

**489. P. A. Levene: Über das bei der tryptischen Verdauung der Gelatine auftretende Prolyl-glycin-anhydrid.**

[Aus dem Rockefeller-Institute for Medical Research, New York.]

(Eingegangen am 2. August 1910.)

Als Emil Fischer bei der Hydrolyse der Proteine das Vorkommen von  $\alpha$ -Prolin feststellte, war er der Ansicht, daß noch Beweise zur Entscheidung der Frage über die primäre oder sekundäre Herkunft der Substanz fehlten. Es ist mir dann in Gemeinschaft mit Wallace und Beatty<sup>1)</sup> gelungen, bei der tryptischen Verdauung der Gelatine das Prolyl-glycin-anhydrid zu gewinnen. In diesem Befunde könnte man gewissermaßen einen Beweis für die primäre Herkunft des Prolins sehen. Die Ausbeute an reiner Substanz betrug etwa 5.0 g auf ein Kilo Gelatine bei 8-monatlicher Verdauung. Wird Rücksicht darauf genommen, daß Gelatine überhaupt sehr wenig von proteolytischen Enzymen angegriffen wird, so daß Kühne und in jüngster Zeit auch Tierfelder der Ansicht waren, daß Gelatine überhaupt nicht verdaut wird, und weiter, daß das Anhydrid wegen seiner großen Löslichkeit in allen Lösungsmitteln nicht quantitativ isolierbar war, so wird man finden, daß die Ausbeute eine nicht unbeträchtliche war. Nun ist aber die Substanz bei 8-monatlicher Verdauung erhalten worden, und es war nicht ausgeschlossen, daß während dieser Zeit noch sekundäre Reaktionen sich abspielen könnten. Hr. Geheimrat E. Fischer hat mich auf diese Möglichkeit freundlichst aufmerksam gemacht. Es war deswegen wünschenswert, den Versuch bei nur kurzdauernder Einwirkung des Enzymes zu wiederholen. Noch aus einem zweiten Grunde war die Wiederholung nötig. E. Fischer und Reif<sup>2)</sup> haben Prolyl-glycin-anhydrid synthetisch dargestellt, welches von dem bei der Verdauung entstandenen sich im Schmelzpunkt beträchtlich unterschied, und dieser Unterschied bedurfte der Erklärung.

Der vorliegende Versuch wurde am 5. August vergangenen Jahres angesetzt und am 29. August abgebrochen. Das Anhydrid des Peptids ließ sich dabei ohne Schwierigkeiten darstellen. Es ließ sich weiter beweisen, daß der Unterschied im Schmelzpunkt zwischen der synthetischen Substanz und der bei Verdauung aus Gelatine entstandenen dadurch verursacht war, daß die Substanz während der Einwirkung des Enzymes eine partielle Racemisierung erlitten hatte. Die optisch-inaktive Form besitzt einen niedrigeren Schmelzpunkt und eine größere Löslichkeit im Alkohol-Äther-Gemisch.

<sup>1)</sup> Diese Berichte 39, 2060 [1906].    <sup>2)</sup> Ann. d. Chem. 363, 118 [1908].

Einige Zeit nach dem Abschluß dieses Experiments ist es E. Fischer und Buchner<sup>3)</sup> gelungen, aus Gelatine  $\alpha$ -Prolin bei Barythydrolyse ohne Anwendung der Estermethode zu isolieren und auf diese Weise den Beweis für den primären Ursprung des Prolins zu erbringen.

Die Resultate des vorliegenden Experiments können nun als eine weitere Bestätigung dieser Ansicht von E. Fischer dienen.

### Experimenteller Teil.

Die Substanz wurde nach achtmonatlicher Verdauung gewonnen. Die Phosphorwolframsäure-Fraktion, welche das Prolyl-glycin-anhydrid enthielt, wurde nach den alten Angaben dargestellt. Der Niederschlag wurde mit Baryhydrat von Phosphorwolframsäure befreit, die Lösung bei vermindertem Druck eingedampft, mit absolutem Alkohol extrahiert und dieser Auszug wieder eingedampft und mit Aceton gefällt. Das Filtrat wurde wieder zur Sirupkonsistenz eingedampft, mit Alkohol-Äther-Gemisch gefällt und das Filtrat zum Eindunsten stehen gelassen. Es schieden sich bald Krystalle des Anhydrids aus. Diese wurden einmal aus heißem Alkohol umkrystallisiert. Die Substanz hatte das typische Aussehen des Prolyl-glycin-anhydrids. Schmp. 178—180° (korr.).

Drehungsvermögen: 0.3181 g Sbst., in 5 ccm Wasser gelöst, Totalgewicht 5.2875 g, hatten im 0.5-dm-Rohr ein Drehungsvermögen von  $-1.75^{\circ}$ . Mithin

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -55.01^{\circ} (\pm 0.01^{\circ}).$$

Diese Substanz wurde dann mit einem großen Überschuß einer Alkohol-Äther-Mischung (1:3) extrahiert. Das Extrakt wurde verdunstet, und die Substanz der Krystallisation überlassen. Dieser Niederschlag wurde wieder mit Alkohol-Äther extrahiert und der Auszug nochmals der Krystallisation überlassen. Schmp. 168—170° (korr.).

Drehungsvermögen: 0.1619 g Sbst. in 10 ccm Wasser gelöst. Gesamtgewicht 10.11 g. Drehungsvermögen bei Natriumlicht im 0.865-dm-Rohr  $-0.08^{\circ}$ . Mithin

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -5.71^{\circ} (\pm 0.01^{\circ}).$$

Die Substanz hatte die folgende Zusammensetzung:

0.1282 g Sbst.: 0.2450 g CO<sub>2</sub>, 0.0727 g H<sub>2</sub>O.

C<sub>7</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>N<sub>2</sub>. Ber. C 54.54, H 6.48.

Gef. > 54.24, • 6.60.

Damit ist erwiesen worden, daß bei langdauernder Verdauung mit Trypsin ein Teil des Anhydrids optisch inaktiviert wird. Es ist

<sup>3)</sup> Zeitschr. f. physiol. Chem. 85, 118 [1910].

möglich, daß dies durch die Einwirkung des Alkalis verursacht ist. Für das zweite Experiment war 1 kg Gelatine in 10 l 0.25-prozentigem Ammoniakwasser mit 15.0 g Trypsin (Trypsinum purissimum Grübler) der Verdauung überlassen worden. Jeden dritten Tag wurden 5.0 g Trypsin zugegeben, bis die gesamte Zugabe 50.0 g erreicht hatte. Die Verdauung dauerte vierundzwanzig Tage. Die weitere Behandlung war die gleiche wie beim vorigen Experiment, die Ausbeute betrug 6.0 g an analysenreiner Substanz. Die Zusammensetzung war die folgende:

0.1500 g Sbst.: 0.2995 g CO<sub>2</sub>, 0.090 g H<sub>2</sub>O.

C<sub>7</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>N<sub>2</sub>. Ber. C 54.54, H 6.48.

Gef. > 54.45, > 6.66.

Die Substanz besaß den Schmp. 212° (korr.) und das folgende Drehungsvermögen:

0.2500 g Sbst. in 4.0 ccm Wasser gelöst. Gesamtgewicht 4.260 g. Spez. Gew. 1.018. Drehte im 1-dm-Rohr — 10.7°. Mithin

$[\alpha]_D^{20} = -168.95^\circ (\pm 0.01^\circ)$ .

Die synthetisch von Fischer und Reif dargestellte Substanz besaß das Drehungsvermögen von  $[\alpha]_D^{20} = -217.40^\circ$  und dem Schmp. 217°.

Mithin ist bei kürzer dauernder Verdauung auch die Inaktivierung nicht so weit fortgeschritten.

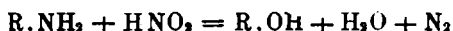
#### 490. Donald D. van Slyke: Eine Methode zur quantitativen Bestimmung der aliphatischen Aminogruppen; einige Anwendungen derselben in der Chemie der Proteine, des Harns und der Enzyme.

[Aus dem Rockefeller-Institute for Medical Research, New York.]

(Eingegangen am 1. Oktober 1910.)

##### I. Prinzip der Methode.

Es ist seit langem bekannt, daß aliphatische Aminogruppen mit salpetriger Säure nach der Gleichung



reagieren. Da der Stickstoff sich gasförmig entwickelt und das System verläßt, sollte die Reaktion quantitativ von links nach rechts gehen, was auch zutrifft. Sachs und Kormann haben bereits vor 35 Jahren die Reaktion zur Grundlage einer Methode für Aminogruppen-Bestim-