

Über Verbindungen von Aminosäuren und Ammoniak.

VI. Mitteilung.

Von

Peter Bergell und Theodor Brugsch.

(Der Redaktion zugegangen am 18. Mai 1910.)

Es ist bekannt,¹⁾ daß das Ferment der Bauchspeicheldrüse eine Verbindung des Ammoniaks mit einer Monoaminosäure, nämlich das Leucinamid, spaltet. Der Vorgang erscheint hier in spezifischer Weise begrenzt zu sein. Wie zu erwarten, verläuft er asymmetrisch. Zudem ist aber dem Pankreasferment das Amid des Leucins wesentlich adäquater als die Amide anderer Aminosäuren. Wenigstens erschien das Alaninamid recht resistent dem Fermente der Bauchspeicheldrüse gegenüber. Es lag nun der Gedanke nahe, daß in Analogie zu der tryptischen Spaltung der Peptide andere Organe Fermentkräfte enthalten, die auch Homologe des Substrates angreifen, welches für das Pankreasferment adäquat ist.

Wir haben nun untersucht, wieweit die Preßsäfte verschiedener Organe die Amide von Aminosäuren spalten. Als Substrat diente sowohl d-l-Alaninamid als d-l-Leucinamid. Es wurde gefunden, daß beide Substrate von den Preßsäften verschiedener Organe wie Leber, Niere, Milz, Placenta und auch von Muskelfleisch fermenthydrolytisch gespalten werden. Der Vorgang ist durchweg ein asymmetrischer und wenn wir die optische Aktivität der entstehenden Spaltprodukte resp. ihrer Derivate als ungefähren Maßstab nehmen, so ergaben sich für die enzymatische Kraft der einzelnen Preßsäfte graduelle Unterschiede.

Die Amide von Aminosäuren betrachten wir als Ver-

¹⁾ P. Bergell und Hanns von Wülfing, Diese Zeitschrift, 1910, IV. Mitteil., Über Verbindungen von Aminosäuren und Ammoniak.

bindungen von Aminosäuren und Ammoniak, wenn auch vom Standpunkt der organischen Chemie es strittig erscheinen mag, ob Säureamide noch als Ammoniakverbindungen anzusehen sind. Die Naturkräfte, wie z. B. die Enzyme des Tierkörpers spalten diese Verbindungen in Ammoniak und andere Stoffe. Wir dürfen auch nicht zweifeln, daß die Natur imstande ist, aus diesen Spaltprodukten die Amide der Aminosäuren aufzubauen. Die physiologische Chemie berechtigt uns daher, hier von Verbindungen von Aminosäuren und Ammoniak zu sprechen.

Wir stellen noch fest, daß wir diese Fermenthydrolysen nicht unter dem Begriff der «autolytischen» Fermente abhandeln wollen. Daß allen Organen fermenthydrolytische Eigenschaften innewohnen können, wird niemals ernstlich bestritten worden sein. Dem Begriff der Autolyse haftet aber auch der Charakter der postmortalen Veränderung, der Autodigestion, an. Die Vorstellung ging dahin, daß beim Zerfall der Zelle Auftreten von Ferment nachweisbar wird. Hiermit haben unseres Erachtens viele neue Beobachtungen nichts zu tun. Je frischer die Preßsäfte dargestellt werden, um so prompter wirken sie, um so schneller der Ablauf der Fermentspaltung, innerhalb von Zeiten, die dem Abbau der Nährstoffe entsprechen. Niemand darf heute mehr zweifeln, daß die Leberfermente im Sinne von Bergell und Lewin, Abderhalden u. a. ebensogut fermenthydrolytische Kräfte des Organismus sind wie das Glycyltyrosin, Alanylleucin etc. spaltende Ferment der Bauchspeicheldrüse. Es deckt sich also nicht der Begriff der intracellulären tryptischen Fermente mit dem Begriff der autolytischen Fermente. Hierbei sei noch darauf hingewiesen, daß das Freiwerden relativ großer Ammoniakmengen immer als ein charakteristisches Zeichen der Autolyse gegolten hat.

Im Anschluß an unsere Untersuchungen über Fermente, welche Amide der Aminosäuren spalten, fanden wir einen Körper, der für die Auffassung der sogenannten roten Biuretreaktion zweifellos von Interesse ist. Leucinamid gibt mit Natronlauge und CuSO_4 eine rote salzartige Verbindung, die unter bestimmten Bedingungen in schönen roten Krystallen

zu erhalten ist. Die Analyse ergab noch keine volle Aufklärung und es scheint eine komplexe Verbindung vorzuliegen. Immerhin dürfte es wichtig sein, daß ein durch Trypsin spaltbarer Stoff eine schön krystallisierte Kupferverbindung gibt, welche als der Träger einer rein roten Biuretreaktion angesprochen werden darf.

Experimenteller Teil.

d-l-Leucinamid und Leberpreßsaft.

Zum Versuche diente ein Preßsaft, der aus frischer Kalbsleber nach den bekannten Methoden mit Sand- und Glasscherben verrieben und darauf mit Kieselgur vermischt gewonnen war.

Angewandt wurde für jeden Versuch 1,0 g bromwasserstoffsäures Leucinamid, das in wenig Wasser gelöst, mit 5 ccm Preßsaft vermischt und nach Zufügung einer Spur Soda und Toluol bei 37° aufbewahrt wurden.

Nach 24 Stunden wurde verdünnt, mit Essigsäure angesäuert, mit wenig NaCl versetzt und durch Kochen enteiweißt. Das Filtrat wurde neutralisiert und nach Zufügung von 15 ccm N-NaOH mit β -Naphthalinsulfochlorid in Äther mehrstündig geschüttelt. Der bei alkalischer Reaktion sich abscheidende Niederschlag wird abgesogen und gewaschen. Er ist das nur wenig verunreinigte Naphthalinsulfoderivat des vom Ferment verschonten d-Leucinamids.

β -Naphthalinsulfo-d-Leucinamid.

Die Menge der aus einem Versuche erhaltenen Substanz betrug 0,46 g. Die Substanz sintert im Kapillarröhrchen erhitzt bei 190° und ist bei 196° geschmolzen. Sie wird in alkalischem verdünntem Alkohol (1 Teil Spirit, 1 Teil N-NaOH) gelöst. Die 2%ige Lösung dreht im 2 ccm-Rohr die Ebene des polarisierten Lichts 2° 12' nach rechts. Die optische Aktivität ist demnach fast ebenso groß wie bei dem gleichen Versuch mit Pankreatin (2° 24'). Zur Analyse wurde die Substanz nochmals aus heißem verdünntem Alkohol umkrystallisiert und schmolz nunmehr bei 200—202° (korr.). Sie wurde bei 100° getrocknet.

0,1597 g Substanz gaben 12,3 ccm N (17°, 769 mm).

$C_{16}H_{20}O_3N_2S$ berechnet: N = 8,75 %

gefunden: > = 8,83 %.

Aus dem alkalischen Filtrate wurde durch Fällung mit Salzsäure Naphthalinsulfo-l-leucin niedergeschlagen, das erst nach mehrtägigem Stehen bei 4° krystallisierte. Seine Menge betrug bei Vereinigung der aus zwei Versuchen erhaltenen Substanz 0,65 g. Die alkalisch-alkoholische Lösung der Krystalle ist linksdrehend.

d-l-Leucinamid und Nierenpreßsaft.

Auch für diesen Versuch wie für die folgenden wurden Organe vom Kalb verwendet.

Der Versuch wurde in gleicher Weise durchgeführt. 2 g d-l-Leucinamid ergaben 0,93 g β -Naphthalinsulfo-d-leucinamid. Die optische Aktivität stand etwas hinter dem bei dem Leberversuch erhaltenen Präparat zurück. Die 3%ige Lösung dreht 2° 24' nach rechts. Schmelzpunkt 195—197°, nach dem Umlösen 200—203°. Erhalten an gereinigter Substanz 0,8 g.

0,1813 g Substanz gaben 0,3938 g CO_2

0,1813 > > > 0,1030 > H_2O

0,1718 > > > 13,2 ccm N (18°, 769 mm).

Gefunden: C = 59,23 %, H = 6,31 %, N = 9,01 %.

$C_{16}H_{20}O_3N_2S$. Berechnet: C = 60,00 %, H = 6,25 %, N = 8,75 %.

Die erhaltene Menge an linksdrehendem β -Naphthalinsulfo-l-leucin betrug 0,64 g.

Bei der Behandlung von d-l-Leucinamid mit Milzpreßsaft war das erhaltene Naphthalinsulfoleucinamid schwächer aktiv: die 2%ige Lösung drehte 0° 36' nach rechts.

d-l-Alaninamid und Nierenpreßsaft.

Zu den Versuchen wurde analysenreines bromwasserstoffsaures d-l-Alaninamid angewandt. Im übrigen wurde der Versuch wie beim Leucinamid durchgeführt. Das erhaltene β -Naphthalinsulfoalaninamid war stark rechtsdrehend. Die 2%ige Lösung (1 Teil Spirit, 1 Teil Normalnatronlauge) drehte die Ebene des polarisierten Lichts 1° 18' nach rechts. Unter dem Mikroskop erscheinen die Krystalle als spitze Blättchen, die

zu Fächern und Rosetten gelagert sind. Sie schmelzen scharf bei 232—233° (korr.).

Zur Analyse wurde bei 100° getrocknet.

0,0990 g Substanz gaben 0,2059 g CO₂ und 0,0480 g H₂O.

0,1152 » » » 10,0 ccm N (19°, 759 mm).

Gefunden: C = 56,72%, H = 5,38%, N = 10,01%.

C₁₃H₁₄O₃N₂S. Berechnet: C = 56,11%, H = 5,04%, N = 10,07%.

d-l-Alaninamid und Fleischpreßsaft.

Es wurde gleichfalls optisch-aktives Naphthalinsulfoalaninamid erhalten. Die 2%ige Lösung drehte jedoch nur 0° 45' nach rechts. Nach der Umfüllung schmolzen die Krystalle bei 230°, nachdem bereits vorher Braunfärbung aufgetreten war. Unter dem Mikroskop mehr spitze, zu Büscheln gelagerte Nadelchen als Blättchen.

0,1692 g Substanz gaben 15,0 ccm N (18°, 758,5 mm).

Gefunden: 10,26% N

Berechnet: 10,07% »

Spaltung des d-l-Leucinamid und d-l-Alaninamid durch Placenta.¹⁾

Das nach der Vorschrift von Löb und Higuchi hergestellte Placentapulver erwies sich gegen Leucinamid unwirksam, während der frisch hergestellte Placentabrei, gewonnen gleichfalls nach der Vorschrift von Löb und Higuchi, sich gegenüber Leucinamid und Alaninamid als wirksam erwiesen.

1. Placentabrei und Leucinamid. Eine Lösung von 1 g bromwasserstoffsäurem Leucinamid in 20 ccm Wasser unter Zusatz von 0,5 g Placentapulver und 0,5 g Toluol wurde 48 Stunden bei 37° gehalten. Die filtrierte Lösung wurde nach kurzem Aufkochen unter Zusatz verdünnter Essigsäure von geringen Mengen Eiweißstoffen befreit, das klare Filtrat neutralisiert und mit ätherischer β-Naphthalinsulfochloridlösung nach Zusatz von Normalnatronlauge bis zur alkalischen Reaktion unter Kontrolle und eventuell Wiederherstellung schwach alkalischer Reaktion 6 Stunden auf der Maschine geschüttelt. Der Niederschlag wurde abfiltriert. Er wurde

¹⁾ Die Durchführung dieser Versuche verdanken wir Herrn Prof. W. Löb-Berlin.

aus verdünntem Alkohol krystallisiert und erwies, in 20 ccm Alkohol gelöst, als optisch inaktiv, Schmelzpunkt 177° . Die Wiederholung des Versuches mit frisch hergestelltem Pulver gab dasselbe Resultat, so daß in ihm ebenfalls kein das Leucinamid spaltendes Enzym enthalten ist.

2. Im Gegensatz hierzu gelingt die Spaltung mit dem frischen Placentabrei.

50 g desselben wurden mit 150 ccm physiologischer Kochsalzlösung, 1 g bromwasserstoffsauerm Leucinamid und 2 ccm Toluol bei 37° 48 Stunden digeriert. Die Behandlung war die gleiche wie bei dem Pulver. Der durch Essigsäure und Kochen erzeugte Eiweißniederschlag war naturgemäß weit reichlicher als bei Anwendung des Pulvers. Die in der geschilderten Weise durchgeführte Schüttelung mit der ätherischen Naphthalinsulfochloridlösung ergab folgendes Resultat:

Der entstandene Niederschlag wurde sofort aus verdünntem Alkohol umkrystallisiert und zeigte, in 20 ccm Alkohol wieder gelöst, im 1 ccm-Rohr eine Rechtsdrehung von $0,51^{\circ}$. Aus der alkalischen Schicht waren durch Salzsäure fällbar 0,2 g sirupöser Substanz, welche langsam in Eis erstarrten. Dieselben in 20 ccm verdünnter Natriumlauge gelöst, drehten im 2 ccm-Rohr $0,75^{\circ}$ nach links.

Ein zweiter Versuch mit dem Placentabrei gab qualitativ dasselbe Resultat.

3. In derselben Weise wie das Leucinamid wurde das Alaninamid in seinem Verhalten gegen Placentabrei geprüft. Nach der Schüttelung mit der ätherischen Naphthalinsulfochloridlösung wurden als unlöslich 0,2 g Substanz erhalten, die in 20 ccm Alkohol gelöst, im 1 ccm-Rohr die Polarisationssebene um $0,2^{\circ}$ nach rechts drehten, und aus verdünntem Alkohol in breiten Nadeln erhalten wurden. In Äther gelöst, blieben 0,6 g sirupöser langsam krystallinisch erstarrender Substanz, die, in 20 ccm Alkohol gelöst, im 2 ccm-Rohr $0,5^{\circ}$ nach links drehten. Aus der alkalischen Flüssigkeit mit Salzsäure gefällt und mit Äther aufgenommen wurden 0,25 g Substanz, welche keine deutliche Ablenkung der Polarisationssebene hervorriefen. Die Substanz ließ sich aus ganz verdünntem Alkohol

umkrystallisieren, zeigte den Schmelzpunkt 220° und bestand wahrscheinlich aus dem Derivat des d-l-Alanins (218°).

Kupferverbindung des d-l-Leucinamids.

Löst man bromwasserstoffsäures Leucinamid in Wasser, fügt wenig verdünnte Natronlauge und tropfenweise sehr verdünnte Kupfersulfatlösung hinzu, so erhält man eine zwiebelrote Färbung nach Art der Biuretreaktion von Peptonen und Albumosen. Weitere Mengen Kupfersulfat führen die Farbe in violettrot über. Stellt man die Reaktion in etwas konzentrierter Lösung an, so scheidet sich bald ein dichter Niederschlag ab, der anfänglich heller erscheint als die Lösung und daher zunächst für Leucinkupfer gehalten wurde. Beim Absetzen zeigt sich jedoch bald, daß der Niederschlag selbst rot gefärbt ist und die Lösung nur noch wenig rotviolett erscheint. Der so entstandene Niederschlag ist zunächst nicht krystallinisch. Es gelang, die Verbindung in folgender Weise zu krystallisieren: Die rote Fällung wird abgesaugt, in Normal-salzsäure gelöst, stark verdünnt und die der Säure genau entsprechende Menge Normalnatronlauge hinzugefügt, wobei Rotfärbung, aber kein Niederschlag auftritt. Es wird filtriert und im Vakuum bis zum Auftreten eines Niederschlags eingeeengt. Der jetzt entstehende Niederschlag ist stets krystallinisch. Seine Menge überstieg auf 1 g angewandte Substanz 0,15 g nicht.

Das rote KupfersalzkrySTALLISIERT in schönen flachen Prismen, die makroskopisch zwiebelrot erscheinen, aber auch unter dem Mikroskop noch rötlich durchscheinend sind. Sie schmelzen scharf bei $222\text{--}223^{\circ}$ (korr.) unter Aufschäumen und Zersetzung. Sie sind krystallwasserfrei. Zur Analyse wurde bei 100° getrocknet.

0,1060 g	Substanz	gaben	0,1154 g	CO_2 .
0,1060	»	»	0,0770	» H_2O .
0,1060	»	»	0,0262	» CuO .
				(Schiffchen zurückgewogen).
0,1050	»	»	15,6	ccm N (18° , 761 mm).
0,0501	»	»	0,0121	g CuO .

Gefunden:	C	=	29,69 %
	N	=	17,25 %
	H	=	8,14 %
	Cu	=	19,70 %