

Studien über Phosphorvergiftung.

Von

Emil Abderhalden und Alfred Schittenhelm.

(Aus dem I. chemischen Institute der Universität Berlin.)

(Der Redaktion zugegangen am 8. August 1906.)

Durch eine Reihe von Versuchen aus dem hiesigen Institut ist festgestellt, daß der tierische Organismus und zwar speziell der Hund die ihm per os und subkutan zugeführten Peptide vollständig abbaut. Der eingegebene Stickstoff erscheint als Harnstoff wieder. Ebenso ist bewiesen, daß die verschiedensten Organe Fermente enthalten, welche Peptide in der gleichen Weise spalten, wie das Trypsin des Pankreassaftes. Diese Untersuchungen sind ausnahmslos an Tieren angestellt worden, welche sich unter ganz normalen Verhältnissen befanden. Es war nun von Interesse, den Abbau der Peptide unter pathologischen Verhältnissen zu studieren. Als einfachsten Fall wählten wir die Phosphorvergiftung. Einem gesunden männlichen Hunde von etwa 5 kg Gewicht spritzten wir zunächst zur Kontrolle 4,0 g dl-Leucyl-glycin unter die Haut. Diese Menge war in ca. 200 ccm Wasser gelöst worden. Die Urinmenge betrug am ersten Tag (15. VI.) 400 ccm. Nach dem Verdünnen des Urins mit etwa dem fünffachen Volumen Wasser wurde er mit Bleiacetat gefällt, der entstandene Niederschlag abgesaugt, scharf abgepreßt und mit Wasser gewaschen. Im Filtrat entfernten wir das gelöste Blei mit Schwefelwasserstoff und dampften dann unter vermindertem Druck bis zum Sirup ein. Der Rückstand wurde mit zirka dem 10fachen Volumen Alkohol übergossen und bis zur Sättigung gasförmige, trockene Salzsäure eingeleitet. Die Veresterung wurde nochmals wiederholt und nach dem nochmaligen Eindampfen der alkoholischen Lösung der Esterchlorhydrate der möglichst von Salzsäure befreite Rückstand in Alkohol gelöst und die Lösung auf ein bestimmtes Volumen gebracht. In einem aliquoten Teil bestimmten wir den Gehalt an Salzsäure und setzten dann die etwa vorhandenen Ester mit der berechneten Menge Natriumäthylat in Freiheit. Die vom

ausgeschiedenen Kochsalz befreite alkoholische Lösung wurde nun unter vermindertem Druck bis 100° des Wasserbades destilliert und das Destillat in einer mit Kochsalzeismischung sorgfältig gekühlten Vorlage aufgefangen. Das Destillat schüttelten wir mit verdünnter wässriger Salzsäure und verdampften es dann zur Trockene. Es hinterließ nur eine Spur eines bräunlich gefärbten Produktes. Der im Destillationskolben verbliebene Teil wurde zunächst zur Entfernung etwa vorhandener Monoaminosäureester mit Äther ausgeschüttelt und der Äther abdestilliert. Es hinterließen keine Aminosäureester, wenigstens konnten wir an der Spur des verbliebenen Rückstandes den charakteristischen Geruch der Monoaminosäureester nicht wahrnehmen. Der in Äther unlösliche Teil des Destillationsrückstandes wurde in Alkohol gelöst und in die klare, braun gefärbte Lösung bis zur Sättigung gasförmiges, trockenes Ammoniak eingeleitet. Es schied sich sofort etwas Chlorammon ab. Nach dessen Entfernung konnte auch bei starkem Einengen der Lösung kein Produkt erhalten werden, das auf Leucyl-glycin resp. dessen Anhydrid hingewiesen hätte. Daß dieses Peptid im Harn mit den genannten Methoden, selbst wenn es nur in kleinen Mengen vorhanden ist, nachgewiesen werden kann, hat jüngst der eine von uns in Gemeinschaft mit Dr. Kautzsch gezeigt.¹⁾ Es scheint somit, daß das gesamte Leucyl-glycin bei der subkutanen Einführung verbrannt worden ist. Daß der Stickstoff dieses Peptides bei seiner Eingabe per os in Form von Harnstoff im Harn wieder erscheint, ist kürzlich gezeigt worden.²⁾

Es war noch die Möglichkeit vorhanden, daß das etwas schwerlösliche dl-Leucyl-glycin langsam ausgeschieden wird. Wir verarbeiteten deshalb den Harn vom 16. VI. und vom 17. — 19. VI. Das Resultat war stets dasselbe. Es konnten weder Spaltprodukte des dl-Leucyl-glycins, noch dieses selbst im Harn aufgefunden werden.

¹⁾ Emil Abderhalden und Karl Kautzsch, Der Abbau des Leucyl-glycins und Leucyl-glycyl-glycins im Organismus des Kaninchens. Diese Zeitschrift, Bd. XLVIII, S. 557, 1906.

²⁾ Emil Abderhalden und Boris Babkin, Der Abbau des Leucyl-glycins im Organismus des Hundes, Diese Zeitschrift, Bd. XLVII, S. 391, 1906.

Am 19. VI. erhielt das Tier 0,01 g Phosphor in Öl subkutan, am 20. VI. 0,005 g und am 21. 0,01 g. Vom 19. VI. bis 22. VI. wurde der Urin 2000 ccm gesammelt und auf Aminosäuren und etwaige kompliziertere Produkte eiweißartiger Natur untersucht. Das Resultat war ein negatives. Hierauf erhielt der Versuchshund, der sich bis dahin anscheinend ganz wohl befand, am 25. VI. 0,01 g Phosphor. Vom 22. — 27. VI. wurde wiederum der Harn gesammelt und untersucht. Seine Menge betrug 3000 ccm. Auch hier gelang es nicht, mit Sicherheit Aminosäuren zu isolieren. Am 27. VI. erfolgte eine weitere Phosphoröleinspritzung. Sie enthielt 0,01 g Phosphor. Zugleich erhielt nun das Tier 4 g dl-Leucyl-glycin in 200 ccm Wasser gelöst subkutan. Der vom 27. VI. — 2. VII. gesammelte Urin 2500 ccm wurde in genau derselben Weise, wie wir es oben geschildert haben, auf Aminosäuren und Peptid untersucht. Der Befund war völlig negativ. Offenbar war auch hier das dl-Leucyl-glycin völlig abgebaut worden. Da jedoch im Urin auch sonst keine Aminosäuren nachweisbar waren, so war offenbar eine irgendwie stärkere Vergiftung noch nicht eingetreten.¹⁾ Wir setzten deshalb die Zufuhr von Phosphor fort. Am 2. VII. erhielt das Versuchstier 0,03 g Phosphor, am 3. VII. 0,03 g und am 4. VII. 0,05 g. In dem am 2. — 5. VII. gesammelten Harn 2000 ccm waren bereits Aminosäuren nachweisbar. Ihre Menge war zu gering, um sie zu identifizieren. Am 5. VII. zeigte schon das Verhalten des Hundes, daß er schwer vergiftet war. Er lag meist unbeweglich im Käfig. Er erhielt am 5. VII. noch 0,05 g Phosphor und zugleich 4 g dl-Leucyl-glycin. Die Urinmenge betrug an diesem Tage 150 ccm. Gegen 7 Uhr abends war der Tod eingetreten. Der Urin wurde in derselben Weise verarbeitet wie immer. Er enthielt Aminosäuren und zwar Glykoll, das als Esterchlorhydrat vom Schmelzpunkt 143° (körr.) nachgewiesen wurde, und ferner Leucin und höchstwahrschein-

¹⁾ Vergl. hierzu: Emil Abderhalden und Lewellys F. Barker, Der Nachweis von Aminosäuren im Harn. Diese Zeitschrift, Bd. XLII, S. 524, 1904, und Emil Abderhalden und Peter Bergell, Der Abbau der Peptide im Organismus. Diese Zeitschrift, Bd. XXXIX, S. 9, 1903.

lich noch andere Aminosäuren. Das Leucin wurde durch die Überführung in das Kupfersalz von den übrigen Aminosäuren getrennt.

| | |
|---------------------------------------|------------|
| 0,1704 g Substanz gaben 0,0422 g CuO | |
| Berechnet für $(C_6H_{12}NO_2)_2Cu$: | Gefunden: |
| 19,6% Cu | 19,77% Cu. |

Unverändertes oder partiell gespaltenes Peptid konnten wir nicht auffinden. Es bleibt fraglich, ob die aufgefundenen Aminosäuren nicht wenigstens zum Teil auf das eingeführte dl-Leucyl-glycin zurückzuführen sind. Jedenfalls konnte auf diesem Wege unter den gewählten Bedingungen nicht klar entschieden werden, ob die proteolytischen Fermente durch die Phosphorvergiftung nach irgend einer Richtung geschädigt worden waren. Wir wählten deshalb zur Entscheidung dieser Frage eine andere Versuchsanordnung.

Ein kleiner, ca. 2½ kg schwerer Hund erhielt am 1. VIII. 0,05 g Phosphor, am 2. VIII. 0,02 g. Am 3. VIII. trat der Tod ein. Die Leber dieses Tieres bot das typische Bild einer Phosphorleber. Sie wurde sofort nach möglicher Entfernung des Blutes mit Sand fein zerrieben und dann nach Vermengen mit Kieselgur unter 300 Atmosphären Druck ausgepreßt. Verwertet wurde nur die bei höherem Druck (von 150—300 Atmosphären) ausgepreßte Flüssigkeit. Mit diesem Preßsaft versuchten wir Glycyl-glycin und dl-Leucyl-glycin zu spalten. Der Leberpreßsaft normaler Tiere bewirkt, wie jüngst nachgewiesen wurde, eine recht beträchtliche Hydrolyse dieser beiden Peptide, und zwar wird das dl-Leucyl-glycin asymmetrisch gespalten. Es läßt sich l-Leucin und aktives Dipeptid nachweisen. Es war von Interesse, festzustellen, ob der aus der Phosphorleber gewonnene Preßsaft sich anders verhält, als der normale. Leider sind unsere Methoden noch nicht so fein, um auch quantitative Unterschiede über jeden Zweifel erhaben nachzuweisen. Wir fanden, daß der verwendete Preßsaft sowohl das Glycyl-glycin als das dl-Leucyl-glycin spaltete, und zwar haben wir den Eindruck gewonnen, als ob die Menge der entstandenen einfachen Aminosäuren eine größere war, als wir sie unter normalen Verhält-

nissen beobachteten.¹⁾ Wir wagen jedoch nicht, nach dieser Richtung schon bestimmte Schlüsse zu ziehen, denn es gehört eine sehr reiche Erfahrung und eine sehr große Zahl von Versuchen dazu, um zu einwandfreien Resultaten zu gelangen. Jedenfalls kann man in diesem Falle von einer Schädigung der proteolytischen Fermente der Leber nicht sprechen. Wir betonen noch ausdrücklich, daß unsere Versuche nur die eine Etappe des Abbaues der Peptide umfassen, nämlich ihre Hydrolyse. Sie sagen jedoch nichts über die weiteren, komplizierteren Prozesse aus, die bei der totalen Verbrennung und der Harnstoffbildung sich vollziehen.

Zu den vorliegenden Versuchen wurden 2,5 g Glycylglycin in 20 cem Wasser gelöst, und die Lösung nach Zusatz von 25 cem Leberpreßsaft und etwas Toluol drei Tage im Brutraum aufbewahrt. Nach den schon oft beschriebenen Methoden isolierten wir 1,2 g Glykokollesterchlorhydrat vom Schmelzpunkt 143° (korr.) und 0,25 g Glycinanhydrid.

Von dl-Leucyl-glycin verwandten wir 2,5 g. Sie wurden in 60 cem Wasser gelöst, und die Lösung mit 25 cem Preßsaft und etwas Toluol in den Brutraum gestellt. Nach drei Tagen wurde der Versuch abgebrochen. Isoliert wurden 0,25 g Glykokollesterchlorhydrat, 0,8 g l-Leucin ($[\alpha]_{20}^D = +14,5^\circ$ in 20%iger Salzsäure) und 0,2 g Leucyl-glycinanhydrid. Letzteres war zum Teil inaktiv, zum Teil optisch aktiv. Offenbar war ein Teil des zugesetzten dl-Leucyl-glycins unverändert geblieben, während der größte Teil gespalten worden war. Das isolierte Produkt war zum Teil krystallisiert, zum Teil bestand es aus schollenartigen Massen. Es ergab in Wasser gelöst

$$[\alpha]_{20}^D = +21^\circ.$$

Wir haben schließlich noch einzelne Organe und das Blut des ersten Phosphorhundes auf Aminosäuren untersucht. Im Blut konnten wir nach der Entfernung des Eiweißes durch Koagulation nur Spuren von Aminosäuren auffinden. Vorhanden

¹⁾ Vergl. hierzu: Martin Jacoby, Über die Beziehungen der Leber- und Blutveränderungen bei Phosphorvergiftung zur Autolyse. Diese Zeitschrift, Bd. XXX, S. 174, 1900.

waren sicher welche, jedoch vermochten wir nicht, sie zu identifizieren. Dagegen gelang es uns, aus der zerkleinerten Leber, der Milz und den Nieren Aminosäuren zu gewinnen. Wir kochten den Brei dieser Organe zweimal mit Wasser aus und verarbeiteten das Filtrat in der gewohnten Weise nach der Estermethode. Peptidartige Verbindungen konnten wir nicht isolieren, dagegen erhielten wir beim Destillieren der freien Ester aus dem Destillat, nach dessen Verdampfung mit wässriger Salzsäure einen ganz beträchtlichen Rückstand. Er bestand aus salzsauren Aminosäuren. Eine Probe des Rückstandes versetzten wir mit zirka der 5fachen Menge Alkohol und leiteten gasförmige, trockene Salzsäure bis zur Sättigung ein. Nach dem Impfen mit einem Kryställchen von Glykokollesterchlorhydrat und einigem Stehen bei 0° erfolgte bald Krystallisation. Der Schmelzpunkt der erhaltenen Krystalle war 142° (korr.). Es war somit Glykokoll vorhanden. Den Rest der salzsauren Aminosäuren versetzten wir mit wässrigem Ammoniak und dampften dann zur Trockene ein. Das gebildete Chlorammon entfernten wir durch Auslaugen mit kaltem Wasser. Durch Umkrystallisieren aus heißem Wasser unter Anwendung von wenig Tierkohle erhielten wir 0,35 g reines Leucin.

0,1616 g Substanz gaben 0,3256 g CO₂ und 0,1447 g H₂O

Berechnet für C₆H₁₃NO₂:

Gefunden:

54,96% C und 9,92% H 55,15% C und 9,91% H.

Ob noch andere Aminosäuren vorhanden waren, konnten wir nicht entscheiden. Es ist natürlich auch hier nicht sicher zu entscheiden, ob die nachgewiesenen Aminosäuren vom Eiweißabbau in der Leber herrühren, oder ob sie mit dem zugeführten Leucyl-glycin in Zusammenhang stehen. Letzteres erscheint uns wenig wahrscheinlich. Wir können jedoch diese Möglichkeit nicht ausschließen.¹⁾

¹⁾ Sotnitschewsky (Über Phosphorvergiftung. Diese Zeitschrift, Bd. III, S. 391, 1879) hat bereits Tyrosin und Leucin in der Leber bei Phosphorvergiftung nachgewiesen, während später August Hirschler (Beiträge zur Analyse der stickstoffhaltigen Substanzen des Tierkörpers. Diese Zeitschrift, Bd. XI, S. 39, 1887) betont, daß eine Bildung von Aminosäuren auch ausbleiben kann.