

Weitere Studien über die normale Verdauung der Eiweißkörper im Magendarmkanal des Hundes.,

III. Mitteilung.¹⁾

Von

Emil Abderhalden, Kornel von Körösy (Budapest) und
E. S. London (St. Petersburg).

(Aus dem chemischen Institute der Universität Berlin und dem pathologischen Laboratorium des K. Instituts für experimentelle Medizin zu St. Petersburg.)

(Der Redaktion zugegangen am 4. August 1907.)

Für die ganze Auffassung des Eiweißstoffwechsels im tierischen Organismus ist es von allergrößter Wichtigkeit, einen exakten Einblick in das Verhalten der Nahrungseiweißstoffe im Magendarmkanal zu erhalten, d. h. zu erfahren, ob der Resorption der Proteine ein weitgehender Abbau vorausgeht. Für die Annahme, daß die Nahrungseiweißstoffe, ehe sie in den eigentlichen Stoffwechsel eintreten, einen umfassenden Umbau erleiden müssen, haben wir manche Hinweise. Sie sind allerdings durchweg nur indirekter Natur. Sie stützen sich einmal auf die Tatsache, daß die Nahrungsproteine sich in verschiedener Beziehung von den Körpereiwweißstoffen in ihrer Zusammensetzung unterscheiden. Unsere Methoden gestatten vorläufig im wesentlichen nur eine Vergleichung der Mengen an einzelnen Aminosäuren der verschiedenartigen Nahrungs- und Körperproteine. Schon eine solche Gegenüberstellung zeigt große Unterschiede und selbst dann, wenn wir ungefähr gleiche

¹⁾ Vgl. Emil Abderhalden, Karl Kautzsch und E. S. London, Studien über die normale Verdauung der Eiweißkörper im Magendarmkanal des Hundes, Diese Zeitschrift, Bd. XLVIII, S. 549, 1906. — Emil Abderhalden, L. Baumann und E. S. London, Weitere Studien über die normale Verdauung der Eiweißkörper im Magendarmkanal des Hundes, II. Mitteilung, Ebenda, Bd. LI, S. 384, 1907.

Mengen an den einzelnen Bausteinen auffinden, sind wir durchaus nicht berechtigt, von Proteinen zu sprechen, die in ihrem Aufbau übereinstimmen. Die Möglichkeit, daß z. B. durch eine verschiedene Reihenfolge der Aminosäuren dennoch große Unterschiede bestehen, muß betont werden. Hier wird in Zukunft die partielle Hydrolyse ein entscheidendes Wort sprechen. Für eine weitgehende Abänderung des Nahrungseiweißes spricht ferner der Umstand, daß der Verdauung unterlegenes, resorbiertes Eiweiß als solches jenseits des Darmes mit Hilfe der biologischen Reaktion nicht mehr nachweisbar ist. Wir wollen auf die weiteren Gründe, die für einen weitgehenden Abbau der Nahrungsproteine im Magendarmkanal sprechen, nicht eingehen, sondern nur noch hervorheben, daß nach neueren Versuchen des einen von uns mit Peter Rona¹⁾ der endgültige Beweis geliefert ist, daß der tierische Organismus sein Körper-eiweiß aus den einfachsten Bausteinen, den Aminosäuren, aufbauen kann, wenn diese nur alle und in genügender Menge vorhanden sind. Es steht somit der Annahme, daß der Abbau der Nahrungsproteine im Magendarmkanal ein totaler oder doch ein sehr weitgehender ist, nach dieser Richtung nichts im Wege. Ein direkter Beweis für die Größe des Eiweißabbaus unter natürlichen Bedingungen steht noch aus. Der Umstand, daß es gelingt, durch successive Verdauung mit Magen-, Pankreas- und Darmsaft Eiweiß vollständig zu zerlegen, darf vorläufig nicht als Beweis dafür betrachtet werden, daß der Abbau im Magendarmkanal selbst ein entsprechender ist. Jedenfalls muß a priori die Möglichkeit zugegeben werden, daß der Abbau der Nahrungsproteine zum Teil bei komplizierteren Produkten — Polypeptiden — stehen bleiben kann und solche Gruppen direkt zur Synthese des neuen Körpereißes Verwendung finden können. Einer direkten Beweisführung über die Größe des Eiweißabbaues im Magendarmkanal stehen bis jetzt unüberwindbare Schwierigkeiten entgegen. Wir können vorläufig nur die Frage entscheiden, ob in einem bestimmten Momente in einem bestimmten Teil des

¹⁾ Emil Abderhalden und Peter Rona, Weiterer Beitrag zur Frage nach der Verwertung von tief abgebautem Eiweiß im Organismus des Hundes, Diese Zeitschrift, Bd. LII, S. 507, 1907.

Darmes tiefe Abbauprodukte nachweisbar sind, und in welchen Mengen. Derartige Untersuchungen haben ergeben, daß im Magen höchstwahrscheinlich keine Aminosäuren entstehen, dagegen lassen sich solche stets vom Pylorus an bis zur Ileocoecalclappe im ganzen Darne nachweisen. Ihre Menge ist stets klein im Verhältnis zu den gesamten Verdauungsprodukten. Wir haben schon früher betont, daß dieser Umstand nicht unbedingt dagegen spricht, daß als letzte Verdauungsprodukte ausschließlich Aminosäuren auftreten. Es ist nicht ausgeschlossen, daß die tiefsten Abbauprodukte stets sofort resorbiert werden, während die höheren Spaltprodukte im Darm zurückbleiben. Wir erhalten dann natürlich beim Auffangen des Chymus aus Fisteln des Magendarmkanals stets in überwiegendem Maße gerade diese komplizierteren Abbauprodukte.

Wir haben diese Versuche fortgesetzt und zwar wählten wir zur Verfütterung ein Pflanzeneiweiß, das Gliadin. Die Versuchstiere waren dieselben, wie bei den früheren Versuchen, und die Methoden der Verarbeitung der einzelnen Verdauungsprodukte waren gleichfalls ganz die entsprechenden, so daß wir auf sie nicht mehr einzugehen brauchen. Hervorgehoben sei, daß wir einige Kontrollversuche angestellt haben, um den folgenden Einwand zu entkräften. Der aus den Fisteln ausfließende Chymus wurde nämlich in auf Eis aufbewahrten Gefäßen aufgefangen, und außerdem waren in das Gefäß hinein Eisstücke gelegt worden. Die Dauer des Auffangens betrug 2—12 Stunden. Von Zeit zu Zeit wurden die Produkte aus dem Gefäß entfernt und aufgekocht. Man könnte nun den Einwand erheben, daß trotz aller Vorsichtsmaßregeln die Bildung der gefundenen Aminosäuren auf eine außerhalb des Körpers fortgesetzte Verdauung zurückzuführen sei und zwar während der Zeit des Auffangens des Chymus und des Verweilens in dem zum Auffangen dienenden Gefäße. Wir haben, um die Berechtigung dieses Einwurfes zu prüfen, Eiereiweiß, Fleisch und Gliadin mit Magensaft verdaut und dann nach Neutralisation mit Soda und nach dem Abkühlen der ganzen Verdauungsflüssigkeit auf 0° Pankreassaft und Darmsaft zu dem Verdauungsgemisch zugesetzt und das innig verrührte Gemisch 10 Stunden

auf Eis aufbewahrt. Wir konnten nach Verlauf dieser Zeit nur Spuren von Aminosäuren nachweisen. Schließlich haben wir einige der erhaltenen Verdauungsbreie vom Hunde aus etwa 1%iger Lösung in Wasser mit Phosphorwolframsäure gefällt, den Niederschlag scharf abgepreßt, ihn dann in der gewohnten Weise mit Baryt zerlegt und aus dem Filtrat des phosphorwolframsauren Baryts den Überschuß an Baryt quantitativ mit Schwefelsäure entfernt. Wir engten dann das Filtrat vom Baryumsulfat unter vermindertem Druck bei einer 40° nicht übersteigenden Temperatur des Wasserbades bis zum dicken Sirup ein. Diesen lösten wir in etwa 10 Teilen Wasser, kühlten die Lösung in Eis auf 0° ab und setzten Pankreassaft und Darmsaft zu. Auch hier ließen sich nach 10stündigem Verweilen bei 0° nur Spuren von Aminosäuren nachweisen. Wir dürfen somit die bei den mitgeteilten Versuchen an den Fistelhunden gefundenen Mengen an Aminosäuren unzweifelhaft als im Darmrohre selbst entstanden betrachten. Im Filtrat des Niederschlags mit Phosphorwolframsäure fällten wir ferner die überschüssige Phosphorwolframsäure mit Baryt und entfernten dessen Überschuß mit Schwefelsäure. Das Filtrat vom Baryumsulfat engten wir unter vermindertem Druck bis zur beginnenden Krystallisation ein, saugten dann ab und wiederholten das Einengen, solange etwas ausfiel. Wir verglichen die so erhaltenen Mengen an einfachen Abbauprodukten mit den mit Hilfe der Estermethode erhaltenen. Wir erhielten stets 2 bis 3fach höhere Werte. Es ist dies nicht auffallend, denn einmal ist die Estermethode keine quantitative, und dann haben wir natürlich bei der direkten Isolierung nicht nur Aminosäuren erhalten, sondern vor allem auch die nicht mit Phosphorwolframsäure fallenden einfacheren Polypeptide. Jedenfalls zeigen diese Versuche, daß die nachgewiesenen Aminosäuren nicht etwa bei der Veresterung entstanden waren, sondern bereits im Speisebrei enthalten sind, denn wir konnten direkt Leucin, Tyrosin, Glutaminsäure, Asparaginsäure aus dem Filtrat der Phosphorwolframsäurefällung isolieren.

Im folgenden geben wir eine Übersicht über die Anlage des ganzen mit Gliadin durchgeführten Versuches:

| Versuchs- hund | Lage der Fistel | Dauer der Aus- scheidung in Stunden | Zahl der Fütte- rungen | Menge des jedesmal gegebenen Gliadins in g | Gesamt- menge des verab- reichten Gliadins in g | Brei aus der Fistel aufge- nommen in g | Stickstoff- gehalt des ver- fütterten Gliadins in g | Stickstoff- gehalt ¹⁾ der koagulier- baren Produkte (Filter- rückstand) in g | Stickstoff- gehalt ¹⁾ der nicht koagulier- baren Produkte (Filtrat) in g |
|-------------------|--------------------------------|--|---------------------------------|---|---|---|---|---|---|
| Histeritschka | 4—5 cm vom Pylorus entfernt | 2½—3 | 6 | 50 | 300 | 3180 | 38,16 | 16,93 | 22,78 |
| Seter | 25 cm vom Pylorus entfernt | 4½—5 | 6 | 50 | 300 | 3552 | 38,16 | 17,81 | 20,35 |
| Polkan | 175 cm vom Pylorus entfernt | 6—6½ | 7 | 50 | 350 | 2130 | 44,52 | 12,72 | 23,71 |
| Margarita | 100 cm vor dem Coecum | 7½—8½ | 7 | 100 | 700 | 1066 | 89,04 | 15,42 | 27,44 |
| Bjelka | 2—3 cm vor dem Coecum | 10—11 | 7 | 150 | 1050 | 492 | 133,56 | 3,78 | 3,43 |

¹⁾ Der Stickstoffgehalt der Verdauungssäfte ist mitbestimmt.

Ein Versuch ist am Magenfistelhund Woltschok ausgeführt. 16 Fütterungen von 50 g Gliadin. Die Fistel wurde 1½—2 Stunden nach der Fütterung geöffnet, die Produkte aufgenommen, mit Wasserdampf koaguliert, filtriert und bei 40° C., wie die Produkte von den übrigen Hunden, eingetrocknet.

Im folgenden geben wir, wie in den früheren Versuchen, die Resultate der einzelnen Untersuchungen wieder. Die Ausbeuten an Aminosäuren beziehen sich auf diese selbst und nicht auf die salzsauren Salze. Als solche waren sie zunächst isoliert worden. Wir stellten dann durch Kochen mit Bleioxyd die freien Aminosäuren dar. Berechnet sind die gewonnenen Mengen an Aminosäuren auf 100 g aschefreien, bei 100° bis zur Gewichtskonstanz getrockneten Chymus.

1. Magenfistelhund (Woltschok).

Das bei 40° getrocknete Verdauungsgemisch enthielt 5,62% Asche und 12,86% N. Beim Trocknen bis zu 100° verlor es 10,81% an Gewicht. Es gab Biuretreaktion, die Millonsche Reaktion, mit Bromwasser keine Tryptophanreaktion. Mit gesättigter Ammonsulfatlösung trat sowohl bei Zusatz der an Volumen gleichen, wie der doppelten Menge Fällung ein.

| | | | | |
|--------------|------|-----------------|-----------------|----------|
| I. Fraktion: | 100° | des Wasserbades | und 12 mm Druck | = 0,02 g |
| II. » : | 100° | » | » 0,5 » » | = 0 |
| III. » : | 200° | » Ölbad | » 0,5 » » | = 0,11 g |

2. Duodenalfistelhund (Histeritschka), Fistel 4—5 cm vom Pylorus entfernt. Aschengehalt des Verdauungsgemisches 5,57%, Wassergehalt 12,21%, Stickstoffgehalt 12,10%. Biuretprobe +, Millon +, Tryptophanprobe (mit Bromwasser) +. Ammonsulfat: Ganzsättigung +, Halbsättigung +.

| | | | | |
|--------------|------|-----------------|-----------------|----------|
| I. Fraktion: | 100° | des Wasserbades | und 12 mm Druck | = 0,80 g |
| II. » : | 100° | » | » 0,5 » » | = 0,04 » |
| III. » : | 200° | » Ölbad | » 0,5 » » | = 0,60 » |

3. Duodenalfistelhund (Seter), Fistel 25 cm vom Pylorus entfernt. Aschengehalt 4,77%, Wassergehalt 10,60%, Stickstoffgehalt 11,91%. Biuretprobe +, Millon +, Tryptophanreaktion (mit Bromwasser) +. Mit Ammonsulfat bei Ganzsättigung nur schwache Fällung.

| | | | | |
|--------------|------|-----------------|-----------------|----------|
| I. Fraktion: | 100° | des Wasserbades | und 12 mm Druck | = 1,25 g |
| II. » : | 100° | » | » 0,5 » » | = 0,09 » |
| III. » : | 200° | » Ölbad | » 0,5 » » | = 1,40 » |

4. Jejunumfistelhund (Polkan). Fistel 175 cm vom Pylorus entfernt. Aschengehalt des Verdauungsproduktes 6,52%, Wassergehalt 10,41%, Stickstoffgehalt 12,29%. Biuretprobe +

Millon, +, Tryptophanprobe schwach (mit Bromwasser). Mit Ammonsulfat bei Gansättigung nur schwache Trübung.

| | | | | | |
|--------------|--------|-----------------|-----------------|---|--------|
| I. Fraktion: | 100° | des Wasserbades | und 12 mm Druck | = | 1,00 g |
| II. » | : 100° | » | » | = | 0,15 » |
| III. » | : 200° | » Ölbad | » | = | 2,25 » |

5. Ileumfistelhund (Margarita). Fistel 100 cm vom Coecum entfernt. Aschengehalt des Verdauungsproduktes 5,86%, Wassergehalt 8,90%, Stickstoffgehalt 12,35%. Biuretprobe —, Millon +, Tryptophanreaktion —, mit Ammonsulfat keine Fällung.

| | | | | | |
|--------------|--------|-----------------|-----------------|---|--------|
| I. Fraktion: | 100° | des Wasserbades | und 12 mm Druck | = | 3,65 g |
| II. » | : 100° | » | » | = | 0,55 » |
| III. » | : 200° | » | » | = | 2,25 » |

6. Ileocoecalfistelhund (Bielka), Fistel 2—3 cm vor dem Coecum. Aschengehalt des Verdauungsproduktes 10,63%, Wassergehalt 15,05%, Stickstoffgehalt 7,28%. Biuretprobe —, Millon +, Tryptophanreaktion —, mit Ammonsulfat keine Fällung.

| | | | | | |
|--------------|--------|-----------------|-----------------|---|--------|
| I. Fraktion: | 100° | des Wasserbades | und 12 mm Druck | = | 0,15 g |
| II. » | : 100° | » | » | = | 0,04 » |
| III. » | : 200° | » Ölbad | » | = | 0,25 » |

Die Resultate stehen ganz in Übereinstimmung mit denen der früheren Versuche.

Wir haben weiterhin festzustellen versucht, welche Aminosäuren in dem Chymus der einzelnen Darmabschnitte nachzuweisen sind. Da die einzelnen Fraktionen an Menge gering waren, haben wir alle in den drei bis jetzt ausgeführten Untersuchungen dieser Art erhaltenen, entsprechenden Produkte vereinigt und durch fraktionierte Krystallisation zunächst eine Trennung durchgeführt. In allen Darmabschnitten — ausgenommen ist natürlich der Magen — fanden wir Leucin. Wir identifizierten es stets durch Bildung seines Kupfersalzes. Dessen Analyse gab den berechneten Kupfergehalt. In besonderen Proben suchten wir nach Glykokoll, indem wir diese mit der fünffachen Menge absoluten Alkohols übergossen und gasförmige, trockene Salzsäure einleiteten. Es gelang uns in keinem Falle, bei den Produkten der oberen Darmabschnitte Glykokollesterchlorhydrat zur Abscheidung zu bringen, wohl aber fanden sich geringe Mengen von Glykokoll in den aus dem Chymus des

Ileums erhaltenen Präparaten. Phenylalanin konnten wir nicht auffinden. Das schließt nicht aus, daß es trotzdem in geringen Mengen vorhanden gewesen ist. Glutaminsäure ließ sich in allen Präparaten der Fraktionen III (100—200° des Ölbad, 0,5 mm Druck) als Chlorhydrat zur Abscheidung bringen. Quantitativ konnten wir seine Menge nicht feststellen. Es schien, als ob in dem Chymus der tieferen Darmpartien relativ mehr Glutaminsäure als in dem der oberen vorhanden gewesen wäre. Aus der Mutterlauge der Glutaminsäure konnten wir Asparaginsäure gewinnen und zwar aus den Präparaten aller Darmabschnitte. Alanin erhielten wir nicht ganz rein, es schien ihm nach den Analysen des Kupfersalzes Valin beigemischt zu sein. Prolin ließ sich mit Sicherheit in den Präparaten nachweisen, die aus dem Chymus des Ileums erhalten worden waren. Jedenfalls decken sich diese Untersuchungen ganz mit früheren Untersuchungen des Darminhaltes frisch getöteter, in Verdauung begriffener Tiere. Auch damals¹⁾ wurden Alanin, Leucin, Glutaminsäure und Asparaginsäure aufgefunden. Schließlich sei noch erwähnt, daß wir die Destillationsrückstände jeweils in Alkohol gelöst und dann aufbewahrt haben. Wir erhielten nach einiger Zeit überall Abscheidungen von zum größten Teil amorphen Massen. Sie bestanden, wie die genauere Untersuchung ergab, aus Anhydriden von Dipeptiden. Wir haben sie vorläufig nicht eingehender untersucht. Es ist natürlich möglich, daß sie sich aus Monoaminosäureestern sekundär gebildet haben. Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, daß sie zum Teil wenigstens aus Dipeptidestern hervorgegangen sind. Wir hoffen, diese Produkte bald genauer untersuchen und uns über ihre Bildung orientieren zu können.

Im Anschluß an diese Versuchsreihe sei noch kurz über einige Versuche berichtet, welche das Ziel verfolgten, den Abbau racemischer Dipeptide im Magendarmkanal unter natürlichen Verhältnissen zu verfolgen und auf diesem Wege zugleich die früher bei der Verdauung von Polypeptiden mit Magensaft und akti-

¹⁾ Emil Abderhalden, Abbau und Aufbau der Eiweißkörper im tierischen Organismus, Diese Zeitschrift, Bd. XLIV, S. 32, 1905.

viertem Pankreassaft erhaltenen Resultate zu kontrollieren.¹⁾ Wir haben vorläufig nur einen Versuch über die Magenverdauung von Dipeptiden ausgeführt und zwar mit Glycyl-l-tyrosin. Der Versuchshund hatte 3,16 g Glycyl-l-tyrosin zugleich mit Fleisch erhalten. Die Magenfistel war während der ganzen Dauer des Versuches offen. Von Zeit zu Zeit wurden peptische Verdauungsprodukte in das Duodenum eingeführt. Der ausfließende Chymus wurde aufgefangen und getrocknet. Der Trockenrückstand wog 45,7 g. Er wurde zweimal mit je einem Liter Wasser ausgekocht und die vereinigten Filtrate mit Phosphorwolframsäure gefällt. Das Filtrat der Fällung befreiten wir von der überschüssigen Phosphorwolframsäure mit Baryt und dessen Überschuß genau mit Schwefelsäure. Beim Eindampfen des schließlich verbleibenden Filtrates unter vermindertem Druck und einer 40° nicht übersteigenden Temperatur des Wasserbades verblieben 11 g Rückstand. Er wurde in Wasser gelöst, mit Tierkohle gekocht und zur Abscheidung von Tyrosin auf dem Wasserbade eingeeengt. Es ließ sich kein Tyrosin nachweisen, selbst als die Lösung bis zum Sirup eingeeengt war, erschienen keine Tyrosinkrystalle, wohl aber anorganische Salze. Von diesen wurde abfiltriert und das Filtrat unter vermindertem Druck völlig zur Trockne verdampft. Den Rückstand veresterten wir in der gewohnten Weise mit Alkohol und gasförmiger, trockener Salzsäure. Beim Abkühlen auf Eis erfolgte bald reichliche Krystallisation. Die Krystalle wurden abfiltriert. Sie schmolzen beim Erhitzen im Kapillarrohr gegen 245° (korr.) unter Gasentwicklung. Ihre Menge betrug 1,85 g. Aus der Mutterlauge wurden beim Einengen noch 1,25 g derselben Verbindung erhalten. Nach allen Eigenschaften lag Glycyl-l-tyrosinäthylesterchlorhydrat vor. Aus der Mutterlauge der letzten Krystallisation suchten wir Glykokoll als Esterchlorhydrat zur Abscheidung zu bringen, jedoch vergeblich. Wir dampften nun völlig zur Trockne ein und lösten den Rückstand in genau 25 ccm absolutem Alkohol, be-

¹⁾ Emil Fischer und Emil Abderhalden, Über das Verhalten verschiedener Polypeptide gegen Pankreassaft und Magensaft, Diese Zeitschrift, Bd. XLVI, S. 52, 1905, und Über das Verhalten einiger Polypeptide gegen Pankreassaft, Ebenda, Bd. LI, S. 264, 1907.

stimmten dann in 2 ccm den Chlorgehalt der Lösung titrimetrisch und setzten mit der auf den Gesamtgehalt an Chlor berechneten Menge Natriumäthylat die Ester in Freiheit. Wir destillierten nun bei 12 mm Druck bis 100° des Wasserbades, schüttelten das Destillat mit wässriger Salzsäure und verdampften das Gemisch zur Trockne. Es verblieb nur ein sehr geringer Rückstand. Allem Anschein nach war somit das verabreichte Glycyl-l-tyrosin nicht gespalten worden, ein Resultat, das der früheren Beobachtung des einen von uns mit P. Rona,¹⁾ daß der Pylorussaft und auch der reine Duodenalsaft Glycyl-l-tyrosin nicht angreift, ganz entspricht.

Weiterhin haben wir Versuche über den Abbau einiger dl-Phenylalanindipeptide in verschiedenen Abschnitten des Darmes ausgeführt. Diese Untersuchungen sind vor allem in Hinsicht auf kürzlich²⁾ veröffentlichte Versuche des einen von uns mit B. Bloch und Peter Rona unternommen worden. Diese betrafen die Verabreichung einiger racemischer Phenylalanindipeptide an einen Alkaptonuriker. Es hatte sich gezeigt, daß das in den per os verabreichten Dipeptiden enthaltene Phenylalanin ebenso wie das in freier Form eingeführte Phenylalanin im Harn als Homogentisinsäure zur Ausscheidung gelangt. Offenbar waren die Dipeptide zunächst hydrolytisch in ihre Komponenten gespalten und das so in Freiheit gesetzte Phenylalanin dann unvollständig abgebaut worden. Da die verabreichten Präparate per os gegeben worden waren, so war es nicht ganz ausgeschlossen, daß die Hydrolyse bereits im Magendarmkanal erfolgt war und erst die Spaltprodukte zur Resorption gelangt waren. In diesem Falle würden die angeführten Versuche natürlich keinen Einblick in den Abbau der erwähnten Phenylalanindipeptide in den Geweben geben. Nun haben frühere Versuche³⁾

¹⁾ Emil Abderhalden und Peter Rona, Zur Kenntnis des proteolytischen Fermentes des Pylorus- und des Duodenalsaftes, Diese Zeitschrift, Bd. XLVII, S. 359, 1906.

²⁾ Emil Abderhalden, Bruno Bloch und Peter Rona, Abbau einiger Dipeptide des Tyrosins und Phenylalanins bei einem Falle von Alkaptonurie, Diese Zeitschrift, Bd. LII, S. 435, 1907.

³⁾ Emil Fischer und Emil Abderhalden, Über die Verdauung einiger Eiweißkörper durch Pankreasfermente, Diese Zeitschrift, Bd. XXXIX, S. 81, 1903.

bereits gezeigt, daß beim Abbau von Proteinen durch Pankreatin Phenylalanin nicht in nachweisbarer Menge frei wird, obschon im übrigen eine weitgehende Spaltung stattgefunden hatte. Dasselbe war der Fall, wenn der Pankreatinverdauung eine solche mit Pepsinsalzsäure vorausging.¹⁾ Ferner ist bei allen Untersuchungen des Chymus verschiedener Darmabschnitte Phenylalanin bis jetzt nie mit Sicherheit aufgefunden worden. Von Interesse ist auch nach dieser Richtung die Beobachtung, daß Glycyl-dl-Phenylalanin²⁾ von aktiviertem Pankreassaft nicht in erkennbarer Weise angegriffen wird. Erepsin dagegen spaltet dieses Dipeptid. Auch andere Dipeptide des dl-Phenylalanins, wie das dl-Alanyl-dl-Phenylalanin und das dl-Leucyl-dl-Phenylalanin, werden von Erepsin angegriffen, jedoch asymmetrisch. Ein Teil des Racemkörpers bleibt ungespalten. Dasselbe Resultat erhält man, wenn man Organpreßsäfte auf die genannten Dipeptide einwirken läßt. Eine totale Hydrolyse des gesamten Racemkörpers beobachtet man nie. Fassen wir alle diese Beobachtungen zusammen, so ergibt sich, daß wir wohl berechtigt waren, anzunehmen, daß der totale Abbau der dem Alkaptonuriker eingegebenen racemischen Phenylalanindipeptide jenseits des Darmes in den Geweben erfolgt ist. Es schien uns jedoch in Hinsicht auf diese Versuche nicht ohne Interesse, den Abbau einiger racemischer Phenylalanindipeptide im Magendarmkanal direkt zu verfolgen. Wir verfütterten an Hunde, welche an verschiedenen Stellen ihres Darmkanales Fisteln besaßen, dl-Leucyl-dl-Phenylalanin, dl-Alanyl-dl-Phenylalanin und Glycyl-dl-Phenylalanin und untersuchten dann den aus den Fisteln austretenden Chymus auf die Abbauprodukte dieser Dipeptide. Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die ausgeführten Untersuchungen.

Der Isolierung der Spaltprodukte der verfütterten Dipeptide standen manche Schwierigkeiten im Wege. Einmal wissen wir aus anderen Versuchen, daß verfütterte Aminosäuren im

¹⁾ Emil Fischer und Emil Abderhalden, Über die Verdauung des Caseins durch Pepsinsalzsäure und Pankreasfermente, Diese Zeitschrift, Bd. XL, S. 215, 1903.

²⁾ l. c., Diese Zeitschrift, Bd. XLVI, S. 52, 1905.

| Versuchsnummer | Stelle der Fistel | Verabreichte Speise in g α = Fleisch β = Dipeptid | Dauer des Versuches in Stunden | Gewicht des aufgesammelten Breies |
|-------------------------------|----------------------|--|--------------------------------|-----------------------------------|
| a) dl-Leucyl-dl-Phenylalanin. | | | | |
| 1 | Ende des Duodenum | α = 200 β = 0,84 | 4 ^{1/2} | 655 |
| 2 | 1 m vor dem Coecum | α = 400 β = 1,14 | 8 | 314 |
| b) dl-Alanyl-dl-Phenylalanin. | | | | |
| 3 | Mitte des Dünndarmes | α = 500 β = 2,16 | 7 | 445 |
| c) Glycyl-dl-Phenylalanin. | | | | |
| 4 | Mitte des Dünndarmes | α = 500 β = 1,96 | 7 ^{1/2} | 470 |

Darme rasch zur Resorption gelangen¹⁾ und sich so dem Nachweis entziehen, dann entstanden bei der Verdauung des Fleisches auch Aminosäuren und zwar zum Teil dieselben, welche unter Umständen aus den verabreichten Dipeptiden sich bilden konnten. Eine Ausnahme bildet nur das Phenylalanin, das bis jetzt im Chymus noch nie mit Sicherheit aufgefunden worden ist. War dieses nach Verfütterung von dl-Phenylalanindipeptiden im Chymus nachweisbar, so spricht alles dafür, daß es diesen entstammt und nicht der gleichzeitig verdauten Nahrung. Sehr wesentlich war die Fahndung auf eventuell asymmetrisch gespaltenes Dipeptid. Bei der großen Schwierigkeit der ganzen Untersuchung konnte natürlich keine Rede von einer auch nur annähernd quantitativen Bestimmung sein. Wir mußten uns auf die Feststellung des Verlaufs der Spaltung der genannten Dipeptide im Magendarmkanal beschränken. Die erhaltenen Resultate sind folgende. In dem aus der Duodenalfistel gesammelten Chymus ließ sich bei Verabreichung von dl-Leucyl-dl-Phenylalanin kein Phenylalanin mit Sicherheit nachweisen, wohl aber im Chymus, der aus einer etwa in der Mitte des

¹⁾ Die Mitteilung dieser Versuche erfolgt demnächst.

Dünndarms gelegenen Fistel nach Fütterung von dl-Alanyl-dl-Phenylalanin aufgefangen worden war. Hier ließ sich das optische Verhalten des isolierten Phenylalanins genau feststellen. Es zeigte $[\alpha]_D^{20} = -29,5^\circ$ in Wasser, während das in der Natur vorkommende Phenylalanin $[\alpha]_D^{20} = -35,1^\circ$ aufweist. Hier erhielten wir auch größere Mengen von d-Alanin ($[\alpha]_D^{20} = +8,5^\circ$), das zum Teil wenigstens wohl dem verabreichten dl-Alanyl-dl-Phenylalanin entstammte. Das verfütterte Glycyl-dl-Phenylalanin scheint nicht oder nur in geringer Menge angegriffen worden zu sein, wenigstens erhielten wir kein Phenylalanin und kein Glykokoll. Jedenfalls geht aus der allerdings noch unvollständigen Beobachtung bei Versuch 3 hervor, daß auch unter natürlichen Verhältnissen der Abbau racemischer Polypeptide im Magendarmkanal asymmetrisch erfolgt. Wir dürfen wohl, gestützt auf diese Versuche, annehmen, daß die totale Spaltung der dem Alkaptonuriker einverleibten racemischen Phenylalanin-Dipeptide erst in den Geweben erfolgt ist, dagegen spricht sehr vieles dafür, daß bereits im Darmkanal der asymmetrische Abbau eingesetzt hat und ein Teil des Phenylalanins, und zwar das l-Phenylalanin, frei geworden und als solches zur Resorption gelangt ist, während das d-Phenylalanin offenbar erst in den Geweben zur Abspaltung kam. Die zwei Phasen im Abbau der racemischen Phenylalanindipeptide kommen höchstwahrscheinlich auch in der Homogentisinsäureausscheidung zum Ausdruck. Es ergab sich, daß nach Eingabe von racemischen Phenylalanindipeptiden sofort eine Steigerung des Gehaltes des Tagesharnes an Homogentisinsäure eintrat. Wahrscheinlich entspricht diese Vermehrung der Homogentisinsäure im wesentlichen dem zuerst freiwerdenden l-Phenylalanin. In der Folge sank zwar die Homogentisinsäureausscheidung, sie ging jedoch bei immer gleicher Kost nicht auf das ursprüngliche Niveau zurück. Es ist wohl möglich, daß wir in diesem Verhalten den Ausdruck des allmählichen Abbaus des asymmetrisch gespaltenen Restes der betreffenden racemischen Phenylalanindipeptide vor uns haben.

Was nun die Verarbeitung der einzelnen Produkte anbe-

trifft, so haben wir zwei Wege eingeschlagen. Einmal versuchten wir durch direkte Krystallisation aus dem in Wasser gelösten getrockneten Chymusrückstand teils unverändertes Di-peptid, teils Spaltprodukte zu gewinnen. Diese Versuche unternahmen wir mit einem aliquoten Teil der gesamten Flüssigkeit. Sie führten zu keinen reinen Produkten. Aus diesem Grunde fällten wir die Hälfte der gesamten Lösungen jedes einzelnen Versuches mit Phosphorwolframsäure. Wir wählten die Verdünnung mit Wasser so, daß die Lösung höchstens 1% an festen Bestandteilen enthielt. Der Phosphorwolframsäureniederschlag wurde abgesaugt, mit Wasser ausgewaschen und scharf abgepreßt. Er wurde dann mit Baryt in der üblichen Weise zerlegt und im Filtrat des phosphorwolframsauren Baryts der überschüssige Baryt mit Schwefelsäure genau gefällt. Das Filtrat vom schwefelsauren Baryt engten wir dann unter vermindertem Druck bis zur Trockene ein. Bei Versuch 2 blieb ein nur geringer sirupöser Rückstand. Am beträchtlichsten war er bei Versuch 1, geringer bei Versuch 3 und 4. Es gelang in keinem Falle die Abscheidung der ziemlich schwer löslichen Phenylalanindipeptide. Sie waren, wie zu erwarten war, aus der großen Verdünnung mit Phosphorwolframsäure nicht gefällt worden.

Die Untersuchung des Filtrates der Phosphorwolframsäurefällung erfolgte in der üblichen Weise. Die von Phosphorwolframsäure und von Baryt befreite Lösung dampften wir bei 12 mm Druck und einer Temperatur von 40° bis zur Trockene ein. Der Rückstand wurde verestert, die Ester mit Natriumäthylat in Freiheit gesetzt und diese zunächst bis 100° des Wasserbades bei 12 mm Druck und dann bei 0,5 mm Druck bis 200° destilliert. Die Destillate beider Fraktionen wurden mit wässriger Salzsäure versetzt und zur Trockene verdampft. Die dann bis zur Gewichtskonstanz getrockneten salzsauren Aminosäuren wurden gewogen. Erhalten wurden folgende Werte:

Bei Versuch 1 (dl-Leucyl-dl-Phenylalanin)

Fraktion I: 1,30 g

» II: 0,64 »

Bei Versuch 2 (dl-Leucyl-dl-Phenylalanin)

Fraktion I: 1,40 g

» II: 0,24 »

Bei Versuch 3 (dl-Alanyl-dl-Phenylalanin)

Fraktion I: 1,55 g

» II: 1,42 »

Bei Versuch 4 (Glycyl-dl-Phenylalanin).

Fraktion I: 0,94 g

» II: 1,11 »

Wir verarbeiteten zunächst in allen Versuchen die zweite Fraktion. Der Versuch, etwa vorhandenes Phenylalanin als salzsaures Salz von den übrigen Aminosäuren zu scheiden, scheiterte am Vorhandensein der Glutaminsäure. Bei Versuch 1 und 2 mußten wir der geringen Menge der vorhandenen salzsauren Aminosäuren wegen auf den Nachweis von Phenylalanin verzichten. Bei Versuch 3 und 4 veresterten wir die Rückstände der Fraktionen II, setzten die Ester mit Natriumalkoholat in Freiheit, destillierten dann den Alkohol bei 12 mm Druck und 100° des Wasserbades ab und lösten den Destillationsrückstand in Äther. Diesen wuschen wir zweimal mit der gleichen Menge Wasser aus und verdampften dann den Äther nach Zusatz von wässriger Salzsäure zur Trockene. Bei Versuch 4 verblieb nur eine Spur eines Rückstandes, bei Versuch 3 dagegen erhielten wir 0,65 g salzsaures Salz. Es wurde mit Ammoniak übergossen und zur Trockene verdampft. Den Rückstand lösten wir in Wasser auf, entfärbten mit Tierkohle, engten etwas ein und kühlten dann auf Eis ab. Es erfolgte ganz allmählich Abscheidung von Krystallen. Ihre Menge betrug aus 3 Krystallfraktionen 0,25 g. Sie waren nicht vollständig chlorfrei. In wässriger Lösung ergab sich $[\alpha]_{20}^D = -29,5^\circ$.

Bei der Untersuchung der ersten Fraktion aller Versuche erhielten wir nach dem Kochen mit Bleioxyd (zur Entfernung der Salzsäure) nur bei Versuch 1, 2 und 3 reine Produkte und zwar bei Versuch 1 und 2 größere Mengen von l-Leucin. Bei Versuch 1 konnten wir durch direkte Krystallisation 0,45 g l-Leucin ($[\alpha]_{20}^D = +12,5^\circ$ in 20% iger Salzsäure) abscheiden und bei Versuch 2 0,65 g l-Leucin ($[\alpha]_{20}^D = +13,5^\circ$ in 20% iger Salz-

säure). Bei Versuch 3 endlich erhielten wir 0,65 g einer in Wasser leicht löslichen Aminosäure. Der Kupfergehalt des dargestellten Kupfersalzes deutete auf Alaninkupfer. Wir fraktionierten das Kupfersalz und setzten von der zweiten Krystallfraktion die Aminosäure wieder in Freiheit. Sie zeigte in n-Salzsäure gelöst $[\alpha]_{20}^D = + 8,5^\circ$. Es ist natürlich fraglich, woher die genannten Aminosäuren (l-Leucin und d-Alanin) stammen. Sie können auch aus dem gleichzeitig verdauten Fleisch herühren. Da wir jedoch bis jetzt bei allen Verdauungsversuchen noch nie so leicht und in so großen Mengen die genannten Aminosäuren isolieren konnten, so darf wohl angenommen werden, daß sie zum Teil wenigstens Produkte einer asymmetrischen Spaltung der verfütterten Dipeptide sind. Erwähnt sei noch, daß wir in Versuch 4 auf Glykokoll gefahndet haben, jedoch vergeblich. Auf die Auffindung der etwa asymmetrisch gespaltenen Dipeptide mußten wir angesichts der geringen Mengen der verfütterten Dipeptide und der Schwierigkeit der Isolierung verzichten. Wir werden diese Versuche mit größeren Mengen von Dipeptiden wieder aufnehmen.
