

84. Weitere Versuche über die Einwirkung von Leberfermenten auf Aminosäuren

von P. Karrer und R. Appenzeller.

(19. III. 43.)

Während *d,l*-N-Methylalanin nach einer Untersuchung von Keilin und Hartree¹⁾ durch das aus getrocknetem Schweinenierenpulver extrahierte Fermentgemisch, das die *d*-Aminosäure-oxydase enthält, oxydativ desaminiert wird, hatten wir festgestellt²⁾, dass diese Fermentlösung N-Butyl-*d,l*-alanin nicht abbaut. Wir prüften jetzt in gleicher Weise *d,l*-N-Äthyl-alanin, *d,l*-N-Dimethyl-alanin und *d,l*-N-Acetyl-alanin auf Abbaufähigkeit durch den Schweinenierenextrakt. Die letzteren beiden Verbindungen verhielten sich völlig beständig, während *d,l*-N-Äthyl-alanin abgebaut wurde; dieser oxydative Abbau ist aber viel langsamer als derjenige des *d,l*-Alanins und *d,l*-N-Methyl-alanins. Nachstehende graphische Darstellung gibt ein Bild über die verschiedenen leichte Angreifbarkeit von *d,l*-Alanin, *d,l*-N-Methyl-alanin, *d,l*-N-Äthyl-alanin und *d,l*-N-Butyl-alanin durch den gleichen Schweinenierenpulver-Extrakt.

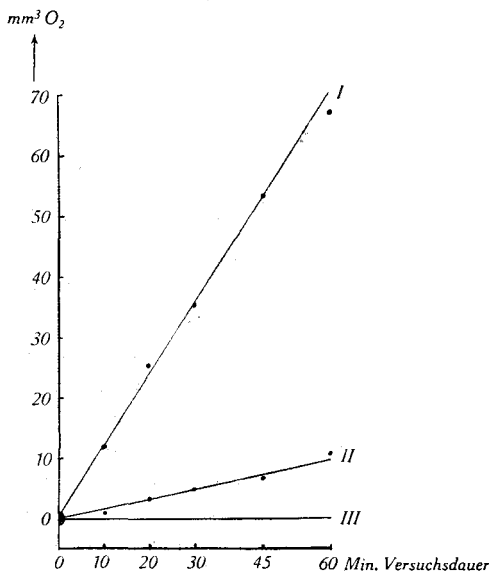


Fig. 1.

Graphische Darstellung der Sauerstoffabsorption bei der fermentativen Einwirkung von Rohextrakt aus Schweinenieren auf verschiedene N-substituierte Alaninderivate.

I. = Alanin, Methylalanin.

II. = Äthylalanin.

III. = Butylalanin, Acetylalanin, α, α' -Imino-dicarbonensäuren, Dimethyl-alanin.

¹⁾ Proc. Roy. Soc. [B] **119**, 114 (1936).

²⁾ Helv. **25**, 1149 (1942).

Es scheint aus diesen Versuchen hervorzugehen, dass bei den N-Alkylderivaten des *d,l*-Alanins die Grenze der Abbaubarkeit beim N-Äthylderivat liegt.

*Handler, Bernheim und Klein*¹⁾ haben die N-Methyl-derivate verschiedener *d,l*-Aminosäuren bezüglich ihrer Oxydierbarkeit durch Extrakte aus getrocknetem Ratten-Nierenpulver und Ratten-Leberpulver verglichen. Hierbei stellten sie fest, dass das aus Nieren gewonnene Fermentpräparat, das die *d*-Aminosäure-oxydase enthält, die N-Methyl-derivate des *d,l*-Methionins, *d,l*-Alanins und *d,l*-Leucins oxydierend demethyliert, das Ferment aus Rattenleber ausserdem *d,l*-N-Methyl-histidin. Dagegen wurden die N-Methyl-derivate von *d,l*-Phenyl-alanin, *d,l*-Tryptophan, *d,l*-Valin und *d,l*-Lysin weder vom Nieren- noch vom Leberferment oxydiert. Andererseits weiss man, dass z. B. der Extrakt von Hammelnieren- bzw. Schweinenieren-Trockenpulver die *d*-Formen des Phenyl-alanins²⁾ und Valins³⁾, deren N-Methyl-derivate gegen die Fermente aus Rattenniere und Rattenmuskel beständig sind, leicht angreift.

Der Umstand, dass *d,l*-N-Methyl-histidin wohl durch das Ferment aus Rattenleber, nicht aber durch dasjenige aus Rattennieren oxydiert wird, während beide Extrakte andere N-Methyl-aminosäuren gleichartig angreifen, zeigt erneut, dass Histidin bzw. sein N-Methyl-derivat nicht durch die gleiche *d*-Aminosäure-oxydase oxydiert wird, die z. B. Alanin, Methionin, Prolin, Leucin etc. zu desaminieren vermag²⁾.

Wir haben dann weiterhin Desaminierungsversuche von *d,l*-Aminosäuren mit Fermentpräparaten durchgeführt, die aus Trockenpulver von Forellenlebern, Taubenlebern, Mövenlebern, Hühnerlebern und Forellmuskeln durch Extraktion mit Phosphatpufferlösung ($p_{\text{H}} = 7,6$) hergestellt worden waren. Diese führten zu folgenden Ergebnissen:

1. Der Fermentextrakt aus dem Trockenpulver von Forellenlebern baute *d,l*-Alanin, *d,l*-Leucin, *d,l*-Asparaginsäure, *d,l*-Methionin und *d,l*-Phenyl-alanin gut ab, wesentlich weniger *d,l*-Serin; praktisch nicht angegriffen wurden *d,l*-Histidin und *d,l*-Glutaminsäure.

2. Das Fermentpräparat aus Trockenpulver von Taubenlebern oxydierte stark *d,l*-Alanin, *d,l*-Leucin, *d,l*-Methionin und *d,l*-Phenyl-alanin; ganz oder fast wirkungslos erwies es sich gegenüber *d,l*-Asparaginsäure, *d,l*-Histidin, *d,l*-Glutaminsäure und *d,l*-Serin.

3. Der Extrakt aus dem Trockenpulver von Mövenlebern erwies sich als sehr wenig wirksam. Geprüft wurden *d,l*-Alanin, *d,l*-Leucin, *d,l*-Asparaginsäure, *d,l*-Methionin, *d,l*-Histidin und *d,l*-Phenyl-alanin.

¹⁾ J. Biol. Chem. **138**, 203 (1941).

²⁾ P. Karrer und H. Frank, Helv. **23**, 948 (1940).

³⁾ Felix und Zorn, Z. physiol. Ch. **258**, 16 (1939).

Die Ausschläge gegenüber den Blindversuchen waren zu klein, um bestimmte Aussagen machen zu können.

4. Der Extrakt aus dem Trockenpulver von Hühnerlebern verhielt sich wie derjenige aus Mövenlebern; die Wirkung war unbedeutend.

5. Ein Extrakt aus Trockenpulver von Forellenmuskeln war auf *d,l*-Alanin, *d,l*-Methionin, *d,l*-Asparaginsäure, *d,l*-Histidin und *d,l*-Leucin ohne Wirksamkeit.

Aus diesen Versuchen ergibt sich, dass die Lebern verschiedener Tiere grosse Unterschiede im Gehalt von Fermenten, welche *d*-Aminosäuren angreifen, aufweisen. Weiterhin sieht man, dass die Fermentpräparate aus den Organen verschiedener Tiere nicht auf alle Aminosäuren gleichartig wirken; so verhielten sich gegen das Forellenleberferment von den geprüften Aminosäuren nur *d,l*-Histidin und *d,l*-Glutaminsäure refraktär, gegen Taubenleberferment auch *d,l*-Asparaginsäure und weitgehend *d,l*-Serin. Diese Ergebnisse liegen in der gleichen Richtung wie die oben zitierten Beobachtungen von *Handler*, *Bernheim* und *Klein* an *N*-Methylderivaten verschiedener Aminosäuren und unterstützen unsere früher geäusserte Auffassung, dass nicht alle Eiweissaminosäuren durch die gleiche *d*-Aminosäureoxydase abgebaut werden.

Experimenteller Teil.

I. Fermentative Oxydationen verschiedener α -Aminosäuren.

Wir haben die fermentative Oxydation der folgenden α -Aminosäuren geprüft: *d,l*-Alanin, *d,l*-Asparaginsäure, *d,l*-Glutaminsäure, *d,l*-Histidin, *d,l*-Leucin, *d,l*-Methionin, *d,l*-Phenylalanin, *d,l*-Serin und *d,l*-Glutaminsäure als Hydrochloride. Sämtliche Präparate stammten von der Firma *F. Hoffmann-La Roche & Co.* in Basel.

Für die folgenden mit Rohextrakten ausgeführten Versuche wurden die betreffenden Organe mit der Fleischmaschine fein zerteilt, mit Aceton getrocknet, dann mit Quarzsand zu Pulver zerrieben und hierauf wurde das Ferment mit Phosphatpuffer p_H 7,6 (1 Tl. Trockenpulver: 10 Tl. Puffer) extrahiert. Die Versuchsbedingungen waren die folgenden:

Im Hauptraum:	2 cm ³ Rohextrakt. 10 mg Substanz in 1 cm ³ Phosphatpuffer 0,067 molar. p_H 7,6. Blindversuch mit Puffer auf 3 cm ³ ergänzt.
Im Seitenansatz:	7 Tropfen 40-proz. Kalilauge.
Im Gasraum:	Luft.
Versuchstemperatur:	38°.
Schliessen der Hähne	nach 10 Minuten.

1. Rohextrakt aus Forellenleber:

Zeit	Alanin		Leucin		Asparagin- säure		Blindversuch	
0'	0	0	0	0	0	0	0	0 mm ³
10'	9	10	5	3	5	4	2	1 „
20'	20	21	10	6	9	9	2	1 „
30'	30	30	14	9	12	12	2	1 „
45'	43	44	20	15	17	16	4	3 „
60'	56	57	23	17	22	21	4	3 „
90'	78	79	33	24	30	27	5	4 „
Zeit	Methionin		Histidin		Glutamin- säure		Blindversuch	
0'	0	0	0	0	0	0	0	0 mm ³
10'	5	4	2	2	1	0	0	-1 „
20'	9	8	3	3	2	0	-1	-2 „
30'	11	10	4	3	3	-1	-1	-2 „
45'	15	14	4	5	3	-1	0	-2 „
60'	18	18	5	6	3	0	1	-2 „
90'	25	23	6	7	4	1	2	-1 „
Zeit	Serin		Phenyl-alanin		Alanin		Blindversuch	
0'	0	0	0	0	0	0	0	0 mm ³
10'	3	3	6	6	6	8	1	0 „
20'	7	6	13	14	12	17	2	1 „
30'	9	8	18	19	18	25	2	1 „
45'	12	11	26	27	25	36	4	2 „
60'	14	13	30	32	30	45	5	3 „
90'	16	15	38	39	38	65	4	2 „

2. Rohextrakt aus Taubenleber:

Zeit	Alanin		Leucin		Asparagin- säure		Blindversuch	
0'	0	0	0	0	0	0	0	0 mm ³
10'	3	3	3	3	0	2	0	-1 „
20'	4	5	5	5	0	2	0	-1 „
30'	6	8	7	7	-1	2	-1	-2 „
45'	10	14	11	15	-2	1	-5	-3 „
60'	17	18	15	23	-2	1	-5	-4 „
90'	25	28	22	37	-3	1	-6	-4 „

2. Rohextrakt aus Taubenleber (Fortsetzung):

Zeit	Methionin		Histidin		Glutaminsäure		Blindversuch	
0'	0	0	0	0	0	0	0	0 mm ³
10'	8	7	1	1	-1	0	0	0 „
20'	14	13	2	1	-1	0	0	0 „
30'	21	20	3	2	-1	0	0	-1 „
45'	30	31	5	3	-1	0	0	-1 „
60'	38	39	3	2	-2	0	0	-1 „
90'	54	57	3	1	-2	2	0	-2 „

Zeit	Serin		Phenyl-alanin		Alanin	Blindversuch	
0'	0	0	0	0	0	0	0 mm ³
10'	0	-1	6	7	1	-2	„
20'	2	0	14	15	4	-2	„
30'	2	-1	21	22	4	-3	„
45'	4	0	35	35	9	-2	„
60'	6	2	51	51	17	-2	„
90'	6	2	71	68	23	-3	„

Für die Versuche mit Taubenleber hat man 1 Tl. Leberpulver mit 20 Tl. Puffer extrahiert und 10 mg Substanz in 0,5 cm³ Puffer zugegeben.

3. Rohextrakt aus Mövenleber:

Zeit	Alanin		Leucin		Asparaginsäure		Blindversuch	
0'	0	0	0	0	0	0	0	0 mm ³
10'	0	-1	0	-1	-3	-1	-2	-1 „
20'	3	3	3	2	0	2	0	2 „
30'	4	3	3	2	-1	2	-1	1 „
45'	5	3	3	2	-1	2	-2	0 „
60'	5	5	4	2	-2	1	-2	0 „
90'	7	6	4	2	-3	0	-4	-2 „

Zeit	Methionin		Histidin		Phenyl-anilin		Blindversuch	
0'	0	0	0	0	0	0	0	0 mm ³
10'	1	-1	0	1	-1	0	0	-2 „
20'	2	1	2	2	-1	1	0	-3 „
30'	4	3	3	2	0	2	1	-3 „
45'	5	3	3	2	0	3	1	-5 „
60'	6	6	3	2	4	6	2	-4 „
90'	9	11	3	2	5	9	2	-4 „

II. Fermentative Oxydationen verschiedener N-substituierter Alaninderivate mit Rohextrakt aus Schweinenieren.

Es wurde die Einwirkung von Rohextrakt aus Schweinenieren auf *d,l*-N-Äthyl-alanin, *d,l*-N-Dimethyl-alanin und *d,l*-Acetyl-alanin geprüft.

Versuchsordnung:

Im Hauptraum: 2 cm³ Rohextrakt.
10 mg Substanz in 1 cm³ Phosphatpuffer 0,067 molar.
pH 7,6. Blindversuch auf 3 cm³ mit Puffer ergänzt.

Im Gasraum: Luft.

Im Seitenansatz: 7 Tropfen 40-proz. Kalilauge.

Temperatur: 38°.

Schliessen der Hähne nach 10 Minuten.

Zeit	<i>d,l</i> -N-Äthyl-alanin				Dimethyl-alanin	Blindversuche		
	0	0	0	0		0	0	0 mm ³
0'	0	0	0	0	0	0	0	0 mm ³
10'	2	1	3	3	0	1	1	1 „
20'	5	3	5	5	0	1	1	1 „
30'	6	4	6	7	1	1	1	1 „
45'	10	7	10	10	1	2	2	2 „
60'	13	10	13	14	1	2	2	2 „
5' Unterbruch: Zugabe von 5 mg Alanin. Dann 10' austemperiert.								
		+ 5 mg Alanin		+ 5 mg Alanin	+ 5 mg Alanin		+ 5 mg Alanin	
0'	0	0	0	0	0	0	0	0 „
10'	3	15	3	16	15	-1	16	-1 „
20'	5	30	4	29	31	0	31	0 „
Zeit	<i>d,l</i> -N-Dimethyl-alanin				Äthyl-alanin	Blindversuche		
	0	0	0	0		0	0	0 mm ³
0'	0	0	0	0	0	0	0	0 mm ³
10'	2	3	3	2	4	1	3	2 „
20'	3	4	3	2	7	0	2	2 „
30'	3	5	4	2	10	0	3	2 „
60'	4	7	6	5	18	0	5	2 „
Zeit	Acetyl-alanin		Alanin		—	Blindversuche		
	0	0	0	0		0	0	0 mm ³
0'	0	0	0	0	—	0	0	0 mm ³
10'	2	1	21	21	—	0	1	1 „
20'	3	2	39	39	—	—	2	2 „
30'	3	2	61	56	—	0	3	3 „
45'	3	1	90	74	—	-1	2	2 „
60'	3	2	—	85	—	-1	4	3 „

III. Darstellung verschiedener N-substituierter Alaninderivate.

1. Äthyl-alanin.

5 g *d,l*- α -Brompropionsäure wurden mit 10 cm³ 50-proz. wässriger Äthylaminlösung unter Eis-Kochsalz-Kühlung versetzt und nach der ersten lebhaften Reaktion bei Zimmertemperatur 2 Tage stehen gelassen. Hierauf wurde im Vakuum zur Entfernung überschüssigen Amins eingengt, wieder mit etwas Wasser verdünnt, das Halogen mit Silbercarbonat ausgefällt, abgenutscht, Silberion mit Schwefelwasserstoff ausgefällt, Silbersulfid abfiltriert und im Vakuum zur Trockene eingengt. Die Substanz krystallisierte man aus 96-proz. Alkohol um.

C ₅ H ₁₁ O ₂ N	Ber. C 51,29	H 9,40%
	Gef. „ 51,58	„ 9,21%

Ninhydrinreaktion war negativ und die Bestimmung nach *van Slyke* ergab keinen Aminostickstoff.

2. N-Dimethyl-*d,l*-alanin.

Die Darstellung dieser Verbindung erfolgte aus α -Brompropionsäure und Dimethylaminlösung in analoger Weise wie die vorbeschriebene Gewinnung des *d,l*-N-Äthyl-alanins. Die Substanz gab keine Ninhydrinreaktion.

3. N-Acetyl-*d,l*-alanin.

Das Präparat wurde nach der Vorschrift von *E. Fischer* und *E. Otto*¹⁾ erhalten. Smp. 137—138°. Ninhydrinreaktion und *van Slyke*-Test negativ.

Zürich, Chemisches Institut der Universität.

85. Über Hydrazoverbindungen des Dis-(benzol-azo)-diphenyls

(24. Mitteilung über Azoverbindungen und ihre Zwischenprodukte²⁾)

von Paul Ruggli und Kurt Hölzle.

(19. III. 43.)

Vor kurzer Zeit haben *P. Ruggli* und *J. Rohner*²⁾ durch vorsichtige Reduktion des *o*-Disazo-benzols das *o*-Dis-hydrazobenzol (I) dargestellt. Dieser *o*-Dis-hydrazokörper erwies sich als äusserst labil und zeigte neben der leichten Dehydrierbarkeit vor allem grosse Säureempfindlichkeit, indem er auch durch schwache Säuren — sogar durch Kohlendioxyd — zu *o*-Amino-azobenzol und Anilin dispropor-

¹⁾ B. 36, 2115 (1903).

²⁾ Letzte Mitteilung, Helv. 25, 1533 (1942).