

Über die Spaltung der Gelatine mittels 25%iger Schwefelsäure.

Von

P. A. Levene und W. A. Beatty.

(Aus dem Rockefeller Institute for Medical Research, New-York.)

(Der Redaktion zugegangen am 3. September 1906.)

Die Untersuchungen über die tryptische Verdauung der Gelatine haben gezeigt, daß dieser Vorgang ein sehr allmählicher ist, daß die Spaltung stufenweise vonstatten geht, indem die Albumosen in Peptone, diese in Peptide, Dipeptide und endlich in Aminosäure zersetzt werden. Es ist aber vorläufig unbekannt, ob das Proteidmolekül aus einer Kette von Aminosäuren besteht, welche je nach den Bedingungen der Hydrolyse in eines oder das andere Peptid zerfällt, oder ob es aus bestimmten Peptiden zusammengesetzt ist, welche bei der Spaltung des Moleküls immer in gleicher Weise zum Vorschein kommen. Dieses Problem könnte Aufklärung finden durch Ausführung einer Hydrolyse, bei welcher die eiweißartige Natur des Körpers zerstört, aber die Bildung der Aminosäuren möglichst verhindert wird. Um diese Bedingungen ausfindig zu machen, wurden vor einem Jahre von einem von uns (Levene) in Gemeinschaft mit C. L. Alsberg Versuche angestellt. Leider sind die Resultate dieser Untersuchung aus äußeren Gründen nicht veröffentlicht worden.

Das zweite Problem in der Zusammensetzung des Proteidmoleküles ist die Aufklärung der Ordnung, in welcher die Aminosäuren im ganzen Moleküle, oder in jenen der Peptide vorkommen. Nun ist es durch die Untersuchungen von E. Fischer und seiner Mitarbeiter bekannt geworden, daß die Resistenzfähigkeit verschiedener Peptide nicht nur von der Natur der Aminosäuren, sondern auch von der Ordnung, in welcher sie im Molekül verkuppelt sind, abhängt. Die Ordnung, in welcher

die verschiedenen Aminosäuren bei der Hydrolyse eines Eiweißkörpers abgespalten werden, kann einige Auskunft über die Ordnung, in welcher die Aminosäuren im Moleküle dieses Körpers vereinigt sind, geben.

Die Resultate der vorliegenden Arbeit waren ganz unerwartete. Es wurde beabsichtigt, eine vollständige Spaltung der Gelatine mittels Schwefelsäure auszuführen. Zu diesem Zwecke werden 400 g Gelatine in 3 Liter 25%iger Schwefelsäure aufgelöst und am Rückflußkühler 12 Stunden gekocht. Da vorherige Erfahrung uns belehrt hatte, daß bei einer solchen Behandlung anderer Eiweißkörper eine vollständige Spaltung erreicht wurde, wurde in diesem Falle eine Untersuchung auf die Anwesenheit der biuretgebenden Substanzen nicht angestellt. Es erwies sich aber, daß die Hydrolyse nicht vollständig war, und daß das Reaktionsprodukt noch viel Gelatosen enthielt.

Um die Aminosäuren, die bei dieser Behandlung entstanden, zu analysieren, wurden erst die basischen Bestandteile mittels 10%iger Phosphorwolframsäure entfernt. Zu diesem Zwecke wurde die Lösung von einem Teile der Schwefelsäure mittels Baryumhydrat befreit, das Filtrat auf ein Volumen von 6 l gebracht und mit 10%iger Phosphorwolframsäure gefällt. Das Filtrat des Niederschlages wurde in üblicher Weise von der Säure befreit, auf ein kleines Volumen gebracht und mittels einer konzentrierten Phosphorwolframsäurelösung fraktioniert. Wir erhielten dabei drei Niederschläge. Der erste schied sich als Öl aus und wurde beim Stehen teigartig, der zweite körnig und noch klebrig, und der dritte bestand aus weißen Krystallen.

Alle Fraktionen wurden auf Aminosäuren und auf Prolin-glycylpiperacid untersucht.

Es erwies sich, daß alle Fraktionen noch eiweißartige Substanzen enthielten. Um diese zu entfernen, wurde jede Fraktion, nachdem sie von Phosphorwolframsäure befreit war, mit einer Gerbsäurelösung behandelt und bei 2° C. einige Tage stehen gelassen. Die Gerbsäureniederschläge in den einzelnen Fraktionen besaßen eine verschiedene Beschaffenheit. In der ersten Fraktion war er hart lederartig, in der zweiten teilweise körnig, und schließlich in der dritten besaß er die Beschaffen-

heit eines gelben Pulvers, welches schon bei Zimmertemperatur teilweise wieder in Lösung ging.

Die Filtrate wurden von Gerbsäure in üblicher Weise befreit, eingedampft und auf Aminosäuren untersucht. Aus der ersten Fraktion konnte etwa 1,5 g Leucin gewonnen werden.

0,1800 g der Substanz gaben 0,3630 g CO₂ und 0,1630 g H₂O.

Für C₆H₁₃NO₂

Berechnet:	Gefunden:
C = 54,96	55,00 %
H = 9,92	10,05 %

Aus der zweiten Fraktion konnten wir aus Wasser eine kleine Menge eines Kupfersalzes krystallisieren, welche scheinbar eine Mischung von Glykokoll und Alanin war.

Die Analyse ergab die folgenden Zahlen:

0,1378 g der Substanz gaben 0,1380 g CO₂, 0,0478 g H₂O und 0,0464 g CuO.

Für $\frac{1}{2} (C_2H_4NO_2)_2Cu + (C_3H_6NO_2)_2Cu$

Berechnet:	Gefunden:
C = 26,66 %	27,37 %
H = 4,44 %	3,76 %
Cu = 28,00 %	26,89 %

Endlich gelang es, aus der dritten Fraktion Glykokoll und Oxyprolin zu gewinnen. Der größte Teil des Glykokolls schied sich beim Eindampfen des Filtrates vom Gerbsäureniederschlag ab, nachdem die Gerbsäure entfernt war. Diese Ausbeute betrug 7,0 g. Die Mutterlauge von diesem Filtrate wurde mit alkoholischer Pikrinsäurelösung behandelt. Es bildete sich ein Pikrat von folgender Zusammensetzung:

0,1920 g der Substanz gaben bei Verbrennung 0,2225 g CO₂ und 0,0514 g H₂O.

Für C₂H₅NO₂ · C₆H₃N₃O₇

Berechnet:	Gefunden:
C = 31,58 %	31,60 %
H = 2,63 %	2,97 %

Die Mutterlauge vom Pikrat wurde in üblicher Weise von Pikrinsäure und nachher von der bei dem Versuch gebrauchten

Schwefelsäure befreit, zu einem kleinen Volumen eingedampft und mit Alkohol und Äther behandelt. Beim längeren Stehen bildete sich ein krystallinischer Niederschlag, der stark süß schmeckte, bei der Sublimation Pyrrol bildete und die folgende Zusammensetzung besaß.

0,1854 g der Substanz gaben bei der Verbrennung 0,2772 g CO₂ und 0,1196 g H₂O.

Die Substanz enthielt 13,33% Stickstoff.

Für C₂H₅NO₂ + C₅H₉NO₃

Berechnet:	Gefunden:
C = 40,75%	40,26%
H = 6,8%	7,17%
N = 13,54%	13,33%

bestand also ohne Zweifel aus Glykokoll und Oxyprolin.

Prolinglycylpiperacid und α -Prolin

konnten nicht nachgewiesen werden. Zur Gewinnung des ersten Körpers wurde gerade so verfahren, wie es in der Mitteilung von Levene und Wallace¹⁾ angegeben ist.²⁾ Alle Phosphorwolframsäureniederschläge sind in dieser Richtung untersucht worden. Zur Darstellung des α -Prolins wurden alle in absolutem Alkohol löslichen Kupfersalze vom Kupfer befreit und mit Barythydrat im Autoklaven racemisiert. Aus diesem Produkte versuchten wir das Kupfersalz des inaktiven α -Prolins zu erhalten. Das gelang aber nicht, obwohl die amorphen Niederschläge, die auf diese Weise entstanden, alle bei der Sublimation viel Pyrrol bildeten.

Es ist also ersichtlich, daß bei der unvollständigen Hydrolyse der Gelatine die Aminosäuren in derselben Ordnung

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLVII, 1906.

²⁾ Seit dieser Arbeit hat einer von uns (Levene) das Verfahren zur Gewinnung des Piperacids viel vereinfacht. Das Verdauungsprodukt wird so weit wie möglich konzentriert und mit 95%igem Alkohol extrahiert. Dieser Auszug wird zur Sirupkonsistenz eingedampft und mit Aceton gefällt. Die Mutterlauge zur Trockene eingedampft, der Rückstand mit absolutem Alkohol ausgezogen, mit Äther versetzt und über Nacht stehen gelassen. Die alkoholätherische Lösung wurde dann abfiltriert und der selbständigen Verdunstung überlassen: es bildete sich eine reichliche Ausscheidung des Piperacids.

vorkommen, wie bei der mäßigen tryptischen Verdauung. Wie dort, erscheinen auch hier hauptsächlich Glykokoll und Leucin, dann Oxyprolin¹⁾ und Alanin. Das α -Prolin kommt in beiden Fällen nicht vor. Erst bei tiefgreifender Verdauung und bei der Hydrolyse mittels konzentrierter Säuren kommt es zum Vorschein. Das Prolinglycyanhydrid kommt nicht vor, möglicherweise weil es in das Dipeptid umgewandelt wird. Wir wollen noch hinzufügen, daß es ohne Anwendung der Phosphorwolframsäure bei dieser Untersuchung nicht gelang, krystallinische Spaltungsprodukte zu gewinnen.

¹⁾ Bei der Untersuchung der krystallinischen Phosphorwolframsäurefraktion ist es einem von uns (Levene) gelungen, eine Substanz von der Zusammensetzung C = 40,99%, H = 7,13% zu erhalten, die scheinbar aus Glykokoll und Oxyprolin bestand.