

Nachweis des l-Prolins als primäres Spaltprodukt der Proteine.

Von

Emil Abderhalden und Karl Kautzsch.

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

(Der Redaktion zugegangen am 19. März 1912.)

Das von Emil Fischer unter den Produkten der totalen Hydrolyse von Proteinen aufgefundene Prolin ist in den letzten Jahren wiederholt Gegenstand eingehender Untersuchungen gewesen. Einerseits war man bemüht, den Gehalt verschiedener Proteine an Prolin festzustellen. Andererseits war der Beweis zu führen, daß das Prolin als Baustein der Proteine vorkommt und nicht sekundär durch Ringschluß aus einer anderen Verbindung, z. B. aus α -Amino- δ -oxyaminovaleriansäure entsteht. Das letztere Problem war vor allen Dingen durch die wichtigen Untersuchungen von Sörensen¹⁾ ein dringliches geworden. Er hatte beobachtet, daß bei der Veresterung von der α -Amino- δ -oxyvaleriansäure eine allerdings geringe Menge sich in Prolin umwandelt.

Was zunächst den Gehalt verschiedener Proteine an Prolin anbetrifft, so unterliegt es keinem Zweifel, daß zurzeit von keinem Eiweißkörper der wahre Gehalt an dieser Aminosäure bekannt ist. Es sind ganz verschieden reine Produkte und sicher oft sehr unreine als Ausbeute angegeben worden. Mit Hilfe der Estermethode erhält man immer nur einen Bruchteil des gesamten Prolins. Bestimmt man das Prolin direkt, indem man nach dem Vorschlage von Emil Fischer und R. Boehner²⁾ das Eiweiß mittels Baryts hydrolysiert und dabei die Spaltprodukte racemisiert, so geht ohne Zweifel ein Teil des Prolins durch Zersetzung verloren. Wir haben, veranlaßt durch die

¹⁾ S. P. L. Sörensen und A. C. Andersen. Studien über Aminosäuresynthesen. VII. Prolin (α -Pyrrolidincarbonsäure). Diese Zeitschrift, Bd. 56, S. 236, 1908.

²⁾ Emil Fischer und Reginald Boehner. Bildung von Prolin bei der Hydrolyse von Gelatine mit Baryt. Diese Zeitschrift, Bd. 65, S. 118, 1910.

Angaben verschiedener Autoren über den Prolingehalt verschiedener Proteine, wiederholt geprüft, ob es statthaft ist, die Alkohollöslichkeit des Prolins als Grundlage zur Prolinbestimmung zu nehmen. Wir müssen das auf Grund einer sehr reichen Erfahrung verneinen. Es gelingt in den meisten Fällen nicht, das Prolin direkt durch Alkohol in reinem Zustand abzutrennen. Fast stets gehen andere Aminosäuren mit in Lösung. Wir haben auf diesen Punkt ganz besondere Sorgfalt verwendet und zunächst die das Prolin enthaltenden, mit Wasser verseiften Aminosäureesterfraktionen stets unter besonderen Kautelen vom Wasser befreit. Zur möglichst vollständigen Entfernung des Wassers wurde mehrmals mit absolutem Alkohol zur Trockne verdampft. Zur Vermeidung von Zersetzung wurden alle Operationen des Abdampfens unter vermindertem Druck und höchstens 60° des Wasserbades ausgeführt. Die genannte Temperatur wurde erst benützt, wenn es galt, die letzten Spuren von Wasser zu entfernen. Im übrigen überschritten wir nie 40°. Nun wurde der trockene Rückstand mit absolutem Alkohol ausgekocht. Die heiß filtrierte Lösung ergibt bald eine Fällung. Von ihr wurde abfiltriert. Es handelte sich in allen Fällen um mitgelöste, an und für sich in Alkohol unlösliche Aminosäuren. Das Filtrat wurde zur Trockene verdampft. Würde man nun einfach den Rückstand gewogen haben, dann wäre selbstverständlich eine hohe Ausbeute an Prolin zustande gekommen. Es läßt sich leicht beweisen, daß der erhaltene Rückstand kein reines Prolin darstellt. Löst man nämlich wieder in Alkohol, dann bleibt ein erheblicher Rückstand, der kein Prolin enthält. Wiederholt man den Prozeß, dann kann man noch mehrmals — allerdings sehr geringe Mengen — Aminosäuren abscheiden, die nur mitgelöst waren. Verzichtet man auf das mehrfache Eindampfen und Lösen in Alkohol und stellt man aus der wässrigen Lösung des Rückstandes direkt das Kupfersalz durch Kochen mit überschüssigem Kupferoxyd dar, dann kann man sehr oft das blaßblaue, in Wasser sehr schwer lösliche Kupfersalz des Leucins erkennen. Es wird sicher häufig übersehen, weil die außerordentliche Schwerlöslichkeit des Leucinkupfers nicht genug beachtet wird. Kocht man das abfiltrierte, überschüssige Kupfer-

oxyd mit sehr viel Wasser aus, dann gelingt es bei der Prolindarstellung fast immer, die Anwesenheit von Leucin und oft auch von Isoleucin und von Valin zu beweisen — vorausgesetzt, daß die Aminosäurefraktionen, aus denen Prolin isoliert werden soll, reichliche Mengen dieser Aminosäuren enthalten.

Es fragt sich nun, ob man berechtigt ist, das wiederholt verdampfte und wieder in Alkohol gelöste alkoholische Extrakt als Prolin anzusprechen. Es ist dies unbedingt zu verneinen. Es können alle möglichen anderen Produkte in ihm enthalten sein. Prolin ist an und für sich relativ leicht zersetzlich. Bei der Hydrolyse mit Säuren und vielleicht auch bei der Veresterung können Zersetzungsprodukte entstehen, die in Alkohol löslich sind. Löst man das alkoholische Extrakt in Wasser und bereitet man sich durch Kochen mit Kupferoxyd das Kupfersalz des Prolins, dann läßt sich nach der Beobachtung von Emil Fischer das aus der blauen Lösung durch Eindampfen erhaltene Salz durch Ausziehen mit Alkohol in zwei Fraktionen trennen. Ein Teil, das aktive Kupfersalz, löst sich in Alkohol, ein anderer Teil bleibt ungelöst. Er enthält das racemische Prolinkupfer. Daß dieses meist noch nicht rein und durch fraktionierte Krystallisation von Beimengungen zu befreien ist, haben wir schon erwähnt. Wiederholt beobachteten wir, daß bei der fraktionierten Krystallisation des racemischen Prolinkupfers eine erste Fraktion erscheint, die erheblich schwerer löslich ist, als der übrige Teil. Die Analyse gab richtige Werte für Kupfer, Stickstoff und Wasser für alle Fraktionen. Sehr unrein ist meistens das sogenannte aktive Prolinkupfer. Es krystallisiert in reinem Zustand in großen Prismen. Ein Teil des Kupfersalzes widersteht hartnäckig allen Krystallisationsversuchen, so daß uns schon die Vermutung gekommen ist, es könnte eine neue Verbindung, vielleicht eine noch unbekannte Aminosäure vorliegen. Alle Bemühungen, den verbleibenden Sirup zu identifizieren, schlugen fehl, dagegen konnten wir es wahrscheinlich machen, daß er zum Teil auf Zersetzung von Prolin zurückzuführen ist. Wenigstens nahm seine Menge zu, wenn wir Prolinkupfer wiederholt in Wasser lösten und dann die Lösung verdampften.

Um den Wert von Angaben über die Ausbeuten an ein-

zelen Aminosäuren beurteilen zu können, muß man diese Verhältnisse genau kennen. Alle bisherigen Angaben dürften, soweit die Estermethode zur Isolierung der Aminosäuren in Anwendung kam, zu niedrig sein, vorausgesetzt, daß nur wirklich identifiziertes Prolin zur Wägung kam. Alle unter der Leitung des einen von uns durchgeführten Prolinbestimmungen setzen sich aus zwei Komponenten zusammen. Einmal wurde das wirklich reine racemische Prolin zur Wägung gebracht und ferner das alkohollösliche Prolinkupfer gewogen. Hier schlugen die Reinigungsversuche des ganzen, nach Verdampfen des Alkohols verbleibenden Rückstandes immer fehl, nur bei der Gelatine gelang es wiederholt, den größten Teil des aktiven Prolinkupfers zur Krystallisation zu bringen. In allen übrigen Fällen waren wir nicht so glücklich. Gelang es, größere Mengen von Krystallen zu erhalten, dann setzten wir diese in Rechnung, nachdem wir selbstverständlich die Analyse durchgeführt hatten. Wollte gar keine Krystallisation eintreten, oder krystallisierte ein nur unbedeutender Teil, dann wurde der ganze in Alkohol lösliche Teil der Kupfersalze als Prolinkupfer berechnet.

Wir vermissen in den meisten von anderen Autoren ausgeführten Hydrolysen Angaben über die genaue Identifizierung des isolierten, der Berechnung der Ausbeute zugrunde gelegten Prolins. Es ist klar, daß man gerade bei dieser Aminosäure fast jede beliebige Ausbeute erzielen kann. Der Umstand, daß eine Aminosäurefraktion, nach van Slyke mit salpetriger Säure behandelt, keinen Stickstoff liefert, beweist auch noch nicht, daß nun wirklich reines Prolin vorliegt. Es können z. B. Anhydride vorliegen. Auch diese gehen in Alkohol hinein. Vgl. hierzu die Beobachtungen des einen von uns mit Funk.¹⁾ Nur wenn die Estermethode zur Isolierung der Aminosäuren verwendet wurde, kommen Diketopiperazine wohl nicht in Betracht.

Fassen wir alle unsere Beobachtungen zusammen, dann ergibt sich, daß wir zurzeit über keine Methode ver-

1) Emil Abderhalden und Casimir Funk, Beitrag zur Kenntnis der beim Kochen von Casein mit 25%iger Schwefelsäure und mit starker Salzsäure entstehenden Spaltungsprodukte. Diese Zeitschrift, Bd. 53, S. 19, 1907.

fügen, um Prolin in reinem Zustande quantitativ nachzuweisen. Bei der Bestimmung der Ausbeute kommt es ganz darauf an, welche Ansprüche man an die Reinheit des isolierten Prolins stellt. Ausschließlich reines, identifiziertes Prolin ist wohl nur in den seltensten Fällen der Berechnung der Ausbeute zugrunde gelegt worden. Sehr oft wurde unzweifelhaft sehr unreines, in Alkohol lösliches Material als Prolin in Rechnung gesetzt. Es muß verlangt werden, daß wenigstens das racemische Prolin, das sich meist leicht reinigen läßt, in reinem Zustand zur Wägung kommt. Ferner muß stets darauf hingewiesen werden, daß die Bestimmung der Ausbeute an aktivem Prolin sehr ungenaue Werte liefert. Die Angaben über die Mengen, in denen Prolin in den einzelnen Proteinen vorkommt, haben nur relativen Wert. Man wird wohl entscheiden können, ob ein Eiweißkörper viel Prolin enthält oder wenig, nicht aber wieviel er enthält. Vor Berechnungen auf Grund indirekter Methoden möchten wir geradezu warnen. So lange nicht Methoden bekannt sind, die uns gestatten, Proteine ohne sekundäre Veränderungen zu spalten und auf die einzelnen Bausteine zu verarbeiten, müssen wir uns an die einzelnen in reinem Zustand isolierten Aminosäuren halten. Wir heben diese Punkte so scharf hervor, weil in den letzten Jahren Angaben über etwas höhere Ausbeuten an einzelnen Aminosäuren und speziell an Prolin als Beweis exakterer Methoden und besserer Durchführung der Isolierung der Spaltprodukte bewertet worden sind. Hinter einer zu hohen Bewertung von Differenzen in den Angaben der Ausbeuten an einzelnen Aminosäuren verbirgt sich Unkenntnis der Methoden und zum Teil auch des ganzen Arbeitsgebietes. Ganz anders würden die Verhältnisse liegen, wenn es glücken würde, für die einzelnen Aminosäuren quantitative Methoden aufzufinden. Solche existieren zurzeit nur für Tyrosin, Glutaminsäure, Arginin, Lysin und Histidin. Osborne schätzt die quantitative Abscheidung des Tyrosins nicht hoch ein, auch konnte es nach seinen letzten Veröffentlichungen scheinen, als wäre die Glutaminsäurebestimmung bis zu seinen jüngsten Untersuchungen nicht so ausgeführt worden, daß der

wahre Gehalt an dieser Aminosäure zum Vorschein kam.¹⁾ Wir werden auf diese Punkte zurückkommen.

Die unten mitgeteilten Versuche belegen die oben erwähnten Angaben über die Unsicherheit der Bestimmung des Prolingehaltes auf Grund seiner Alkohollöslichkeit sehr deutlich. Es seien deshalb die einzelnen Versuche ausführlich mitgeteilt. Als das wichtigste Ergebnis der Untersuchung von verdautem Casein und fermentativ abgebauter Gelatine und ferner von Darminhalt ist hervorzuheben, daß es gelungen ist, Prolin ohne Anwendung der Estermethode direkt als Hydantoin zur Abscheidung zu bringen. Wir glauben auf Grund dieses Befundes schließen zu dürfen, daß nunmehr endgültig bewiesen ist, daß Prolin ein primäres Abbauprodukt der Proteine ist. Ob daneben auch noch Aminoxyvaleriansäure im Eiweißmolekül vorkommt, bleibt unentschieden. Alle Bemühungen, eine solche Verbindung zu fassen, schlugen bis jetzt fehl. Emil Fischer hat bereits darauf hingewiesen, daß der Umstand, daß Prolin bei der Säurehydrolyse von Proteinen und auch bei der Hydrolyse mit Alkalien sich nachweisen läßt, es wahrscheinlich macht, daß Prolin im Eiweißmolekül vorgebildet ist. Ferner wurde es von ihm und E. S. London²⁾ aus Darminhalt isoliert. Das Prolin wurde nur bei der Hydrolyse mit Baryt direkt isoliert. In allen anderen Fällen kam die Estermethode in Anwendung. Nun sind allerdings die in den einzelnen Fällen isolierten Prolinmengen so groß, daß es sehr gezwungen wäre, anzunehmen, daß diese Aminosäure in ihrer Gesamtheit sekundär entstanden ist. Immerhin erschien es uns wünschenswert, das Vorhandensein des Prolins unter den beim fermentativen Abbau der Proteine auftretenden Abbauprodukten direkt ohne Anwendung der Estermethode zu beweisen.

Ein Einwand, der gegen unsere Schlußfolgerung noch möglich ist, ist der folgende. Es wäre denkbar, daß unter den

¹⁾ Vgl. hierzu Thomas B. Osborne. The Chemistry of the Proteins. Harey Lectures 1910—1911.

²⁾ Emil Fischer und E. S. London. Bildung von Prolin bei der Verdauung von Gliadin. Diese Zeitschrift, Bd. 73, S. 398, 1911.

Bausteinen der Proteine Pyrrolidincarbonsäure vorkommt. Diese könnte während der Verdauung — z. B. durch Bakterienwirkung — zu Pyrrolidincarbonsäure reduziert werden. Wir sind mit der experimentellen Prüfung dieser Möglichkeit beschäftigt. Nach unseren bisherigen Erfahrungen ist eine Bildung von Pyrrolidincarbonsäure aus Pyrrolidoncarbonylsäure unter den Bedingungen, wie sie bei Verdauungsversuchen herrschen, nicht sehr wahrscheinlich. Dazu kommt, daß die Pyrrolidoncarbonylsäure zurzeit als Baustein der Proteine noch nicht mit aller Bestimmtheit nachgewiesen ist.

Zum Schlusse möchten wir vorschlagen, die Ausbeuten an Prolin, wie folgt, anzugeben. Entweder wird das Prolin in den aktiven und racemischen Anteil zerlegt und mitgeteilt, daß x Gramm reines racemisches Prolin erhalten wurden, ferner y Gramm krystallisiertes aktives Prolinkupfer, oder es wird das aktive Prolin als solches gewonnen und analysiert. Man kann es aus der alkoholischen Lösung mit Äther fällen. Man kann ferner durch Erhitzen mit Baryt alles Prolin in die Racemform überführen und dann das racemische Prolin reinigen. Verluste sind hierbei unvermeidlich. Endlich kann man die das aktive Prolin enthaltende Masse auch, wie folgt, prüfen. Man bestimmt ihr Drehungsvermögen in einem aliquoten Teil, ferner den Stickstoffgehalt und endlich den Aminostickstoff nach van Slyke und berechnet aus allen Daten die Menge des Prolins, die vorhanden sein könnte, und stellt dann das Hydantoin des Prolins dar. Man wird sich dann leicht davon überzeugen können, mit welchem Rechte man das erwähnte Produkt direkt als Prolin anspricht! Es scheint uns im Interesse einer ruhigen Erforschung der Abbauprodukte zweckmäßiger zu sein, nur solche Zahlen als Ausbeuten anzugeben, die den wirklich reinen Substanzen entsprechen, besonders, nachdem wir jetzt genau wissen, daß die Ausbeuten an den einzelnen Aminosäuren bei Anwendung der Estermethode einerseits schwankende sind und ferner weit hinter der Wirklichkeit zurückbleiben. Bei vergleichenden Untersuchungen wird man immerhin zu brauchbaren Resultaten kommen, falls die Unterschiede im Gehalt der einzelnen Aminosäuren sehr große sind. Handelt es sich jedoch um geringfügige

Differenzen, dann wird man die Frage offen lassen müssen, ob diese auf die Methode zurückzuführen sind, oder ob wirklich ein verschiedener Gehalt der untersuchten Proteine an den festgestellten Aminosäuren vorliegt. Dazu kommt noch, daß, wie wiederholt betont worden ist, die Übereinstimmung der Mengenverhältnisse an einzelnen Aminosäuren keinen Schluß auf die Identität von untersuchten Proteinen zuläßt, weil ja doch die Struktur eine gänzlich verschiedene sein kann. Endlich muß immer wieder betont werden, daß für keinen einzigen Eiweißkörper bewiesen ist, daß er einheitlich ist. Studien an optisch aktiven Polypeptiden, an deren Aufbau mehrere verschiedene Aminosäuren beteiligt sind, müssen ergeben, ob man instande ist, ein aus mehreren davon bestehendes Gemisch zu trennen, resp. zu entscheiden, ob ein einheitliches Produkt vorliegt oder nicht. Nach unseren bisherigen Erfahrungen können Polypeptide sich in ihren Eigenschaften so beeinflussen, daß es unmöglich ist, eine Trennung herbeizuführen.

Ein neuer Impuls in der Erforschung des Aufbaus und der Zusammensetzung der Proteine ist nur zu erwarten, wenn neue Methoden zur quantitativen Abscheidung einzelner Aminosäuren entdeckt werden und durch systematische Studien an synthetisch dargestellten Polypeptiden die Möglichkeit der Reindarstellung von Proteinen eingehend geprüft wird.

Versuch mit abgebauter Gelatine.

Das zu dieser Untersuchung benutzte Präparat stammte von Gelatine, die der Einwirkung von Pepsinsalzsäure und dann der von Trypsin und Erepsin unterworfen worden war. Das bei dieser Verdauung entstandene Produkt enthielt 13,07% Gesamtstickstoff, 8,8% Aminostickstoff (nach van Slyke bestimmt) und 1,03% Ammoniakstickstoff. Das Präparat bestand zum weitaus größten Teil aus Aminosäuren, daneben war noch ein kleiner Rest von Produkten vorhanden, die Aminosäuren gebunden enthielten. 100 g des pulverisierten Präparates wurden mit 300 ccm absoluten Alkohols ausgekocht. Dann wurde heiß filtriert und mit heißem Alkohol nachgewaschen. (Über die Aufarbeitung der ungelösten Substanz (A) vgl. S. 105). Das

Filtrat wurde mit dem gleichen Volumen Äther versetzt. Es entstand eine gelblich gefärbte Fällung, von der abfiltriert wurde. Die Verarbeitung dieses Filtrates (B) vgl. S. 105. Dieser Niederschlag wurde mit 150 ccm absoluten Alkohols ausgekocht. Es blieb nur eine geringe Menge Substanz ungelöst. Nach dem Erkalten filtrierten wir und versetzten die Lösung mit 300 ccm Äther. Es fiel ein hellbraun gefärbtes Produkt (ca. 5 g). Zur Verarbeitung dieses Präparates auf Prolin wurde nun, wie folgt, verfahren:

Das Produkt wurde in 25 g Wasser gelöst und die mit Tierkohle entfärbte, neutrale Lösung mit frisch gefälltem Kupferoxyd in wässriger Suspension gekocht. Dann wurde vom überschüssigen Kupferoxyd heiß abfiltriert, der Filterrückstand mit heißem Wasser ausgewaschen und nun die blau gefärbte Lösung auf dem Wasserbade eingedunstet. Beim Erhitzen des Rückstandes mit 20 ccm absoluten Alkohols verblieb ein geringer Anteil (ca. 0,1 g) ungelöst. Es wurde filtriert. Beim Versetzen der Lösung mit dem 4fachen Volumen Äther fiel ein voluminöses hellblaues, flockiges Kupfersalz. Das sehr hygroskopische Salz wurde in wässriger Lösung durch Einleiten von Schwefelwasserstoff zerlegt. Aus dem Filtrate des Kupfersulfids entfernten wir durch Erwärmen den Schwefelwasserstoff und versetzten dann die Lösung mit etwas Silbercarbonat, um etwa vorhandene Säuren, die mit Silbercarbonat leicht reagieren,¹⁾ in die Silbersalze überzuführen und als solche abzutrennen. Die vom Silbercarbonat abfiltrierte Lösung wurde bis auf einige Kubikzentimeter eingeengt und dann mit dem mehrfachen Volumen Alkohol versetzt. Es trat nur eine sehr geringe Fällung auf. Das Filtrat behandelten wir nun nach Zusatz von etwas Natronlauge in der bekannten Weise mit Phenylisocyanat. Es gelang jedoch nicht, die Phenylisocyanatverbindung des Prolins oder, nach Behandlung mit Salzsäure, das entsprechende Hydantoin (Anhydrid), das sich nach Emil Fischer²⁾ besonders

¹⁾ Im Gegensatz zu der Pyrrolidincarbonensäure.

²⁾ Emil Fischer, «Synthese der α,δ -Diaminovaleriansäure», Berichte der deutsch. chem. Gesellschaft, Bd. 34, S. 454 (1901) und «Über die Hydrolyse des Caseins durch Salzsäure», Diese Zeitschrift, Bd. 33, S. 151 (1901).

gut zur Isolierung der Pyrrolidincarbonsäure eignet, zu gewinnen.

Verarbeitung des alkoholisch-ätherischen Filtrates B (von S. 104). Das Filtrat wurde mit 500 ccm Äther versetzt, die gefällte, hellbraune Substanz in 25 g Wasser gelöst, mit Tierkohle entfärbt und mit einer wässrigen Kupferoxydsuspension gekocht. Die blau gefärbte Lösung wurde eingedunstet und das erhaltene blaue schmierige Produkt mit absolutem Alkohol erwärmt. Es ging bis auf ca. 0,1 g alles in Lösung. Das Filtrat wurde mit Äther gefällt und das gefällte Salz in wässriger Lösung mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Das Filtrat des Kupfersulfids wurde, nachdem auf ca. 5 ccm eingeeengt, mit Natronlauge alkalisch gemacht und dann mit Phenylisocyanat gekuppelt. Die schließlich mit Tierkohle behandelte Lösung wurde zur Überführung der Phenylisocyanatverbindung des Prolins in das entsprechende Anhydrid nach Zusatz von Salzsäure auf dem Wasserbade eingedunstet. Den Rückstand kochten wir nun mit Alkohol aus, behandelten die vom Kochsalz abfiltrierte, gefärbte Lösung wieder mit Tierkohle und engten schließlich auf ein sehr kleines Volumen ein. Es schieden sich die farblosen, glänzenden, blättchenartigen Krystalle des l-Prolinhydantoins ab. Sie schmolzen gegen 140° ohne Zersetzung. Ihre Menge betrug nicht mehr als 0,1 g. (Analyse vgl. S. 107.)

Verarbeitung der mit Alkohol ausgekochten Substanz A (S. 103).

Da die Möglichkeit vorlag, daß die in Alkohol ungelöst gebliebene Substanz zum Teil Natriumsalze von Aminosäuren enthielt — zur Verdauung mit Trypsin und Erepsin war Natriumcarbonat zugegeben worden —, lösten wir sie in ca. 300 ccm Wasser und versetzten mit Essigsäure. Hierauf wurde auf etwa 100 ccm eingeeengt und mit dem doppelten Volumen absoluten Alkohols eine hellgelb gefärbte Fällung erzeugt. Von dieser wurde abgesaugt. Die Menge des getrockneten Produktes betrug 18 g. Das Filtrat wurde weiter eingeeengt und schließlich mit 300 ccm absoluten Alkohols versetzt. Es fiel wieder eine sehr

beträchtliche Menge Substanz aus. Das bräunlich gefärbte Filtrat wurde nun mit Tierkohle behandelt, dann bis zur beginnenden Sirupbildung (ca. 30 ccm) eingeeengt, und mit 160 ccm absoluten Alkohols vermischt. Es entstand nur noch eine geringe Fällung. Das Filtrat davon versetzten wir mit 700 ccm Äther, wobei ein hellbraun gefärbtes Produkt ausfiel. Dieses wurde abgesaugt. Seine Menge betrug nach dem Trocknen fast 5 g.

Die Verarbeitung dieses Präparates auf Prolin wurde, wie folgt, durchgeführt. Wir lösten das in der erwähnten Weise isolierte Produkt in 50 g Wasser und behandelten es mit etwas Silbercarbonat (wobei kaum CO_2 -Entwicklung stattfand). Dann wurde in der Hitze filtriert, das Filtrat eingeeengt und schließlich mit 300 ccm absoluten Alkohols versetzt. Es entstand dabei nur eine geringe Fällung. Von ihr wurde abgesaugt. Dann wurde das Produkt (ca. 0,5 g) in wässriger Lösung mit Schwefelwasserstoff zerlegt, die vom Silbersulfid abfiltrierte Flüssigkeit mit Tierkohle entfärbt, eingedunstet und mit etwas absolutem Alkohol versetzt, wobei eine sehr geringe Abscheidung eintrat. Das ausgefällte Produkt konnte, da es in Alkohol unlöslich war, nicht l-Prolin sein. Aus dem Filtrat konnte gleichfalls kein Prolin gewonnen werden. In das Filtrat der oben erwähnten 0,5 g Silber-salz wurde Schwefelwasserstoff eingeleitet, dann vom Schwefel-silber abfiltriert und der Schwefelwasserstoff durch Einengen der Lösung verjagt. Dann wurde die Lösung mit einer wässrigen Kupferoxydsuspension aufgeköcht, vom überschüssigen Kupferoxyd in der Hitze abfiltriert und das tief blau gefärbte Filtrat eingedunstet. Es verblieb ein schmieriger Rückstand. Er wurde portionsweise mit 30 ccm absoluten Alkohols ausgeköcht. (Verarbeitung des ungelösten Teils vgl. S. 107.)

Die alkoholische Lösung wurde mit 100 ccm Äther versetzt. Es entstand eine blaugefärbte, amorphe Fällung. Das Produkt wurde in wässriger Lösung mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Das Filtrat vom Kupfersulfid wurde eingedunstet und der Rückstand nach Aufnahme in einigen Kubikzentimetern Wasser unter Zusatz von Natronlauge mit Phenylisocyanat gekuppelt. Die gelbgefärbte Lösung behandelten wir mit Tierkohle, säuerten dann mit Salzsäure an und dunsteten ein. Den

Rückstand kochten wir zur Beseitigung des Chlornatriums mit Alkohol und engten schließlich die alkoholische Lösung auf wenige Kubikzentimeter ein. Es schied sich das l-Prolinhydantoin in farblosen Nadelchen ab. Sie wurden abgesaugt, mit Wasser gewaschen und bei 90° getrocknet. Die Menge betrug knapp 0,2 g (Analyse vgl. unten). Aus dem Filtrate konnte nach Entfärben mit Tierkohle und Eindunsten noch eine geringe Menge von Krystallen zur Abscheidung gebracht werden.

Das beim Auskochen mit 30 ccm Alkohol ungelöst verbliebene Kupfersalz (S. 106) wurde in 50 g Wasser gelöst und nun ebenso behandelt, wie das eben beschriebene, mit Äther gefällte Kupfersalz. Schließlich konnten wir auch von dieser Fraktion das Hydantoin des l-Prolins gewinnen. Es schied sich aus Alkohol in leichten glänzenden Krystallen ab, deren Menge etwa 0,2 g betrug.

Die einzelnen Fraktionen an l-Prolinhydantoin wurden vereinigt und aus der 75fachen Menge heißen Wassers umkrystallisiert, wobei sich das Hydantoin in schönen farblosen, leichten, verfilzten Nadeln abschied und an Menge sich nur unwesentlich verringerte. Das im Vakuumexsikkator über konzentrierter Schwefelsäure getrocknete Präparat schmolz gegen 142—143° und zeigte somit den von Emil Fischer¹⁾ für das Hydantoin des l-Prolins (Anhydridform der l-Pyrrolidincarbon-säure-Phenylisocyanatverbindung) angegebenen Schmelzpunkt (unkorr. 143°).

0,0915 g exsikkatortrockener Substanz erforderten 8,43 ccm ⁿ₁₀-H₂SO₄.

Berechnet für C₁₂H₁₂O₂N₂: 12,96% N.

Gefunden: 12,91% N.

Das erhaltene Präparat stimmte auch in seinen Löslichkeitsverhältnissen — sehr schwer löslich in kaltem Wasser, schwer löslich in Äther, leichter löslich in absolutem Alkohol und in Aceton — mit dem von E. Fischer beschriebenen l-Prolinhydantoin überein.

¹⁾ Emil Fischer, Über die Hydrolyse des Caseins durch Salzsäure. Diese Zeitschrift, Bd. 33, S. 151 (1901).

Bei der Beurteilung der Menge des isolierten Prolinhydantoin's muß in Betracht gezogen werden, daß das angewandte Präparat nicht vollständig abgebaut war. Ferner sind die unvermeidlichen Verluste zu berücksichtigen, die die zahlreichen Operationen mit sich brachten. Endlich ist darauf hinzuweisen, daß die Abscheidung des Prolins als Hydantoin keine ganz quantitative ist. Es entstehen offenbar auch Nebenprodukte. Besonders auffällig war die Bildung eines carminroten Farbstoffes.

Versuch mit abgebautem Casein.

Das benutzte Präparat war durch successive Einwirkung von Pepsinsalzsäure, Trypsin und Erepsin auf Casein erhalten worden. Es enthielt 12,85% Gesamtstickstoff. Der Gehalt an Aminostickstoff (nach van Slyke bestimmt) belief sich auf 7,8% und der an Ammoniakstickstoff auf 0,37%.

200 g des Präparates wurden in 600 g warmen Wassers gelöst und nach dem Ansäuern mit etwas Essigsäure (zur Zerlegung etwa vorhandener Natriumsalze) auf dem Wasserbad bis auf die Hälfte des ursprünglichen Volumens eingedampft. Es trat hierbei bereits Abscheidung von Substanz ein. Wir fällten nun mit dem gleichen Volumen absoluten Alkohols, saugten nach dem Erkalten von der abgeschiedenen Substanz ab und wuschen sie mit verdünntem Alkohol aus. Das Filtrat wurde auf etwa $\frac{1}{3}$ eingedunstet und dann mit etwa $\frac{1}{2}$ l absoluten Alkohols versetzt. Es fand wiederum eine reichliche Fällung statt. Wir saugten von ihr ab, dampften das Filtrat auf ca. 50 ccm ein, fällten mit der 6fachen Menge absoluten Alkohols, filtrierten wieder von der entstandenen Fällung ab, engten das Filtrat erneut stark ein, versetzten es dann mit reichlich dem doppelten Volumen absoluten Alkohols und fällten schließlich die Lösung mit einem halben Liter Äther.

Die Menge des ausgefällten Produktes betrug 33 g. Dieses Präparat wurde auf Pyrrolidincarbonensäure untersucht.

Wir lösten die Substanz in 210 ccm Wasser. Von dieser Lösung kamen 155 ccm = $\frac{3}{4}$ Teile (150 g Caseinpräparat entsprechend) zur weiteren Verarbeitung. Wir kochten die Lösung 10 Minuten lang mit gefälltem Kupferoxyd, filtrierten vom über-

schüssigen Kupferoxyd in der Hitze ab und dampften das dunkelblau bis dunkelgrün gefärbte Filtrat ein. Der stark hygroskopische, etwas klebrige Rückstand wurde nun portionsweise mit ca. 200 ccm absoluten Alkohols ausgekocht. Wir filtrierten dann in der Hitze ab und wuschen mit heißem absoluten Alkohol nach. Als Rückstand hinterblieben 1,75 g (exsikkatortrocken) eines graugefärbten Produktes, das teils aus organischer, teils aus anorganischer Substanz bestand.

Das tierblaue Filtrat wurde mit mehr als 1 l Äther versetzt, das dabei ausgefallene blaue Kupfersalz in wässriger Lösung durch Schwefelwasserstoff zerlegt, das Filtrat vom Schwefelkupfer zur Entfärbung mit Tierkohle behandelt und hierauf unter stark vermindertem Druck bei niedriger Temperatur eingedampft. Den Rückstand nahmen wir in 100 ccm absoluten Alkohols auf, behandelten zur Entfärbung nochmals mit Tierkohle, engten die Lösung etwas ein und fällten schließlich mit etwa 200 ccm Äther. Die Menge des ausgefällten gelblichen amorphen Produktes betrug nach dem Trocken bei ca. 80° 8,6 g.

Diese 8,6 g Substanz wurden in 50 ccm Wasser gelöst. In 16,3%iger wässriger Lösung zeigte sie, im 1 dm-Rohr bei Na-Licht untersucht, bei einem spezifischen Gewicht von 1,052 eine Drehung von $-5,39^\circ$. Hieraus berechnet sich:

$$[\alpha]_D = -31,4^\circ.$$

Die Stickstoffbestimmung ergab folgendes Resultat:

Gesamtstickstoff: 3 ccm der Lösung, 0,516 g Substanz enthaltend, erforderten 39,7 ccm n_{10} -Schwefelsäure. Daraus berechnen sich 10,8% N.

Ammoniakstickstoff: 2,5 ccm = 0,43 g Substanz ergaben 0,0015 g Ammoniakstickstoff oder 0,35%. Auf den Gesamtstickstoff bezogen beträgt die Menge des Ammoniakstickstoffs: 3,2%.

Aminostickstoff: Die Bestimmung des Aminostickstoffs nach van Slyke ergab für 0,17 g Substanz 0,00518 g N oder: 3,05%. Auf den Gesamtstickstoff umgerechnet beläuft sich demnach die Menge des Aminostickstoffs auf 28,3%. Dieser

Befund beweist mit Sicherheit, daß neben Prolin noch andere Aminosäuren vorhanden waren.

Aus den gefundenen Werten für das Drehungsvermögen und der festgestellten Stickstoffmenge berechnet sich für die nach dem oben erwähnten Verfahren abgetrennten 8,6 g alkohollöslicher Substanz folgender Gehalt an Prolin:

Aus der gefundenen, spezifischen Drehung — $31,4^\circ$ ergibt sich bei Zugrundelegung des für reines Prolin in wässriger Lösung beobachteten Wertes von — $77,40^\circ$,¹⁾ daß die untersuchten 8,6 g Substanz **3,5 g** Prolin enthielten.

Aus den für den Gesamtstickstoff, Ammoniak- und Aminostickstoff gefundenen Werten ergibt sich folgende Berechnung des Prolingehaltes. Werden von dem Gesamtstickstoffwert (10,8%) der gefundene Wert des Ammoniakstickstoffs (0,35%) und der des Aminostickstoffs (3,05%), also die Stickstoffwerte, welche für Prolin nicht in Betracht kommen können, abgezogen, so verbleiben 7,4% Stickstoff. Da das Prolin 12,17% Stickstoff enthält, so müßten demnach 60,8% der untersuchten Substanz reines Prolin gewesen sein. Die isolierten 8,6 g alkohollöslicher Substanz, die aus 150 g abgebauten Caseins gewonnen wurden, entsprächen somit **5,2 g** reinen Prolins. Auf 100 g Caseinpräparat kämen demnach **3,47 g Prolin**. Die berechneten Prolinwerte zeigen, wie das zu erwarten war, erhebliche Differenzen. Es wäre auffallend, wenn die unzweifelhaft neben Prolin vorhandenen anderen Aminosäuren keinen Einfluß auf das Drehungsvermögen des Gemisches gehabt hätten. Beim Casein ist die einzige optisch inaktive Aminosäure, das Glykokoll, ausgeschlossen.

Zur Aufarbeitung der erwähnten Lösung von 50 ccm auf Prolin wurde, wie folgt, verfahren:

12,6 g der Lösung, die 2,16 Substanz enthielt, wurden mit einigen Kubikzentimetern starker Natronlauge versetzt und unter Kühlung mit 5 ccm Phenylisocyanat gekuppelt. Schließlich verdünnten wir mit etwas Wasser, schüttelten mit Tierkohle

¹⁾ Emil Fischer, Über die Hydrolyse des Caseins durch Salzsäure. Diese Zeitschrift, Bd. 33, S. 151 (1901).

und säuerten die Lösung mit Salzsäure an. Es trat eine etwas ölige Fällung ein. Wir gossen von ihr ab, wuschen mit Wasser aus und trockneten im Exsikkator. Die dabei erhaltene feste hellbraun gefärbte Substanz wog 2,21 g. (Verarbeitung des Filtrats vgl. unten.) Wir versetzen sie mit 30 ccm 10^o iger Salzsäure, engten auf dem Wasserbade ein und fügten wieder etwas Salzsäure und schließlich reichlich 50 ccm Alkohol hinzu. Wir erhielten eine rötlich-gelb gefärbte Flüssigkeit. Zur Entfärbung erwärmten wir sie mit Tierkohle. Dann wurde stark eingeengt. Es schied sich eine krystallinische Substanz (ca. 0,4 g) ab. Sie erwies sich als anorganisch. Das Filtrat ergab beim langsamen Abdunsten weiterhin farblose Krystalle. Sie wurden abgesaugt und mit Wasser und Alkohol gewaschen. Die so erhaltene Substanz wog ca. 0,1 g. Aus heißem Wasser schied sie sich in glänzenden, farblosen Krystallblättchen ab. Sie schmolzen bei ca. 118^o ohne Zersetzung. Sie zeigten demnach den Schmelzpunkt des Anhydrids der inaktiven Prolin-Phenylcyanatverbindung.¹⁾ Die gewonnenen Krystalle lösten sich auch, wie diese, leicht in heißem absoluten Alkohol und schwer in kaltem Wasser.

Das Filtrat der oben erwähnten 2,21 g wurde mit 10 ccm Salzsäure versetzt, auf dem Wasserbade, zuletzt unter Zusatz von etwas Alkohol, eingedunstet. Der Rückstand wurde zur Trennung vom Kochsalz mit absolutem Alkohol ausgekocht. Die rötlich gefärbte Flüssigkeit behandelten wir mit Tierkohle und dunsteten bis auf eine kleines Volumen ein. Es traten Krystalle auf, die abgesaugt und mit Äther gewaschen wurden. Die exsikkator-trockene Substanz wog 3,5 g. Sie wurde in der 20fachen Menge heißen Wassers gelöst und mit Tierkohle gekocht. Beim Erkalten schieden sich leichte, farblose (blättchenartige) Krystalle aus: ihre Menge betrug fast 0,2 g. Sie erwiesen sich als das Phenylhydantoin der aktiven Pyrrolidincarbonsäure. Sie schmolzen bei 143—144^o.

Aus dem Filtrate, das sich schnell rötlich-violett färbte, konnten keine weiteren Mengen an Hydantoin gewonnen werden.

¹⁾ Emil Fischer. Synthese der α,δ -Diaminovaleriansäure, Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, Jg. 34, S. 454 (1901).

Dagegen gelang es, daraus noch fast 1,5 g weißlicher Krystalle zu isolieren, die gegen 200° mit Zersetzung schmolzen. Beim Versuche, sie umzukrystallisieren, wurde wiederum das Auftreten eines roten Farbstoffes beobachtet. Daneben schieden sich lange farblose Nadeln ab, während sich die Flüssigkeit grün färbte.

Unter Zugrundelegung der oben erwähnten Ausbeuten an Phenylhydantoin des Prolins (0,1 g + 0,2 g) berechnet sich also für 100 g abgebauten Caseinpräparates eine Menge von 0,84 g Hydantoinverbindung oder von 0,45 g Prolin. Es ist ganz selbstverständlich, daß diese Menge nicht dem wahren Gehalt des Caseins an Prolin entspricht. Sicher enthielt auch das untersuchte vollständig verdaute Casein mehr Prolin, als wir auf diesem langwierigen Wege isolieren konnten.

Es sei noch bemerkt, daß wir aus einem Caseinverdauungsgemisch, das wir nach 3monatlicher Verdauung von Casein mit Pankreatin erhalten hatten, bei der Fahndung auf Pyrrolidincarbonsäure Isoleucin isolieren konnten. Wir engten die Verdauungsflüssigkeit ein, fällten mit Äthylalkohol, dann mit Methylalkohol und das dabei gewonnene Filtrat mit Äther. Das Filtrat dieser letzten Fällung wurde eingedampft, der Rückstand in Wasser aufgenommen und diese Lösung mit gefällttem Kupferoxyd gekocht. Die tiefblau gefärbte Kupfersalzlösung wurde eingedunstet, der Rückstand bis auf eine sehr geringe Menge in Alkohol gelöst und aus dieser Lösung mittels Äthers ein voluminöses, flockiges Kupfersalz gefällt, das sich an der Luft als sehr hygroskopisch erwies. Wir lösten es wieder in Wasser und zerlegten es durch Einleiten von Schwefelwasserstoff. Das Filtrat vom Kupfersulfid wurde eingedampft und der Rückstand in Methylalkohol gelöst. Beim Einengen dieser Lösung schieden sich farblose Krystalle ab, die sich als Isoleucin erwiesen. Seine Menge betrug in der untersuchten Fraktion weniger als $\frac{1}{4}\%$ des angewandten Caseins. Beim Verarbeiten der oben erwähnten Ätherfällung, Eindampfen des alkoholischen Extraktes usw. machte sich auch der Geruch nach Prolin bemerkbar.

Darstellung von Prolin in Form seines Hydantoins aus Darminhalt.

In einer vor kurzem erschienenen Arbeit wurde über die Isolierung größerer Mengen von Aminosäuren aus dem Darminhalt verschiedener Tiere berichtet.¹⁾ Es gelang, ganz erhebliche Mengen verschiedenartiger Aminosäuren direkt durch Krystallisation abzuschneiden. Die sirupöse Mutterlauge diente zur Abtrennung von Prolin. Der Sirup wurde zunächst mit Methylalkohol ausgekocht und das Extrakt noch heiß in kalten absoluten Alkohol eingetragen. Von der auftretenden Fällung wurde abfiltriert und das alkoholische Filtrat unter vermindertem Druck zur Trockene verdampft. Den Rückstand extrahierten wir in der Kälte mit absolutem Alkohol und wiederholten diesen Prozeß des Eindampfens und Wiederauflösens so lange, bis schließlich der verbleibende Rückstand vollständig in Alkohol löslich war. Nun nahmen wir den Rückstand in Wasser auf, kochten mit überschüssigem Kupferoxyd, filtrierten vom überschüssigen Kupferoxyd ab und verdampften die blaue Lösung unter vermindertem Druck zur Trockene. Der Rückstand wurde mit absolutem Alkohol in der Kälte ausgelaugt. Wir ließen den Alkohol 48 Stunden mit ihm in Berührung. Es wurde nunmehr filtriert und vorläufig nur das Filtrat weiter verarbeitet. Dann wurde zur Trockene verdampft und wieder mit absolutem Alkohol in der Kälte ausgelaugt. Es verblieb ein geringer amorpher Rückstand. Er zerfloß an der Luft zu einer grünen Schmiere. Der in Alkohol lösliche Teil wurde durch Verdampfen des Alkohols isoliert und in Wasser gelöst. In die Lösung wurde Schwefelwasserstoff eingeleitet, vom Kupfersulfid abfiltriert und das hellgelbe Filtrat unter vermindertem Druck zur Trockene verdampft. Der verbleibende zähe Sirup zeigte deutlich Geruch nach Pyrrolidin. Er löste sich vollständig in absolutem Alkohol. Die klare Lösung wurde vorsichtig mit Äther versetzt. Es setzte sich an den Wänden des Gefäßes eine klebrige amorphe Masse ab. Von ihr wurde rasch abfiltriert und dieser Prozeß unter tropfen-

¹⁾ Emil Abderhalden, Über den Gehalt des Darminhaltes einiger Säugetiere an freien Aminosäuren. Diese Zeitschrift, Bd. 74, S. 436 (1911).

weisem Zusatz von Äther so lange wiederholt, bis schließlich eine weiße, pulvrige Fällung eintrat. Die Menge des amorphen Produktes war sehr erheblich, während von der krystallinischen Abscheidung nur Spuren zu erhalten waren. Alle Bemühungen, das unzweifelhaft vorhandene Prolin direkt in reinem Zustand abzutrennen, waren ohne Erfolg. Stets haftete ein Körper an, der verursachte, daß das isolierte Produkt Wasser anzog und dann verschmierte. Wir haben deshalb auch hier in gewohnter Weise mit Phenylisocyanat gekuppelt und die erhaltene Verbindung in das Hydantoin übergeführt. Wir gewannen im ganzen 0,5 g reines, umkrystallisiertes Hydantoin vom Schmelzpunkt 143° . Diese Menge entspricht dem Darminhalt von 5 Hunden.

0,1001 g Substanz brauchten 9,25 ccm $n/10$ -Schwefelsäure.

Berechnet für $C_{12}H_{12}O_2N_2$: 12,96 % N

Gefunden: 12,93 % N.