

Über den oxydativen Abbau einiger physiologisch wichtiger Stoffe nach dem Verfahren von Hehner

Von

Fritz Lieben und Erich Molnar

Aus der Abteilung für physiologische Chemie am Wiener Physiologischen Universitäts-Institut

(Vorgelegt in der Sitzung am 25. April 1929)

Gelegentlich einer Untersuchung der Beziehungen zwischen dem Kohlehydrat- und Phosphorsäurestoffwechsel haben Fürth und Marian¹ vor einiger Zeit versucht, Hexosediphosphorsäure quantitativ zu bestimmen. Sie bedienten sich u. a. dazu des bekannten Verfahrens von Hehner für Glycerinbestimmung und fanden die Methode zwar für Glukose, Fruktose und Dioxyazeton verwendbar, jedoch zeigte sich überraschenderweise, daß Hexosediphosphorsäure nur zirka $\frac{1}{4}$ des berechneten Wertes lieferte. Es lag nahe, dieser Tatsache auch in bezug auf andere Kohlehydrate nachzugehen und auch darüber hinaus schien die Methode gerade durch ihr etwaiges Differenzierungsvermögen geeignet, einen Einblick in den oxydativen Abbau physiologisch-chemisch interessanter Stoffe zu bieten, woraus ja auch immer Hinweise für den physiologischen Abbau dieser Substanzen gewonnen werden können.

Es wurden hier wie auch in den später angeführten Versuchen 0.2—0.5 g Substanz mit einem Volumen Hehner-Gemisch (enthaltend 7.4% $K_2Cr_2O_7$ und 75% H_2SO_4) versetzt, das nach der Gleichung: $K_2Cr_2O_7 + 4 H_2SO_4 = K_2SO_4 + Cr_2(SO_4)_3 + 4 H_2O + 3 O_2$ genügend, bzw. einen kleinen Überschuß an O_2 abgeben konnte, um das Substrat vollkommen zu CO_2 , H_2O und ev. NH_3 zu verbrennen; das nicht verbrauchte Kaliumbichromat wurde mit einer gestellten 25% Ferroammonsulfatlösung (Mohrsches Salz) zurücktitriert und das Ende der Titration durch Tüpfelproben mit Kaliumferrizyanid festgestellt. Anwendung eines größeren Überschusses an Hehner-Mischung steigerte, wie wiederholt erprobt, den O_2 -Verbrauch nicht wesentlich. Wenn nicht anders angegeben, wurde 2 Stunden auf dem Wasserbade erhitzt, bei flüchtigen Stoffen mit Rückflußkühler*. Bei stick-

¹ O. Fürth und J. Marian, Biochem. Ztschr. 167, 1925, S. 123.

* Nach Abschluß der vorliegenden Arbeit finden wir in der Z. anal. Chem. 76, 1929, S. 297, ein Referat über eine uns bisher entgangene Arbeit von H. Cordebar (Ann. chim. anal. appl. (2) 3, 1921, S. 49), der sich ziemlich der gleichen Methodik bediente wie wir. (Die Bichromat- und Schwefelsäurekonzentrationen waren bedeutend kleiner. Es wurde durch fünf Minuten bis gegen 160° erhitzt.) Dabei wurde eine Anzahl organischer Stoffe, die flüchtige Oxydationsprodukte, wie z. B. Essigsäure, nicht liefern können, völlig verbrannt, so daß eine Bestimmungsmethode für sie gegeben erscheint. Cordebar fand so unter anderem, in Übereinstimmung mit uns, völlige Oxydation von Oxalsäure, Malonsäure, Äpfelsäure, Weinsäure, Phenol, Salizylsäure sowie von diversen Kohlehydraten; auffallenderweise auch von Benzoesäure.

stoffhaltigen Stoffen wurde nach der Wasserbad-Reaktion nur die Hälfte des Gemisches titriert, aus der zweiten Hälfte mittels MgO das NH_3 in vorgelegte $n/10 \text{ H}_2\text{SO}_4$ überdestilliert und titriert (Kjeldahl-Bestimmung).

I.

Im folgenden sollen zunächst die Verbindungen aus der Gruppe der Kohlehydrate betrachtet werden. Die Zahlen bedeuten stets Prozente des zur Totalverbrennung notwendigen Sauerstoffs bzw. Prozente des gesamten NH_3 , das die Verbindung liefern kann.

Tabelle 1 (Zweistundenversuche).

I.		II.	
Hehner-Wert		Hehner-Wert	
%		%	
Dioxyazeton	92·3	Candiolin-Na	76·0, 76·9
Xylose	97·7, 98·2	„ -Ca	63·6, 63·1
Sorbit	98·7, 99·3	„ -Mg ²	56·0, 58·0
Stärke	93·5, 94·2		
Zellulose	101·9, 100·8		

III.

	Hehner-Wert	Kjeldahl-Wert
	%	%
Glukosamin	99·8	99·8
Chitin ³	66·5, 66·0	94·0, 95·0
Chitosansulfat ³	63·3	80·0
Chondroitin- ³ schwefelsaur. Na	{ 61·0 63·0	{ 18·2 22·0

Wir sehen, daß die in der Rubrik I angeführten Stoffe, auch die hochmolekulare Stärke und Zellulose, nach Hehner vollkommen oxydiert werden; daß die Hexosediphosphorsäurenalsalze nur zu ca. $\frac{2}{3}$ — $\frac{3}{4}$ verbrennen und untereinander kleine Unterschiede aufweisen. Ob der bedeutende Unterschied gegenüber dem von Fürth und Marian gefundenen Wert von ca. 25% auch auf solchen Verschiedenheiten des Präparates beruht, läßt sich jetzt nicht mehr entscheiden. Beim Mg-Salz der Hexosediphosphorsäure ergaben auch fünfständige Versuche keine Steigerung des Wertes nach Hehner, es liegen also hier Verbindungen von größerer Resistenz vor, als sie die anderen Kohlehydrate darstellen. Bei den N-haltigen Kohlehydratderivaten wird nur das Glukosamin völlig oxydiert; bei den Chitin- und Chitosanpräparaten erfolgt wohl ziemlich vollständige Desaminierung, jedoch bleibt der Wert nach Hehner beträchtlich zurück, was darauf hindeutet, daß das desaminierte Produkt der Oxydation nur langsam oder überhaupt unvollständig anheimfällt. Einige fünfständige Versuche

² Wir verdanken das Präparat (enth. 31, 6% H_2O) der Freundlichkeit von Herrn Prof. C. Neuberg, Berlin-Dahlem.

³ Vgl. Formeln in Fürths Lehrb. d. physiol. Chemie, I. Bd., S. 317.

⁴ Ebenda I., S. 311. Formel von Levene und La Forge.

deuten eher auf das Stehenbleiben der Oxydation. — Beim chondroitinschwefelsauren Na zeigt sich umgekehrt neben einem den übrigen Derivaten dieser Gruppe analogen Hehner-Wert eine auffallend geringe NH_3 -Abspaltung, was mit dem Bau dieser Verbindung zusammenhängen kann: die Aminogruppen sind bekanntlich azetyliert, und die Oxydation kann in der großen Molekel an einem Teile einsetzen, ohne daß davon der Stickstoff tangiert wird (s. unten bei Histidin).

II.

Um in die hier vorliegenden Gesetzmäßigkeiten einen besseren Einblick zu erhalten, schien es angezeigt, auf die Untersuchung bekannter Verbindungen von einfachem Bau überzugehen und speziell einige Ringe zu studieren, um z. B. die Frage zu lösen, ob bei der Resistenz der Hexosediphosphorsäuren etwa zyklische Strukturen eine Rolle spielen, was schon Fürth und Marian diskutieren.

Tabelle 2.

Nr.	2 St.		Nr.	2 St.	
	Hehner-Wert			Hehner-Wert	
	%			%	
1. Benzol	10·9,	17·5	4. Salicylsäure	91·5	
	11·6,	18·0		91·8	
2. Phenol	83·2,	95·6	. <i>p</i> -Oxybenzoesäure	98·2	
	82·8,	97·6		96·1	
3. Benzoesäure	56·7		6. Furfurol	90·2	95·0
	56·9				

Nr.	2 St.		5 St.		8 St.	
	Hehner-Wert	Kjeld.-Wert	Hehner-Wert	Kjeld.-Wert	Hehner-Wert	Kjeld.-Wert
	%		%		%	
7. Pyrrol	71·0	76·1	82·5	—	90·1	—
	—	—	86·0	—	92·4	—
8. Chinolin	17·0	18·5	—	—	—	—
9. Indol	83·0	83·5	94·0	—	94·8	—
	85·2	—	94·5	—	—	—
10. Thiophen	77·2	—	—	—	—	—
	77·7	—	—	—	—	—
11. Imidazol	36·7	31·5	41·0	38·8	—	—

Wie zu erwarten, sind die Hehner-Werte bei den Phenolderivaten bedeutend höher als bei Benzolabkömmlingen; die leichte Verbrennbarkeit des Sauerstoffringes Furfurol deutet an, daß etwaige Sauerstoffringe in Hexosediphosphorsäuren dem oxydativen Abbau keine Schwierigkeiten bereiten dürften, so daß die relative Resistenz der letzteren andere Gründe haben muß. — Pyridin wird nach 2 Stunden überhaupt nicht angegriffen, Chinolin in geringem Ausmaß, Pyrrol wird im Laufe von 8 Stunden beinahe vollständig oxydiert.

III.

Am meisten mußte den Biochemiker der Abbau der Aminosäuren bei der beschriebenen Versuchsanordnung interessieren; besonders beobachteten wir den Vergleich zwischen dem Fortschreiten der Oxydation und dem der Desaminierung.

Der oxydative Abbau von Aminosäuren ist bekanntlich in mannigfacher Weise untersucht worden. Es seien von früheren Arbeiten (ohne Anwendung von Katalysatoren) erwähnt die Versuche von Dakin⁵, der Glykokoll, Alanin, Leuzin usw. mit H₂O₂ oxydierte und im allgemeinen die Bildung der um 1 C ärmeren Aldehyde bzw. der entsprechenden Fettsäuren neben CO₂ und NH₃ konstatierte; Harries und Langheld⁶ fanden, daß Ozon die zyklischen Aminosäuren angreift, während die aliphatischen ziemlich resistent sind. Langheld⁷ behandelt die Aminosäuren mit NaOCl mit ähnlichem Resultat wie Dakin. Im diabetischen Tierkörper fanden nach Verabreichung von Aminosäuren Ringer, Frankl und Jonas⁸ intermediäre Abbauprodukte, die den in der folgenden Diskussion von Tabelle III zu erörternden völlig entsprechen; Fichter und Kuhn⁹ finden neuerdings Aldehyd, CO₂ und NH₃ bei Oxydation von Aminosäuren mit H₂O₂ an der Anode; Fearon und Montgomery¹⁰ schließlich konstatierten bei Oxydation mit H₂O₂ und KMnO₄ das Auftreten von Zyansäure in geringer Menge.

Tabelle 3.

Es wurden Präparate von Kahlbaum, Hofmann-La Roche und Merck verwendet. H: Hehner-Wert, i. e. Sauerstoffverbrauch in Prozenten des zur Totaloxydation benötigten. K: Kjeldahl-Wert, i. e. Desaminierungswert in Prozenten des Gesamt-NH₃, den die Verbindung liefern kann.

Name	2 St.		5 St.		8 St.	
	H. %	K. %	H. %	K. %	H. %	K. %
Glykokoll	58·0	59·1	—	—	81·6	94·5
	57·7	58·5	88·5	—	—	—
	56·0	65·6	86·2	—	—	—
	55·2	66·0	—	—	—	—
Glykokollester-HCl .	43·5	—	—	—	—	—
	44·6	—	—	—	—	—
Glyzinaanhydrid . .	70·0	67·2	—	—	—	—
Leuzin	65·2	70·5	70·5	84·4	74·7	92·2
	65·5	69·6	73·2	87·6	—	—

⁵ H. D. Dakin, J. of. biol. Chem. 1, 1905, S. 171; 4, 1907, S. 63; 5, 1908, S. 409; siehe auch F. Breinl u. O. Baudisch, Z. physiol. Chem. 52, 1907, S. 159.

⁶ C. Harries u. K. Langheld, Z. physiol. Chem. 51, 1907, S. 373.

⁷ K. Langheld, Ber. D. ch. G. 42, 1909, S. 2360.

⁸ A. J. Ringer, E. M. Frankl u. J. Jonas, J. of biol. Chem. 14, 1913, S. 525 und 539.

⁹ F. Fichter u. F. Kuhn, Helv. chim. Acta 7, 1924, S. 167.

¹⁰ W. R. Fearon u. E. G. Montgomery, Biochem. Journ. 18, 1924, S. 576

N a m e	2 St.		5 St.		8 St.	
	Hehner- Wert	Kjeld.- Wert	Hehner- Wert	Kjeld.- Wert	Hehner- Wert	Kjeld.- Wert
	%	%	%	%	%	%
Valin	42·0	68·0	54·0	71·2	86·1	94·2
	47·0	78·5	—	—	—	—
Asparaginsäure . .	82·0	80·9	84·8	91·2	92·5	95·8
Arginin	36·1	38·0	59·1	54·5	60·0	56·0
	42·0	41·8	59·8	56·1	61·0	56·5
Lysin	27·5	38·4	55·0	40·1	59·0	46·5
	29·3	41·2	—	—	—	—
Zystin	58·3	61·0	—	—	—	—
	57·0	60·0	—	—	—	—
Alanin	29·4	80·0	33·0	70·2	37·0	92·5
	30·1	73·5	—	—	—	—
	29·0	83·4	—	—	—	—
Alaninanhydrid . .	67·0	89·0	—	—	—	—
	69·0	89·9	—	—	—	—
Glutaminsäure . . .	32·5	85·0	34·0	—	43·0	—
	31·1	96·0	38·5	—	45·2	—
	35·5	94·0	—	—	—	—
Phenylalanin . . .	62·6	72·7	76·1	95·4	94·5	—
	67·0	77·0	—	—	—	—
	72·1	77·1	—	—	—	—
Tyrosin	85·0	87·1	—	—	—	—
Tryptophan	88·2	82·2	—	—	—	—
Prolin	20·0	12·4	—	—	—	—
	22·8	14·8	—	—	—	—
Histidin	42·5	35·5	64·8	41·0	67·9	40·3
	43·4	32·5	—	—	—	—

Die Tabelle zeigt zunächst, daß die Aminosäuren gegen das angewandte Oxydationsverfahren beträchtliche Resistenz aufweisen; selbst bei achtstündigem Erhitzen auf dem Wasserbad nähert sich der Hehner-Wert nur allmählich dem Wert 100. Von den aliphatischen Aminosäuren ist dies am ehesten bei der *Asparaginsäure* der Fall. Sehr leicht (schon nach 2 Stunden) geht die Verbrennung beim *Tyrosin* und *Tryptophan* vonstatten, was mit den Erfahrungen von *Harries* und *Langheld* (l. c.) bei der Ozonbehandlung übereinstimmt. Das wichtigste Ergebnis aber scheint uns aus dem Vergleich zwischen den Hehner- und Kjeldahl-Werten hervorzugehen.

Wir können nämlich (im zweistündigen Versuch) drei Gruppen bei den Aminosäuren unterscheiden. Bei der ersten sind die beiden Werte ungefähr gleich. Zu dieser Gruppe gehören: *Glykokoll*, *Leuzin*, *Asparaginsäure*, *Arginin*, *Zystin*, *Tyrosin* und *Tryptophan*. Wir müssen hier annehmen, daß, sobald die Aminosäure desaminiert ist, die nun zunächst entstehende Verbindung: Aldehyd, Säure (Oxysäure und Dikarbonsäure) sehr leicht verbrennlich ist. Da das Ansteigen der

Hehner-Werte auf die Dauer des Erhitzens die Bildung beträchtlicher Mengen flüchtiger Produkte, wie Aldehyd (s. weiter unten), die aus dem Gemisch hätten entweichen können, unwahrscheinlich macht, mußten wir unser Augenmerk besonders auf Fettsäuren richten, deren Verhalten bei unserer Versuchsanordnung zu studieren war.

Die zweite Gruppe umfaßt Alanin, Valin und Glutaminsäure; hier mußten nicht nur die intakte Aminosäure, sondern auch die nach Desaminierung entstandenen Stoffe der Oxydation erheblichen Widerstand leisten, was in dem Voraneilen der Kjeldahl-Werte gegenüber den Hehner-Werten seinen Ausdruck findet. Während dies beim Valin noch wenig ausgeprägt ist und hier die desaminierte Verbindung mit der Zeit fortschreitend oxydiert wird, ist dies bei der Glutaminsäure schon bedeutend weniger der Fall, während beim Alanin der Hehner-Wert direkt stehenbleibt, was auf das Entstehen einer unverbrennlichen Verbindung hinweist. Das Phenylalanin nimmt als zyklische Aminosäure mit Alanin als Seitenkette hier eine Stelle zwischen den Gruppen 1 und 2 ein; der Kjeldahl-Wert geht voraus, doch wird die Oxydation mit der Zeit eine vollständige, jedenfalls wird die zunächst entstehende Benzoesäure (s. Tab. II., 3) angegriffen (s. unten!); die völlige Verbrennung des Tyrosins entspricht demgegenüber dem Verhalten des Phenols gegenüber Benzol (Tab. II.).

In der dritten Gruppe ist der Wert nach H e h n e r höher als der Kjeldahl-Wert, es muß also die Oxydation einsetzen, ohne daß vorher oder gleichzeitig der Stickstoff abgespalten wird, bzw. es werden im Oxydationsgemisch schwer oxydable N-haltige Verbindungen zurückbleiben. Zu dieser Gruppe gehören vor allem Prolin und Histidin; in beiden Stoffen ist der Stickstoff im Kern enthalten und die Möglichkeit einer Oxydation ohne gleichzeitige Abspaltung des Stickstoffes als NH_3 gegeben. Beim Histidin richtet sich das Verhalten nach dem des Imidazolkerns, an dem sowohl Resistenz wie das Vorgehen des H e h n e r-Wertes beobachtet wird (s. Tab. II., 11), während die Zugehörigkeit des Tryptophans zur ersten Gruppe trotz des N im Indolkern mit der leichten Oxydierbarkeit des Indols (s. Tab. II., 9) zusammenhängen muß. — Schwerer deutbar ist das Verhalten des Lysins, das bei längerem Erhitzen auch einen höheren Wert nach H e h n e r gegenüber dem Kjeldahl-Wert zeigt. Hier muß die ϵ -ständige NH_2 -Gruppe eine Rolle spielen, doch lassen sich die sehr komplizierten Verhältnisse bei der Oxydation hier¹¹ wie beim Arginin nicht ohne weiteres übersehen. Auch beim Glykokoll treten auffallenderweise (bei Versuchen ohne Rückflußkühler) Werte (in der Tab. III nicht angeführt) ent-

¹¹ Vgl. H. Zickgraf (Ber. D. ch. G. 35, 1902, S. 3301), der Lysin mit Bariumpermanganat oxydierte.

sprechend der dritten Gruppe auf. d. h. es müßten N-haltige flüchtige Stoffe entstanden sein (vgl. hiezu Dakin, l. c., J. of biol. Chem. 1, 175, S. 6).

IV.

Im Gegensatz zu den noch nicht ganz übersehbaren Verhältnissen in Gruppe 3 erschien es notwendig und möglich, das unterschiedliche Verhalten der ersten und zweiten Gruppe aufzuklären, und zu diesem Zweck wurden nunmehr die folgenden ein- und zweibasischen Fettsäuren (bzw. Oxyssäuren) auf ihre Hehner-Werte (Proz. der Totaloxydation bei zweistündiger Wasserbadbehandlung) untersucht.

Über Fettsäureoxydation besteht eine sehr umfangreiche Literatur; die ältere ist bei Cochenhausen¹² und Margulies¹³ zu finden. Letzterer erhielt bei KMnO₄-Oxydation in saurer Lösung aus Propionsäure, Buttersäure und Heptylsäure als Hauptprodukt Essigsäure (s. unten); mit H₂O₂ behandelte Dakin¹⁴ diverse Fettsäuren und studierte die zahlreichen Abbauprodukte; der Chromschwefelsäure als Oxydationsmittel bediente sich Polonovsky¹⁵ und betont das Abreißen der Kohlenstoffkette durch β -Oxydation.

Tabelle 4 (Zweistundenversuche).

Nr.	Name	H. %	Nr.	Name	H. %
1.	Essigsäure	< 1	13.	Oxalsäure	98·0, 98·5
2.	Propionsäure	11	14.	Malonsäure	99·8, 100·5
3. n.	Buttersäure	58	15.	Bernsteinsäure	1·2, 1·1
4. n.	Valeriansäure	67	16.	Glutarsäure	1·0, 1·4
5.	Isovaleriansäure	65	17.	Sebazinsäure	40·0, 39·5
6. n.	Kaprinsäure	57	18.	Milchsäure	39·8, 40·5
7. n.	Heptylsäure	35	19.	β -Oxybuttersäure	60·0, 62·0
8. n.	Kaprylsäure	31	20.	Äpfelsäure	83·0, 85·7
9. n.	Pelargonsäure	18	21.	Weinsäure	95·5, 95·8
10. n.	Kaprinsäure	13			
11. n.	Palmitinsäure	< 1			
12. n.	Stearinsäure	< 1			

Zunächst sei das Ansteigen der Oxydationswerte bei den einbasischen Fettsäuren von der unverbrennlichen Essigsäure bis zur Valeriansäure und der sodann eintretende Abfall bis zur wieder äußerst resistenten Palmitinsäure und Stearinsäure hervorgehoben. Von den zweibasischen Säuren zeigen Oxalsäure und Malonsäure völlige Oxydierbarkeit, Bernsteinsäure und Glutarsäure völlige Unverbrennlichkeit; bei den höheren Homolgen scheinen durch Reißen der C-Kette Glieder von verschiedener Resistenz zu entstehen.

¹² E. v. Cochenhausen, J. prakt. Chem. 58, S. 451; behandelt speziell die Oxydation von Ketonen zu Fettsäuren.

¹³ R. Margulies, Monatsh. Chem. 15, 1894, S. 273, bzw. Sitzb. Ak. Wiss. Wien (Iib), 103, 1894, S. 273.

¹⁴ H. D. Dakin, J. of biol. Chem. 4, 1907/1908, S. 77, 90, 227; 5, 1908, S. 173.

¹⁵ M. Polonovsky, Compt. rend. 178, S. 576 (zit. n. Chem. Centr. 1924, I, S. 1765).

Wenn wir nun unsere Erfahrungen aus Tabelle IV auf die in Tabelle III gewonnenen Zahlen anwenden, lassen sich folgende Schlüsse ziehen:

1. **Glykokoll.** Als Hauptprodukt der Oxydation kann hier **Oxalsäure** angesehen werden (**Dakin, l. c.**, findet auch **Glyoxylsäure**); da Oxalsäure leicht und vollständig verbrennt, kann der **Hehner-Wert** hinter dem Wert für die **Desaminierung** nicht wesentlich zurückbleiben; daß mitunter umgekehrt der **Hehner-Wert** vorangeht, wurde schon besprochen.

2. **Leuzin** wurde oben auch zur Gruppe 1 gerechnet, obwohl der **Kjeldahl-Wert** den Wert nach **Hehner** stets etwas übersteigt. Es kann sich hier **Isovaleriansäure** (s. **Dakin, l. c.**) bilden, die nach Tab. IV von allen untersuchten einbasischen Fettsäuren am besten (65%) verbrennt. Die Werte für **Leuzin** liegen stets etwas höher, als im folgenden berechnet, da die Oxydation sicher nicht ausschließlich auf einem Wege verläuft.

Leuzin braucht zur Totaloxydation pro Mol 15 Atome Sauerstoff, zur Bildung von **Isovaleriansäure** 2 Atome O; sind z. B. 75% des **Leuzins** desaminiert worden, so wird zu deren Umwandlung in **Isovaleriansäure** $\frac{2}{15}$ des zur völligen Oxydation nötigen O₂, i. e. 10%, benötigt; von den zur Totaloxydation der **Isovaleriansäure** benötigten 65% werden jedoch (s. Tab. IV, 5) wieder nur 65%, i. e. zirka 42%, verbraucht. Der berechnete O₂-Verbrauch wäre also 52%.

3. Beim **Valin** ist die erwähnte Erscheinung (das Voraneilen des **Kjeldahl-Wertes**) viel akzentuierter — zum mindesten im zweistündigen Versuch —, bei längerer Dauer wird das Verhalten sämtlicher Aminosäuren (außer **Alanin** und **Glutaminsäure**) einander allmählich immer ähnlicher. Wir haben daher diese Aminosäure oben zur zweiten Gruppe gerechnet, obwohl der Unterschied gegenüber dem **Leuzin** nicht sehr erheblich ist. Wir können als Oxydationsprodukt die Bildung von **Isobuttersäure** annehmen, die eben etwas schlechter verbrennt als **Isovaleriansäure**. Für die gefundenen und berechneten Werte gilt analog das unter 2. Gesagte.

Während das Bild der Oxydation bei den Diaminosäuren **Arginin** und **Lysin** (von letzterer war oben schon die Rede) sich noch nicht deutlich übersehen läßt, muß

4. die besonders leicht verbrennende **Asparaginsäure** nach **Desaminierung** zunächst **Malonsäure** bilden, und diese Verbindung verbrennt (nach Tab. IV, 14) glatt. **Hehner-** und **Kjeldahl-Werte** müssen daher ungefähr gleich sein (auch **Dakin, l. c.**, weist auf Entstehung und Zerfall der **Malonsäure** bei der Oxydation der **Asparaginsäure** hin).

5. Die **Glutaminsäure** zeigt, wie erwähnt, ein ganz anderes Verhalten. Hier bildet sich bei der Oxydation (s. wieder **Dakin, l. c.**) als nicht flüchtiges Produkt **Bernsteinsäure**; diese ist aber unter den obigen Versuchsbedingungen (s. auch weiter unten) völlig resistent. Wir sehen nun bei der

Glutaminsäure tatsächlich ein starkes Zurückbleiben des Hehner-Wertes und sehr hohe, fast vollständige Desaminierung.

6. Als Hauptrepräsentant der Gruppe 2 (neben Glutaminsäure) erscheint das Alanin. Hier entsteht bei der Oxydation in der Hauptsache Essigsäure, die sich nach Tab. IV als völlig unverbrennlich erweist¹⁶. Es bleibt beim Alanin denn auch der Hehner-Wert hinter dem Kjeldahl-Wert beträchtlich zurück, was sich bei längerem Erhitzen nicht ändert.

1 Mol Alanin braucht 6 At. O zur totalen Verbrennung, 2 At. O zur Essigsäurebildung; von den desaminierten z. B. 75% sollen $\frac{1}{3}$, i. e. 25%, des Totalsauerstoffverbrauches konsumiert werden, bei 81% Desaminierung: 27%; die gefundenen Werte sind nur wenig höher (29%).

Bemerkenswert ist, daß beim Alaninanhydrid die Spannung zwischen den beiden Werten besteht, jedoch beide Werte deutlich höher liegen. Es ist die Frage, ob hier die Oxydation auf unbekanntem Wegen der Hydrolyse zu Alanin vorangeht?

V.

Um unsere Anschauungen vom Oxydationsverlauf bei den Aminosäuren zu präzisieren, haben wir 1. einige Oxydationen mit Hilfe des Gemisches nach Beckmann (enthaltend 20% $K_2Cr_2O_7 + 17\% H_2SO_4$) durchgeführt. Dieses Gemisch wurde von Kollmann¹⁷ im hiesigen Institut zur quantitativen Bestimmung von Phenylalanin benützt; bei seiner Versuchsanordnung (Kochen am Drahtnetz und Rückflußkühler) wird das Phenylalanin völlig zu Benzoesäure oxydiert. Bei der Untersuchung von Kasein ergab sich völlige Desaminierung, während der Oxydationswert beträchtlich hinter dem für die vollständige Verbrennung erforderlichen zurückblieb.

Unsere Versuche ergaben die folgenden Oxydationswerte in Prozenten der Totaloxydation:

Tabelle 5.

Dauer des Kochens	Glykokoll	Alanin	Leuzin	Glutamins.	in Prozenten	
5 St.	80	33	43	70		
8 „	—	32·5	—	75		
	Essigs.	Propions.	Butters.	Valerians.	Isovalerians.	
5 „	< 1	15	18	23	24	
	Kaprone.	Kapryls.	Oxals.	Bernsteins.		
5 „	21	17	98·6	57		

Die Oxydationskurve der Fettsäuren verläuft also ebenso wie in Tab. IV mit Valeriansäure als Höhepunkt, nur sind die erreichten Werte viel niedriger. — Bei Glykokoll ist der Oxydationswert dem Hehner-Wert ziemlich gleich; beim Alanin wird die entstehende Essigsäure auch hier, wie

¹⁶ Eine Oxydation von Essigsäure durch H_2O_2 geben neuerdings K. Bernhauer u. J. Nistler an. *Biochem. Ztschr.* 205, 1928, S. 230.

¹⁷ G. Kollmann, *Biochem. Ztschr.* 194, 1927, S. 1.

man sieht, nicht angegriffen. Der Wert bei der Glutaminsäure ist auffallend hoch, was dadurch erklärt wird, daß hier (s. Tab. V) die Bernsteinsäure beträchtlich oxydiert wird. Was wiederum den niedrigen Oxydationswert beim Leuzin betrifft, so hängt er mit dem niedrigeren Wert für Isovaleriansäure zusammen.

Es wurden 2. zum Nachweis der Oxydationsprodukte Wasserdampfdestillationen ausgeführt. Dabei wurde die betreffende Aminosäure nach Hehner durch zwei Stunden am Wasserbad oxydiert und dann durch viele Stunden Wasserdampf durchgeleitet, bis das Destillat nur noch ganz schwach sauer übergiebt. Dabei wurden natürlich die Versuchsbedingungen im Vergleich zu den obigen Bestimmungen beträchtlich verschoben, da sich an das zweistündige Erhitzen noch ein vielstündiges Kochen anschloß. Es waren demnach Veränderungen in den Oxydationsprodukten, bzw. Verschiebung nach den Endprodukten zu erwarten (vgl. Margulies, l. c.).

a) Beim Glykokoll konnte dabei erwartungsgemäß ein Oxydationsprodukt nicht gefaßt werden, es gingen nur geringe Mengen Säure (wahrscheinlich Ameisensäure) über.

b) Bei Alanin wurde aus 7 g Substanz im Destillat eine Säure titriert, die durch ihr Silbersalz als 4.2 g Essigsäure identifiziert wurde (65.2% Ag statt 64.2% ber.); die theoretische Menge Essigsäure aus 7 g Alanin beträgt: 4.76 g.

c) Valin lieferte im Destillat eine Säure und etwas Aldehyd, der nach dem Neutralisieren abdestilliert wurde, so daß er die Ag-Bestimmung nicht stören konnte. Dieselbe ergab 67—68% Ag, also (etwas zu hoch für) Essigsäure. Die nach unseren obigen Annahmen zuerst entstehende Buttersäure war durch die energische, lang andauernde Oxydation unter Kochen in Essigsäure weiterverwandelt worden.

d) Das gleiche geschieht beim Leuzin. Neben etwas Aldehyd, der entfernt wurde, konnte Essigsäure identifiziert werden (etwas mehr als 1 Mol pro Mol Leuzin).

e) Beim Phenylalanin wurde nach Vertreiben von Spuren Aldehyd durch Ansäuern Benzoesäure gefällt. Im Filtrat derselben war eine flüchtige Säure nachzuweisen; die am Wasserbad noch nicht zerstörte Benzoesäure geht beim Kochen offenbar vor weiterer Oxydation über.

f) Bei der Glutaminsäure schließlich ging, wie zu erwarten, nichts Wesentliches über. Der Destillationsrückstand wurde im Apparat von Schacherl mit Äther wiederholt extrahiert; nach Entfernen aller Verunreinigungen blieben Nadeln vom Smp. 182° der Bernsteinsäure zurück.

VI.

Der durch den Vergleich der Hehner- und der Kjeldahl-Werte erlangte Überblick über die Oxydation der Aminosäuren nach dem Verfahren von Hehner machte es verlockend, dieses Verfahren auch auf Eiweißkörper anzuwenden. Man konnte daran denken, daß je nach der Zusammensetzung des betreffenden Proteins an bestimmten Aminosäuren die Hehner- und Kjeldahl-Werte ungefähr gleich oder voneinander ver-

schieden sein würden. Bei einem an Alanin und Glutaminsäure besonders reichen Protein, wie z. B. Zein, konnte man ein deutliches Voraneilen der Kjeldahl-Werte erwarten usw. Es sei gleich bemerkt, daß bei den folgenden Zweistundenversuchen solche Unterschiede nicht zutage traten.

Tabelle 6 (Bezeichnungen wie in Tab. 3).

	Hehner-Wert		Kjeldahl-Wert	
	%		%	
1. Ovalbumin	}	49·0	}	68·0
		51·5		59·0
2. Serumalbumin	}	62·5	}	65·0
		57·0		59·0
3. Kasein	}	60·5	}	70·0
		46·2		49·4
4. Gelatine	}	49·8	}	52·0
5. Zein		50·5		62·2

Es wurden außerdem noch Blutfibrin, Seidenfibroin und Keratin (aus Hornspänen) untersucht und in allen Fällen $\frac{1}{2}$ — $\frac{1}{3}$ der benützten Menge desaminiert, wobei der Hehner-Wert stets etwas zurückbleibt. Auch beim Zein tritt die Differenz nicht auffällig hervor.

Die oben beschriebenen Destillationsversuche hatten ferner gezeigt, daß bei sämtlichen Aminosäuren bei längerer Wasserdampfdestillation nach vorhergegangener Oxydation nach H e h n e r als flüchtiges Produkt neben geringen Aldehydmengen nur Essigsäure auftritt. Man konnte sich fragen, wieviel Essigsäure bei maximaler Oxydation nach H e h n e r aus einem Eiweißkörper zu erhalten ist.

10 g Kasein (Hammarsten) wurden mit einer Hehner-Mischung (enthaltend 178·95 g $K_2Cr_2O_7$, 1440 cm^3 konz. H_2SO_4 und 2400 cm^3 H_2O) auf dem Wasserbad erhitzt.

Eine nach 5 St. entnommene u. titr. Probe v. 20 cm^3 ergab einen Hehnerwert v. 73·8 %
 " " 10 " " " " " " " " " 75 "
 " " 15 " " " " " " " " " 75 "

Die Oxydation war also nach 5 Stunden praktisch vollendet und überschritt nicht $\frac{3}{4}$ der zur Totaloxydation des vorhandenen Eiweiß nötigen Sauerstoffmenge. Die Wasserdampfdestillation lieferte eine Säure, von der ein Silbersalz bereitet wurde, das ca 1·1 g Essigsäure entsprach. Die aus dem Alanin des Kaseins erhältliche Menge ist beträchtlich geringer (ca. 0·12 g), so daß auch beim Eiweiß offenbar andere Aminosäuren (Leuzin, Isoleuzin usw.) bei der Oxydation Essigsäure liefern müssen.

Zusammenfassung.

Um den oxydativen Abbau von physiologisch wichtigen Stoffen zu studieren, wurde das Verfahren von H e h n e r (für Glycerinbestimmung) angewendet. Es ergab sich:

1. Die untersuchten N-freien Stoffe der Kohlehydratgruppe und das Glukosamin werden vollständig oxydiert, die hexosediphosphorsäuren Salze nur zu $\frac{2}{3}$ — $\frac{3}{4}$ angegriffen. Bei den N-haltigen Substanzen (außer dem Glukosamin) bleibt die Oxydation unvollständig (Tab. I).

2. Um die vorliegenden Gesetzmäßigkeiten besser kennenzulernen, wurden zunächst einige zyklische Verbindungen von bekannter Zusammensetzung untersucht (Tab. II) und dann

3. die Aminosäuren betrachtet (Tab. III). Hier wurde besonders das Fortschreiten der Oxydation (Hegner-Wert) mit dem der Desaminierung (Kjeldahl-Wert) verglichen. Von diesem Gesichtspunkt ergab sich eine Einteilung der Aminosäuren in drei Gruppen, u. zw. eine Gruppe, wo die beiden genannten Werte ungefähr gleich sind; eine zweite, wo der Kjeldahl-Wert dem Hegner-Wert beträchtlich voraneilt (Alanin, Glutaminsäure, minder deutlich Valin), und eine dritte, wo umgekehrt der Kjeldahl-Wert zurückbleibt, da hier die Möglichkeit einer Oxydation ohne vorhergehende oder gleichzeitige Stickstoffabspaltung gegeben ist (Histidin und Prolin, bei längerer Versuchsdauer Lysin). — Das Verhalten der Gruppen 1 und 2 muß sich nach den Eigenschaften der entstehenden Zwischenprodukte richten. Bei der ersten müssen mehr oder minder leicht verbrennliche (wie Oxalsäure, Malonsäure, Isovaleriansäure) entstehen; bei der zweiten schwer verbrennliche (wie Bernsteinsäure) und unverbrennliche (wie Essigsäure). Das Auftreten dieser einzelnen Produkte bei der Oxydation mit H_2O_2 , $NaOCl$ usw. wurde schon von Dakin, Langheld usw. konstatiert.

4. Über die Eigenschaften dieser Zwischenprodukte der Hegner-Oxydation gibt Tab. IV Auskunft. Die Diskussion der Tab. III im Lichte der Erfahrungen aus Tab. IV zeigt auch an Hand einfacher Berechnungen die Berechtigung der unter 3. erwähnten Einteilung sowie der Annahmen über das Auftreten von Zwischenprodukten.

5. Die Durchführung einiger Versuche mit dem Beckmannschen Oxydationsgemisch nach dem Verfahren von Kollmann zeigt ein analoges Verhalten der untersuchten Substanzen wie nach dem Hegner-Verfahren.

6. Die an die Hegner-Oxydation angeschlossene Wasserdampfdestillation führt gleich zu den Endprodukten; als flüchtiges Oxydationsprodukt wurde bei Alanin, Valin und Leuzin nur Essigsäure (neben etwas Aldehyd) festgestellt, beim Phenylalanin Benzoesäure als Hauptprodukt; bei Glykoll und Glutaminsäure fand sich, wie zu erwarten, kein flüchtiges Produkt, wohl aber bei der letzteren Verbindung: Bernsteinsäure im Destillationsrückstand.

7. Versuche, die bei den Aminosäuren gewonnenen Erfahrungen auch an Eiweiß zu erproben, ergaben (Tab. VI) keine Unterschiede, die auf die Eiweißzusammensetzung hätten zurückgeführt werden können; es wurde stets $\frac{1}{2}$ — $\frac{2}{3}$ der benützten Menge desaminiert, wobei der Hehner-Wert nur mäßig zurückblieb. Beim Kasein ist die Oxydation schon nach 5 Stunden maximal und erreicht $\frac{3}{4}$ des zur totalen Oxydation berechneten Wertes; die bei Wasserdampfdestillation übergehende Essigsäure kann nicht nur aus dem Alanin, sondern muß auch aus dem Leuzin, Isoleuzin usw. stammen.
