung zur Trockne ein und erhitzte endlich den Rückstand 12 Stunden lang bei eben beginnender Rothgluth in der Muffel.¹⁾ Um etwa vorhandenes Baryumoxyd in das Carbonat überzuführen, wurde die Asche zuletzt mit Ammoniumcarbonat befeuchtet und nochmals während kurzer Zeit in der Muffel erhitzt. Am Ende wurde die Gesamtasche gewogen, die Kohlensäure nach Kolbe²⁾ bestimmt und ebenso wie die bekannte Menge des zugefügten Baryumoxyds (BaO) vom Gesamtgewichte abgezogen.

Wirksamkeit. Waren die Präparate im Vacuum über Schwefelsäure nur bei Zimmertemperatur getrocknet, so erwiesen sie sich jedesmal in höchstem Grade wirksam. Um eine genauere Vorstellung von dem Grade dieser Wirksamkeit zu erhalten, löste ich 0,01 g. davon in 5 ccm. Wasser und brachte 1 Tropfen dieser Lösung zu 10 ccm. einer 1%igen Rohrzuckerlösung. Nachdem ich die Mischung etwa 1/2 Stunde lang bei 30° sich selbst überlassen, prüfte ich sie mit Fehling'scher Flüssigkeit und fand sofort eine reichliche Ausscheidung von Kupferoxydul.

Da auf 5 ccm. Wasser, wie oben bemerkt, 0,01 g., daher auf 1 ccm. 0,002 g. des Präparats kamen, da ferner 1 ccm.

¹⁾ Liebig's Ann., Bd. 73, S. 366.

²⁾ Fresenius, Quant. Anal. I. 449.

meines Messgefässes 19 Tropfen gab, so enthielt ein einzelner Tropfen der Lösung also nur $\frac{0,002}{19} = 0,00011$ g fester Substanz.

Um Klarheit über die Natur des reducirenden Körpers zu gewinnen, den Osborne beim Erwärmen unseres Invertinpräparats mit Salzsäure gefunden hatte, wandte auch ich als Zersetzungsmittel zunächst Salzsäure an.

5 g reines, im Vacuum bei gewöhnlicher Temperatur getrocknetes Invertin wurde in Portionen von je 1 g mit je 15 cem. gewöhnlicher verdünnter Salzsäure in Röhren eingeschlossen und diese im Wasserbad bei Siedehitze so lange erhitzt, bis die Flüssigkeit dunkelbraun gefärbt und eine ungefähr 1 cm. hohe, lockere Schicht schwarzer Huminsubstanzen abgeschieden war. Bei frisch bereitetem Invertin war hierzu eine Erhitzungsdauer von mindestens 10, bei älteren Präparaten nur eine solche von ungefähr 2 bis 3 Stunden erforderlich. Nach dem Oeffnen der Röhren wurde die Flüssigkeit von der geringen Menge Huminsubstanz abfiltrirt und in das Filtrat unter kräftigem Schütteln desselben allmählich so viel frisch aufgeschlämmtes Kupferoxydul eingetragen, bis das gebildete Kupferchlorür röthlich gefärbt erschien. Dann ward abermals filtrirt und das etwa gelöste Kupfer aus der Flüssigkeit mit Schwefelwasserstoff entfernt. Endlich wurde der vom Schwefelkupfer befreiten Flüssigkeit kohlensaures Baryum bis zur schwach sauren Reaction zugefügt, das Ganze im Vacuum zum dicken Syrup eingedampft und dieser in einen grossen Ueberschuss 96%igen Alkohols (etwa 15 cem. auf ein Liter Alkohol) eingegossen. Der Alkohol wurde nach mehrstündigem Stehen von ausgeschiedenem Chlorbaryum wiederum abfiltrirt und gleichfalls im Vacuum zum Syrup eingedampft. Dieser letztere besass ein starkes Reductionsvermögen und diente nunnmehr unmittelbar zur Isolirung des reducirenden Körpers.

Zu diesem Zwecke löste ich ihn in ca. 150 cem. Wasser und versetzte ihn mit einer zuvor erhitzten Lösung von 2 g salzsauren p-Bromphenylhydrazins und 3 g essigsäuren Natriums in 60 cem. Wasser. Nach einigem Stehen in der Kälte, bei späteren Versuchen sofort, schied sich nun eine röthlich-weiße

Verbindung aus, die abgesaugt, mit warmem Wasser, dann mit Alkohol und Aether gewaschen und zuletzt aus viel siedendem, 60° warmem Alkohol umkrystallisirt werden konnte. Sie stellt dann eine aus seidenglänzenden Täfelchen bestehende Krystallmasse dar, die bei raschem Erhitzen, d. h. bei einer innerhalb 3 Minuten bewirkten Steigerung der Temperatur von 20 bis 195° (nach Emil Fischer), bei 208—210° schmolz.

Die Krystalle waren wenig löslich in heissem Wasser, Benzol, Aether, Essigester, absolutem Alkohol und unlöslich in Chloroform, leicht löslich dagegen in heissem Eisessig. Liess ich eine Spur derselben mit verdünnter Kalilauge an der Luft stehen, so trat daran nach einiger Zeit eine rosenrothe Färbung auf.

Bildungsweise, Schmelzpunkt, Löslichkeitsverhältnisse, alle diese Umstände zusammen, ebenso wie die nachstehend angeführten Resultate der Analyse kennzeichnen die Verbindung als das p-Bromphenylhydrazon der Mannose.¹⁾

1. 0.2096 g Substanz gaben 0.0955 g Wasser und 0.3175 g Kohlensäure.

2. 0.1740 g Substanz gaben bei 15.5° und 725 mm. Bar. 12.6 cem Stickstoff.

3. 0.3054 g Substanz gaben bei 8° und 721 mm. Bar. 21.8 cem Stickgas.

4. 0.1526 g Substanz lieferten bei der Brombestimmung nach Carius 0.0817 g Bromsilber, entsprechend 0.0347 g Brom.

Berechnet für $C_{12}H_{17}BrN_2O_5$:

Gefunden:

		I	II
Kohlenstoff	41.26%	41.31%	—
Wasserstoff	4.87%	5.06%	—
Stickstoff	8.02%	8.05%	8.16%
Brom	22.92%	22.74%	—

Ich gewann im Ganzen aus den angewandten 5 g meines Invertins 1,5 g reines Hydrazon.

Da Mannose die einzige Zuckerart ist, die schon in der Kälte ein unlösliches Hydrazon auch mit Phenylhydrazin liefert, so wurde in einem zweiten Versuche der nach dem beschriebenen

¹⁾ W. Naumann, Ueber einige Hydrazone etc. Inauguraldissertation Wurzen 1892, S. 14.

Verfahren erhaltene Syrup zum Zwecke der Kontrolle in der von E. Fischer¹⁾ vorgeschriebenen Weise mit salzsaurem Phenylhydrazin und essigsauerm Natrium in der Kälte behandelt. Schon nach kurzem Stehen schied sich das erwartete Hydrazon aus. Nach dem Umkrystallisiren aus heissem Wasser stellte es eigenthümlich röthliche Blättchen dar, deren Schmelzpunkt zwischen 195 und 200° lag, also mit dem von E. Fischer angegebenen übereinstimmte.

Auch die Stickstoffbestimmung führte zu dem gleichen Resultate.

0.1558 g Substanz gaben bei 13° und 722 mm. Bar. 15.8 ccm. Stickgas.

Berechnet für $C_{12}H_{13}N_2O_5$:

Stickstoff 10.37%

Gefunden:

10.42%

Wendet man anstatt der Salzsäure als Zersetzungsmittel die gewöhnliche verdünnte Schwefelsäure an, so erhält man zuletzt als eines der Spaltungsprodukte gleichfalls Mannose. Um dies zu beweisen, kocht man etwa 1 g des Präparats mit 30 ccm. der genannten Säure in einem mit Steigrohr versehenen Kölbchen etwa einen Tag lang über dem Drahtnetze, filtrirt am Ende von der ausgeschiedenen Trübung ab, verdünnt das Filtrat mit Wasser und digerirt es auf dem Wasserbade mit aufgeschwemmtem kohlen-sauren Baryum so lange, bis die Reaction neutral geworden. Hierbei pflegt das Ganze jene eigenthümliche Orangefarbe anzunehmen, die Schmiedeberg²⁾ als charakteristisch für das basisch glykuronsaure Baryum bezeichnet hat.

Alsdann filtrirt man vom schwefelsauren und vom Ueberschuss des kohlen-sauren Baryums ab, wäscht den weissen Niederschlag gut aus, dampft das Filtrat im Vacuum bis zu einem geringen Volumen ein, wobei stets ein weiterer Nieder-

1) Ber. d. d. chem. Gesellsch. Bd. 20, S. 832 und Bd. 22, S. 1155.

2) Archiv für experiment. Pathol. und Pharmakol., Bd. 28, S. 355.
Die weitere Untersuchung hat nun freilich gezeigt, dass das Reductionsvermögen des Reactionsproduktes in unserem Falle nicht von der Anwesenheit von Glykuronsäure, sondern von der Mannose herrührte, die sich in der gelb gefärbten Lösung befand.

schlag ausfällt, und giesst endlich den Rest sammt diesem letzteren Niederschlage in viel Alkohol ein. Nachdem das Ganze einige Stunden ruhig gestanden, filtrirt man von Neuem, wobei ein weisser Rückstand auf dem Filter bleibt, und dampft endlich das alkoholische Filtrat wieder im Vacuum zum Syrup ein. Aus diesem lässt sich das p-Bromphenylhydrazon der Mannose in der gleichen Weise gewinnen, wie oben beschrieben.

Das Verfahren, mit Schwefelsäure zu kochen, ist einfacher als das erste und bietet den Vortheil, dass dabei der Zucker in völlig neutraler, salzfreier Lösung erhalten wird; zugleich aber erweckt es einige Hoffnung, dass es zur Isolirung noch weiterer Spaltprodukte unseres Präparates wird führen können. Der zuletzt erwähnte weisse Niederschlag nämlich enthielt zwar noch Reste von schwefelsaurem und kohlensaurem Baryum, die beide offenbar von der organischen Substanz in Lösung zurückgehalten worden waren, er war aber zugleich auch stickstoffhaltig.