

Die Monoaminosäuren des «Edestins» aus Baumwollsamem und dessen Verhalten gegen Magensaft.

Von

Emil Abderhalden und Otto Rostoski, Würzburg.

(Aus dem I. Chemischen Institut der Universität Berlin.)

(Der Redaktion zugegangen am 20. März 1905.)

Nach der allgemeinen Annahme geht die hydrolytische Spaltung des Eiweißes unter normalen Verhältnissen¹⁾ unter der Einwirkung von Pepsin und Salzsäure nicht über die Peptone hinaus. Dementsprechend konnte der eine²⁾ von uns im Mageninhalt von auf der Höhe ihrer Verdauung getöteten Hunden in keinem Fall mit Sicherheit Aminosäuren nachweisen. Eine absolut sichere Deutung lassen diese Befunde nicht zu, denn die Möglichkeit muß immerhin in Betracht gezogen werden, daß der Bildung tiefster Spaltprodukte eine sofortige Resorption entsprechen könnte. Es schien uns deshalb wichtig, unter möglicher Innehaltung physiologischer Verhältnisse möglichst exakt festzustellen, ob unter der Einwirkung von Magensaft Aminosäuren aus dem Eiweiß abgespalten werden, und in welchen Mengenverhältnissen. Um bei Verdauungsversuchen

¹⁾ Daß bei sehr lange dauernder Einwirkung von Säure und Pepsin die Hydrolyse bis zu einfachen Spaltungsprodukten gehen kann, beweisen die Versuche von Leo Langstein (Hofmeisters Beiträge, Bd. I, S. 507 (1902), und Diese Zeitschrift, Bd. XXXI, S. 208). Vergl. auch bezüglich Langsteins Arbeit Salaskin und Kowalewsky, Diese Zeitschrift, Bd. XXXVIII, S. 567 (1903).

Nachdem die vorliegende Arbeit bereits abgeschlossen war, ist eine Abhandlung von D. Lawrow (Diese Zeitschrift, Bd. XLIII, S. 447, 1905) erschienen, die vornehmlich das Studium des Einflusses der Salzsäure auf die Eiweißkörper bei der Magenverdauung zum Ziele hat. Wir werden später auf die mitgeteilten Resultate zurückkommen.

²⁾ Emil Abderhalden, Diese Zeitschrift, Bd. XLIV, S. 17 (1905).

eindeutige Resultate zu erhalten, muß nach den neueren Erfahrungen unbedingt die Forderung aufgestellt werden, daß derartige Untersuchungen mit den reinen aus Fisteln gewonnenen Verdauungssäften, welche durch die ausgezeichneten, von Pawlow geschaffenen Methoden so leicht zugänglich geworden sind, ausgeführt werden. Die Verwendung von käuflichen Pepsinpräparaten und von durch Extraktion der Magenschleimhaut hergestelltem «Magensaft» kann deshalb nicht zu einwandfreien Resultaten führen, weil die Mitwirkung anderer Fermente, z. B. der autolytischen, durchaus nicht ausgeschlossen ist. Daß in der Tat derartige Produkte ganz anders und zwar viel energischer als der reine Magensaft wirken können, haben wir durch eigene Versuche festgestellt. Der zu unseren Versuchen verwendete Magensaft¹⁾ stammte aus einem sogenannten kleinen Magen nach Pawlow. Nach dieser Methode erhält man einen von Bestandteilen der Nahrung absolut freien Magensaft. Als «vollwertiger» Magensaft darf das so gewonnene Produkt im strengen Sinne des Wortes nicht aufgefaßt werden, denn wir erhalten durch die genannte Operation nur den Saft eines Teiles des gesamten Magens. Bekanntlich sondern aber die einzelnen Abschnitte des Magens ein ganz verschiedenartiges Sekret ab. Daß jedoch der von uns verwendete Saft für unsere Zwecke vollkommen ausreichte, zeigten unsere Vorversuche, die ergaben, daß er sehr rasch Eiweiß peptonisierte.

Um die bei der Verdauung mit Pepsin und Salzsäure entstehenden einfacheren Spaltprodukte, speziell die Aminosäuren, festzustellen, unterwarfen wir das Verdauungsgemisch zu verschiedenen Zeiten der Einwirkung des Fermentes der Dialyse.

Das Dialysat, in dem wir die eventuell gebildeten Aminosäuren vermuteten, wurde zur Entfernung der komplizierteren Produkte aus großer Verdünnung mit Phosphorwolframsäure gefällt und im Filtrat des Niederschlages nach den einfacheren Spaltprodukten gesucht. Wir wählten diesen Gang der Untersuchung, um jede sekundäre Hydrolyse (etwa durch die vorhandene Salzsäure) der gebildeten Verdauungsprodukte zu ver-

¹⁾ Für die gütige Überlassung des Magensaftes sprechen wir Herrn Privatdozent Dr. Bickel unseren verbindlichsten Dank aus.

meiden. Vor allem schlossen wir die sekundäre Wirkung der Salzsäure aus, indem wir dieselbe bei unseren Operationen stets zuerst entfernten. Trotz langer Dauer des Versuches ist es uns unter den unten genauer angeführten Versuchsbedingungen in keinem Falle gelungen, irgendwie erheblichere Mengen von Aminosäuren nachzuweisen. Spuren von Tyrosin konnten allein mit Sicherheit festgestellt werden.

Zu den Versuchen wählten wir das aus Baumwollsamensamen dargestellte Edestin, das uns in größerer Menge zur Verfügung stand. Da dessen Zusammensetzung noch nicht bekannt war, haben wir nach der Estermethode von E. Fischer zunächst die Monoaminosäuren bestimmt. Edestin aus Baumwollsamensamen enthält Glykokoll, Alanin, Aminovaleriansäure, Leucin, α -Prolin, Phenylalanin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Serin, Tyrosin und Tryptophan. Es finden sich somit dieselben Spaltprodukte, wie bei den übrigen bis jetzt untersuchten Eiweißkörpern. In den Mengenverhältnissen seiner Aminosäuren steht es zum Teil dem Edestin aus Hanfsamen recht nahe. Der Gehalt an Glutaminsäure ist allerdings beträchtlich höher. Es liegt dies zum Teil an der Art der Isolierung derselben. Bei der Hydrolyse des Edestins aus Hanfsamen war die Glutaminsäure fast ausschließlich mit Hilfe der Veresterung gewonnen worden, im vorliegenden Falle dagegen war die Bestimmung zum größten Teil eine direkte. Ob die übrigen Differenzen in der quantitativen Zusammensetzung der beiden Edestine der angewandten Methode zur Last fallen, oder ob vielmehr die unter die Gruppe «Edestine» eingereihten Eiweißkörper ganz verschieden sind, muß einstweilen dahingestellt bleiben. Es ist übrigens auch sehr wohl möglich, daß die Zusammensetzung des «Edestins» ein und derselben Pflanze eine schwankende ist. Untersuchungen in dieser Richtung sind im Gange. Aus den Verdauungsversuchen mit Magensaft darf geschlossen werden, daß unter den angewandten Versuchsbedingungen ein irgendwie in Betracht kommender tieferer Abbau des verwendeten Edestins unter der Einwirkung von Pepsinsalzsäure nicht stattgefunden hat. Weitere Versuche mit modifizierten Versuchsbedingungen und An-

wendung anderer Eiweißkörper müssen erweisen, ob die gemachten Beobachtungen ganz allgemeine Gültigkeit besitzen.

Experimenteller Teil.

I. Hydrolyse des Edestins aus Baumwollsamem.

1 kg Edestin aus Baumwollsamem mit einem Wassergehalt von 12,6% und einem Aschegehalt von 0,4% wurden mit 3 l konzentrierter Salzsäure vom spezifischen Gewicht 1,19 unter fortwährendem Umschütteln übergossen und so lange stehen gelassen, bis sich das Eiweiß vollständig aufgelöst hatte. Nun wurde 6 Stunden am Rückflußkühler gekocht, und die Lösung nach dem Erkalten im Vacuum auf etwa die Hälfte eingeeengt, mit gasförmiger Salzsäure gesättigt und über Nacht auf Eis gestellt. Es schied sich dabei ein dunkelbrauner kristallinischer Brei aus, der abgesaugt und mit konzentrierter Salzsäure gewaschen wurde. Beim weiteren Eindampfen der vereinigten Filtrate und Sättigen mit gasförmiger Salzsäure erhielt man noch einmal einen dicken Kristallbrei. Beide Portionen wurden vereinigt, in wenig Wasser gelöst, mit Tierkohle gekocht und durch Salzsäure wieder zur Ausscheidung gebracht. Durch mehrmalige Wiederholung dieser Operation wurde das Glutaminsäurechlorhydrat völlig gereinigt. Über Schwefelsäure und Kalk getrocknet, wog es 154 g.

0,1894 g Substanz gaben 0,2250 g CO₂ und 0,0926 g H₂O

Berechnet für C₅H₉NO₄ · HCl:

Gefunden:

32,70% C und 5,40% H.

32,40% C und 5,43% H.

Die Mutterlauge des Glutaminsäurechlorhydrats wurde nun in drei Portionen bis zum Sirup eingedampft, jede Portion mit 1 l absolutem Alkohol übergossen, und nun durch Sättigen mit trockenem Salzsäuregas in der gewöhnlichen Weise verestert. Der ganze Prozeß der Veresterung wurde noch zweimal wiederholt, und schließlich die Ester in der bekannten Weise in Freiheit gesetzt. Die fraktionierte Destillation der Ester gab folgendes Resultat:

I.	Fraktion bis 60° (Temp. des Wasserbades)	bei 10 mm Druck	=	45 g
II.	» » 100° (» » » »)	» 10 » »	=	40 »
III.	» » 100° (» » » »)	» 0,5 » »	=	185 »
IV.	» » 180° (» » Ölbad)	» 0,5 » »	=	100 »

Im Kolben verblieb ein bald erstarrender, braungelb gefärbter Rückstand. Er wog 130 g.

Die einzelnen Fraktionen wurden in der folgenden Weise verarbeitet.

I. Fraktion.

Sie wurde mit konzentrierter Salzsäure zur Trockene verdampft. Es verblieben 25 g Rückstand. Er wurde mit dem 3fachen Gewicht absoluten Alkohols übergossen und mit gasförmiger Salzsäure gesättigt. Beim Stehen in der Kälte und Impfen eines Kriställchens von Glykokollesterchlorhydrat trat bald reichliche Kristallisation ein. Nach 24 Stunden betrug ihre Menge 20 g.

0,1968 g Substanz gaben 0,2507 g CO_2 und 0,1256 g H_2O

Für $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{NO}_2\text{Cl}$ berechnet: 34,41% C und 7,17% H

gefunden: 34,74% C und 7,09% H

Das Filtrat des Glykokollesterchlorhydrates wurde in der bekannten Weise durch Kochen mit gelbem Bleioxyd von der Salzsäure befreit. Es enthielt 10,5 g einer bei 295° (korr.) schmelzenden Aminosäure, die alle Eigenschaften des Alanins zeigte.

II. Fraktion.

Sie wurde durch Kristallisation in zwei Fraktionen getrennt. Beide wurden zur Entfernung von α -Prolin mit absolutem Alkohol ausgekocht.

Von der ersten Fraktion verblieben 5 g. Sie bestand aus Leucin.

0,1320 g Substanz gaben 0,2754 g CO_2 und 0,1224 g H_2O

Berechnet für $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_2$: Gefunden:

54,9% C und 9,8% H. 54,7% C und 9,9% H.

Die leichter lösliche Partie (14 g) enthielt fast ausschließlich Alanin.

0,1803 g Substanz gaben 0,2670 g CO_2 und 0,1290 g H_2O

Berechnet für $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2$: Gefunden:

40,4% C und 7,9% H. 40,39% C und 7,95% H.

Der alkoholische Auszug wurde mit dem in der folgenden Fraktion erhaltenen zur gemeinsamen Verarbeitung vereinigt.

III. Fraktion.

Die dritte Fraktion wurde direkt zur Trockene verdampft, und der Rückstand mit absolutem Alkohol ausgekocht. Das in Alkohol Unlösliche wurde wiederum in Wasser gelöst und nun durch fraktionierte Kristallisation in fünf Unterabteilungen zerlegt. Die drei ersten Fraktionen hatten denselben Schmelzpunkt (298° korr.). Sie bestanden zum weitaus größten Teil aus Leucin, das sich leicht durch Umkristallisieren aus heißem Wasser analysenrein gewinnen ließ. Seine Menge betrug 130 g.

0,1701 g Substanz gaben 0,3411 g CO_2 und 0,1510 g H_2O

Berechnet für $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_2$:

Gefunden:

54,9% C und 9,8% H.

54,69% C und 9,86% H.

Aus der vierten und fünften Unterabteilung wurden zunächst durch Darstellung der Kupfersalze reine Substanzen zu isolieren versucht. Es gelang, aus der vierten Fraktion reines Alaninkupfer zu isolieren.

0,5142 g Substanz gaben 0,1692 g CuO = 0,1352 g Cu = 26,3% Cu

0,1990 „ „ „ 0,2209 „ CO_2 und 0,0908 g H_2O

Berechnet für $(\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_2)_2 \text{Cu}$: 30,05% C, 5,00% H und 26,50% Cu

Gefunden : 30,28% C „ 5,04% H „ 26,30% „

Durch weitere Kristallisationen wurden fernerhin Produkte erhalten, deren Kupfergehalt auf ein Gemisch von Alanin und Aminovaleriansäure und event. Leucin hindeutete. Der Versuch, aus den mit Schwefelwasserstoff zerlegten Kupfersalzen reine Aminovaleriansäure zu gewinnen, hatte auch keinen vollen Erfolg, wie die Analyse des «reinsten» Produktes zeigt:

0,1627 g Substanz ergaben 0,3015 g CO_2 und 0,1346 g H_2O

Berechnet für $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_2$:

Gefunden:

51,28% C und 9,40% H.

50,54% C und 9,18% H.

Es gelang somit leider nicht, völlig reine Aminovaleriansäure zu gewinnen. Sie ist aber zweifellos vorhanden. Durch Racemisierung der gesamten Fraktion hätte sich deren Reindarstellung sicher erleichtern lassen.

Die fünfte Unterabteilung hatte dieselbe Zusammensetzung wie die vierte. Auch sie enthielt zweifelsohne Aminovaleriansäure.

Die Gesamtmenge des aus dieser Fraktion isolierten Alanins betrug 15 g.

Das Filtrat vom ausgeschiedenen asparaginsäuren Baryt wurde mit Schwefelsäure quantitativ von Baryt befreit, unter vermindertem Druck völlig zur Trockne verdampft, dann in wenig konzentrierter Salzsäure gelöst und bis zur Sättigung trockenes Salzsäuregas eingeleitet. Beim Stehen auf Eis erfolgte reichliche Kristallisation von Glutaminsäurechlorhydrat (14,0 g). Die Mutterlauge derselben wurde durch Kochen mit gelbem Bleioxyd von der Salzsäure befreit und dann bis zur beginnenden Kristallisation eingengt. Diese erste Kristallisation bestand zum größten Teil aus Asparaginsäure (4 g), offenbar noch etwas mit Glutaminsäure verunreinigt. Durch weiteres Einengen der Mutterlauge wurden Kristallisationen erhalten, welche nach wiederholtem Umkristallisieren aus Wasser mehr und mehr Analysenzahlen gaben, welche dem Serin entsprachen. Reines Serin wurden auf diese Weise 3,2 g erhalten. Seine Menge war in Wirklichkeit bedeutend größer.

0.1511 g Substanz gaben 0.1884 g CO_2 und 0.0950 g H_2O

Berechnet für $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_3$:	Gefunden:
34.28% C und 6.66% H.	34,0% C und 6,9% H.

Rückstand.

Der bei der Destillation der Ester verbleibende Rückstand wurde mit viel Essigäther ausgekocht. Ein geringer Teil ging in Lösung. Nach dem Verdampfen des Essigäthers hinterblieb eine geringe Menge einer voluminösen Kristallmasse. Sie zeigte alle Eigenschaften des Leucinimids. Der nicht in Essigäther lösliche Rückstand wurde 6 Stunden mit überschüssigem Barythydrat gekocht, und nach dem Abkühlen der Baryt mit Schwefelsäure quantitativ entfernt. Durch Einengen der so erhaltenen Lösung ließen sich zunächst Kristallisationen von ganz reiner Glutaminsäure gewinnen (8,3 g). Weitere Mengen wurden durch völliges Eindampfen der zuletzt verbleibenden sirupösen Mutterlauge, Lösung des Rückstandes in konzentrierter Salzsäure, Einleiten von Salzsäuregas gewonnen (8 g). Aus der Mutterlauge des Glutaminsäurechlorhydrates wurde die Salzsäure mit Bleioxyd entfernt. Es gelang nicht, aus dieser Mutterlauge zu

kristallisierten, einheitlichen Produkten zu gelangen. Auch der Versuch, Kupfersalze darzustellen, führte zu keinen einwandfreien Resultaten.

Tyrosinbestimmung.

250 g Edestin wurden 12 Stunden mit 2½ l 25%iger Schwefelsäure am Rückflußkühler gekocht, nach dem Erkalten mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt, die Schwefelsäure mit Baryt quantitativ gefällt, und das Filtrat vom Baryumsulfat soweit eingeeengt, bis schon in der Wärme eine reichliche Kristallisation erfolgte. Die Mutterlauge der abgeseugten Kristallmasse wurde so lange weiter eingedampft, bis eine Probe der von den Kristallen befreiten Mutterlauge nur noch eine ganz schwache Millonsche Reaktion gab. Die vereinigten Kristallmassen wurden zur Reinigung mit Eisessig ausgekocht und schließlich aus viel heißem Wasser unter Kochen mit Tierkohle umkristallisiert. Es wurden auf diese Weise 5 g reines Tyrosin erhalten.

0.1882 g Substanz gaben 0.1039 g H₂O und 0.4118 g CO₂

Berechnet für C₉H₁₁NO₃: Gefunden:

59,66% C und 6,07% H. 59,67% C und 6,13% H.

Nachweis von Tryptophan.

100 g Edestin wurden in 1 l Wasser suspendiert, mit Pankreatin (Rhenania) und Toluol versetzt und 14 Tage lang im Brutraum aufbewahrt. Das Verdauungsgemisch zeigte deutliche Tryptophanreaktion.

Im Edestin aus Baumwollsamens wurden somit auf 100 g trockenes, aschefreies Eiweiß berechnet folgende Produkte isoliert:

Glykokoll	1,2%
Alanin	4,5%
Aminovaleriansäure	vorhanden
α-Prolin	2,3%
Leucin	15,5%
Glutaminsäure	17,2%
Asparaginsäure	2,9%
Phenylalanin	3,9%
Serin	0,4%
Tyrosin	2,3%
Tryptophan	vorhanden.

II. Verdauungsversuch.

Am 19. XII. 1904 wurden 500 g Edestin (dasselbe Präparat, dessen Hydrolyse ausgeführt wurde) mit 3 l 0,4%iger Salzsäure, 400 ccm Hundemagensaft und Toluol versetzt und bei 36° aufbewahrt. Der Salzsäuregehalt des Magensaftes war 0,47%. Seine verdauende Kraft wurde für koaguliertes Eiereiweiß und Edestin geprüft und mit einem gut wirksamen menschlichen Magensaft verglichen. Dabei ergab sich eine sehr starke verdauende Kraft des Hundemagensaftes, die die des menschlichen Magensaftes wenigstens für das Edestin noch erheblich übertraf. Auch bei dem eigentlichen Verdauungsversuch kam es sehr bald zu einer Auflösung des Edestins, wobei die Reaktion auf freie HCl (Congopapier) schnell verschwand.

Am 21. XII. wurde noch 1 l 0,4%iger Salzsäure zugesetzt, schon nach wenigen Stunden war wieder die Reaktion auf freie HCl verschwunden, sie trat auch in den nächsten Tagen nicht wieder auf.

Am 29. XII. wurden, da das Verdauungsgemisch einen breiartig zähen Charakter angenommen hatte, der ein ordentliches Durchschütteln unmöglich machte, 3½ l Wasser (ohne HCl) zugegeben, eine Congopapierreaktion blieb dauernd aus, mit Lakmuspapier war dagegen stark saure Reaktion zu konstatieren.

Am 5. I. 05, also nach 17 Tagen, wurden die ersten 2 l zur Untersuchung genommen. Näheres siehe unten. Der übrige Teil blieb weiter im Brutraum stehen.

Am 16. I. wurde zu dem Verdauungsgemisch soviel Salzsäure gegeben, daß jetzt eine deutliche Reaktion auf freie Salzsäure vorhanden war. Das Salzsäuredefizit hatte 0,109% betragen, d. h. man mußte soviel Salzsäure hinzugeben, um eine Reaktion auf freie Salzsäure (mit Congopapier oder mit Phloroglucin-Vanillin) zu erhalten. Die Reaktion auf freie HCl blieb jetzt während des ganzen Versuches bestehen. Ferner kamen noch 60 ccm Magensaft zum Verdauungsgemisch hinzu.

Am 20. I., also nach 32 Tagen, wurden wieder 2 l zur Untersuchung genommen, ebenso am 6. II., also nach 48 Tagen,

und am 14. II., also nach 56 Tagen, die letzten etwa 2 $\frac{1}{2}$ l. Am 7. II. wurde die verdauende Kraft des Gemisches gegen koaguliertes Eiereiweiß nochmals geprüft. Es zeigte sich noch recht wirksam. Um in den einzelnen 4 Portionen, die zu verschiedenen Zeiten entnommen worden waren, Aminosäuren nachzuweisen, wurden sie in Pergamentschläuchen 8 Tage lang gegen destilliertes Wasser dialysiert, das während der ersten 3 Tage täglich, dann alle 2 Tage gewechselt wurde. In jedem Versuch wurden die Dialysate, welche sauer reagierten und starke Biuretreaktion gaben, vereinigt, mit Phosphorwolframsäure die Albumosen und Peptone ausgefällt, die überschüssige Phosphorwolframsäure im Filtrate des Phosphorwolframsäureniederschlages mit Baryt entfernt, letztere quantitativ mit H_2SO_4 ausgefällt, nun die Salzsäure durch Erhitzen mit PbO entfernt, das überschüssige Blei wieder mit H_2S ausgefällt, und schließlich das Filtrat vom Bleisulfit im Vacuum bis auf etwa 40 ccm eingedampft. In dieser Flüssigkeit erhielt man mit Millonschem Reagens eine deutlich positive Reaktion. Bei der Sättigung mit Ammonsulfat bekam man weder bei neutraler, noch bei saurer, noch bei alkalischer Reaktion einen Niederschlag. Bei völligem Eindampfen erhielt man wenige Gramm eines zum größten Teil anorganischen Rückstandes. Der Versuch, Glutaminsäure als Chlorhydrat nachzuweisen, fiel negativ aus.

Es waren also in dem Rückstand nur geringe Mengen Tyrosin aufzufinden.

Um nachzuweisen, ob etwa in den Dialysierschläuchen Aminosäuren zurückgeblieben waren, wurde der Inhalt der Schläuche bei Versuch III mit Natronlauge neutralisiert, auf 50—60° erwärmt, um etwa ausgefallenes Tyrosin zur Lösung zu bringen, warm filtriert und nach dem Ansäuern mit Phosphorwolframsäure gefällt. Das Filtrat des mit der hydraulischen Presse abgepressten Niederschlages wurde in gleicher Weise wie die Dialysate weiter behandelt. In diesem Fall gab die eingedampfte Flüssigkeit keine Millonsche Reaktion. Sie enthielt auch sonst keine Aminosäuren.