

unter Kühlung mit Eis innerhalb von 15 Min. eine äquimolekulare Menge Äthylenimin. Die ganze Masse ist dann fast vollständig krystallin erstarrt; sie wird zweckmäßig noch mehrere Stunden im Kältebad belassen.

Die Additionsverbindungen sind in fast allen Lösungsmitteln äußerst leicht löslich, nur die des Cyclohexanons und des *m*-Nitro-benzaldehyds sind in Petroläther schwer löslich. Aus einer sehr konzentrierten Lösung in Äther krystallisieren sie bei weiterem Eindunsten an der Luft in farblosen Schuppen. Die Additionsverbindung des *n*-Butyraldehyds konnten wir dagegen nur durch Ausfrieren und Absaugen auf einer mit einer Eis-Kochsalz-Mischung gekühlten Fritte isolieren. Versuchsergebnisse s. in der Tafel 1.

Zur Darstellung der Kondensationsverbindungen werden die Carbonylverbindungen in gleicher Weise mit 2 Mol. Äthylenimin umgesetzt. Das Reaktionsgemisch wird im langsam auftauenden Kältebad belassen und noch einige Tage bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Bei der Destillation i. Vak. erhält man dann, nachdem nicht umgesetztes Äthylenimin und das bei der Kondensation entstandene Wasser abgesaugt sind, neben der unveränderten Carbonylverbindung die Bisäthylenimino-Verbindung. Die in den Tafeln angegebenen Ausbeuten werden erhalten, wenn das Reaktionsgemisch 7 Tage bei Zimmertemperatur aufbewahrt wird. Sie sind in einigen Fällen erheblich geringer, wenn die Destillation früher vorgenommen wird. Versuchsergebnisse s. in der Tafel 2.

### 83. Theodor Wieland und Liselotte Wirth: Papierchromatographische Analyse der durch Erhitzen mit Alkali gebildeten Zersetzungsprodukte von Serin, Threonin und Cystein.

[Aus dem Kaiser-Wilhelm-Institut für Medizinische Forschung, Institut für Chemie, Heidelberg.]

(Eingegangen am 2. August 1949.)

Beim Erhitzen von Serin und Threonin mit Alkali bilden sich Glycerin, Alanin und  $\alpha$ -Amino-buttersäure. Cystein liefert nur Alanin. Die gebildeten Aminosäuren wurden papierchromatographisch getrennt, die Mechanismen ihrer Bildung werden erörtert.

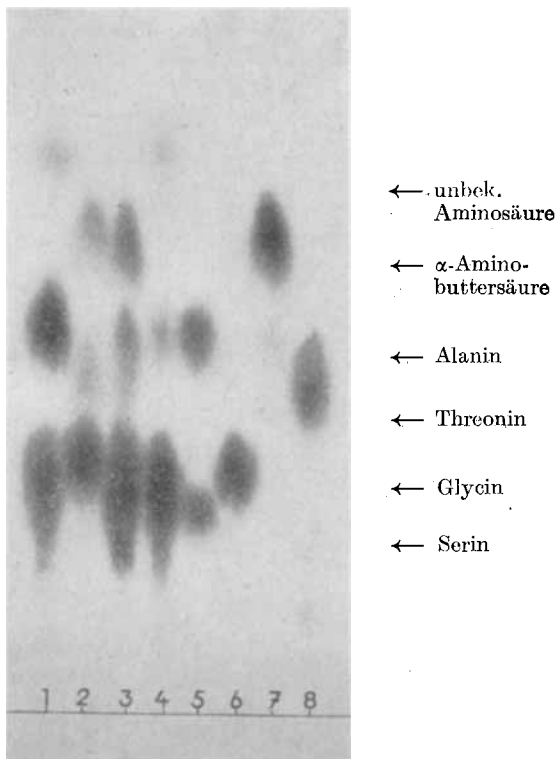
Die Zahl und Genauigkeit der Verfahren zur Analyse von Aminosäuregemischen hat sich in den letzten Jahren erheblich vermehrt. Mit Hilfe der mikrobiologischen, ionophoretischen und chromatographischen Bestimmungsweisen konnte man nahezu sämtliche bei der sauren Hydrolyse gewisser Proteine auftretenden Spaltprodukte quantitativ erfassen und daraus Bausteinsummenformeln aufstellen. Bei der mitunter ebenfalls angewandten Hydrolyse durch Alkali erleiden jedoch manche Proteinbausteine tiefgreifende Veränderungen. Es sind zahlreiche Arbeiten erschienen, die sich mit dem Schicksal von Aminosäuren beim Kochen mit Alkalien befassen<sup>1)</sup>. Trotzdem schien es uns wünschenswert, diese nicht nur für den Analytiker, sondern auch für den organischen und biologischen Chemiker interessanten Umwandlungen mit der eleganten und empfindlichen papierchromatographischen Methode<sup>2)</sup> neuerlich zu untersuchen. Dabei richteten wir unser Augenmerk nur auf die Umwandlungsprodukte, die mit Ninhydrin positive Farbreaktion geben.

<sup>1)</sup> Vergl. A. J. P. Martin u. R. L. M. Synge, *Analytical Chemistry of Proteins*, in *Advances in Protein Chem.* II, 1 [1946] u. A. Neuburger, *Stereochemistry of Amino Acids*, ebenda IV, 297 [1948].

<sup>2)</sup> R. Consden, A. H. Gordon u. A. J. P. Martin, *Biochem. Journ.* 38, 224 [1944].

Daß beim Kochen mit Barytwasser aus Serin langsam Ammoniak abgespalten wird, hat schon E. Baumann 1882 beobachtet<sup>3)</sup>. Später hat Bettzieche<sup>4)</sup> diese Reaktion etwas eingehender studiert und als Spaltungsprodukt neben Ammoniak Brenztraubensäure festgestellt.  $\alpha$ -Amino- $\beta$ -oxy- $\beta$ -phenylpropionsäure (Phenylserin) wird durch Alkali glatt zu Benzaldehyd und Glycin gespalten, eine Aldolspaltung, die am Serin nicht beobachtet wurde. Doch tritt sie, wie F. S. Daft und R. D. Coghill fanden, auch beim Serin auf, denn als Produkte der 72-stdg. Zersetzung mit heißgesättigtem kochenden Barytwasser konnten Oxalsäure, Milchsäure und Glycin mit Sicherheit identifiziert werden. Daneben entstand in kleinerer Menge eine weitere Aminosäure, die, als  $\alpha$ -Naphthyl-uraminosäure isoliert, etwa den Schmelzpunkt der aus  $\alpha$ -Naphthyl-isocyanat und Alanin gewonnenen Verbindung hatte<sup>5)</sup>.

Die papierchromatographische Untersuchung eines Ansatzes von 50 mg Serin, das mit 0.5 ccm heißgesättigtem Barytwasser 15 Stdn. im zugeschmolzenen Röhrchen auf 110° erhitzt worden war, ergab nun nach dem Neutralisieren mit Schwefelsäure mit aller Deutlichkeit, daß neben wenig unverändertem Serin eine große Menge Glycin und in erheblicher Menge Alanin aufgetreten war (Abbild. 1, Nr. 1). Daneben findet sich noch in viel geringerer Konzentration eine weitere ninhydrinpositive Substanz mit größerem  $R_F$ -Wert. Die retentionimetrische Auswertung<sup>6)</sup> eines solchen Chromatogramms ergab, daß sich die  $\alpha$ -Amino-carbonsäuren des



Abbild. 1. Aufsteigendes Papierchromatogramm (20% wasserhaltiges Phenol) der alkalischen Zersetzungsprodukte von Serin und Threonin. 1, 2, 3 und 4 s. Text, 5 = Serin-Alaninmischung, 6 = Glycin, 7 =  $\alpha$ -Aminobuttersäure, 8 = Threonin ( $1/2$  natürl. Größe).

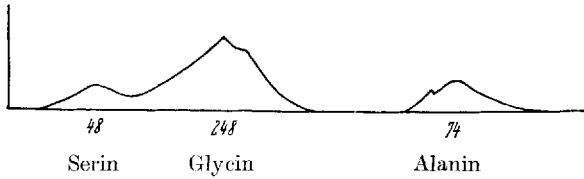
<sup>3)</sup> B. 15, 1733 [1882].

<sup>4)</sup> F. Bettzieche u. K. Menger, Ztschr. physiol. Chem. 172, 56 [1927].

<sup>5)</sup> Journ. biol. Chem. 90, 341 [1931].

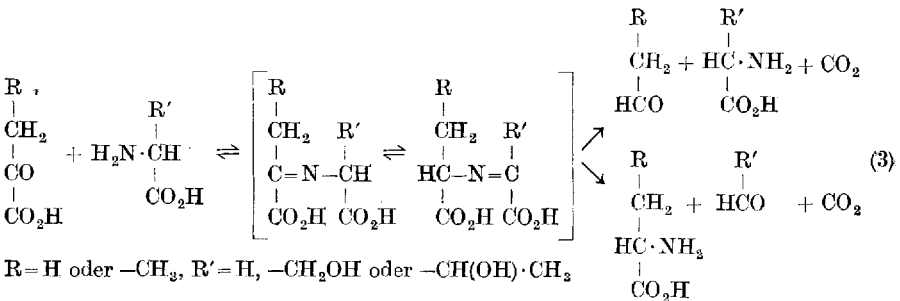
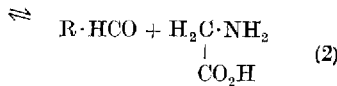
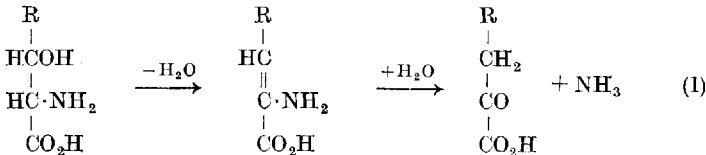
<sup>6)</sup> Th. Wieland u. E. Fischer, Naturwiss. 35, 29 [1948]; Th. Wieland, Angew. Chem. 60, 313 [1948].

Spaltungsansatzes aus 1 Mol. Serin, 12.5 Mol. Glycin und 4.5 Mol. Alanin zusammensetzten (Abbild. 2).



Abbild. 2. Retentiographie des Papierchromatogramms eines Zersetzungsansatzes von Serin.

Zur Deutung des Mechanismus dieser Spaltungsreaktion wird man sich wohl mit Recht der Formulierung bedienen, wonach durch Wasserabspaltung aus Serin und seinen Derivaten zunächst  $\alpha$ -Amino-acrylsäure bzw. deren Abkömmlinge hervorgehen. Diese zerfallen bei der Hydrolyse in Pyruvat und Ammoniak (1)<sup>7, 8)</sup>. Daneben stellt sich aber wohl mit gleicher Geschwindigkeit ein Aldolgleichgewicht ein, das überwiegend auf der Seite der Spaltungsprodukte Formaldehyd und Glycin liegt (2). Der Aldehyd kann nun unverändertes Serin zu Alanin reduzieren; wahrscheinlicher scheint uns aber, daß das Alanin seine Entstehung der Herbstschen Umaminierungsreaktion<sup>9)</sup> zwischen Glycin oder Serin und Brenztraubensäure verdankt (3).



R = H oder  $-\text{CH}_3$ , R' = H,  $-\text{CH}_2\text{OH}$  oder  $-\text{CH}(\text{OH}) \cdot \text{CH}_3$

Die Umkehrbarkeit von Gleichung (2) gibt sich im Auftreten von Alanin beim barytalkalischen Erhitzen von Glycin mit Formaldehyd zu erkennen (Abbild. 1, Nr. 4). Auch hier erkennt man im Chromatogramm außer Glycin

<sup>7)</sup> M. Bergmann, A. Miekeley u. E. Kann, *Ztschr. physiol. Chem.* **146**, 247 [1925].

<sup>8)</sup> O. A. Nicolet, L. A. Shinn u. L. J. Saidel, *Journ. biol. Chem.* **142**, 609 [1942].

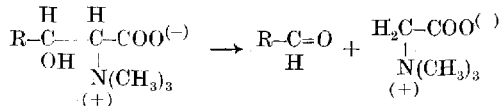
<sup>9)</sup> R. M. Herbst, *Journ. Amer. chem. Soc.* **58**, 2239 [1936].

und Alanin die schneller wandernde Aminosäure, die, nach ihrem  $R_F$ -Wert geschätzt, etwa 5 C-Atome haben muß. Über die Struktur dieses Kondensationsproduktes von Glycin mit Formaldehyd können wir vorerst noch keine Aussagen machen.

Beim Erhitzen mit kaltgesättigtem (etwa 0.3 *n*) Barytwasser tritt keine der beobachteten Änderungen am Serin auf.

Erhitzt man Threonin unter den beim Serin geschilderten Bedingungen mit heißgesättigtem Barytwasser, so tritt im Papierchromatogramm deutlich außer unverändertem Ausgangsmaterial der Flecken des Glycins auf (Abbild. 1, Nr. 2). Die Isolierung dieser Aminosäure bereitete keine Schwierigkeiten. Wie wir nämlich vor längerer Zeit gefunden haben<sup>10)</sup>, bildet der Cu-Komplex von Glycin als einziger von allen untersuchten beim Sättigen der wäßr. Lösung mit Phenol eine in der Kälte nur zu 0.05% lösliche Additionsverbindung der Zusammensetzung  $(C_2H_4O_2N)_2Cu + 2C_6H_5OH$ , die sich in hellblauen Krystallen abscheidet. Auch *m*- und *p*-Kresol geben krystallisierte Additionsverbindungen, die etwas leichter löslich sind, während mit *o*-Kresol keine Abscheidung erfolgt. Im Chromatogramm des Zersetzungsansatzes fand sich weiterhin eine als Proteinbaustein nicht mit Sicherheit aufgefundene Aminosäure. Der Vergleich mit synthetisch dargestellter  $\alpha$ -Amino-buttersäure<sup>11)</sup> im eindimensionalen Chromatogramm (Abbild. 1, Nr. 7) sowie im zweidimensionalen mit 20% wasserhaltigem Phenol und einem *n*-Butanol-Propionsäure-Wassergemisch (2.1 : 1 : 1.4 Vol.-Tle.) ergab eindeutig die Identität. Die Aminosäure verdankt ihre Entstehung wahrscheinlich einem Mechanismus, der analog demjenigen ist, der zur Bildung von Alanin aus Serin führt. In Nr. 3 von Abbild. 1 ist das Chromatogramm des Threonin-Zersetzungsversuches in Gegenwart von Formaldehyd abgebildet. Hierbei ist, wie aus Nr. 4 (Abbild. 1) zu erwarten war, durch Kondensation von Glycin mit Formaldehyd und die weiteren beim Serin geschilderten Veränderungen Alanin aufgetreten. Auch der Flecken der länger-kettigen Aminosäure findet sich, allerdings nur in sehr geringer Stärke.

Wie beim Serin, so führt auch beim Threonin längeres Erhitzen mit kaltgesättigtem Barytwasser zu keinerlei Veränderung. Hingegen beobachteten wir, daß nach 12-stdg. Hydrolyse eines threoninhaltigen Oligopeptids mit kaltgesättigtem Barytwasser Threonin in Glycin verwandelt wurde. Die Labilität der Bindung zwischen dem  $\alpha$ - und  $\beta$ -ständigen C-Atom ist also bei der



in die Peptidkette eingebauten Oxyaminosäure ganz wesentlich gesteigert, ähnlich wie man es bei Alkylsubstitution des Stickstoffs antrifft. So erleiden die Betaine von Serin, Threonin, Oxyasparaginsäure,  $\beta$ -Oxy-glutaminsäure und

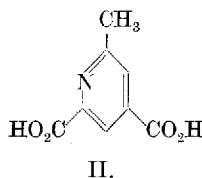
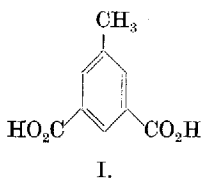
<sup>10)</sup> Th. Wieland, *Fiat Reviews, Biochemistry III*, S. 1 [1948].

<sup>11)</sup> Das nach der Streckerschen Methode aus Propionaldehyd dargestellte, nur einmal umkrystallisierte Präparat enthält Spuren von Alanin, das aus einer Verunreinigung des verwendeten Aldehyds mit Acetaldehyd stammt und im Papierchromatogramm gerade noch sichtbar ist.

*cis*- sowie *trans*-Phenylserin schon beim Versuch ihrer Bereitung aus den Aminosäuren mit Dimethylsulfat und Alkali eine „retrograde“ Aldolspaltung zu den entsprechenden Aldehyden und Glycin-betaïn<sup>12)</sup> (s. Gleichung S. 471).

Auch das  $\alpha$ -Wasserstoffatom scheint in substituierten Aminosäuren besonders locker gebunden zu sein: Es fallen solche Derivate leicht der Racemisierung durch Alkali anheim, einem Vorgang, der ja mit der Labilität des  $\alpha$ -ständigen Wasserstoffatoms zusammenhängt. Weiterhin scheint die zu Aminoacrylsäure-Derivaten führende Wasserabspaltung in den gebundenen Oxyaminosäuren begünstigt<sup>8)</sup>. Nun stellt sich zudem heraus, daß auch die Bindung des am  $\alpha$ -Kohlenstoffatom haftenden  $\beta$ -C-Atoms durch Amidverknüpfung der Carboxygruppe und Acylierung des Stickstoffs stark gelockert wird. Diese Spaltung der Kohlenstoffkette durch Alkali vermißt man völlig beim Cystein.

Cystein ist ebenso wie Cystin gegen Alkali besonders labil. Bekanntlich läßt sich ein Teil des Schwefels von Proteinen durch Erhitzen mit alkalischer Plumbit-Lösung als Bleisulfid abspalten. Sein Ursprung liegt in den SH-Gruppen der Cysteinreste. Nach F. G. Hopkins<sup>13)</sup> ist die Sulfhydrylgruppe des Cysteins im Tripeptid-Glutathion leichter als Schwefelwasserstoff abspaltbar als in der freien Aminosäure, ebenso wie in bestimmten cystinhaltigen Diketopiperazinen<sup>14)</sup>, doch erleidet auch die freie Aminosäure leicht eine alkalische Zersetzung zu Sulfid, Ammoniak und Pyruvat<sup>15)</sup>. H. V. Lindstrom und W. M. Sandstrom, die die Natur sämtlicher Zersetzungsprodukte in kochendem  $2n$  Ba(OH)<sub>2</sub> analysierten<sup>16)</sup>, fanden neben Brenztraubensäure, Ammoniak und Schwefelwasserstoff Thiomilchsäure und die aus der Weiterreaktion der Brenztraubensäure herrührenden cyclischen Produkte Uvitinsäure (I) und Uvitoninsäure (II). Neben diesen Produkten fanden die amerikanischen Autoren auch



Alanin, das jedoch nicht isoliert werden konnte. Die papierchromatographische Analyse eines Spaltungsansatzes von Cystein mit heißgesättigtem Barytwasser ergab nun eindeutig, daß als einzige ninhydrin-positive Substanz in beträchtlicher Menge Alanin vorlag. Für eine Spaltung der Kohlenstoffkette, wie wir sie beim Serin und Threonin beobachtet hatten, ergab sich keinerlei Anhaltspunkt. Hierbei, wo das Auftreten von Formaldehyd also ausgeschlossen ist,

<sup>12)</sup> H. E. Carter u. D. B. Melville, Journ. biol. Chem. **133**, 109 [1940]; H. D. Dakin, ebenda **140**, 847 [1941].

<sup>13)</sup> Journ. biol. Chem. **84**, 276 [1929].

<sup>14)</sup> M. Bergmann u. F. Stather, Ztschr. physiol. Chem. **152**, 189 [1926].

<sup>15)</sup> B. H. Nicolet, Journ. Amer. chem. Soc. **53**, 3066 [1931].

<sup>16)</sup> Journ. biol. Chem. **138**, 445 [1940].

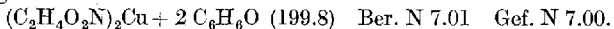
kommt als Mechanismus für die Alaninbildung am ehesten der der Umaminierungsreaktion zwischen der aus einem Teil des Cysteins gebildeten Brenztraubensäure und unverändertem Cystein in Frage.

### Beschreibung der Versuche.

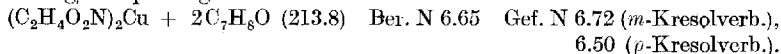
Ausführung der Spaltungsansätze: Die Aminosäuren (50 mg) wurden mit 0.5 cem kalt- oder heißgesättigtem Barytwasser in ein Jenaer Reagensröhrchen eingeschmolzen und 15 Stdn. auf 110° erhitzt; dann wurde der Inhalt mit Schwefelsäure genau neutralisiert, das Bariumsulfat abzentrifugiert und mehrmals mit heißem Wasser gewaschen. Das Zentrifugat und die Washwässer wurden sodann i. Vak. auf 1 cem eingedampft und so zur papierchromatographischen Analyse verwendet.

Papierchromatographie: Zur Papierchromatographie benutzten wir Whatman-Papier Nr. 1. Die Streifen (25/2–8 cm) wurden nach Aufbringen des Substanztropfens an das untere Ende unter eine Glasglocke in das Lösungsmittel gehängt, das sich in 10 bis 12 Stdn. bis zum oberen Rand aufsaugte. Für zweidimensionale Chromatogramme wurde bei quadratischen Blättern (25×25 cm) die Zylindermethode von R. J. Williams und H. Kirby<sup>17)</sup> angewandt; die Sichtbarmachung erfolgte durch Besprühen mit einer 0.5-proz. Lösung von Ninhydrin in 5% wasserhaltigem Butanol, dem einige Tropfen Eisessig zugesetzt wurden, und Erwärmen im Trockenschrank auf 110°. Als Lösungsmittel verwendeten wir: 1.) 20% wasserhaltiges Phenol; das Phenol wurde durch Vak.-Destillation über Zinkstaub farblos erhalten und bleibt so, wenn man bei der Chromatographie ein Schälchen mit Natriumcyanid unter die Glocke bringt. 2.) Eine Mischung aus gleichen Teilen A und B (A = 125 cem *n*-Butanol, 8.5 cem H<sub>2</sub>O; B = 62 cem Propionsäure, 79 cem H<sub>2</sub>O). Bei unvollständiger Mischung (zu niedrigerer Temperatur) gibt man vorsichtig Propionsäure bis zur Homogenität zu. Das Gemisch bildet bald etwas Propionsäurebutylester, von dem kleine Mengen nichts schaden; es soll aber alle vier bis fünf Tage erneuert werden.

Isolierung von Glycin: Die neutralisierten Spaltungsansätze von je 50 mg Serin oder Threonin wurden durch Kochen mit Kupfercarbonat in die Lösung der Kupfer-Komplexe verwandelt. Zur filtrierten, eisgekühlten Lösung (etwa 2 cem) fügte man tropfenweise so lange verflüssigtes Phenol, bis dieses eben nicht mehr in Lösung ging. Nach kurzer Zeit begann die Krystallisation der hellblauen Additionsverbindung, von der am nächsten Tage abgesaugt und die mit wenig eiskaltem, phenolgesättigtem Wasser nachgewaschen wurde. Aus der Spaltung von Serin wurden 40 mg, aus der des Threonins 30 mg erhalten. Das aus Glycin-Kupfer bereitete Krystallisat ist zu 5 mg in 10 cem phenolgesättigtem Wasser von 0° löslich.



Additionsverbindung von Glycin-Kupfer mit *m*- und *p*-Kresol; Herstellung aus kaltgesätt. Glycin-Kupfer-Lösung, wie bei Phenol beschrieben. Löslichkeit für beide etwa 2–3 mg/ccm phenolgesätt. Wasser bei 0°.



*o*-Kresol gibt im selben Versuchsansatz keine schwer lösliche Verbindung.

<sup>17)</sup> Science **107**, 481 [1948].