

Isolierung von Glycyl-l-phenylalanin aus dem Chymus des Dünndarmes.

Anhang: Biologische Studien mit Hilfe verschiedener Abbaustufen aus Proteinen und synthetisch dargestellten Polypeptiden.

Von

Emil Abderhalden.

(Aus dem physiologischen Institute der Universität Halle a. S.).
(Der Redaktion zugegangen am 13. September 1912.)

In einer kürzlich mitgeteilten Veröffentlichung¹⁾ war über die direkte Isolierung von Aminosäuren verschiedener Art aus dem Inhalt des Dünndarms berichtet worden. Wir haben die Mutterlauge der durch Krystallisation abgetrennten Aminosäuren stark konzentriert und mit einer 10%igen Phosphorwolframsäurelösung gefällt. Die Fällung löste sich im Überschuß, weshalb nur gerade so viel vom Fällungsmittel zugegeben wurde, bis eine Probe bei weiterem Zusatz der Phosphorwolframsäurelösung keine erneute Fällung, sondern eher eine Abnahme des schon vorhandenen Niederschlages zeigte. Der Phosphorwolframsäureniederschlag wurde dann abfiltriert, scharf abgepreßt, wiederholt in einer Reibschale mit kaltem Wasser durchgerieben und stets wieder abgesaugt und abgepreßt. Wir versuchten, den Niederschlag auf verschiedene Arten zu trennen. Ein Teil löste sich in heißem Wasser, der größte Teil ging ferner in heißen Alkohol über. Auch ließ sich durch überschüssige Phosphorwolframsäurelösung eine Trennung herbeiführen, indem ein Teil des Niederschlages sich leichter in ihr löste, als der Rest. Doch führten alle diese recht mühsamen Trennungsverfahren auch bei kombinierter Anwendung zu keinen bestimmten Verbindungen. Wohl gelang es, solche zu isolieren, die nur wenige Aminosäuren enthielten. Wir konnten ganz scharf Tyrosin und ferner Tryptophan enthaltende Produkte und von diesen Aminosäuren ganz freie Verbindungen abtrennen, doch steht eine Identifizierung mit Polypeptiden noch aus.

¹⁾ Emil Abderhalden, Weiterer Beitrag zur Frage nach dem Schicksal der Eiweißabbauprodukte im Darmkanal. Über das Vorkommen der einzelnen Aminosäuren in verschiedenen Teilen des Darmkanals. Diese Zeitschrift, Bd. 78, S. 382, 1912.

Einen Teil des Phosphorwolframsäureniederschlages verarbeiteten wir direkt ohne vorherige Trennung durch Lösungsmittel. Er wurde in der Kälte mit Baryt in der üblichen Weise umgesetzt. Im Filtrat des phosphorwolframsauren Baryts fällten wir den überschüssigen Baryt quantitativ mit Schwefelsäure. Das Filtrat vom Baryumsulfat wurde unter vermindertem Druck bei 40° des Wasserbades ganz zur Trockene verdampft. Den Rückstand nahmen wir in heißem Methylalkohol auf. Es verblieb ein krystallinischer Rückstand, der sich schließlich als ein Gemisch verschiedener Aminosäuren: Phenylalanin, Prolin, Isoleucin, Leucin erwies. Die Identifizierung dieses Rückstandes kostete sehr viel Zeit, denn es schien eine Verbindung vorzuliegen, die mehrere Bausteine aufwies. Daß ausschließlich Aminosäuren vorhanden waren, ergab die Bestimmung des Aminostickstoffs des gereinigten Produktes. Der erhaltene Wert änderte sich nicht, als das Gemisch 16 Stunden mit 25%iger Schwefelsäure gekocht wurde. Beim unreinen Produkt hatte eine Zunahme des Aminostickstoffs nach erfolgter Hydrolyse stattgefunden. Diese Beobachtung zeigte, daß neben den Aminosäuren auch Verbindungen zugegen waren, die solche gebunden enthielten. Doch war die Menge des isolierten Materials zu gering, um identifiziert zu werden. Bei der Aufarbeitung des in heißem Methylalkohol löslichen Anteils des oben erwähnten Verdampfungsrückstandes bedienten wir uns beständig der Formoltitration und in neuerer Zeit auch des van Slykeschen Verfahrens zum Nachweis von Aminogruppen als Leitschnur. Bei jedem einzelnen Produkte stellten wir fest, ob der Gehalt an Aminostickstoff nach erfolgter Hydrolyse anstieg. Auf diese Weise vermieden wir Täuschungen durch freie Aminosäuren. Sie treten deshalb sehr leicht ein, weil sich oft freie Aminosäuren vorfinden, wo man sie nach den angewandten Trennungsv erfahren gar nicht vermutet.

Das methylalkoholische Extrakt ließen wir sich langsam abkühlen. Es schieden sich amorphe Massen aus. Von diesen wurde abfiltriert und die Mutterlauge soweit eingeengt, bis Abscheidungen erfolgten. Von diesen wurde wieder abfiltriert. Mit dem Filtrat wurde in gleicher Weise verfahren. Schließlich verblieb

ein zäher, gelb gefärbter Sirup. Er wurde wieder in heißem Methylalkohol aufgenommen und die Lösung nach erfolgtem Abkühlen in das gleiche Volumen Äthylalkohol gegossen. Die entstandene Fällung wurde abgenutscht und zum Filtrat nochmals das gleiche Volumen Äthylalkohol zugesetzt. Der ganze Prozeß wurde noch einmal wiederholt und das dann resultierende Filtrat wieder unter vermindertem Druck bei 38° zur Trockene verdampft. Der Rückstand wurde nunmehr mit heißem Äthylalkohol übergossen. Es ging der größte Teil in Lösung. Den verbleibenden Rückstand dampften wir mehrmals mit absolutem Alkohol zur Trockene. Er wurde allmählich fest und ließ sich pulvern. Das so gewonnene Produkt gab Biuretreaktion, ferner ganz schwach Millons Reaktion, sehr ausgesprochene Xanthoproteinreaktion, dagegen keine Schwefelbleiprobe und mit Glyoxylsäure und konz. Schwefelsäure keine Reaktion. Der Aminostickstoff nahm nach erfolgter Hydrolyse ganz beträchtlich zu. Es lag somit ohne Zweifel eine Verbindung vor, die Aminosäuren gebunden enthielt. Die Menge des Rohproduktes betrug 5,6 g.

Zur Reinigung wurde das Rohprodukt in heißem Wasser gelöst. Es löste sich in 60 ccm heißem Wasser. Beim Abkühlen fiel eine amorphe Substanz, die Tyrosin enthielt. Von der Fällung wurde abfiltriert und die Mutterlauge eingeengt. Immer wieder schieden sich an der Wand des Gefäßes amorphe, zum Teil gelatinöse Massen ab. Zuletzt verblieb eine Mutterlauge, die mit Millons Reagens keine Reaktion mehr gab, wohl aber mit konz. Salpetersäure intensive Gelbfärbung. Nach Zusatz von Alkohol zu der heißen wässerigen Lösung bis zur bleibenden Trübung erschienen beim Abkühlen kleine Nadelchen. Ihre Menge nahm beim Verdunsten der Lösung zu. Nach einiger Zeit zeigten sich neben den kurzen Nadelchen auch lange, ganz dünne Nadeln. Ferner schieden sich außerdem besonders am Verdunstungsrand amorphe Massen aus. Eine mechanische Trennung dieser offenbar verschiedenartigen Massen war unmöglich. Wir verdampften deshalb Fällung und Mutterlauge nochmals zusammen zur Trockene und zogen den Rückstand mit Benzol, Chloroform und endlich mit Äther aus. Es

ging nur ein geringer Teil in Lösung. Den unlöslichen Anteil lösten wir in Wasser. Er löste sich selbst in der Hitze sehr schwer. Beim Abkühlen trat auffallenderweise keine Abscheidung ein. Es mußte sehr stark eingeengt werden, bis allmählich sich lange, sehr dünne Nadelchen abschieden. Sie wurden diesmal nicht durch amorphe Massen verunreinigt. Unter dem Mikroskop betrachtet erschienen sie einheitlich. Die gesamte Ausbeute an diesen Krystallen betrug 2,3 g.

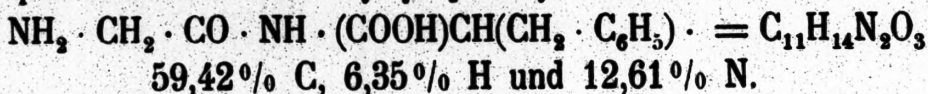
Das Produkt löste sich in kaltem Wasser sehr schwer, leichter in heißem. In den gebräuchlichen organischen Lösungsmitteln löste es sich fast gar nicht, nur heißer Alkohol nahm etwas von der Substanz auf. Sie zersetzte sich beim raschen Erhitzen gegen 270° (korr.). Die Elementaranalyse ergab das folgende Resultat:

0,1124 g Substanz gaben 0,2461 g CO₂ und 0,0647 g H₂O.

0,1012 g Substanz. Nach Kjeldahl verbraucht: 9,2 ccm
n/10 - Schwefelsäure.

Gefunden: 59,71% C, 6,39% H und 12,72% N.

Die Molekulargewichtsbestimmung ergab 230,5, 224,8, 229,0. Da das Produkt starke Xanthoproteinreaktion ergab, wurde auf ein Phenylalanin enthaltendes Dipeptid geschlossen. In Betracht kamen dem Molekulargewicht entsprechend nur Glykokoll und Alanin. Die Resultate der Analyse stimmen recht gut auf ein aus Glykokoll und Phenylalanin aufgebautes Dipeptid. Berechnet für Glycyl-phenylalanin:



Das Molekulargewicht dieser Verbindung beträgt 222,13. Die Eigenschaften stimmen auch sehr gut auf diese Verbindung. Fraglich war zunächst noch, ob Glycyl-phenylalanin oder Phenylalanyl-glycin vorlag. Für das Vorliegen der ersteren Verbindung sprach der Zersetzungspunkt. Er liegt bei der letzteren Verbindung beträchtlich tiefer (224°). Auch die Löslichkeitsverhältnisse sind andere.

Schließlich haben wir auch das Drehungsvermögen des isolierten Dipeptids festgestellt. Es betrug in wässriger Lösung +36,8°. Das synthetisch gewonnene Glycyl-l-phenylalanin zeigt

$[\alpha]_{20}^D = +42,0^\circ$, während das isomere l-Phenylalanyl-glycin $=54,20^\circ$ nach rechts dreht.¹⁾ Durch weitere Fraktionierung konnten wir das Drehungsvermögen unserer Substanz auf $38,6^\circ$ steigern.

Zu einer quantitativen Durchführung der totalen Hydrolyse des gewonnenen Dipeptids reichte leider das Material nicht mehr aus. Wir kochten 0,3 g des Dipeptids mit 5 ccm rauchender Salzsäure 6 Stunden am Rückflußkühler. Beim Einengen des Hydrolysates auf dem Wasserbade schied sich bald salzsaures Phenylalanin aus. Es wurde mit dem Spatel abgeschöpft und auf Ton von der Mutterlauge befreit. Zur Identifizierung wurde eine Probe der Krystalle mit Ammoniak verrieben und dann die Lösung nach erfolgtem Aufkochen eingengt. Es schieden sich die bekannten perlmutterartig glänzenden Blättchen des Phenylalanins ab. Sie gaben deutlich die Phenylacetaldehydprobe und auch die Xanthoproteinreaktion. Die Mutterlauge des salzsauren Phenylalanins wurde zur Trockene verdampft und der Rückstand in gewohnter Weise mit Alkohol und gasförmiger, trockener Salzsäure verestert. Beim Impfen mit einem Kryställchen von Glykokollesterchlorhydrat konnte nach einiger Zeit diese Verbindung in zur Identifizierung genügender Menge erhalten werden. Die feinen Nadelchen schmolzen bei 144° .

Mit der Feststellung dieser beiden Verbindungen war wohl bewiesen, daß diese am Aufbau des isolierten Produktes beteiligt waren, dagegen würde diese Art der Aufarbeitung des Hydrolysates nicht ausschließen, daß noch weitere Bausteine vorhanden waren. Wir haben in dieser Hinsicht im Laufe der Jahre viele unangenehme Erfahrungen gemacht. Produkte, die nach den Eigenschaften, dem Molekulargewicht und den Ergebnissen der Elementaranalyse und der totalen Hydrolyse eindeutig identifiziert erschienen, enthüllten sich bei weiterer Fraktionierung plötzlich als Gemische offenbar stereoisomerer Verbindungen, ja oft waren unzweifelhaft sogar freie

¹⁾ Vgl. Emil Fischer und Walter Schöller, Synthese von Polypeptiden. Derivate des l-Phenylalanins. *Annalen der Chemie und Pharmacie*. Bd. 357, S. 1, 1907.

Aminosäuren beigemischt. Die Eigenschaft, Mischkristalle zu bilden, die all diesen Produkten in hervorragendem Maße eigen ist, stört alle Untersuchungen auf dem Gebiete der partiellen Hydrolyse von Proteinen.

Wir haben, um noch einen weiteren Anhaltspunkt zu besitzen, den Aminostickstoff bestimmt, doch war ein eindeutiges Resultat nicht möglich, weil bekanntlich die van Slyke'sche Methode bei solchen Polypeptiden, bei denen das Glycin die Aminogruppe trägt, keine genauen Resultate liefert.¹⁾ Wir hofften, dem gleichen Produkte noch einmal zu begegnen. Es war dies nicht der Fall. Wir entschlossen uns deshalb, den Rest der isolierten Substanz zu opfern und daraus das Anhydrid zu gewinnen. Wir stellten zunächst in gewohnter Weise den salzsauren Methylester dar und leiteten in dessen alkoholische Lösung trockenes gasförmiges Ammoniak. Vom ausgeschiedenen Chlorammonium wurde abfiltriert und die Lösung eingeengt. Bei längerem Stehen bei 37° erfolgte Abscheidung von feinen Nadelchen. Durch weiteres Einengen wurde die Abscheidung vervollständigt. Das erhaltene Produkt war in Wasser sehr schwer löslich. Es zersetzte sich gegen 270° (korr.) und zeigte auch im übrigen alle Eigenschaften des Glycyl-l-phenylalaninanhydrids.

0,1168 g Substanz gaben 0,2797 g CO₂ und 0,0621 g H₂O.

0,1400 g Substanz. Nach Kjeldahl verbraucht 13,8 ccm
n/10 - Schwefelsäure.

Gefunden: 65,30% C, 5,98% H, und 13,80% N.

Berechnet für
$$\begin{array}{c} \text{C}_6\text{H}_5 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CO} \cdot \text{NH} \\ | \qquad \qquad \qquad | \\ \text{NH} \cdot \text{CO} \cdot \text{CH}_2 \end{array}$$

= C₁₁H₁₂N₂O₂ (204,1): 64,67% C, 5,92% H und 13,73% N.

In Eisessig gelöst, zeigte das Anhydrid $[\alpha]_{20}^D = 98,52^\circ$ nach rechts. Das synthetisch dargestellte Anhydrid hat $[\alpha]_{20}^D = 100,5^\circ$ nach rechts. Die Ausbeute an Glycyl-l-phenylalaninanhydrid war eine sehr gute (ca. 85%), sodaß wir wohl mit Recht den

¹⁾ Vgl. hierzu: Emil Abderhalden und van Slyke, Die Bestimmung des Aminostickstoffes in einigen Polypeptiden nach der Methode von van Slyke, Diese Zeitschrift, Bd. 74, S. 505, 1911.

Schluß ziehen dürfen, daß außer dem festgestellten Glycyl-l-phenylalanin kein weiteres Produkt in der gereinigten Substanz vorhanden war.

Das Glycyl-l-phenylalanin ist das erste Polypeptid, das direkt aus Darminhalt isoliert werden konnte. Daß weitere Polypeptide vorhanden sind, unterliegt nach unseren Beobachtungen keinem Zweifel. Das langsame Fortschreiten der Identifizierung von Produkten, die bei der partiellen Hydrolyse von Proteinen auftreten, ist ausschließlich auf die Schwierigkeit der Reinigung der einzelnen Verbindungen zurückzuführen. Über Produkte, die nicht mit voller Schärfe als einheitlich erkannt sind, Mitteilungen zu machen, hat wenig Wert.

Hervorheben wollen wir noch, daß wir alle Abbaustufen, die wir in verhältnismäßig reinem Zustande aus Proteinen gewinnen konnten, auch biologisch auf ihre Wirkung geprüft haben. Diese Untersuchungen liegen einige Zeit zurück. Die einen sind von Herrn Prof. Franz Müller in Berlin durchgeführt worden, andere hat Herr Prof. Pfeiffer, Graz, in Arbeit. Eine Mitteilung der erhaltenen Resultate wird erfolgen, sobald die Produkte soweit charakterisiert sind, daß sie immer wieder gewonnen werden können. Nur soviel sei hier schon erwähnt, daß wir, was Abbauprodukte aus an Monoaminosäuren reichen Proteinen anbetrifft, bestätigen können, was Schittenhelm und Weichardt¹⁾ hervorheben, nämlich daß diese relativ ungiftig sind. Unsere Untersuchungen sind ganz unabhängig von denen der genannten Autoren unternommen worden. Sie haben zum Ziele, festzustellen, ob einheitliche Abbaustufen aus Proteinen an und für sich giftige Wirkungen entfalten, oder ob Gemische von solchen erst in Kombination giftig wirken. Endlich interessiert uns die Frage, ob je nach der Art des Abbaus aus einem ganz unwirksamen Produkte wirksame entstehen können.

¹⁾ Vgl. Alfred Schittenhelm und Wolfgang Weichardt. Eiweißumsatz und Überempfindlichkeit. Über die biologische Differenzierung von Eiweiß- und Eiweißspaltprodukten durch ihre Wirkung auf den tierischen Organismus. Z. f. experim. Pathol. und Therapie, Bd. 11, S. 65, 1912.

Die Hauptschwierigkeit bei diesen Untersuchungen bereitet das hartnäckige Zurückhalten von Aschenbestandteilen durch diese Abbauprodukte.

In diesem Zusammenhange sei noch erwähnt, daß wir die Versuche über Erzeugung einer Anaphylaxie durch synthetisch dargestellte Polypeptide wieder aufgenommen haben.¹⁾ Wir haben nochmals 0,1 g der folgenden Polypeptide Meer-schweinchen intraperitoneal einverleibt: l-Leucyl-oktaglycyl-glycin und l-Leucyl-triglycyl-l-leucyl-oktaglycyl-glycin. 15 Tage nach der ersten Injektion wurde die Einspritzung wiederholt. Während das mit dem ersteren Polypeptid sensibilisierte Meer-schweinchen nur Erscheinungen geringfügiger Art aufwies, zeigte das mit dem 14-Peptid gespritzte Meerschweinchen einen Temperatursturz von 10°. Es starb nach 6 Stunden, nachdem es vorher lebhaft Krämpfe gezeigt hatte. Es ist somit zum erstenmal gelungen, Anaphylaxie mittels eines synthetisch dargestellten Produktes aus der Eiweißreihe zu erzeugen. Leider können wir nicht mit Bestimmtheit aussagen, ob das gespritzte Material die Zusammensetzung des oben genannten Polypeptids hatte. Es sind uns aus folgenden Gründen Zweifel gekommen. Beim längeren Kochen der wässerigen Lösung des Polypeptids schied sich ganz plötzlich eine Gallerte ab. Man hatte den Eindruck, als sei Koagulation eingetreten. Wir dachten zunächst an eine einfache physikalische Zustandsänderung. Allein der Versuch, das Molekulargewicht des erwähnten Polypeptids festzustellen, führte uns zu Resultaten und Beobachtungen, die es nicht unwahrscheinlich machen, daß auch eine chemische Veränderung beim Kochen eingetreten ist. Es scheint sich um eine Polymerisation zu handeln. Diese Beobachtungen sind in mehr als einer Hinsicht wichtig, weshalb wir die Darstellung hoch molekularer Polypeptide wieder aufgenommen haben.

¹⁾ Vgl. hierzu: Emil Abderhalden und Ernst Kämpf, Serologische Studien mit Hilfe der optischen Methode. XVI, Mitt., Diese Zeitschr., Bd. 71, S. 421, 1912.