

Bildung von Prolin bei der Hydrolyse von Gelatine mit Baryt.

Von

Emil Fischer und Reginald Bochner.

(Aus dem chemischen Institut der Universität Berlin.)

(Der Redaktion zugegangen am 9. Februar 1910.)

Die Frage, ob das Prolin als primäres Spaltprodukt der Proteine zu betrachten sei, oder ob es sekundär aus anderen Bestandteilen der Proteine entstehe, ist von dem einen von uns wiederholt diskutiert worden.¹⁾ Er kam dabei zum Schluß, daß die erste Möglichkeit, die primäre Entstehung der Aminosäuren, das Wahrscheinlichere sei, denn das Prolin entsteht nicht allein bei der Hydrolyse durch heiße Säuren oder Alkalien, sondern auch bei der enzymatischen Spaltung der Proteine, wie die Versuche von E. Fischer und Abderhalden gezeigt haben. In Übereinstimmung damit steht die Beobachtung von Levene und Beatty,²⁾ daß bei der tryptischen Verdauung ein Glycylprolinanhydrid gebildet wird. Aber bemerkenswert ist doch, daß bei diesen enzymatischen Spaltungen die Menge des Prolins immer sehr gering war, und daß auch bei der Behandlung des Caseins mit Alkali weniger Prolin gefunden wurde, als bei der Säurehydrolyse.³⁾ Zudem ist für die Isolierung des Prolins in den meisten Fällen der Umweg über die Ester gewählt worden. Es war deshalb die Möglichkeit nicht ausgeschlossen, daß das bisher aus den Proteinen isolierte Prolin wenigstens teilweise nicht primär, sondern sekundär, vielleicht aus der α -Amino- δ -Oxyvaleriansäure, die S. P. L.

¹⁾ E. Fischer, Diese Zeitschrift, Bd. XXXIII, S. 169 (1901), und Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXIX, S. 604 (1906).

²⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXIX, S. 2060 (1906).

³⁾ E. Fischer, Diese Zeitschrift, Bd. XXXV, S. 227 (1902).

Sörensen¹⁾ durch Kochen mit Salzsäure in Prolin überführen konnte, oder aus ähnlichen Substanzen entstand. Wir haben aus diesem Grunde nochmals die Hydrolyse der Gelatine, die bekanntlich viel Prolin liefert, unter Bedingungen studiert, wo die Aminosäuren niemals mit freien Mineralsäuren in Berührung kommen. Das gelingt durch Hydrolyse mit Barytwasser. Sie ist bei 100° nach 3 Tagen scheinbar beendet. Das Prolin wird dabei fast vollständig racemisiert²⁾ und läßt sich infolge dessen hinterher verhältnismäßig leicht in Form seines ziemlich schwer löslichen Kupfersalzes isolieren. Wir sind so zu dem Resultat gekommen, daß die bei 100° getrocknete Gelatine («Golddruck» Kahlbaum) 7,6% Prolin liefert. Diese Menge ist fast 1¹/₂ mal so groß, als die früher bei der Säurehydrolyse der Gelatine gefundene.³⁾ Aber im letzteren Fall war die Aminosäure durch die Estermethode in der ursprünglichen einfachen und unvollkommenen Form isoliert.

In neuerer Zeit haben Zd. H. Skraup und A. v. Biehler indirekt die Menge des Prolins aus Gelatine zu bestimmen versucht.⁴⁾ Da sie bei 4facher Wiederholung der Veresterung fast doppelt so viel Gesamtster aus Gelatine erhielten, als E. Fischer, Levene und Aders, so berechnen sie auch die Menge, die jene für Prolin gefunden haben, auf das Doppelte, mithin 10,4%, und meinen, daß diese Zahl noch erheblich zu niedrig sei. Wir halten solche Schätzungen für recht unsicher, da die Qualität der Ester mit der Art der Isolierung und der Destillation schwankt. Übrigens ist schon früher von E. Fischer nachgewiesen worden, daß man bei einmaliger Wiederholung der Veresterung eine nicht unerhebliche Menge, etwa 30% mehr Ester von Aminosäuren aus Gelatine gewinnt,⁵⁾ als in

¹⁾ Trav. du Labor. Carlsberg, Bd. VI, S. 137 (1905).

²⁾ Ähnliches wurde früher bei der Hydrolyse des Caseins durch Alkali bei 100° beobachtet. E. Fischer, Diese Zeitschrift. Bd. XXXV, S. 227 (1902).

³⁾ E. Fischer, P. A. Levene und R. H. Aders, Diese Zeitschrift, Bd. XXXV, S. 70 (1902).

⁴⁾ Monatshefte f. Chemie, 1909, S. 467.

⁵⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXV, S. 2661 (1902).

der Abhandlung von Fischer, Levene und Aders angegeben wurde.

Jedenfalls glauben wir, daß vorläufig die Menge des Prolins aus Gelatine, wenn man sicher gehen will, nicht höher als 7,6% oder auf aschefreies Material berechnet als 7,7% angenommen werden kann.

Da diese Menge in alkalischer Lösung entsteht, so würde die α -Amino- δ -Oxyvaleriansäure als primäres Produkt für sie nicht in Betracht kommen, weil sie nach Sörensen durch Erhitzen mit Baryt nicht in Prolin umgewandelt wird. Wir kennen auch sonst kein Valeriansäurederivat, das unter diesen Bedingungen Prolin liefert, und es bleibt also zurzeit nur die Annahme übrig, daß das Prolin aus der Gelatine primär entsteht. Damit wird das Gleiche für die anderen Proteine, so lange nicht entgegenstehende Beobachtungen vorliegen, ebenfalls recht wahrscheinlich.

Auffallend ist aber noch immer die geringe Menge von Prolin, die man bisher bei der enzymatischen Spaltung der Proteine erhalten hat. Da das l-Prolyl-d-phenylalanin durch Pankreatin ziemlich leicht hydrolysiert wird,¹⁾ so erscheint es erwünscht, daß die Verdauungsversuche mit Rücksicht auf die Menge des dabei gebildeten Prolins wiederholt werden.

200 g Gelatine (mit 16% Wasser und 1,7% Asche) wurden mit 2400 ccm Wasser und 800 g krystallisiertem Baryumhydroxyd in einer Flasche aus Eisenblech im kochenden Wasserbad erhitzt. Nach 14 Stunden war die Biuretreaktion verschwunden, aber die Hydrolyse noch nicht beendet, denn die Flüssigkeit enthielt jetzt, wie wir durch die Estermethode nachweisen konnten, verhältnismäßig wenig Aminosäuren, wohl aber erhebliche Mengen von polypeptidartigen Stoffen, wahrscheinlich Di- und Tripeptide, mit deren Untersuchung wir noch beschäftigt sind. Das Erhitzen mit dem Barytwasser wurde deshalb 3 Tage fortgesetzt, dann die Flüssigkeit abgekühlt, das auskrystallisierte Baryumhydroxyd abgesaugt und das Filtrat unter vermindertem Druck eingedampft, bis alles Ammoniak

¹⁾ E. Fischer und A. Luniak, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Bd. XLII, S. 4756 (1909).

vertrieben war. Wir haben jetzt den Baryt aus der Flüssigkeit genau mit Schwefelsäure ausgefällt, dann zentrifugiert, die klare Flüssigkeit abgehoben, den Niederschlag nochmals mit heißem Wasser ausgelaugt und wieder zentrifugiert. Die vereinigten Mutterlaugen wurden nun unter etwa 15 mm Druck zur Trockene verdampft und der Rückstand 4mal mit je 500 ccm Alkohol tüchtig ausgekocht. Dabei geht das Prolin in Lösung, während die meisten anderen Aminosäuren zurückbleiben. Die alkoholischen Auszüge wurden unter vermindertem Druck zum Sirup eingedampft und dieser wiederum in 500 ccm heißem Alkohol gelöst. Dabei blieb noch ein kleiner Rückstand von gewöhnlichen Aminosäuren. Die alkoholische Mutterlauge wurde abermals in der gleichen Weise verdampft und der Rückstand nochmals mit absolutem Alkohol aufgenommen. Das alkoholische Filtrat hinterließ nun beim Verdampfen unter geringem Druck 35,5 g eines gelbgefärbten Sirups, der in absolutem Alkohol völlig löslich war. Zur Isolierung des Prolins, das fast vollständig racemisiert war, diente das Kupfersalz.

Zu dem Zweck wurde der Sirup in etwa 700 ccm Wasser gelöst, mit überschüssigem frisch gefälltem reinem Kupferoxyd $\frac{1}{2}$ Stunde gekocht und die heiß filtrierte Lösung unter etwa 15 mm Druck eingedampft, bis eine reichliche Krystallisation von Kupfersalz erfolgt war. Seine Menge betrug nach dem Absaugen und Trocknen an der Luft 11,7 g.

Für die Analyse war das Salz nochmals aus wenig heißem Wasser umkrystallisiert, wobei etwa 20% in Lösung blieben, und an der Luft getrocknet.

0,4338 g Substanz verloren bei 100° 0,0472 g H₂O.
 $C_{10}H_{16}O_4N_2Cu + 2H_2O$ (327,75). Berechnet: H₂O 10,99%.
 Gefunden: > 10,88%.

0,3866 g Substanz: 0,1052 g CuO.
 $C_{10}H_{16}O_4N_2Cu$ (291,72). Berechnet: Cu 21,79%.
 Gefunden: > 21,74%.

Die aus dem gereinigten Kupfersalz dargestellte freie Aminosäure schmolz gegen 205° unter Gasentwicklung und gab folgende Zahlen:

dampfen eine tiefblaue amorphe Masse, die mit viel Alkohol ausgekocht wurde. Als der alkoholische Auszug verdampft und der Rückstand abermals mit absolutem Alkohol ausgekocht war, betrug die gelöste Menge nicht mehr als 1,9 g. Wir schließen daraus, daß die Menge des aktiven Prolins, das hier als Kupfersalz sich finden müßte, höchstens 1 g betragen haben kann. Wir haben übrigens auf die Isolierung der Aminosäure aus dem noch unreinen Kupfersalz verzichtet.

Obige Methode zur Bestimmung des Prolins in den Proteinen ist zweifellos genauer und sicherer als der früher benutzte Umweg über die Ester. Wir werden sie deshalb benutzen, um einige früher erhaltene Zahlen zu prüfen, und haben für das Casein schon festgestellt, daß seine Hydrolyse durch Barytwasser bei 100° ohne Schwierigkeit erreicht wird.
