

Vorläufig kommt der Möglichkeit einer direkten Jodzähl-Bestimmung fettsaurer bzw. harzsaurer Alkalisalze hauptsächlich wissenschaftliche Bedeutung zu; weitere Versuche sollen erst darüber entscheiden, ob das angeführte Verhalten für technisch-analytische Zwecke in Betracht kommt.

174. H. v. Euler und Edv. Brunius: Amino-Derivate von Zuckerarten. (II.)

[Aus d. Chem. Laborat. d. Universität Stockholm.]

(Eingegangen am 14. Februar 1927.)

Unter dem gleichen Titel haben wir in diesen „Berichten“¹⁾ Messungen über das Verhalten von Glykokoll zu Glucose mitgeteilt, aus welchen die Affinitätskonstante zwischen diesen Stoffen berechnet werden konnte. Die starke Abhängigkeit dieser Konstante von der Acidität der Lösung ($p_H = 8.1-10.8$) wurde graphisch dargestellt.

Bereits in der ersten Mitteilung über dieses Thema aus diesem Laboratorium (Euler und Josephson²⁾) wurde darauf hingewiesen, daß ein analoges Gleichgewicht und eine analoge Aciditätsfunktion desselben auch in Systemen zu erwarten ist, welche neben Hexosen eigentliche Proteine enthalten. Ob der Blutzucker eine andere Affinität zu den Amino-säuren und ihren Aufbauprodukten besitzt als die Glucose wäre natürlich wichtig zu entscheiden, um so mehr, als in letzter Zeit bekannt geworden ist, daß der Gehalt des Blutes an Amino-säuren mit dem Blutzucker-Gehalt variiert, eine Tatsache, welche wohl mit den hier gemessenen Gleichgewichten zwischen Amino-säure-Glucosiden und ihren Komponenten in direkte Beziehung gesetzt werden muß.

Einstweilen haben wir unsere Untersuchung in zwei Richtungen fortgesetzt. Es sollte zunächst festgestellt werden, ob die zwischen den Amino-säuren und den eigentlichen Proteinen liegenden Peptone auch hinsichtlich ihrer Affinität zu den Hexosen eine Zwischenstellung einnehmen. Ferner wurde im Anschluß an die Arbeiten von Neuberger und Kobel³⁾, welche die bei der Mischung von Amino-säuren mit Fructose eintretenden Drehungsänderungen studiert hatten, die an Amino-säuren eintretende Reaktion mit Glucose einerseits, mit Fructose andererseits verglichen, wobei sich in vollkommener Übereinstimmung mit Neuberger zeigte⁴⁾, daß sich die mit Fructose eintretende Reaktion insofern von der an Glucose bekannten unterscheidet, als erstere sofort eintritt, während letztere langsamer fortschreitet und erst nach Verlauf mehrerer Stunden den Gleichgewichtszustand erreicht.

Einstweilen haben H. Pringsheim und M. Winter⁵⁾ außerordentlich bemerkenswerte Beobachtungen mitgeteilt, welche mit oben erwähnten Reaktionen in nahem Zusammenhange zu stehen schienen: Wenn man Eiweißstoffe und reduzierende Zucker in wäßriger oder kochsalz-haltiger Lösung vermischt, so läßt sich in der Mischung der Zucker nicht mehr durch

1) B. **59**, 1581 [1926].

2) Ztschr. physiol. Chem. **153**, 1 [1926]. Dortselbst ältere Literatur.

3) Biochem. Ztschr. **162**, 496 [1925] und **174**, 464 [1926].

4) Euler und Brunius, Ztschr. physiol. Chem. **161**, 265 [1926].

5) B. **60**, 278 [1927]. -- Siehe auch Biochem. Ztschr. **177**, 406 [1926].

Fehlingsche Lösung nachweisen. Die von Pringsheim entdeckte Reaktion tritt mit verschiedenen Eiweißstoffen ein, nur die Gelatine macht eine Ausnahme. Die Versuche waren in der Weise angestellt, daß die Mischungen von Eiweiß-Lösung und Zucker nach der Methode von Bertrand titriert wurden; es trat, wie erwähnt, dabei keine Reaktion der Glucose ein; der gleiche auffallende Effekt zeigte sich nicht nur bei Verwendung von Fructose, sondern auch — wenn auch erst nach Verlauf gewisser Zeit — bei Maltose und Lactose. Das Maximum des Vorganges liegt nach Pringsheim bei $p_{\text{H}} = 6.4$.

Da wir nun bei einigen Amino-säuren das Gleichgewicht, das mit Glucose bzw. Fructose erreicht wird, genau kennen, so war es für uns von Interesse, festzustellen, ob, wie wir vermutet hatten, bei Eiweißstoffen die Affinität zu Glucose und Fructose wesentlich stärker ist als bei den Amino-säuren, und wir haben deshalb an diesen Systemen wiederum festgestellt, wie sich die Summe der Gefrierpunkte von Zucker-Lösungen und Eiweiß-Lösungen zum Gefrierpunkt von Mischungen dieser beiden Stoffe verhalten.

Zunächst können wir mitteilen, daß sich nach der kryoskopischen Methode ein Effekt zwischen Serum-Albumin und Fructose zeigt, welcher, wie der Versuch von Pringsheim und Winter an Serum-Albumin und Glucose, auf eine Kondensation hindeutet, wenn dieselbe in unserem Falle auch viel kleiner ist. Wir haben hier noch keine Berechnung unserer Versuchszahlen angegeben, da wir zunächst unsere kryoskopischen Ergebnisse mit eigenen Reduktionsversuchen vergleichen wollen. Ein quantitativer Vergleich zwischen einer Amino-säure und einem Pepton bzw. Protein ist auch dadurch erschwert, daß die Berechnung in letzterem Falle sich auf die im Pepton bzw. Protein vorhandene Zahl der freien Aminogruppen stützen muß.

Unsere kryoskopischen Versuche haben im übrigen bis jetzt Folgendes ergeben: Witte-Pepton scheint sich insofern ähnlich wie Glykokoll zu verhalten, als die Erniedrigung der gesamten Molekülzahl (Differenz zwischen der Gefrierpunkts-Erniedrigung der Komponenten und derjenigen der Mischung) mit Fructose sofort (allerdings in geringem Grade) eintritt, während sich mit Glucose nur ein zeitlich verlaufender Effekt bemerkbar macht, der mit dem Alkalinitätsgrad zwischen $p_{\text{H}} = 7.08$ und 7.90 zunimmt. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit Resultaten von Borsook und Wastenays⁶⁾.

Mischen von Fructose mit Serum-Albumin führte zu einer kleinen augenblicklichen Verminderung der Molekülzahl.

Unsere mit Hexosen und Blutserum angestellten Versuche schließen sich an die früheren mit der Methylenblau-Methodik angestellten Versuche aus diesem Laboratorium (Euler und Nilsson⁷⁾) an und an Untersuchungen über den Blutzucker. Euler, Myrbäck und Nilsson⁸⁾ haben vor einiger Zeit darauf hingewiesen, daß „diese in wäßriger Lösung sehr labile Glucose-Form durch Proteine des Blutes, durch Peptone und Amino-säuren, also spezifische Stoffe gebunden und stabilisiert wird“. Wir fanden nun (vergl. S. 996), daß zwischen Blutserum und Fructose eine Bindung, allerdings

⁶⁾ Biochem. Journ. **19**, 1128 [1925].

⁷⁾ Ztschr. physiol. Chem. **149**, 44 [1925].

⁸⁾ Svensk kem. Tidskr. **38**, 353 [1926].

auch in geringem Grade, sofort auftritt, nicht aber zwischen Blutserum und Glucose.

Im allgemeinen liefert die kryoskopische Methode eine erheblich geringere Verminderung der Molekülzahl (entsprechend einer geringeren Kondensation) als Pringsheim und Winter mit der Reduktionsmethode fanden. In dieser Hinsicht muß ein weiterer Ausbau der analytischen Methoden vorhandene Differenzen aufklären.

Beschreibung der Versuche.

Wir haben uns hier der gleichen Methodik bedient wie in unseren vorhergehenden Arbeiten. Wir haben also kryoskopisch festgestellt, welche relative Erniedrigung der Molekülzahl eintritt, wenn Lösungen von Pepton oder Eiweiß bzw. Serum mit Lösungen von Glucose oder Fructose vermischt werden. Wie schon einleitend bemerkt, haben wir hier wieder wie früher zwischen dem momentanen Effekt und dem zeitlich meßbaren Effekt unterschieden.

Glucose + Pepton Witte.

Die Pepton-Lösung hatte nach Herstellung und Filtration einen Gehalt von 14.8% Trockensubstanz. Für die Gefrierpunkts-Bestimmungen wurden folgende Lösungen bereitet:

- 20 ccm Pepton-Lösung + Wasser zu 50 ccm Totalvolumen,
 - 15 ccm 1-n. Glucose-Lösung + Wasser zu 50 ccm Totalvolumen,
 - 20 ccm Pepton-Lösung + 15 ccm Glucose-Lösung zu 50 ccm Totalvolumen.
- In der Mischung von Pepton und Glucose betrug die Acidität $p_H = 7.08$.

Lösung	Gefrierpunkt	Mittel	Erniedrigung
Wasser	3.505	3.501	
	3.498		
	3.500		
Pepton	3.329	3.335	0.166
	3.335		
	3.340		
Glucose	2.846	2.840	0.661
	2.835		
	2.839		
Glucose + Pepton (sofort)	2.660	2.665	0.836
	2.665		
	2.672		
Glucose + Pepton (36 Stdn.)	2.711	2.718	0.783
	2.723		
	2.719		

Augenblicklicher Effekt: $0.166 + 0.661 - 0.836 = 0.009^0$.

Zeitlicher Effekt: $0.836 - 0.783 = 0.053^0$.

Der ersterwähnte Effekt fällt in die Versuchsfehler-Grenzen. Es tritt also hier nur der zeitlich meßbare, langsam verlaufende Effekt auf.

Glucose + Pepton Witte + Alkali.

Die Ausgangslösung des Peptons enthielt wieder 14.8% Trockensubstanz. Die Lösungen, an welchen die Gefrierpunkts-Erniedrigung gemessen wurde, hatten die gleichen Zusammensetzungen wie beim vorigen Versuch und unterschieden sich von den genannten Lösungen nur dadurch,

daß die Pepton-Lösungen mit so viel Alkali versetzt worden waren, daß in den Mischungen von Pepton und Glucose eine Acidität von $p_H = 7.90$ eintrat.

Lösung	Gefrierpunkt	Mittelwert	Erniedrigung
Wasser	3.520	3.516	
	3.511		
	3.517		
Pepton + Alkali	3.288	3.280	0.236
	3.281		
	3.276		
	3.275		
	2.875		
Glucose	2.860	2.865	0.651
	2.860		
	2.866		
	2.644		
Glucose + Pepton + Alkali (sofort)	2.638	2.636	0.880
	2.626		
	2.714		
Glucose + Pepton + Alkali (36 Stdn.)	2.704	2.709	0.807
	2.710		

Zeitlicher Effekt: $0.880 - 0.807 = 0.073^0$.

Fructose + Pepton Witte.

Trockengehalt der Pepton-Lösungen: 10.1 %.

Zusammensetzung der Lösungen:

30 ccm Pepton-Lösung + Wasser	zu 50 ccm Totalvolumen,
15 ccm 1-n. Fructose-Lösung + Wasser	„ 50 ccm „ „
30 ccm Pepton-Lösung + 15 ccm 1-n. Fructose-Lösung + Wasser	„ 50 ccm „ „

Lösung	Gefrierpunkt	Mittelwert	Erniedrigung
Wasser		3.560	
	Pepton		
Fructose	3.390	2.856	0.704
	3.393		
	2.849		
	2.858		
	2.859		
Fructose + Pepton	2.857	2.706	0.854
	2.703		
	2.712		
	2.702		
	2.706		

Augenblicklicher Effekt: $0.165 + 0.704 - 0.854 = 0.015^0$.

Glucose + Blutserum.

Das zu diesen Versuchen angewandte Serum wurde aus defibriertem Ochsenblut durch Abzentrifugieren der roten Blutkörperchen hergestellt. Hierauf wurde das Serum einer 16-stdg. Dialyse durch eine Kollodium-Membran unterworfen.

Die Gefrierpunkte wurden in folgenden Lösungen bestimmt:

15 ccm Serum + 5 ccm Wasser,

15 ccm Wasser + 5 ccm Glucose-Lösung (ca. 0.4 Mol.),

15 ccm Serum + 5 ccm Glucose-Lösung.

Acidität in den Mischungen von Serum und Glucose: $p_H = 7.80$.

Lösung	Gefrierpunkt	Mittelwert	Erniedrigung
Wasser	3.552	3.560	
	3.561		
	3.565		
	3.563		
Serum	3.550	3.545	0.015
	3.539		
	3.540		
	3.551		
Glucose	3.280	3.270	0.290
	3.273		
	3.265		
	3.263		
Serum + Glucose	3.253	3.251	0.309
	3.240		
	3.248		
	3.262		

Ein augenblicklicher Effekt hat sich hier nicht gezeigt. Ebenso wenig konnte ein Effekt nach längerer Zeit mit Sicherheit festgestellt werden. Noch nach 40 Stdn. war der Gefrierpunkt innerhalb der Versuchsfehler der gleiche wie der der Ausgangslösung.

Fructose + Serum.

Das gleiche Serum wie im vorhergehenden Versuch. Die Lösungen hatten folgende Zusammensetzung:

15 ccm Serum + 5 ccm Wasser,

15 ccm Wasser + 5 ccm Fructose-Lösung (ca. 0.4-n.),

15 ccm Serum + 5 ccm

Acidität in den Mischungen von Serum und Fructose: $p_H = 7.78$.

Lösung	Gefrierpunkt	Mittelwert	Erniedrigung
Wasser		3.560	
Serum		3.545	0.015
Fructose	3.307	3.300	0.260
	3.298		
	3.295		
	3.301		
Serum + Fructose	3.327	3.321	0.239
	3.318		
	3.317		
	3.322		

$$\text{Zeitlicher Effekt} = 0.260 + 0.015 - 0.239 = 0.036^0.$$

Die mittleren Fehler bei jeder Gefrierpunkts-Bestimmung geben im Resultat einen mittleren Fehler von $\pm 0.006^0$. Der gefundene Effekt liegt also außerhalb der Versuchsfehler-Grenzen.

Ein zeitlich verlaufender Effekt konnte nicht nachgewiesen werden.

Fructose + Serum-Albumin.

Die Lösung des Serum-Albumins hatte nach dem Filtrieren ein Trockengewicht von 3.2%. Die Gefrierpunkte wurden in folgenden Mischungen gemessen:

- 15 ccm Serum-Albumin + 5 ccm Wasser,
 15 ccm Wasser + 5 ccm Fructose-Lösung (ca. 0.4 Mol.),
 15 ccm Serum-Albumin + 5 ccm „

Lösung	Gefrierpunkt	Mittelwert	Erniedrigung
Wasser		3.560	
Serum-Albumin	3.545		
	3.542	3.541	0.019
	3.535		
Fructose	3.307		
	3.298	3.300	0.260
	3.295		
	3.301		
Serum-Albumin + Fructose	3.311		
	3.303		
	3.300	3.305	0.255
	3.305		

$$\text{Augenblicklicher Effekt} = 0.019 + 0.260 - 0.255 = 0.024^0.$$

175. H. v. Euler und Edv. Brunius: Nachtrag zu unserer Mitteilung: Amino-Derivate von Zuckerarten, II.

(Eingegangen am 25. Februar 1927.)

In Rücksicht auf die weittragenden Schlußfolgerungen, welche sich an die eindeutige Beantwortung der Frage nach der Kondensation von Hexosen und Proteinen knüpfen, haben wir die in unserer voranstehenden Abhandlung mitgeteilten Versuche¹⁾ noch in einigen Punkten erweitert und ergänzt. Wir erinnern an unseren Befund, daß kryoskopische Messungen für eine augenblicklich eintretende Kondensation zwischen Pepton oder Serum-Albumin und Glucose bzw. Fructose keine oder nur sehr geringe Anzeichen liefern, während H. Pringsheim und M. Winter²⁾ aus Reduktionsversuchen auf eine weitgehende Kondensation geschlossen hatten.

Zunächst haben wir mit Pepton Witte und mit Glucose die von Pringsheim beschriebene Verminderung des Reduktionsvermögens durchaus bestätigen können.

Pepton-Lösung: 1 g Witte-Pepton + 15 ccm Wasser, Glucose-Lösung: 1 g in 100 ccm Lösung.

Die Reduktions-Bestimmungen wurden nach der Methode von Bertrand mit je 10 ccm folgender Reaktionsgemische ausgeführt: a) 5 ccm Glucose-Lösung + 25 ccm Wasser; verbraucht 4.94 ccm 0.1092-n. Kaliumpermanganat = 34.3 mg Cu = 17 mg Glucose. b) 5 ccm Glucose-Lösung + 5 ccm Pepton-Lösung + 20 ccm Wasser; verbraucht 3.00 ccm 0.1092-n. Kaliumpermanganat = 20.8 mg Cu = 10 mg Glucose.

Es bestätigt sich also, daß nicht weniger als 40% der angewandten Glucose-Menge nach Zusatz des Peptons durch die Bertrand'sche Methode

¹⁾ siehe auch unsere älteren Versuche, B. 59, 1581 [1926] und Ztschr. physiol. Chem. 161, 265 [1926]. ²⁾ B. 60, 278 [1927].