

Zum Chemismus der Verdauung im tierischen Körper.

III. Mitteilung.

Die Probleme des Eiweißabbaues im Verdauungskanal.

Von

E. S. London.

(Aus dem pathologischen Laboratorium des K. Instituts für experimentelle Medizin.)

(Der Redaktion zugegangen am 6. März 1906.)

1. Allgemeine Betrachtungen.

An unseren Verdauungsfistelhunden ist eine Reihe von Untersuchungen vorgenommen worden, die dazu dienen sollen, in das über den Ab- und Aufbau des Eiweißes im tierischen Organismus herrschende Dunkel einiges Licht zu bringen.

Der Vorzug der Verdauungsfistelmethode vor den bisher angewandten, wie Versuche an ausgeschnittenen Magen- und Darmabschnitten (Kühne,¹⁾ Hofmeister,²⁾ Salvioli³⁾ und Glaessner,⁴⁾ oder Töten der Tiere einige Zeit nach der letzten Fütterung (Schmidt-Mülheim,⁵⁾ Kutscher und Seemann⁶⁾ und Emil Abderhalden,⁷⁾ oder Einnähen der Darmenden in die Bauchwand (Kutscher und Seemann), besteht darin, daß dieselbe erstens Spaltungsprodukte zur Verfügung stellt in beliebig großen zur Analyse erforderlichen Mengen und daß sie zweitens die vollständigen quantitativen Bestimmungen der Abbauprodukte bis zu einer gewissen Genauigkeit ermöglicht.

¹⁾ Virchow's Archiv, 1867, Bd. XXXIX, S. 130; Zeitschrift für Biologie, 1883, Bd. XIX u. XX.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. VI, S. 69.

³⁾ Du Bois' Archiv, Supplement, 1880, S. 112.

⁴⁾ Hofmeister's Beiträge, 1901, Bd. I, S. 328.

⁵⁾ Archiv f. Anat. u. Phys., phys. Abt., 1879, S. 39.

⁶⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXIV u. XXXV, I. u. II. Mitteil., S. 528 und 432.

⁷⁾ Diese Zeitschrift, 1905, Bd. XXXIV, S. 17.

Um große Quantitäten von Verdauungsprodukten zu bekommen, vereinigt man diejenigen von mehreren Fütterungen, indem man die letzteren in Intervallen von 2 bis 8 Tagen folgen läßt. Der Magenfistelhund kann jeden zweiten Tag zum Versuch gebraucht werden, die übrigen Hunde (Pylorus-, Duodenum-, Jejunum- und Ileumfistelhunde) aber desto seltener, je näher zum Pylorus die Fistel angelegt ist, da die Tiere durch den Säfteverlust und das Hungern (am Tage vor dem Versuche) erschöpft werden können.

Was die vollständige quantitative Bestimmung der Spaltungsprodukte, welche unmittelbar durch die stetige Resorption unmöglich gemacht wird, anbetrifft, so kann sie bei folgendem Verfahren ausgeführt werden.

Vor allem möchte ich darauf hinweisen, daß, wie es aus den ihrem Abschlusse nahen Untersuchungen von A. Sulima (Fleischfütterung), W. Polowtzowa (Weißbrotfütterung) und S. Lewites (Fettfütterung) hervorgeht, der Verdauungsprozeß an allen Etappen des Magendarmkanals *ceteris paribus* nicht bloß bei einem und demselben Tiere, sondern auch bei verschiedenen Tieren mit befriedigender Regelmäßigkeit und Gesetzmäßigkeit verläuft, so daß die Resultate entsprechender Versuche miteinander verglichen werden können.

Die Zusammensetzung des Breies, welcher einen bestimmten Abschnitt des Verdauungskanals passiert hat, hängt ab von

- x — Bestandteile, die in den Abschnitt eingetreten sind,
- y — Substanzen von «x», die im Abschnitte resorbiert wurden,
- z — neu abgespaltene, aber noch nicht resorbierte Substanzen und endlich
- u — resorbierte Substanzen aus den neu abgespaltenen.

Das «x» läßt sich durch die direkte Analyse der Verdauungsprodukte, welche aus der am initialen Ende des Abschnittes angelegten Fistel (Initialfistel) erscheinen, genau bestimmen.

Läßt man die aus der Initialfistel erscheinenden Produkte, in denen das Ferment durch Erhitzen zerstört wurde, den durchgewaschenen Verdauungsabschnitt passieren, so erhält man «y» durch Subtraktion der dabei gewonnenen Werte von «x». Bei diesem Verfahren muß natürlich die Initialfistel offen bleiben, damit die Verdauungssäfte nicht in den Versuchsabschnitt geraten.

Die Analyse des Breies, welcher aus der am Ende des Versuchsabschnittes angelegten Fistel (Terminalfistel) gewonnen wird, gewährt genaue Kenntnis über die im Versuchsabschnitte neu abgespaltenen, aber noch nicht resorbierten Substanzen, d. h. über «z».

Endlich kann man den aus der Terminalfistel aufgenommenen Brei nach Zerstören des Fermentes den Versuchsabschnitt bei geöffneter Initialfistel wiederum passieren lassen, wobei die Analyse der wiedergewonnenen Produkte zur Bestimmung des «u» dienen kann.

So weit die theoretische Lösung der Frage über die vollständige quantitative Analyse der Abbauprodukte vermittelt unserer Verdauungsfistelmethode. Bei der praktischen Ausführung erwarten wir auf mancherlei Schwierigkeiten, z. B. seitens Cohnheim's Erepsin usw., zu stoßen, die aber hoffentlich nicht unüberwindbar sind.

Vor Inangriffnahme der praktischen Ausführung hielt ich es für nötig, Vorversuche anzustellen, um die Frage zu beantworten, welche Eiweißabbauprodukte man überhaupt an verschiedenen Stellen des Verdauungskanals antrifft.

Die spärlichen Angaben, welche man hierüber in der Literatur auffindet, vermögen nicht diese Frage entschieden zu beantworten, umsoweniger als hierüber noch kontroverse Meinungen herrschen.

Nach Kühne soll Pepsin die Eiweißkörper nur bis zu den Peptonen abbauen, dagegen meint Emil Abderhalden, daß bei der Magenverdauung auch biuretfreie Spaltungsprodukte entstehen.

Was das Trypsin anbetrifft, so wies Kühne nach, daß bei der Einwirkung des Pankreassaftes auf Eiweißkörper tiefgehende Spaltungen auftreten, dabei wird ein Teil des Eiweißes — die sogenannte Hemigruppe — vollständig zerlegt, während der andere Teil — die Antigruppe resp. das Antipepton — der Einwirkung des Trypsins hartnäckigen Widerstand leisten soll. Im Einklang mit diesen Versuchen stehen diejenigen von E. Pick,¹⁾ Siegfried mit seinen Schülern und endlich Emil

¹⁾ Diese Zeitschrift, 1899, Bd. XXVIII, S. 49.

Fischer und Emil Abderhalden.¹⁾ Aus den Versuchen der letzteren geht hervor, daß bei der Verdauung der Eiweißkörper durch Trypsin neben Tyrosin, Leucin, Alanin, Asparaginsäure und Glutaminsäure als Endprodukt ein polypeptidartiger Stoff entsteht, der bei weiterer Hydrolyse mit Kochen der Salzsäure reichliche Mengen von α -Pyrrolidincarbonensäure und Phenylalanin liefert. Aus dieser Tatsache ziehen die Autoren den Schluß, es finde keine totale Sprengung des Eiweißmoleküls im Darmkanal statt.

Im Inhalte des Darmkanals sind bis jetzt Leucin, Tyrosin (Kölliker und Müller, Kühne, Kutscher und Seemann), Lysin und Arginin (Kutscher und Seemann) nachgewiesen. Ob im Darmkanal bei der Eiweißverdauung außer diesen Mono- und Diaminosäuren noch andere hervortreten, ist noch unbekannt.

Ferner sei bemerkt, daß das bloße Auffinden irgend eines krystallinischen Spaltungsproduktes im Inhalte des Verdauungskanals nicht unbedingt dafür spricht, daß dasselbe zur Resorption oder zum Aufbau des Eiweißmoleküls bestimmt ist. Kühne z. B. will Leucin und Tyrosin als Abfallstoffe betrachten, Salkowski, Leube²⁾ u. a. demgegenüber als Bausteine, die dem Tiere zur Bildung seines Körpereißes dienen. Die Beobachtungen von Kölliker und Müller,³⁾ nach denen Leucin und Tyrosin bei ihrem Durchgang durch den Dünndarm aus demselben allmählich verschwinden, die bestätigt werden durch die Befunde von Macfadyen, Nencki und Sieber,⁴⁾ welche bei einem Kranken in den Entleerungen aus einer am untersten Ende des Dünndarmes sitzenden Fistel nie Leucin und Tyrosin fanden, vermögen nicht diese Frage zu entscheiden. Das kann nur durch systematische Verfolgung des ganzen Ablaufes der Eiweißverdauung mit quantitativer Analyse aufgeklärt werden.

2. Experimentelle Untersuchungen.

Wir fingen mit den Entleerungen an, welche aus der in der Mitte des Dünndarms sitzenden Fistel erscheinen. Von

¹⁾ Diese Zeitschrift, 1903, Bd. XXXIX, S. 81.

²⁾ Die Lehre vom Harn. Berlin, 1882, S. 430.

³⁾ Verh. d. physik.-med. Gesellschaft in Würzburg, 1856, Bd. VI, S. 507.

⁴⁾ Arch. f. exp. Path. u. Pharm., 1891, Bd. XXVIII, S. 344.

ca. 4 Fütterungen mit 500 g magerem feingehackten Fleische wurden 175 g (Asche abgezogen) wasserlösliche Substanz erhalten. Die letztere wurde in Wasser gelöst, mit Schwefelsäure angesäuert und Phosphorwolframsäure gefällt.

a) Das Phosphorwolframsäurefiltrat.

Das Filtrat, welches 41 g Substanz enthielt, wurde mit Baryt von der überschüssigen Phosphorwolframsäure, mit Schwefelsäure vom Baryt quantitativ befreit und auf dem Wasserbade stark eingeengt.

Es fiel dabei Tyrosin aus, welches mit kaltem Wasser gewaschen, von anorganischen Beimengungen durch Umkrystallisieren gereinigt, mit Eisessig gewaschen, wieder getrocknet und gewogen wurde.

Gewicht des gewonnenen Tyrosins: 1,65 g.

0,1225 g Tyrosin gaben 0,7302 g C und 0,0730 g H

Berechnet für $C_9H_{11}NO_3$:

Gefunden:

59,67% C und 6,08% H.

59,61% C und 6,03% H.

Die Mutterlauge wurde noch stärker eingeengt und zur Glutaminsäurebestimmung mit gasförmiger Salzsäure gesättigt. Es schied sich nach dem Erkalten ein organischer amorpher Niederschlag, dem ein krystallinischer anorganischer Niederschlag beigemischt war, ab. Aus dem amorphen Niederschlag konnte durch Sättigen mit Salzsäuregas kein Glutaminsäurechlorhydrat auskrystallisiert werden.

Die vom Niederschlag abgesaugte Flüssigkeit wurde bis fast zur Trockene eingedampft, im absoluten Alkohol aufgenommen und mit trockenem Salzsäuregas verestert. Bei längerem Stehen in der Kälte erfolgte nach Einimpfen eines Kryställchens von Glykokollesterchlorhydrat keine Krystallisation. Eine Wiederholung desselben Verfahrens war ebenfalls erfolglos. Ebenso erfolgte keine Krystallisation nach starkem Einengen, Abkühlen und abermaligem Impfen der Flüssigkeit. Die letztere wurde dann in absolutem Alkohole aufgenommen, mit Tierkohle aufgekocht, verestert, unter vermindertem Drucke bei 32—35° C. stark eingeengt. Der Rückstand wurde in Alkohol gelöst und die Ester mit einer genau berechneten Natriumäthylatmenge in Freiheit gesetzt, das Kochsalz mit Äther gefällt, der Äther und

Alkohol möglichst ausgetrieben und der Rest in 4 Fraktionen destilliert:

Fraktion I	bis	55°	des Wasserbades	und	10–12 mm	Druck
„ II	„	100°	„	„	10–12	„
„ III	„	100°	„	„	0,5	„
„ IV	„	200°	Ölbades	„	0,5	„

Im Destillationskolben verblieb ein dunkelbrauner Rückstand.

Das ätherisch-alkoholische Destillat wurde mit salzsäurehaltigem Wasser aufgeschüttelt und zur Trockne verdampft. Es blieb ein brauner Rückstand, der mit den amorphen Rückständen, welche sich bei den Versuchen zur Auffindung des Glykokolls abschieden, und mit einem Teile der verseiften ersten Fraktion vereinigt, mit absolutem Alkohol übergossen und mit trockenem Salzsäuregas gesättigt wurde. Trotz längeren Stehens auf Eis und Einimpfens eines Kryställchens von Glykokollesterchlorhydrat ließ sich kein krystallinischer Niederschlag abscheiden.

Die I. Fraktion wurde durch 9stündiges Kochen mit einer fünffachen Wassermenge verseift und auf dem Wasserbade sehr stark eingeeengt. Es schied sich das Leucin ab. Das Filtrat wurde zur Trockne verdampft und mit Alkohol aufgeköcht. Der Rückstand wurde in Fraktionen zerlegt.

Die II. Fraktion wurde durch 8stündiges Kochen mit einer fünffachen Wassermenge verseift, dann durch Einengen in Fraktionen geteilt und die krystallinischen Produkte mit Alkohol ausgeköcht.

Die III. Fraktion wurde wie die ersten beiden verseift, dann eingedampft, zur Krystallisation gebracht und die Krystalle mit Alkohol ausgeköcht.

Aus diesen drei Fraktionen wurden 1,55 g Leucin und 0,9 g Alanin isoliert. α -Pyrrolidincarbonsäure konnte nicht nachgewiesen werden. Der Rückstand der vereinigten alkoholischen Auszüge wurde nach der üblichen Methode bearbeitet, und eine Kupferverbindung erhalten, die aber bei der Bestimmung des Krystallwassers und des Kupfergehaltes Resultate lieferte, welche der Zusammensetzung $(C_5H_8NO_2)Cu + 2H_2O$ nicht entsprechen.

0,1735 g Leucin gaben 0,09527 g C und 0,0170 g H

Berechnet für $C_6H_{11}NO_2$:

54,96% C und 9,92% H.

Gefunden:

54,91% C und 9,81% H.

0,1813 g Alanin gaben 0,7321 g C und 0,1413 g H.	
Berechnet für $C_3H_7NO_2$:	Gefunden:
40,45% C und 7,87% H.	40,38% C und 7,80% H.

Die IV. Fraktion wurde mit Wasser versetzt, wobei fast vollständige Lösung erfolgte (es verblieb eine gelbe, ölige Masse) und das Gemisch mit dem gleichen Volumen Äther geschüttelt; die ölige Masse wurde gelöst. Der im Scheidetrichter abgehobene Äther wurde noch einigemal mit Wasser durchgeschüttelt, die Lösung verdampft und der Rückstand mit überschüssiger konzentrierter Salzsäure eingedampft, mit Ammoniak übergossen und wieder verdampft und vermittelt kalten Wassers von Chlorammonium befreit. Es verblieb eine geringe Substanzmenge, welche für die Analyse nicht ausreichte. Es wurde deshalb die qualitative Reaktion mit Schwefelsäure und Bichromat (Fischer) ausgeführt, wobei aber kein deutlicher Geruch von Phenylacetaldehyd wahrzunehmen war.

Die wässerigen Lösungen wurden vereinigt mit Barythydrat erwärmt. Beim 4tägigen Stehen schied sich nur ein sehr geringer Niederschlag aus, der abfiltriert, mit Schwefelsäure zerlegt, wieder filtriert und bis zur Krystallisation eingengt wurde. Es schied sich nun eine ganz geringe Menge von Krystallen ab.

In der Mutterlauge wurde in der üblichen Weise nach Glutaminsäure gesucht, aber wieder erfolglos. Ebenso erfolglos war das Suchen nach der Glutaminsäure im Destillationsrückstand, welcher in der von Emil Abderhalden und H. Gideon Wells¹⁾ angegebenen Weise untersucht wurde.

Dagegen wurden aus der erwähnten Mutterlauge und dem Destillationsrückstand 0,65 g Asparaginsäure isoliert (Kochen mit überschüssigem Bleioxyd, Entbleiung durch Schwefelwasserstoff, Einengen bis zur Krystallisation).

Zur Reinigung der isolierten Asparaginsäure wurde die Kupferverbindung hergestellt.

0,2444 g Asparaginsäure gaben 0,0696 g CuO	
Berechnet für $C_4H_6NO_4Cu + 4\frac{1}{2}H_2O$:	Gewonnen:
22,91% Cu.	21,71% Cu.

¹⁾ Diese Zeitschrift, 1905, Bd. XLVI, H. 1 u. 2, S. 31.

b) Der Phosphorwolframsäureniederschlag.

Der abgesaugte Phosphorwolframsäureniederschlag wurde mit Baryt zerlegt, das Filtrat durch Schwefelsäure vom Baryt befreit und zwecks Isolierung der Hexonbasen¹⁾ mit einer Tanninlösung vollkommen ausgefällt. Die gefällte Flüssigkeit klärte sich nach 2 Tagen vollständig und wurde vom Niederschlage abgossen. Das überschüssige Tannin wurde durch Barytlösung und endlich Bleioxyd und Bleiacetat beseitigt: Baryt und Blei durch Schwefelsäure entfernt. Das Filtrat wurde mit Phosphorwolframsäure gefällt, der Niederschlag mit Baryt zerlegt, vom Baryt mit Schwefelsäure befreit und nach Kossel's Verfahren in eine Histidin-, Arginin- und Lysinfraktion geteilt.

Aus der Lysinfraktion ließ sich eine Ausbeute von 0,48 g Lysinpikrat gewinnen. Was aber das Histidin und Arginin anlangt, so scheinen sie, nach den qualitativen Reaktionen zu schließen, vorhanden gewesen zu sein, es gelang aber nicht, sie in analysenreinem Zustande zu gewinnen. Dazu sind größere Quantitäten nötig und wir denken deshalb die ganze Analyse an einem reichlicheren Material zu wiederholen.

3. Schluß.

Aus all dem Gesagten glaube ich folgende Schlüsse ziehen zu dürfen:

1. Die Aufgabe der vollständigen quantitativen Analyse des Eiweißabbaues im tierischen Organismus kann als lösbar angesehen werden.

2. Die Fischer'sche Estermethode ist zur Analyse der dem tierischen Organismus entnommenen Verdauungsprodukte mit gutem Erfolge anwendbar.

3. Im mittleren Abschnitte des Dünndarmes lassen sich bei Fleischfütterung außer den Spaltungsprodukten, welche schon von anderen Autoren nachgewiesen worden sind, noch Alanin und Asparaginsäure isolieren.

¹⁾ Vergl. Kutscher u. Lohmann, Diese Zeitschrift, 1905, Bd. XLVI, Heft 4, S. 383.