Zur Kenntnis der Oxydation einiger physiologischer Substanzen durch Tierkohle

Von

Otto Fürth und Hans Kaunitz

Aus dem Institut für angewandte medizinische Chemie der Universität in Wien

(Vorgelegt in der Sitzung am 13. Juni 1929)

I. Einleitung.

Die vorliegenden Untersuchungen, die nicht sowohl von physikalisch-chemischen als von biochemischen Gesichtspunkten aus in Angriff genommen worden sind, knüpfen an O. Warburgs grundlegende Forschungen an. Zweifellos ist die Tatsache, daß Nährstoffe, die von molekularem Sauerstoff bei niederer Temperatur nicht angegriffen werden, im Organismus bis zu ihren Endprodukten verbrennen, eine überaus wunderbare Erscheinung. Da sind denn O. Warburgs[1] Versuche am Kohlenmodell ein Merkstein am Wege zur Erkenntnis. Bedeuten sie doch nichts Geringeres, als daß es gelungen ist, wenigstens einen Teil des Mysteriums der Eiweißverbrennung aus den Zellwerkstätten ins Reagenzglas zu bannen: Warburg vermochte nämlich, durch einfaches Durchleiten von Sauerstoff durch Suspensionen eisenhaltiger Kohlen Zystin und andere Aminosäuren zu verbrennen. Am besten wirkt Häminkohle, die sowohl Stickstoff als Eisen enthält. Warburg weist dem Eisen als spezifischem Faktor eine zentrale Stellung an; anderseits aber nimmt er unspezifische Oberflächenkräfte und eine Adsorptionskatalyse der Oxydation an. Blausäure, welche schon in minimalen Mengen vitale Oxydationen zu hemmen vermag, entfaltet, offenbar am Eisen angreifend, ihre Hemmungswirkung auch in den Modellversuchen.

Bereits H. Freundlich[2] hatte beobachtet, daß Oxalsäure bei Berührung mit Kohle schon bei Zimmertemperatur unbeständig ist. Warburg hat diese Beobachtung verfolgt und gefunden, daß Oxalsäure zu Kohlensäure und Wasser verbrennt. Später stellte er dann fest, daß, wenn man in eine wässerige Zystinlösung Blutkohle einbringt und bei 40° schüttelt, die Aminosäure unter O_2-Aufnahme und CO_2-Bildung (gasometrisch beobachtet) und unter Auftreten von Schwefelsäure verschwindet.

---

[1] O. Warburg, Pflügers Arch. f. Physiol. *155*, 1914, S. 517; O. Warburg und E. Negelein, Biochem. Ztschr. *113*, 1920, S. 257; E. Negelein, ebenda *142*, 1923, S. 492; O. Warburg und W. Brefeld, ebenda *145*, 1924, S. 461; H. Blaschko, ebenda *175*, 1926, S. 68; O. Warburg, ebenda *198*, 1928, S. 241.

[2] H. Freundlich (Capillarchemie 1909, S. 163).

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Andere Aminosäuren verhielten sich ähnlich. Die NH_3-Abspaltung betrug bei Leuzin bis 74% der theoretisch möglichen Menge. Dabei werden die Aminosäuren an die Kohle adsorbiert. Bei sehr geringen Konzentrationen gilt Proportionalität zwischen Oxydationsgeschwindigkeit einerseits, adsorbierter Menge und Konzentration anderseits [3]. Die Adsorptionskonstante zeigt einen Anstieg mit dem Molekulargewichte (Glykokoll 3·0, Alanin 2·8, Aminobuttersäure 7·5, Valeriansäure 19, Iso-Leuzin 60, Nor-Leuzin 200). Blausäureversuche ergaben, daß nur ein kleiner Teil der Kohlenoberfläche katalytisch wirksam sei. Weitere Versuche bezogen sich auf Zuckerkohle, Silikatzuckerkohle, Häminkohle und Kohle aus Anilinfarbstoffen. Häminkohle erwies sich 7—8mal stärker katalytisch wirksam als technische Blutkohle. Eine Vermehrung des Eisengehaltes der Kohle von einigen Zehntelprozent auf einige Prozente bewirkte keine Vermehrung der Wirkung. 1 Zehntelprozent dürfte bereits eine maximale Wirkung entfalten. N-freie Kohlen können durch Fe nicht aktiviert werden. Die Eisenkatalyse wird durch HCN gehemmt. Katalytische und adsorptive Eigenschaften der Kohle sind voneinander weitgehend unabhängig.

E. Baur [4] und K. Wunderly [5] (Zürich) studierten die Desaminierung von Aminosäuren durch Tierkohle, wobei stets auf luftfreies Arbeiten geachtet wurde. Es wurde die Einstellung eines Gleichgewichtes nach dem Massenwirkungsgesetze, z. B. $CH_2(NH_2).COOH + H_2O \rightleftarrows CH_2(OH).COO' + NH_4$, ermittelt. Eine Umkehrung der Reaktion im Sinne einer Bildung von Aminosäure aus dem Ammoniumsalze der Oxysäure wurde nie erzielt. Aus Glykokoll wurde bei 40° (1 *g* + 5—10 *g* Carbo) in 170—240 Stunden eine NH_3-Abspaltung zu 10—17% des Gesamt-N erzielt; bei 100° aber bereits in 15 Stunden eine solche von 11%. 1—4 *g* Alanin ergab (in 200 cm^3 Wasser) innerhalb 3—4 Stunden NH_3-Abspaltung zu 8—38% des Gesamt-N; 1—3 *g* Asparagin in 4—40 Stunden 24—37% usw.

Hennichs [6] (Stockholm) erzielte mit einer 4% Fe enthaltenden Blutkohle einen optimalen Effekt, wenn er auf 0·1 *g* Alanin 2 *g* Kohle in Anwendung brachte; bei 40° in 24 Stunden: CO_2-Produktion entspr. 40%, $CH_3.COH$-Produktion entspr. 15%, $CH_3.COOH$-Produktion entspr. 8% der theoretischen Menge.

Eine wesentliche Vertiefung der Anschauungen über die Vorgänge an Kohlenoberflächen ergibt sich aus den umfassenden, insbesondere die Oxalsäure-Oxydation betreffenden Versuchen von E. K. Rideal und Winifred Mary Wright [7] unter Verwertung der Forschungen von Paneth und Radu [8] über die Auswertung von Kohlenoberflächen durch Methylenblau- und Amylalkoholadsorption. Für eine Zuckerkohle ergab sich z. B. nur 0·38% der Kohlenoberfläche als autoxydierbar, 40·5% der Oberfläche als katalytisch wirksam, der Rest der Oberfläche (ca. 59%) als katalytisch unwirksam. Paneth und Radu hatten ge-

---

[3] Vgl. auch Abderhalden und Fodor (Fermentforschung 2, 1917/18, S. 44, 151).

[4] E. Baur, Helv. chim. Acta *5*, 1922, S. 825.

[5] R. Wunderly (Zürich), Z. physikal. Chem. *112*, 1924, S. 175.

[6] G. Hennichs, Ber. D. ch. G. *59*, 1926, S. 218.

[7] E. K. Rideal and Winifred Mary Wright (Labor. physic. chemistry, Cambridge), Journ. Chem. Soc. London, 1925, S. 1346; 1926, S. 1813, 3182; W. M. Wright. Proc. Cambridge Philos. Soc. *23*, 1926, S. 187; Journ. Chem. Soc. London, 1927, S 2323.

[8] F. Paneth und A. Radu, Ber. D. ch. G. *57*, 1924, S. 1221.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

funden, daß N-haltige Kohlen eine größere Oberfläche haben als N-freie. Rideal und Wright haben katalytisch hochwertige Kohlen aus Zucker unter Zusatz von Eisenchlorid und Harnstoff bereitet. Sie errechneten z. B.:

	Fe-C-Komplexe entsprechend	6 %	der Oberfläche
	Fe-C-N-	$4^1/_2$ %	
aktive	C-C-	20 %	

Andere Komplexe als die genannten sollen für die Aktivität nicht in Betracht kommen.

Sie fanden in voller Bestätigung der Warburgschen Anschauungen eine Aktivität der drei Komplexe[9] im Verhältnisse von

C-C Fe-C Fe-C-N = 1 50 800.

Die Literatur über katalytische Oxydation physiologisch wirksamer stickstofffreier Substanzen soll später erörtert werden.

Unsere eigenen Untersuchungen sind, wie bereits erörtert, nicht von physikalisch-chemischen, vielmehr von physiologischen Gesichtspunkten aus in Angriff genommen worden und sollten womöglich einer Nutzanwendung der bereits feststehenden Resultate auf biochemische Fragen dienen. Insbesondere ist der Umfang der NH_3-Abspaltung aus verschiedenen Aminosäuren, das Verhalten von ringförmigen Komplexen, von Säureamiden und Proteinen, die Ursache des Steckenbleibens der Reaktion und die Wirkung anderer biologisch in Betracht kommender Schwermetalle untersucht worden. — Weiterhin haben wir unsere Aufmerksamkeit einigen als Zuckerabbauprodukte und Fettabbauprodukte in Betracht kommenden physiologischen Substanzen zugewandt.

II. Versuche über die katalytische Oxydation von Aminosäuren.

1. Aktivität von Kohlenpräparaten. Wenn wir aus den vorliegenden Untersuchungen auch wissen, daß die katalytische und adsorptive Aktivität von Kohlenpräparaten keineswegs parallel gehen, wählten wir für unsere Versuche ein in letzterer Hinsicht hochwertiges Präparat, nämlich Carbo medicinalis Merck. Die adsorptive Affinität desselben wurde nach Joachimglu geprüft, indem 0·20 *g* des bei 120° getrockneten Präparates mit 50 cm^3 *n*/10 Jodlösung 30 Minuten geschüttelt wurden. Dann wurde zentrifugiert; 10 cm^3 der

[9] Anmerkung: Die Gesamtoberfläche der Kohle wurde aus der Methylenblauadsorption, die katalytisch wirksame Oberfläche wurde aus dem Minimalwert von Amylalkohol errechnet, der eben notwendig war, um die Oxydation von Oxalsäure ganz zu verhindern. Die hochaktiven Fe-C- und Fe-C-N-Gebiete wurden aus der zur Vergiftung eben erforderlichen Minimalmenge von Kaliumzyanid und Rhodankalium ermittelt.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Andere Aminosäuren verhielten sich ähnlich. Die NH_3-Abspaltung betrug bei Leuzin bis 74% der theoretisch möglichen Menge. Dabei werden die Aminosäuren an die Kohle adsorbiert. Bei sehr geringen Konzentrationen gilt Proportionalität zwischen Oxydationsgeschwindigkeit einerseits, adsorbierter Menge und Konzentration anderseits[3]. Die Adsorptionskonstante zeigt einen Anstieg mit dem Molekulargewichte (Glykokoll 3·0, Alanin 2·8, Aminobuttersäure 7·5, Valeriansäure 19, Iso-Leuzin 60, Nor-Leuzin 200). Blausäureversuche ergaben, daß nur ein kleiner Teil der Kohlenoberfläche katalytisch wirksam sei. Weitere Versuche bezogen sich auf Zuckerkohle, Silikatzuckerkohle, Häminkohle und Kohle aus Anilinfarbstoffen. Häminkohle erwies sich 7—8mal stärker katalytisch wirksam als technische Blutkohle. Eine Vermehrung des Eisengehaltes der Kohle von einigen Zehntelprozent auf einige Prozente bewirkte keine Vermehrung der Wirkung. 1 Zehntelprozent dürfte bereits eine maximale Wirkung entfalten. N-freie Kohlen können durch Fe nicht aktiviert werden. Die Eisenkatalyse wird durch HCN gehemmt. Katalytische und adsorptive Eigenschaften der Kohle sind voneinander weitgehend unabhängig.

E. Baur[4] und K. Wunderly[5] (Zürich) studierten die Desaminierung von Aminosäuren durch Tierkohle, wobei stets auf luftfreies Arbeiten geachtet wurde. Es wurde die Einstellung eines Gleichgewichtes nach dem Massenwirkungsgesetze, z. B. $CH_2(NH_2).COOH + H_2O \rightleftarrows CH_2(OH).COO' + NH_4$, ermittelt. Eine Umkehrung der Reaktion im Sinne einer Bildung von Aminosäure aus dem Ammoniumsalze der Oxysäure wurde nie erzielt. Aus Glykokoll wurde bei 40° (1 *g* + 5—10 *g* Carbo) in 170—240 Stunden eine NH_3-Abspaltung zu 10—17% des Gesamt-N erzielt; bei 100° aber bereits in 15 Stunden eine solche von 11%. 1—4 *g* Alanin ergab (in 200 cm^3 Wasser) innerhalb 3—4 Stunden NH_3-Abspaltung zu 8—38% des Gesamt-N; 1—3 *g* Asparagin in 4—40 Stunden 24—37% usw.

Hennichs[6] (Stockholm) erzielte mit einer 4% Fe enthaltenden Blutkohle einen optimalen Effekt, wenn er auf 0·1 *g* Alanin 2 *g* Kohle in Anwendung brachte; bei 40° in 24 Stunden: CO_2-Produktion entspr. 40%, $CH_3.COH$-Produktion entspr. 15%, $CH_3.COOH$-Produktion entspr. 8% der theoretischen Menge.

Eine wesentliche Vertiefung der Anschauungen über die Vorgänge an Kohlenoberflächen ergibt sich aus den umfassenden, insbesondere die Oxalsäure-Oxydation betreffenden Versuchen von E. K. Rideal und Winifred Mary Wright[7] unter Verwertung der Forschungen von Paneth und Radu[8] über die Auswertung von Kohlenoberflächen durch Methylenblau- und Amylalkoholadsorption. Für eine Zuckerkohle ergab sich z. B. nur 0·38% der Kohlenoberfläche als autoxydierbar, 40·5% der Oberfläche als katalytisch wirksam, der Rest der Oberfläche (ca. 59%) als katalytisch unwirksam. Paneth und Radu hatten ge-

---

[3] Vgl. auch Abderhalden und Fodor (Fermentforschung 2, 1917/18, S. 44, 151).

[4] E. Baur, Helv. chim. Acta *5*, 1922, S. 825.

[5] R. Wunderly (Zürich), Z. physikal. Chem. *112*, 1924, S. 175.

[6] G. Hennichs, Ber. D. ch. G. *59*, 1926, S. 218.

[7] E. K. Rideal and Winifred Mary Wright (Labor. physic. chemistry, Cambridge), Journ. Chem. Soc. London, 1925, S. 1346; 1926, S. 1813, 3182; W. M. Wright. Proc. Cambridge Philos. Soc. *23*, 1926, S. 187; Journ. Chem. Soc. London, 1927, S 2323.

[8] F. Paneth und A. Radu, Ber. D. ch. G. *57*, 1924, S. 1221.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

funden, daß N-haltige Kohlen eine größere Oberfläche haben als N-freie. Rideal und Wright haben katalytisch hochwertige Kohlen aus Zucker unter Zusatz von Eisenchlorid und Harnstoff bereitet. Sie errechneten z. B.:

	Fe-C-Komplexe entsprechend	6 %	der Oberfläche
	Fe-C-N-	$4^1/_2$ %	
aktive	C-C-	20 %	

Andere Komplexe als die genannten sollen für die Aktivität nicht in Betracht kommen.

Sie fanden in voller Bestätigung der Warburgschen Anschauungen eine Aktivität der drei Komplexe[9] im Verhältnisse von

C-C Fe-C Fe-C-N = 1 50 800.

Die Literatur über katalytische Oxydation physiologisch wirksamer stickstofffreier Substanzen soll später erörtert werden.

Unsere eigenen Untersuchungen sind, wie bereits erörtert, nicht von physikalisch-chemischen, vielmehr von physiologischen Gesichtspunkten aus in Angriff genommen worden und sollten womöglich einer Nutzanwendung der bereits feststehenden Resultate auf biochemische Fragen dienen. Insbesondere ist der Umfang der NH_3-Abspaltung aus verschiedenen Aminosäuren, das Verhalten von ringförmigen Komplexen, von Säureamiden und Proteinen, die Ursache des Steckenbleibens der Reaktion und die Wirkung anderer biologisch in Betracht kommender Schwermetalle untersucht worden. — Weiterhin haben wir unsere Aufmerksamkeit einigen als Zuckerabbauprodukte und Fettabbauprodukte in Betracht kommenden physiologischen Substanzen zugewandt.

II. Versuche über die katalytische Oxydation von Aminosäuren.

1. Aktivität von Kohlenpräparaten. Wenn wir aus den vorliegenden Untersuchungen auch wissen, daß die katalytische und adsorptive Aktivität von Kohlenpräparaten keineswegs parallel gehen, wählten wir für unsere Versuche ein in letzterer Hinsicht hochwertiges Präparat, nämlich Carbo medicinalis Merck. Die adsorptive Affinität desselben wurde nach Joachimglu geprüft, indem 0·20 *g* des bei 120° getrockneten Präparates mit 50 cm^3 *n*/10 Jodlösung 30 Minuten geschüttelt wurden. Dann wurde zentrifugiert; 10 cm^3 der

[9] Anmerkung: Die Gesamtoberfläche der Kohle wurde aus der Methylenblauadsorption, die katalytisch wirksame Oberfläche wurde aus dem Minimalwert von Amylalkohol errechnet, der eben notwendig war, um die Oxydation von Oxalsäure ganz zu verhindern. Die hochaktiven Fe-C- und Fe-C-N-Gebiete wurden aus der zur Vergiftung eben erforderlichen Minimalmenge von Kaliumzyanid und Rhodankalium ermittelt.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Flüssigkeit wurden dann mit $n/10$ Thiosulfatlösung zurücktitriert. Verschiedene Proben ergaben so eine Adsorption von 14—17 cm^3 $n/10$ Jod für 0·1 g.

Eine Probe dieser Kohle, mit frisch bereiteter 1%iger Ferrosulfatlösung geglüht, ergab eine etwas gesteigerte Adsorption entspr. 20 cm^3 $n/10$ Jod für 0·1 g. Eine andere Probe, im Verhältnis 10 : 1, mit Hämoglobin gemischt und 1 Stunde bei Rotglut erhalten, gab: 19 cm^3 $n/10$ Jod. Kohle aus Bismarckbraun, analog behandelt, adsorbierte nur 0·3 cm $n/10$ Jod pro 0·1 g.

2. Versuchsschema: Ein Beispiel mag unsere Versuchsanordnung veranschaulichen:

0·5 g der Aminosäure wurden mit 10 g Carbo medicinalis Merck und 150 cm^3 Wasser in einem Jenaer Kolben von ½ l Fassungsraum unter Rückflußkühlung 5 Stunden gekocht. Dann wurde ohne Filtration ½ g Magnesia zugesetzt, das sich entwickelnde Ammoniak in einem Kjeldahl-Apparat abdestilliert und in $n/10$ H_2SO_4 aufgefangen.

Es resultierten 17 cm^3 $n/10$ N $= 17 \times 0{\cdot}0014 = 0{\cdot}0238\,g$ N.

Alanin enthält 15·76% N, 0·5 g, demnach 0·0786 g N; vom Alanin-N sind 30·3% als NH_3-N abgespalten worden.

Parallelversuch mit Alanin, statt bei Siedehitze, bei **40°** ergab nur **12·1 %** bzw. **9·8 %** abgespalt. N.

Parallelversuch mit Leuzin, statt bei Siedehitze, bei **40°** ergab **68·3 %** bzw. **69·1 %** N.

Parallelversuch mit Argininnitrat, statt bei Siedehitze, bei **40°** ergab **18·7 %** N.

(Schüttelversuche mit Hilfe einer in einen Thermostaten eingebauten Schüttelvorrichtung mit elektrischem Antriebe.)

Die Versuche illustrieren einerseits die Wirkung höherer Temperatur, anderseits aber den Einfluß eines höheren Molekulargewichtes (s. o.) der Aminosäure. Wenn das

Arginin $C\begin{cases} NH_2 \\ (NH) \\ NH\cdot CH_2\cdot CH_2\cdot CH_2\cdot CH(NH_2)COOH \end{cases}$ trotz seines hohen Molekulargewichtes (174) so viel weniger seines N abspaltet als Leuzin (Molekulargewicht 131), so ist dabei zu beachten, daß nur ein Viertel seines Gesamtstickstoffes Amino-N ist, die anderen drei Viertel aber einem Guanidinkomplexe angehören. Bezieht man die NH_3-Abspaltung nicht auf den Gesamt-N, vielmehr auf den Amino-N, so vervierfacht sich der gefundene Wert auf $4 \times 18{\cdot}7 = 74{\cdot}8\%$.

3. Einfluß der Konzentration und der Kochdauer.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Je 0·5 *g* Alanin wurden mit je 10 *g* Carbo medicinalis (Adsorptionsvermögen für 0·1 *g* 14 *cm*³ *n*/10 Jod) und a) 50 *cm*³, b) 200 *cm*³, c) 400 *cm*³, d) 800 *cm*³ Wasser 7 Stunden unter Rückfluß gekocht; dann wurde unter Magnesiazusatz ohne vorangegangene Filtration destilliert. NH_3-N-Abspaltung in % des Gesamt-N: a) 52·4%, b) 35·6%, c) 35·4%, d) 25·4%.

4 Parallelversuche mit 0·5 *g* Alanin + 10 *g* Carbo + 100 *cm*³ Wasser; Kochdauer: a) 2, b) 4, c) 6, d) 8 Stunden. NH_3-N-Abspaltung: a) 25·4%, b) 36·1%, c) 41·3%, d) 40·0% des Gesamt-N. — Über eine gewisse Grenze hinaus bewirkt also eine Verlängerung der Kochdauer keine Vermehrung der NH_3-Abspaltung.

In einer weiteren Versuchsreihe gelangte die dreifache Alaninmenge, jedoch auch die dreifache Kohlenmenge zur Anwendung: je 1·5 *g* Alanin + 30 *g* Kohle + 300 *cm*³ Wasser, Kochdauer 5 Stunden: NH_3-N-Abspaltung 57·4, 57·9, 50·6% des Gesamt-N.

Nach vollzogener Destillation wurde ein aliquoter Teil der Flüssigkeit abfiltriert, zu jedem Filtrate 20 *g* Kohle zugesetzt, wieder 5 Stunden unter Rückfluß gekocht und neuerlich mit Magnesia destilliert.

Die nunmehr neuerlich abgespaltene NH_3-N-Menge betrug, auf die Gesamtmenge des Alanins umgerechnet, 10·3%, 14·9% und 12·3% des Gesamt-N.

4. Einfluß der Sauerstoffdurchleitung.

Daß hier hydrolytische Vorgänge sich vollziehen, geht aus den vorerwähnten, unter Luftabschluß durchgeführten Versuchen von Baur und Wunderly hervor, wo sich ein Gleichgewicht vom Typus $CH_2(NH_2)COOH + H_2O = CH_2(OH) . . COO' + NH_4$ eingestellt hatte.

Anderseits gestatten die Versuche Warburgs, der ja den O_2-Verbrauch direkt gemessen hat, nicht den mindesten Zweifel darüber, daß bei seiner Versuchsanordnung sich oxydative Vorgänge abspielen.

Wir müssen also bei unseren Versuchen eine Überlagerung hydrolytischer durch oxydative Vorgänge annehmen.

Da sich aber unsere Versuche immerhin (lang dauerndes Kochen unter Kühlung mit aufgesetztem, langem Rückflußkühler), insofern ja die Luft allmählich durch die Wasserdämpfe größtenteils verdrängt sein mußte, in einem sauerstoffarmen Medium abspielten, erwarteten wir eine Erhöhung der NH_3-Abspaltung bei Durchleitung eines lebhaften Sauerstoffstromes. Wir stellten daher Parallelversuche in der Weise an, daß wir aus einer Bombe einen O_2-Strom (mittels eines doppelt durchbohrten Stopfens mit bis zum Boden des Kolbens reichendem Einleitungsrohr) durch den Zersetzungskolben durchleiteten.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Die Sauerstoffdurchleitung hatte aber tatsächlich nicht den erwarteten Effekt:

Alanin 0·5 + 10 Carbo + 150 cm^3 $n/10$ H_2SO_4, keine O_2-Durchleitung, 5 St., NH_3-N-Absp. 28·5 % des Gesamt-N

Alanin 0·5 + 10 Carbo + 150 cm^3 H_2O, O_2-Durchleitung, NH_3-N-Absp. 25·9 % des Gesamt-N

Alanin 0·5 + 10 Carbo + 150 cm^3 $n/10$ H_2SO_4, O_2-Durchleitung, NH_3-N-Absp. 29·1 % des Gesamt-N

Leuzin 0·5 + 10 Carbo + 150 cm^3 $n/10$ H_2SO_4, keine O_2-Durchleitung, NH_3-N-Absp. 81·4 % des Gesamt-N

Leuzin 0·5 + 10 Carbo + 150 cm^3 $n/10$ H_2SO_4, O_2-Durchleitung, NH_3-N-Absp. 43·0 % des Gesamt-N

Leuzin 0·5 + 10 Carbo + 150 cm^3 $n/10$ H_2SO_4, O_2-Durchleitung, NH_3-N-Absp. 48·2 % des Gesamt-N.

Wir werden uns vorstellen müssen, daß nur die geringen an den Kohlenoberflächen adsorbierten Sauerstoffmengen zur Wirkung gelangen, nicht aber der überschüssige molekulare O_2.

Weitere Versuche haben auch dargetan, daß der zerstörende Einfluß von Wasserstoffsuperoxyd auf Alanin in der Siedehitze durch die Gegenwart „aktiver" Kohle nicht nur nicht gefördert, sondern eher gehemmt werde:

Alanin 0·5 g + H_2O 100 + Carbo 0 g + H_2O_2 3 % 10 cm^3, 5 St. koch., NH_3-N-Absp. 46 % des Gesamt-N

Alanin 0·5 g + H_2O 100 + Carbo 10 g + H_2O 10 cm^3, 5 St. koch., NH_3-N-Absp. 47 % des Gesamt-N

Alanin 0·5 g + H_2O 100 + Carbo 10 g + H_2O_2 3 % 10 cm^3, 5 St. koch., NH_3-N-Absp. 39 % des Gesamt-N

Alanin 0·5 g + H_2O 100 + Carbo 0 g + H_2O_2 3 % 30 cm^3, 5 St. koch., NH_3-N-Absp. 64 % des Gesamt-N

Alanin 0·5 g + H_2O 100 + Carbo 10 g + H_2O_2 3 % 30 cm^3, 5 St. koch., NH_3-N-Absp. 38 % des Gesamt-N.

5. Einfluß metallischer Katalysatoren.

500 g reine Saccharose (gefällt, zur kalorimetrischen Bestimmung Kahlbaum) wurden mit 5 g Harnstoff verrieben, dann in einer Porzellanschale bei kleiner Flamme geröstet, nach erfolgter Verkohlung anhaltend stärker geglüht, fein pulverisiert: „Zuckerkohle". Ausbeute ca. 10%.

Je 15 cm^3 dieser Kohle wurden mit 20 cm^3 1%iger Metallsalzlösung, u. zw. a) $CuCl_2$, b) $FeSO_4$, c) $MnSO_4$, d) $VdCl_2$ befeuchtet, dann bei Rotglut erhitzt. Der Adsorptionstiter von je 0·1 g dieser Kohlen betrug

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

für die Zuckerkohle	1·0 cm^3	$n/10$ Jod
Kupferzuckerkohle	2·2 cm^3	$n/10$ Jod
Eisenzuckerkohle	2·2 cm^3	$n/10$ Jod
Manganzuckerkohle	2·2 cm^3	$n/10$ Jod

Vanadiumkohle wurde in den Kreis der Betrachtungen gezogen, weil das Vanadium anscheinend in den Körperflüssigkeiten der Aszidien die Rolle eines metallischen Katalysators spielt.

Parallelversuche (mit je 0·25 g Alanin, 5 g der Kohle, 80 cm^3 Wasser, fünfstündige Kochdauer) ergaben eine NH_3-N-Abspaltung in Prozenten des Gesamt-N:

Zuckerkohle	18·5, 18·9 %
Eisenzuckerkohle	15·3 %
Kupferzuckerkohle	12·2 %
Manganzuckerkohle	12·0 %
Vanadiumzuckerkohle	10·0 %

Keiner der metallischen Katalysatoren vermochte sonach die Wirkung der Zuckerkohle zu verstärken. Nun enthält ja sicherlich auch die Zuckerkohle noch geringe Eisenmengen und wäre die Erscheinung, daß auch reichlicher Eisenzusatz ihre Wirkung nicht zu verstärken vermag, im Sinne Warburgs wohl derart zu deuten, daß die geringen in der Zuckerkohle enthaltenen Eisenmengen ausreichen, um einen optimalen Effekt unter den gegebenen Versuchsbedingungen auszulösen.

6. Verhalten zyklischer Aminosäuren.

Die NH_3-N-Abspaltung aus dem Phenylalanin und Tyrosin erwies sich, ihrem hohen Molekulargewichte entsprechend, als hoch: 66·8 bzw. 71·9%.

Das Histidin (= Imidazolylalanin) gab, verglichen damit, eine viel niedrigere Quote — 18·5% seines Gesamt-N —, offenbar deswegen, weil der N seines Imidazolkernes resistent ist und nur sein Amino-N reagiert. Bezieht man die Ammoniak-Abspaltung nicht auf den Gesamt-N, sondern nur auf den Amino-N, so gelangen wir auch hier zu einer hohen Quote $= 3 \times 18{\cdot}5 =$ 55·5 %.

Vom Prolin (Pyrrolidincarbonsäure) hätte man erwarten können, daß es völlig resistent gegen den Eingriff sei, da es ja nur Ring-N enthält; tatsächlich ist dies aber nicht der Fall, da unter den genannten Versuchsbedingungen aus reinem Prolin (von Hofmann-La Roche) immerhin eine merkliche NH_3-

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Abspaltung (9·0 bzw. 6·7%) zu bemerken war. Man wird vielleicht an eine Ringspaltung denken müssen.

7. Verhalten von Säureamiden.

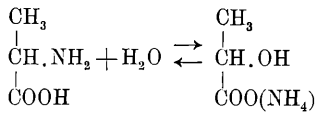
Mit Rücksicht auf die erwähnten Beobachtungen von Wunderly hatten wir eine prompte Ammoniakabspaltung aus Säureamiden durch die Kohle erwartet. Wir waren daher überrascht, sowohl das Azetamid als auch das Benzamid völlig resistent zu finden. Das gleiche gilt für die Säureamidgruppe des Asparagins. Es geht dies aus Parallelversuchen mit Asparaginsäure eindeutig hervor. Während aus dieser unter den gegebenen Bedingungen 41·7% des Gesamt-N als Ammoniak-N abgespalten wurden, kamen beim Asparagin bei zwei gesonderten Versuchen nur 22·5% bzw. 22·2% zum Vorschein, was, auf den Amino-N bezogen, 45·0% bzw. 44·4% entspricht.

8. Verhalten von Proteinen.

Es ergab sich weiterhin die Frage, ob man imstande sei, durch das Kohlenmodell eine Desintegration von Proteinen zu bewirken und die polypepidartigen Bindungen derselben unter Ammoniakabspaltung zu sprengen. Auf Grund unserer Versuche muß diese Frage entschieden verneint werden. 0·5 *g* Leim (Gelatina purissima pulverisata) bzw. Wittepepton wurden in 160 cm^3 Wasser gelöst und mit 10 *g* Carbo medicinalis Merck 5 Stunden unter Rückfluß gekocht. Sodann Destillation mit Magnesia. Aus Leim wurde 1·6, bzw. 2·0, aus Wittepepton 4·0% des Gesamt-N als NH_3-N abgespalten. Es läge vielleicht nahe, dafür die freie Aminogruppe des im Eiweißmoleküle enthaltenen Lysins wenigstens teilweise verantwortlich zu machen.

9. Chemismus der Alaninspaltung durch Kohle.

Falls der Spaltungsvorgang durch Kohle zunächst im Sinne des Gleichgewichtes einsetzt, wie es Wunderly bei seinen Versuchen unter Luftabschluß gefunden hat, hätte man immerhin erwarten können, daß im Sinne der Gleichung



$$\begin{array}{l} CH_3 \\ | \\ CH.NH_2 \\ | \\ COOH \end{array} + H_2O \rightleftarrows \begin{array}{l} CH_3 \\ | \\ CH.OH \\ | \\ COO(NH_4) \end{array}$$

beim Alaninabbau greifbare Mengen Milchsäure auftreten. Tatsächlich vermochten wir aber in der Reaktionsflüssigkeit nach dem Milchsäurebestimmungsverfahren von O. Fürth und Charnass (das auf der oxydativen Aldehydabspaltung aus Milch-

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

säure durch Permanganat in schwefelsaurer Lösung beruht) höchstens Spuren von Milchsäure nachzuweisen. Wohl aber gelang es, greifbare Mengen von Azetaldehyd zu fassen.

0·5 *g* Alanin wurden in 300 *cm*³ *n*/10 H_2SO_4 mit 10 *g* Kohle im Milchsäure-Bestimmungsapparate nach Fürth-Charnass unter Zutropfen von Wasser 5 Stunden lang destilliert. In der Vorlage befanden sich 200 *cm*³ annähernd $^1/_5$ normaler Kaliumbisulfitlösung („meta" Kahlbaum) von genau bekanntem Jodtiter. Der Jodverbrauch entsprach 5·8 *cm*³ *n*/10 Jod, entsprechend $5{\cdot}8 \times 0{\cdot}0022 = 0{\cdot}0127\,g$ Aldehyd. Da 0·5 *g* Alanin theoretisch 0·244 *g* Aldehyd liefern könnten, entspricht dies 5·2% der theoretischen Menge. Nun ist aber sicherlich nicht das ganze vorhandene Alanin desaminiert worden, sondern nur ein Bruchteil desselben. Nehmen wir an, die Zersetzung hätte $^1/_3$ desselben betroffen, so würde die gefundene Aldehydmenge immerhin $^1/_6$ davon ausmachen. Ein weiterer Anteil dürfte zu Essigsäure weiter oxydiert werden (vgl. oben die Versuche von Hennrichs).

10. Steckenbleiben der Aminosäurespaltung durch Kohle.

Weder den früheren Beobachtern noch uns ist es gelungen, die Gesamtmenge vorhandener Aminosäure am Kohlenmodell völlig zu zerstören. Stets bleibt die Reaktion in einem gewissen Momente praktisch stecken.

Wir haben uns nun die Frage vorgelegt, worauf dieses Steckenbleiben der Reaktion denn zurückzuführen sei. Insbesondere mußte man an die Möglichkeit denken, daß vielleicht der Rest der Aminosäure nicht mehr in der ursprünglichen Form vorhanden sei, vielmehr in irgendein sekundäres widerstandsfähigeres Umwandlungsprodukt (z. B. durch einen Ringschluß) übergegangen sei.

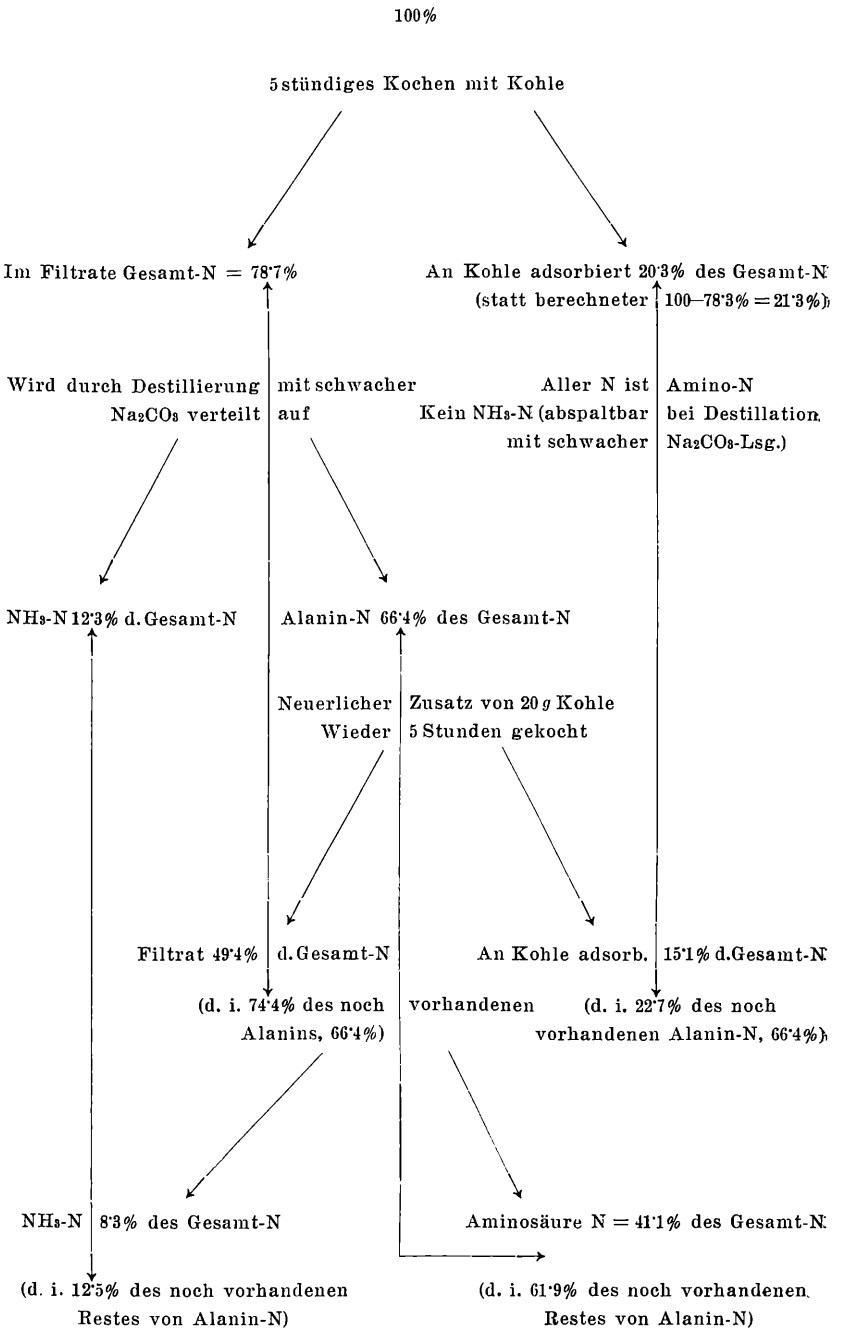
Um darüber ins klare zu kommen, wurden N-Bilanzversuche in der Weise durchgeführt, daß der Gesamt-N des ursprünglich vorhandenen Alanins verteilt wurde: auf in der Reaktionsflüssigkeit noch vorhandene Aminosäure, auf Ammoniak-N in der Flüssigkeit und auf N, der von der Kohle[10] adsorbiert worden war. Dabei stellte es sich heraus, daß der N der letzteren Art als N adsorbierter Aminosäure anzusehen sei und daß eine Adsorption von neu entstandenem Ammonium-N nicht in Betracht komme. In der II. Phase des Versuches wurde dann neue Kohle hinzugefügt und der in der Flüssigkeit verbliebene Alaninrest durch mehrstündiges Kochen wiederum ihrer Wirkung ausgesetzt. Sodann wurde der N wieder auf Aminosäure-N, Ammoniak-N und adsorbierten N aufgeteilt. Das folgende Schema stellt die Versuchsresultate in übersichtlicher Form dar:

---

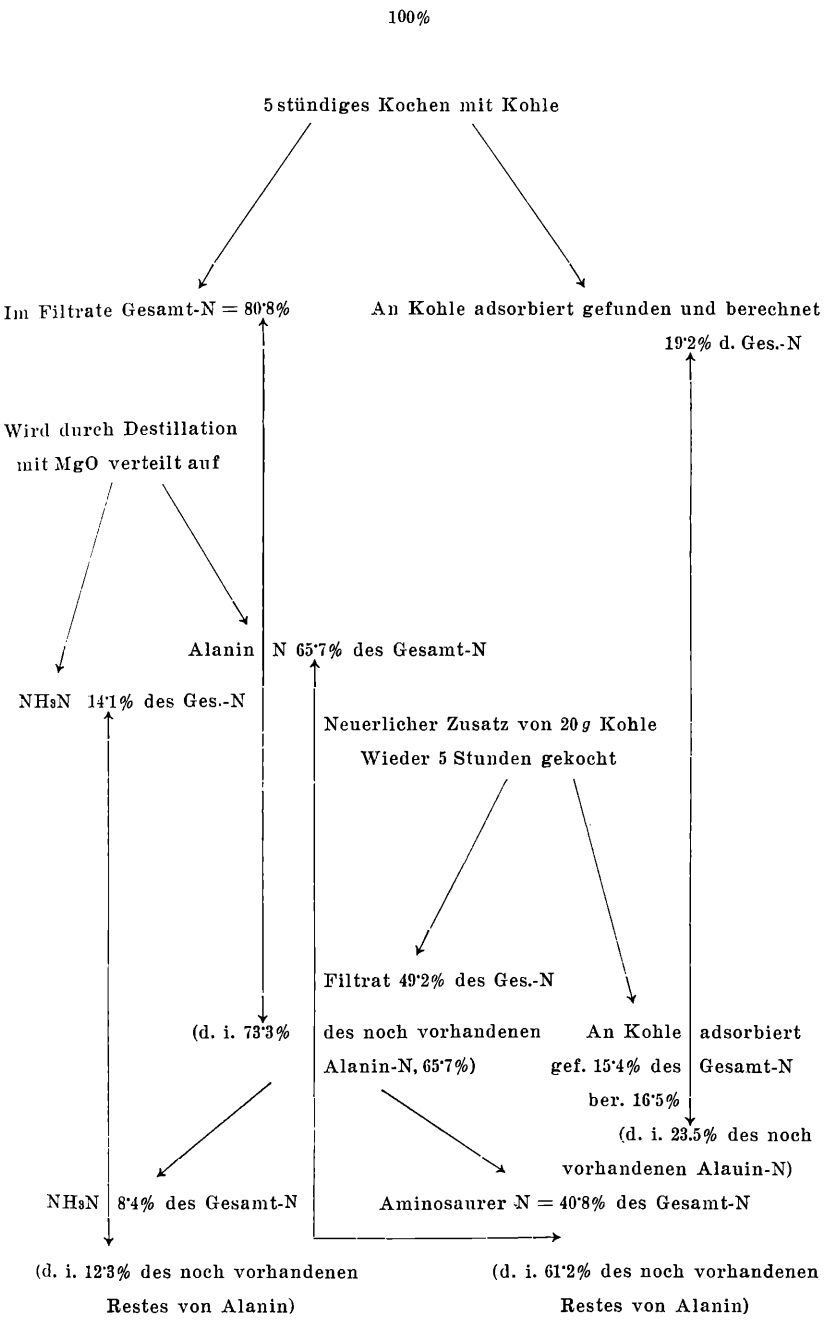
[10] Dabei mußte der in der Tierkohle von vornherein enthaltene Stickstoff in Rechnung gezogen werden. Derselbe wurde mit 0·2343% und 0·2344% ermittelt.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

A. Gesamt-N des Alanins.



B. Gesamt-N des Alanins.



©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Der Versuch wurde so angesetzt, daß 2 *g* Alanin mit 40 *g* Carbo animalis Merck, 400 *cm*³ Wasser 5 Stunden lang unter Rückfluß gekocht wurden. Sodann wurde die Kohle auf einem gehärteten Nutschfilter gesammelt, gewaschen und in bezug auf ihren Stickstoffgehalt analysiert.

Wir haben also hier 2 Bilanzversuche, von denen jeder in zwei Phasen zerfällt. In jeder Phase wurde der jeweilig vorhandene Alanin-N aufgeteilt: 1. in NH_3—N, 2. in der Flüssigkeit verbliebenen Alanin-N, 3. an Kohle adsorbierten Alanin-N. Diese 3 Werte sollten sich theoretisch auf 100% ergänzen. Gefunden wurde:

	Versuch A		Versuch B	
	Phase I	Phase II	Phase I	Phase II
NH_3-N	12·3%	12·5%	14·1%	12·3%
In der Flüssigkeit verbliebener Alanin-N .	66·4%	61·9%	65·7%	61·2%
Von der Kohle adsorbierter Alanin-N	20·3%	22·7%	19·2%	23 5%
	99·0%	97·1%	99·0%	97·0%

Die Übereinstimmung dieser Versuche muß als eine befriedigende bezeichnet und die eingangs gestellte Frage dahin beantwortet werden, daß das Steckenbleiben des oxydativen Alaninabbaues durch die Kohle keinesfalls durch den Übergang derselben in ein schwer angreifbares Umwandlungsprodukt bedingt ist, vielmehr dadurch, daß ein Teil der Aminosäure von der Kohle adsorbiert wird. Dadurch wird dieser Anteil des Alanins der Einwirkung entzogen, die Kohle aber selbst inaktiviert (offenbar infolge Bedeckung ihrer aktiven Oberfläche). Fügt man neue Kohle hinzu, so schreitet die Reaktion wieder ganz gleichmäßig weiter.

III. Katalytische Oxydation einiger stickstofffreier Substanzen.

1. Phenole.

a) Brenzkatechin. Diese Substanz läßt sich ganz analog wie Adrenalin mit Hilfe ihrer Farbenreaktion mit Eisenchlorid sehr wohl kolorimetrisch bestimmen, u. zw. unter Anwendung einer von F. Lieben[11] angegebenen Modifikation dieser Reaktion. Dabei wurden 2 *cm*³ einer 0·10%igen oder 0·05%igen Brenzkatechinlösung mit 15 *cm*³ einer 10%igen Natriumkarbonat- oder Natriumazetatlösung, sodann tropfenweise mit 1%iger Eisenchloridlösung versetzt, bis die auftretende Rotfärbung maximal geworden war. Die Fehler der kolorimetrischen Bestimmungen schwankten um 3% herum.

[11] F. Lieben, Biochem Ztschr. *184*, 1927, S. 464.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Wurden nun 100 cm^3 ½%iger Brenzkatechinlösung mit 10 g aktiver Kohle 5 Stunden lang unter Rückfluß gekocht, so wurde der Farbstoff vollkommen zerstört. Eine melaninartige Substanz konnte hinterher der Kohle durch Alkali nicht entzogen werden.

b) Phenol. Zur Auswertung unserer Phenollösungen bedienten wir uns des titrimetrischen Verfahrens nach Koppeschaar-Seubert[12]. Dasselbe beruht darauf, daß die Phenollösung mit Kaliumbromat und Kaliumbromid versetzt und mit Salzsäure angesäuert wird. Das in Freiheit gesetzte Brom bindet das vorhandene Phenol als Tribromphenol. Aus zugesetztem Kaliumjodid wird Jod entsprechend dem Bromüberschusse in Freiheit gesetzt und titrimetrisch ausgewertet. Drei Probebestimmungen mit 0·5 g Phenol in ½%iger Lösung ergaben 98, 98, 99% der theoretischen Menge.

100 g ½%ige Phenollösung wurden mit 10 g aktiver Kohle 2 Stunden unter Rückflußkühlung gekocht und abgenutscht: Im Filtrate war die Millonsche Reaktion nunmehr negativ. Die Kohle auf dem Filter wurde sodann mit 200 cm^3 Alkohol ausgekocht. Der Alkohol nahm aus der Kohle reichlich Phenol auf, das nach Abdunsten des Alkohols titrimetrisch bestimmt wurde. Weitere Auskochungen ergaben nur mehr Spuren von Phenol. Es ergab sich schließlich ein Manko von 51·5% der ursprünglich vorhandenen Phenolmenge.

2 weitere Parallelversuche ergaben ein Phenoldefizit von 47·2 und 49·1%. Sonach war etwa die Hälfte des Phenols der katalytisch-oxydativen Zersetzung anheimgefallen. Melaninbildung konnte auch hier nicht nachgewiesen werden. Die Kohle wurde mit verdünnter Natronlauge ausgekocht; im Filtrate keine Melaninfällung beim Ansäuern.

2. Glukose.

Bereits Warburg hatte festgestellt, daß, wenn er Glukoselösungen im Thermostaten bei 40° kurze Zeit mit aktiver Kohle schüttelte, kein Sauerstoffverbrauch gasometrisch nachweisbar war. Auch Meyerhof und Weber[13] vermochten bei einem ähnlichen Vorgange Kohlehydrate nicht zu oxydieren. Dagegen beobachteten A. Meyer und Wurmser[14] eine merkliche CO_2-Entwicklung und einen O_2-Verbrauch, wenn sie 2 g Kohle und 50 cm^3 $n/100$ Glukoselösung 100 Stunden lang bei 39° mit Luft schüttelten. Bolcato[15] ließ kleine sterile Gefäße mit je 10 cm^3 2—3%iger Glukoselösung und 0·3 g Tierkohle 75—100 Stunden bei 40° ohne Schütteln stehen und sah kleine Mengen Milchsäure auftreten. Endlich beobachtete Vasatka[16] das Verhalten von Saccharose gegenüber Adsorptionskohle. Die Zerstörung war bei 20° praktisch Null, wurde aber bei höherer Temperatur und anhaltendem Schütteln merklich.

---

[12] Vgl. Vortmann, Anl. z. chem. Analyse, F. Deuticke 1891, S. 137.

[13] O. Meyerhof und H. Weber, Biochem. Ztschr. *135*, 1923, S. 558.

[14] A. Meyer et R. Wurmser, Ann. de physiol. et de Physicochemie biol. 2, 1926, S. 329.

[15] V. Bolcato (Parma), Boll. Biol. Speriment. 2, 1923, S. 884.

[16] J. Vasatka, Zeitschr. Zuckerindustrie der Czechoslowak. Republik, *52*, 1927, S. 129; Chem. Centr. I, 1928, S. 1108.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Wir vermochten auch bei andauerndem Kochen mit aktiver Kohle keinerlei Zuckerzerstörung zu beobachten. Wir bedienten uns der Bertrandschen Zuckerbestimmungsmethode, die uns mit Traubenzucker („pro analysi Merck") in 3 Versuchen Ausbeuten von 98, 99 und 100% lieferte.

Die Adsorption des Zuckers an die Kohle war eine hochgradige. Aus 100 cm^3 1%iger Glukoselösung verschwanden zunächst nach 3- bzw. 5stündigem Kochen mit 5—20 g Kohle 84, 76, 89, 78%, nach 6stündigem Schütteln im Thermostaten bei 40° 81%. Die Gesamtmenge der vermißten Glukose fand sich aber in der Kohle und konnte derselben durch häufiges Auskochen (je 1½—2 Stunden) mit Wasser wieder entzogen werden.

Es fanden sich so nach einer Kochdauer der kohlenhaltigen Lösung:

	3 Stunden	5 Stunden	24 Stunden
	%	%	%
Im Kohlenfiltrate	14·0	30·0	40·1
In der 1. Auskochung	35·0	37·0	48·8
2.	22·5	19·0	11·4
3.	12·5	9·5	2·0
4.	6·8	5·5	Spuren
5.	3·3	3·0	—
6.	3·0	1·3	—
7.	Spuren	Spuren	—
	97·1 %	105·3 %	102·3 %

Wir sehen uns also der Erscheinung gegenüber, daß bei kurz dauerndem Kochen mit Kohle mehr Zucker von der Kohle adsorbiert wird als bei lang andauerndem Kochen. Offenbar wird der erst adsorbierte Zucker später wieder abgegeben. Ob das geringe Zuckerplus, das in zwei der Versuche errechnet worden ist, auf das Auftreten geringer Mengen stärker reduzierender Umwandlungsprodukte oder aber auf Versuchsfehler zu beziehen sei, mag dahingestellt bleiben.

3. Dioxyazeton.

Es schien uns von Interesse, eine Triose, das Dioxyazeton, das vielfach als ein Produkt des intermediären Zuckerstoffwechsels angesehen wird, in den Kreis unserer Untersuchungen einzubeziehen. Wir verwendeten dasselbe in Gestalt des Handelspräparates „Oxanthin" der Höchster Farbwerke.

Es liegt eine Angabe von Boysen-Jensen[17] vor, derzufolge reines, kristallisiertes Dioxyazeton ebensowenig von Hefe wie von Tierkohle „vergoren" wird.

[17] Boysen-Jensen, Ber. d. botanischen Gesellsch. *26A*, S. 666.

Die Angaben über das Reduktionsvermögen des Dioxyazetons sind sehr spärlich und lauten widersprechend[18].

Wir mußten also das Reduktionsvermögen unseres Präparates nach Bertrand erst empirisch ermitteln.

Oxanthin	Reduziertes Kupfer		
mg	*mg*	*mg*	
10	9	10	Also entspricht je einem Teile Oxanthin annähernd die Reduktion von einem Teil Kupfer.
20	19	19	
30	28	31	
40	38	38	
50	48	49	
60	56	58	
70	67	67	
80	77	76	
90	86	89	
100	96	96	

100 cm^3 1%ige Oxanthinlösung wurden mit 10 *g* Kohle 4 Stunden lang unter Rückfluß gekocht. Dann wurde abgenutscht und das Filter wiederholt ausgekocht. Es fanden sich:

	A	B
Im 1. Filtrate	41·5%	63·5%
In der 1. Auskochung	25·5	24·0
2.	7·6	8·5
3.	7·2	7·6
4.	3·0	3·5
5.	Spuren	Spuren
	84·8%	87·1%
Verlust	15·2	12·9
	100·0%	100·0%

Es konnte sonach eine immerhin außerhalb der Fehlergrenzen gelegene Zerstörung von Dioxyazeton durch die aktivierte Kohle bei Siedehitze festgestellt werden.

4. Milchsäure.

O. Meyerhof und H. Weber[19] vermochten keine Oxydation von Milchsäure am Kohlenmodell festzustellen. Ebensowenig war dies in den Versuchen von H. Wielandt und Wingler[20] bei der Brenztraubensäure der Fall. Dagegen sahen André Meyer und Wurmser[21] eine merkliche CO_2-Entwicklung und einen Sauerstoff-

[18] Piloty (Ber. D. ch. G. *30*, 1899, S. 3167) fand bei zwei Analysen, daß gleiche Mengen Glukose und Dioxyazeton unter gleichen Umständen annähernd gleich stark reduzieren. Campbell (Journ. of biol. Chem. *67*, S. 59) ermittelte das Reduktionsvermögen des Dioxyazetons nach Folin-Wu und fand dasselbe bei 6 Minuten Kochdauer höchstens 79% derjenigen der Glukose.

[19] l. c.

[20] H. Wielandt und A. Wingler, Liebigs Ann. *436*, 1924, S. 229.

[21] l. c.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

verbrauch, wenn sie die Versuche auf 100 Stunden bei 39° ausgedehnt hatten.

Unsere Milchsäurebestimmungen wurden nach der Methode von Fürth-Charnass durchgeführt. Zwei Probebestimmungen mit 0·3 Lithiumlaktat (Kahlbaum) ergaben Ausbeuten von 92·0 bzw. 97·5%.

Die Versuche wurden so ausgeführt, daß je 100 cm^3 einer ½% igen Lithiumlaktatlösung 3—4 Stunden lang mit 10 g Kohle unter Rückfluß gekocht wurden; dann wurde abgenutscht und mit wenig Wasser nachgewaschen.

Es fanden sich in 3 Versuchen:

Direkt im Filtrate	62·4%	44·7%	61·3%
Durch Auskochen der Kohle	3·7	4·5	2·1
	66·1%	49·2%	63·4%
Verlust	33·9	50·8	36·6
	100·0%	100·0%	100·0%

Es war also zweifellos ein erheblicher Teil der Milchsäure bei unserem Vorgange einer katalytisch-oxydativen Zersetzung anheimgefallen.

5. β-Oxybuttersäure.

Schließlich wandten wir unsere Aufmerksamkeit der β-Oxybuttersäure als dem wichtigsten intermediären Produkte des Fettstoffwechsels zu.

Die Bestimmung derselben erfolgte nach der Methode von Van Slyke[22], wobei die Säure durch Kaliumbichromat zu Azeton oxydiert, dieses abdestilliert, mit Mercurisulfat gefällt und der Quecksilberniederschlag gewogen wird.

2 Probebestimmungen mit einem β-Oxybuttersäure-Präparate von E. de Haen ergaben Ausbeuten von 96·1 und 95·1%.

Wir stellten nun Versuche in der Art an, daß 100 cm^3 einer 0·472% igen β-Oxybutterlösung mit 10 g Kohle 3- bzw. 2 bzw. 1 Stunde unter Rückflußkühlung gekocht werden. Weitaus der größte Teil der Säure wurde zerstört und nur geringe Mengen konnten aus der Kohle zurückgewonnen werden. — Im ganzen:

Nach 3 Stunden kochen	95·8%
2 „	94·1, 99·2%
1 Stunde	98·2%.

Wir müssen also eine geradezu überraschende Labilität der Säure feststellen.

[22] Van Slyke, Journ. of biol. Chem. *12*, 1917, S 455.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Wir versuchten nun, etwas über die bei der Zerstörung der β-Oxybuttersäure auftretenden Abbauprodukte zu erfahren.

Indem wir die Zerstörung der β-Oxybuttersäure in einem Milchsäuredestillationsapparate vornahmen, vermochten wir festzustellen, daß dabei kein Azetaldehyd auftritt.

Ebenso vermochten wir durch Anwendung einer Vorlage, wie sie bei der Azetonbestimmung nach Messinger üblich ist, zu zeigen, daß kein Azeton als Zersetzungsprodukt in Erscheinung tritt. Ebensowenig fand sich Oxalsäure.

Dagegen konnte die Entstehung einer mit Wasserdampf flüchtigen Säure festgestellt werden. Dieselbe wurde durch etwa vierstündige Wasserdampfdestillation übergetrieben, gegen Phenolphthalein als Indikator mit $n/10$ NaOH neutralisiert, sodann auf ein geringes Volumen eingeengt und mit $AgNO_3$ gefällt. Das ausfallende Silbersalz, anscheinend essigsaures Silber, wurde auf einem Goochtiegel gewogen. Unter der vorläufigen Annahme, daß es sich tatsächlich um Essigsäure handle und daß 1 Molekül derselben aus einem Molekül β-Oxybuttersäure entstehe, hatte die gefundene Menge Essigsäure etwa 30% der theoretischen Ausbeute betragen.

Bei weiteren Versuchen ähnlicher Art ergaben sich auf titrimetrischem Wege Ausbeuten von 15, 12 und 20% einer als Essigsäure berechneten, mit Wasserdampf flüchtigen Säure.

Da es sich aber tatsächlich um Essigsäure gehandelt haben dürfte, ergab sich folgendermaßen: Das Silbersalz wurde auf dem Goochtiegel gewogen, der Niederschlag im Ammoniak gelöst. Spuren metallischen Silbers auf dem Filter wurden mit Salpetersäure in Lösung gebracht. Es fanden sich so:

0·191 *g* Ag statt für essigsaures Silber berechnet	0·185 *g* Ag und
0·331 *g* Ag	0·321 *g* Ag.

6. Azeton.

Es wurden 100 cm^3 einer 1·45%igen Azetonlösung und 10 *g* Kohle 4 Stunden unter Rückfluß gekocht. Um Verluste an Azeton durch den Kühler hindurch zu vermeiden, wurden 2 lange Kühler hintereinander geschaltet und am Ende noch eine Vorlage eingeschaltet, wie sie bei der Azetonbestimmung nach Messinger üblich ist.

Es fanden sich so:

	Versuch I	Versuch II
Im Filtrate . . .	0·1268 *g* Azeton	0·1243
In der 1. Kohlenauskochung	0·2779 *g*	0·1114
2.	0·0343 *g*	0·0654
3.	Spuren	0·0211
4. „	—	Spuren
Messinger-Vorlage	0·0610 *g*	Spuren
	0·5000	0·3222
Es fehlen	64·2% des Azetons	77·8%

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Die Beobachtung, daß sowohl die β-Oxybuttersäure als auch (unerwarteterweise) das Azeton leicht einem oxydativen Abbau am Kohlenmodell unterliegen, scheint uns für die Frage des Fettabbaues im intermediären Stoffwechsel von besonderem Interesse zu sein. Die genauere Feststellung, wie dieser Abbau erfolgt, soll Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Zusammenfassung.

1. Im Anschluß an die Kohlenmodellversuche von Warburg, Meyerhof, Baur und Wunderly, Rideal und W. Mary Smith wurde eine Reihe physiologischer Substanzen in wässeriger Lösung der Einwirkung aktiver Kohle bei Siedehitze unterworfen.

2. Bei Aminosäuren konnten bis 70% ihres Stickstoffes als Ammonium-N abgespalten werden, wobei (Warburgs Anschauungen entsprechend) hochmolekulare Aminosäuren, wie Leuzin, Tyrosin, Phenylalanin, schneller angegriffen werden als solche mit niederem Molekulargewicht (wie Alanin).

3. Die Säureamidgruppe (z. B. des Azetamids, Benzamids, Asparagins) wurde im Gegensatz zur Aminogruppe von aktiver Kohle auch bei Siedehitze in keiner Weise angegriffen; es erfolgte also in diesem Falle keinerlei Hydrolyse.

4. Das gleiche gilt für die glyzylglyzinartigen Bindungen von Proteinen (Glutin, Wittepepton).

5. Der Stickstoff der Ringsysteme des Prolins und Histidins wurde nur sehr langsam angegriffen.

6. Wir fanden Zuckerkohle kaum weniger wirksam als eisenreiche Tierkohle. Von Warburgs Gesichtspunkte aus wäre dies wohl so zu deuten, daß die Eisenspuren, die auch in der Zuckerkohle enthalten sind, genügen, um einen optimalen katalytischen Effekt auszulösen. Durch Anreicherung der Zuckerkohle mit Kupfer, Mangan oder Vanadium wurde ihre Wirksamkeit vermindert.

7. Wir waren niemals imstande, die Gesamtheit einer Aminosäure völlig zu desaminieren. Stets blieb die Reaktion stecken. Sorgfältige Versuche über stufenweisen Abbau des Alanins haben dargetan, daß das Steckenbleiben der Reaktion nicht etwa durch den Übergang eines Teiles der Aminosäure in ein schwer angreifbares Umwandlungsprodukt bedingt ist, vielmehr dadurch, daß ein Teil der Aminosäure von der Kohle adsorbiert und der weiteren Einwirkung entzogen, die Kohle selbst aber (offenbar infolge Bedeckung eines Teiles ihrer aktiven Oberfläche) inaktiviert wird.

8. Phenole (Phenol, Benzkatechin) werden von der aktiven Kohle sehr schnell zerstört.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

9. Glukose wurde nicht angegriffen, wohl aber war eine zerstörende Wirkung gegenüber Dioxyazeton und in noch höherem Grade gegenüber der Milchsäure nachgewiesen.

10. Überraschend ist die Schnelligkeit, mit der ein Abbauprodukt der resistenten hohen Fettsäuren, die β-Oxybuttersäure, angegriffen wurde. Auch das Azeton, das als ein Endprodukt des Stoffwechsels gilt, erwies sich als angreifbar.

11. Dasjenige, was nun den vorliegenden Versuchen ein allgemeineres physiologisches Interesse verleihen dürfte, scheint uns der Umstand zu sein, daß sie den Kreis der biologischen Anwendbarkeit des Warburgschen Modells wesentlich erweitern. Man wußte bisher, daß Häminkohle zwar Aminosäuren zu oxydieren vermag, daß sie aber weder Zucker noch aber hohe Fettsäuren angreift. Warburg hat sich nun so geholfen, daß er meinte, diese Stoffe würden nicht als solche, vielmehr erst durch Spaltungen und Kondensationen umgeformt, Angriffspunkte die Eisenkatalyse. Diese Vermutung findet nun durch unsere Versuche eine wesentliche experimentelle Stütze, insofern wir für zwei dem Zucker nahestehende Substanzen, das Dioxyazeton und die Milchsäure, ebenso wie für die vom Abbau hoher Fettsäuren herstammende β-Oxybuttersäure und das Azeton ihre Angreifbarkeit im Kohlenmodellversuche darzutun vermochten.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Sitzungsberichte der Akademie der Wissenschaften mathematisch-naturwissenschaftliche Klasse

Jahr/Year: 1929

Band/Volume: 138_2b_Supp

Autor(en)/Author(s): Fürth Otto, Kaunitz Hans

Artikel/Article: Zur Kenntnis der Oxydation einiger physiologischer Substanzen durch Tierkohle. 127-145