

Über die Gewinnung von Glykokoll aus normalem Blut.

Von

Dr. Adolf Bingel.

(Aus der medizinischen Klinik und dem chemisch-physiologischen Institut der städtischen Krankenanstalten zu Frankfurt a. M.)

(Der Redaktion zugegangen am 2. September 1908.)

Während unter pathologischen Verhältnissen im Harn Aminosäuren — insbesondere Glykokoll — von verschiedenen Autoren gefunden waren, hatte man im normalen Harn bis vor kurzem, auch bei Anwendung der Fischer-Bergellschen β -Naphthalinsulfochloridmethode diese Substanzen, wenn überhaupt, so nur in Spuren nachweisen können. Embden und Reese¹⁾ gelang es dann, durch eine geringfügige methodische Modifikation erhebliche Mengen β -Naphthalinsulfoglykokoll aus normalem Harn darzustellen. Sie zeigten, daß es für den Ablauf der Reaktion in erster Linie auf den Alkaleszenzgrad des Harns bei der Behandlung mit β -Naphthalinsulfochlorid ankommt.

Abderhalden und Schittenhelm²⁾ bestätigten im wesentlichen diese Ergebnisse. Die Einwände, die von Kionka,³⁾ Wohlgemuth und Neuberg,⁴⁾ Hirschstein⁵⁾ erhoben wurden, haben Embden und Marx⁶⁾ widerlegt, sodaß wohl an der Tatsache, daß sich aus jedem normalen Harn Naphthalinsulfoglykokoll darstellen läßt, nicht mehr gezweifelt werden kann.

Es lag nunmehr sehr nahe, die Fischer-Bergellsche Methode, die bei der Untersuchung des normalen Harns auf Aminosäuren zu positiven Resultaten geführt hatte, auch auf das Blut anzuwenden. Denn der Nachweis bestimmter Aminosäureverbindungen im Blute ist von großem physiologischem Interesse. Gelangt man doch immer mehr zu der Anschauung, daß der Organismus bei der Verdauung das Eiweiß in seine niedersten Spaltprodukte, eben die Aminosäuren, zerlegt und aus ihnen sein Körpereiß wieder aufbaut. Sicherlich spielen

¹⁾ Hofmeisters Beitr., Bd. VII, H. 7/9.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLVII, S. 339.

³⁾ Zeitschrift f. exp. Path. u. Ther., Bd. II, S. 23.

⁴⁾ Med. Klinik, 1906, S. 227.

⁵⁾ Zeitschrift f. exp. Path. u. Ther., Bd. IV.

⁶⁾ Hofmeisters Beitr., Bd. XI, H. 7/9.

daher die Aminosäuren im intermediären Stoffwechsel und wohl auch beim Stofftransport durch das Blut eine große Rolle.

Trotzdem ist der Nachweis einer bestimmten Aminosäure, insbesondere jener des Glykokolls im normalen, lebensfrischen Blute bisher noch nicht geglückt.

G. v. Bergmann¹⁾ arbeitete mit Blut unter verschiedenen pathologischen Zuständen und mit normalem Blute auf der Höhe der Verdauung. Es gelang ihm, ein Reaktionsprodukt mit β -Naphthalinsulfochlorid zu gewinnen, bezüglich dessen chemischer Einheitlichkeit er sich sehr zurückhaltend ausdrückt. Der Stickstoffgehalt seiner Verbindung war ein außerordentlich hoher (9,84%), so daß es sich jedenfalls nicht um die Verbindung einer einfachen Aminosäure handeln konnte.

Untersuchungen aus dem Jenenser pharmakologischen Institute wurden an Blut angestellt, das nach Zusatz von reichlichen Mengen Harnsäure 24 Stunden lang bei 39—40° gestanden hatte. Nachdem Frey²⁾ an derartig vorbehandeltem Blute mittels der β -Naphthalinsulfochloridmethode ein Produkt gewonnen hatte, das er auf Grund des Verhaltens seiner Lösung in Ammoniak gegen Baryumchlorid als Glykokoll ansehen zu müssen glaubt, fanden Kionka und Frey³⁾ in ebenso behandeltem Blut eine Substanz, die bei 154° schmolz, und die sie deswegen als Glykokoll ansprachen. In einer jüngst erschienenen Arbeit «Über das Auftreten von Glykokoll im Blute» weist Kionka⁴⁾ im Blute ebenfalls nach Harnsäurezusatz und längerem Stehen mittels der Fischer-Bergellschen Methode eine Substanz nach, die er auf krystallographischem Wege und durch Bestimmung des Schmelzpunktes als Glykokoll identifizierte.

Während Kionka und Frey früher der Ansicht zuneigten, daß das gebildete Glykokoll der Harnsäure entstammte, drückt sich Kionka in dieser neuesten Arbeit bezüglich der Herkunft des Glykokolls aus Harnsäure vorsichtiger aus. Er hält es für

1) Hofmeisters Beitr., Bd. VI, S. 40.

2) Zeitschrift f. exp. Path. u. Ther., Bd. II, S. 36.

3) Zeitschrift f. exp. Path. u. Ther., Bd. III, S. 597.

4) Zeitschrift f. exp. Path. u. Ther., Bd. V, S. 131.

möglich, daß «das Glykokoll beim Abbau der aus den zugrunde gehenden Zellen stammenden Kernsubstanzen entsteht».

Das Vorkommen von Glykokoll im normalen lebensfrischen Blute ohne Harnsäurezusatz lehnen Kionka und Frey¹⁾ ausdrücklich ab.

Neuberg und Strauß²⁾ fanden in der Ascitesflüssigkeit bei Lebercirrhose und im Blute bei Urämie infolge chronischer interstitieller Nephritis 2,4 ‰, resp. 5 ‰ Aminosäurereststickstoff. Das Vorhandensein von Glykokoll in dem bei Anwendung der Naphthylisocyanatmethode entstandenen Reaktionsgemenge glauben sie durch die Gewinnung eines schwer löslichen Barytsalzes zu erweisen. Analytische Angaben über dieses Barytsalz teilen sie nicht mit.

In der vorliegenden Untersuchung gelang es mir, mittels der Fischer-Bergellschen Methode nicht ganz unerhebliche Mengen Glykokoll im lebensfrischen Blute nachzuweisen.

Die angewandte Methode stelle ich ausführlicher dar, um auf einige Besonderheiten hinzuweisen, die eine Nachprüfung meines Befundes erleichtern können.

Das benutzte Rinderblut wurde ganz frisch im Schlachthof aufgefangen und in Quantitäten von 5 l so schnell wie möglich nach dem Krankenhaus gebracht. Hier wurde es nach Fr. Schenck mit der gleichen Menge Wasser, der doppelten Menge 2 ‰iger Salzsäure und der doppelten Menge 5 ‰iger Sublimatlösung versetzt. Nach kurzem Stehen wurde der Eiweißniederschlag auf der Nutsche abfiltriert und das Filtrat mit Schwefelwasserstoff entquecksilbert. Nach Entfernung des überschüssigen Schwefelwasserstoffs durch einen Luftstrom und Abtrennung des Schwefelquecksilbers wurden je 6 l Flüssigkeit, die einem Liter Blut entsprachen, sorgfältig neutralisiert und im Vakuum bei einer 60° nicht überschreitenden Temperatur des Heizwassers auf 500 ccm eingeengt. Der

¹⁾ l. c., S. 600: «Es tritt im Blute Glykokoll auf, wenn demselben vorher Harnsäure zugesetzt war, dieser Befund ist nicht zu erheben ohne Harnsäurezusatz.» «Nach Harnsäurezusatz tritt Glykokoll im überlebenden Blute auf, das sonst niemals darin zu finden ist.»

²⁾ Berl. klin. Wochenschr., 1906, S. 258.

eingeeengten Flüssigkeit wurde soviel 33%ige Natronlauge zugesetzt, daß rotes Lackmuspapier kräftig gebläut wurde. Es waren dazu 1,5 ccm Natronlauge nötig. Durch Filtrieren auf der Nutsche wurden die hierbei sich ausscheidenden Phosphate entfernt. Nunmehr wurde die völlig klare, in dicker Schicht gelbliche Flüssigkeit mit etwa 100 ccm einer 5%igen ätherischen β -Naphthalinsulfochloridlösung 9 Stunden lang geschüttelt. Von 3 zu 3 Stunden wurde die Reaktion gegen Lackmuspapier geprüft und, falls eine Abschwächung der alkalischen Reaktion stattgefunden hatte, wenig Natronlauge hinzugefügt, so daß rotes Lackmuspapier wieder kräftig gebläut wurde. Nach Abtrennung des Äthers und dem Abfiltrieren unlöslicher Verbindungen, deren weitere Untersuchung unterblieb, wurde durch Ansäuern mit Salzsäure eine starke Fällung hervorgerufen, die beim Schütteln mit Äther sehr leicht von diesem aufgenommen wurde. Der abgetrennte und mit wenig Wasser bis zur annähernden Chlorfreiheit gewaschene Äther wurde unter Zusatz von etwas Wasser abdestilliert. Es hinterblieb ein reichlicher, gelber, öliger Rückstand. Dieser löste sich zum größten Teil beim Zusatz von Ammoniak bis zur neutralen oder schwach alkalischen Reaktion. Der ungelöste Anteil, der, wie gleich erwähnt sei, aus dem Amid der β -Naphthalinsulfosäure bestand, wurde nicht, wie Embden und Reese angegeben haben, durch Filtration nach längerem Stehen im Eisschrank abgetrennt, wobei geringe Mengen des Amids in Lösung bleiben, sondern die deutlich ammoniakalisch reagierende Flüssigkeit wurde nach einer bisher unveröffentlichten Modifikation von Embden mit reichlichen Äthermengen geschüttelt, wobei das Amid in den Äther ging. Die wässrige Schicht war schon nach dem ersten Schütteln vollkommen klar. Zur Beseitigung von etwa noch gelöst gebliebenen Amidspuren wurde die Ätherschüttelung ein- bis zweimal wiederholt.

Weitere Ätherextrakte enthalten augenscheinlich kein Amid mehr, wohl aber geringe Mengen eines Öles, das nicht näher untersucht wurde.

Man kann das Amid leicht aus der ätherischen Lösung gewinnen. Die Substanz zeigt die charakteristischen Krystall-

formen des β -Naphthalinsulfamids und schmilzt nach einmaligem Umkrystallisieren aus heißem Wasser ganz scharf bei 216° .

Nach Abtrennung des Amids wurden die Naphthalinsulfoverbindungen abermals durch Salzsäurezusatz in Freiheit gesetzt und in Äther aufgenommen. Der annähernd chlorfrei gewaschene Äther wurde wiederum unter Wasserzusatz abdestilliert.

Nunmehr wurde die zurückbleibende Flüssigkeit mit Wasser auf etwa 30 ccm aufgefüllt, auf dem Wasserbade erwärmt, wobei die Substanz nur zum Teil in Lösung ging, und heiß filtriert. Die abkühlende Flüssigkeit wurde mit einigen Kryställchen β -Naphthalinsulfoglykokoll geimpft. Die Krystallisation begann sehr rasch (rascher als bei den früheren Untersuchungen am Harn) schon bei Zimmertemperatur und vollendete sich beim Stehen im Eisschrank (Fraktion I).

Der bei dieser ersten Behandlung mit warmem Wasser ungelöst gebliebene Rückstand wurde abermals mit Wasser erwärmt und wiederum heiß filtriert. Nach der Abkühlung und Impfung erfolgte die Krystallisation weit langsamer und unvollständiger (Fraktion II), noch langsamer und weniger vollständig krystallisierte eine auf gleiche Weise gewonnene dritte Fraktion. Für die weitere Bearbeitung wurden nur die 1. und 2. Fraktion verwandt.

Diese beiden, noch stets mit öligen Beimengungen verunreinigten Fraktionen wurden unter großen Verlusten durch mehrmaliges Umkrystallisieren aus immer geringeren Mengen warmen Wassers gereinigt, wobei die Krystallisation jedesmal auch ohne Impfung rascher und vollständiger erfolgte.

Bei einem Teil der Untersuchungen wurde nach dem Vorgange von Embden und Reese¹⁾ folgendermaßen verfahren:

Die neutrale amidfreie Lösung der Ammonsalze wurde mit Wasser auf 40 ccm aufgefüllt, mit Baryumchloridlösung ausgefällt, der voluminöse Niederschlag abfiltriert und mit wenig kaltem Wasser gewaschen. Baryumfiltrat und Baryumniederschlag wurden mit Salzsäure zerlegt und die in Freiheit gesetzten β -Naphthalinsulfoverbindungen mit Äther aufgenommen. Die Gewinnung von β -Naphthalinsulfoglykokoll aus dem Baryumfiltrat gelingt

¹⁾ l. c.

außerordentlich leicht, während die Verbindungen aus dem Niederschlag nur langsam und unvollständig krystallisieren. Der Barytniederschlag wurde daher bei der weiteren Verarbeitung nicht berücksichtigt.

Die Substanz schmolz nach einmaligem Umkrystallisieren bei 140° , nach zweimaligem bei $147\text{—}148^{\circ}$ und nach dreimaligem bei $148\text{—}149^{\circ}$.

Die Ausbeute aus 10 l Blut betrug nach dem ersten Umkrystallisieren 0,35 g, nach dem zweiten 0,27 g und nach dem dritten 0,21 g. Ein Teil wurde nochmals umkrystallisiert, zeigte aber nur eine Erhöhung des Schmelzpunktes auf 150° .

Da nach dem dritten Umkrystallisieren der Schmelzpunkt nur um ein geringes in die Höhe gegangen war, so wurde von einer weiteren Reinigung der Substanz Abstand genommen, weil sie voraussichtlich nur unter größeren Verlusten zu erreichen gewesen wäre. Es wurde daher mit der bei $148\text{—}149^{\circ}$ schmelzenden Substanz die Elementaranalyse ausgeführt. Das war um so mehr angängig, als in den Versuchen von Embden und Reese und Embden und Marx die Analyse noch wesentlich niedriger schmelzender Präparate zu richtigen Ergebnissen geführt hatte. Das Resultat der Analyse war folgendes:

0,1336 g Substanz gaben 0,2688 g CO_2 und 0,0544 g H_2O .

	C	H
Gefunden:	54,87 %	4,55 %
Berechnet für $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{O}_4\text{NS}$:	54,33 %	4,15 %

Wie man sieht, stimmen die gewonnenen Analysenwerte mit denen des β -Naphthalinsulfoglykokolls ausreichend überein. Wahrscheinlich ist die Substanz noch mit geringen Mengen einer kohlenstoffreicheren Verbindung verunreinigt.

Der genannte, bei 150° schmelzende Anteil der Substanz wurde mit gleichen Teilen β -Naphthalinsulfoglykokoll vom Schmelzpunkt 155° vermischt und der Schmelzpunkt dieser Mischung bei 152° gefunden, ein weiterer Beweis dafür, daß es sich bei meiner Substanz tatsächlich um β -Naphthalinsulfoglykokoll handelte.

Das Vorhandensein mindestens einer höheren β -Naphthalinsulfoaminosäure (vielleicht auch einer peptidartigen Verbindung) konnte noch auf einem anderen Wege erwiesen werden.

Das von Amid befreite Rohprodukt drehte nämlich in alkoholischer und ammoniakalischer Lösung in allen daraufhin untersuchten Fällen die Ebene des polarisierten Lichtes sehr stark nach links. Die Natur dieser optisch aktiven Substanz bildet den Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Die aus 10 l Blut gewonnene Menge von 0,21 g β -Naphthalinsulfoglykokoll erscheint zwar recht gering, doch man muß bedenken, daß bei der Reinigung der Substanz ohne Frage ein großer, wenn nicht der größte Teil verloren geht, ganz abgesehen davon, daß die Reaktion mit β -Naphthalinsulfochlorid bei den in Frage kommenden Glykokollkonzentrationen sicherlich auch nicht annähernd quantitativ verläuft.

In der vorliegenden Untersuchung ist der Nachweis von Glykokoll im normalen, lebensfrischen Blute geführt und das Vorhandensein mindestens einer höheren Aminosäure — oder einer peptidartigen Verbindung — durch die starke optische Aktivität des Gemenges von β -Naphthalinsulfoprodukten wahrscheinlich gemacht worden.

Daß gerade das Glykokoll im Blute allem Anschein nach in relativ großer Menge vorhanden ist, steht insofern im Einklang mit den jüngst gewonnenen Erfahrungen und Anschauungen, als diese Substanz im intermediären Stoffwechsel augenscheinlich eine hervorragende Rolle spielt.

Ein Hinweis auf das Vorhandensein von Glykokoll im normalen Blute ist übrigens vielleicht schon in den bekannten Untersuchungen von Bunge und Schmiedeberg:¹⁾ «Über die Bildung der Hippursäure» gegeben. Diese Autoren haben bekanntlich dargetan, daß bei der Durchblutung der Niere mit benzoesaurem Natron auch ohne Zusatz von Glykokoll Hippursäure — allerdings in geringen Mengen — entsteht. Auf Grund meiner Untersuchungen ist es höchst wahrscheinlich, daß das in den eben genannten Versuchen am Hippursäureaufbau beteiligte Glykokoll dem Durchblutungsblute entstammte.

¹⁾ Archiv f. exp. Path. u. Pharm., Bd. VI.
