

Zeitschrift für Ernährungswissenschaft

Journal of Nutritional Sciences · Journal des Sciences de la Nutrition

Band 9

Heft 1

Mai 1968

*Aus dem biochemischen Laboratorium der Farbenfabriken Bayer AG,
Wuppertal-Elberfeld*

Zur Kenntnis des Pyrokohlensäurediäthylesters

1. Enzymatische Hydrolyse von Carbäthoxyverbindungen von Getränkeinhaltsstoffen

Von E. RAUENBUSCH

Mit 2 Abbildungen und 5 Tabellen

(Eingegangen am 26. August 1967)

Der Pyrokohlensäurediäthylester (Baycovin ^R)¹⁾, der zur Entkeimung von Getränken verwendet wird, zerfällt in wässriger Lösung in Äthanol, Kohlendioxid und Wasser. In geringem Ausmaß treten jedoch Nebenreaktionen ein, die zur Carbäthoxylierung von Getränke-Inhaltsstoffen führen. Dabei werden entweder Hydroxylgruppen, Sulfhydrylgruppen oder primäre und sekundäre Aminogruppen carbäthoxyliert. Über diese Reaktionen wurde bereits von anderer Seite berichtet (1, 2, 3, 4).

Zum Nachweis der gesundheitlichen Unbedenklichkeit dieser Carbäthoxyverbindungen war zur Ergänzung der bisher durchgeföhrten Untersuchungen das biochemische Verhalten der Verbindungen gegenüber den hydrolytischen Enzymen des tierischen Organismus zu prüfen. Nach LANG et al. (4) werden verschiedene dieser Verbindungen, wie Diäthylcarbonat und die Carbäthoxyderivate von Pflanzenphenolen, Hydroxsäuren und einiger Aminosäuren, bereits durch die Enzyme des Verdauungstraktes enzymatisch zu den Ausgangsverbindungen sowie Äthanol und Kohlendioxid hydrolysiert; sie sind damit gesundheitlich unbedenklich.

Diese Untersuchungen wurden sowohl in qualitativer als auch in quantitativer Hinsicht erweitert. So wurden die Carbäthoxyderivate aller in Proteinen vorkommenden Aminosäuren auf ihre enzymatische Spaltbarkeit geprüft. Außerdem wurde ein N-Carbäthoxydipeptid und ein N-Carbäthoxytripeptid sowie einige O-Carbäthoxy-flavanon- und -flavonol-glykoside untersucht.

Über die Synthese und die chemischen Eigenschaften dieser Derivate wird im 2. Teil dieser Mitteilung berichtet.

¹⁾ Warenzeichen der Farbenfabriken Bayer AG, Leverkusen

Experimenteller Teil

Herstellung der Homogenate

Aktiviertes Pankreas-Homogenat

100 g fettfreies Pankreasgewebe vom Schwein wurde zusammen mit 10 g abgeschabter Schleimhaut vom Dünndarm und 50 ml 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,1 im Starmix homogenisiert. Das Homogenat wurde 1 Stunde bei 30° C inkubiert und danach 5 min bei $39000 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde bei 0° C im Visking-Dialysierschlauch 5 Std. gegen 0,05 M Phosphatpuffer pH 7,1 dialysiert. In der Innenflüssigkeit hatte sich ein Niederschlag gebildet, der abzentrifugiert wurde. Der Gehalt an Aminosäuren im Überstand war jedoch immer noch zu hoch, so daß nochmals 5 Std. dialysiert wurde.

Volumen der Innenflüssigkeit 180 ml. Die Enzymlösung wurde in Portionen von 5 ml eingefroren und bei -20°C aufbewahrt. Stickstoffgehalt nach KJELDAHL 4,95 mg/ml.

Aufarbeitung der Darmschleimhaut

Duodenum: 1,10 m Duodenum vom Schwein wurde vorsichtig ausgewaschen, der Darm aufgeschnitten und die Schleimhaut abgeschabt (53 g). Die Schleimhaut wurde in 50 ml 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,1 homogenisiert und 6 Std. bei 0° C gegen 0,01 M Phosphatpuffer pH 7,1 dialysiert. Die Innenflüssigkeit wurde 10 min bei $39000 \times g$ zentrifugiert und der Überstand (49 ml) in 5 ml Portionen eingefroren. Stickstoffgehalt nach KJELDAHL 7,35 mg/ml.

Jejunum: 1,0 m Jejunum vom Schwein ergab 43 g Darmschleimhaut und wurde, wie für Duodenum beschrieben, aufgearbeitet. Endvolumen 37 ml, Stickstoffgehalt nach KJELDAHL 5,08 mg/ml.

Leberhomogenat

100 g Schweineleber wurden in 100 ml 0,05 M-Trispuffer pH 7,5 im Starmix homogenisiert. Das Homogenat wurde 10 min bei $39000 \times g$ zentrifugiert und der Überstand 6 Std. bei 0° C in einem Visking-Dialysierschlauch gegen dest. Wasser dialysiert. Nach der Dialyse wurde die Innenflüssigkeit durch Zentrifugieren (20 min bei $39000 \times g$) geklärt. Der Überstand von 138 ml wurde in 10 ml Portionen eingefroren. Stickstoffgehalt nach KJELDAHL 7,60 mg/ml.

Nierenhomogenat

100 g Schweineniere wurden, wie für die Leber beschrieben, aufgearbeitet. Endvolumen 118 ml, Stickstoffgehalt nach KJELDAHL 7,94 mg/ml.

Qualitativer Nachweis der Carbäthoxyaminosäuren

Die Carbäthoxyverbindung der Aminosäure wurde mit dem Homogenat 2 bzw. 20 Std. bei 37°C inkubiert. Der Ansatz und die Kontrollen hatten folgende Zusammensetzung:

Zusammensetzung	Ansatz	K_1	K_2
Organhomogenat	0,5 ml	0,5 ml	—
0,05 M Phosphatpuffer pH 7,1	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml
0,05 M Carbäthoxyaminosäure	0,5 ml	—	0,5 ml
Wasser	—	0,5 ml	0,5 ml

Die Kontrolle K_1 dient zur Festlegung der durch das Homogenat verursachten Ninhydrinflecken, die Kontrolle K_2 muß die Beständigkeit der Carbäthoxyverbindung unter den Inkubationsbedingungen beweisen.

Die Trennung und Identifizierung der Aminosäuren wurde sowohl durch Dünnschichtchromatographie als auch durch Papier-Elektrophorese vorgenommen. Neben einer Probe des Ansatzes und der Kontrollen K_1 und K_2 wurde die nachzuweisende Aminosäure im Gemisch mit der Kontrolle K_1 aufgetragen.

Dünnschichtchromatographie: Platten beschichtet mit Kieselgel G, Lösungsmittel: Äthanol (96% ig)/NH₃ (25% ig) = 67/33 (V/V). Aufgetragen wurden je 1 μ l. Anfärbung mit Ninhydrin.

Papierelektrophorese: Je 2 μ l der Lösungen wurden auf Whatman Nr. 1 -Papier aufgetragen, das zuvor in Puffer (Ameisensäure 50 ml, Essigsäure 150 ml mit Wasser ad 1 l; pH 1,8) getränkt und abgepreßt worden war. Die Elektrophorese lief 1 Std. mit 1200 V.

In analoger Weise wurde auch die Hydrolyse der Carbäthoxypeptide untersucht.

Bestimmung der Hydrolysegeschwindigkeit der Carbäthoxyaminosäuren mit der Ninhydrinmethode

Die Carbäthoxyaminosäure wurde bei 37 °C mit dem Homogenat inkubiert.

Ansatz:	A (ml)	K_1 (ml)	K_2 (ml)
Homogenat	1,0	1,0	—
0,05 M Phosphat pH 7,1	7,0	7,0	7,0
0,05 M Cäo-Aminosäure ¹⁾	2,0	—	2,0
Wasser	—	2,0	1,0

Probenahme 1,0 ml nach 0, 30, 60, 90, 120 und 240 min nach Zugabe des Homogenates bzw. der Cäo-Aminosäure. Die Probe wurde zur Enteiweißung sofort nach der Entnahme in eine im Eisbad stehende Lösung von 0,4 ml 1 N Perchlorsäure gegeben. Nach 3 min Stehen wurden 0,6 ml eines Gemisches aus 0,4 ml 1 N-Kalilauge und 0,2 ml 0,2 M-Phosphatpuffer pH 7,1 zugegeben. Die Suspension wurde zentrifugiert und vom Überstand 0,1 ml zum Ninhydrin-Test nach H. ROSEN (5) gegeben. Die Extinktionen wurden in der 1 cm-Küvette gegen einen Kontrollansatz mit den Reagenzien des Ninhydrintests gemessen. In diesem Test wurden folgende Extinktionen (E) für 1 μ Mol der Aminosäuren im Testansatz gefunden:

	E 1 cm 570 nm
Lys, Orn	3,02
Trp	2,74
Asp, Glu, Arg	
His, Gly, Ala, Leu, Ser,	2,90
Thr, Tyr, Phe	

Infolge einer langsam Autolyse der Enzymlösungen ergibt die Kontrolle K_1 einen langsamen, für die Enzymlösung charakteristischen Anstieg, dessen Mittelwert aus 5 bis 6 Ansätzen ermittelt und von dem Meßwert abgezogen wurde. Für das Enzympräparat aus Leber betrug die Extinktionszunahme pro Minute und mg N $7,5 \cdot 10^{-3}$, für das Präparat aus Niere $8,4 \cdot 10^{-3}$. Diese Werte würden einen Umsatz von $2,6$ bzw. $2,9 \frac{n \text{ Mol}}{\text{min} \cdot \text{mg N}}$ vortäuschen.

Die Kontrolle K_2 von der später nur noch nach 0 und 240 min Proben gezogen wurden, sollte zeigen, ob eine Spontanhydrolyse der Carbäthoxyverbindung während Inkubation, Enteiweißung und Ninhydrin-Test das Ergebnis verfälscht. Eine solche Spontanhydrolyse ist nur in Einzelfällen aufgetreten, die dann nicht ausgewertet wurden.

¹⁾ Abkürzung: Cäo. = Carbäthoxy.

Die Berechnung der spezifischen Aktivität erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Spez. Akt.} = \frac{(E_t - E_0) - E_K}{E_A \cdot t \cdot m \cdot d} \quad \left[\frac{n \text{ Mol}}{\text{min} \cdot \text{mg N}} \right]$$

E_t = Extinktion zur Zeit t

E_0 = Extinktion zur Zeit 0

E_K = Extinktionsdifferenz des Kontrollansatzes K_1 zwischen Zeit t und t_0

E_A = Extinktion von 1 n Mol Aminosäure im Testansatz

t = Inkubationszeit (min)

m = N-Gehalt des Homogenates nach KJELDAHL (mg/ml)

d = Verdünnung im Testansatz, bei vorliegendem Ansatz = $1/_{200}$

Die Bestimmung der Hydrolysegeschwindigkeit der Carbäthoxyderivate der Anthoxanthine

Die Hydrolyse der Anthoxanthine wurde im Bicarbonatpuffer durchgeführt und die Entstehung von Kohlendioxyd im Warburg-Apparat manometrisch gemessen.

Testzusammensetzung:

0,1 M-NaHCO ₃	0,2 ml
0,01 M-Carbäthoxyverbindung	1,0 ml
Wasser	0,3 ml
Homogenat	0,5 ml

Im Gasraum Ar mit 5% CO₂.

Das Homogenat befand sich im Seitengefäß und wurde nach dem Temperieren eingekippt. Die Ansätze wurden bei 37 °C mit einer Schüttelgeschwindigkeit von 120 Schlägen pro min inkubiert.

Die Carbäthoxyverbindungen wurden mit etwas Dimethylformamid und wenig Wasser vorgelöst und dann auf das Endvolumen aufgefüllt. Das Tricarbäthoxyrutin war auch auf diese Weise nicht in Lösung zu bringen, es wurde als Suspension eingesetzt.

Die Hydrolysegeschwindigkeit wurde aus dem linearen Anstieg des Kohlendioxid-Druckes in den ersten Minuten bestimmt. Die Berechnung der spezifischen Aktivität erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Spez. Akt.} = \frac{C}{f \cdot m} \quad \left[\frac{n \text{ Mol}}{\text{min} \cdot \text{mg N}} \right]$$

C = Hydrolysegeschwindigkeit in $\mu\text{l CO}_2/\text{min}$

f = 0,0224 ($\mu\text{l CO}_2$ pro n Mol Cäo-Gruppe)

m = Stickstoffgehalt des Homogenates im Testansatz in mg.

Ergebnisse

Die N-Carbäthoxyaminosäuren sind ziemlich stabile Verbindungen, die bei neutralen p_H -Werten und 37 °C im wässrigen Medium keine Spontanhydrolyse zeigen. Nach Inkubation der Verbindungen mit geeigneten Enzympräparaten war es möglich, die durch enzymatische Hydrolyse entstandenen Aminosäuren durch Chromatographie oder Elektrophorese zu trennen und durch Anfärbung mit Ninhydrin sichtbar zu machen. Eine Voraussetzung für einen derartigen Ansatz ist jedoch, daß das Enzympräparat keine Aminosäuren oder niedermolekularen Peptide in größerer Menge enthält, die durch Anfärbung mit Ninhydrin den Nachweis stören könnten. Dieses Ziel wurde im allgemeinen durch vorherige Dialyse des Organextraktes erreicht. Schwierigkeiten treten jedoch auf bei den Präparaten aus Pankreas, da diese stark proteolytischen Extrakte

durch Autolyse während der Dialyse und während der Inkubation mit der Carbäthoxyverbindung laufend Aminosäuren und andere Ninhydrin-positive Substanzen nachbilden, die den Nachweis der als Carbäthoxyderivat zugegebenen Aminosäure erschweren.

Die Ergebnisse werden zusammenfassend in der Tabelle 1 dargestellt. Alle geprüften Enzympräparate waren in unterschiedlichem Maße befähigt, den N-Carbäthoxyrest von Aminosäuren hydrolytisch zu entfernen. Insbesondere zeigten die Präparate aus Leber und Niere eine hohe Aktivität und auch eine

Tabelle 1. Hydrolytische Spaltung von Carbäthoxyaminoäuren durch Enzympräparate aus Organen des Schweines

Carbäthoxy-Verb. von	Spaltung durch Präparate aus:					
	Pankreas	Duodenum	Jejunum	Leber	Niere	Milz
Asp	—	—	— u	+ u	+ u	(+) u
Asn	—	—	— u	+ u	+ u	(+) u
Glu	—	++	++	+++	+++	++
Gln	— u	(+)	— u	+++	+++	+ u
Lys(α , ϵ -Di-Cäo-)	—	—	—	$\xrightarrow{+ \rightarrow \epsilon^2}$	$\xrightarrow{+ \rightarrow \epsilon^2}$	(+)
Lys(ϵ -Cäo-)	—	—	—	—	—	(+)
Arg	\rightarrow Orn ¹⁾	—	+	$+ \rightarrow$ Orn ¹⁾	++	$(+) \rightarrow$ Orn ¹⁾
Orn(α , ϵ -Di-Cäo-)	—	—	— u	(+) u	—	+ u
His	—	— u	—	+	+++	+
Gly	—	+ u	(+)	++	++	++
Ala	—	(+)	+	++	+++	++
Val	+++	++	++	+++	+++	++
Leu	++	++	++	++	+++	++
Ile	(+)	(+) u	+ u	+	+++	++
Ser	(+)	(+)	+	++	+++	+++
Thr	—	—	+	+ u	+++	+
Cys (Di-Cäo-)	— u	— u	— u	+ u	+ u	+ u
Cys Cys (Di-Cäo-)	— u	—	—	—	— u	—
Met	—	+	+	+++	+++	++
Tyr(N,O-Di-Cäo-)	+++	—	—	(+)	+	—
Trp	+++	—	—	—	(+)	—
Phe	+++	(+)	—	+	+	+
Pro	—	—	—	(+) u	— u	— u
Hyp	—	—	—	— u	— u	— u

u = Folgereaktionen führen zu weiteren Ninhydrin-positiven Substanzen

¹⁾ Nach dem chromatographischen Verhalten ist die Bildung von Ornithin wahrscheinlich.

²⁾ Bildung von N^ε-Carbäthoxy-lysin wahrscheinlich.

+++ Aminosäure nach 2stündiger Inkubation stark sichtbar

++ Aminosäure nach 2stündiger Inkubation nachweisbar

+ Aminosäure nach 20stündiger Inkubation nachweisbar

(+) Aminosäure nach 20stündiger Inkubation wahrscheinlich

— Aminosäure nach 20stündiger Inkubation nicht nachweisbar

breite Spezifität. Die Carbäthoxyderivate verschiedener Aminosäuren wurden nämlich nicht mit gleicher Geschwindigkeit hydrolysiert, sondern mit einer von Organ zu Organ verschiedenen Geschwindigkeit. Dies spricht für die Beteiligung unterschiedlicher Hydrolasen für verschiedene Carbäthoxyaminoäuren. Während einige Carbäthoxyaminoäuren wie zum Beispiel die des Valins, Leucins und der Glutaminsäure fast von allen Enzympräparaten hydrolysiert wurden, wurden andere nur von ganz bestimmten Organextrakten hydrolysiert. Auffällig in dieser Beziehung sind vor allem die Derivate der aromatischen Aminosäuren, die bevorzugt von Pankreasenzymen gespalten wurden.

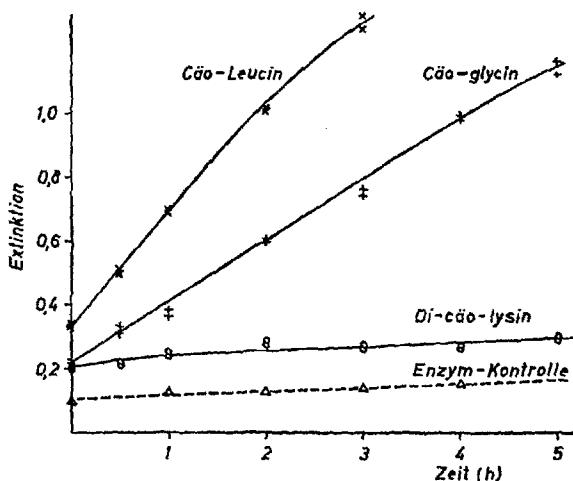


Abb. 1. Hydrolyse von N-Carbäthoxyaminoäuren mit einem Enzymextrakt aus Schweineleber. Abszisse: Dauer der Inkubation bei 37° C; Ordinate: Extinktion nach Entzweißung und Anfärbung mit Ninhydrin, gemessen gegen den Reagenzien-Leerwert.

Bei anderen Carbäthoxyaminoäuren, die langsamer hydrolysiert wurden, wie zum Beispiel Carbäthoxyasparaginsäure treten wahrscheinlich nach der primären Abspaltung des Carbäthoxyrestes weitere Folgereaktionen ein, die zur Bildung einer ganzen Reihe von Ninhydrin-positiven Substanzen führen. Dies gilt auch für Cystein, Prolin und Hydroxyprolin. Derartige Folgereaktionen beobachtet man auch, wenn man nicht das Carbäthoxyderivat, sondern die freie Aminosäure mit dem Enzympräparat inkubiert.

Carbäthoxyderivate anderer Aminosäuren wurden ebenfalls nach ihrer Hydrolyse weiter enzymatisch umgesetzt, jedoch in ganz charakteristischer Weise. So konnte bei dem N^α-Carbäthoxyarginin ein Übergang zu einer Aminosäure beobachtet werden, die nach ihrem chromatographischen Verhalten als Ornithin identifiziert werden konnte. Dies würde bedeuten, daß die Guanidino-gruppe noch zusätzlich abhydrolysiert wurde.

Von den Lysinderivaten ist im Gegensatz zur N^α-Carbäthoxyverbindung (4) die N^α, N^ε-Dicarbäthoxyverbindung nur sehr langsam hydrolysiert, und auch dann wurde der Übergang zur N^ε-Carbäthoxyverbindung bevorzugt.

Zur quantitativen Messung der Hydrolyse wurde eine Methode entwickelt, die es erlaubt, die aus der Carbäthoxyverbindung frei werdende Aminosäure mit Hilfe des Ninhydrin-Testes nach H. ROSEN (5) zu bestimmen. Um die Anfärbung durch Proteine des Enzympräparates möglichst niedrig zu halten, wurde nach der Inkubation eine Enteiweißung mit Perchlorsäure vorgenommen. Diese Säurebehandlung, sowie das nachfolgende Erhitzen mit dem Ninhydrin-Reagens wurde von einem großen Teil der Carbäthoxyverbindungen ohne erkennbare Hydrolyse vertragen, einige jedoch wie z. B. die Derivate des Valins, Isolencins und des Methionins wurden hydrolysiert. Die Methode war damit bei diesen Derivaten nicht anwendbar. Die Abb. 1 zeigt den Gang der Hydrolyse einiger Carbäthoxyaminosäuren mit Leberenzymen und die Tab. 2 gibt die erhaltenen Hydrolysegeschwindigkeiten an, die im einzelnen große Unterschiede aufweisen. Nach der qualitativen Prüfung dürfte im Falle der N-Carbäthoxyasparaginsäure die erhaltene Ninhydrinfärbung nicht durch die Asparaginsäure selbst, sondern durch die bei der weiteren Umsetzung entstandenen Produkte bedingt sein.

Tabelle 2. Hydrolysegeschwindigkeit von Carbäthoxyaminosäuren

Carbäthoxy-Verb. von (L-N ^α -Cäo-aminosäuren)	Hydrolysegeschwindigkeit in η Mol pro min u. pro mg N durch Homogenate aus	
	Leber	Niere
Asparaginsäure	2,7	4,3
Glutaminsäure	79	330
Lysin (α , ϵ -Di-Cäo-)	0,6	1,6
Arginin	2,5	16
Ornithin (α , ϵ -Di-Cäo-)	1,9	3,9
Histidin	2,0	12
Glycin	26	99
Alanin	21	77
Leucin	49	188
Serin	42	139
Threonin	5,4	20
Valin ¹⁾		112
Tyrosin (N, O-Di-Cäo-)	5,0	36
Tryptophan	2,4	4,4
Phenylalanin	6,1	9

¹⁾ Ohne Perchlorsäurebehandlung

Auch die Vollständigkeit der Spaltung wurde bei einigen Aminosäuren überprüft. Wie die Tab. 3 zeigt, waren bei den aufgeführten Aminosäurederivaten nach 4 Std. oder weniger die angegebenen Werte erreicht, die mit denen durch Säure-Hydrolyse und nachfolgender Aminosäureanalyse erhaltenen Werten befriedigend übereinstimmen.

Die Hydrolyse der Carbäthoxypeptide wurde an zwei Beispielen in Analogie zur Hydrolyse der Carbäthoxyaminosäuren untersucht (Tab. 4). In beiden Fällen wurden die Peptide zu den Aminosäuren abgebaut und die Carbäthoxygruppe abgespalten. Ein Hinweis auf eine Abspaltung der Carbäthoxygruppe bei intakt bleibendem Peptid ergab sich in diesen Fällen nicht.

Tabelle 3. Endwerte der Hydrolyse von Carbäthoxyaminosäuren

α , N-Carbäthoxyderivat von	Hydrolyse durch Nierenenzyme Extinktions- differenz ¹⁾	Ausbeute in % der Einwaage	Säurehydrolyse ²⁾ Ausbeute in % der Einwaage
Leucin	1,42	96	86
Alanin	1,05	72	74
Serin	1,33	92	90 ³⁾
Glutaminsäure	1,22	84	98
Glycin	1,51	104	99

¹⁾ Maximale Extinktionsdifferenz zwischen Test und Kontrollansatz, sie sollte bei Umsatz von 0,5 μ Mol = 100% 1,45 betragen.

²⁾ 22 Stunden mit 5,7 N-Salzsäure bei 110 °C hydrolysiert.

³⁾ Ein Hydrolysenverlust von 15% wurde berücksichtigt.

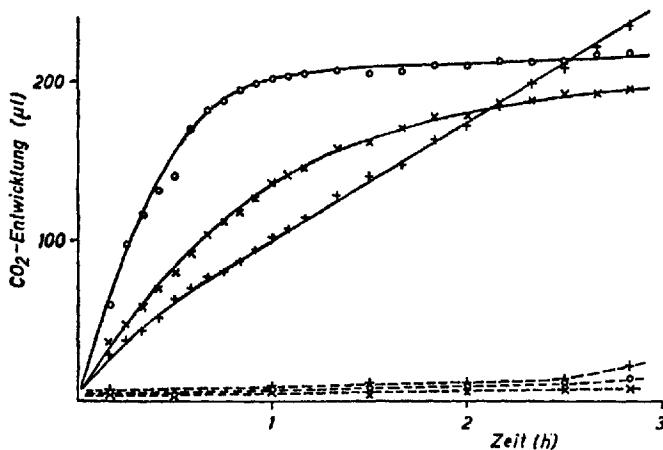


Abb. 2. Manometrische Messung der Hydrolyse von Carbäthoxy-anthoxanthinen durch Enzyme aus Schweineleber. Abszisse: Inkubationsdauer bei 37° C; ordinat: Kohlendioxidentwicklung in μ l; —: Hydrolyse mit Enzymen (0,3 mg N pro Ansatz); ----: Spontanhydrolyse; o: 4'-O-Carbäthoxy-naringin; x: 3'-O-Carbäthoxy-hesperidin; +: 7,3',4'-O-Tricarbäthoxy-rutin

Aus der Gruppe der Flavanon- bzw. Flavonol-glykoside wurde die Hydrolyse der Carbäthoxyverbindungen des Hesperidins, des Naringins und des Rutins untersucht. Bei diesen O-Carbäthoxyverbindungen war die mit der Hydrolyse verbundene Kohlendioxidentwicklung direkt manometrisch meßbar. Von allen drei Verbindungen wurden durch die geprüften Enzymderivate die Carbäthoxygruppen rasch und vollständig abgespalten. Die Abb. 2 und die Tab. 5 geben Auskunft über den Verlauf und die Ausbeute der enzymatisch beschleunigten Hydrolyse.

Tabelle 4. Hydrolyse von Carbäthoxypeptiden

Substanz	Nachgewiesene Aminosäure	Pankreas	Leber	Niere	Milz
Cäo-Gly-Leu	Gly	(+)	++	++	++
	Leu	++	++	++	++
Cäo-Ala-Gly-Gly	Ala	-	+	++	++
	Gly	++	++	++	++

++ Aminosäure nach 2stündiger Inkubation nachweisbar

+ Aminosäure nach 20stündiger Inkubation nachweisbar

(+) Aminosäure nach 20stündiger Inkubation wahrscheinlich

- Aminosäure nach 20stündiger Inkubation nicht nachweisbar

Tabelle 5. Enzymatische Hydrolyse der Carbäthoxyverbindungen von Flavanon- und Flavonol-glykosiden

Substanz	Hydrolyse in Gegenwart von Enzymen aus:									
	Spontane Hydrolyse ¹⁾ n Mol/min	Darm-Pankreas Spez.-Geschwindigkeit ¹⁾ n Mol/min mgN	Endwert		Leber Spez.-Geschw. ¹⁾ n Mol/min mgN	Endwert		Niere Spez.-Geschw. n Mol/min mgN	Endwert	
			μMol	% d. Th. ¹⁾		μMol	% d. Th. ¹⁾		μMol	% d. Th. ¹⁾
3'-0-Carbäthoxy-hesperidin	2	10	> 5,9	> 59	547	9,2	92	168	8,9	89
4'-0-Carbäthoxy-naringin	2	44	8,9	89	805	9,4	94	302	8,9	89
7,3',4'-0-Tricarbäthoxy-rutin	6	78	27	90	198	23,4	78	156	26	87

¹⁾ Anfangsgeschwindigkeit der Hydrolyse bei 37 °C im Bikarbonatpuffer bei pH 7,2 pro mg N des Homogenates.

¹⁾ Endwert bezogen auf die eingesetzte Substanzmenge.

Diskussion

Die durch frühere Untersuchungen von LANG et al. (4) bereits angedeutete prinzipielle Spaltbarkeit von Carbäthoxyverbindungen von in der Natur vorkommenden Aminosäuren und Anthoxanthinen konnte mit Enzympräparaten aus Schweineorganen weitgehend bestätigt werden. Nicht nur die Enzyme des Darmtraktes sind zu diesen Spaltungen befähigt, sondern gerade Extrakte aus inneren Organen waren hierfür geeignet. Bei der vorliegenden Untersuchung wurden als Enzymquelle ausschließlich Schweineorgane verwendet, da die hydrolytischen Enzyme des omnivoren Schweines eine gewisse Ähnlichkeit mit den menschlichen Hydrolasen haben dürften. Bei den Aminosäurederivaten konnte in den Fällen, wo die erwartete Aminosäure nicht nachgewiesen werden konnte, gezeigt werden, daß durch einen weiteren Metabolismus Ninhhydrin-positive Substanzen entstehen, für deren Bildung die Abspaltung der Carbäthoxygruppe vorausgesetzt werden kann. Es ist verständlich, daß je nach Art der Enzympräparation diese Folgereaktionen verschiedenartig ausfallen oder unter Umständen auch unterbleiben können, sodaß dann der Nachweis der betreffenden Aminosäure gelingt. Wir sehen deshalb keinen Widerspruch zu

den Arbeiten von LANG et al. (4), die mit Präparaten aus Rinderorganen zum Beispiel Prolin nach der Hydrolyse direkt nachweisen konnten. Auch auf die Spaltung von N,S-Dicarbäthoxy cystein folgten weitere Umsetzungen. Das Cystinderivat wurde nur langsam umgesetzt. Es sieht so aus, als ob erst eine Reduktion zur SH-Verbindung notwendig wäre, die unter unseren oxydativen Bedingungen nicht stattfinden konnte. Als sehr beständig erwies sich auch die N^ε-Carbäthoxyverbindung des Lysins, deren Bildung jedoch unter den Bedingungen der normalen Anwendung des Pyrokohlensäurediäthylesters, d. h. im sauren pH-Bereich, nicht nachweisbar ist (3).

Die beiden untersuchten N-Carbäthoxy-Peptide wurden ebenfalls von den Organextrakten hydrolysiert und die Carbäthoxygruppe in demselben Maße hydrolysiert, wie es aus der Betrachtung der einzelnen Aminosäurederivate zu erwarten war.

Die O-Carbäthoxyverbindungen der Anthoxanthine wurden durch alle geprüften Enzympräparate glatt hydrolysiert.

Zusammenfassung und Literatur siehe Teil 2.

Anschrift des Verfassers:

Dr. E. RAUENBUSCH, Biochemisches Laboratorium der Farbenfabriken Bayer AG,
58 Wuppertal-Elberfeld