

Über Verbindungen von Aminosäuren und Ammoniak. VII. Mitteilung.

Von
Peter Bergell und Paul Boll.

(Der Redaktion zugegangen am 22. Dezember 1911.)

Nach Auffindung der asymmetrischen Fermenthydrolyse des Leucinamids war es von Interesse, zu untersuchen, ob das Ferment, das diese Verseifung durchführt, mit den anderen proteolytischen und peptidspaltenden Fermenten identisch ist oder von ihnen differenziert werden kann.

Durch vier Versuche konnte festgestellt werden, daß die im Pankreassaft enthaltenen Fermente, soweit sie Eiweiß oder Aminosäurederivate spalten, durch Einwirkung von Normalsalzsäure mehr oder weniger geschädigt, in einem Falle sogar gänzlich unwirksam wurden.

Am wenigsten wurde das «Seidenpepton» spaltende Ferment angegriffen, während bei unserer Versuchsanordnung die Fermente, welche «Casein» und «Fibrin» verdauen, scheinbar schon beträchtlich mehr geschädigt wurden. Das «Leucinamid» spaltende Ferment wurde jedenfalls vollständig zerstört.

Die Einwirkung von Salzsäure auf Pankreatin geschah in der Weise, daß 1 g wirksames Pankreatin mit 50 ccm normaler Salzsäure gut verrieben und eine Nacht stehen gelassen wurde. Vor ihrer Verwendung wurde die Lösung mit Natriumbicarbonat neutralisiert, außerdem ein Überschuß zugefügt, so daß die Lösung 0,1% Natriumbicarbonat enthielt.

Die Lösung, welche zu den Kontrollversuchen verwendet wurde, enthielt ebenfalls 2% Pankreatin und 0,1% Natriumbicarbonat.

I. Versuch:

a) 3 ccm einer 20%igen Seidenpeptonlösung wurden mit 10 ccm der unbehandelten Pankreatinlösung, einem Tropfen Ammoniak und 2 Tropfen Toluol versetzt und 24 Stunden im Brutschrank erwärmt.

Das nach dieser Zeit abgeschiedene Tyrosin wurde auf dem Goochtiiegel abgesaugt, mit 5 ccm kaltem Wasser gewaschen, bei 110° getrocknet und, ohne umzukristallisieren, gewogen.

Gef.: 0,0651 g.

b) Das gleiche Volumen Seidenpeptonlösung wurde mit 10 ccm der mit Normalsalzsäure behandelten Pankreatinlösung, einem Tropfen Ammoniak und 2 Tropfen Toluol versetzt und ebenfalls 24 Stunden in den Brutschrank gestellt.

Das abgeschiedene rohe Tyrosin wurde wie oben isoliert. Seine Menge betrug 0,0549 g.

Morphologisch glich das Präparat dem Kontrollversuch a).

II. Versuch:

a) ca. 2 g Casein wurden mit 10 ccm der in Versuch Ia) verwendeten Pankreatinlösung und 2 Tropfen Toluol versetzt und darauf 4 Stunden im Brutschrank aufbewahrt.

Nach dieser Zeit wurde mit Essigsäure angesäuert, vom unverdauten Casein abgesaugt und vom Filtrat eine Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl ausgeführt.

Gef.: N = 0,4069 %.

b) Die gleiche Menge Casein wurde mit 10 ccm der mit Salzsäure behandelten Pankreatinlösung und 2 Tropfen Toluol versetzt und dieselbe Zeit in den Brutschrank gestellt.

Die nach dem Ansäuern mit Essigsäure ausgeführte Stickstoffanalyse des Filtrates gab

N = 0,1512 %.

III. Versuch:

a) ca. 2 g Fibrin wurden mit 10 ccm der unbehandelten Pankreatinlösung und 2 Tropfen Toluol versetzt und 4 Stunden in den Brutschrank gestellt. Darauf wurde vom unverdauten Fibrin abgesaugt und im Filtrat der Stickstoff bestimmt.

Gef.: N = 0,4368 %.

b) Die gleiche Menge Fibrin wurde mit 10 ccm der mit Salzsäure behandelten Pankreatinlösung und 2 Tropfen Toluol versetzt und die gleiche Zeit in den Brutschrank gestellt.

Die Stickstoffanalyse des Filtrates gab

N = 0,0651 %.

Bei längerer Verdauungszeit verdaut auch die mit Salzsäure behandelte Pankreatinlösung Casein und Fibrin wieder kräftiger, wenn auch nie so stark wie die unbehandelte.

IV. Versuch:

Durch diesen Versuch konnte nachgewiesen werden, daß das im Pankreatin enthaltene Ferment, welches Leucinamid in l-Leucin, Ammoniak und d-Leucinamid spaltet, durch längere Einwirkung von Normalsalzsäure vollständig unwirksam wurde.

1 g reines bromwasserstoffsäures Leucinamid wurde mit 10 ccm der mit Normalsalzsäure behandelten Pankreatinlösung und 2 Tropfen Toluol versetzt und 24 Stunden im Brutschrank aufbewahrt. Während dieser Zeit konnte keine Änderung der optischen Aktivität festgestellt werden. Die Lösung wurde filtriert, mit 5 ccm Normalnatronlauge versetzt und 4 Stunden mit einer ätherischen β -Naphthalinsulfochloridlösung (5 g β -Naphthalinsulfochlorid + 50 ccm Äther) auf der Maschine geschüttelt. Die entstandene Fällung wurde abgesaugt, das Filtrat nochmals mit dem gleichen Volumen Normalnatronlauge versetzt und auf der Maschine geschüttelt. Nach 2 Stunden konnte noch eine kleine Menge Krystalle abgesaugt werden. Die Gesamtmenge der so gewonnenen farblosen Abscheidung war nach dem Auswaschen mit Wasser 0,64 g. Zur Reinigung wurde sie aus heißem Alkohol umkrystallisiert, mit kaltem Wasser, wenig verdünntem Alkohol und absolutem Äther gewaschen. Die Menge an reiner Substanz betrug 0,36 g.

Zum Nachweis ihrer optischen Inaktivität wurde sie in 9 ccm Normalnatronlauge und 9 ccm Alkohol gelöst. Diese 2%ige Lösung zeigte im 2-dm-Rohr keine Drehung; ebenso waren sämtliche Mutterlaugen inaktiv.

Die durch Ansäuern mit Normalsalzsäure wieder abgeschiedene Substanz schmilzt scharf bei 173—175° (unkorr.). Sie wurde zur Analyse im Toluolbad getrocknet.

0,1656 g Substanz gaben 0,3653 g CO₂; 0,0937 g H₂O.

0,1646 „ „ „ 12,2 ccm N (17° und 768 mm).

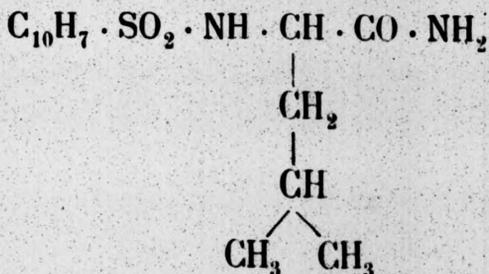
Für $C_{16}H_{20}N_2O_3S$ wurde

Ber.: C = 60,00; H = 6,25; N = 8,75

Gef.: C = 60,16; H = 6,29; N = 8,65.

Die Substanz bildet lange weiße Nadeln. Aus ihrer wässerigen Lösung krystallisiert sie in langen, zu Büscheln verwachsenen Spießen. Sie ist leicht löslich in absolutem Alkohol, Aceton und Chloroform, schwer löslich in Benzol, sehr schwer löslich in Wasser, unlöslich in Äther.

Wie optische Bestimmung und Schmelzpunkt zeigen, ist durch die mit Salzsäure behandelte Pankreatinlösung keine Spaltung des Leucinamids eingetreten; vielmehr stellt obiger Körper das β -Naphthalinsulfo-d-l-Leucinamid vor, dessen Strukturformel folgende ist:



Die optisch aktive Modifikation, das β -Naphthalinsulfo-d-Leucinamid, ist bereits in der IV. Mitteilung beschrieben. Bei der starken spezifischen Drehung derselben scheint es ausgeschlossen, daß in dem beschriebenen Versuche noch eine irgendwie erhebliche Fermentspaltung stattgefunden hatte.

Natürlich liegt auch hier die Frage vor, ob etwa die Fermentwirkung nur verdeckt ist, nicht eine Zerstörung des Fermentes stattgefunden hat. Derartige Vorgänge haben ja bei früheren Versuchen der Trennung von tryptischen Fermenten oft unklare oder unrichtige Vorstellungen ergeben, wie z. B. die Untersuchungen über die Existenz einer Glutinasin seiner Zeit zeigten.

Im vorliegenden Falle dürften derartige Täuschungen nicht stattfinden, denn zugesetzte Fermentmengen leiteten die Fermentspaltung prompt wieder ein, ohne daß eine Änderung des Milieus vor sich ging. Es erscheint uns daher hinreichend wahrscheinlich, daß Leucinamidspaltung und Tyrosinpeptidspaltung durch verschiedene Fermente hervorgerufen wird.