

Fortgesetzte Studien über die Pyrrolidoncarbonsäure und aus ihr aufgebaute Polypeptide.

Von

Emil Abderhalden und Erich Wurm.

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

(Der Redaktion zugegangen am 23. September 1912.)

Wie wiederholt an dieser Stelle erwähnt worden ist, besteht die Möglichkeit, daß Pyrrolidoncarbonsäure als Baustein von Proteinen vorkommt. Der eine von uns (A.) hat deshalb umfassende Untersuchungen unternommen, um dieser Säure nachzuspüren. Die Entscheidung der Frage, ob diese Verbindung zu den regelmäßig oder überhaupt vorkommenden Bausteinen der Eiweißstoffe gehört, hat aus mehreren Gesichtspunkten Interesse. Einmal steht die Pyrrolidoncarbonsäure zwischen Glutamin- und Pyrrolidincarbon-säure. Ferner ist es wichtig, über ihre Anwesenheit orientiert zu sein, weil als Maßstab einer vollständigen Hydrolyse von Proteinen der Gehalt des Hydrolysates an Aminostickstoff vor und nach erfolgtem Kochen mit starken Säuren gewählt worden ist. Man baut z. B. irgend ein Protein mit Fermenten ab, stellt dann in einem aliquoten Teil der Lösung den Aminostickstoff nach Sørensen oder van Slyke fest und kocht hierauf einen bestimmten Teil der Verdauungsflüssigkeit mit rauchender Salzsäure (am besten leitet man gasförmige Salzsäure in die Lösung bis zur Sättigung ein), bestimmt dann wieder in einem aliquoten Teil des Hydrolysates den Aminostickstoff und vergleicht nun die gefundenen Werte unter einander. Hat eine Zunahme des Aminostickstoffs stattgefunden, dann wird der Schluß gezogen, daß der Abbau durch die Fermente ein unvollständiger war. Diese Schlußfolgerung kann dann unrichtig sein, wenn im Eiweißmolekül Bausteine vorhanden sind, die durch die Säure veränderbar sind. Pyrrolidoncarbon-säure läßt als Iminosäure weder nach Sørensen noch nach van Slyke Aminostickstoff erkennen. Sobald jedoch auf diese Aminosäure z. B. Salzsäure einwirkt, wird sie aufge-

spalten. Es entsteht Glutaminsäure. Es könnte somit das Vorkommen von Pyrrolidoncarbonsäure im Eiweißmolekül unter Umständen zu einer ganz unrichtigen Beurteilung des Verlaufs einer Fermenthydrolyse führen.

Um die Pyrrolidoncarbonsäure besser kennen zu lernen, haben wir noch einige Derivate studiert und vor allem haben wir weitere Polypeptide, an deren Aufbau die genannte Säure beteiligt ist, gewonnen. Um die Reinheit der dargestellten Produkte zu prüfen, bestimmten wir den Aminostickstoff nach van Slyke. Diese Methode ist überhaupt ausgezeichnet dazu geeignet, um die Reinheit von Polypeptiden festzustellen.

Als Ausgangsmaterial zu den folgenden Versuchen verwendeten wir reine unkrystallisierte Glutaminsäure aus Weizen gliadin. Sie wurde in einem weithalsigen Rundkolben im Ölbad auf 180° erhitzt und dann noch etwa eine Stunde lang bis 195°. Die hellbraune Schmelze wurde noch heiß in wenig Wasser gelöst und mit Tierkohle entfärbt. Beim Erkalten krystallisierte die Pyrrolidoncarbonsäure in weißen, schönen Krystallen aus, die abgesaugt und bei 100° getrocknet wurden. Sie zeigten sogleich den richtigen Schmelzpunkt 181—182°. Aus der Mutterlauge ließ sich noch mehr reine Säure gewinnen, wenn sie möglichst verdampft und der Sirup schnell auf ca. 200° erhitzt wurde. Durch Umkrystallisieren aus Wasser erhielten wir dann noch reichliche Mengen. Die Ausbeute betrug meist 80—85% der Theorie.

Darstellung von Pyrrolidonylchlorid.

Sie erfolgte in der bereits mitgeteilten Weise.¹⁾ 20 g feingepulverte Pyrrolidoncarbonsäure erwärmten wir mit ca. 70 g Thionylchlorid in einem Kölbchen, das mit Steigrohr und Chlorcalciumrohr versehen war, auf 55—60°. Wenn die Salzsäureentwicklung nachgelassen hatte, wurde schnell auf

¹⁾ Emil Abderhalden und Akikazu Suwa, Synthese von Polypeptiden. Derivate der Pyrrolidoncarbonsäure, Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch., Jg. 43, S. 2151, 1910. — Emil Abderhalden und Karl Kautzsch, Weiterer Beitrag zur Kenntnis der Glutaminsäure und der Pyrrolidoncarbonsäure. III. Quecksilbersalze, Pyrrolidonylchlorid und Pyrrolidonylamid, Diese Zeitschrift, Bd. 78, S. 333, 1912.

vorgewärmtem Trichter durch Glaswolle in einen Erlenmeyer-Kolben filtriert, der in einem Vakuumexsikkator stand. Dieser wurde dann evakuiert und mehrere Stunden stehen gelassen, wobei das Pyrrolidonylchlorid auskrystallisierte. Es wurde dann schnell abgesaugt und mit trockenem Chloroform ausgewaschen. Zum Schluß wurde es im Vakuum über Schwefelsäure und Natriumhydroxyd bis zum Verschwinden des Geruches nach Thionylchlorid völlig getrocknet. Die Ausbeute betrug $18 \text{ g} = 87,5\%$ der Theorie.

Verhalten des Pyrrolidonylchlorids gegen Alkohole.

1. Methylalkohol.

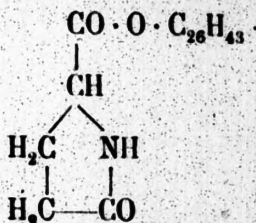
7 g Pyrrolidonylchlorid wurden in 50 ccm Methylalkohol, der durch geglühtes Kupfersulfat völlig entwässert war, gegeben. Es löste sich unter schwacher Erwärmung auf. Der Methylalkohol wurde nun unter vermindertem Druck abdestilliert. Im Destillat waren reichliche Mengen Salzsäure nachzuweisen. Der Rückstand destillierte bei 25 mm Druck bei 180° . Bei einer zweiten Destillation änderte sich der Siedepunkt nicht. Das Produkt krystallisierte nicht und zeigte auch die gleichen Löslichkeitsverhältnisse wie der von E. Fischer und A. Böhner¹⁾ dargestellte Pyrrolidoncarbonsäuremethylester. Erhalten wurden $4,5 \text{ g} = 67\%$ der Theorie.

2. Äthylalkohol.

Wir verfahren in der gleichen Weise, wie beim Methylalkohol. 6 g Pyrrolidonylchlorid wurden in etwa 50 ccm absolutem Alkohol gelöst und dieser sogleich abdestilliert. Das Reaktionsprodukt wurde dann bei 12 mm Druck fraktioniert, wobei die Hauptmenge bei 184° , dem Siedepunkt des Pyrrolidoncarbonsäureäthylesters, überging. Das Destillat erstarrte beim Abkühlen in der Vorlage krystallinisch. Es wurde aus sehr wenig Alkohol und viel Äther umkrystallisiert. Der Ester erweichte bei 45° und schmolz bei $52\text{--}53^\circ$. Die Ausbeute betrug 70% der Theorie.

¹⁾ Emil Fischer und A. Böhner, Verwandlung der Glutaminsäure bezw. Pyrrolidoncarbonsäure in Prolin. Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch., Jg. 44, S. 1332, 1911.

Pyrrolidonyl-cholesterin.



Bei allen folgenden Versuchen war es von größter Wichtigkeit, jede Spur von Feuchtigkeit auszuschließen. Deshalb wurde das Cholesterin unmittelbar vor dem Versuch 5 Stunden lang im Vakuum bei 100° getrocknet. Das Chloroform befand sich über oft erneuertem Phosphorpenoxyd.

5,4 g Cholesterin wurden in etwa 150 ccm trockenem Chloroform gelöst und dazu 2 g Pyrrolidonylchlorid gegeben. Dann wurde $\frac{1}{2}$ Stunde in einem Wasserbad von 65° das Chloroform zu schwachem Sieden gebracht. Der Kolben war mit einem Rückflußkühler mit aufgesetztem Chlorcalciumrohr versehen. Es fand eine lebhaftere Salzsäureentwicklung statt. Als sie fast aufgehört hatte, wurde die Lösung von geringen harzigen Verunreinigungen abfiltriert und im Vakuum stark eingengt. Beim Versetzen mit Petroläther und längerem Stehen in einer Kältemischung fielen Krystalle aus, die abgesaugt und mit Petroläther gewaschen wurden. Sie wurden dann in heißem Alkohol gelöst und die Lösung mit Tierkohle entfärbt. Beim Erkalten krystallisierte das Pyrrolidonyl-cholesterin in weißen, verfilzten Nadelchen aus, die abgesaugt und bei 100° getrocknet wurden. Der Schmelzpunkt ist nicht völlig scharf. Von 199 bis 203° an sintert nämlich die Substanz zu einem dicken, trüben Öltropfen, der dann bei 205° plötzlich klar schmilzt.

Die Substanz löst sich leicht in Chloroform, ziemlich leicht in Äther; in Methyl- und Äthylalkohol ist sie in der Kälte sehr schwer, in der Wärme bedeutend leichter löslich; in Wasser und Petroläther ist sie unlöslich. Die Ausbeute betrug nur 0,6 g.

Zur Analyse wurde die Substanz bei 100° im Vakuum getrocknet.

0,1296 g Substanz gaben 0,3637 g CO_2 und 0,1205 g H_2O .

0,1956 g Substanz gaben 5,0 ccm Stickstoff (16° und 762 mm Druck).

Berechnet auf $C_{31}H_{49}NO_3$: C = 76,95%, H = 10,17%, N = 2,90%.

Gefunden: C = 76,53%, H = 10,40%, N = 3,02%.

Die Mutterlauge wurde eingedampft, in Chloroform gelöst und mit Methylalkohol versetzt. Dabei ergab sich eine starke Krystallabscheidung, die sich durch ihren Schmelzpunkt (146°) als reines Cholesterin erwies.

dl-Pyrrolidonyl-d-alaninester.

Zu 15 g d-Alaninester (2 Mol.), der in 200 ccm Chloroform gelöst war, wurden in der Kälte 8,8 g dl-Pyrrolidonylchlorid gegeben. Das Chlorid löste sich beim Schütteln schnell auf. Die braune Lösung blieb ein paar Stunden stehen und wurde dann im Vakuum möglichst stark eingedampft. Der Rückstand wurde in absolutem Alkohol gelöst und auf genau 100 ccm aufgefüllt. In einem aliquoten Teil wurde das Chlor durch Titration nach Volhard bestimmt und zu dem Rest die berechnete Menge Natrium, in Alkohol gelöst, hinzugefügt. Nach längerem Stehen in Eis wurde ohne Filtration der Alkohol im Vakuum verdampft. Zur Entfernung des Alaninesters wurde mehrere Male mit Alkohol abgedampft. Der Rückstand wurde mit Petroläther versetzt und das Gemisch von Kochsalz und Kupplungsprodukt abgesaugt. Aus der Mutterlauge ließ sich durch Einengen im Vakuum und Fällen mit Petroläther noch eine ziemlich große Menge eines braunen Öles gewinnen, das bei längerem Stehen in einer Kältemischung krystallinisch erstarrte. Beide Fraktionen wurden getrennt in Essigester gelöst, mit Tierkohle entfärbt, vom ungelösten Kochsalz abfiltriert und mit Petroläther wieder abgeschieden. Meist wurde ein farbloses Öl erhalten, das aber bald krystallinisch erstarrte. Die Ausbeute betrug 5 g = 36,7% der Theorie, bezogen auf das angewandte Pyrrolidonylchlorid.

Die Substanz löst sich leicht in Wasser, Methyl- und Äthylalkohol, Chloroform, Aceton, Essigester und Benzol; in Äther und Petroläther ist sie fast unlöslich. Beim Versetzen der Lösung des Esters in Chloroform mit Petroläther fällt er in feinen, zu Rosetten angeordneten Nadeln aus. Schmelzpunkt: 125,5° (korr.).

Zur Analyse wurde die Substanz nochmals aus Essigester und Petroläther umkrystallisiert und im Vakuum bei 80° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

0,1668 g Substanz geben 0,3201 g CO₂ und 0,1078 g H₂O.

0,1203 g Substanz. Verbraucht 10,4 ccm ¹/₁₀-n-Schwefelsäure.

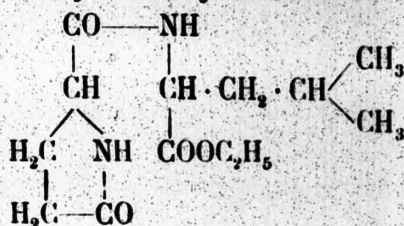
Berechnet auf C₁₀H₁₆N₂O₄: C = 52,59%, H = 7,07%, N = 12,28%.

Gefunden: C = 52,34%, H = 7,23%, N = 12,11%.

0,2262 g Substanz in Wasser gelöst und auf 10 ccm aufgefüllt. Drehung bei Natriumlicht im 1-dm-Rohr 1,05° nach links. $[\alpha]_D^{20} = -46,42^\circ$.

0,1 g Substanz wurden in 10 ccm Wasser gelöst und in 7,5 ccm davon der Stickstoff nach van Slyke bestimmt. Die Reaktionsdauer betrug 5 Minuten. Es wurden 2,9 ccm Stickstoff von 750 mm Druck und 20° (über Wasser) entwickelt. Es sind dies 2,16% der Substanz oder 17,84% des Gesamtstickstoffs. Ganz ähnliche Zahlen erhielten wir bei der analogen Bestimmung beim Pyrrolidonyl-leucinester.

dl-Pyrrolidonyl-dl-leucinester.



40 g dl-Leucinester wurden in 200 ccm trockenem Chloroform gelöst und unter guter Kühlung 18,5 g Pyrrolidonylchlorid zugesetzt. Das Chlorid löste sich schnell auf. Das Chloroform wurde nach längerem Stehen abdestilliert und der Rückstand zu 250 ccm in absolutem Alkohol gelöst. In einem aliquoten Teil wurde das Chlor titrimetrisch bestimmt und im Rest durch die berechnete Menge Natriumäthylat ausgefällt. Der Alkohol wurde im Vakuum zum größten Teil abdestilliert und der Rückstand mit Petroläther versetzt. Das Gemisch von Pyrrolidonyl-leucinester und Kochsalz wurde abgesaugt (I). Aus der Mutterlauge wurde durch Einengen und nochmaliges Versetzen mit Petroläther noch eine beträchtliche Menge des Reaktionsproduktes gewonnen (II). Nr. 1 wurde mit Essigester unter Zusatz von Tierkohle ausgekocht und vom Kochsalz abfiltriert. Beim

Abkühlen fiel der Ester in weißen, mikroskopischen Prismen aus. Das zweite Produkt wurde ebenfalls aus Essigester umkrystallisiert und erwies sich als mit dem ersten identisch. Aus den Mutterlaugen ließ sich keine gut krystallisierte Substanz mehr gewinnen. Die Ausbeute an reinem Produkt betrug etwa $15\text{ g} = 44\%$ der Theorie, bezogen auf das angewandte Pyrrolidonylchlorid.

Die Substanz löst sich spielend leicht in Wasser, Methyl- und Äthylalkohol, leicht in Aceton, Benzol und heißem Essigester; in kaltem Essigester ist sie schwer, in Äther und Petroläther nicht löslich. Aus Essigester krystallisiert sie in kleinen Prismen. Schmelzpunkt: $115\text{--}117^\circ$ (korr.).

Zur Analyse wurde die Substanz nochmals aus Essigester umkrystallisiert und bei 80° im Vakuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

0,1580 g Substanz gaben 0,3330 g CO_2 und 0,1162 g H_2O .

0,1338 g Substanz. Verbraucht 9,8 ccm $1/10\text{-n}$ -Schwefelsäure.

Berechnet auf $\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_4$: C = 57,33%, H = 8,21%, N = 10,37%.

Gefunden: C = 57,48%, H = 8,23%, N = 10,26%.

Von diesem Körper sind zwei Aminostickstoffbestimmungen ausgeführt worden. Bei beiden betrug die Reaktionsdauer 5 Minuten, auch alle anderen Versuchsbedingungen wurden völlig gleich gehalten. Daher stammt auch die große Übereinstimmung der Resultate.

I. 0,2224 g zu 10 ccm in Wasser gelöst. Davon 9,46 ccm verwandt.

Sie ergaben 11,0 ccm Stickstoff von 21° und 741 mm Druck (über Wasser aufgefangen). Daraus ergeben sich 2,87% Aminostickstoff.

II. 0,1613 g Substanz zu 10 ccm in Wasser gelöst. Verbraucht 9,39 ccm. Erhalten 7,3 ccm Stickstoff von 16° und 744 mm Druck = 2,7% Aminostickstoff.

Es sind somit über 27% des Gesamtstickstoffs abgespalten worden. Wir vermuten, daß der Pyrrolidonylring aufgespalten worden ist. Allerdings ergibt die Pyrrolidoncarbonsäure selbst unter den gleichen Bedingungen keinen Stickstoff.