

Über die Verbreitung von Glukothionsäure in tierischen Organen.

Von

John A. Mandel und P. A. Levene.

(Aus dem chemischen Universitätslaboratorium und dem Bellevue-Krankenhaus des
Medical-College in New-York.)

(Der Redaktion zugegangen am 24. Juni 1905.)

Gepaarte Schwefelsäureverbindungen kohlehydratartiger Substanzen wurden zuerst von C. Mörner und Schmiedeburg aufgefunden. Später bemühten sich dann Schmiedeburgs Schüler, Krawkow¹⁾ und Oddi,²⁾ die Verbreitung solcher Körper im Organismus näher zu erforschen, und es gelang ihnen auch ihre Darstellung aus verschiedenen Bindegewebssubstanzen. Da nun einer³⁾ von uns das Vorkommen einer der in Frage stehenden ähnlichen Substanz in einem parenchymatösen Organe, nämlich in der Milz, erweisen konnte, so lag es nahe, auch in andern derartigen Organen danach zu suchen, und wir entschlossen uns, die Niere, die Leber, das Pankreas und die Milchdrüse nach dieser Richtung zu prüfen. In der Tat war bei jedem der genannten Organe unsere Untersuchung von Erfolg begleitet, doch soll gleich hier bemerkt werden, daß die Ausbeute an reiner Substanz meist sehr gering ausfiel, da die Reinigung große Verluste mit sich brachte.

Darstellungsverfahren.

Die Säure läßt sich nach derselben Methode, wie sie bei der Milz angewendet wurde, auch aus den andern Organen gewinnen; nur erhält man dabei eine Substanz, die noch mit Spuren von Eiweiß und Nucleinsäure verunreinigt ist. Um sie

¹⁾ Archiv f. exp. Pathologie u. Pharmakologie, Bd. XL.

²⁾ Archiv f. exp. Pathologie u. Pharmakologie, Bd. XXXIII.

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXVII, S. 400.

davon zu befreien, bedient man sich eines Verfahrens, das auf ihrer Unlöslichkeit in Eisessig und der Löslichkeit in Wasser beruht: durch jene nämlich gelingt eine Abtrennung des Eiweißes und durch Auflösen in Wasser wird die Nucleinsäure beseitigt. — Es folgen die genaueren Vorschriften:

Nachdem die Organe auf dieselbe Weise, wie bei der Darstellung der Nucleinsäure angegeben, behandelt sind, hat man in der Alkoholfällung der Pikrinsäurefiltrate hauptsächlich Nucleinsäure und Glukothionsäure. Diesen Niederschlag nun löst man mit Lauge, macht mit Essigsäure stark sauer, filtriert mit Hilfe der Saugpumpe und entfernt aus dem so gewonnenen Filtrat die Nucleinsäure mit Kupferchlorid. Das noch in Lösung befindliche Kupfersalz der Glukothionsäure wird jetzt mit Alkohol ausgefällt, der Niederschlag in verdünnter Salzsäure wieder aufgelöst und nochmals mit Alkohol gefällt. Jetzt fällt die Säure frei von Kupfer aus.

Um die dem Präparat noch anhaftenden Beimengungen von Eiweiß und Nucleinsäure zu beseitigen, verreibt man es in der Reibschale innig mit Eisessig, saugt diesen ab, löst den Rückstand in Wasser und fällt, nach nochmaligem Absaugen, die wässrige Lösung mit Alkohol.

Auf diese Weise hergestellte Substanzen sind biuretfrei und enthalten Nucleinsäure nicht einmal in Spuren: dabei stimmen sie in allen ihren Eigenschaften mit der Glukothionsäure aus der Milz überein. Das Verhalten gegen Jodlösung ist allerdings bei den Präparaten verschiedener Organe ein abweichendes und gelegentlich erhält man beim Eintragen von trockener Substanz in eine hellgelbgefärbte Jodlösung einen tiefbraunen Farbenton, während man dies mit gelöster Substanz fast nie erreicht. In den Fällen, wo eine solche Braunfärbung eintritt, muß man wohl an eine Verunreinigung mit Spuren von Glykogen denken.

Ferner geben die Präparate auch in gleicher Weise, wie die Glukothionsäure der Milz, beim Kochen mit Orcinsalzsäure eine prachtvolle Violettfärbung und der amyalkoholische Extrakt einer solchen Lösung liefert die typischen Absorptionserscheinungen. Des weiteren ist zu bemerken, daß man mit

Phloroglucinsalzsäure einen roten Farbenton erhält und in Übereinstimmung damit nach Behandlung mit Salzsäure im Destillat Furfurol auf die übliche Weise nachweisen kann.¹⁾ Reduktion von Fehlingscher Lösung tritt nach Erhitzen mit Mineralsäuren ein, bleibt jedoch, ohne daß dies vorhergegangen ist, aus. Eine nähere Prüfung ergab, daß nach vorheriger Hydrolyse mit 2^o/oiger Schwefelsäure das Filtrat Fehlingsche Lösung mit der Stärke einer 24,5^o/oigen Traubenzuckerlösung reduzierte.

Erwähnt ist ja schon das Verhalten der Substanzen gegen Wasser, verdünnte Säuren, Alkalien, worin sie löslich ist, und gegen Eisessig, in dem sie sich nicht löst. Bemerket sei noch, daß das Baryumsalz in 50^o/oigem Alkohol fast unlöslich ist.

Mit Hilfe des oben angegebenen Verfahrens gelangt man im allgemeinen zu reinen Präparaten, doch stößt man bei gewissen Organen auf Schwierigkeiten, die wir in der nun folgenden näheren Schilderung der Substanzen verschiedener Herkunft bei Gelegenheit der betreffenden Fälle besprechen werden.

Milchdrüse.

Hier gelingt eine völlige Reindarstellung. Ich lasse die Analysen von verschiedenen Präparaten folgen.

Präparat I.

0,2293 g Substanz gaben nach Kochen mit Salzsäure und Zusatz von Chlorbaryum 0,0448 g BaSO₄ = 2,68% S.

0,1757 g Substanz wurden zu einer Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl verwendet; verbraucht: 5,05 ccm Schwefelsäure (1 ccm dieser Schwefelsäure entsprach 0,00172 g N). N = 4,66%.

¹⁾ In meiner Mitteilung über die Milz-Glukothionsäure (Diese Zeitschrift, Bd. XXXVII, S. 400) habe ich angegeben «Beim Destillieren mit Salzsäure konnte man im Destillate Furfurol mit Phloroglucin, Orcin und essigsäurem Anilin nachweisen». Darüber äußert sich Neuberger wie folgt: «Die Angabe Levenes, nach der Destillation seiner Substanzen mit HCl im Destillat Furfurol nachgewiesen und positive Orcin- oder Phloroglucinprobe erhalten zu haben, ist mit den Tatsachen überhaupt nicht in Einklang zu bringen, da Furfurol, und nur solches kann sich im Destillat befinden, die Pentosenreaktionen nicht gibt» (Ascher und Spiros Ergebnisse, Bd. III, S. 404, 1904). Meine Angabe enthält jedoch, wie man sieht, kein Wort über die Pentosenreaktionen; ich habe nur sagen wollen, daß sich aus dem Destillat ein Phloroglucid, Orcid und Anilid des Furfurols darstellen läßt. P. A. L.

Präparat II.

0.1682 g Substanz gaben nach Kochen mit Salzsäure und Zusatz von Chlorbaryum 0.0356 g BaSO₄ = 2.91 % S.

0.2294 g Substanz wurden zu einer Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl verwendet; verbraucht: 6.2 ccm Schwefelsäure. N = 4.38 %.

Präparat III.

0.2185 g Substanz gaben 0.0396 g BaSO₄ = 2.49 % S.

0.2492 g Substanz wurden zu einer Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl verwendet; verbraucht 6.6 ccm Schwefelsäure. N = 4.29 %.

Präparat IV.

0.2294 g Substanz gaben 0.0449 g BaSO₄ = 2.68 % S.

0.2294 g Substanz erforderten bei einer Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl 6.4 ccm Schwefelsäure. N = 4.52 %.

Präparat V.

0.2395 g Substanz gaben 0.0431 g BaSO₄ = 2.47 % S.

0.2395 g Substanz erforderten bei einer Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl 5.9 ccm Schwefelsäure. N = 3.99 %.

Baryumsalz der Glukothionsäure.

Präparat I.

0.2125 g Substanz gaben 0.0528 g BaSO₄ = 3.41 % S.

0.2647 g Substanz erforderten bei einer Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl 5.2 ccm Schwefelsäure. N = 3.18 %.

0.1699 g Substanz gaben nach dem Kochen mit Salzsäure und darauffolgendem Zusatz von Schwefelsäure 0.0308 g BaSO₄ = 10.66 % Ba.

Präparat II.

0.2454 g Substanz gaben 0.0656 g BaSO₄ = 3.67 % S.

0.2694 g Substanz erforderten bei einer Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl 5.2 ccm Schwefelsäure. N = 3.13 %.

0.2218 g Substanz gaben nach dem Kochen mit Salzsäure und darauffolgender Behandlung mit Schwefelsäure BaSO₄ = 9.53 % Ba.

Präparat III.

0.3158 g Substanz gaben 0.0777 g BaSO₄ = 3.38 % S.

0.3603 g Substanz erforderten für eine Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl 7.2 ccm Schwefelsäure. N = 3.24 %.

0.2034 g Substanz gaben nach dem Kochen mit Salzsäure und darauffolgender Behandlung mit Schwefelsäure 0.0336 g BaSO₄ = 9.23 % Ba.

Präparat	S %	N %
I.	2.68	4.66
II.	2.91	4.38
III.	2.49	4.29
IV.	2.68	4.58
V.	2.47	3.99
Mittel	2.65	4.38

Präparat	Baryumsalz.		
	S %	N %	Ba %
I	3,41	3,18	10,66
II	3,67	3,13	9,53
III	3,38	3,24	9,23
Mittel	3,48	3,18	9,81

Um über die Natur der Kohlehydratgruppe einigen Aufschluß zu bekommen, destillierten wir zuerst mit Salzsäure vom S. G. 1,06, erhielten aber nur eine geringe Ausbeute an Furfurol-Phloroglucid. Dann wurde die Gewinnung eines Osazons versucht. Zu diesem Zwecke erhitzen wir 1,5 g Substanz im Autoklaven mit 2%iger Schwefelsäure drei Stunden auf 125° C. Nach Beseitigung der Schwefelsäure durch Baryt und dessen Überschuß mit Kohlensäure wurde das Filtrat bei vermindertem Druck eingedampft, der Rückstand in Alkohol gelöst und filtriert. Aus dem Filtrat, das wir wieder eindampften, gelang es uns dann, auf die übliche Weise ein Osazon vom Schmelzpunkt 196° C. (korr.) zu gewinnen.

Niere.

Auch bei diesem Organ gelangt man ohne Schwierigkeiten zu einem reinen Präparat. Die Analyse ergab folgende Werte:

0,2401 g Substanz gaben 0,0697 g BaSO₄ = 3,94% S.

0,2401 g Substanz erforderten bei einer Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl 7,4 ccm Schwefelsäure. N = 4,99%.

Pankreasdrüse.

Hier stößt man bei der Darstellung der Glukothionsäure auf Hindernisse, die wohl vor allem auf dem gleichzeitigen Vorhandensein einer in Wasser ziemlich löslichen Nucleinsäure beruhen. So waren denn die meisten der gewonnenen Präparate mit Nucleinsäure verunreinigt, und nur einmal glückte die Darstellung eines Körpers, dessen Zusammensetzung mit der früherer Präparate aus anderen Organen gut übereinstimmte. Wir hoffen indessen, unsere Methode noch soweit zu vervollkommen, daß auch aus dem Pankreas ohne Schwierigkeit die in Frage stehende Substanz gewonnen werden kann. Hier sei nur noch bemerkt, daß uns der bedeutende Schwefelgehalt der Körper auffiel,

sowie ihr Vermögen, nach Erhitzen mit Salzsäure Fehlingsche Lösung zu reduzieren, eine Erscheinung, die bei freien Nucleinsäuren ja meist vermißt wird.

Die Analyse ergab:

Präparat I.

0,1567 g Substanz gaben 0,0277 g $\text{BaSO}_4 = 2,43\%$ S.

0,1567 g Substanz erforderten bei einer Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl 4,5 ccm Schwefelsäure. N = 4,65%.

Präparat II.

0,4468 g Substanz gaben 0,0854 g $\text{BaSO}_4 = 2,67\%$ S.

0,4468 g Substanz erforderten bei einer Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl 23 ccm Schwefelsäure. N = 8,34%.

Präparat III.

0,3060 g Substanz gaben 0,0630 g $\text{BaSO}_4 = 2,83\%$ S.

0,3060 g Substanz erforderten bei einer Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl 18,1 ccm Schwefelsäure. N = 9,58%.

Leber.

In diesem Falle konnte das normale Organ nicht zur Darstellung verwandt werden, da man stets anstatt der Glukothionsäure anscheinend reines Glykogen erhielt. Dies mußte also vorher entfernt werden, was wir auf folgende Weise versuchten: Wir behandelten hungernde Hunde nach der Methode von Lusk mit Phloridzin, töteten sie nach drei Tagen und behandelten die Leber nun in der üblichen Weise; dadurch kamen wir schließlich zu Präparaten, deren Menge aber nur ausreichte, sie qualitativ als Glukothionsäure zu identifizieren. Zur Gewinnung größerer Quantitäten mußte ein anderes Verfahren eingeschlagen werden, bei dem die Vorbereitung des Organes durch Autolyse geschah; wir geben hier die Resultate zweier derartiger Versuche.

Versuch I. Nach voraufgegangener 5tägiger Autolyse der Lebersubstanz gelangten wir zu einem Präparat mit folgenden Analysenwerten:

0,1882 g Substanz gaben 0,0194 g $\text{BaSO}_4 = 1,42\%$ S.

0,1882 g Substanz erforderten bei einer Bestimmung des Stickstoffs nach Kjeldahl 3,15 ccm Schwefelsäure. N = 2,71%.

Das Baryumsalz, welches wir zur Reinigung darzustellen suchten, war leider nicht frei von Glykogen zu bekommen.

Versuch II. Hier wurde erst nach 14tägiger Autolyse der Lebersubstanz an die Darstellung gegangen, wonach sich Präparate mit folgenden Analysenwerten ergaben:

0,4106 g Substanz gaben 0,1103 g $\text{BaSO}_4 = 3,69\%$ S.

0,4106 g Substanz erforderten bei einer Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl 12,5 ccm Schwefelsäure. N = 4,93%.

Bei dieser Gelegenheit möchten wir nicht unerwähnt lassen, daß schon früher in der Leber Substanzen beobachtet worden sind, die der Glukothionsäure nahe stehen, wir meinen das stickstoffhaltige Kohlehydrat von Seegen und Seegen und W. Niemann¹⁾ sowie die Glukoalbumose Simons,²⁾ die beide mit unserer Säure anscheinend verwandt sind.

Neben der weiteren Verfolgung dieses Zusammenhanges wäre es interessant, auch die Frage nach dem Residuum-Glykogen von neuem zu bearbeiten. Es ist dies eine Substanz, die in verschiedenen Organen nach längerem Hungern wie auch nach Konvulsionen angetroffen wird, und bisher immer mit Glykogen identifiziert wurde. Wir halten es aber nicht für ausgeschlossen, daß Verunreinigungen mit Glukothionsäure³⁾ vorlagen, wenn es sich dabei nicht überhaupt um reine Glukothionsäure gehandelt hat. Wir hoffen, diese Frage in nächster Zeit beantworten zu können.

¹⁾ Seegen, Arch. f. (Anat. u.) Physiol., 1903.

Seegen und Niemann, Wiener Sitzungsbericht d. kais. Akad. d. Wissensch. Mathem. naturw. Klasse 112, Abt. III, 119—139.

²⁾ O. Simon, Arch. f. exp. Pathol. u. Pharm., Bd. XLIX.

³⁾ Ein Präparat von Glykogen, das wir nach dem Verfahren von Pflüger dargestellt hatten, enthielt Spuren von organischem Schwefel.