

Ueber das Nucleoproteid der Leber.

(Mittheilung I.)

Von

J. Wohlgemuth.

Aus dem chemischen Laboratorium des pathologischen Instituts der Universität Berlin.
(Der Redaction zugegangen am 2. März 1903.)

Die Kenntnisse über das Nucleoproteid der Leber sind bisher noch sehr spärliche. Untersuchungen darüber existiren nur von Plósz¹⁾ und Halliburton.²⁾ Beide stellten ein Nucleoproteid aus der Leber dar, indem sie Leberbrei mit physiologischer Kochsalzlösung extrahirten und das Filtrat langsam erhitzten: beim Erwärmen schied sich dann ein Eiweisskörper aus, der Phosphor enthielt. So gewann Plósz ein Proteid, das bei 70°, Halliburton eine Substanz, die schon bei 60° gerann. Die so erhaltenen Ausbeuten waren indessen sehr gering, und erst durch Füllen des Leberauszuges mit Essigsäure kam Halliburton zu besseren Resultaten. Den Phosphorgehalt des durch Füllen mit Essigsäure dargestellten Nucleoproteids gibt der Autor zu 1,45% an.

Später gelang es Hammarsten,³⁾ ein Nucleoproteid aus dem Pankreas darzustellen, indem er das frische Organ zerkleinerte und 10 Minuten lang mit Wasser kochte. Aus dem Filtrat erhielt er durch Zusatz von Essigsäure ein Nucleoproteid, das nach der Reinigung einen Phosphorgehalt von

1) Plósz, Pflüger's Archiv, Bd. 7, S. 371.

2) Halliburton, Journ. of Physiol. 1893, Bd. 13, 15, 1895, Bd. 17.

3) Hammarsten, Diese Zeitschrift, Bd. XIX, 1894.

4,48^o o. hatte. Umber¹⁾ fand den Phosphorgehalt bei den durch Auskochen gewonnenen Präparaten nicht so constant. Drei von ihm so dargestellte Proteide enthielten 3,8, 3,76 und 3^o o Phosphor. Hammarsten fasste sein Proteid als das Zersetzungsprodukt einer anderen, weit mehr complicirten Nucleinsubstanz auf, mit deren Isolirung er sich nicht näher befasste. Umber gelang es dann in eleganter Weise, das eigentliche Nucleoproteid der Pankreasdrüse in grossen Mengen analysenrein darzustellen. Er gewann es auf dieselbe Art, wie Halliburton das Leberproteid, durch Ausziehen des möglichst frischen Organs mit physiologischer Kochsalzlösung und Füllen mit Essigsäure. Der Phosphorgehalt dieses Proteids betrug durchschnittlich 1,67^o o, also etwas mehr als der des Nucleoproteids von Halliburton.

Ich habe nun die Methode des Auskochens von Hammarsten auf die Leber angewandt und bin damit, was die Ausbeute an Nucleoproteid anbetrifft, zu guten Resultaten gekommen, und zwar bin ich in folgender Weise dabei verfahren. 2½—3 kg möglichst frischer Rinderleber wurden zu einem feinen Brei zerhackt, der Brei mit 5—6 l Wasser in einem Blechtopf 10 Minuten lang gekocht, die Flüssigkeit abfiltrirt und nach dem Abkühlen solange mit verdünnter Essigsäure versetzt, bis kein Niederschlag sich mehr bildete. Gewöhnlich setzte sich das Nucleoproteid in schönen grossen Flocken ab und konnte bequem von der Flüssigkeit getrennt werden. Bisweilen kam es aber auch vor, dass die Flüssigkeit eine milchige Trübung annahm und das Proteid sich nicht absetzte; dann regte ein kurzes, leichtes Erwärmen auf dem Wasserbad sofort die Ausscheidung des Proteids an. Ein einmaliges Auskochen des Leberbreies genügte jedoch nicht, sämtliches Proteid zu extrahiren, dazu war mindestens ein zwei- bis dreimaliges Wiederholen dieser Procedur erforderlich. Ja, ich hatte sogar mitunter noch bei einer sechsten und siebenten Extraction nicht unbeträchtliche Ausbeuten. Sämtliche Niederschläge von einer Verarbeitung wurden dann auf ein Filter

¹⁾ Umber, Zeitschr. f. klin. Medic., Bd. 40. Heft 5 u. 6.

gebracht, ausgewaschen, durch Abpressen möglichst von dem noch anhaftenden Wasser befreit, mit 96° igem Alkohol fein verrieben, der Alkohol gewechselt, dann unter 99,8° igem Alkohol gebracht und auch dieser während der nächsten Tage mehrmals gewechselt, um dadurch das Fett und die letzten Reste von Farbstoff zu entfernen. Zum Schluss wurde die Substanz mit absolutem Aether mehrere Tage behandelt und auf diese Weise ein schneeweisses, bisweilen auch gelbliches feines Pulver gewonnen, das etwas hygroskopisch war. 1 kg frischer Leber lieferte durchschnittlich eine Ausbeute von 3—4 g.

Der Phosphorgehalt der so gewonnenen, noch nicht gereinigten Präparate schwankte zwischen 2,29—2,38%. Gereinigt wurde die Substanz in der üblichen Weise, indem ein Theil frisch gewonnenen Proteids in Natriumcarbonat in der Kälte gelöst, die Lösung filtrirt und aus dem Filtrat durch Fällen mit Essigsäure das Protein wiedergewonnen wurde. Nach mehrmaliger Behandlung mit 96- und 99,8° igem Alkohol und wasserfreiem Aether zeigte das Produkt einen Phosphorgehalt von 2,98%. Es würde somit dieses Nucleoprotein zu dem von Halliburton dargestellten in demselben Verhältniss stehen, wie das von Hammarsten zu dem von Ember, nämlich schon als ein Spaltungsprodukt des ursprünglichen anzusehen sein.

Ueber die Natur des im Nucleoprotein vorhandenen Zuckers.

Nachdem Kossel¹⁾ als Erster auf das Vorkommen einer Kohlehydratgruppe in der Nucleinsäure der Hefe aufmerksam gemacht und aus dieser ein Osazon vom Schmelzpunkt des Pentosazons, sowie Furfurol erhalten hatte — ein Befund, den man nach dem damaligen Stand der Wissenschaft als unbedingt beweisend für die Gegenwart von Pentose ansehen musste —, gelang es Hammarsten,²⁾ aus dem Nucleoprotein des Pankreas ein Osazon darzustellen, das er nach dem Schmelzpunkt vermuthungsweise als Pentosazon ansprach. Hammarsten

1) Kossel, Vortrag gehalten in d. phys. Gesellschaft zu Berlin am 14. Oktober 1892.

2) Hammarsten l. c.

bezog sich dabei auf die kurz vorher von E. Salkowski¹⁾ als Stoffwechsellanomalie entdeckte Pentosurie. Letzterer²⁾ bestätigte die Vermuthung Hammarsten's durch Darstellung grösserer Mengen eines Osazons aus Pankreas und Analyse derselben.

F. Blumenthal³⁾ wies sodann auf das fast allgemeine Vorkommen ähmlicher Substanzen in Nucleoproteiden hin auf Grund der Tollens'schen Orcin- und Phloroglucinreaction, die er mit fast allen Organen erhielt. Am Nucleoprotein der Thyreoidea, Milz- und Hirnsubstanz stützte er diesen Befund noch durch den Schmelzpunkt der Osazone 158—160°. Ferner wiesen nach eine Osazon bildende Gruppe Ivar Bang⁴⁾ im Eiter, Bergell und Jacob⁵⁾ in der Milz, Slowtzoff⁶⁾ im Sperma, Friedenthal⁷⁾ in den Fermenten, Bendix und Eppstein⁸⁾ im Stierhoden. Mir⁹⁾ selber gelang es bereits vor 3 Jahren, aus dem Nucleoprotein der Leber durch Kochen mit Salzsäure einen Zucker abzuspalten, durch dessen Elementaranalyse das zu Grunde liegende Kohlehydrat mit Sicherheit als Pentose charakterisirt wurde.

Ueber die absoluten Mengen, in denen solche Pentosen-
gruppen im thierischen Organismus vorkommen, haben im
hiesigen Laboratorium Grund¹⁰⁾ und nach ihm Andere Unter-
suchungen angestellt, aus denen hervorgeht, dass, was das
absolute Gewicht anbelangt, die Leber das grösste Contingent
für den Pentosenvorrath liefert. Die Muskelsubstanz dürfte
wohl mit Fug unberücksichtigt bleiben: denn ihre procentisch

1) E. Salkowski, Centralbl. f. med. Wissensch. 1892, Nr. 19 u. 35.

2) E. Salkowski, Diese Zeitschr., Bd. XXVII, S. 535, 1899.

3) F. Blumenthal, Berl. klin. Wochenschr., 1897, Nr. 12, Zeitschrift f. klin. Medic., Bd. 34.

4) J. Bang, Deutsche med. Wochenschr. 1897, Nr. 21.

5) Bergell u. Jacob, Zeitschr. f. klin. Medicin.

6) Slowtzoff, Diese Zeitschr., Bd. XXXV, S. 358, 1902.

7) Friedenthal, Arch. f. Anatom. u. Physiol. 1900, S. 181.

8) Bendix u. Eppstein, Zeitschrift f. allgem. Physiol., Bd. 2, Heft 1, 1902.

9) J. Wohlgemuth, Berl. klin. Wochenschr. Nr. 31, 1900.

10) G. Grund, Diese Zeitschr., Bd. XXXV, S. 111.

berechnete Pentosemenge ist so gering, dass, wie auch Grund selbst sagt, die angegebene Gesamtmenge nur als grober Annäherungswerth gelten kann. Nachdem es nun Neuberg¹⁾ gelungen war, die Constitution der Pankreaspentose als die der l-Xylose aufzuklären und damit ihre Verschiedenheit von der pathologisch ausgeschiedenen Harnpentose, r-Arabinose darzuthun, schien es mir von Wichtigkeit, wenigstens für die Leber, das reichste Organ an gebundenen Pentosen, die Natur des vorliegenden 5-Kohlenstoffzuckers aufzuklären. Denn es war a priori nicht von der Hand zu weisen, dass hier eine anders constituirte Pentose vorliegt, die vielleicht mit der Harnpentose hätte in Beziehung gebracht werden können. Hinzu kommt, dass nach dem Befund von Paul Mayer²⁾ über die Existenz einer Glycuronsäure-Phenylhydrazinverbindung vom Schmelzpunkt der Pentose (158—160°), sowie nach den Feststellungen von Tollens³⁾ und seinen Schülern über das absolut gleiche Verhalten der Pentose und Glycuronsäure in Bezug auf ihre Farbenreaction ein Teil der früheren Untersuchungen keine bestimmte Entscheidung zwischen der Glycuronsäure und Pentose geliefert haben. Dieselbe ist, abgesehen von der Pankreaspentose⁴⁾, nur von mir⁵⁾ für die der Leber geführt, und an diese Feststellung knüpft folgende Untersuchung an.

Bevor ich die Frage von der Constitution des Zuckers selbst in Angriff nahm, schien es zweckmässig, um wenigstens ungefähr einen Anhaltspunkt über dessen Natur zu haben, zunächst mittelst des Neuberg'schen Verfahrens im Pyridin-Alkoholgemisch das Pentosazon durch Polarisation genauer zu bestimmen. Darum unterzog ich 25 g Nucleoprotein der Spaltung mit Bromwasserstoffsäure am Rückflusskühler. Ich richtete mich genau nach der Vorschrift von Neuberg.⁶⁾ Nach drei-

1) C. Neuberg, Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch. Nr. 8, 1367, 1902.

2) Paul Mayer, Diese Zeitschrift, Bd. XXIX, S. 59.

3) Tollens und seine Mitarbeiter, Ber. d. deutsch. chem. Gesellschaft Nr. 22, 1046; Nr. 29, 1202. Ann. d. Chem. 254, 329, 260, 304.

4) E. Salkowski l. c.

5) F. Wohlgenuth l. c.

6) Neuberg l. c.

stündigem Erhitzen auf freiem Feuer, wobei die Anfangs hellgelbe Lösung eine tief dunkelbraune Farbe angenommen hatte, wurde von einzelnen noch ungelösten Bestandtheilen abfiltrirt und das Filtrat unter Erwärmen auf dem Wasserbad mit Bleicarbonat neutralisirt. Die Flüssigkeit gab die Trommer'sche Probe und zeigte deutliche Linksdrehung. Von dem in grosser Menge ausgefallenen Bromblei wurde nach 24stündigem Stehen abfiltrirt und das Filtrat im Vacuum bei 35° eingeengt, wobei die Lösung derartig schäumte, dass die Procedur öfters unterbrochen werden musste. Aus dem so erhaltenen dickflüssigen Syrup wurde der Zucker durch mehrmaliges Extrahiren mit 96^o igeim Alkohol gewonnen und die gesammte Alkoholmenge bis auf 100 cem eingeengt. Die Titration mittelst Fehling'scher Lösung ergab einen Gehalt von ca. 1 g Zucker insgesamt. Nach Verdampfen des Alkohols wurde der Rückstand mit wenig Wasser aufgenommen, mit 2 cem Phenylhydrazin und 4 cem Essigsäure versetzt und 48 Stunden im Brutschrank stehen gelassen, ein Verfahren, das nach der Beobachtung von C. Neuberg für die Darstellung von Osazonen sehr geeignet ist. Dabei schied sich eine grosse Menge Osazon ab, das abgesaugt und nach zweimaligem Umkrystallisiren vollkommen analysenrein war.

Das Präparat schmolz bei $158-160^{\circ}$ und zeigte in dem von Neuberg angegebenen Pyridinalkoholgemisch im Halbschattenapparat eine Drehung von $-0^{\circ}15'$, was mit der Drehung des Xylosazons ($0^{\circ}12'$) hinreichend übereinstimmt. Damit war ein Fingerzeig für die weitere Untersuchung gegeben, und ich konnte nun an die Verarbeitung des übrigen Nucleoproteids herangehen.

150 g Nucleoprotein wurden in 3 Portionen zu je 50 g mit einer Lösung von 50 cem rauchender Bromwasserstoffsäure ($D = 1.49$) in der bereits oben angegebenen Weise verarbeitet, noch heiss mit Bleicarbonat neutralisirt und sämtliche Filtrate von den Bleisalzen zusammen verarbeitet und 6-8 Mal mit heissem 95^o igeim Alkohol extrahirt. Die alkoholischen Zuckerkösungen schieden beim Stehen in der Kälte einen noch nicht näher untersuchten Niederschlag (wahrschein-

lich eine Xanthinbase aus. Es wurde davon abfiltrirt, der Alkohol im Vacuum eingeengt und der von Alkohol befreite Syrup in 400 cem Wasser aufgenommen. Da in dem Vorversuch bei der Titration mit Fehling die Zersetzungsproducte des Eiweisses, die in dem Syrup noch gelöst waren, durch die Biuretreaction sich störend bemerkbar machten, so wurde dieses Mal von der Titration Abstand genommen und durch die Bestimmung des Furfurols in einem aliquoten Theil der Lösung der Gehalt an Pentosen berechnet. Die Bestimmung ergab 8.3030 g Pentose in der Gesamtlösung.

Zur Ueberführung der Pentose in die Pentonsäure wurde die Lösung mit 10 g Brom versetzt, das sich beim Schütteln in einigen Stunden löste. Nach $1\frac{1}{2}$ Tagen wurde der Ueberschuss an Brom durch Erwärmen auf dem Wasserbad und der gebildete Bromwasserstoff durch Kochen mit Bleicarbonat entfernt. Die nach dem Erkalten vom Bromblei abfiltrirte Lösung enthielt das normale Bleisalz der gebildeten Säure.

Zur Entfernung aller bei der Isolirung möglicher Weise störender Substanzen wurde die Lösung mit Bleiacetat versetzt und von dem dadurch hervorgerufenen Niederschlag abfiltrirt. Derselbe wurde nicht weiter berücksichtigt, da er von der gesuchten Pentonsäure nichts enthielt. Das Filtrat wurde abwechselnd mit Ammoniak und Bleiessig in kleinen Mengen versetzt, solange noch ein Niederschlag entstand, und die reichliche voluminöse Fällung auf einem Filter mehrmals mit kaltem Wasser gewaschen. Das so gereinigte ammoniakalische Bleisalz der Pentonsäure wurde darauf in wässriger Suspension mit Schwefelwasserstoff anfangs in der Kälte, zuletzt bei leichter Erwärmung auf dem Wasserbad zerlegt, wobei die Pentonsäure frei wurde und in Lösung ging.

Vom Schwefelblei wurde abfiltrirt und ein Theil des wasserklaren Filtrats zur Darstellung des Brucinsalzes der Pentonsäure verwandt. Unter starkem Erwärmen wurde dieser Portion soviel Brucin zugesetzt, bis die Lösung alkalisch reagierte; dabei ging die freie Pentonsäure mit einem Theil des Alkaloids in Bindung, während das frei gebliebene überschüssige Brucin durch Ausschütteln mit Chloroform aus der

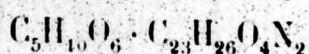
Lösung extrahirt werden konnte. Beim Einengen der Lösung krystallisirte das Salz sofort aus. Nach einmaligem Umkrystallisiren und Reinigen mit Knochenkohle erhielt ich das Salz vollkommen analysenrein. Es zeigte dieselbe Eigenschaft, wie das von Neuberg aus reiner Xylonsäure dargestellte und beschriebene: Es löste sich wenig in kaltem Wasser und Alkohol, in beiden, besonders im Wasser, leichter in der Wärme, löste sich auch etwas in heissem Aceton, während es in den übrigen organischen Solventien nicht oder nur in Spuren löslich war. Unter dem Mikroskop sah man rhombische Tafeln mit einspringenden Ecken oder feine Nadelchen, die mitunter zu grossen Drusen vereinigt waren. Der Schmelzpunkt der Substanz lag bei 174 bis 176°; die Drehung betrug in wässriger Lösung:

$$[\alpha]_D^{15} = -37.25' (l = 1, c = 2.013, a = -0.645').$$

Die Elementaranalyse ergab:

0.2275 g Substanz: 10.0 ccm N (14°, 764 mm).

0.1818 g Substanz: 0.4013 CO₂; 0.1080 H₂O.



Berechnet: C 60.00; H 6.43; N 5.00.

Gefunden: C 60.20; H 6.61; N 5.20.

Durch diese Verwandlung in l-Xylonsäure ist der Zucker des Nucleoproteids der Leber sicher als l-Xylose¹⁾ gekennzeichnet, als dasselbe Kohlehydrat, das Neuberg im Pankreasprotein gefunden hat, und es gewinnt nunmehr die Annahme an Sicherheit, dass die in sämtlichen Nucleoproteiden enthaltene Pentose l-Xylose ist. Es wird sich daher empfehlen, in Zukunft stets, wie es bisher schon vereinzelt geschehen ist, etwaigen Berechnungen über den Pentosengehalt thierischer Organe Werthe für l-Xylose zu Grunde zu legen.

Aus den erwähnten quantitativen Untersuchungen geht hervor, dass Leber- und Pankreasentosen die Hauptmenge

¹⁾ Dass hier nicht Aminoxylose vorliegt, geht daraus hervor, dass die Aminozucker bei der Oxydation mit Bromwasser ihre NH₂-Gruppe nicht verlieren, sondern in Oxyaminosäuren übergehen (E. Fischer und Tie mann, Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. 27, S. 142).

des im Thierkörper vorhandenen Pentosenmaterials ausmachen. Diese können jedoch in Folge ihrer abweichenden Constitution (l-Xylose) mit der Harnpentose (r-Arabinose) nichts gemein haben. Nun aber ist der von dem Pentosenvorrath des Thierkörpers verbleibende Rest, der auf die übrigen Organe entfällt, viel zu gering, um für eine Betheiligung am Zustandekommen des pentosurischen Stoffwechsels ernstlich in Betracht zu kommen; selbst wenn man die unwahrscheinliche Annahme machen wollte, dass der noch nicht untersuchte Fäufkohlenstoffzucker dieser Proteide r-Arabinose ist.

Danach ist auch diese Untersuchung wieder eine Stütze für die Hypothese, dass bei der Pentosurie der Zucker im Organismus synthetisch gebildet wird, eine Anschauung, für die Neuberg und ich¹⁾ bereits durch Verfütterung von r-Arabinose den experimentellen Beweis erbracht haben, und für die auch die klinischen Untersuchungen von Bial und Blumenthal²⁾ sprechen.

1) C. Neuberg und J. Wohlgemuth, Diese Zeitschrift, Bd. XXXV, S. 41.

2) Bial und Blumenthal, Deutsch. med. Wochenschrift, 1902.