

Über die Anwendbarkeit der Estermethode bei Stoffwechselversuchen.

Von

Dr. Bruno Oskar Pribram, Wien.

(Der Redaktion zugegangen am 18. März 1911.)

Seit den Arbeiten Emil Fischers über die Aminosäureester, die die Verwendbarkeit derselben zur Trennung und Identifizierung der Aminosäuren, den Eiweißbausteinen bewiesen, ist diese Estermethode ganz allgemein in Anwendung, wenn es sich darum handelt, Aminosäuren aus einem Gemisch zu isolieren und zu erkennen.

Die Eiweißstoffwechselforscher, die seit Jahren bemüht sind, die Frage zu entscheiden, wie weit Eiweiß im Magendarmkanal unter dem Einfluß der Verdauungsfermente abgebaut wird, haben diese Methode ebenfalls benutzt, um nachzuweisen, ob Aminosäuren als Stoffwechselprodukte im Verdauungstrakt auftreten.

Zu diesem Zwecke wird das Verdauungsgemisch unter vermindertem Druck eingedampft und mit Alkohol und Salzsäuregas nach der Fischerschen Vorschrift zwei- oder mehrmals verestert, eventuell entstandene Ester aus den Chlorhydraten freigemacht, ausgeäthert und der Destillation unterworfen. Die so gereinigten und fraktionierten Ester werden nach den bekannten Methoden, die ja für einige Aminosäuren sehr verläßlich und verhältnismäßig einfach sind, identifiziert.

Nach den grundlegenden Arbeiten Abderhaldens können zum Nachweis proteolytischer Fermente in einwandfreier Weise Polypeptide verwendet werden. Eine Spaltung durch Fermente läßt sich besonders schön an Tyrosinpeptiden durch das Auskrystallisieren des Tyrosins, an Tryptophanderivaten durch das Auftreten der Bromwasserreaktion zeigen. Aber auch hier wird oft die Estermethode angewandt. Will man z. B. Fermente in den Faeces nachweisen, so setzen manche Forscher zu dem Extrakt ein Polypeptid, am einfachsten ein solches, das das leicht nachweisbare Glykokoll enthält. Das Ganze wird unter

Toluol eine Zeitlang im Brutschrank gelassen, hierauf eingedampft, verestert und das eventuell aus dem Polypeptid abgespaltene Glykokoll als Esterchlorhydrat gefunden.

Es sei mir nun gestattet, einige Versuche hier zu veröffentlichen, die ich, ursprünglich ein ganz anderes Ziel verfolgend, im Jahre 1908 ausführte. Das Resultat der Versuche wurde damals nicht bekannt gegeben, weil ich den Zweck, den ich damals anstrebte, auf diesem Wege nicht erreichte und für mich das Resultat also ein negatives war. Dennoch glaube ich sie heute veröffentlichen zu sollen, weil sie einen Beitrag zur Anwendbarkeit der Estermethode bei Stoffwechselversuchen liefern.

In kurzem sei das Resultat der Versuche vorweg genommen. Es wurde gefunden, daß Eiweißkörper, in absolutem Alkohol suspendiert und mit Salzsäuregas behandelt, gespalten werden. Wenn man also nach einer Eiweißmahlzeit den Magen aushebert und den Inhalt auf die oben angeführte Weise auf Aminosäuren untersucht und solche findet, so besteht die Gefahr, daß diese Aminosäuren erst bei der Veresterung aus Eiweiß entstanden und überhaupt keine Verdauungsprodukte sind. Diese Möglichkeit besteht selbstverständlich bei allen bisher in diesem Sinne ausgeführten Versuchen.

Die Tatsache, daß die Spaltung in absolut alkoholischer Lösung erfolgte, legte den Gedanken nahe, daß diese in der Weise vor sich geht, daß an die Stelle der Peptidbindungen die C_2H_5OH -Gruppe tritt, daß es sich also um eine Alkohololyse handelt. Spätere Versuche widerlegten diese Ansicht allerdings und machten es wahrscheinlich, daß die C_2H_5OH -Gruppe erst sekundär im Sinne einer Veresterung eintritt, nachdem vorher selbst durch geringe Mengen nicht auszuschließenden Wassers eine Hydrolyse erfolgt ist. Da das aufgenommene Wasser bei der darauffolgenden Veresterung wieder frei wird, so läßt es sich ganz gut verstehen, warum nur geringe Mengen davon zur Spaltung nötig sind.

Ich möchte, ehe ich auf den experimentellen Teil eingehe, noch auf einen Punkt hinweisen, der mir von Wichtigkeit zu sein scheint, gerade in bezug auf die Stoffwechselversuche

und die Schlüsse, die man aus dem Auftreten beziehungsweise Fehlen bestimmter Aminosäuren zu ziehen geneigt sein könnte. Bei den Spaltungsversuchen, die ich mit Gelatine anstellte, war es auffallend, daß ich kein Glykokoll nachweisen konnte, während Prolin, Alanin, Phenylalanin usw. zu identifizieren waren. Dies war um so bemerkenswerter, als ganz allgemein Gelatine mehr Glykokoll enthält als andere Aminosäuren und ich bei einer gewöhnlichen Hydrolyse dieser Gelatine den Gehalt mit 12% bestimmte. Die Ursache war, wie sich später herausstellte, allein darin zu suchen, daß der am leichtesten verseifbare Glykokollester eben verseift oder auch möglicherweise das Glykokoll überhaupt noch nicht verestert war; und wie unten gezeigt werden soll, waren es keine bedeutenden Mengen Wassers, die dies bewirkten. Bei einem andern Versuch wurde Glykokoll als unverestertes Glykokollchlorhydrat gefunden. Erst ein nochmaliges Verestern gab die normale Ausbeute an Esterchlorhydrat.

Ich verweise hier auch auf die Publikation von Dr. Pfannl, der meine Versuche seinerzeit fortgesetzt hat.¹⁾

Experimenteller Teil.

Ich will nur einen ganz kleinen Teil der in sehr großer Anzahl ausgeführten Versuche anführen, da dies für den vorliegenden Zweck voll- zu genügen scheint.

Als Vorversuch wurden 20 g lufttrockenes Ovalbumin (pulv. subt. Merk) in der zehnfachen Menge absoluten Alkohols suspendiert und ein Ström von scharf getrocknetem Salzsäuregas eingeleitet.

Schon nach kurzer Zeit trat Violett-, später Braunfärbung auf, analog den Farbentönen bei der Hydrolyse. Nach zirka 1 Stunde war vollständige Lösung eingetreten, die einsetzte, sowie sich der Alkohol zu wärmen begann. Nun wurde noch durch eine weitere Stunde auf dem Wasserbade zum Sieden erhitzt. Bedeutend schneller erfolgte die Lösung, wenn mit Salzsäuregas vorher gesättigter Alkohol verwendet wurde.

¹⁾ Sitzungsberichte der Kaiserl. Akademie d. Wissenschaften. Wien. Dez. 1909, und Monatshefte f. Chem., Bd. XXXI, S. 81.

Das Spaltungsgemisch wurde filtriert. Der Rückstand erwies sich als rein anorganisch und chlorammonhaltig, ein Beweis dafür, daß genau wie bei der Hydrolyse Ammoniak abgespalten wurde.

Die Lösung wurde unter vermindertem Druck eingedampft, die Ester nach E. Fischers Methode mit Kaliumcarbonat und Natronlauge in Freiheit gesetzt und mit Äther aufgenommen.

Die Menge an Rohestern betrug 7 g oder 35 %.

Ein ähnliches Resultat gab eine Spaltung von 10 g Casein. Es wurden hierbei 3 g Rohester erhalten.

Der Versuch wurde bei Gelatine wiederholt in der Absicht, die Menge entstandenen Glykokollesterchlorhydrates zu bestimmen.

Die Lösung erfolgte diesmal etwas schwerer, die Dauer der Spaltung wurde daher unter Erwärmen auf dem Wasserbade bis auf 8 Stunden ausgedehnt. Die Lösung wurde nach dem Filtrieren — der Rückstand erwies sich als reines Calciumsulfat — auf ca. 60 cmm eingeeengt, mit einem Kryställchen Glykokollesterchlorhydrat geimpft und in den Eisschrank gestellt. Es zeigte sich auch nach mehrmaligem Einengen keine Krystallisation von Glykokollesterchlorhydrat.

Hierauf wurden die Ester mit Kaliumcarbonat und Natronlauge in Freiheit gesetzt und destilliert. Einleiten von Salzsäuregas konnte auch im Destillat keine Abscheidung bewirken. Im übrigen betrug die Esterausbeute wieder 30 % an Rohestern.

Bei einer Wiederholung des Versuches mit 200 g getrockneter Gelatine ergab sich folgendes. Die Trocknung hatte bewirkt, daß die Spaltung bedeutend langsamer vor sich ging. Eine Abscheidung von Glykokollesterchlorhydrat aus dem Spaltungsgemisch konnte auch hier nach der gewöhnlichen Verarbeitung nicht erzielt werden. Dagegen konnte nach der Destillation der Ester in der ersten Fraktion Glykokoll nachgewiesen werden. Es wurde Salzsäuregas eingeleitet, worauf eine geringe Krystallisation eintrat. Die Krystalle schmolzen bei 144°, den Schmelzpunkt des Glykokollesterchlorhydrates. Die Menge war allerdings sehr gering und stand in keinem

Verhältnis zur Ausbeute an den übrigen Estern, so daß ich damals verleitet war, Schlüsse zu ziehen, die sich als nicht zutreffend erwiesen. Der Grund lag nicht, wie spätere Versuche zeigten, in einer unvollständigen Spaltung, sondern in einer unvollständigen Veresterung. Es zeigte sich nämlich, daß, wenn man das Gemisch unter vermindertem Druck zum Sirup einengte und mit absolutem Alkohol und Salzsäure neu veresterte, die Ausbeute dieselbe war, wie bei der gewöhnlichen Hydrolyse (Pfannl l. c.).

Ich bemerke, daß man aus dem Nachweis der Bildung von Äthylchlorid den Schluß ziehen mußte, daß das hierbei im Spaltungsgemische entstehende Wasser die Verseifung bewirkt.

Wenn ich die allergrößte Vorsicht anwandte, um jede Spur von H_2O auszuschließen, erfolgte die Spaltung auch, nur in bedeutend längerer Zeit.

Getrocknet wurde in folgender Weise: Zunächst wurden die käuflichen Gelatineblätter im Vakuumtrockenschrank auf 100° erhitzt; die spröde gewordenen Blätter in einem Leinentuche zu einem feinen Pulver zerdrückt und zerrieben und dieses Pulver abermals im Vakuum bei 100° zur Gewichtskonstanz getrocknet. Der absolute Alkohol war von mir über metallischem Calcium destilliert, das Salzsäuregas durch drei Schwefelsäurewaschflaschen getrocknet. Das ganze System wurde noch durch Aufsetzen eines Chlorcalciumrohres auf den Rückflußkühler gegen das Eindringen von Feuchtigkeit geschützt. Die Spaltung erfolgte trotzdem ganz glatt innerhalb von 8 Stunden. Die Dauer des Prozesses war bei meinen Versuchen also bedeutend länger als die einer gewöhnlichen Veresterung. Auch die Temperatur wurde höher gehalten. Doch sei bemerkt, daß auch schon beim gewöhnlichen Einleiten von Salzsäure in das Gemisch partielle Spaltung eintrat, sowie der Alkohol mit Salzsäure annähernd gesättigt war und sich erwärmte. Mir kam es damals darauf an, die Spaltung quantitativ zu bewerkstelligen. Bei Verdauungsversuchen, wo es sich schon um das Auftreten geringer Mengen von Aminosäuren handelt, besteht die oben erwähnte Möglichkeit der Herkunft

derselben aus durch Veresterung gespaltenem Eiweiß daher trotz der etwas differenten Verhältnisse.

Bedeutend schneller geht der Prozeß der Spaltung vor sich bei einem Feuchtigkeitsgehalt von etwa 5%: und dies dürften im besten Fall die Verhältnisse sein, wie sie bei Verdauungsgemischen vorliegen.

Es wurden 360 g scharf getrocknete Gelatine mit genau 95%igem Alkohol übergossen und Salzsäure eingeleitet. Die Lösung der Gelatine erfolgte ziemlich schnell. Die Spaltung erwies sich als vollständig, die Veresterung unvollständig. Beim Stehen im Eisschrank zeigte sich bald Krystallisation. Der Schmelzpunkt der Krystalle differierte aber von dem des Glykokollesterchlorhydrates. Er war scharf bei 184°.

Die Analyse identifizierte sie als unverestertes Glykokollchlorhydrat.

	C	H	N	Cl
Gefunden für:	21,78	5,3	12,75	31,32
Berechnet für $C_2H_6NO_2Cl$:	21,51	5,4	12,55	30,7.

Die Identifizierung wurde, da der Körper in der Literatur bisher nicht beschrieben ist, in der Weise vervollständigt, daß aus 5 g Glykokollesterchlorhydrat durch Verseifen mit Salzsäure das Chlorhydrat dargestellt wurde. Dieses zeigte denselben Schmelzpunkt mit 184°.

Ich will von den vielen ausgeführten Versuchen nur noch einen beschreiben, der ergibt, daß bei zweimaligem Verestern die Ausbeute dieselbe ist, wie bei der gewöhnlichen Hydrolyse.

460 g ungetrocknete Gelatine wurden in 3 Litern 97%igen Alkohols durch 10 Stunden gespalten. Da die Gelatine 15% Wasser enthielt, so handelte es sich in diesem Falle also abermals um einen Feuchtigkeitsgehalt von 5%. Das Spaltungsgemisch wurde eingedampft und abermals verestert.

An Glykokollesterchlorhydrat wurden 85 g gefunden, d. i. ca. 11,5% Glykokoll. 12,2% fand ich bei einer gewöhnlichen Hydrolyse derselben Gelatine.¹⁾

Die übrigen Ester wurden diesmal mittels der Ammoniakmethode in Freiheit gesetzt. Die Destillation ergab:

¹⁾ Pribram, Sitzungsber. d. Kaiserl. Akad., Wien. Dez. 1909, und Monatsh. f. Chem., Bd. XXXI, S. 51.

Druck:	Dampftemperatur:	Alkoholfraktion:
15 mm	— 45°	—
13—11	46—65°	38.4 g Fraktion I.
11	65—100°	48.5 „ II.
11	100—160°	20.9 „ III.
		107.8 g

Die Ausbeute an destillierten Estern war besser, als ich sie sonst bei der Hydrolyse erhielt. Doch ist diese bessere Ausbeute auf die Ammoniakmethode zu beziehen.¹⁾

Bestimmt wurde von den übrigen Aminosäuren nur das Phenylalanin zu 0,5%.

Wenn ich die Resultate noch kurz zusammenfasse, so ergibt sich folgendes:

Eiweißkörper werden auch in absolut alkoholischer Lösung unter dem Einfluß von Salzsäure gespalten. Die Spaltung ist bei genügender Dauer des Versuches eine vollständige.

Partielle Spaltung erfolgt schon nach kurzer Zeit.

Infolge leichter Verseifbarkeit des Glykokollesters kann diese Aminosäure bei unvollständiger Veresterung, wenn sie in nicht bedeutender Menge vorhanden ist, der Auffindung leicht entgehen.

Ich möchte aus all diesem den Schluß ableiten, daß, wenn man die Estermethode bei Stoffwechselversuchen, wo es sich eventuell um Gemische von Eiweißkörpern und Aminosäuren handelt, weiter anwenden will, man dies nur mit äußerster Vorsicht tun kann unter fortwährender Kontrolle durch Blindversuche, da sonst die gewonnenen Resultate völlig unzuverlässig sein und zu ganz falschen Schlüssen Anlaß geben können.²⁾

Dieselben Vorsichtsmaßregeln wären natürlich bei der Anwendung der leichter spaltbaren Polypeptide zum Fermentnachweis zu gebrauchen und es muß noch entschieden werden, ob diese Vorsichtsmaßregeln genügen, eine Sicherheit der Resultate zu gewährleisten.

¹⁾ Pribram, l. c.

²⁾ Man könnte versuchen, die Veresterung unter Eiskühlung vor sich gehen zu lassen, wobei allerdings noch die Frage zu entscheiden ist, ob diese dann eine vollständige ist. Nach Emil Fischer soll der Alkohol bei der Veresterung ins Sieden kommen.