

Diese Thatsachen sprechen für die Annahme, dass beide Phosphoratome direct an Kohlenstoff gebunden sind, denn eine P—O—C-Bindung sollte leicht verseifbar sein.

Die Bildung der Säure verläuft demnach wohl in zwei Phasen. Zuerst entsteht acetylphosphorige Säure $H_3CCO \cdot PO(OH)_2$ ¹⁾, indem das direct an Phosphor gebundene Wasserstoffatom der phosphorigen Säure²⁾ durch Acetyl ersetzt wird. An die Carbonylgruppe lagert sich dann weitere phosphorige Säure an, vielleicht unter Bildung einer ähnlichen, aber viel beständigeren Bindung wie zwischen Ketonen oder Aldehyden und Bisulfit.

Die so entstandene Formel $H_3CC(OH)[PO(OH)_2]_2$ steht mit den bis jetzt beobachteten Thatsachen in gutem Einklang; doch werden wir nicht ermangeln, durch eine genaue Untersuchung der aus Benzoylchlorid und Eisessig entstehenden analogen Verbindung weiteres Material zu beschaffen.

357. F. Röhmann: Zur Kenntniss der bei der Trypsinverdauung aus dem Casein entstehenden Producte. I.

[Aus dem chem. Laboratorium des physiologischen Instituts zu Breslau.]

(Eingegangen am 9. August.)

Bekanntlich ist in der Bauchspeicheldrüse (Pancreas) ein Eiweiss verdauendes Ferment, das Trypsin, enthalten, unter dessen Wirkung, ähnlich wie beim Kochen mit Säuren, aus dem Eiweiss neben peptonartigen Körpern krystallinische Producte — Amidosäuren und Säureamide der fetten und aromatischen Reihe — entstehen.

Für das Studium der Eiweisszersetzung besitzt das Trypsin gegenüber dem Kochen mit Säuren zunächst den Vortheil, dass die Zersetzung anscheinend (vgl. R. Cohn, Z. f. physiol. Chem. 22, 153) nicht so tiefgreifend ist, wie bei diesem, dass stets eine bestimmte, beschränkte Anzahl von Verdauungsproducten entsteht und secundäre Reactionen ausgeschlossen erscheinen.

Die bei der Trypsinwirkung aus dem Eiweiss entstehenden Producte sind bisher nur wenig eingehend untersucht worden. Ein Weg zur systematischen Trennung der Amidosäuren ist kaum vorhanden.

Im Folgenden sollen zunächst einige Beobachtungen, die zur Auffindung einer einfachen und sicheren Methode zur Darstellung des Leucins (α -Amidoisobutylelessigsäure) führten, beschrieben werden.

¹⁾ Menschutkin, Ann. d. Chem. 133, 317; Wedensky, Ber. russ. chem. Ges. 20, 31.

²⁾ Michaelis und Becker, diese Berichte 30, 1003.

Zu den Verdauungsversuchen wurde anfangs, unter Benutzung der Erfahrungen von W. Kühne, eine ziemlich reine Trypsinlösung in folgender Weise dargestellt: Die frische Bauchspeicheldrüse vom Rinde bleibt einen Tag liegen, wird zerkleinert und mit Chloroformwasser bei 35° mehrere Stunden extrahirt. Das Extract wird durch Faltenfilter filtrirt, mit soviel Soda versetzt, dass die Lösung 0.5 pCt. davon enthält und unter Zusatz von Thymol der Selbstverdauung überlassen, dann wird filtrirt und mit Ammoniumsulfat gesättigt. Der Niederschlag wird abfiltrirt, auf einer Thonplatte ausgebreitet, in Wasser gelöst und zwei Tage in fließendem Wasser dialysirt. Die filtrirte Flüssigkeit löst Fibrin in kurzer Zeit auf.

Als Eiweisskörper benutzte ich zur Verdauung das Casein. Dasselbe ist ein einheitlicher, leicht in grossen Quantitäten zu gewinnender Stoff. Es wurde mir in vorzüglicher Reinheit als solches bezw. in Form von Nutrose (Caseinnatrium) von Seiten der Farbwerke vorm. Meister, Lucius & Brüning zu Höchst a/M. freundlichst zur Verfügung gestellt.

Das Casein wurde in 1-procentiger Sodalösung von der obigen Trypsinlösung in wenigen Tagen unter Bildung reichlicher Mengen von Tyrosin und Leucin verdaut.

Die Versuche, aus dem Rohleucin reine Producte herzustellen, zeigten jedoch bald, dass man nur dann zum Ziele gelangen konnte, wenn man mit nicht zu kleinen Mengen desselben arbeitete. Für die Gewinnung grösserer Mengen Leucin war es aber überflüssig, die reine Fermentlösung zu benutzen; es genügte hierzu das Chloroformwasserextract des Pancreas. Dass das aus dem Casein entstehende Leucin hierbei durch die aus dem Infus selbst sich bildenden Verdauungsproducte verunreinigt wurde, war für die vorliegenden Zwecke unwesentlich.

Es wurden nunmehr 500 g Nutrose mit 25 g kohlensaurem Natrium und 5 Liter Wasser, welche das Extract von etwa 1500 g Pancreas enthielten, unter Zusatz von 50 ccm 10-procentiger alkoholischer Thymolösung etwa 8 Tage bei 35° stehen gelassen. Meist schied sich hierbei die ganze Menge des Tyrosins, die überhaupt aus dem Casein entstehen kann, aus. Aus dem Tyrosin lässt sich unmittelbar oder nach vorherigem Umkrystallisiren aus Ammoniak der salzsaure Tyrosinäthylester darstellen. Er ist in Wasser leicht löslich und krystallisirt aus Alkohol-Aether oder Essigester in seidenglänzenden Nadeln vom Schmp. 166°.

Die vom Tyrosin durch Leinwand abfiltrirte Flüssigkeit wird genau mit der zur Neutralisation des kohlensauren Natriums erforderlichen Menge Salzsäure versetzt, eine Zeit lang über freiem Feuer erhitzt und zur Abscheidung eines geringen Niederschlages filtrirt. Beim Eindampfen des Filtrates scheidet sich zuerst Tyrosin ab in

Fällen, in denen die Abscheidung desselben nicht schon vorher vollständig erfolgt war. Es lässt sich durch Erwärmen mit Wasser von anhaftendem Leucin befreien. Bei weiterem Einengen scheidet sich die Hauptmenge des Leucins körnig krystallinisch aus. Es wird, nachdem die Abscheidung in der Kälte möglichst vollständig erfolgt ist, auf einem Leinwandtuche gesammelt, abgepresst, mit wenig Wasser, dann zuerst mit 75-procentigem, weiter mit 94-procentigem Alkohol gewaschen.

Nach der bisher üblichen Weise versuchte man aus dem Rohleucin durch Fällung mit Kupferhydrat oder essigsauerm Kupfer reines Leucin zu gewinnen. Die Abscheidung unlöslicher Kupferverbindungen gelingt stets, wenn man die auf Grund einer Stickstoffbestimmung berechneten Mengen frisch gefällten Kupferhydroxyds unter Einleiten von Dampf in die Leucinlösung einträgt oder die concentrirte Leucinlösung heiss mit heiss gesättigter Kupferacetatlösung versetzt. Die Fällung des Leucins ist aber nur sehr unvollständig; ausserdem enthält der Kupferniederschlag stets ein Gemenge von mehreren Amidosäuren, aus denen erst durch erneute Fällung mit Kupfer oder Umkrystallisiren aus ammoniakhaltigem Alkohol und ähnlichem unter erheblichen Verlusten reines Leucin gewonnen werden kann.

Zweckmässiger erwies sich das folgende Verfahren:

Das Rohleucin wird in verdünnter Salzsäure (auf 1 Atom Stickstoff ein Molekül Salzsäure) gelöst, auf dem Wasserbade eingengt und dann in eine Kältemischung gestellt. Die Flüssigkeit erstarrt zu einem Krystallbrei, der auf einem mit einer Kältemischung umgebenen Trichter (Plantamon'scher Trichter, mit Watte umhüllt) abgesaugt wird. Er wird noch einmal in wenig Wasser gelöst, wieder in der Kälte auskrystallisirt, abgesaugt und auf Thonplatten ausgebreitet; man erhält eine weisse, feste Krystallmasse, die in ihrer Hauptmenge aus salzsaurem Leucin besteht. Zur Gewinnung eines reinen Präparates benutzte ich, einer Anregung von A. Liebrecht folgend, die Darstellung des salzsauren Leucin-Aethylesters. Das salzsaure Leucin wird entweder in absolutem Alkohol unter Einleiten von Salzsäuregas oder besser nach E. Fischer durch Kochen mit 3—4 pCt. Salzsäure enthaltendem Alkohol verestert. Nach dem Verdunsten des Alkohols bleibt ein Syrup, der sehr bald zu einem Krystallbrei erstarrt. Er wird soweit als möglich abgesaugt, auf Thonplatten ausgebreitet und einige Tage über Kaliumhydroxyd stehen gelassen. Die Masse wird farblos, trocken, leicht zerreiblich.

Der über Schwefelsäure getrocknete salzsaure Methylester des Leucins lässt sich besonders unter Benutzung von Kälte leicht aus einem siedenden Gemisch von Essigester und Ligroin umkrystallisiren. Er krystallisirt in langen, schmalen Prismen und hat nach mehrmaligem Umkrystallisiren den Schmp. 134°.

Analyse: Ber. für $C_8H_{13}NO_3Cl$.

Procente: C 49.10, H 9.21, N 7.16.

Gef. » » 49.06, 49.37, » 9.22, 9.31, » 7.29.

In 5-proc., absolut alkoholischer Lösung betrug das Drehungsvermögen

$$[\alpha]_D + 18.4^\circ.$$

Erhitzt man die wässrige Lösung des activen, salzsauren Leucin-äthylesters oder direct das rechtsdrehende salzsaure Leucin 2—3 Tage im zugeschmolzenen Rohr auf etwa 200° , so sinkt das Drehungsvermögen auf ein Minimum, und es hinterbleibt beim Verdunsten der Lösung ein salzsaures Leucin, welches einen inactiven salzsauren Leucinäthylester vom Schmp. 112° liefert. Derselbe erwies sich als identisch mit einem Leucin, das aus käuflichem Valeraldehyd (Isovaleraldehyd?) dargestellt war. Der Valeraldehyd siedete bei $92-95^\circ$ und drehte in 2-Decimeterrohr $\alpha + 38'$.

Die dem Leucin entsprechende Leucinsäure¹⁾ wurde aus dem Rohleucin dargestellt. Das Leucin wurde in etwa 1 Molekül stark verdünnter Schwefelsäure gelöst und mit der wässrigen Lösung von etwa 1 Molekül Natriumnitrit allmählig in der Kälte versetzt. Die Lösung blieb solange stehen, bis die Stickstoffentwicklung aufgehört hatte. Etwa überschüssige salpetrige Säure wurde durch Zusatz von Harnstoff entfernt; dann wurde neutralisirt, eingedampft und mit Alkohol extrahirt. Der Alkoholextract wurde mit Schwefelsäure angesäuert und mit Aether geschüttelt. Der Aetherextract wurde in wenig Wasser gelöst, filtrirt und mit einer conc. Lösung von essigsäurem Kupfer gefällt. Der Niederschlag, der die Oxysäure enthielt, wurde abfiltrirt, mit Wasser gewaschen und in Salzsäure gelöst; die Lösung wurde mit Aether ausgeschüttelt. Beim Verdunsten des Aethers blieb ein Rückstand, der beim Stehen über Schwefelsäure allmählig krystallinisch erstarrte. Er wurde in wenig alkoholfreiem Aether gelöst und mit Petroleumäther versetzt. Es krystallisirt die Oxysäure aus. Sie schmolz zunächst unscharf bei 65° . Nach wiederholtem Umkrystallisiren schmolz sie constant bei 78° .

Analyse: Ber. für $C_8H_{12}O_3$.

Procente: C 53.78, H 9.09.

Gef. » » 53.87, » 9.06.

Die aus dem bei der Pancreasverdauung entstehenden Leucin erhaltene Leucinsäure drehte

$$[\alpha]_D - 7.6^\circ.$$

Die inactive Leucinsäure, welche aus inactivem Leucin dargestellt worden war, schmolz bei 74° .

¹⁾ Vergl. B. Gmelin, Z. f. physiol. Chem. 18, 21 und E. Schulze und A. Likiernik, ebenda 17, 512.