

Vergleichende Untersuchungen über den Gehalt der verschiedenen Bestandteile des Nervensystems an Aminosäuren.

I. Mitteilung.

Die Aminosäuren der peripheren Nerven und der Leitungsbahnen des Rückenmarks (weiße Substanz).

Von

Emil Abderhalden und Arthur Weil.

(Aus dem physiologischen Institute der Universität Halle a. S.)

(Der Redaktion zugegangen am 30. August 1912.)

Die Untersuchung zahlreicher Proteine der Tier- und Pflanzenwelt hat ergeben, daß sich die einzelnen Eiweißarten durch die Menge, in der die verschiedenen Aminosäuren vorhanden sind, unterscheiden. Manche sind außerdem durch das Fehlen bestimmter Bausteine ausgezeichnet. Bisher ist keine Proteinart bekannt geworden, die einen Baustein besessen hätte, der nur ihr zukommt. Die bei der Hydrolyse des Caseins aufgefundene sogenannte Diaminotrioxydodecansäure¹⁾ scheint nach neueren Untersuchungen eine andere Struktur zu haben, als ihr Name besagt. Die stark schwankenden Ausbeuten an dieser Säure lassen es ferner wahrscheinlich erscheinen, daß ein sekundär entstandenes Produkt vorliegt. Weitere Untersuchungen über diese Verbindung sind im Gange. Man könnte als Baustein, der nur bestimmten Proteinen zukommt, das Glukosamin anführen. Es scheint in der Tat den meisten Proteinen zu fehlen. Immerhin muß in Betracht gezogen werden, daß der Nachweis des Glukosamins mit Schwierigkeiten verbunden ist, sobald es nur in geringen Mengen vorhanden ist. Ferner steht noch zur Diskussion, ob das Glukosamin als direkter Baustein der Proteine aufzufassen ist, oder aber ob es

¹⁾ Emil Fischer und Emil Abderhalden, Notizen über Hydrolyse von Proteinstoffen. Diese Zeitschrift, Bd. 42, S. 540, 1904.

mit solchen nur locker gebunden ist. Wir neigen nach allen Beobachtungen der Ansicht zu, daß das Glukosamin in derselben Weise wie die Aminosäuren am Aufbau der Mucine beteiligt ist. Oswald¹⁾ hat die von ihm beobachtete leichte Abspaltbarkeit des Glukosamins für die Auffassung in die Wagschale geworfen, wonach das Glukosamin in den Mucinen glukosidartig gebunden sein soll. Uns scheint dieser Schluß nicht zwingend, weil festgestellt ist, daß verschiedene Aminosäuren ebenfalls sehr verschieden rasch abgespalten werden. So wird Tyrosin von Trypsin sehr rasch in Freiheit gesetzt. Auch bei der Säurehydrolyse kann man beobachten, daß die einzelnen Aminosäuren verschieden rasch abgetrennt werden. Die Erfahrung mit den synthetisch dargestellten Polypeptiden hat gezeigt, daß man aus der Raschheit der Abspaltung der einzelnen Bausteine keine bestimmten Schlüsse auf die Art der Bindung ziehen kann. Immerhin verdient die Beobachtung von Adolf Oswald großes Interesse, weil an ihrer Hand an synthetisch dargestellten, Glukosamin enthaltenden Körpern geprüft werden kann, ob seine Feststellung mit einer säureamidartigen Verkuppelung von Glukosamin mit Aminosäuren verträglich ist. Der eine von uns (A.) hat sich bemüht, Polypeptide, an deren Aufbau Glukosamin beteiligt ist, darzustellen [gemeinsam mit Kasimir Funk]; doch ergaben sich erhebliche Schwierigkeiten. Die Versuche werden fortgesetzt.

Eiweißkörper, von denen a priori ein ganz eigenartiger Aufbau anzunehmen ist, dürften in den Bestandteilen des Nervengewebes enthalten sein. Mit Ausnahme des Neurokeratins liegen eingehendere Untersuchungen über die Bausteine der Proteine von Nervengewebe nicht vor. Man hat sich bei der Untersuchung dieses Gewebes meist mit der Feststellung des Wasser-, Asche-, Fett-, Lipoid- und Eiweißgehaltes begnügt. Eine ausgezeichnete Zusammenstellung der bisherigen Chemie des Nervengewebes findet sich bei Halliburton,²⁾ dem wir selbst mehrere Bei-

¹⁾ Adolf Oswald, Eine einfache Methode zur Darstellung von salzsaurem Glukosamin aus Ovomuroid. Diese Zeitschrift, Bd. 68, S. 173, 1910.

²⁾ W. D. Halliburton, Die Biochemie der peripheren Nerven. Ergebnisse der Physiologie (Asher u. Spiro), Jg. 4, S. 23, 1905.

träge auf diesem Gebiete verdanken.¹⁾ Wir haben uns die Aufgabe gestellt, die noch vorhandene Lücke auszufüllen. Es sollen zunächst die Eiweißkörper verschiedener Teile des Nervengewebes auf ihren Gehalt an verschiedenen Aminosäuren untersucht werden. Das Hauptaugenmerk wird dabei auf neue Bausteine zu richten sein. Thudichum²⁾ erwähnt in seiner Gehirnchemie das Vorkommen von Glykoleucin, dessen Struktur durch die Darstellung von α -Aminocapronsäure aus Gärungscapronsäure er aufzuklären versuchte. Nach dieser Verbindung werden wir ganz besonders Ausschau halten. Der eine von uns (A.) hat sie gemeinsam mit J. V. Pettibone studiert, um ihre Eigenschaften genau kennen zu lernen.³⁾

Die Untersuchung der Proteine des Nervengewebes bietet aus verschiedenen Gründen Schwierigkeiten. Es fehlen exakte Anhaltspunkte über den wahren Eiweißgehalt. Den Stickstoffgehalt des Nervengewebes kann man der Berechnung der Ausbeute an den einzelnen Aminosäuren nicht zugrunde legen, weil die große Menge von Phosphatiden ebenfalls Stickstoff enthält. Entfernt man diese N-haltigen, nicht eiweißartigen Produkte mit verschiedenartigen Lösungsmitteln, dann läuft man große Gefahr, gleichzeitig auch Proteinstickstoff mit zu verlieren. Andererseits ist die Möglichkeit durchaus gegeben, daß im Nervengewebe stickstoffhaltige, nicht eiweißartige Produkte vorhanden sind, die sich durch die gewöhnlichen Lösungsmittel nicht entfernen lassen. Aus diesem Grunde suchten wir nach einer anderen zuverlässigeren Basis für die Berechnung der erhaltenen Ausbeuten an den einzelnen Aminosäuren. Durch frühere Untersuchungen⁴⁾ hatten wir festgestellt, daß mit Hilfe der Ester-

¹⁾ W. D. Halliburton, The Proteids of Nervous Tissues. The Journ. of Physiol., Bd. XV, S. 90, 1894.

²⁾ J. L. W. Thudichum, Die chemische Konstitution des Gehirns des Menschen und der Tiere. Fr. Pietzker, Tübingen, 1901, S. 257 und 301.

³⁾ Vgl. auch Emil Fischer und Rudolf Hagenbach, Spaltung racemischer Aminosäuren und die optisch-aktiven Komponenten. Berichte d. Deutschen chem. Gesellsch., Jg. 34, S. 3764, 1901.

⁴⁾ Emil Abderhalden und Arthur Weil, Über die bei der Isolierung der Monoaminosäuren mit Hilfe der Estermethode entstehenden Verluste. I. Mitteilung, Diese Zeitschrift, Bd. 74, S. 445, 1911. II. Mitt., Bd. 77, S. 59, 1912.

methode durchschnittlich 60—70% des vorhandenen Aminostickstoffs in Form von freien Aminosäureestern erhalten werden kann, wenn man von den reinen Aminosäuren ausgeht. Wählt man als Ausgangsmaterial vollständig hydrolysierte Eiweißkörper, dann reduziert sich die Ausbeute auf etwa 50%, d. h. bei der Aufnahme der Aminosäureester in den Äther bei der Infreiheitsetzung aus ihren Esterchlorhydraten erhält man ca. 50% des Stickstoffs des Ausgangsmaterials. Wir haben früher schon darauf hingewiesen, daß diese mangelhafte Ausbeute zum großen Teil auf die Methode zurückzuführen ist. Ferner muß berücksichtigt werden, daß die Diaminosäureester, ferner der größte Teil der Ester des Tyrosins, Cystins, Tryptophans und Oxyprolins nicht in die ätherische Lösung überzugehen scheint. Wir werden bei weiteren Untersuchungen dem Übergang der Ester der genannten Aminosäuren in die ätherische Lösung noch genauer nachforschen.

Auf Grund der gemachten Feststellung bestimmten wir den Stickstoffgehalt in der ätherischen Lösung der in Freiheit gesetzten Ester. Wir nahmen an, daß der gefundene Stickstoffgehalt 50% des Aminostickstoffgehaltes des Ausgangsmaterials ausmacht. Wir glauben, daß die so berechneten Werte am besten zu Vergleichen zwischen den verschiedenen Arten der untersuchten Nervengewebe verwendbar sind.

Es sind die Ausbeuten an den einzelnen Aminosäuren einmal in den unten mitgeteilten Tabellen in absoluten Werten angegeben (1), ferner auf 100 g wasser- und aschefreie Substanz bezogen (2), dann auf 100 g Stickstoff des untersuchten Materials der Stickstoffgehalt der einzelnen Aminosäuren berechnet (3). Hierauf folgt die Angabe der Stickstoffmenge für jede einzelne Aminosäure berechnet auf den Stickstoffgehalt des Ätherextraktes unter Berücksichtigung von 50% Verlust an aufgenommenem Aminosäurestickstoff (4). Berechnet man so aus dem Ätherextrakt den Gehalt des Aminosäurestickstoffs des Ausgangsmaterials, so ergibt sich, daß beim Rückenmark ca. 40% des Gesamtstickstoffs auf Aminosäurestickstoff entfällt (Tabelle S. 218) und bei den peripheren Nerven ca. 32% (Tabelle S. 223). — Endlich sind in einer letzten Abteilung für einzelne Amino-

säuren diejenigen Werte angegeben, die sich unter Berücksichtigung der von uns festgestellten Verlustwerte ergeben, wenn man von den reinen Aminosäuren ausgeht (5).

Wir untersuchten zunächst periphere Nerven und Leitungsbahnen des Rückenmarks vom Rinde. Wir bestimmten den gesamten Stickstoffgehalt, den Wasser- und Aschegehalt, und ferner die mit Tetrachlorkohlenstoff extrahierbaren stickstoffhaltigen Substanzen. Die erhaltenen Resultate stimmen, wie die folgenden Beispiele aus der vorhandenen Literatur zeigen, recht gut mit den Angaben früherer Autoren überein.

Es fanden:	Im Gehirn (weiße Subst.) Albumine [in % der Trockensubst.]	Nervenfaser Albumine in %
Baumstark ¹⁾ . .	31	—
Chevalier ²⁾ . . .	—	36,8
Petrowsky ³⁾ . .	24,7	—
Halliburton ⁴⁾ . .	33	29

Den Wassergehalt der weißen Substanz vom Rückenmark des Ochsen gibt Noll⁵⁾ mit 64,17% an, Halliburton mit 68—76%; den der Nerven mit 57—64%. Vgl. hierzu unsere Bestimmungen im experimentellen Teil.

Die Hydrolyse des Nervengewebes wurde in der gewohnten Weise vorgenommen. In einer besonderen Portion bestimmten wir Tyrosin, ferner Lysin, Arginin und Histidin. Die letzteren drei Verbindungen wurden nach den Angaben von Kossel und Kutscher abgeschieden und identifiziert. Zur Isolierung der übrigen Aminosäuren verwandten wir die Estermethode von Emil Fischer. Die folgenden beiden Tabellen enthalten

¹⁾ F. Baumstark, Über eine neue Methode, das Gehirn chemisch zu erforschen. Diese Zeitschrift, Bd. 9, S. 145, 1885.

²⁾ Josephine Chevalier, Chemische Untersuchung der Nervensubstanz. Diese Zeitschrift, Bd. 10, S. 97, 1886.

³⁾ D. Petrowsky, Zusammensetzung der grauen und der weißen Substanz des Gehirns. Pflügers Archiv, Bd. 7, S. 367, 1873.

⁴⁾ l. c.

⁵⁾ A. Noll, Über die quantitativen Beziehungen des Protogons zum Nervenmark. Diese Zeitschrift, Bd. 27, S. 370, 1899.

die erhaltenen Ausbeuten an den einzelnen Aminosäuren. Eine Gegenüberstellung der Ausbeuten zeigt eine große Ähnlichkeit in der Zusammensetzung der weißen Substanz des Rückenmarks und derjenigen der peripheren Nerven. Glykokoll konnten wir nicht nachweisen. Wir werden unter Verwendung von mehr Ausgangsmaterial noch eingehend prüfen, ob die genannte Aminosäure vollständig fehlt, oder ob ihre Menge so gering ist, daß sie sich dem einwandfreien Nachweis entzieht. Phenylalanin ist nicht über jeden Zweifel festgestellt, weshalb wir es nicht aufgeführt haben. In der Fraktion, welche diese Amino-

Tabelle I.

Rückenmark.

	1	2	3	4	5
	Absolute Werte der einzelnen Aminosäuren in g	Auf 100 g wasser- und asche-freie Substanz entfallen g	Auf 100 g Gesamtstickstoff kommen von dem N der einzelnen Aminosäuren g	Auf 100 g Aminosäurestickstoff des Ausgangsmaterials kommen Stickstoff g	Spalte 4 mit Berücksichtigung der Verlustwerte
Glykokoll	0	0	0	0	—
Alanin	5,91	0,59	2,1	5,2	9,5
Valin	5,09	0,51	1,4	3,4	5,2
Leucin	10,98	1,1	2,67	6,5	10,0
Serin	0,2	0,02	0,06	0,15	—
Asparaginsäure . .	0,66	0,06	0,16	0,4	1,1
Glutaminsäure . .	11,77	1,18	2,5	6,2	11,3
Lysin	1,1	0,54	2,3	5,6	—
Arginin	—	0,63	4,6	10,9	—
Nicht identifizierte Aminosäuren (x)	1,97	0,2	0,5	1,2	—
Tyrosin	1,36	0,46	0,8	2,1	—
Prolin	0,79	0,08	0,2	0,5	—
Tryptophan . . .	vorhanden	vorhanden	vorhanden	vorhanden	—
Histidin	—	0,05	0,3	0,7	—
		5,42	17,59	42,85	

Tabelle II.
Periphere Nerven.

	1	2	3	4	5
	Absolute Werte der einzelnen Aminosäuren in g	Auf 100 g wasser- und asche-freie Substanz entfallen g	Auf 100 g Gesamtstickstoff kommen von dem N der einzelnen Säuren g	Auf 100 g Aminosäurenstickstoff des Ausgangsmaterials kommen Stickstoff g	Spalte 4 mit Berücksichtigung der Verlustwerte
Glykokoll	0	0	0	0	0
Alanin	5,55	0,76	2,0	6,1	11,0
Valin	4,70	0,68	1,3	4,0	6,0
Leucin	6,93	1,02	1,7	5,2	8
Serin	0,29	0,04	0,14	0,2	—
Asparaginsäure . .	—	vorhanden	—	—	—
Glutaminsäure . .	10,35	1,50	2,25	6,9	12,8
Lysin	0,38	0,84	2,6	8,0	—
Arginin	—	0,77	2,8	9,1	—
Nicht identifizierte Aminosäuren (x)	1,94	0,28	0,47	1,5	—
Tyrosin	0,69	0,52	0,76	2,4	—
Prolin	1,03	0,15	0,29	0,9	—
Tryptophan	vorhanden	vorhanden	—	—	—
Histidin	—	0,13	0,56	1,8	—
		6,69	14,87	46,1	

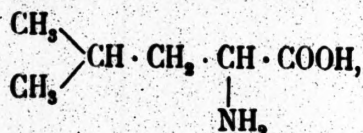
säure enthalten sollte, fand sich ein Aminosäuregemisch, das in perlmutterglänzenden Blättchen krystallisierte, schwach süß schmeckte, beim Erhitzen im Kapillarrohr gegen 276° erweichte und bei 292° sich zersetzte. Es zeigte in Wasser gelöst $[\alpha]_{20}^D = + 8,32^\circ$ und in 20%iger Salzsäure $+ 12,5^\circ$ (berechnet auf die gewogene Substanz). Die Stickstoffbestimmung ergab 10,64%, 10,55%, 10,63% und 10,68%. Für Kohlenstoff wurden gefunden 54,88% und 54,85% und für Wasserstoff 9,83% und 9,89%.

0,1534 g Substanz gaben 0,3087 g CO₂ und 0,1357 g H₂O.

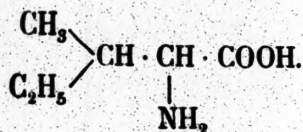
0,0970 „ „ „ 0,1951 „ „ „ 0,0862 „ „

Für Leucin, $C_6H_{13}NO_2$, berechnen sich 10,69% N, 54,97% C und 9,99% H.

Es sind bis jetzt zwei Körper von der Zusammensetzung $C_6H_{13}NO_2$ bekannt, nämlich die α -Aminoisobutyllessigsäure,



und die β -Äthyl- β -methyl- α -aminopropionsäure,



Die erstere Verbindung, das gewöhnliche l-Leucin, schmeckt fade mit bitterem Nachgeschmack und zeigt in Wasser gelöst $[\alpha]_{20}^D = -10,8^\circ$, in 20%iger Salzsäure gelöst $+ \text{ca. } 16^\circ$. Das andere Leucin, das sog. Isoleucin, schmeckt bitter und zeigt in Wasser gelöst $[\alpha]_{20}^D = \text{ca. } 11^\circ$ nach rechts und in 20%iger Salzsäure aufgelöst $[\alpha]_{20}^D = + \text{ca. } 40^\circ$.

Die von uns isolierte und in der gleichen Esterfraktion bereits bei anderer Gelegenheit beobachtete Verbindung stimmt mit keiner der genannten Verbindungen überein. Ihr Geschmack und ihr Drehungsvermögen zeigen ein abweichendes Verhalten. Es spricht manches dafür, daß wir ein neues, dem Leucin stereoisomeres Abbauprodukt in Händen haben. Die weiteren Untersuchungen werden bald Aufklärung bringen. Wir dachten zunächst daran, daß die Verbindung die α -Aminocaprinsäure sein könnte. Der eine von uns hat, wie bereits erwähnt, mit Pettibone dl- α -Aminocaprinsäure dargestellt und diese über die Formylverbindung in die optischen Komponenten zerlegt. Wir fanden $[\alpha]_{20}^D$ für die in 20%iger Salzsäure gelösten Verbindungen $+ 22,5^\circ$ resp. $- 22,7^\circ$. Die wässrige Lösung drehte ca. $3,6^\circ$, und zwar drehte die in Salzsäure gelöste rechtsdrehende Komponente nach links und umgekehrt die in salzsaurer Lösung linksdrehende Verbindung nach rechts. Die l- α -Aminocaprinsäure (bezeichnet nach der Drehung in Wasser) schmeckt fade und hat einen leicht bitteren Nachgeschmack. Die d-Komponente dagegen

schmeckt süß. dl- α -Aminocaprinsäure schmeckt fade. Emil Fischer und Rudolf Hagenbach haben die dl- α -Aminocaprinsäure über die Benzoylverbindung mittels des Cinchoninsalzes gespalten. Sie fanden $[\alpha]_{20}^D = + 21,3^\circ$ resp. $- 22,4^\circ$. Die von uns beobachtete Verbindung kann somit auch nicht der α -Aminocaprinsäure entsprechen. Auch das Verhalten des Kupfersalzes ist ein ganz anderes.

Das der Hydrolyse unterworfenen Material stellte Leitungsbahnen dar. Es ist nicht verwunderlich, daß die an deren Aufbau beteiligten Eiweißkörper sehr ähnlich, vielleicht auch identisch zusammengesetzt sind. Interessant wird ein Vergleich mit der Zusammensetzung der grauen Substanz verschiedener Teile des Zentralnervensystems und ferner von Bestandteilen des Nervus sympathicus werden.

Experimenteller Teil.

I. Rückenmark.

Als Ausgangsmaterial diente das Rückenmark von Ochsen und Rindern, die am hiesigen Schlachthofe geschlachtet worden waren, so daß wir stets mit ganz frischem Material arbeiten konnten.

Zur Trennung der grauen Substanz von der weißen wurde nach dem Abziehen der Häute der Rückenmarkstrang mit einem Skalpellstiel in der ventralen Längsfissur vorsichtig eröffnet und das graue Mark durch Herausstreichen entfernt. Nachdem durch öfteres Auswaschen gut entblutet war, wurden die weißen Rückenmarkstränge in 70%igem Alkohol aufbewahrt. Bei Zimmertemperatur ging hierbei schon ein Teil N-haltiger Substanzen in Lösung. Nach dem Abfiltrieren des Alkohols wurde das Rückenmark im Soxhlet-Apparat mit Tetrachlorkohlenstoff vollständig erschöpft und schließlich mit konzentrierter Salzsäure hydrolysiert.

Über die hierbei eingetretenen Verluste an Stickstoff gibt die folgende Tabelle einen Überblick.

Extraktion mit Tetrachlorkohlenstoff.

Verarbeitet: 385 g mit einem N-Gehalt von 1,49%.

	Stickstoffgehalt	
	g	%
Ausgangsmaterial	5,74	100
Alkoholextrakt	0,2697	4,70
Tetrachlorkohlenstoff	1,421	24,76
Hydrolysenfiltrat	3,95	68,9
» rückstand	0,086	1,50

Stickstoff-, Wasser- und Aschegehalt.

Die Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl des ganz frischen Materials ergab folgende Werte:

1. 1,3584 g verbrauchten 14,1 ccm $n_{/10}\text{-H}_2\text{SO}_4$. N = 1,45%
2. 0,9502 » » 10,0 » $n_{/10}\text{-H}_2\text{SO}_4$. N = 1,47%
3. 3,1216 » » 40,85 » $n_{/10}\text{-H}_2\text{SO}_4$. N = 1,83%
4. 3,9942 » » 35,15 » $n_{/10}\text{-H}_2\text{SO}_4$. N = 1,23%

125 g Substanz enthielten 1,808 N. N = 1,45%

189 » » » 2,519 N. N = 1,33%.

Als Durchschnittswert ergibt sich somit ein Stickstoffgehalt von 1,39%.

Zur Bestimmung des Wassergehaltes wurde die Substanz bei etwa 105° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

1. 10,0010 g verloren 6,4716 g = 64,71%

2. 8,2394 » » 5,3680 » = 65,15%

3. 7,9888 » » 5,0404 » = 63,13%

4. 11,2016 » » 7,2724 » = 64,9 %.

Der Wassergehalt beträgt somit im Durchschnitt 64,47%.

3,9328 g wasserfreie Substanz gaben 0,2036 g Asche = 5,18%

2,9386 » » » 0,1616 » » = 5,50%

3,0574 » » » 0,1620 » » = 5,29%.

Für die wasserfreie Substanz ergibt sich somit ein durchschnittlicher Aschegehalt von 5,32%.

Auf das frische Rückenmark berechnet, ergibt sich ein Aschegehalt von 1,91%.

Hydrolysen mit Salzsäure und Schwefelsäure.

Bei allen ausgeführten Hydrolysen blieb stets ein großer Teil des nicht mit Lösungsmitteln extrahierten Rückenmarks ungelöst. Der Rückstand schied sich nach dem Erkalten auf der Oberfläche als feste, fettige Schicht ab und enthielt im Durchschnitt etwa 13% des gesamten Stickstoffs. Die bei der Hydrolyse mit Salzsäure und Schwefelsäure erhaltenen Werte stimmen nahe überein:

	Stickstoffgehalt					
	Ausgangsmaterial		Hydrolysenfiltrat		Hydrolysenrückstand	
	g	%	g	%	g	%
189 g HCl-Hydrolyse . . .	2,52	100	2,21	87,7	0,31	12,3
3300 „ „ „ . . .	43,9	100	38,6	86,3	6,02	13,7
125 „ H ₂ SO ₄ - „ . . .	1,81	100	1,55	85,6	0,26	14,4
1000 „ „ „ . . .	12,3	100	9,97	81,1	2,33	18,9

Isolierung der Monoaminosäuren mit Hilfe der Estermethode.

3300 g lebendfrischen weißen Rückenmarks (nicht mit Tetrachlorkohlenstoff extrahiert) wurden durch 8stündiges Kochen mit 12 l konzentrierter Salzsäure hydrolysiert. Nach dreimaliger Veresterung der von den fettigen, harzigen Rückständen abgeseugten Hydrolysenfiltrate wurden die Ester mit Kaliumcarbonat und Natronlauge in Freiheit gesetzt, der Äther 12 Stunden über Magnesiumsulfat getrocknet und nach dem Abdestillieren des Äthers in drei Fraktionen getrennt.

- I. Fraktion: 15 mm; 100° : 70 g
- II. „ 0,1 „ 100° : 7,6 „
- III. „ 0,1 „ bis 180° : 20,3 „

Fraktion I und II wurden mit Wasser, III mit Salzsäure verseift. Es gelang nicht, Glykokollesterchlorhydrat aus I oder II abzuscheiden.

Es wurden identifiziert:

d-Alanin, d-Valin, l-Leucin, l-Serin, l-Asparaginsäure, d-Glutaminsäure und l-Prolin.

Die folgende Tabelle gibt über die Stickstoffverteilung während der ganzen Verarbeitung einen Überblick.

	Stickstoff	
	g	%
Ausgangsmaterial	43,9	100
Filtrate der Hydrolyse	37,9	86
Rückstände der Hydrolyse	6,02	13,7
Rückstände bei der Infreihetsetzung . . .	28,5	64,8
Ätherextrakt der Ester	9,0	20,5
I. Fraktion	2,94	6,7
II. >	0,39	0,9
III. >	0,42	0,95
Destillationsrückstand	4,0	9,01

Tyrosinbestimmung.

1000 g weißen Rückenmarks wurden mit 3 l 25%iger Schwefelsäure 16 Stunden hydrolysiert. Beim Entfernen der Schwefelsäure mit Baryt blieb in dem Baryumsulfatniederschlag, trotz sorgfältiger Erschöpfung durch fünfmaliges energisches Auskochen mit je etwa 3 l Wasser, noch ein großer Teil des Stickstoffs zurück:

	N-Gehalt		Kontrollversuch	
	g	%	g	%
Ausgangsmaterial	12,3	100	1,808	100
Hydrolysenfiltrat	9,97	81	1,548	85,6
> rückstand	2,328	18,9	0,26	14,38
Baryumsulfatniederschlag . .	2,46	20	0,420	23,2
Filtrate	7,50	61	1,128	62,39

Die vom Baryumsulfatniederschlag abgessaugten Filtrate zeigten eine tiefrote Farbe, die bei Zusatz von Säure ins Grüne umschlug.

Beim Einengen auf dem Wasserbade wurden 1,357 g Tyrosin gewonnen.

100 g wasser- und aschefreie Substanz enthalten also: 0,456 g Tyrosin.

Auf 100 g Stickstoff entfallen 0,854 g Tyrosinstickstoff.

Bestimmung von Histidin, Arginin und Lysin.

Ein aliquoter Teil der Schwefelsäurehydrolysenfiltrate mit einem Stickstoffgehalt von 5,52 g wurde nach Verdünnung auf ca. 2 Liter solange mit einer 10%igen Phosphorwolframsäurelösung versetzt, bis kein Niederschlag mehr auftrat. Die Fällung wurde mit Baryt zersetzt. Die Filtrate verarbeiteten wir nach den von Kossel und Kutscher¹⁾ gegebenen Vorschriften weiter. Über die Stickstoffverteilung bei den einzelnen Operationen gibt die folgende Tabelle Auskunft:

	Stickstoffgehalt in		
	g	% von 1.	% von 4.
1. Ausgangsmaterial	9,05	100	—
2. Hydrolysenfiltrat	5,52	61	—
3. > rückstände + BaSO ₄ . .	3,53	39	—
4. Phosphorwolframsäurefällung	1,63	18	100
5. > filtrat	3,89	43	—
6. Barytlösung	1,481	16,4	90,9
7. Histidin	0,027	0,3	1,65
8. Arginin	0,414	4,6	25,4
9. Lysin	0,210	2,3	12,9

Der N-Gehalt von 5,52 g des mit Baryt neutralisierten Hydrolysenfiltrats entspricht 607 g Rückenmark = 207 g wasser- und aschefreies Material.

Auf 100 g wasser- und aschefreie Substanz kommen also Histidin: 0,048 g. Arginin: 0,630 g. Lysin: 0,537 g.

Histidin und Arginin wurden nach den Angaben Steudels aus dem Stickstoffgehalt der entsprechenden Filtrate der zersetzten Silberniederschläge berechnet und als Pikrolonate identifiziert:

Histidinpikrolonat: F.: 216° (unkorr.) (Gemisch von Mono- und Dipikrolonat).

Argininpikrolonat: F.: 223° (unkorr.).

¹⁾ Vgl. Steudels Beitrag im Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden, Bd. 2, S. 498, 1910.

Lysin wird als Pikrat abgeschieden. Ausbeute an Pikrat:
2,8142 g = 1,096 g Lysin.

Lysinpikrat: F.: bei 214° allmähliches Erweichen; bei 233° Zersetzung.

Nachweis von Tryptophan.

30 g Rückenmark, die aus etwa 380 g frischem Gewebe durch Extraktion mit Tetrachlorkohlenstoff und Trocknen gewonnen sind, werden mit 200 ccm einer 1%igen Natriumcarbonatlösung und 3 g Pankreatin unter Toluol im Thermostaten bei 37° aufbewahrt. Nach drei Tagen gibt die Lösung bereits mit Bromwasser eine stark violette Färbung. Der Kontrollversuch mit 3 g Pankreatin allein gab keine Violettfärbung.

Analytische Belege.

	Substanz g	Verbraucht ccm n/10-H ₂ SO ₄	Berechnet		Ge- funden % N
			für	% N	
Alanin	0,2256	20,2	C ₃ H ₇ NO ₂	15,73	15,79
Valin	0,1438	12,0	C ₅ H ₁₁ NO ₂	11,96	11,69
Leucin	0,1366	10,4	C ₆ H ₁₃ NO ₂	10,69	10,67
Serin	0,1392	12,8	C ₃ H ₇ NO ₃	13,33	12,89
Asparaginsäure	0,1494	11,0	C ₄ H ₇ NO ₄	10,53	10,31
Glutaminsäure	0,1436	9,85	C ₅ H ₉ NO ₄	9,53	9,61
Tyrosin	0,1530	8,3	C ₉ H ₁₁ NO ₃	7,74	7,60
Nicht identifizierte { x .	0,0804	6,1	—	10,62 ¹⁾	10,63
Aminosäure { x .	0,2604	19,6	—	10,62	10,55

Prolin: 0,2205 g des bei 100° im Vakuum getrockneten Kupfersalzes gaben 0,0611 g CuO.

Ber. f. (C₅H₈NO₂)₂Cu: Cu = 21,80%. Gef.: 22,14%.

II. Periphere Nerven.

Als Material für die folgenden Versuche dienten die Nerven von Rindern, die am hiesigen Schlachthofe geschlachtet worden

¹⁾ Aus dem Durchschnitt von 5 Analysen berechnet; vgl. S. 213.

waren. Hauptsächlich wurde der Plexus brachialis, lumbalis und sacralis präpariert. Ferner wurden auch die Nervi ischiadici und Nerven der vorderen Extremität verwendet. Die Verarbeitung der in etwa 70%igem Alkohol konservierten Nerven war dieselbe wie beim Rückenmark. Die Extraktion mit Tetrachlorkohlenstoff gab folgende Stickstoffwerte:

	Versuch 1 N-Gehalt		Versuch 2 N-Gehalt	
	g	%	g	%
Ausgangsmaterial	26,37	100	1,038	100
Konservierungsalkohol . .	0,363	1,87	—	—
Tetrachlorkohlenstoff . .	2,278	8,4	0,075	7,22
Hydrolysenfiltrat	23,3	88,4	0,927	89,3
Hydrolysenrückstand . .	0,3	1,1	0,036	3,4

Stickstoff-, Wasser- und Aschegehalt.

Die Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl ergab folgende Werte:

1. 2,2590 g verbrauchen 36,7 ccm $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$ N = 2,27%
2. 1,6856 » » 23,8 » $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$ N = 1,98%
3. 1,000 » » 14,25 » $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$ N = 1,997%
4. 2300 » enthalten 43,84 g Stickstoff N = 1,91%
5. 400 » » 8,57 » » N = 2,14%.

Der Durchschnittswert für den N-Gehalt ist somit 2,06%.

Zur Bestimmung des Wassergehaltes wurde die Substanz bei etwa 105° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

1. 6,4774 g verloren 4,3545 g = 67,23%
2. 4,6788 » » 3,0736 g = 65,69%
3. 5,8772 » » 3,8140 g = 64,9%.

Der Wassergehalt beträgt also im Durchschnitt 65,9%.

- 1,5586 g wasserfreie Substanz gaben 0,0464 g Asche = 2,98%
- 1,6296 » » » 0,0538 » » = 3,33%
- 1,9560 » » » 0,0624 » » = 3,19%.

Für die wasserfreie Substanz ergibt sich also ein durchschnittlicher Aschegehalt von **3,17%**.

Auf die frischen Nerven berechnet ergibt sich: **1,07%**.

Hydrolysen mit Salzsäure und Schwefelsäure.

Ebenso, wie bei den Rückenmarkshydrolysen, blieb eine auf der Oberfläche schwimmende Fettschicht zurück, die im Durchschnitt noch **3%** des gesamten Stickstoffs enthielt.

Über die erhaltenen N-Analysen gibt die folgende Tabelle Auskunft:

	Ausgangsmaterial		Hydrolysenfiltrat		Rückstand	
	g	%	g	%	g	%
2300 g HCl, Hydrolyse	43,84	100	41,75	95,2	2,09	4,7
400 » H ₂ SO ₄ , »	8,57	100	8,38	97,8	0,169	1,9

Isolierung der Monoaminosäuren.

2300 g Nerven mit einem N-Gehalt von ca. **1,9%** werden mit 8 l konzentrierter HCl hydrolysiert. Nach dreimaliger Veresterung werden die Ester mit Natronlauge und Kaliumcarbonat in Freiheit gesetzt. Die Destillation der Ester erfolgte in drei Fraktionen:

I. Fraktion:	12 mm	100°	90 g
II. » :	0,1 »	100°	5,2 »
III. » :	0,1 »	bis 180°	17,7 »

Fraktion I und II werden mit Wasser verseift. Bei Fraktion III wird Salzsäure angewendet. Ebenso, wie beim Rückenmark, gelingt es nicht, Glykokoll nachzuweisen; auch Asparaginsäure kann nicht identifiziert werden; doch deutet der Stickstoffgehalt einer Krystallfraktion von III, sowie der Nachweis beim Rückenmark, das in seiner Zusammensetzung große Ähnlichkeit mit den peripheren Nerven besitzt, auf ihr Vorhandensein hin.

Stickstoffverteilung.

	N-Gehalt	
	g	%
Ausgangsmaterial	43,84	100
Filtrate der Hydrolyse	41,7	95,2
Rückstände der Hydrolyse	2,09	4,7
» » Infreiheitsetzung	34,6	78,9
Ätherertrakt der Ester	7,15	16,3
I. Fraktion	2,17	4,95
II. » 	0,27	0,61
III. » 	0,17	0,39
Rückstand der Destillation	2,92	6,7

Tyrosinbestimmung.

400 g Nerven wurden mit 2 l 25%iger H_2SO_4 16 Stunden lang am Rückflußkühler gekocht. Auch hier bleibt wie beim Rückenmark ein beträchtlicher Teil des Stickstoffs im Baryumsulfatniederschlag zurück.

	N-Gehalt		Kontrollversuch	
	g	%	g	%
Ausgangsmaterial	8,57	100	1,038	100
Hydrolysenfiltrat	8,38	97,8	0,927	89,3
Hydrolysenrückstand	0,169	1,9	0,110	10,6 ¹⁾
Baryumsulfatniederschlag	2,48	28,9	0,198	19,1
Filtrate	5,90	68,9	0,729	70,2

Auch hier konnten wir, wie beim Rückenmark, wieder die Bildung eines Farbstoffs beobachten, der bei Säurezusatz eine grüne und mit Alkalien rote Färbung gab.

Beim Einengen der Filtrate wurden 0,686 g Tyrosin gewonnen.

100 g wasser- und aschefreie Substanz enthalten also 0,519 g Tyrosin.

¹⁾ + CCl_4 -Extrakt.

Bestimmung von Histidin, Arginin und Lysin.

Als Ausgangsmaterial dienten die Filtrate der Salzsäurehydrolyse von mit Tetrachlorkohlenstoff extrahierten Nerven. Der N-Gehalt von 2,509 g entspricht 138 g Ausgangsmaterial. Die Phosphorwolframsäurefällung hatte annähernd denselben Prozentgehalt des gesamten Stickstoffs wie bei der Verarbeitung des Rückenmarks.

	Stickstoffgehalt in.		
	g	% von 1.	% von 4.
1. Ausgangsmaterial	2,84	100	—
2. Hydrolysenrückstände	0,331	1,14	—
3. » filtrate	2,509	88,4	—
4. Phosphorwolframsäurefällung	0,587	20,67	100
5. » filtrat	1,922	67,7	—
6. Barytlösung	0,508	17,89	86,5
7. Histidin	0,0159	0,56	2,71
8. Arginin	0,0809	2,85	13,8
9. Lysin	0,0737	2,59	12,6

Der N-Gehalt von 2,84 g des Ausgangsmaterials entspricht 138 g frischen Nerven oder 45,5 g wasser- und aschefreier Substanz.

100 g wasser- und aschefreie Substanz enthalten also: Histidin: 0,127 g; Arginin: 0,767 g; Lysin: 0,842 g.

Histidin und Arginin wurden aus den N-Werten der entsprechenden Filtrate berechnet und als Pikrolonate identifiziert.

Histidinpikrolonat: F. 218° (unkorr.)

Argininpikrolonat: F. 227° (»)

Lysin wurde als Pikrat isoliert und daraus die Base berechnet. Erhalten: 0,986 g Pikrat = 0,384 g Lysin.

Lysinpikrat: F. erweicht gegen 215°; schmilzt gegen 235° unter Zersetzung.

Nachweis von Tryptophan.

100 g Nerven werden mit 300 ccm 1%iger Sodalösung und 5 g Pankreatin bei 37° im Thermostaten unter Toluol

aufbewahrt. Nach 5 Tagen gab die Lösung mit Bromwasser schwach violette Färbung.

Analytische Belege.

	Substanz g	Verbraucht ccm n/10-H ₂ SO ₄	Berechnet		Ge- funden % N
			für	% N	
Alanin	0,1842	20,45	C ₃ H ₇ NO ₂	15,73	15,55
Valin	0,2392	20,05	C ₅ H ₁₁ NO ₂	11,96	11,74
Leucin	0,1184	9,1	C ₆ H ₁₃ NO ₂	10,69	10,77
Serin	0,1124	10,4	C ₃ H ₇ NO ₂	13,33	12,96
Asparaginsäure	—	—	C ₄ H ₇ NO ₄	10,53	—
Glutaminsäure	0,1235	8,35	C ₅ H ₉ NO ₄	9,53	9,47
Tyrosin	0,1532	8,25	C ₉ H ₁₁ NO ₃	7,74	7,55
x	0,1264	9,6	—	10,62 ¹⁾	10,64
x	0,1258	9,4	—	10,62	10,47
x	0,1600	12,2	—	10,62	10,68

Prolin: 0,1862 g des bei 100° im Vakuum getrockneten Kupfersalzes gaben 0,0498 g CuO.

Berechnet für (C₅H₉NO₂)₂Cu:

Cu = 21,80%

Gefunden:

Cu = 21,37%.

¹⁾ Vgl. S. 219.