

Über die Verwendbarkeit der Estermethode zum Nachweis von Monoaminosäuren neben Polypeptiden.

Von

Emil Abderhalden und Rudolf Hanslian.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Halle a. S.)

(Der Redaktion zugegangen am 28. Februar 1912.)

Bei der Untersuchung der Spaltbarkeit von Polypeptiden durch bestimmte Fermente wurde neben der optischen Methode das erhaltene Resultat fast durchweg durch Isolierung der gebildeten Spaltprodukte kontrolliert. Eine Fermentwirkung ist dann als sicher festgestellt zu betrachten, wenn ein racemisches Polypeptid asymmetrisch gespalten wird. Die bei der Zerlegung von Polypeptiden gebildeten Monoaminosäuren wurden bald direkt durch Krystallisation oder durch besondere Fällungsmittel abgetrennt, bald wurden sie über ihre Ester isoliert. Die Estermethode wurde ferner vielfach angewandt, um aus Verdauungsgemischen des Darmkanals Monoaminosäuren zu isolieren. Unsere Vorschrift lautet bei der Anwendung der Estermethode zur Trennung von Aminosäuren von komplizierter gebauten Produkten: 1. Es ist das Wasser sorgfältig zu entfernen. Wir dampfen unter vermindertem Druck zur Trockene ein und wiederholen das Eindampfen unter Zugabe von absolutem Alkohol mehrmals. Es ist klar, daß die Gegenwart von Wasser die Veresterung stört und auch Fehlerquellen bedingen kann. 2. Die Veresterung wird mit sorgfältig getrockneter gasförmiger Salzsäure durchgeführt. 3. Es wird etwa das zehnfache Volumen Alkohol angewendet. 4. Endlich wird die Veresterung unter Kühlung durchgeführt und unter den gleichen Bedingungen 3—5mal wiederholt. 5. Um zu verhindern, daß der absolute Alkohol Wasser anzieht, legen wir während der Veresterung ein Chlorcalciumrohr vor. Nach erfolgter Veresterung wird das Gefäß sofort sorgfältig verschlossen. Wir haben uns durch

Kontrollversuche davon überzeugt, daß unter den gewählten Bedingungen die Veresterung eine gute ist, und gleichzeitig eine Spaltung von aus mehreren Aminosäuren bestehenden Produkten nicht eintritt.

Wir haben die Sicherheit der Methode nochmals mit der von van Slyke¹⁾ ausgearbeiteten Methode geprüft. Es zeigte sich, wie die unten mitgeteilten Resultate ergeben, daß unter Innehaltung der erwähnten Vorsichtsmaßregeln eine Spaltung der untersuchten Polypeptide bei der Veresterung nicht eintritt. Die von Pribram²⁾ geäußerte Befürchtung trifft für die von uns gewählten und stets befolgten Bedingungen somit nicht zu. Untersucht wurden: dl-Leucyl-glycin, Glycyl-glycin, dl-Alanyl-glycyl-glycin, Glycyl-dl-leucyl-glycin, dl-Leucyl-diglycyl-glycin. Selbst bei der Veresterung ohne Kühlung trat bei den höher molekularen Polypeptiden keine Spaltung ein. Es nahm auffallenderweise der Aminostickstoff sogar eher ab. Bei der Veresterung ohne Kühlung trat stets starke Erwärmung ein.

Angewandte Substanz	Mol.-Gew.	Be-rechnet Ges.-N	Be-rechnet Amino-N	Gefunden Amino-N			
				vor der Ver-esterung	nach der Ver-esterung in der Kälte	nach der Ver-esterung ohne Kühlung	
dl-Leucyl-glycin	188,15	14,89	7,445	7,37	6,92 6,99	8,904 8,816) Di-peptide
salzsaures Glycyl-glycin	168,54	16,62	8,31	7,73	7,74	8,45	
dl-Alanyl-glycyl-glycin	203,13	20,69	6,89	6,44	6,65 6,55	6,39 6,18) Tri-peptide
Glycyl-dl-leucyl-glycin	245,17	17,15	5,714	—	5,992	5,504	
dl-Leucyl-diglycyl-glycin	302,21	18,54	4,63	—	4,392	4,24) Tetra-peptide

¹⁾ Vgl. Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden, Bd. 5, Teil 2, S. 995.

²⁾ Bruno Oskar Pribram, Über die Anwendbarkeit der Ester-methode bei Stoffwechselversuchen. Diese Zeitschrift, Bd. 71, S. 472, 1912.

Wir haben ferner Seidenfibroin unter Kühlung und ohne eine solche verestert. Es gingen keine stickstoffhaltigen Produkte in Lösung. Bei sechsstündigem Kochen mit dem mit Salzsäure gesättigten Alkohol wurden ganz beträchtliche Mengen von Aminogruppen frei gelegt. Diese Beobachtung findet sich im Einklang mit der Feststellung, daß beim Kochen von Seidenfibroin mit salzsäuregesättigtem Alkohol Aminosäuren abgespalten werden. Pribram¹⁾ hat bereits auf diesen Umstand hingewiesen. Beim Casein nimmt während der Veresterung der Aminostickstoff etwas zu. Nach sechsstündigem Kochen des beim Verestern entstandenen Gemisches nahm der Aminostickstoffwert nur unbedeutend zu — im Gegensatz zum Verhalten des Seidenfibroins. Auffallenderweise wurde weniger Aminostickstoff erhalten, wenn die Veresterung ohne Kühlung durchgeführt wurde, ja es fand fast gar keine Vermehrung des Aminostickstoffs, verglichen mit dem Aminostickstoffwert des Ausgangsmaterials, statt. Diese Beobachtung deckt sich mit den bei den komplizierter gebauten Polypeptiden gemachten Erfahrungen.

1. Seidenfibroin (Seidenabfälle).

5 g Seide wurden mit so viel absolutem Alkohol versetzt, daß sie ganz mit diesem durchtränkt waren. Dann wurde sorgfältig getrocknete gasförmige Salzsäure unter vollständigem Ausschluß von Wasser (Chlorcalciumrohr!) bis zur Sättigung eingeleitet. Bei dem einen Versuch wurde hierbei gekühlt, bei einem zweiten dagegen nicht. Es war kein Stickstoff im Alkohol nachweisbar. Nun wurde 6 Stunden am Rückflußkühler gekocht und das Gemisch dann unter vermindertem Druck bei 40° des Wasserbades zur Trockene verdampft. Der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und das Gemisch in einem Maßkolben auf ein bestimmtes Volumen gebracht. Dann wurden in aliquoten Teilen die folgenden Werte bestimmt:

Gesamtstickstoff: 18,51 %,

Aminostickstoff: 4,762 %.

¹⁾ l. c.

Zu dieser Bestimmung waren die gelösten und ungelösten Bestandteile gemischt verwendet worden. Eine weitere Bestimmung wurde mit dem Filtrat nach Abtrennung der festen Bestandteile vorgenommen.

Gesamtstickstoff: 10,15%.

Aminostickstoff: 4,196%.

2. Casein.

Das verwendete Casein war nach Hammarstens Vorschrift dargestellt worden. Es enthielt in dem Zustande, in dem wir es verarbeiteten, 13,33% Stickstoff und 0,729% Aminostickstoff. Nach der Veresterung unter Kühlung stieg der letztere Wert auf 1,150%. Bei der Veresterung ohne Kühlung wurden 0,793% Aminostickstoff erhalten. In beiden Fällen wurde das Gemisch nach beendigtem Einleiten der Salzsäure 6 Stunden am Rückflußkühler gekocht. Im ersteren Fall wurden gefunden 1,782% Aminostickstoff und 1,611% Ammoniakstickstoff. Bei der Probe, die ohne Kühlung verestert worden war, erhielten wir 1,354% Aminostickstoff und 1,533% Ammoniakstickstoff.

Aus den erhaltenen Resultaten geht hervor, daß die Estermethode unter den richtigen, schon wiederholt beschriebenen Bedingungen angewandt, ohne Gefahr einer Spaltung zum Nachweis von Monoaminosäuren neben kompliziert gebauten Abbaustufen verwendet werden kann.