

fugiert. Das Überstehende, das vorsichtig mit einer Pipette entnommen wurde, wurde zum Einbau verwendet und entspricht dann ebenfalls etwa 20 mg Trockeneiweiß/0,5 ccm.

Da durch die Dialyse eine Verdünnung eintritt, mußte zu den Dialysateinbauversuchen etwas mehr Eiweißlösung verwendet werden. Durch den nach der Trichloressigsäurefällung folgenden Auswaschvorgang erhielten wir bisweilen weniger als 10 mg Trockeneiweiß zur Impulsmessung. In diesem Falle wurde unter Verwendung einer Selbstabsorptions-Eichkurve auf 10 mg umgerechnet.

Die Dialysen wurden ohne Pufferzusatz bei 0° C gegen öfter ausgewechseltes destilliertes Wasser ausgeführt.

Frau Elisabeth Schneider möchten wir für ihre gewissenhafte Mithilfe bei der Durchführung der gesamten Versuche danken.

Zusammenfassung

Es wird die Existenz eines Einbauhemmsystems in Mitochondrien und Mikrosomen aus Rinderleber nachgewiesen, das den Einbau von Aminen in Proteine fast vollständig zu hemmen vermag. Ob dieser Hemmfaktor ein dialysables Co-Ferment benötigt, läßt sich noch nicht sicher entscheiden. Die Versuche deuten aber darauf hin, daß evtl. ein zweiter Hemmfaktor mit dialysablem Co-Ferment im Plasma vorhanden ist.

Der Einbau von Aminen scheint grundsätzlich und überraschend leicht in nicht denaturierte Proteine erfolgen zu können. Die Hemmfaktoren lassen diesen offenbar physiologisch nicht erwünschten Vorgang in vivo nur schwer oder überhaupt nicht ablaufen. Am besten geschützt erscheint in der Rinderleber das Cytoplasma, dann folgen die Mitochondrien und die Mikrosomen, während der Zellkern keinen Schutz zu besitzen scheint. Dies wird zur Diskussion gestellt ohne auf die sich hieraus ergebenden Folgerungen, die sich auch auf das Krebsproblem erstrecken, einzugehen.

Über das Verhalten von *d*-Glucosamin in wäßrigen Lösungen

Von

Kurt Heyns, Christa-Maria Koch und Wolfgang Koch

Aus dem Chemischen Institut der Universität Hamburg

(Der Schriftleitung zugegangen am 28. August 1953)

Obwohl das *d*-Glucosamin als Bestandteil zahlreicher Bau- und Gerüstsubstanzen und in funktioneller Hinsicht eine wichtige Rolle spielt, sind die Kenntnisse über sein Verhalten sowie über seine biologische Bildung bis heute nur gering.

Im Anschluß an die Arbeiten früherer Autoren^{1, 2} befaßten wir uns mit der enzymatischen Oxydation von Glucosamin³. Dabei zeigten

¹ B. Kisch, Biochem. Z. 267, 32 [1933].

² C. Lutwak-Mann, Biochem. J. 35, 610—626 [1941].

³ G. Ledderhose, diese Z. 2, 213 [1878]; Ber. dtsh. chem. Ges. 9, 1200 [1876]; G. Blix, in F. Hoppe-Seyler u. H. Thierfelder, Handbuch d. physiol. u. pathol. chem. Analyse 10. Aufl., im Druck; K. Heyns, ebenda; R. Kuhn, Angew. Chem. 64, 493 [1952].

Messungen an der Warburg-Apparatur, daß wäßrige Lösungen von Glucosamin im neutralen und alkalischen p_H -Bereich auch ohne Enzymzusatz Sauerstoff aufnehmen. Nähere Untersuchungen über diese Beobachtung führten zu folgenden Ergebnissen:

a) Wäßrige Lösungen von Glucosamin sind im neutralen und alkalischen Bereich autoxydabel. Die Geschwindigkeit der Sauerstoffaufnahme steigt mit zunehmendem p_H (Tab. 1). Wäßrige Lösungen von Glucosamin-Hydrochlorid sind dagegen weitgehend beständig (s. unten); das gleiche gilt von *N*-Acetylglucosamin.

b) Der Effekt wird durch Anwesenheit von Phosphat-Ionen wesentlich gesteigert und tritt überraschenderweise dann auch bereits im schwach sauren Bereich auf. Die Sauerstoffaufnahme wird durch wachsende Phosphatkonzentration beschleunigt (Tab. 1 u. 2).

Tab. 1. Abhängigkeit der Sauerstoff-Aufnahme von 2,5 ccm 0,25-*m*. Glucosamin-Hydrochlorid bei 38°C vom p_H a) ohne, b) in Gegenwart von *m*-Phosphat.

		p_H	4,2	5,4	6,0	6,8	7,2	7,3	9,4
Sauerstoff- Aufnahme	a)	30 Min.	0	0	0	5	16	—	63
		60 Min.	0	0	0	18	28	—	123
in μ l	b)	30 Min.	0	54	92	155	—	156	—
		60 Min.	0	94	—	—	—	—	—

Tab. 2. Abhängigkeit der Sauerstoff-Aufnahme von der Phosphatkonzentration. 2,5 ccm 0,25-*m* Glucosamin-Hydrochlorid, p_H 6,8, Temp. 38°C.

Phosphatkonzentration	0	<i>m</i> /15	<i>m</i> /10	<i>m</i> /4	<i>m</i> /2	<i>m</i>
O ₂ -Aufnahme	30 Min.	5	36	45	82	107
in μ l	60 Min.	18	80	85	162	—

c) Der Effekt wird durch Methylenblau erhöht (Tab. 3). Stark phosphathaltige Glucosaminlösungen vermögen Methylenblau innerhalb kurzer Zeit zu entfärben. Durch Erwärmen der Lösungen wird die Entfärbung beschleunigt.

Tab. 3. Einfluß von Methylenblau auf die Sauerstoff-Aufnahme. 2,50 ccm 0,25-*m*. Glucosamin-Hydrochlorid, p_H 6,8, 0,005% Methylenblau, Temp. 38°C.

Phosphatkonzentration	0		<i>m</i> /4			
	ohne	mit	ohne	mit		
		Methylenblau		Methylenblau		
O ₂ -Aufnahme	30 Min.	5	26	10 Min.	25	120
in μ l	60 Min.	18	39	30 Min.	82	—

e) Unter den verwendeten Bedingungen erwies sich Glucose gegen Luftsauerstoff als völlig indifferent, im Gegensatz zu Fructose, die schon Warburg und Yabusoe in Gegenwart von Phosphat bei neutralem p_H als autoxydabel erkannten⁴.

⁴ O. Warburg u. M. Yabusoe, Biochem. Z. 146, 380 [1924].

Da wir bei diesen Versuchen beobachteten, daß wäßrige Glucosamin-Lösungen sich beim Stehenlassen gelb bis braun färben und daß sich ihr p_H -Wert rasch in den sauren Bereich verschiebt, untersuchten wir das Verhalten des Aminozuckers in wäßriger Lösung. Dabei ergaben sich die Fragen: 1. Ob und in welchem Maße Glucosamin unter den Bedingungen, die üblicherweise für biochemische Untersuchungen gewählt werden, instabil ist; 2. von welchen Faktoren die Unbeständigkeit des Aminozuckers beeinflußt wird; 3. welche Produkte bei seinem Abbau entstehen und 4. wie der Abbau des Glucosamins chemisch zu deuten ist.

0,25-m. wäßrige, mit Chloroform und Toluol versetzte Lösungen von reinem Glucosamin-Hydrochlorid wurden mit 1-n. Natronlauge auf das jeweilige p_H gebracht und in gut verschlossenen Glaskolben bei verschiedenen, jeweils konstant gehaltenen Temperaturen sich selbst überlassen (vgl. l. c. 1, 5, 6). Es wurde meistens ein Anfangs- p_H von 7,4 und eine Brutschrank-Temperatur von 38°C gewählt. — Wir untersuchten stets Lösungen von Glucosamin-Hydrochlorid in dest. Wasser und solche in *m*/15-sec. Natriumphosphat nebeneinander. Bei allen Versuchsreihen bis zu 200 Tagen wurden die Zeitabschnitte von einer Messung bis zur nächsten verdoppelt.

Die Verfärbung beim Aufbewahren der Glucosaminlösungen unter Luftabschluß von farblos über gelb und rotbraun bis dunkelbraun wurde mittels Lichtdurchlässigkeitsmessungen für 7 verschiedene Wellenlängen mit dem Photometer Eppendorf verfolgt, an dem die Werte unmittelbar in Prozent abgelesen werden konnten.

Die Durchlässigkeit der Glucosaminlösungen nimmt allgemein ab mit abnehmender Wellenlänge des Lichtes und für eine einzelne Wellenlänge mit zunehmendem Alter und Anfangs- p_H der Lösungen (s. Tab. 2 u. 4). Die Durchlässigkeit für eine bestimmte Wellenlänge nimmt bei Gegenwart von Phosphat wesentlich schneller ab (vergl. Tab. 4, Vers. 1 u. 2). Für Glucosaminlösungen, die verschiedenen, aber für jede einzelne Lösung konstant gehaltenen Temperaturen ausgesetzt waren, weisen die Lichtdurchlässigkeiten auf eine starke Temperaturabhängigkeit der Farbvertiefung hin, derart, daß diese mit steigender Temperatur der Lösung schneller fortschreitet (vergl. Tab. 4, Vers. 1—3).

Tab. 4. Lichtdurchlässigkeit phosphathaltiger (Vers. 1 u. 3) und wäßriger (Vers. 2 u. 4) Glucosaminlösungen in Abhängigkeit von der Zeit. Wellenlänge 578 μ .

Vers.- Nr.	Temp. °C	Anfangs- p_H	Zeit	nach Stunden				nach Tagen					
				1	3	7	24	2	4	8	16	32	64
1	0	7,4	Durch-	99,4	99,3	99,3	99,0	99,0	98,0	96,2	94,5	93,3	
3	38	7,4	lässig-	99,3	98,0	96,0	43,6	33,1	23,2	7,9	3,0	—	
2	38	7,4	keit	100	98,9	98,1	79,8	44,9	31,2	13,2	5,5	2,5	
				nach Tagen				6	9	30	110	267	
4	38	4,2	in %					100	99,9	98,2	97,6	73,5	

⁵ E. Abderhalden u. A. Fodor, diese Z. 87, 214 [1913].

⁶ A. Jolles, Biochem. Z. 29, 152 [1898].

Die zeitliche Abnahme des p_H -Wertes von wäßrigen Glucosaminlösungen wurde mit der Glaselektrode gemessen. Die Tab. 5 u. 6 (Spalte 2a u. 2b) zeigen, daß die p_H -Werte um so schneller abfallen, je höher die Temperatur und das Anfangs- p_H sind. Phosphatzusatz verlangsamt nach einer wirkungslosen Zeit von 4 Tagen die Abnahme des p_H -Wertes.

Tab. 5. Zeitliche Abnahme des p_H -Wertes phosphathaltiger Glucosaminlösungen in Abhängigkeit von der Temperatur (Vers. 1 u. 2) und vom Anfangs- p_H (Vers. 2 u. 3).

Vers.-Nr.	Temp. °C	Zeit nach Tagen	0	1	2	4	8	16	32	64	128
1	0	p_H	7,4	7,3	7,2	7,1	7,0	6,8	6,4	—	—
2	38		7,4	6,4	5,9	5,5	5,0	4,2	3,8	3,3	3,0
3	38		4,0	3,6	3,5	3,2	3,0	2,9	2,6	2,5	2,5

Die zeitliche Abnahme des Glucosamin-Gehaltes in den Lösungen wurde kolorimetrisch nach Elson und Morgan in der Ausführungsform von Schloss⁷ bestimmt (Tab. 6, Spalte 3a u. b).

Das nach Bertrand⁸ bestimmte Reduktionsvermögen der Glucosaminlösungen nimmt in den ersten Tagen rasch, später langsamer ab (s. Tab. 6, Spalte 4a, 4b). Durch Formol-Titration, die potentiometrisch ausgeführt wurde, konnte der gesamte basische Stickstoff in den Lösungen bestimmt werden. Die Bildung von Ammoniak, die von früheren Autoren^{2, 9} bereits bei biochemischen Abbaubersuchen an Glucosamin in wäßriger Lösung festgestellt wurde, haben wir nach einem Verfahren von Abderhalden¹⁰ bei Gegenwart und Abwesenheit von Phosphat quantitativ verfolgt (s. Tab. 6, Spalte 6a, 6b).

Bei allen Untersuchungen führte die Gegenwart von Phosphat zu einem beschleunigten Glucosaminabbau, der nicht allein auf eine Pufferwirkung des Phosphats zurückzuführen ist. Die Versuchsergebnisse in Tab. 6 zeigen, daß sich der Einfluß von Phosphat auf den Glucosaminabbau in den ersten Tagen am stärksten bemerkbar macht. Die p_H -Werte der Lösungen sind jedoch in dieser Zeit (1.—4. Tag) noch praktisch gleich. Durch Anwendung anderer, phosphatfreier Puffer erfolgt eine derartige Einwirkung nicht.

Es ergab sich ferner, daß die Zerfallsgeschwindigkeit des Aminozuckers um so kleiner wird, je niedriger die Temperatur und das Anfangs- p_H einer Lösung ist.

Diese Ergebnisse decken sich qualitativ mit den bei Messung der Lichtdurchlässigkeit gemachten Erfahrungen. Ein quantitativer Zusammenhang ist nicht zu erkennen, aber auch nicht zu erwarten.

⁷ L. A. Elson u. W. Th. J. Morgan, *Biochem. J.* **27**, 1824 [1933]; B. Schloss, *Analytic. Chem.* **23**, 1321 [1951].

⁸ G. Bertrand, *Bull. Soc. chim. France* [3] **35**, 1285 [1906].

⁹ W. I. Aleschina, *Mikrobiologia* **7**, 850 [1938]; Yoshio Matsushima, *Sci. Pap. Osaka Univ. Nr. 31* [1951]; A. W. Walker, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **28**, 1078 [1931].

¹⁰ E. Abderhalden, *Physiolog. Praktikum*, 1. Teil, 8. Aufl.

Tab. 6. 0,25-*m* Glucosaminhydrochlorid-Lösung in *m*/15-*sec*. Natriumphosphat: Spalte 2a, 3a, 4a, 5a, 6a, 7a, 8a, 9a, 10a; in dest. Wasser: Spalte 2b, 3b, 4b, 5b, 6b, 7b, 8b, 9b, 10b. Temp. 38°C.

Spalte	2a	2b	3a	3b	4a	4b	5a	5b	6a	6b	7a	7b	8a	8b	9a	9b	10a	10b
Zeit in Tagen	pH -Wert		Glucosamin-HCl in % des eingesetzten		Reduktion, in % des eingesetzten Glucosamin-HCl		Reduktion - Glucosamin-HCl berechnet		NH ₃ -N in % des eingesetzten Glucosamin-N		Formol-N in % des eingesetzten Glucosamin-N		Formol N - NH ₃ -N berechnet		(Formol-N - NH ₃ -N) - Glucosamin-HCl berechnet		100 - Formol-N = „Verschwundenes N“	
0	7,4	7,4	100	100	100	100	0	0	0	0	100	100	100	100	0	0	0	0
1	6,4	6,4	45,5	61,6	76,3	86,0	30,8	24,4	6,6	4,3	62,6	70,4	55,6	66,1	10,1	4,5	37,4	29,6
2	5,9	6,0	29,6	46,0	66,6	76,7	37,0	30,7	11,0	8,5	56,2	67,5	45,2	59,0	15,6	13,0	43,8	32,5
4	5,5	5,4	25,9	39,5	58,8	68,0	32,9	28,7	12,2	11,7	53,2	66,5	41,0	54,8	15,1	15,3	46,8	33,5
8	5,0	4,7	18,9	36,0	50,0	59,0	31,7	23,0	13,4	13,1	49,1	66,1	35,7	53,0	16,8	17,0	50,9	33,9
16	4,2	3,8	15,2	32,0	39,5	49,0	24,3	16,8	14,7	14,2	45,9	65,5	31,2	51,3	16,0	19,1	54,1	34,5
32	3,8	3,3	13,5	31,0	31,0	40,2	17,5	9,2	16,3	15,2	44,5	65,2	28,2	50,0	14,7	19,0	55,5	35,0
64	3,3	2,8	11,1	29,4	29,2	40,1	18,1	10,7	17,6	16,2	43,4	65,0	25,8	48,8	14,7	19,4	56,6	34,8
128	3,0	2,5	9,3	27,2	28,8	40,0	19,5	12,8	18,3	17,2	40,6	64,5	21,3	47,3	12,0	20,1	59,4	35,5
201	2,5	2,5	8,6	26,4	26,7	38,8	18,1	12,4	18,7	17,8	37,7	64,2	19,0	46,6	10,4	20,2	62,3	35,8

Frühere Autoren, die eine zunehmend saure Reaktion von Glucosaminhydrochlorid-Lösungen im Laufe der Zeit beobachteten, schlossen daraus auf das Entstehen von Carboxylgruppen^{5, 11}. Für eine pH -Abnahme gibt jedoch die mittels Formoltitration gemessene Abnahme des basischen Stickstoffs (s. Tab. 6, Spalte 7a, 7b) bereits eine ausreichende Erklärung. Wenn nämlich die Aminogruppen des Glucosamins ihren basischen Charakter, z. B. infolge Fructosaminbildung oder durch andersartige Umwandlungen, verlieren, muß die dabei freierwerdende Salzsäure das pH der Lösungen zu niedrigeren Werten verschieben. Es können allerdings nebenher Carboxylgruppen gebildet werden, deren Entstehen den Effekt noch verstärken würde. Ihre Bildung ist jedoch für die Deutung der pH -Abnahme nicht notwendig.

Ein Vergleich der Abnahme des Glucosamingehaltes und des Reduktionsvermögens gleicher Lösungen zeigt, daß der Glucosamingehalt stärker sinkt, als es der Reduktion entspricht. Es müssen bei der spontanen Umwandlung des Glucosamins in wäßriger Lösung Stoffe entstehen, die ihrerseits Fehlingsche Lösung reduzieren.

Wenn der gebildete Ammoniak-Stickstoff von dem

¹¹ O. O. Meyer, C. Mc. Tiermann u. W. S. Salter, Amer. J. Cancer **22**, 76 [1934]; K. Meyer, Biochem. Z. **57**, 297 [1913].

gleichzeitig noch vorhandenen basischen Gesamtstickstoff in einer Lösung abgezogen wird, erhält man die tatsächlich vorhandene Menge an Amino-
gruppen (s. Tab. 6, Spalte 8a, 8b). Auch deren Menge nimmt im Laufe der
Zeit ab, liegt aber stets höher als es dem Glucosamin-Gehalt entspricht.
Es müssen also Substanzen entstehen, deren Stickstoff ganz oder teilweise
auf die Formoltitration anspricht. — Als „verschwundenen Stickstoff“
bezeichnen wir denjenigen prozentualen Anteil des eingesetzten Glucosamin-Stickstoffs, der nicht mehr in die Formoltitration eingeht.
Dieser Stickstoff hat keinen basischen Charakter mehr, er kann aber
in einem Abbauprodukt wie Fructosazin gebunden sein. Die Menge an
„verschwundenem Stickstoff“ ist berechnet aus der Differenz von Formol-Stickstoff zu Hundert in Spalte 10a, 10b der Tab. 6 aufgeführt.

In Tab. 6 fällt auf, wie erheblich sich eine Glucosamin-Lösung unter
den gewählten Bedingungen bereits nach einem Tag verändert hat. Auch
bei biochemischen Abbauprodukten, die sich nur über 24 Stdn. erstrecken,
sollte diese beachtliche Instabilität des Glucosamin-Hydrochlorids in
gepufferter wäßriger Lösung nicht unbeachtet bleiben. Im Laufe der
letzten 50 Jahre sind aber zahlreiche Arbeiten erschienen, die den Ab-
bau des Glucosamins durch Einwirkung von Organextrakten^{1, 2, 12, 13}
oder seine Ausnutzung durch Mikroorganismen^{2, 5, 9, 11, 14} zum Gegen-
stand hatten, in denen jedoch die geringe Stabilität des Glucosamins
nicht hinreichend berücksichtigt wurde. Daher müssen diese z. Tl.
ausgedehnten biochemischen Untersuchungen — bei denen größtenteils
noch dazu unter Phosphatzusatz als Puffer gearbeitet wurde — in ihren
Folgerungen in bezug auf das Glucosamin als größtenteils fragwürdig
angesehen werden.

Fructosazin, das sich in einer wäßrigen oder methylalkoholischen
Lösung von freiem Glucosamin bildet¹³, fanden wir auch in den
oben beschriebenen Glucosaminhydrochlorid-Lösungen als Abbauprodukt.

Es wurde papierchromatographisch sowie durch die charakteristische Violett-
färbung beim Versetzen seiner soda-alkalischen Lösung mit Eisen(II)-sulfat¹⁵ nach-
gewiesen.

Papierchromatogramme, die mit Ninhydrin eingesprüht waren, zeigten nur
einen Fleck vom restlichen Glucosamin und der bei Gegenwart von Phosphat, wie
von Heyns und Koch¹⁶ bereits beschrieben, in zwei Flecke gespalten war.
Das gleiche Bild ergaben die Autoxydationsversuche. Damit war die Bildung

¹² Kawakami, J. *Biochemistry* [Tokyo] **20**, 423 [1934].

¹³ Y. Suzuki, J. *Biochemistry* [Tokyo] **23**, 57 [1936].

¹⁴ W. Benecke, *Bot. Ztg.* **63**, 227 [1905]; W. C. Evans, W. Handley, u.
F. Happold, *Biochem. J.* **36**, 311 [1942]; A. Gottschalk u. S. M. Partridge,
Nature [London] **165**, 684 [1950]; St. A. Koser u. F. Saunders, *Proc. Soc. exp.
biol. med.* **30**, 443 [1933]; M. Kuroya u. M. Kurose, *Tohoku J. exp. Med.* **38**,
590 [1940]; G. Ledderhose, *diese Z.* **4**, 139 [1880]; F. Lieben u. L. Löwe,
Biochem. Z. **252**, 70 [1932]; Y. Matsushima, *Sci. Pap. Osaka Univ. Nr. 34* [1951];
K. Meyer, *Biochem. Z.* **57**, 297 [1913]; A. J. Rosenberg, *C. R. heb. Séances
Acad. Sci.* **226**, 1751 [1948]; K. Takao, *diese Z.* **131**, 307 [1923]; A. W. Walker,
Proc. Soc. exp. Biol. Med. **28**, 1078 [1931].

¹⁵ K. Stolte, *Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol.* **11**, 19 [1908].

¹⁶ K. Heyns u. W. Koch, *Z. Naturforsch.* **7b**, 486 [1952].

von Glucosaminsäure auf diesem Wege ausgeschlossen. Glucosaminsäure kann jedoch aus Glucosamin durch Oxydation mit Luft am Platinkontakt erhalten werden¹⁷.

Die Bildung eines Aminoazuckers aus Fructose und Ammoniak unter physiologischen Bedingungen, der sich wie Glucosamin verhält¹⁸, führte zu der Annahme, daß Fructose auch umgekehrt aus Glucosamin entstehen könne, zumal Ammoniak bis zu 18% des eingesetzten Aminoazuckers in den Lösungen gefunden worden war. Jedoch ließ sich unter den 3—4 Flecken, die beim Einsprühen von Papierchromatogrammen der Glucosamin-Abbaulösungen mit Zuckerreagenzien auftraten, keiner der Fructose zuordnen. Dagegen wurde ein Fleck mit dem R_F -Wert = 1,14, bezogen auf Glucose = 1, bei Verwendung von Papier Whatman Nr. 1 und Entwickeln der Chromatogramme mit Pyridin-Amylalkohol¹⁹ als Arabinose identifiziert.

Der Fleck gab mit *p*-Anisidinhydrochlorid und Anilinphthalat die für Pentosen charakteristische rote Farbe. Er erschien beim Auftropfen mit einer Vergleichslösung von eingesetzter Arabinose an der gleichen Stelle wie diese, und es trat auch im zweidimensionalen Papierchromatogramm nach gemeinsamem Auftropfen beider Lösungen keine Trennung ein. Durch Auftropfenlassen von Vergleichslösungen abgestufter Konzentration wurde der prozentuale Gehalt der Lösungen an Arabinose auf etwa 0,4% des eingesetzten Glucosamins papierchromatographisch bestimmt.

Ein anderer Fleck mit dem absoluten R_F -Wert = 0,87 erwies sich chromatographisch als identisch mit Oxymethylfurfurol.

Dieses erschien als leuchtend roter Fleck bei Verwendung von Resorcin-Trichloressigsäure als Sprühreagenz. Oxymethylfurfurol ließ sich aus den wäßrigen Glucosamin-Abbaulösungen mit Chloroform wenigstens teilweise extrahieren und dann durch die typische Farbreaktion seiner wäßrig-alkoholischen Lösung mit Phloroglucin und konz. Salzsäure²⁰ nachweisen.

Bei der Substanz, die einem dritten Fleck mit dem absoluten R_F -Wert 0,61 zugrunde liegt, handelt es sich offensichtlich um Glycerinaldehyd. — Ein weiterer Fleck, der sich von letzterem nur schwer trennen läßt, konnte nicht aufgeklärt werden.

Die Farbstoffträger fielen durch Methanol oder auch durch Ansäuern der Lösungen als hellbrauner amorpher, voluminöser Niederschlag aus, der sich in seinen Eigenschaften und im Stickstoffgehalt nicht von denen für Melanoidine beschriebenen²¹ unterscheidet.

Es sind mithin drei Abbauewege klar erkennbar.

Als erster ist die Umwandlung unter Stabilisierung zum Fructosazin und zu anderen Heterocyclen zu nennen. Ein zweiter Weg ist die Bildung von Melanoidinen. Ein dritter Abbaueweg wird offenbar durch

¹⁷ K. Heyns u. W. Koch, Chem. Ber. 86, 110 [1953].

¹⁸ Die Identität des aus Fructose und Ammoniak gebildeten Aminoazuckers mit *d*-Glucosamin konnte inzwischen eindeutig durch Isolierung und Herstellung von Derivaten erwiesen werden. Vgl. hierzu K. Heyns u. K. H. Meinecke, Chem. Ber. 86, 1453 [1953].

¹⁹ K. Heyns u. W. Walter, diese Z. 287, 15 [1951].

²⁰ F. W. Klingstedt, Z. analyt. Chem. 66, 129 [1925].

²¹ C. Enders, Kolloid. Z. 85, 74 [1938].

die Desaminierung eingeleitet, mit nachfolgenden Sekundärreaktionen an den entstehenden labilen kohlenhydratartigen Molekülteilen.

Ein Teil des „verschwundenen Stickstoffs“ verbleibt im Fructosazin. Wahrscheinlich verläuft die Fructosazinbildung über Substanzen, deren Stickstoff zu einem gewissen Prozentsatz auf die Formoltitration anspricht, da auch die Iminogruppen des Prolins und Oxyprolins zu etwa 90% und ähnlich auch eines der beiden Ringstickstoffatome des Histidins von dieser Titration erfaßt werden. Durch das Auftreten solcher Zwischen- bzw. Nebenprodukte würde die Differenz vom gefundenen Aminostickstoff zum jeweils vorhandenen Glucosamin erklärlich (s. Tab. 6, Spalte 9a, 9b). Aus der anfänglichen Zu- und späteren Abnahme dieser Werte muß geschlossen werden, daß für diese Substanzen die Bildungsgeschwindigkeit anfangs größer und später kleiner als die Zerfallsgeschwindigkeit ist.

Wegen der unsicheren Kenntnisse über den chemischen Aufbau der Melanoidine ist es nicht möglich, genauere Angaben über deren Auswirkung auf die Stickstoffbilanz der untersuchten Glucosaminlösungen zu machen. Vermutlich ist aber der Stickstoff, der in die endgültige Form dieser Farbstoffträger eingebaut wird, als „verschwundener Stickstoff“ (s. oben) anzusehen. Dagegen können Zwischenprodukte der Reaktion durchaus noch mit basischem Stickstoff in die Formoltitration eingehen. Dafür spricht die Theorie von Weber und Grünhut²², nach der im ersten Stadium der Reaktion, die zu den Melanoidinen führt, noch freie Aminogruppen vorhanden sind. — Auf den hier zweifellos bestehenden Zusammenhang mit den ernährungsphysiologisch so bedeutungsvollen „Bräunungsreaktionen“ nach der Art der Maillard-Reaktion, an der die Zersetzung intermediär entstehender Aminozucker-Verbindungen sicher beteiligt sind, sei hier nur hingewiesen²³.

In seinem Ausmaß am besten zu beurteilen ist der dritte erkennbare Abbauweg, der unter Desaminierung des Glucosamins verläuft. Er betrifft, gemessen an dem gebildeten Ammoniak, etwa 18% des eingesetzten Aminozuckers. Bezogen auf das abgebaute Glucosamin-Hydrochlorid schlagen 24% in dest. Wasser diese Richtung ein und 20% in phosphathaltiger Lösung. Über Desaminierungen muß die Bildung des Oxymethylfurfurols, Glycerinaldehyds sowie der Arabinose verlaufen.

Da die Arabinose nur in geringen Mengen gefunden wurde, ist anzunehmen, daß sie unter den gegebenen Bedingungen selbst veränderlich ist. Diese Vermutung wird durch die Arbeiten von Jolles⁶ gestützt. Wenn diese Unbeständigkeit in den Glucosamin-Abbaulösungen auch eine Rolle spielt, sind die gefundenen Mengen an Arabinose nur als jeweilige Gleichgewichtswerte zu betrachten. Die Bildung von Oxymethylfurfurol und Glycerinaldehyd ist beim Abbau von Zuckern sowie im Zusammenhang mit der Melanoidinbildung bekannt und daher beim Glucosaminabbau nicht überraschend.

Obgleich der dritte geschilderte Abbauweg nur einen Teil des abgebauten Glucosamins verbraucht, ist er von biochemischer Seite

²² J. Weber u. L. Grünhut, *Biochem. Z.* **121**, 109 [1921].

²³ Zusammenfassende Übersicht vgl. J. P. Daneby u. W. W. Pigman, *Advances in Food Research* **3**, 241 [1951], ferner *Annu. Rev. Biochem.* **1951**, 317.

gesehen der interessanteste. Denn die Substanzen, die hierbei gebildet werden, bieten Nährböden für Bakterien. Z. B. wachsen alle Mikroorganismen, die angeblich auf Glucosamin wachsen sollen, auch auf Arabinose, soweit diese Pentose darauf untersucht worden ist.

Zusammenfassung

d-Glucosamin wird in wäßriger Lösung bei physiologischen p_H -Werten aerob und anaerob im Gegensatz zu seinem Hydrochlorid weitgehend abgebaut; durch Gegenwart von Phosphationen wird diese Reaktion beschleunigt und verläuft dann auch bereits im sauren p_H -Bereich. *d*-Glucosaminsäure wird beim Abbau nicht gebildet. Im Verlauf der anaeroben Umwandlung wird ein Teil des Stickstoffes in eine Bindungsform überführt, in der er keine basischen Eigenschaften mehr besitzt. Parallel zu diesem Vorgang wird das p_H der Lösung ins saure Gebiet verschoben. Ein weiterer Anteil des Stickstoffs erscheint in Form formaltitrierbarer Substanzen unbekannter Natur und als Ammoniak. Weiter werden in größeren Mengen reduzierende Substanzen gebildet. Die Abbauewege werden erörtert.

Papierchromatographisch wurden neben dem für den Glucosaminabbau charakteristischen Fructosazin Arabinose und Oxymethylfurfurol festgestellt. Es wurden noch weitere Umwandlungsprodukte beobachtet, von denen eines offensichtlich auf Glycerinaldehyd zurückzuführen ist.

Die Befunde zeigen, daß Glucosamin unter physiologischen Bedingungen auch ohne enzymatische Beteiligung leicht abgebaut und in andere Substanzen umgewandelt werden kann. Im chemischen Verhalten steht es der Fructose näher als der Glucose. In biologischen Strukturen wird weitgehende Stabilisierung des Glucosamins durch die N-Acetylierung bewirkt.

Über den Pepsin- und den Kathepsin-Gehalt des Duodenums und des Antrum Pylori des Menschen

Von

S. Buchs

Aus der Universitätskinderklinik Basel,

Vorst.: Prof. Dr. E. Freudenberg

(Der Schriftleitung zugegangen am 29. August 1953)

Das Kathepsin des Duodenums ist erstmals namentlich und ausführlich von Freudenberg^{1,2} beschrieben und im Duodenalsaft nachgewiesen worden. Schon Pawlow und Parastschuk³ sowie Ponomarew⁴ fanden im Fistelsaft vom oberen Duodenum des Hundes eine

¹ E. Freudenberg, Schweiz. Med. Wschr. 1945, 735.

² E. Freudenberg, Ann. Paed. 166, 77 [1946].

³ J. P. Pawlow u. S. W. Parastschuk, diese Z. 42, 415 [1904].

⁴ Ponomarew, Biochem. Zbl. 1, 351 [1903].