

Der Nachweis von freien Aminosäuren im Blute unter normalen Verhältnissen.

Von

Emil Abderhalden.

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

(Der Redaktion zugegangen am 1. Dezember 1913.)

Es ist gelungen, im Blute und im Blutserum Aminosäuren nachzuweisen und einige von ihnen zu identifizieren. Das Blut stammte von ganz normalen Schlachtieren. Da die Abtrennung der Aminosäuren auf verschiedenen Wegen geglückt ist, so unterliegt es keinem Zweifel mehr, daß im Blute freie Aminosäuren zugegen sind — eine Annahme, die bereits indirekt auf Grund von Beobachtungen über den Gehalt des Blutes an nicht koagulierbaren, stickstoffhaltigen Verbindungen gemacht worden war. Die Versuche sind noch im Gange. Es sei hier nur in aller Kürze berichtet, welche Aminosäuren bisher genau identifiziert sind, und auf welchem Wege ihr Nachweis geglückt ist.

Es war zum vorneherein klar, daß nur eine direkte Feststellung bestimmter Aminosäuren eine eindeutige Entscheidung der Frage nach dem Vorkommen von solchen im Blute bringen konnte. Es war deshalb, wie schon mehrfach an dieser Stelle mitgeteilt worden ist, mein Bestreben, Aminosäuren unter normalen Verhältnissen im Blute nachzuweisen. Es schien, nachdem wir in der Estermethode von Emil Fischer eine so vorzügliche Methode zum Nachweis der Monoaminosäuren besitzen, und ferner die Methode von Kossel und Kutscher die Abtrennung der einzelnen sogenannten Diaminosäuren ermöglicht, sehr leicht zu sein, auf die einzelnen Aminosäuren zu fahnden. Es mußten zunächst die folgenden Bedingungen erfüllt sein. Das Eiweiß des Blutes resp. Plasmas mußte vollständig entfernt werden. Hierzu mußten Methoden verwendet werden, die jede Möglichkeit einer Spaltung von Eiweiß resp. von dessen Abkömmlingen ausschließen. Die enteweißte Flüssigkeit durfte keinem Verfahren ausgesetzt

werden, das die Möglichkeit einer Veränderung vorgebildeter Produkte zuließ. Endlich mußte die Isolierung der Aminosäuren so geschehen, daß ihr primäres Vorkommen eindeutig bewiesen war.

Die Erfüllung dieser Bedingungen machte erhebliche Schwierigkeiten. Eine restlose Enteiweißung ohne Anwendung besonderer Fällungsmittel — wie von Phosphorwolframsäure, kolloidalem Eisenhydroxyd usw. — begegnet großen Schwierigkeiten. Sie läßt sich nur in großen Verdünnungen vornehmen. Nach früheren Erfahrungen waren nur sehr geringe Mengen von Aminosäuren im Blute zu erwarten. Bei Anwendung von 50—100 l Blut konnten gerade so viele Aminosäuren gewonnen werden, daß eine Identifizierung möglich war. Zur Enteiweißung durch Hitze-koagulation unter Anwendung von Essigsäure ist eine mindestens zehnfache Verdünnung des Blutes resp. des Plasmas oder Serums mit Wasser nötig. Man erhält sonst zu leicht eine unvollkommene Koagulation. Ich ging so vor, daß das Blut in Mengen von 1 l in 15 l siedendes, destilliertes Wasser gegossen wurde. Nach etwa 15 Minuten langem Kochen wurde 1%ige Essigsäure unter lebhaftem Rühren zugetropft. Mit dem Zusatz wurde in dem Momente aufgehört, in dem die Koagulation eine vollständige war. Dieser Punkt läßt sich bei richtiger Ausführung der Koagulation leicht erkennen. Die vorher trübe Lösung wird mit einem Schlage ganz klar. Die vom Eiweiß durch Filtration getrennte Lösung ist ganz klar und zeigt keine Spur einer Biuretreaktion. Während es bei Anwendung von Plasma und von Serum sehr leicht gelang, ein absolut eiweiß- und peptonfreies Filtrat zu erhalten, waren die Resultate beim Blute selbst wechselnde Infolgedessen wurde zu den Versuchen nur Plasma und ferner auch Serum verwendet. Zur Gewinnung des ersteren wurde Oxalatblut benutzt.

Das Eiweißkoagulum wurde wiederholt mit Wasser ausgekocht und ferner mit heißem Wasser in der Reibschale zerrieben. Schließlich kamen auf jeden Liter Serum resp. Plasma ca. 50 l Flüssigkeit. In den einen Fällen wurde diese unter vermindertem Druck bei 40° Wasserbadtemperatur zur Trockene

eingedampft, in anderen verwendeten wir den Faust-Heim-schen Apparat. Es sind wiederholt 50 und 100 l Serum und Plasma in der geschilderten Weise verarbeitet worden. Es gelang jedoch nicht, in einwandfreier Weise Aminosäuren aufzufinden. Wahrscheinlich waren die vorhandenen Eiweißbausteine mit dem Harnstoff zu Uraminosäuren vereinigt worden. Wir haben zwar auf solche gefahndet, jedoch ohne Erfolg. Die Anwendung der Estermethode ergab die Anwesenheit von ganz geringen Mengen von Aminosäuren. In keinem Falle gelang die Isolierung einzelner davon.

Nach diesen Erfahrungen wurde versucht, die einzelnen Aminosäuren durch Darstellung von Derivaten abzuscheiden. Auch dieser Versuch führte zu keinem eindeutigen Resultat. Einzig Glykokoll konnte im Rinder- und Pferdeblut nachgewiesen werden. Die übrigen Aminosäuren bildeten mit β -Naphthalinsulfochlorid und Phenylisocyanat Derivate, die nicht zur Krystallisation zu bringen waren. Offenbar lagen Gemische vor.

Bei einer weiteren Versuchsreihe wurden Fällungsmittel versucht. Zunächst galt es, Tryptophan abzuscheiden. Die Anwendung von Quecksilbersulfat führte zu einer Fällung, aus der in Spuren Tryptophan gewonnen werden konnte. Die Glyoxylsäure- und die Bromwasserprobe fielen positiv aus. Ferner gelang es, durch Fällung des stark verdünnten Filtrates mit Phosphorwolframsäure basische Aminosäuren nachzuweisen. Die Fällung trat ganz allmählich auf. Erst nach 48 Stunden ließ sich keine Vermehrung der Abscheidung mehr nachweisen. Die Fällung wurde in der üblichen Weise mit Baryt zerlegt. Lysin, Arginin und Histidin waren unzweifelhaft zugegen. Wir sind dabei, diesen Befund durch Isolierung der reinen Aminosäuren noch mehr sicher zu stellen.

Schließlich wandte ich mich der Fällung der Aminosäuren mit Quecksilberacetat zu.¹⁾ Das Filtrat vom Eiweißkoagulum wurde mit soviel einer gesättigten Sodalösung versetzt, bis seine Reaktion deutlich alkalisch war. Dann wurde so lange eine kalt gesättigte Lösung von Mercuriacetat zugegeben, als eine

¹⁾ Vgl. hierzu Carl Neuberg und Johannes Kerb, Biochem. Zeitschr., Bd. 40, S. 498 (1912).

weiße bis graue Fällung entstand. Zwischendurch wurde immer wieder Sodalösung zugesetzt und dafür Sorge getragen, daß die Reaktion alkalisch blieb. Schließlich wurde dann noch ein Überschuß an Mercuriacetat zugesetzt. Der Niederschlag wurde nun sofort abgesaugt, gründlich mit kaltem Wasser in der Reibschale vermischt und wieder abgenutscht. Der noch feuchte Rückstand wurde dann mit Schwefelwasserstoff zerlegt und das Filtrat vom Quecksilbersulfid unter vermindertem Druck bei 40° des Wasserbades eingedampft. Es verblieb eine weiß gefärbte, blätterige, krystallinische Masse. Im gleichen Destillationskolben wurden die schließlich verbleibenden Filtrate von 50l Serum eingeengt. Dann wurde der Rückstand mit absolutem Alkohol ausgekocht. Es wurde heiß filtriert, und das Filtrat unter vermindertem Druck zur Trockene eingedampft. Es hinterblieb eine gelb gefärbte zähflüssige Masse, die allmählich Kristalle absetzte. Schon ihr Geruch zeigte die Anwesenheit von Prolin an. Zur Identifizierung wurde das Kupfersalz dargestellt. Es löste sich restlos in absolutem Alkohol. Beim Verbrennen des Salzes trat der bekannte Geruch nach Pyrrolidin auf. Leider war die Menge des reinen Prolins so gering, daß nur eine Schmelzpunktbestimmung möglich war. Der Schmelzpunkt stimmte genau mit dem gleichzeitig erhitzten reinen Prolin überein. Auch ein Mischschmelzpunkt bestätigte, daß Prolin vorlag.

Sämtliche nicht in Alkohol löslichen Aminosäuren wurden durch Kochen ihrer wässerigen Lösung mit Kupferoxyd in das Kupfersalz übergeführt. Es gelang sehr leicht, das schwerlösliche Leucinkupfer in reinem Zustand abzutrennen. Die Kupferbestimmung ergab den richtigen Wert. Ferner gelang es, Valinkupfer mit dem richtigen Kupfergehalt zu isolieren. Ferner konnte aus dem Valinkupfer die Aminosäure selbst durch Zerlegung mit Schwefelwasserstoff erhalten werden. Der Mischschmelzpunkt mit reinem d-Valin ergab den richtigen Wert. In der Mutterlauge waren unzweifelhaft Alanin und Glykokoll und ferner Asparagin- und Glutaminsäure zugegen. Es gelang jedoch nicht, diese Aminosäuren ganz sicher zu stellen. Ihre Menge war zu gering. Bei einem zweiten Versuche wurde die Estermethode angewandt. Nunmehr gelang es, Glykokoll-

esterchlorhydrat abzuscheiden und durch den Schmelzpunkt zu identifizieren. Die Ester der übrigen Aminosäuren wurden nicht in der üblichen Weise in Freiheit gesetzt, sondern es wurde die Mutterlauge des Glykokollesterchlorhydrates mit rauchender Salzsäure gekocht und dann stark eingeengt. Es schied sich Glutaminsäurechlorhydrat in so großen Mengen ab, daß eine Chloranalyse nach Volhard möglich wurde.

Die geschilderten Versuche sind im Laufe des Sommersemesters vollendet worden. Gleichzeitig wurde an Stelle der Enteiweißung die Dialyse angewandt. Diese Methode macht bei Anwendung großer Blut- resp. Serummengen Schwierigkeiten. Es ist sehr schwer, Dialysierschläuche zu erhalten, welche wirklich eiweißundurchlässig sind. Nach meiner sehr reichen Erfahrung auf diesem Gebiete scheint es mir ein großer Fehler zu sein, wenn irgend welche Dialysierschläuche ohne gründliche Prüfung verwendet werden. Es sind mir sehr viele Versuche verloren gegangen, weil ein zunächst dichter Dialysierschlauch während des Versuches undicht wurde. Schließlich wurde zunächst jeder einzelne Schlauch gründlich ausprobiert und erst dann zum eigentlichen Versuch verwendet. Das Dialysat wurde bei jedem Versuch auf Eiweiß und Pepton geprüft. Im ganzen wurden 100 Liter Blut und ebensoviel Serum der Dialyse unterworfen. Die Dialysate wurden nach 24 Stunden und in einem weiteren Versuche schon nach 12 Stunden mit Quecksilberacetat gefällt. Es wurde absichtlich darauf verzichtet, eine möglichst große Ausbeute an Aminosäuren zu erhalten, weil mir daran lag, jede Fehlerquelle auszuschalten, und dazu gehörte in erster Linie auch die Ausschaltung von Bakterienwirkung. Während des Dialysierens gegen destilliertes Wasser waren Dialysat und Schlauchinhalt mit Toluol bedeckt. Die Verarbeitung der Dialysate war im übrigen genau dieselbe, wie sie oben für die enteiweißten Flüssigkeiten geschildert worden ist. Identifiziert wurden Prolin, Leucin, Valin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Alanin und Glykokoll. Arginin, Lysin und Histidin wurden in einem besonderen Versuche nachgewiesen, bei dem das Dialysat direkt mit Phosphorwolframsäure gefällt worden war.

Die Ausbeuten waren stets sehr geringe. Mehr als 0,4 g reine Substanz ist von keiner einzigen Aminosäure erhalten worden! Neben den Aminosäuren war noch ein Produkt vorhanden, dessen Eigenschaften mit keiner der bekannten Aminosäuren übereinstimmen. Es krystallisiert in Nadeln. Was die geringen Ausbeuten anbetrifft, so dürfen aus ihnen keine Schlüsse auf die quantitativen Verhältnisse des Vorkommens von Aminosäuren im Blute gezogen werden. Die Bedingungen, unter denen die Aminosäuren isoliert wurden, waren die denkbar ungünstigsten. Es wurde in enormen Verdünnungen gefällt. Auch die Dialysate waren stark verdünnt, es wurden 500 ccm Blut resp. Serum gegen 10 Liter Wasser dialysiert. Ferner waren die Verluste bei der Identifizierung der einzelnen Aminosäuren sehr groß.

Die mitgeteilten Versuche lassen selbstverständlich keine Schlüsse auf die Art der resorbierten Eiweißabbauprodukte zu. Die Schlachttiere hatten als Pflanzenfresser alle Chymus im Darm und fast durchwegs einen gut gefüllten Magen. Es ist daher sehr wahrscheinlich, daß von den aufgefundenen Aminosäuren ein Teil dem Darm entstammte. Selbstverständlich können auch auf dem Transport von Zelle zu Zelle begriffene Aminosäuren zur Beobachtung gelangt sein. Ein vorläufiger Versuch an hungernden Tieren hat ergeben, daß höchstwahrscheinlich das Blut nie ganz frei von Aminosäuren ist. Es scheint der Aminosäuregehalt des Blutes in ähnlicher Weise auf einem annähernd konstanten Niveau gehalten zu werden, wie der Zuckergehalt. Vielleicht wird man in Zukunft ebenfalls von einer Hyper- und Hypoaminoacidämie sprechen können.

Die vorliegend mitgeteilten Befunde werden in Bälde durch die Ergebnisse neuer zum Teil schon vollendeter Versuche ergänzt werden. Es soll dann auch ausführlich auf diejenigen Befunde und Probleme eingegangen werden, die zu dem Befund von Aminosäuren im Blute in Beziehung stehen.¹⁾

¹⁾ Vgl. dazu auch Emil Abderhalden, Lehrbuch der physiol. Chemie, 3. Aufl., Vorlesung XXV. Urban & Schwarzenberg, Berlin-Wien, 1913.