

Die Spaltung des Pseudomucins durch starke siedende Säuren.

I. Mitteilung.

Von

J. Otori (Tokio).

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Marburg.)

(Der Redaktion zugegangen am 21. Juli 1904.)

Das Pseudomucin ist nicht selten Gegenstand eingehender Untersuchungen gewesen. Dieselben waren aber fast ausschließlich darauf gerichtet, die Natur der im Pseudomucinmolekül steckenden Kohlehydratgruppe zu ergründen. Der Zweck dieser Arbeiten brachte es mit sich, daß die betreffenden Forscher nur schwache Säuren, in der Regel eine 2%ige Salzsäure, auf das Pseudomucin einwirken ließen. Durch eine derartige schwache Säure ließ sich die prosthetische Gruppe in der Wärme abspalten, während der Eiweißrest in der Hauptsache koaguliert wurde, sonst aber unverändert zurückblieb. Bezüglich der Literatur der Arbeiten, die sich auf den Kohlehydratkomplex des Pseudomucins beziehen, verweise ich auf die ausführliche Zusammenstellung Steudels.¹⁾

Spaltungsversuche mit starken siedenden Säuren sind dagegen meines Wissens am Pseudomucin überhaupt noch nicht ausgeführt worden. Nur am Paramucin, einem anderen pathologischen Erzeugnis der Ovarien, das aber mit dem Pseudomucin nicht identisch ist, sind von K. Mitjukoff²⁾ und Panzer³⁾ derartige Versuche angestellt worden. Auf die Arbeiten dieser beiden Autoren werde ich später noch zurückgreifen. Ich habe nun auch das Pseudomucin der tiefgreifenden Spaltung durch

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXIV, S. 353.

²⁾ Archiv f. Gynäkol., Bd. 49, S. 278.

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXVIII, S. 363.

starke siedende Schwefelsäure unterworfen und will im folgenden über die Ergebnisse meiner Untersuchung berichten.

Das Ausgangsmateril lieferte der Inhalt zweier Ovarialcysten, der im Jahre 1901 von Herrn Professor Dr. Enderlen aus der chirurgischen Klinik (Direktor: Geheimrat Professor Dr. Küster) dem hiesigen physiologischen Institut zur Verfügung gestellt worden war. Durch meinen Freund Herrn Dr. Ishihara wurde das Pseudomucin dann aus dem Cysteninhalte nach den Vorschriften von Hammarsten rein dargestellt. Ich erhielt es in Form eines trockenen gelblich weißen Pulvers im Gewicht von 190 g. Im Laufe der Zeit hatte es sich in seinen physikalischen Eigenschaften etwas geändert: während es früher alle Eigenschaften des Pseudomucins, die von Hammarsten angegeben werden, völlig typisch zeigte, löste es sich jetzt nur noch teilweise in kaltem und warmem Wasser. Dabei spaltete es nach wie vor beim Kochen mit verdünnter Salzsäure reichliche Mengen einer reduzierenden Substanz ab. Die Elementaranalyse ergab folgende Werte.

	I	II	III	IV	im Mittel
C	48.40%	48.71%	—	—	= 48.55%
H	7.21%	7.73%	—	—	= 7.47%
N	—	—	10.86%	10.98%	= 10.92%

Es wurden noch 2 Aschenbestimmungen ausgeführt: 1. Versuch ergab 2,42%, 2. Versuch 2,02% Asche; also im Mittel waren 2,22% Asche im bei 100° C. getrockneten Pseudomucin enthalten. Die aschefreie Substanz enthielt demnach:

$$C = 49.65\% \quad H = 7.64\% \quad N = 11.16\%$$

Analytische Belege.

- I. 0.1980 g Paramucin gaben 0.3514 g CO₂ und 0.1277 g H₂O;
daraus berechnen sich 48,4% C und 7,21% H.
- II. 0.1946 g Substanz gaben 0.3476 g CO₂ und 0.1346 g H₂O;
darnach berechnen sich 48,71% C und 7,73% H.
- III. 0.2059 g Substanz gaben 20,0 ccm N nach Dumas:
T. = 14°; B. 745,5 mm;
daraus berechnet man 10,86% N.
- IV. 0.2652 g Substanz gaben 25,4 ccm N; T. = 13°; B. = 751 mm;
berechnet 10,98% N.

Von dem Pseudomucin wurden 50 g lufttrockene Substanz entsprechend 43,369 g trockener, aschefreier Substanz mit einem Stickstoffgehalt von 11,16% zunächst auf dem Wasserbade in einem Gemisch von 300 g Wasser und 150 g konzentrierter Schwefelsäure gelöst. Die Lösung wurde dann 12 Stunden am Rückflußkühler gekocht. Danach wurde die Flüssigkeit mit Wasser etwas verdünnt und die ausgeschiedenen Huminsubstanzen durch Filtration entfernt. Es zeigte sich schon jetzt ein auffälliger Unterschied von dem durch K. Mitjukoff¹⁾ untersuchten Paramucin. Dort war die Bildung von Huminsubstanzen bei einer ähnlichen Behandlung so reichlich gewesen, daß die weitere Verarbeitung der Reaktionsflüssigkeit fast unmöglich war. Beim Pseudomucin hingegen hatten sich nur 2,6265 g unlöslicher Huminstoffe mit 3,95% N-Gehalt ausgeschieden. Die Analyse der bei 100° C. getrockneten Huminsubstanz ergab folgende Werte:

0,2808 g Substanz gaben 10,3 ccm N; T. = 15,5°; B. = 750 mm;
daraus berechnen sich 3,95% N.

Das Filtrat von den unlöslichen Huminstoffen wurde in dem von Kutscher und Steudel²⁾ angegebenen Ätherextraktionsapparat einer erschöpfenden Extraktion unterworfen. Mir scheint die Einschaltung der Ätherextraktion einen wesentlichen Fortschritt in der Untersuchung der Spaltungsprodukte zu bedeuten. Dieselbe erfolgt in dem von mir benutzten Apparat schnell, quantitativ, mühelos, und ist geeignet, uns eine Reihe von Spaltungsprodukten zu verschaffen, die ebenso charakteristisch sein können, wie das Tyrosin, Leucin, Arginin etc.³⁾

Die Verarbeitung des Ätherextraktes.

Aus dem Ätherextrakt wurde der Äther auf dem Wasserbade verjagt, dabei erhitze sich leider durch ein Versehen die Flüssigkeit so stark, daß der Hauptteil der flüchtigen Fettsäuren verloren ging. Der Rückstand wurde der Destillation mit Wasserdämpfen unterworfen, nachdem er vorher mit Phosphorsäure stark angesäuert war. Das Destillat wurde in Natriumkarbonat-

¹⁾ Archiv für Gynäkologie, Bd. 49, S. 278.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXIX, S. 473.

³⁾ Siehe hierzu die Angaben Mörners in dieser Zeitschrift Bd. XLII, S. 121 über Brenztraubensäure.

lösung aufgefangen, bis es nicht mehr sauer reagierte. Die Natronsalze der flüchtigen Säuren wurden zur Trockne verdunstet, mit wenig Wasser aufgenommen, wieder mit Phosphorsäure angesäuert und von neuem mit Äther erschöpft. Nach der Verdunstung des Äthers hinterblieb ein stark sauer reagierender Rückstand, der Silbernitrat zu Silber und Sublimat zu Calomel reduzierte. Damit ist die Bildung von Ameisensäure nachgewiesen. Da die Identifizierung der übrigen flüchtigen Fettsäuren schwieriger ist und die Hauptmenge verloren gegangen war, habe ich Abstand genommen, sie aufzusuchen. Der mit Wasserdämpfen nicht flüchtige Teil wurde weiter in folgender Weise behandelt. Die Säuren wurden ihm zunächst durch Äther entzogen. Der nach Verdunstung des Äthers hinterbleibende Rückstand wurde mit wenig Wasser aufgenommen und die Lösung mit Barytwasser alkalisch gemacht. Das ausfallende schwerlösliche Barytsalz war hauptsächlich Baryumoxalat. Es wurde in Calciumoxalat übergeführt. Die Menge des gewonnenen Calciumoxalats betrug 0,0847 g, daraus berechnet sich die freie Oxalsäure zu 0,0553 g.

Das Filtrat vom Baryumoxalat wurde durch CO_2 vom überschüssigen Baryt befreit, auf ein kleines Volumen gebracht und mit neutralem Silbernitrat ausgefällt. Die schwerlösliche Silberverbindung bestand hauptsächlich aus lävulinsaurem Silber, dem hartnäckig eine reduzierende Substanz anhaftete. Dieselbe ließ sich aber schließlich durch Tierkohle entfernen. Die Ausbeute an lävulinsaurem Silber betrug 1,6434 g. Die Analyse des lävulinsauren Silbers ergab:

0,1458 g Substanz gaben 0,0701 g Silber.

Für $\text{C}_5\text{H}_7\text{AgO}_3$

Berechnet:	Gefunden:
Ag = 48,43%	Ag = 48,08%

Verarbeitung der durch Äther erschöpften Zersetzungsflüssigkeit.

Die mit Äther extrahierte Zersetzungsflüssigkeit wurde, nachdem sie mit Baryt bis zur schwach sauren Reaktion abgestumpft war, nach bekannten Methoden verarbeitet. Es wurde zunächst eine Histidin-, Arginin- und Lysinfraktion dargestellt.

Bei der Aufteilung dieser Fraktionen bin ich aber von dem bisher üblichen Modus abgewichen.

Aufteilung der Histidinfraktion.

Die gewonnene Histidinfraktion wurde zunächst durch Umfällung mit Silbernitrat und Ammoniak gereinigt. Die so gewonnene Silberverbindung wurde mit Salzsäure zersetzt, die salzsaure Flüssigkeit zur Trockne verdunstet, mit wenig Wasser aufgenommen, mit Tierkohle entfärbt und nach den Angaben Steudels¹⁾ mit alkoholischer Pikrolonsäure gefällt. Die Fällung wurde aus Wasser umkristallisiert. Die Ausbeute betrug 0,2344 g.

Die Substanz zersetzt sich ganz scharf bei 339° C. unter Feuererscheinung. Die Substanz ist wahrscheinlich nicht Histidin-pikrolonat, sondern jedenfalls mit dem Pikrolonat eines Körpers identisch, der kürzlich von Kutscher und Otori²⁾ aus Histidinmutterlaugen dargestellt worden ist und den gleichen Zersetzungspunkt besitzt.

Aufteilung der Argininfraktion.

Die Silberverbindungen der Argininfraktion wurden in verdünnter Schwefelsäure gelöst mit Schwefelwasserstoff zersetzt, die Schwefelsäure durch kaltes Barytwasser entfernt und schließlich nach Abscheidung des Baryts durch Kohlensäure die kohlen-sauren Basen gewonnen. Aus ihnen wurde nach Steudel³⁾ das Arginin mit Pikrolonsäure abgeschieden. Die Ausbeute an Arginin-pikrolonat betrug 0,4776 g. Das Pikrolonat schmolz bei 218° (nach Steudel bei 225°). Die Analysen ergaben folgende Werte:

1. 0,0986 g Substanz gaben 21,7 ccm N; T. = 16,7°; B. = 750 mm;
2. 0,1300 » » » 29,9 » » » = 17°; » = 740 »

Für $C_{26}H_{26}N_{12}O_{10}$

Berechnet:
N = 25,26%

Gefunden:
N = 24,63%; 25,08%

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXVII, S. 217.

²⁾ Zentralblatt f. Phys., Bd. 18, Nr. 8 (1904).

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXVII, S. 217.

Die Lysinfraktion schien außer dem Lysin eine andere Base nicht mehr zu enthalten. Das Filtrat von der Lysinfraktion wurde durch Baryt von Schwefelsäure und Phosphorwolframsäure befreit, der überschüssige Baryt durch Kohlensäure entfernt. Zum dünnen Sirup eingeeengt, schieden sich nimmehr das Tyrosin und auch das Leucin bis auf geringe Reste ab. Sie wurden abgesaugt, mit wenig kaltem Wasser gewaschen und nach dem Verfahren von Habermann und Ehrenfeld¹⁾ getrennt. Die Ausbeute an Tyrosin ergab 0,4618 g, die an Leucin 2,0282 g. Ich lasse die Analyse der beiden Substanzen folgen.

I. 0,2086 g Substanz gaben 15 ccm N: T. = 17,5°; B. = 755 mm.

Daraus berechnen sich 7,87% N; Tyrosin enthält 7,73% N.

II. 0,3058 g Substanz gaben 29,4 ccm N: T. = 15,5°; B. = 752 mm.

Daraus berechnen sich 10,95% N; Leucin enthält 10,68% N.

Das Filtrat vom Tyrosin und Leucin wurde sorgfältig vom Baryt befreit, auf 500 ccm gebracht und in 20 ccm davon die Reduktionsfähigkeit gegen Fehlingsche Lösung bestimmt: dieselbe entsprach für die gesamte Flüssigkeit berechnet 0,318 g Traubenzucker. Die reduzierte Substanz war demnach bei der eingreifenden Spaltung nicht völlig zerstört worden. Die Hauptmasse der Flüssigkeit wurde nach Kutschers²⁾ Angaben auf Glutaminsäure und Asparaginsäure verarbeitet. Die Fraktion der Glutaminsäure enthielt nur geringe Mengen einer schmierigen, stark gefärbten Substanz. Die Fraktion der Asparaginsäure löste bei dem Versuch, das asparaginsäure Kupfer darzustellen, das Kupfer mit grüner, nicht mit blauer Farbe, und es gelang nicht, die charakteristische Kupferverbindung der Asparaginsäure daraus zu erhalten. Nach der Entkupferung verblieb ein stark sauer reagierender Sirup, der aber nicht kristallisierte. Dieses negative Resultat deckt sich mit den Angaben von Panzer,³⁾ der aus dem Paramucin ebenfalls keine Glutaminsäure und Asparaginsäure darzustellen vermochte.

Das Filtrat von den Silberverbindungen, die die Glutamin-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXVII, S. 18.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXVIII, S. 111.

³⁾ I. c.

säure und Asparaginsäure enthalten sollten, wurde mit Silbernitrat und Barytwasser gefällt, um die Reste des Leucins und der anderen Aminosäuren, die nach der Methode Kutschers schwerlösliche Silberverbindungen liefern, abzuscheiden. Aus diesen Silberverbindungen wurde aber nach ihrer Zersetzung mit Schwefelwasserstoff nur wenig an einem nicht kristallisierenden Sirup gewonnen. Das Leucin mußte demnach von mir nahezu vollständig an anderer Stelle (siehe S. 459) zur Abscheidung gebracht sein.

Zum Schlusse lasse ich tabellarisch die einzelnen von mir isolierten Substanzen folgen:

100 Teile Pseudomucin gaben	in Gramm
Ammoniak ¹⁾	0,7517
Guanidin	0,0393
Arginin	0,2875
Lysin	2,6389
Tyrosin	1,089
Leucin	4,677
Oxalsäure	0,1275
Lävulinsäure	1,971
Reduzierende Substanz als Traubenzucker berechnet .	0,7333
Unlösliche Huminstanz	6,056

Zum Schlusse bin ich verpflichtet, dem Herrn Professor Kutscher für die Anregung zu dieser Arbeit meinen verbindlichsten Dank auszusprechen.

¹⁾ Das Ammoniak war in 100 ccm der auf 1000 ccm gebrachten ursprünglichen Zersetzungsflüssigkeit durch Destillation mit Baryumkarbonat bestimmt worden.