

Das Verhalten von Cystin, Dialanlylcystin und Dileucylcystin im Organismus des Hundes.

Von

Emil Abderhalden und **Franz Samuely.**

(Aus dem I. chemischen Institut der Universität Berlin.)
(Der Redaktion zugegangen am 21. August 1905.)

Das Verhalten des Cystins im tierischen Organismus ist schon wiederholt Gegenstand eingehender Untersuchungen gewesen.¹⁾ Unseren Versuchen lag der Gedanke zugrunde, festzustellen, ob freies Cystin und gebundenes Cystin ein verschiedenes Verhalten zeigen, und ob die Art der Bindung auf den Abbau von Einfluß ist. Einstweilen haben wir unsere Versuche nur auf die beiden durch Pankreassaft außerordentlich leicht spaltbaren²⁾ Peptide: Dialanlylcystin und Dileucylcystin ausgedehnt. Wir betrachten diese Untersuchungen nur als Vorversuche. Sie sind zum Teil unternommen worden, um später, wenn ein geeignetes Versuchsobjekt sich findet, der Frage nach dem Wesen der Cystinurie näher zu treten. Es wäre von Interesse, festzustellen, ob der Cystinuriker zwischen dem einfachen Cystin und verschiedenartigen Cystinpeptiden einen Unterschied macht, d. h. ob er das eine Mal das Cystin glatt verbrennt, das andere Mal in mehr oder weniger großem Umfange unverändert wieder ausscheidet.

¹⁾ Vgl. L. Blum, Über das Schicksal des Cystins im Tierkörper. Hofmeisters Beiträge, Bd. V, S. 1, 1903. — J. Wohlgemuth, Über die Herkunft der schwefelhaltigen Stoffwechselprodukte im tierischen Organismus. Diese Zeitschrift, Bd. XL, S. 81, 1903. — C. H. Rothera, Experiments on cystin and its relation to sulphur metabolism. Journal of Physiology, Vol. XXXII, S. 175, 1905.

²⁾ Emil Fischer und Emil Abderhalden, Über das Verhalten verschiedener Polypeptide gegen Pankreasferment. Sitzungsberichte der Akademie der Wissenschaften zu Berlin, Bd. X, 1905 und diese Zeitschrift, Bd. XLVI, S. 52, 1905.

Das zu den unten mitgeteilten Versuchen verwendete Cystin war aus Pferdehaaren gewonnen. Bei der Darstellung der beiden Peptide folgten wir im großen und ganzen der von E. Fischer und Umetaro Suzuki gegebenen Vorschrift.¹⁾

1. Darstellung des Dialanylecystins: Es empfiehlt sich, mit kleinen Mengen zu arbeiten. 2 g Cystin werden in 30 ccm Normalnatronlauge gelöst und bei möglichst niedriger Temperatur abwechselnd 5,3 g α -Brompropionylbromid und 20 ccm Normalnatronlauge unter kräftigem Schütteln zugefügt. Es empfiehlt sich, wegen der Empfindlichkeit des Cystins gegen Alkali keinen Überschuß an Natronlauge anzuwenden und immer äquivalente Mengen von Säurebromid und Alkali zuzusetzen. Aus der angesäuerten Lösung wird der Bromkörper mit sehr viel Äther (etwa 5—6 mal $\frac{1}{3}$ Volumen der Lösung) extrahiert und sehr scharf mit Natriumsulfat getrocknet. Ist die Lösung möglichst wasserfrei, so kristallisiert der Bromkörper beim Abdestillieren des Äthers sofort. Die farblose Kristallmasse wird abgesaugt, gut mit trockenem Äther gewaschen und sofort im Vacuumexsikkator getrocknet. Durch 4—5tägiges Stehen mit der 5fachen Menge in der Kälte gesättigten Ammoniaks erhält man das Peptid. Die Lösung wird im Vacuum eingeengt, das Ammoniak durch wiederholtes Eindunsten mit Alkohol völlig vertrieben. Es ist hierbei sorgfältig darauf zu achten, daß die Temperatur nie 35° überschreitet. Aus der trockenen Kristallmasse wird schließlich das gebildete Bromammon durch Auflösen in wenig heißem Wasser und Fällen mit Alkohol entfernt.

0,1949 g Substanz gaben 0,2676 g CO_2 und 0,1044 g H_2O .

Berechnet für $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{S}_2\text{O}_6$:

Gefunden:

37,7% C und 5,76% H

37,54% C und 5,96% H.

2. Darstellung des Dileucylecystins. 5 g Cystin werden in 75 ccm Normalnatronlauge gelöst und nun unter denselben Bedingungen wie oben 10 g Bromisocapronylchlorid und 50 ccm Normalnatronlauge unter Schütteln abwechselnd zugesetzt. Die Darstellung des Bromkörpers ist dieselbe, wie eben geschildert. Die Kristallisation erfolgt durch Zusatz von Petroläther zum sirupösen Destillationsrückstand. Auch hier wurde der Bromkörper

¹⁾ Berichte d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXVII, S. 4575, 1904.

mit Ammoniak bei gewöhnlicher Temperatur umgesetzt. Die Trennung des Peptides vom Bromammon ist wegen der leichten Löslichkeit des ersteren in Wasser recht schwer. Zur Trennung wird eine konzentrierte, wässrige Lösung des Peptides mit absolutem Alkohol bis zur beginnenden Trübung versetzt und nun mit Aceton im Überschuß zur festen, amorphen Abscheidung gebracht. Diese Fällung wird mehrmals wiederholt. Die Verluste an Peptid sind hierbei ziemlich erheblich. Das Peptid zersetzte sich gegen 178° und gab folgende Zahlen.

0,1738 g Substanz gaben 0,2939 g CO₂ und 0,1140 g H₂O.

Berechnet für C₁₈H₃₄N₄S₂O₆:

Gefunden:

46,35 % C und 7,30 % H

46,12 % C und 7,29 % H.

Zu den Versuchen diente ein ca. 3 kg schwerer Hund, der während der ganzen Dauer des Versuches in einem Stoffwechsellkäfig gehalten wurde. Er befand sich während der ganzen Zeit durchaus wohl und nahm beständig an Gewicht zu. Seine Nahrung war stets dieselbe und bestand aus 50 g Schabefleisch, 50 g Stärke und 25 g Fett. Den Schwefelgehalt der Nahrung bestimmten wir nicht, dagegen stellten wir stets beim Wechsel des Fleisches durch Vorperioden den Gehalt des Harnes an oxydiertem und nicht oxydiertem Schwefel fest. Es erwies sich auch als sehr wichtig, nach Eingabe von Cystin und den Cystinpeptiden in Nachperioden die Schwefelausscheidung im Harn zu kontrollieren. Bei Fütterung per os erhielt das Versuchstier die Präparate in Futter eingewickelt. Sie wurden stets anstandslos aufgefressen und verursachten nie die geringsten Störungen. Bei der subkutanen Einführung wurde das Dialanycystin in Sodalösung, das Dileucycystin in Wasser gelöst.

Was die Methodik der Schwefelbestimmungen anbetrifft, so ist zu bemerken, daß der oxydierte Schwefel in 50 oder 25 ccm des filtrierten Harns bestimmt wurde, und zwar so, daß der Harn mit 5 ccm konzentrierter Salzsäure 15 Minuten lang nach beginnendem Kochen erhitzt wurde. Dann wurde der Harn mit Baryumchlorid gefällt, vom ausgefallenen Baryumsulfat abfiltriert, die Fällung sorgfältig mit Wasser, Alkohol und Äther gewaschen und dann geglüht. Zur Bestimmung des Gesamtschwefels wurden 50 oder 25 ccm des klaren Harns in

einer Platinschale unter Zusatz von etwas Soda auf dem Wasserbad bis zur Sirupkonsistenz eingedampft. Den Rückstand versetzten wir dann mit einem Gemisch von zwei Teilen Kaliumcarbonat, zwei Teilen Soda und einem Teil Salpeter und schmolzen das Ganze bis zur farblosen Masse. Die Schwefelsäure wurde dann, wie üblich, mit Baryumchlorid gefällt. Zur Kontrolle wurde in einem Falle (7./8. Juni) eine gleiche Menge Harn durch Kaliumchlorat in salzsaurer Lösung auf dem Wasserbade und darauf folgende Schmelze mit obigem Gemisch, und eine zweite Probe durch Schmelzen nach dem Eindampfen oxydiert. Die Differenz der S-Werte lag in der 4. Dezimale.

Wiederholt wurde auf Thioschwefelsäure gefahndet. Es konnte jedoch nie solche aufgefunden werden. Auch nach unverändertem Cystin resp. Alanin und Leucin wurde gesucht, und zwar ersteres mit Hilfe von Benzoylchlorid, letzteres teils direkt, teils mit β -Naphtalinsulfochlorid. In keinem Falle gelang es uns, Aminosäuren im Harn nachzuweisen. Ab und zu erhielten wir mit β -Naphtalinsulfochlorid eine geringe, amorphe Fällung. Sie war jedoch in keinem Falle zur Kristallisation zu bringen. Auch der Kot wurde ab und zu auf Cystin untersucht. Die Faeces wurden mit 10% igem Ammoniak wiederholt extrahiert, und die eingeengten ammoniakalischen Filtrate mit viel Eisessig versetzt. Es trat nie eine Fällung ein.

Die folgende Tabelle enthält die Ergebnisse der einzelnen Untersuchungen.

Der vorliegenden Zusammenstellung ist wenig beizufügen. Cystin, per os eingeführt, bedingt eine starke Vermehrung des oxydierten und des neutralen Schwefels. Es ist auffallend, daß der oxydierte Schwefel mit der Dauer des Versuches stetig zunahm, so daß schließlich der größte Teil des eingeführten Cystinschwefels als Schwefelsäure im Harn wiedererschien. Ganz gleich verhielt sich Dialanycystin, das offenbar zum größten Teile schon im Darne in seine Komponenten zerfallen sein dürfte. Bei subkutaner Einführung wurden Dialanyl- und Di-leucylcystin in gleicher Weise abgebaut, nur hat man den Eindruck, als ob die Ausscheidung des Schwefels bei den Peptiden weniger rasch erfolgt sei, als beim Cystin selbst.

Datum	Diät. 50 g Fleisch- pulver, 50 g Stärke, 25 g Fett	Oxydier- ter S in g der 2 Tages- harne	Neu- traler S g	Ge- samt S g	Einge- führter S g	Zunahme des ausgeschiede- nen S g	Bemerkungen
24.—25. V.	—	0,1327	0,0595	0,1922	—	—	
26.—27. V.	—	0,1803	0,0570	0,2372	—	—	
28.—29. V.	1,0 Cystin 1,0 »	0,2958	0,3713	0,6671	0,5532	0,4646	
30.—31. V.	—	0,1540	0,1179	0,2719	—	—	
1.—2. VI.	Frisches Fleisch —	0,1196	0,0921	0,2117	—	—	
3.—4. VI.	1,0 Cystin 1,0 »	0,5090	0,1299	0,6389	0,5532	0,4427	Im eingeeugten Harn kein Cystin. Faeces kein Cystin.
5.—6. VI.	—	0,1329	0,0943	0,2272	—	—	
7.—8. VI.	1,0 Cystin 1,0 »	0,5353	0,1852	0,7205	0,5532	0,5243	Keine Thio- schwefelsäure.
9.—10. VI.	—	0,1292	0,1281	0,2573	—	—	
11.—12. VI.	Frisches Fleisch 1,0 Cystin 1,0 »	0,4718	0,1243	0,5961	0,5532	0,3831	Vorperiode irr- tümlich verloren. ¹⁾ Benzoylchlorid auf Cystin negativ.
13.—14. VI.	1,0 » 1,0 »	0,6639	0,1607	0,8246	0,5532	0,6116	
15.—16. VI.	—	0,2001	0,1520	0,3521	—	0,1411	
17.—18. VI.	1,6) Dialanyl- 1,6) cystin	0,4710	0,1570	0,6280	0,5532	—	
19.—20. VI.	—	0,2319	0,1933	0,4252	—	—	
21. VI.	Hunger	—	—	—	—	—	
22.—23. VI.	Frisches Fleisch —	0,1584	0,0955	0,2539	—	—	
24.—25. VI.	1,6) Dialanyl- 1,6) cystin	0,4428	0,1182	0,5610	0,5532	0,4021	Harn kein Cystin.
26.—27. VI.	—	0,1668	0,1479	0,3147	—	—	
28.—29. VI.	—	0,1648	0,1133	0,2881	—	—	
30.—1. VII.	Frisches Fleisch —	0,1503	0,0999	0,2502	—	—	
2.—3. VII.	1,6) Dialanyl- 1,6) cystin	0,4347	0,1928	0,6275	1,1064	0,9228	Mit β-Naphtalin- sulfochlorid kein Alanin.
4. VII.	1,6) cystin 1,6)	0,3852	0,0917	0,4769			
5.—6. VII.	—	0,1665	0,1609	0,3274	—	—	
7.—8. VII.	—	0,2125	0,2793	0,4917	—	—	

¹⁾ Die Vorperiode wurde berechnet aus einer Gesamt-S-Bestimmung der Nachperiode vom 16.VI. die 0,2130 ergab und mit der Vorperiode vom 1.—2.VI. gut übereinstimmte.

Datum	Diät. 50 g Fleisch- pulver, 50 g Stärke, 25 g Fett	Oxydier- ter S in g der 2 Tages- harn	Neu- traler S g	Ge- sam- t S g	Einge- führter S g	Zunahme des ausgeschiede- nen S g	Bemerkungen
15.—16. VII.	Frisches Fleisch —	0,1714	0,1118	0,2832	—	—	Erbrechen
17.—18. VII.	1,6 } Dialanyl- cystin, sub- kutan	0,3959	0,2659	0,6618	0,5532	0,4056	Gelöst in 20 ccm 1% iger Na ₂ CO ₃ - Lösung
19.—20. VII.	—	0,1733	0,1301	0,3034	—	—	
21.—22. VII.	—	0,1808	0,1092	0,2900	—	—	
23.—24. VII.	Frisches Fleisch —	0,1387	0,0908	0,2295	—	—	Naphthalinsulfo- chloridreaktion auf Amino- säuren negativ (Spuren).
25.—26. VII.	1,6 } Dialanyl- cystin, sub- kutan	0,3570	0,2186	0,5756	0,7998	0,5090	
27. VII.	—	0,2272	0,1546	0,3818			
28.—29. VII.	—	0,1341	0,1060	0,2401	—	—	
30. VII.	—	0,0701	0,0455	0,1156	—	—	
31.—1. VIII.	Frisches Fleisch —	0,2032	0,1355	0,3387	—	—	Dileucylcystin in Wasser gelöst.
2.—3. VIII.	1,9 } Dileucyl- cystin, sub- kutan	0,3648	0,2903	0,6551	0,5532	0,3546	
4.—5. VIII.	—	0,2393	0,1340	0,3769			

Endlich haben wir noch andere Versuche begonnen. Uns interessierte die Frage, ob der Hundeorganismus racemische Aminosäuren vollständig verwertet oder aber nur die eine optisch aktive Form. Wir gaben unserem Versuchstier 8 g Dileucylcystin subkutan und prüften hierauf den Urin in den auf die Injektion folgenden 48 Stunden auf Leucin, jedoch ohne Erfolg. Es scheint somit, daß der Organismus des Hundes das ganze Leucin verbrannt hat. Die im Gange befindlichen Untersuchungen mit racemischen Peptiden (Leucylleucin, Leucylglycin etc.) müssen zeigen, ob hier vielleicht nicht doch der Organismus eine ähnliche Auswahl trifft, wie sie dem Pankreasferment eigen ist.