

Über die Wirkung des reinen Hundemagensaftes auf das Hämoglobin, resp. Globin.

(Zweite Mitteilung).

Von

S. Salaskin und Katharina Kowalevsky.

(Aus dem physiologisch-chemischen Laboratorium der medizinischen Hochschule für Frauen und aus der chemischen Abteilung des Instituts für experimentelle Medizin zu St. Petersburg).

(Der Redaktion zugegangen am 19. Mai 1903.)

Vorliegende Arbeit bildet eine Fortsetzung der Untersuchungen, welche der eine von uns begonnen hat¹⁾ und welche das Studium der bei protrahierter Einwirkung von Magensaft auf Eiweiß entstehenden Endprodukte bezwecken. Isoliert und untersucht wurden fürs erste diejenigen Körper, welche mit Phosphorwolframsäure nicht ausgefällt werden können. Das Studium der basischen Produkte wird den Inhalt weiterer Mitteilungen bilden.

Von den die Einwirkung von Magensaft auf Eiweiß behandelnden Literaturangaben interessieren uns nur diejenigen, welche die Frage, wie weit die Zersetzung des Eiweißmoleküls unter Einwirkung des von den Verdauungsdrüsen des Magens produzierten Eiweißenzym²⁾ geht, betreffen. Diese Frage gehört nicht zu den neuen. Vor 30 Jahren haben Lubavin³⁾ und

¹⁾ Siehe S. Salaskin, Diese Zeitschr., Bd. XXXII (1901), S. 592.

²⁾ Wir vermeiden absichtlich den Terminus «Pepsin». Nach den Untersuchungen von J. Pawlow und S. Paraschtschuk darf man weder von Pepsin noch von Labferment, sondern ausschließlich von der Pepsin- oder Labwirkung des von den Magendrüsen produzierten Enzyms reden.

³⁾ Lubavin, Med. chem. Unters. v. Hoppe-Seyler, Bd. IV (1871), 463—485.

Möhlenfeld¹⁾ festgestellt, daß bei der Einwirkung von Magensaft auf Eiweiß unter anderm Leucin und Tyrosin entstehen. Auf diesen Untersuchungen fußend, sagt Hoppe-Seyler²⁾ in seinem Lehrbuche, daß «bei verlängerter Einwirkung der Verdauungsflüssigkeit sich aus den Peptonen langsam Leucin, Tyrosin und unbekannte Körper bilden». «Kühne», fährt Hoppe-Seyler fort, «hat diese weitere Spaltung bei der Magenverdauung mit Unrecht bestritten!» Kühne³⁾ sagt an der Stelle, auf die Hoppe-Seyler Bezug nimmt: «Die Angabe, daß durch Pepsinverdauung Eiweißstoffe, namentlich das Casein, in Peptone einerseits, in Leucin und Tyrosin andererseits zersetzt würden, beruht auf Irrtum. In den Arbeiten von Lubavin und von Möhlenfeld, welche es behaupten, ist übersehen, daß die Magenschleimhaut und besonders das daraus durch Glycerin extrahierte Rohenzym bedeutende Quantitäten Leucin und Tyrosin bei der Auflösung in verdünnten Säuren geben. Casein, mit gereinigtem Pepsin vollständig verdaut, gibt keine Spur Leucin oder Tyrosin». Dank der Autorität Kühnes faßte die Ansicht, daß das sogenannte «Pepsin» Eiweißstoffe nur bis zur Bildung von Peptonen zersetzt, Fuß und fand in allen Lehrbüchern Aufnahme.

Die Frage wurde durch die Arbeit von Lawrow,⁴⁾ welche im Jahre 1897 aus dem Laboratorium von Prof. A. Danilewsky hervorgegangen ist, wieder auf die Tagesordnung gebracht. «12 kg der frischen, sorgfältig gewaschenen und vom Schleim und Fettgewebe befreiten Schweinemagen wurden mit 35 l 0,6^o/iger Salzsäure unter Zusatz von 175 ccm Chloroform und Thymol ungefähr zwei Monate bei 40–45^o gehalten» (l. c. 515). Das neutralisierte Filtrat wurde im Wasserbade eingedickt, beim Erkalten verwandelte sich das eingeeengte

¹⁾ Möhlenfeld, Pflügers Arch., Bd. 5 (1872), S. 381–400.

²⁾ Physiologische Chemie. Berlin 1881, S. 228.

³⁾ Verhandl. d. naturhist.-mediz. Vereins zu Heidelberg. N. F. I. Bd. (1877), 237.

⁴⁾ Über den Chemismus d. peptischen u. tryptischen Verdauung des Eiweißes. Inaug.-Diss. St. Petersburg. 1897. Im Auszuge ist diese Arbeit in dieser Zeitschr., Bd. XXVI (1898/99), S. 513, abgedruckt.

Filtrat in eine krystallinische Masse. Der zwischen Fließpapierblättern sorgfältig ausgepreßte und bei Zimmertemperatur getrocknete Niederschlag wog ca. 1,5 kg. Bei mikroskopischer Untersuchung fanden sich Leucinkugeln; die wässerige Lösung der Krystalle zeigte keine Millonsche Reaktion. Die erhaltenen krystallinischen Produkte wurden erst bedeutend später von Lawrow¹⁾ einer genauern chemischen Untersuchung unterworfen. Hierbei konnte er Leucin, Amidovaleriansäure, Asparaginsäure, Tetramethyldiamin und Pentamethyldiamin ausscheiden. Daß diese Produkte, wenigstens der größte Teil derselben, während der Selbstverdauung der Mägen entstanden waren, nicht aber in ihnen von vornherein enthalten waren, unterliegt unsrer Meinung nach keinem Zweifel; bezweifelt könnte nur die Frage werden, ob man auf Grund von Versuchen, in welchen es sich um Selbstverdauung des Magens handelt, auch dem Magensaft die Fähigkeit, Eiweißstoffe bis zu krystallinischen Produkten zu zersetzen, zuerkennen kann. Diese Zweifel sind durchaus begründete, da wir wissen, daß die Organe und Gewebe der sogenannten Autolyse unterliegen können, und bestärkt werden unsere Zweifel noch dadurch, daß zu Lawrows Versuchen nicht nur die Magenschleimhaut, sondern der ganze Magen verwandt wurde.²⁾ Jedenfalls aber gab Lawrows Arbeit den Anstoß zur Revision einer Frage, die bereits gelöst schien.

Zuntz³⁾ weist in seiner Arbeit «Über den quantitativen Verlauf der peptischen Eiweißspaltung» unter anderm darauf hin, daß schon ganz im Beginn der peptischen Verdauung ein bedeutender Teil des Eiweißstickstoffes durch Körper, welche keine Biuretreaktion zeigen, repräsentiert ist. «Allem Anschein nach», fügt der Verfasser hinzu, «stellen diese die Biuretreaktion nicht mehr gebenden Stoffe auch die Hauptmasse der bei intensiver Pepsinverdauung gebildeten Endprodukte dar. Inwieweit dieser Befund die angefochtenen Angaben von Hoppe-Seyler

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. XXXIII (1901), S. 312.

²⁾ Vgl. hierzu die Bemerkung Salkowskis, Diese Zeitschr., Bd. XXXV, S. 546.

³⁾ Diese Zeitschr., B. XXVIII (1899), S. 132.

und seinen Schülern über das Auftreten von Aminosäuren bei Pepsinverdauung, sowie auch die ähnlichen gelegentlichen Beobachtungen von Lawrow aus jüngster Zeit bestätigt, bleibt dahingestellt (l. c. 171)».

Pfaundler,¹⁾ der die Endprodukte der Magenverdauung von Eiweißstoffen studiert hat, formuliert seine Ergebnisse in folgender Weise (l. c. 98): «Die Frage, ob die der Biuretreaktion entbehrenden Endprodukte der Pepsinverdauung ganz oder zum Teil einfache Aminosäuren sind, kann auf Grund des Serumalbuminversuches nur verneint werden. Denn wenn Leucin und Tyrosin überhaupt Endprodukte der Pepsinverdauung darstellen, so wäre in diesem Versuche, bei sechsmonatlicher Dauer der Digestion, die ja nahezu zum Verschwinden der Albumosen geführt hatte, sicher das Auftreten derselben in beträchtlichen Mengen zu erwarten gewesen. Daß sie nicht gefunden wurden, während der Nachweis des Leucins unter den durch Salzsäure erhaltenen Spaltungsprodukten des Verdauungsrestes ohne Schwierigkeit gelang, spricht ganz entschieden gegen ihre Bildung bei der Pepsinverdauung. Freilich läßt sich bei den Schwierigkeiten, die sich dem Nachweise der Asparagin- und Glutaminsäure, sowie auch der Diaminsäuren entgegenstellen, dieser Schluß nur unter gewisser Wahrscheinlichkeit auf die übrigen aus Eiweiß erhältlichen Aminosäuren ausdehnen.»

Dem einen von uns²⁾ ist es bei den Versuchen über Einwirkung von Magensaft auf das Hämoglobin gelungen, aus dem Verdauungsgemisch Leucinimid zu gewinnen; dieser Befund berechtigte mich zu der Behauptung, daß «bei der protrahierten peptischen Verdauung auch krystalloide Produkte entstehen, was schon von Hoppe-Seyler und vor kurzem von Lawrow hervorgehoben wurde» (l. c. 597).

Weiter folgt die Arbeit von Langstein.³⁾ In einem Versuche unterwarf er 700 g Eiweiß des Pferdeserums im Laufe von 12 Monaten der Einwirkung einer 2%igen Lösung von Grüblerschem Pepsin in 1% H_2SO_4 . Das Volumen des

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. XXX (1900), S. 90.

²⁾ Salaskin, Diese Zeitschr., Bd. XXXII (1901), S. 592.

³⁾ Hofmeisters Beiträge, Bd. I (1902), 507 u. Bd. II, S. 229.

Verdauungsgemisches betrug ungefähr 40 Liter. In einem andern Versuche wurden 500 g krystallinischen Eieralbumins im Laufe von 12 Monaten der peptischen Verdauung ausgesetzt; in diesem Falle betrug das Volumen des Verdauungsgemisches ca. 30 Liter. «Als Produkt langandauernder peptischer Spaltung sind folgende Körper isoliert worden: Leucin, Tyrosin, Phenylalanin, Glutaminsäure, Asparaginsäure, Cystin, Lysin, Pentamethylendiamin, Oxyphenyläthylamin, ein polymeres stickstoffhaltiges Kohlehydrat». Außerdem konnte die Anwesenheit noch anderer Körper, welche jedoch wegen zu geringer Quantität des Untersuchungsmaterials nicht identifiziert wurden, nachgewiesen werden. Bei der Beurteilung seiner Ergebnisse, sowie auch besonders der Ergebnisse Lawrows wirft der Verfasser die Frage auf, ob nicht etwa die bei diesen Untersuchungen beobachtete Spaltung der Eiweißstoffe bis zu krystallinischen Produkten von dem von Glaebner im Pylorusteil des Magens entdeckten Pseudopepsin abhängen konnte. Diese Vermutung verliert gegenwärtig ihre Gültigkeit ganz und gar. Klug¹⁾ zieht aus seinen Untersuchungen den Schluß: «es gibt kein Pseudopepsin». Diese Behauptung hat, wie dem einen von uns auf Grund einer persönlichen Mitteilung von J. Pawlow bekannt ist, in den im Laboratorium dieses letzteren vorgenommenen Arbeiten ihre volle Bestätigung gefunden; J. Pawlow hat außerdem mit unbestreitbarer Sicherheit auch alle Fehlerquellen Glaebners aufgedeckt, so daß wir jetzt keinen triftigen Grund besitzen, von Pseudopepsin zu reden: es existiert nicht. Bei der Abschätzung von Langsteins Ergebnissen kann ein anderer Umstand unsern Zweifel erregen; es fragt sich nämlich, was mit Eiweißsubstanzen geschehen würde, wenn wir sie im Laufe eines Jahres bei einer Temperatur von 37—40° C. der Einwirkung einer 1%igen Schwefelsäurelösung unterwerfen wollten. Das Enzym besitzt keine auflösende, sondern nur eine beschleunigende Wirkung, d. h. im Laufe eines bedeutenden Zeitraumes kann mit der Säure der nämliche Effekt erzielt werden, wie mit dem Magen-

¹⁾ Über das Ferment der Pylorusschleimhaut. Pfl. Arch. Bd. 92 (1902), S. 281.

saft. Außerdem nimmt die verdauende, resp. spaltende Wirkung des Enzyms allmählich ab und hört schließlich ganz auf; deshalb können wir mit Recht annehmen, daß in Langsteins Versuchen die spaltende Wirkung früher ausgeblieben ist, als wie er die Verdauung unterbrach; folglich kann hier wohl kaum davon, daß Eiweißstoffe im Laufe von 12 Monaten der Einwirkung des Eiweißenzym des Magensaftes ausgesetzt wurden, die Rede sein.

Aus allem oben Angeführten geht hervor, daß das Studium der Einwirkung von reinem Magensaft auf Eiweißsubstanzen, welches einige der erwähnten Zweifel lösen könnte, sowohl von Interesse, als auch von Bedeutung ist.

In folgendem wollen wir über die Ergebnisse, zu denen wir auf Grund unseres Studiums gekommen sind, berichten.

Versuche.

In sämtlichen Versuchen verwandten wir zweimal umkrystallisiertes und zwischen Fließpapierblättern sorgfältig getrocknetes Hämoglobin des Pferdeblutes. Magensaft wurde durch Scheinfütterung von nach J. Pawlow operierten Hunden gewonnen. Der Magensaft wurde dem zu verdauenden Hämoglobin in einzelnen Portionen von je 400—600 ccm in Zwischenräumen von 3 bis 5 Tagen zugesetzt. Nachdem sich ein aus abgespaltenem Hämatin bestehender Niederschlag gebildet hatte, wurde er abfiltriert, wonach wir das Filtrat einer erneuten Verdauung aussetzten. Die Verdauungskraft des Magensaftes betrug nach Mett 4—5 mm., die Acidität ca. 0,5 %.

	Vers. 1	Vers. 2
Oxyhämoglobin, auf den Trockenrückstand berechnet	145 g	223 g
Verdauungsdauer	57 Tage	44 Tage
Menge des im ganzen hinzugefügten Magensaftes	3890 ccm	5450 ccm.

Zu Ende der Verdauungsperiode war die Flüssigkeit in beiden Fällen durchsichtig, in dicker Schicht gelbbraun gefärbt. Sättigten wir die zum Sieden erhitzte Flüssigkeit mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, so bildete sich ein unbedeutender Niederschlag; bei Zusatz von CuSO_4 kein Niederschlag. Mit der Hellerschen Probe erzielten wir nur einem kaum wahrnehmbaren Ring; nach der Neutrali-

sation — eine kaum merkliche Opaleszenz. Die Biuretreaktion fiel in stark roter Färbung aus.

Es wurden nun beide Portionen zusammengewaschen. Zur Entfernung der HCl wurden sie mit PbO behandelt, dann der Niederschlag abfiltriert, im Filtrate der Bleiüberschuß durch H₂S ausgeschieden, die vom PbS abfiltrierte Flüssigkeit durch den Luftstrom vom H₂S befreit und hierauf zwecks Entfernung der übrig gebliebenen Salzsäure mit feuchtem Ag₂O behandelt; weiter wurde durch das Filtrat wieder Schwefelwasserstoff geleitet und dieser letztere, nach Entfernung des Ag₂S durch Filtration, durch den Luftstrom verdrängt. Die erhaltene alkalische Flüssigkeit, welche in dicker Schicht schwach gelbgefärbt erscheint, wurde nun bei mäßiger Temperatur bis zu verhältnismäßig geringem Volumen eingeeengt. Beim Stehen der konzentrierten Flüssigkeit bildete sich ein krystallinischer Niederschlag. Die Krystalle bieten in ihrem Aussehen Ähnlichkeit mit Tyrosinkrystallen, zeigen die Hoffmannsche Reaktion. Die abfiltrierten Krystalle wurden mehrmals aus Ammoniaklösung umkrystallisiert, dann mit Wasser ausgewaschen; sie wogen 0,2 g, wurden mit ebensolchen Krystallen, welche wir in den weiteren Versuchen erhielten, zusammen analysiert (siehe dort die Ergebnisse der Analyse) und erwiesen sich als Tyrosinkrystalle. Die von ihnen abfiltrierte Flüssigkeit wurde zweimal mit 700 ccm Essigäther extrahiert, dann der Äther aus dem Extrakte entfernt, die übrig gebliebene Flüssigkeit im Wasserbade bis zur Trockene verdampft. Der schmutzigbraune Niederschlag wurde weiter mit kaltem Alkohol behandelt, der nicht gelöste Rückstand abfiltriert, mit Alkohol ausgewaschen und dann in einem Gemisch von Alkohol und Essigäther gelöst. Hierauf wurde die Flüssigkeit filtriert, mit Wasser verdünnt und Alkohol und Äther durch Verdampfen im Wasserbade verdrängt; schließlich wurde der hierbei entstehende Niederschlag abfiltriert, mit Wasser ausgewaschen, erst auf Fließpapier, dann im Vacuumapparat über Schwefelsäure getrocknet. Seine Menge reichte nicht zur Ausführung einer Elementaranalyse aus. Sein Schmelzpunkt ist 265—267° (unkorr.). Allen seinen Eigenschaften nach entspricht er dem Leucinimid, welches der eine von uns

schon früher bei der peptischen und tryptischen Verdauung des Globins isoliert hat.¹⁾

Aus dem mit Essigäther bearbeiteten Hauptfiltrat entfernten wir den Äther durch Verdampfen im Wasserbade. Hiernach beträgt das Volumen der Flüssigkeit 690 ccm; sie enthält 30 g N, 188 g Trockenrückstand.

620 ccm dieser Flüssigkeit wurden nun mit Wasser bis auf 5 Liter nachgefüllt, mit H_2SO_4 bis zu 1% Gehalt angesäuert, mit 33%iger Phosphorwolframsäurelösung niedergeschlagen; die vollständige Ausscheidung des Niederschlages erforderte 2100 ccm Phosphorwolframsäure. Weiter wurde der Niederschlag mit 0,5%iger Schwefelsäurelösung ausgewaschen; nach jeder Waschung preßten wir den Niederschlag zwischen Fließpapierblättern aus und vermengten ihn dann mit 0,5%iger H_2SO_4 . Das hierbei erhaltene Filtrat und das Waschwasser behandelten wir mit Ätzbaryt, filtrierten den dabei entstehenden Niederschlag ab und wuschen ihn mit Wasser aus. Letzteres Filtrat und Waschwasser wurden mit CO_2 behandelt, eingengt, filtriert. Die Menge des endgültigen Filtrates betrug 4540 ccm; es enthielt 8 g Stickstoff, d. h. in das Filtrat waren 26% des Gesamtstickstoffes übergegangen.

In dem nun stark eingengten Filtrate fiel ein krystallinischer Niederschlag zu Boden; bei mikroskopischer Untersuchung gewahrt man in diesem charakteristische Leucinkugeln. Zur Isolierung der Aminosäuren wurde das von E. Fischer²⁾ vorgeschlagene Verfahren angewandt. Die Destillation der Äther der Aminosäuren fand bei Druck von ca. 15 mm statt.

- | | | | |
|-------------|-----------|---|--------|
| 1. Fraktion | 40°—55° | — | 2,3 g |
| 2. » | 55°—110° | — | 13,4 » |
| 3. » | über 110° | — | 2,0 » |

Die erste und die zweite Fraktion wurden durch 5stündiges Kochen mit dem zehnfachen Volumen Wasser am Rückflußkühler verseift. Die aus der zweiten Fraktion erhaltene Lösung unterwarfen wir der fraktionierten Krystallisation und erhielten

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. XXXII (1901), 592.

²⁾ Diese Zeitschr., Bd. XXXIII (1901), S. 153 u. ff.

hierbei perlmutterglänzende Blättchen, welche zur Elementaranalyse verwandt wurden.

0,2228 g der Substanz lieferten 0,4481 g CO ₂ und 0,2011 g H ₂ O.	
Berechnet für C ₆ H ₁₃ NO ₂ :	Gefunden:
C = 54,96 %	54,86 %
H = 9,92 %	10,03 %

Diese Substanz war also Leucin. Die übrigen ausgeschiedenen Fraktionen von Krystallen wurden zu den bei den folgenden Versuchen erhaltenen Fraktionen hinzugefügt.

	Vers. 3	Vers. 4
Oxyhämoglobin, auf den Trockenrückstand berechnet	271 g	474 g
Verdauungsdauer	30 Tage	37 Tage
Menge des im ganzen hinzugefügten Magensaftes	7110 ccm	7020 ccm
7110 ccm Magensaft enthielten N	1,86 g	

Beide Portionen wurden zusammengegossen. Eigenschaften und Reaktion des Verdauungsgemisches waren dieselben wie in Versuch 1 und 2. Nach Neutralisation mit Ba(OH)₂ wurde von dem geringen Neutralisationsniederschlage abfiltriert, das Filtrat bedeutend eingeengt und nach Entfernung des Barytüberschusses durch Schwefelsäurezusatz mit Phosphorwolframsäure (es waren 2400 ccm der 33%igen Lösung erforderlich) gefällt. Weiter wurde der Phosphorwolframniederschlag, wie auch früher, mit H₂SO₄ ausgewaschen und das Waschwasser besonders gesammelt; nach üblicher Behandlung mit Ba(OH)₂ und Eindickung desselben bildete sich in ihm beim Stehen ein krystallinischer Niederschlag. Dieser wurde abfiltriert, mit Wasser ausgewaschen und zweimal aus heißer ammoniakalischer Lösung umkrystallisiert. Nach all seinen Eigenschaften zu urteilen, stellt dieser Körper Tyrosin dar. Er wurde mit demselben, in Versuch 1 und 2 erhaltenen Niederschlage (siehe S. 573) vermengt. Zwecks endgültiger Reinigung¹⁾ wurde das Gemisch der Niederschläge im Kolben mit Wasser zum Sieden erhitzt, dann NH₃ bis zu vollständiger Lösung des Ganzen hinzugetan; der heißen Lösung wurde nun vorsichtig Bleiessig bis zur Bildung eines farblosen Niederschlages hinzugesetzt,

1) Siehe Hlasiwetz u. Habermann, Liebigs Ann. N. F., Bd. 93 (1875) 151—166.

sofort abfiltriert, das Filtrat fast bis zum Sieden erhitzt, dann mit verdünnter Schwefelsäure zwecks Neutralisation des NH_3 und Bleiausscheidung versetzt, die heiße Lösung rasch abfiltriert. Nach dem Erkalten wurde ein seidenartig schimmernder, die Hoffmannsche Reaktion zeigender Niederschlag ausgeschieden. Bei der Stickstoffbestimmung desselben erhielten wir folgende Zahlen:

0,2252g Substanz gaben	16,2ccm N (757,5 mm, t 24,5)
Berechnet auf $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_3$:	Gefunden:
7,74 %	8,07 %

Nachdem das Tyrosin abfiltriert worden war, wurde das Waschwasser zwecks Entfernung des Baryums mit H_2SO_4 bearbeitet, dann das BaSO_4 abfiltriert. In dem Filtrate bildet sich nach Zusatz von Phosphorwolframsäure ein Niederschlag, welcher dadurch bedingt ist, daß beim Waschen des ursprünglichen Phosphorwolframniederschlags sich ein Teil desselben gelöst hat; deshalb wurde das Filtrat von neuem mit Phosphorwolframsäurelösung gefällt, dann die Flüssigkeit von dem hierbei entstehenden Niederschlage abgossen; der Niederschlag ist von teigiger Konsistenz und klebrig; zwecks vollkommener Reinigung wurde er mehrmals in angesäuertem Wasser zerstampft, dann mit heißem Wasser extrahiert, die heiße Lösung von dem unlöslichen Teile abfiltriert; nach Erkalten der Lösung fällt ein Niederschlag, der die nämlichen Eigenschaften wie der ursprüngliche besitzt, zu Boden; es wurde nun die Mutterlauge abgossen, der Niederschlag aber in heißem Wasser gelöst und mit heißer Barytlösung versetzt. Da das Phosphorwolframat in seinen Eigenschaften an diejenigen erinnert, welche E. Schulze und E. Winterstein¹⁾ als für das Phosphorwolframat des Phenylalanins charakteristische Merkmale beschreibt, so hielten wir uns in der weiteren Bearbeitung genau an die Angaben von E. Schulze und Winterstein (l. c. 215), d. h. es wurde zu der vom Baryumphosphorwolframat abfiltrierten, mit CO_2 bearbeiteten und sodann

1) Diese Zeitschr., Bd. XXXV (1902), S. 215.

eingedickten Flüssigkeit Kupferacetat hinzugetan. Der hierbei entstehende Niederschlag wurde sodann abfiltriert, ausgewaschen, in Wasser suspendiert und mit H_2S zersetzt. Weiter wurde die von dem Kupfersulfid abfiltrierte Flüssigkeit durch Verdampfen bis zur Bildung einer krystallinischen Kruste konzentriert und mit Alkohol versetzt, dann der abfiltrierte Niederschlag in das Hydrochlorat übergeführt, letzteres aus HCl umkrystallisiert, durch Ammoniak zersetzt, mit Wasser von dem Chlorammonium abgewaschen, in Wasser aufgelöst, die Lösung eingengt, schließlich mit dem 3—4fachen Volumen Alkohol versetzt; der hierbei entstehende abfiltrierte und getrocknete Niederschlag krystallisiert in atlasglänzenden Blättchen, schmilzt bei 266° . Seine charakteristischen Eigenschaften entsprechen also denen des Phenylalanins. Diese Krystalle wurden mit den nämlichen, bei Verarbeitung der nach E. Fischer (siehe unten) erhaltenen Fraktionen ausgeschiedenen Krystallen vermenget.

Das Waschwasser wurde nach Ausscheidung sämtlicher mit Phosphorwolframsäure einen Niederschlag bildenden Körper aus demselben zu dem ursprünglichen Filtrate hinzugetan. Die so entstandene Flüssigkeit wurde weiter mit $Ba(OH)_2$ und CO_2 behandelt, eingengt und von dem hierbei entstehenden Niederschlage abfiltriert, das in der Lösung übrig gebliebene Baryum durch Schwefelsäurezusatz ausgeschieden, das Baryumsulfat abfiltriert. Das Filtrat mißt 500 ccm. Bei Verdampfen eines geringen Teiles dieses mit Tierkohle vorbehandelten Filtrates werden Krystalle ausgeschieden, unter denen man bei mikroskopischer Untersuchung deutlich die charakteristischen Leucinkugeln gewahrt. Die 500 ccm Flüssigkeit enthalten 11,5 g N. Zwecks fraktionierter Scheidung wurde nach E. Fischer verfahren. Die Äther wurden bei ca. 15 mm Druck destilliert:

1. Fraktion	bis 40° C	10,7 g
2. „	„ 75° „	11,9 „
3. „	„ 110° „	8,7 „
4. „	„ 130° „	10,2 „
5. „	bei 130° „	8,2 „
6. „	bis 160° „	3,2 „
		<hr/> 52,9 g

1. Fraktion, bis 40° C.

Im Laufe von 5 Stunden mit dem 10 fachen Volumen Wasser am Rückflußkühler gekocht. Filtriert, durch Verdampfen eingengt, von dem in geringer Quantität ausgeschiedenen Niederschlage abfiltriert. Filtrat bis zur Trockene verdampft; Gewicht des Trockenrückstandes 1,1 g. Der Trockenrückstand in einer geringen Menge heißen Wassers gelöst und in 200 ccm heißen 95° Alkohols ausgegossen. An kühlem Orte stehen gelassen. Der ausgeschiedene Niederschlag abfiltriert. Die Elementaranalyse des Niederschlages ergab folgende Zahlen:

0,2207 g Substanz lieferten	0,3256 g CO ₂ ,	0,1556 g H ₂ O.
Berechnet für C ₃ H ₇ NO ₃ :	Gefunden:	
C = 40,45 %	40,23 %	
H = 7,86 %	7,83 %	

Es handelt sich also um Alanin.

2. Fraktion, 40—75°.

Wie Fraktion 1 bearbeitet, filtriert, bis zur Trockene verdampft. Der Rückstand in 1500 ccm Wasser gelöst, dann die Lösung im Laufe einer Stunde mit überschüssigem, frisch dargestelltem Kupferoxyd gekocht. Die Lösung der Kupferverbindungen abfiltriert, eingengt, die beim Verdampfen ausgeschiedenen Niederschläge abfiltriert; letzteres Filtrat, das die leichtlöslichen Kupferverbindungen enthält, bis zur Trockene verdampft.

3. Fraktion, 75—110°.

Wie Fraktion 1 und 2 bearbeitet, filtriert, bis zur Trockene verdampft. Aus dem Rückstande, wie aus demjenigen der Fraktion 2 Kupferverbindungen dargestellt. Durch Verdampfen der Lösung fraktionierte Krystallisationen erhalten. Die leicht löslichen Kupferverbindungen bis zur Trockene verdampft.

Die schwer löslichen Kupferverbindungen von Fraktion 2 und 3 vermengt, in kochendem Wasser aufgelöst; der beim Erkalten der Lösung sich bildende Niederschlag abfiltriert, getrocknet. Schließlich wurde der Kupfergehalt bestimmt.

0,2110 g Substanz lieferten 0,0521 g CuO.

Berechnet für $C_{12}H_{24}N_2O_4Cu$:

Cu = 19,62 %

Gefunden:

19,71 %

Die Ergebnisse der Analyse weisen auf eine Kupferverbindung des Leucins hin.

Bei entsprechender Verarbeitung der leicht löslichen Kupferverbindungen war ein Körper gefunden, der seinen Eigenschaften nach der Pyrrolidincarbonsäure glich. Seine Ausbeute war gering.

Fraktion 4, 5 und 6 wurden mit dem 5—6fachen Wasservolumen versetzt und die erhaltene wässrige Lösung mit dem gleichen Volumen Äther extrahiert. Weiter wurden die Ätherextrakte dreimal mit Wasser ausgewaschen und das Waschwasser zu der ursprünglichen Lösung hinzugegossen. Nun verdampften wir die Ätherextrakte, erhitzen den Rückstand mit Salzsäure, krystallisierten das erhaltene Hydrochlorat aus heißer Salzsäure um, filtrierten es ab, zerlegten es mit Ammoniak, verdampften zur Trockene und extrahierten das Chlorammonium mit Wasser. Der Rückstand wurde nun gelöst, mit Tierkohle gekocht, das Filtrat eingeeengt und mit dem 3—4fachen Alkoholvolumen vermennt, die seidenartig glänzenden, ausgeschiedenen Krystalle abfiltriert und mit den auf Seite 577 beschriebenen Krystallen vermennt. Sie schmelzen bei 266° unter stürmischer Gasentwicklung zu einem rotbraunen Öle.

Die Elementaranalyse dieser Krystalle ergab folgende Zahlen:

0,1957 g Substanz lieferten 0,4686 g CO_2 und 0,1187 g H_2O .

Berechnet für $C_9H_{11}NO_2$:

C 65,45 %

H 6,66 %

Gefunden:

65,31 %

6,69 %

Es handelte sich also um Phenylalanin.

Nach Ausscheidung des Phenylalanins wurden die übriggebliebenen ursprünglichen Lösungen zwecks Verseifung mit Barytwasser im Wasserbade erhitzt. Nach einigen Tagen wurde von dem Niederschlage (Barytsalz der Asparaginsäure) abfiltriert, das Filtrat zur Entfernung des Baryums mit Schwefelsäure behandelt. Weiter wurden die Filtrate zusammengegossen, verdampft, trockenes Chlorwasserstoffgas durch sie hindurchgeleitet, dann der ausgeschiedene Niederschlag, das Chlorhydrat der

Glutaminsäure, abfiltriert, das Filtrat durch Kochen mit Bleioxyd von der Salzsäure befreit und mit frischdargestelltem Kupferoxyd behandelt. Die umkrystallisierte Kupferverbindung ergab bei der Elementaranalyse folgende Zahlen:

0,2873 g Substanz lieferten 0,2585 g CO ₂ und 0,0675 g H ₂ O.	
Berechnet für CuC ₄ H ₅ NO ₄ :	Gefunden:
C = 24,67 %	24,54 %
H = 2,57 %	2,61 %

Die ausgeschiedene Kupferverbindung erwies sich also als asparaginsaures Kupfer.

Bei der Magensaftverdauung von Hämoglobin resp. Globin konnten wir also folgende Substanzen isolieren: das Alanin, Leucin, Phenylalanin, die Glutaminsäure, die Asparaginsäure, das Tyrosin und die Pyrrolidincarbonensäure. Letztere ist unter den Produkten der hydrolytischen Spaltung der Eiweißstoffe zum erstenmale von E. Fischer bestimmt worden, er fand sie auch bei der tryptischen Verdauung; uns ist es nun gelungen, sie auch unter den Produkten der peptischen Verdauung zu isolieren. Es unterliegt also keinem Zweifel, daß sie in dem Eiweißmolekül präformiert ist und daß sie als primäres Spaltungsprodukt anzusehen ist. In Anbetracht dieser Ergebnisse beabsichtigen wir, in allernächster Zeit Versuche mit Einverleibung dieser Säure in den tierischen Organismus anzustellen, um ihr Verhalten im Organismus und die Veränderungen, welche sie in ihm erfährt, zu studieren.

Wir wollen hier nun über einige von von uns festgestellte Tatsachen, deren genaueres Studium uns gegenwärtig beschäftigt, kurz berichten. Bei der Magensaftverdauung des krystallinischen Eieralbumins ist es uns gelungen, das Leucinimid zu isolieren und auch das Vorhandensein von Leucin nachzuweisen.

Außerdem ist in der das Leucinimid betreffenden Abhandlung des einen von uns¹⁾ auch die dort angewandte Verarbeitung des Verdauungsgemisches beschrieben worden. Der nach Alkoholzusatz sich bildende Niederschlag wurde mit absolutem

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. XXXII (1901), S. 593.

Alkohol ausgekocht, wobei wir ihn in einen unlöslichen, einen aus der abgekühlten Lösung sich ausscheidenden und einen hierbei in der Lösung verbleibenden Teil trennen konnten. Der nach dem Erkalten der Lösung ausgeschiedene Niederschlag zeigte die Millonsche und sehr intensive Biuretreaktion, erschien unter dem Mikroskop als amorphe Masse. Ca. 6 g dieses Niederschlags wurde im Laufe einer Woche der Einwirkung von 100 ccm Magensaft ausgesetzt. Aus diesem Verdauungsgemisch konnte Leucin leicht dargestellt werden.

In einem anderen Versuche nahmen wir 33 g desselben Niederschlages, setzten 600 ccm Magensaft hinzu und ließen 25 Tage im Thermostaten stehen. Nach Ausscheidung eines Niederschlages durch Phosphorwolframsäurezusatz und Entfernung der Salzsäure aus dem in gewohnter Weise bearbeiteten Filtrate durch Zusatz von Ag_2O erhielten wir beim Verdampfen desselben eine krystallinische Masse, aus welcher wir mit Leichtigkeit Leucin und Tyrosin darstellen konnten.

Wir glauben, daß wir es im gegebenen Falle mit einem Gemisch verschiedener amorpher Substanzen, die jedoch von verhältnismäßig einfachem Bestande und durch Magensaftwirkung leicht zu zersetzen sind, zu tun haben.

Ein genaueres Studium dieser Körper bietet unserer Meinung nach ein hervorragendes Interesse. Die künstliche Synthese des Eiweißes ist eine sich gegenwärtig immer mehr und mehr aufdrängende Aufgabe. Im Organismus findet diese Synthese Schritt für Schritt statt, ebenso wie auch die Eiweißzersetzung durch Eiweißenzyme ganz allmählich abläuft. Die erste Aufgabe bestände also in dem genauen Studium jener einfachen, jedoch immer noch verhältnismäßig komplizierten Eiweißzersetzungsprodukte, welche Hofmeister Peptoide genannt hat. Weiter hätte dann ihre synthetische Darstellung aus denjenigen Substanzen, welche wir als ihre Zersetzungsprodukte kennen, und erst an letzter Stelle die Synthese des komplizierteren Eiweißmoleküls zu folgen. Verwirklicht könnte diese Synthese auf zweifache Art werden, nämlich 1. auf rein chemischem Wege und 2. vermittelt der Eiweißenzyme. Der reversible Verlauf der Enzymreaktion ist für einige Enzyme

mit Sicherheit nachgewiesen. J. Pawlow hat uns durch seine wichtige Entdeckung der Unität von Chymosin und Pepsin den Beweis erbracht, daß auch die von den Eiweißenzymen ausgelöste Reaktion in zweifacher Richtung verlaufen kann. Das genaue Studium der physiologischen Eiweißspaltung durch Eiweißenzyme gibt uns also das Mittel, welches uns die Eiweißsynthese zu verwirklichen befähigen könnte, in die Hand. Daß die Eiweißsynthese im tierischen Organismus durch Vermittelung der Bildung verhältnismäßig einfacher Verbindungen stattfindet, das beweist uns folgende Beobachtung von Kutscher und Seemann: ¹⁾ indem sie das Schicksal der im Darmkanal gebildeten Aminosäuren zu verfolgen suchten, fanden sie dieselben weder in der Darmschleimhaut, noch in dem aus dem Darmkanale abfließenden Blute, jedoch konstatierten sie in der Darmschleimheit die Gegenwart eines Körpers, welcher keine Biuretreaktion zeigte und beim Kochen mit verdünnter Schwefelsäure leicht zersetzt werden konnte, wobei sich Aminosäuren bildeten. Dieser Körper kann als Ergebnis der ersten Synthese aus den Endprodukten der Eiweißspaltung angesehen werden.

Es unterliegt also keinem Zweifel, daß das Enzym des Magensaftes bei protrahierter Einwirkung Eiweißsubstanzen bis zur Bildung von krystallinischen Produkten zu spalten imstande ist. In vitro ist seine Wirkung eine viel schwächere, als wie diejenige des Trypsins; dieses berechtigt uns jedoch noch nicht zu dem Schlusse, daß im Organismus die Eiweißstoffe unter Einwirkung des Magensaftes keine so tiefen Veränderungen erfahren: im Organismus walten andere Verhältnisse vor, und die Frage kann nur durch entsprechende Untersuchungen gelöst werden; die von J. Pawlow eingeführte Methodik läßt an die Möglichkeit dieser Lösung denken.

Zum Schluß noch einige Worte über die Nomenklatur der Enzyme ²⁾ und speziell der Eiweißenzyme; die gegenwärtig üb-

1) Diese Zeitschr., Bd. XXXV [1902], S. 433.

2) Es wäre im höchsten Grade wünschenswert, daß die physiologischen Chemiker, um Mißverständnissen zu entgehen, die Bezeichnung «Ferment» ganz fallen ließen und nur das Wort «Enzym» gebrauchten,

liche gibt Anlaß zu Mißverständnissen, welche nicht aus dem Wesen der Dinge, sondern aus der ethymologischen Bedeutung der Worte hervorgehen. Nur auf diesem Boden sind Diskussionen, wie die zwischen Kutscher und Salkowski¹⁾ über das, was man als tryptisches Enzym zu bezeichnen hat, möglich. Gegenwärtig sind zu den Eiweißenzymen das entsprechende Enzym der Galle und des Darmsaftes (das Erepsin) hinzugekommen; fügt man noch die intracellulären Eiweißenzyme hinzu, so wächst die Zahl dieser Enzyme recht bedeutend an. Sie alle in die Kategorie des Pepsins oder Trypsins einzureihen, geht nicht an; die Entdeckung des Erepsins hat erwiesen, daß diese zwei Kategorien nicht genügen, und daß die Enzyme, was ihre Wirkung anbetrifft, sehr mannigfaltig sind: so entsprechen z. B. den verschiedenen Disacchariden spezifische Enzyme, das Invertin, die Maltase usw.; viel richtiger wäre es, das Wort «Eiweißenzym» als Gattungsname zu gebrauchen, die Speziesbezeichnung aber von der Bildungsstätte des Enzyms zu nehmen; in diesem Falle müßten wir also von dem Eiweißenzym des Magens, des Pankreas, des Darmsaftes, der Galle usw. reden. Diese, dem faktischen Tatbestande vollkommen entsprechende Bezeichnung birgt nichts Präjudizierendes in sich; und je weniger das der Fall ist, um so besser, denn dieses schließt einen Streit um Worte und nicht um das Wesen der Sache ganz aus. Die von v. Lippmann²⁾ vorgeschlagene Nomenklatur findet fürs erste für die Eiweißenzyme keine Anwendung, denn die Bezeichnung gestaltet sich hier nach dem Körper, welcher der Enzymwirkung unterworfen wird, und nach dem aus ihm entstehenden Produkte; so wird z. B. für das Enzym, welches Maltose und Glykose spaltet, die Bezeichnung «Maltoglykose» vorgeschlagen; bei der Einwirkung

als Ferment aber nur die organisierten Fermente bezeichneten. Augenscheinlich wird auch die Einwirkung der organisierten Fermente in kurzer Zeit auf die Summe der Wirkungen der in ihnen enthaltenen Enzyme zurückzuführen sein.

1) Siehe diese Zeitschrift Bd. XXXIV, S. 159. XXXIV, S. 519, XXV, S. 545. Dasselbe gilt auch von der Ansicht von Hahn und Geret, Die Zymasegährung. Berlin. 1903. 321.

2) Diese Zeitschrift, Bd. XXXVI (1903), 331.

von Eiweißenzymen sind jedoch die hierbei entstehenden Produkte überaus mannigfaltig und zuweilen schwer bestimmbar. Deshalb beschränkt man sich lieber auf die von uns vorgeschlagene empirische Nomenklatur und überläßt eine rationelle Nomenklatur der Zukunft.

Gegenwärtig untersuchen wir die basischen Produkte, welche bei Einwirkung von Magensaft auf Eiweißstoffe entstehen.

Berichtigung

zu Seite 165 dieses Bandes:

Der Name des Verfassers ist

Dr. Provan Cathcart — nicht Prowan Cathcart.
