

## Weiterer Beitrag zur Kenntnis der partiellen Hydrolyse von Proteinen.

Von

**Emil Abderhalden und Casimir Funk.**

(Aus dem physiologischen Institute der tierärztlichen Hochschule, Berlin.)

(Der Redaktion zugegangen am 21. Januar 1910.)

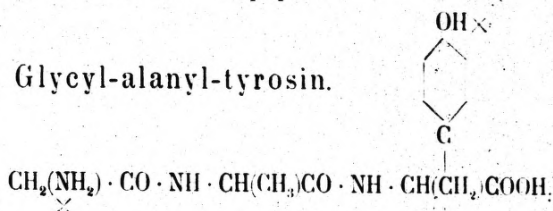
Emil Fischer und Emil Abderhalden<sup>1)</sup> haben darauf hingewiesen, daß die  $\beta$ -Naphthalinsulfoderivate von Polypeptiden insofern zur Aufklärung der Struktur derartiger Verbindungen Verwendung finden können, als bei der totalen Hydrolyse die Naphthalinsulfogruppe mit derjenigen Aminosäure, an deren  $\text{NH}_2$ -Gruppe sie gebunden ist, in Zusammenhang bleibt. Es läßt sich so, wie das am Beispiel des Glycyl-alanins resp. Alanyl-glycins ausgeführt ist, die am Anfang der Polypeptidkette stehende Aminosäure feststellen.

Wir haben nun versucht, diese Methode zu erweitern. Findet sich im Molekül eines Polypeptids resp. eines Peptons oder Eiweißkörpers Tyrosin, dann ist unter Umständen die Möglichkeit gegeben, nicht nur die Stellung dieser Aminosäure im Molekül zu charakterisieren, sondern eventuell noch die eines weiteren Bausteins. Dies ist z. B. der Fall, wenn das Tyrosin nicht am Anfang der Kette steht und das Phenolhydroxyl unbesetzt ist. In diesem Fall erhält man bei der Kuppelung eines Polypeptids, Peptons oder Proteins — angenommen, daß ein einheitliches Produkt vorliegt — mit  $\beta$ -Naphthalinsulfochlorid ein Dinaphthalinsulfoderivat. Die eine Gruppe sitzt an dem Hydroxyl des Tyrosins und die andere an der Aminogruppe

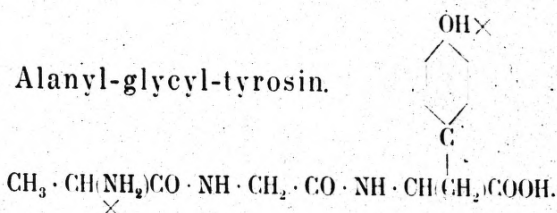
<sup>1)</sup> Bildung von Polypeptiden bei der Hydrolyse der Proteine. Berichte der Deutsch. chem. Ges., Jg. XL, S. 3544, 1907.

derjenigen Aminosäure, die am Anfang der Kette steht. Die folgenden Formeln veranschaulichen das eben Ausgeführte. Wir wählen als Beispiel ein aus den Aminosäuren Glykokoll, Alanin und Tyrosin bestehendes Tripeptid:

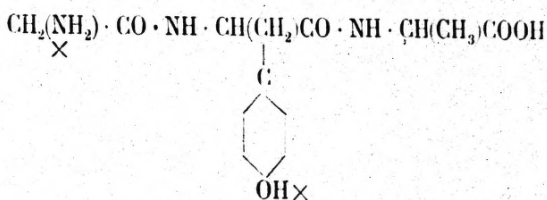
## 1. Glycyl-alanyl-tyrosin.



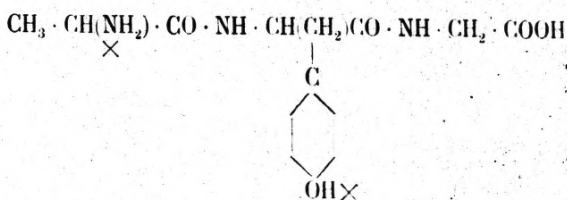
## 2. Alanyl-glycyl-tyrosin.



## 3. Glycyl-tyrosyl-alanin.



## 4. Alanyl-tyrosyl-glycin.



Die Sterne bedeuten jedesmal die Stellen, an denen Naphthalinsulfogruppen eintreten können. Hydrolysiert man die vier angeführten, mit  $\beta$ -Naphthalinsulfochlorid gekuppelten Tripeptide durch zwei- bis dreistündiges Kochen mit 10%iger Salzsäure, dann erhält man in den einzelnen Fällen ganz verschiedenartige Resultate. Das unter 1. angeführte Tripeptid müßte liefern: 1. Alanin, 2.  $\beta$ -Naphthalinsulfoglycin und 3. Mononaphthalin-

sulfotyrosin. Das Tripeptid 2 ergibt: 1. Glykokoll, 2.  $\beta$ -Naphthalinsulfoalanin und 3. Mononaphthalinsulfotyrosin. Das Tripeptid der Struktur 3 liefert dieselben Spaltprodukte wie 1 und das Tripeptid 4 dieselben Abbauprodukte wie 2. Man wäre somit imstande, von den genannten vier Strukturmöglichkeiten je zwei auszuschließen. Ein ganz anderes Resultat würde man erhalten, wenn Tyrosin die Kette eröffnet:



1. Tyrosyl-glycyl-alanin.



2. Tyrosyl-alanyl-glycin.

Bei der totalen Hydrolyse dieser beiden Tripeptide würde man Di- $\beta$ -Naphthalinsulfotyrosin und die freien Aminosäuren Glykokoll und Alanin erhalten.

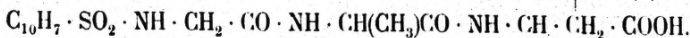
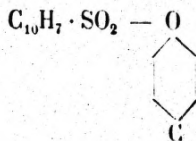
Findet man nach erfolgter Kuppelung eines Polypeptides oder eines Gemenges von Aminosäureketten, wie wir sie in den Peptonen und den Proteinen vor uns haben, bei der totalen Hydrolyse nur Mono- $\beta$ -Naphthalinsulfotyrosin, dann ist, falls die so erhaltene Ausbeute an Tyrosinderivat dem Tyrosingehalte entspricht, bewiesen, daß das gesamte Tyrosin eine freie Phenolgruppe besitzt. Man wird in diesen Fällen die Vollständigkeit der Kuppelung direkt am Verschwinden der Millonschen Reaktion feststellen können. Ferner beweist das Fehlen von Dinaphthalinsulfotyrosin, daß das Tyrosin nicht am Anfang der Kette steht.

Bei der totalen Hydrolyse derartiger Kuppelungsprodukte stößt man beim Versuche, die gebildeten Spaltprodukte zu isolieren, leicht auf Schwierigkeiten, besonders, wenn man von Gemischen, wie sie die Peptone und Proteine darbieten, ausgeht. In derartigen Fällen gelingt es durch Veresterung der

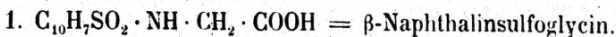
Abbauprodukte, eine weitere Trennung herbeizuführen. Es bilden nämlich nur die freien, d. h. keine Naphthalinsulfogruppe an der  $\text{NH}_2$ -Gruppe besitzenden Aminosäuren Esterchlorhydrate, wenn man in der gewohnten Weise mit Alkohol und gasförmiger Salzsäure verestert. Die  $\beta$ -Naphthalinsulfoderivate geben — natürlich mit Ausnahme des Mononaphthalinsulfotyrosins, das ja ebenfalls eine freie  $\text{NH}_2$ -Gruppe besitzt — die freien Ester. Diese lassen sich von den Esterchlorhydraten durch Ausäthern abscheiden. Die Esterchlorhydrate der Aminosäuren kann man dann in gewohnter Weise trennen und ihre Natur feststellen. Glykokollesterchlorhydrat wird man als solches direkt abscheiden und die Ester der übrigen Aminosäuren in Freiheit setzen, destillieren und dann verseifen. Das Mononaphthalinsulfotyrosinesterchlorhydrat ist verhältnismäßig leicht isolierbar, weil es im Gegensatz zu den Esterchlorhydraten der Aminosäuren in kaltem Wasser sehr schwer löslich ist. Man gewinnt so die ganze Gruppe der Bausteine, welche nicht am Anfang der Kette stehen.

Die ätherische Lösung enthält alle am Anfang der Kette sich befindenden Aminosäuren.

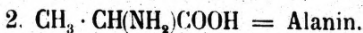
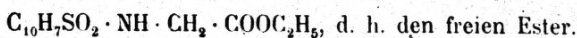
Ein Beispiel möge die besprochenen Verhältnisse klarlegen. Es sei das Tripeptid Glycyl-alanyl-tyrosin mit  $\beta$ -Naphthalinsulfochlorid gekuppelt worden. Es entsteht folgendes Derivat:



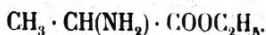
Bei der totalen Hydrolyse entstehen:



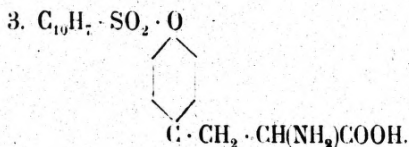
Bei der Veresterung mit Alkohol und Salzsäure erhält man:



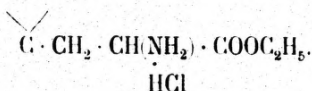
Diese liefert bei der Veresterung den salzsauren Ester:



HCl



Die Veresterung ergibt hier ebenfalls ein salzsaures Salz:



Wir gingen bei unseren Untersuchungen zunächst von Glycyl-l-tyrosin aus und stellten das  $\beta$ -Naphthalinsulfoderivat dieses Dipeptids dar. Es gelang uns nicht, dieses Präparat zur deutlichen Krystallisation zu bringen. Bei der totalen Hydrolyse erhielten wir  $\beta$ -Naphthalinsulfoglycin und das noch unbekannte Mononaphthalinsulfotyrosin. Wir wollen vorläufig dasjenige Mononaphthalinsulfoderivat des Tyrosins, das die  $\beta$ -Naphthalinsulfogruppe an der Phenolgruppe trägt, als I bezeichnen. Es ist nämlich ein zweites Mononaphthalinsulfoderivat des Tyrosins möglich. Es kann bei freiem Hydroxyl die Aminogruppe besetzt sein. Dieses Derivat, das wir als II bezeichnen wollen, wird sich von dem ersteren (I) abgesehen von den verschiedenen Eigenschaften einmal dadurch unterscheiden, daß es Millons Reaktion gibt und ferner bei der Veresterung kein Chlorhydrat, sondern direkt den freien Ester liefert. Wir haben auch dieses zweite Mononaphthalinsulfotyrosin dargestellt.

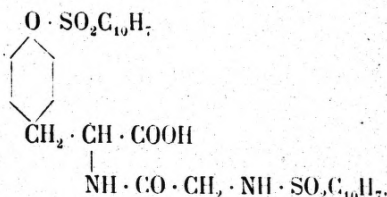
Wir gingen dann dazu über, Seidenpepton mit  $\beta$ -Naphthalinsulfochlorid zu kuppeln und das Reaktionsprodukt total abzubauen, um die im Eingang erwähnte Methode an einem Beispiel zu prüfen. Wir fanden unsere Erwartungen bestätigt. Es ist uns geglückt, Mononaphthalinsulfotyrosin I,  $\beta$ -Naphthalinsulfoalanin, Glykokoll und Alanin zu isolieren. Wir erhielten keine Spur von Dinaphthalinsulfotyrosin. Alanin findet sich nach unserem Befunde wenigstens zum Teil am Anfang der Kette.

Es sind im hiesigen Institute bereits Untersuchungen im Gange, um einesteils die allgemeine Anwendbarkeit dieser Methode zu prüfen und ferner eine möglichst quantitative Durchführung derselben auszuarbeiten. Wir haben auch andere Deri-

vate dargestellt. Wir hoffen ferner, den Nachweis von Aminosäuren und von komplizierteren Produkten im Urin durch die Anwendung der Estermethode kombiniert mit der Darstellung von Derivaten erleichtern zu können.

### Experimenteller Teil.

#### 1. $\beta$ -Naphthalinsulfoderivat des Glycyl-l-tyrosin.



6 g Glycyl-l-tyrosin wurden in 50,4 ccm n-Natronlauge gelöst und mit 22,8 g  $\beta$ -Naphthalinsulfochlorid (in ätherischer Lösung) 3 Stunden geschüttelt. Jede Stunde wurden 35 ccm n-Natronlauge zugefügt. Nach dem Ansäuern mit Salzsäure fällt das Produkt direkt aus. Rohausbeute 17,8 g. Zur Reinigung wurde das Derivat in 150 ccm n-Natronlauge gelöst, die Lösung filtriert, in Kältemischung gestellt und nun die äquivalente Menge n-Salzsäure tropfenweise zugesetzt. Die entstehende weiße Fällung wurde abgenutscht und zur Entfernung des Kochsalzes so lange mit Wasser ausgewaschen, bis im Filtrat kein Chlor mehr nachweisbar war. Die Ausbeute an reinem Produkt betrug 14,2 g.

Die Verbindung ist in Wasser sehr schwer löslich, leichter löslich in Chloroform und daraus mit Äther fällbar. Sie gibt mit Millons Reagens keine Rotfärbung. Sie sintert bei 90° und zersetzt sich unter Aufschäumen bei 110°. Zur Analyse wurde die Substanz im Vakuum bei 65° getrocknet.

0,1872 g Substanz lieferten 0,4094 g  $\text{CO}_2$  und 0,0716 g  $\text{H}_2\text{O}$ ;

0,3446 » » » brauchten 11,4 ccm  $n_{10}\text{-H}_2\text{SO}_4$ ;

0,2534 » » » lieferten 0,1936 g  $\text{BaSO}_4$ .

Berechnet für  $\text{C}_{31}\text{H}_{26}\text{O}_8\text{N}_2\text{S}_2$  (618,3):

60,15% C, 4,23% H, 4,53% N, 10,37% S.

Gefunden:

59,64% C, 4,24% H, 4,63% N, 10,04% S.

## Hydrolyse des $\beta$ -Naphthalinsulfoderivats von Glycyl-l-tyrosin.

2 g des Produktes wurden mit 20 ccm 10%iger Salzsäure 3 Stunden am Rückflußkühler gekocht. Das ausgefallene Öl wurde durch Kochen mit Wasser in eine in heißem Wasser lösliche und eine darin unlösliche Fraktion geteilt. Aus dem in heißem Wasser löslichen Teil wurden 0,4 g  $\beta$ -Naphthalinsulfo-glycin (sintert bei 135, schmilzt bei 159°) isoliert. Der in Wasser unlösliche Teil wurde in Alkohol gelöst, die Lösung mit viel Wasser versetzt, der Alkohol durch Erhitzen weggejagt und die wässerige Lösung im Vakuum eingeeengt. Der Rückstand wurde in Eisessig gelöst und mit Äther gefällt. Das Produkt (0,95 g) erwies sich als Mono- $\beta$ -Naphthalinsulfo-tyrosinchlorhydrat. Es gibt keine Rotfärbung mit Millons Reagens. Es sintert bei 100° und schmilzt unter Zersetzung bei 170°.

0,1702 g Substanz lieferten 0,3533 g CO<sub>2</sub> und 0,0729 g H<sub>2</sub>O;  
0,2042 » » » » brauchten 5,5 ccm  $n_{10}$ -H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Berechnet für C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>O<sub>5</sub>NSCl = 407,7: 55,92% C, 4,43% H, 3,43% N.  
Gefunden: 56,60% C, 4,75% H, 3,77% N.

Viel bessere Ausbeuten und reinere Produkte werden bei Anwendung der Estermethode erzielt.

5 g des  $\beta$ -Naphthalinsulfoderivats von Glycyl-l-tyrosin wurden mit 50 ccm 10%iger Salzsäure 3 Stunden gekocht. Die Flüssigkeit wurde im Vakuum zur Trockene verdampft und der Rückstand mit Alkohol und gasförmiger Salzsäure verestert. Die veresterte Lösung wurde im Vakuum zur Trockene eingeeengt, der Rückstand siedend mit Äther extrahiert. Die ätherische Lösung wurde eingedampft, der Rückstand in wenig Alkohol gelöst und in eiskaltes Wasser eingegossen. Der  $\beta$ -Naphthalinsulfo-glycinäthylester (1,5 g) fiel direkt in Nadeln aus. Zur Analyse wurde das Produkt in derselben Weise umkrystallisiert und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet. Ausbeute an reinem Produkt 1,0 g. Schmelzpunkt 74° (korr.).

0,1882 g Substanz brauchten 6,6 ccm  $n_{10}$ -H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> zur Neutralisation.

Berechnet für C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>O<sub>4</sub>NS = 293,2: 4,77% N.  
Gefunden: 4,90% N.

Der Rückstand nach Extraktion mit Äther betrug 3.5 g. Er bestand aus Mono- $\beta$ -Naphthalinsulfotyrosinäthylesterchlorhydrat (dasselbe Produkt wurde bei der Hydrolyse von Seidenpepton erhalten, s. unten). Die Substanz wurde in wenig Alkohol gelöst und die Lösung vorsichtig mit Äther versetzt, wobei das Produkt in Blättchen auskristallisiert. In heißem Wasser löst es sich und fällt beim Erkalten wieder aus. Millons Probe negativ. Sintert bei  $190^{\circ}$  und schmilzt gegen  $195^{\circ}$ . Zur Analyse wurde die Substanz im Vakuum bei  $65^{\circ}$  getrocknet.

0,1796 g Substanz lieferten 0,3756 g  $\text{CO}_2$  und 0,0827 g  $\text{H}_2\text{O}$ ;  
 0,2572 » » brauchten zur Neutralisation 6,1 ccm  $\frac{1}{10}\text{-H}_2\text{SO}_4$ .  
 0,1816 » » lieferten 0,0975 BaSO.

Berechnet für  $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_5\text{NSCl} = 435,7$ :

57,83% C, 5,08% H, 3,21% N, 7,36% S.

Gefunden:

57,03% C, 5,11% H, 3,32% N, 6,97% S.

Zur Kontrolle wurde das Di- $\beta$ -Naphthalinsulfotyrosin, das nach der üblichen Methode dargestellt worden war, 3 Stunden mit 10%iger Salzsäure gekocht, um zu sehen, ob die  $\beta$ -Naphthalinsulfogruppe am Phenolhydroxyl abgespalten wird. Die Naphthalinsulfoverbindung konnte unverändert und quantitativ wieder gewonnen werden.

## 2. $\beta$ -Naphthalinsulfoderivate aus Seidenpepton.

10 g Seidenpepton wurden in n-Natronlauge gelöst, mit 15 g  $\beta$ -Naphthalinsulfochlorid (in Äther) und 66 ccm n-Natronlauge (jede Stunde 22 ccm) 3 Stunden geschüttelt. Die wässrige Lösung (Wiederholen des Prozesses nach erneutem Zusatz von  $\beta$ -Naphthalinsulfochlorid verbessert die Ausbeute nicht erheblich) wurde darauf abgetrennt und mit Salzsäure angesäuert, wobei ein Öl ausfiel. Die Lösung wurde vom Öl abdekantiert und das letztere mit 100 ccm 10%iger HCl 3 Stunden hydrolysiert. Die direkte Isolierung der Spaltungsprodukte ist nicht geglückt, deshalb wurde auch hier die Estermethode angewandt.

Die Flüssigkeit wurde im Vakuum zur Trockene eingengt und der Rückstand mit Alkohol und gasförmiger Salzsäure verestert. Die veresterte Lösung lieferte nach erfolgtem Impfen 0,2 g Glykokollesterchlorhydrat (Schmelzp.  $144^{\circ}$ ). Das



Filtrat davon wurde zur Trockene eingengt, der Rückstand mit eiskaltem absolutem Alkohol aufgenommen, wobei 0,5 g Glykokollesterchlorhydrat (Schmelzp. 144°) zurückblieben. Das Filtrat davon wurde neuerdings zur Trockene eingengt und der Rückstand mit Äther heiß extrahiert.

Der ätherische Auszug wurde eingengt, der Rückstand mit Alkohol aufgenommen und in eiskaltes Wasser gegossen. Es schied sich  $\beta$ -Naphthalinsulfoalaninäthylester aus. Die Ausbeute an Rohprodukt betrug 0,9 g. Nach dem Umkrystallisieren aus Alkohol und Zusatz von Wasser verblieben 0,5 g. Zur Analyse wurde das Produkt bei 90° im Vakuum getrocknet, wobei es ölig wird, um beim Erkalten wiederum zu erstarren. Schmelzpunkt 95°.

0,1823 g Substanz brauchten zur Neutralisation 6,7 ccm  $\frac{n}{10}$ -H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Berechnet für C<sub>15</sub>H<sub>17</sub>O<sub>4</sub>NS = 307,2: 4,56% N.

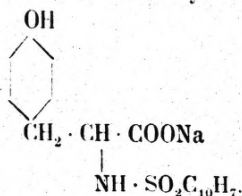
Gefunden:

4,76% N.

Der Rückstand nach Extraktion mit Äther bestand aus einem Gemisch von Alaninesterchlorhydrat und Mono- $\beta$ -Naphthalinsulfotyrosinäthylesterchlorhydrat. Diese beiden Substanzen lassen sich durch ihre Löslichkeit in Wasser trennen. Das Gemenge wurde in heißem Wasser gelöst, wobei das Tyrosinderivat beim Erkalten als Öl ausfällt. Dies wässrige Filtrat wurde eingedampft und nochmals verestert und die Lösung wieder eingedampft. Der Rückstand wurde in Alkohol gelöst und mit Äther gefällt. Es wurden auf diese Weise 0,8 g Alaninäthylesterchlorhydrat isoliert. (Zersetzungspunkt 160°.) Das oben erwähnte, in kaltem Wasser sehr schwer lösliche Öl wurde ebenfalls nochmals verestert, die alkoholische Lösung eingedampft, der Rückstand in wenig Alkohol gelöst und mit Äther vorsichtig bis zur Trübung versetzt. Das auskrystallisierte Produkt (0,4 g) stimmte in allen Eigenschaften mit dem bei der Spaltung des  $\beta$ -Naphthalinsulfoderivates des Glycyltyrosins erhaltenen Mono- $\beta$ -Naphthalinsulfotyrosinäthylesterchlorhydrat überein. Es sintert bei 190°, schmilzt bei 195°. Beim Vermischen mit dem aus Glycyltyrosin erhaltenen Produkt änderte sich der Schmelzpunkt nicht. Mit Millons Reagens wurde keine Rotfärbung erhalten. Zur Analyse wurde die Substanz bis 65° im Vakuum getrocknet.

0,1388 g Substanz lieferten 0,2930 g CO<sub>2</sub> und 0,0666 g H<sub>2</sub>O.  
 Berechnet für C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>O<sub>5</sub>NSCl = 435,7: 57,83% C und 5,08% H.  
 Gefunden: 57,57% C und 5,33% H.

### 3. Mono-β-Naphthalinsulfotyrosinnatrium II.



Beim Versuche, das bei der Spaltung des β-Naphthalinsulfoderivates des Glycyl-l-tyrosins und des Seidenpeptons erhaltene Mono-β-Naphthalinsulfo-tyrosin I synthetisch darzustellen, erhielten wir ein Mononaphthalinsulfoderivat des Tyrosins mit ganz anderen Eigenschaften. Es erwies sich als das an der Aminogruppe gekuppelte Derivat.

5 g Tyrosin wurden in 2 Molekülen Natriumäthylat gelöst und die Lösung mit absolutem Äther gefällt. Das auf diesem Wege erhaltene Tyrosinnatrium (6,7 g) wurde in Alkohol gelöst und mit 7,4 g (1 Mol.) β-Naphthalinsulfochlorid (in Äther gelöst) 3 Stunden geschüttelt. Nach dem Abfiltrieren des Niederschlages (5,3 g des unveränderten Tyrosinnatriums) wurde die Lösung im Vakuum eingeeengt, wobei der Rückstand krystallinisch erstarrte. Zur Entfernung von überschüssigem β-Naphthalinsulfochlorid wurde die Masse zweimal mit heißem Äther extrahiert und der Rückstand auf einer Tonplatte getrocknet. Ausbeute 5,7 g. Das Produkt wurde durch Lösen in Alkohol und Versetzen der alkoholischen Lösung mit Äther umkrystallisiert. Ausbeute an reinem Produkt 5,0 g. Das Na-Salz sintert bei 150° und zersetzt sich gegen 175°. Millon positiv. Zur Analyse wurde die Substanz im Vakuum bei 65° getrocknet.

0,1763 g Substanz lieferten 0,3728 g CO<sub>2</sub> und 0,0642 g H<sub>2</sub>O.  
 0,1912 » » brauchten 4,6 ccm n/10-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,  
 0,2154 » » lieferten 0,0396 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,  
 0,2178 » » 0,1286 » BaSO<sub>4</sub>.

Berechnet für C<sub>19</sub>H<sub>16</sub>O<sub>5</sub>NSNa = 393,2:  
 57,98% C, 4,09% H, 3,56% N, 8,15% S, 5,84% Na.

Gefunden:  
 57,67% C, 4,03% H, 3,36% N, 8,10% S, 5,61% Na.

Von diesem Na-Salz wurde 1 g mit Alkohol und gasförmiger Salzsäure verestert. Die Lösung wurde im Vakuum eingeeengt, der Rückstand in wenig Alkohol gelöst und die alkoholische Lösung vom Kochsalz abfiltriert. Aus dem Filtrat wurde der Alkohol abdestilliert und der Rückstand mit Äther gekocht, wobei der Mono- $\beta$ -Naphthalinsulfotyrosinäthylester sich analysenrein abschied. Im Vakuum bei 65° getrocknet. Ausbeute 0,5 g. Trübe Schmelze bei 140°, klar bei 143°.

0,1665 g Substanz lieferten 0,3840 g CO<sub>2</sub> und 0,0730 g H<sub>2</sub>O.

Berechnet für C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>O<sub>5</sub>NS = 399,3: 63,11% C, 5,30% H.

Gefunden: 62,89% C, 4,87% H.

Die Verbindung gab mit Millons Reagens Rotfärbung.

---