

krystallinischer Niederschlag. Zum Schluss wird der überschüssige Glycinester durch trockne gasförmige Salzsäure neutralisiert und der dicke Niederschlag abgesaugt und mit Aether gewaschen. Behandelt man dieses feste Product nach dem Abpressen und Verdunsten des Aethers mit Wasser, so geht der salzsaure Glycinester in Lösung, während der α -Bromisocapronylglycylglycinester in fast reinem Zustand zurückbleibt. Seine Menge betrug 1.9 g, und aus der ätherischen Mutterlauge wurden durch Verdunsten noch 0.2 g desselben Productes erhalten, sodass die Ausbeute mehr als 50 pCt. der Theorie erreichte. Einmaliges Umlösen aus verdünntem Alkohol genügte, um ein reines Präparat vom Schmp. 123—124° zu gewinnen.

0.1508 g Sbst.: 0.236 g CO₂, 0.0833 g H₂O.

C₁₉H₂₁O₄N₂Br. Ber. C 42.7, H 6.2.

Gef. » 42.7, » 6.1.

Aus diesem Product lässt sich dann, wie früher gezeigt, das Tripeptid Leucylglycylglycin gewinnen.

Ich habe mich überzeugt, dass das Bromisocapronylglycylglycin auf dieselbe Art in Chlorid verwandelt werden kann, und ich zweifle kaum daran, dass mit der neuen Reaction eine werthvolle Erweiterung der Polypeptidsynthesen gewonnen ist.

Es ist mir wiederum eine angenehme Pflicht, Hrn. Dr. H. Leuchs für die werthvolle Hülfe, die er auch bei dieser Untersuchung leistete, besten Dank zu sagen.

484. Emil Fischer und Emil Abderhalden: Synthese von Polypeptiden. V. Derivate des Proline (α -Pyrrolidin-carbonsäure).

[Aus dem I. chemischen Institut der Universität Berlin.]

(Eingegangen am 3. August 1904.)

Von den Aminosäuren, die bisher in den Proteinen gefunden wurden, ist das Prolin (α -Pyrrolidincarbonsäure) die einzige Iminobase. Da diese Verschiedenheit der Structur ein Hinderniss für die Anwendung der neuen Polypeptid-Synthese sein konnte, so haben wir einen darauf bezüglichen Versuch angestellt und uns vom Gegentheil überzeugt. Das Prolin lässt sich nämlich in alkalischer Lösung leicht mit α -Bromisocapronylchlorid vereinigen, und das hierbei entstehende Bromderivat wird durch Behandlung mit Ammoniak ebenso leicht in Leucylprolin, $\text{CH}_3\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO.NC}_4\text{H}_7\text{COOH}$, verwandelt.

Letzteres giebt, wie viele andere Dipeptide, beim Erhitzen ein An-

hydrid, das ein Analogon des kürzlich beschriebenen Prolylalaninanhydrids¹⁾ ist.

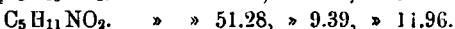
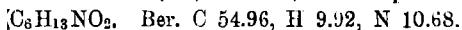
Das für die nachfolgenden Versuche nötige Prolin haben wir aus Gelatine mit Benutzung der Estermethode bereitet.

Es scheint uns nicht überflüssig, die hierbei gewonnenen Erfahrungen mitzutheilen. Da das Prolin im Gegensatz zu den gewöhnlichen Aminosäuren in heissem Alkohol leicht löslich ist, so lässt es sich auch aus einem complicirten Gemisch verhältnismässig leicht isoliren, vorausgesetzt, dass zuvor eine Reinigung durch Destillation der Ester stattgefunden hat. Wir verwandten das Gemisch von Estern, das unter 0.6 mm Druck bei 40—105° (Temperatur des Bades) überdestillirt. Dasselbe wurde durch sechsstündiges Kochen mit der fünffachen Menge Wasser verseift, die wässrige Lösung bei vermindertem Druck zur Trockne verdampft, und der Rückstand mit etwa der fünffachen Menge absolutem Alkohol ausgekocht. Beim Erkalten schied das alkoholische Filtrat einen Niederschlag von anderen Aminosäuren ab, nach deren Entfernung die Lösung stark eingeeengt und darauf mit Aether das Prolin ausgefällt wurde. Die Menge des Rohproduetes betrug 60 g aus 1 kg Gelatine.

Es ist ein Gemisch von aktivem Prolin, racemischem Prolin und anderen gewöhnlichen Aminosäuren, die zwar in reinem Zustand in Alkohol unlöslich sind, aber bei Gegenwart von viel Prolin mit aufgelöst werden. Zur Isolirung des activen Prolins haben wir den etwas mühsamen Weg über das Kupfersalz eingeschlagen, der früher ausführlich beschrieben ist²⁾. Die Hauptversuche wurden aber mit racemischem Prolin angestellt. Für seine Gewinnung ist es am zweckmässigsten, das rohe Gemisch der Aminosäuren völlig zu racemisiren.

Zu dem Zwecke wurden 40 g des Gemisches in 150 cem Wasser gelöst und nach Zusatz von 80 g gereinigtem, krystallisiertem Baryumhydroxyd in einem Porzellaanbecher fünf Stunden im Autoclaven auf 145° erhitzt. Nach genauer Ausfällung des Baryts mit Schwefelsäure wurde dann die Flüssigkeit unter vermindertem Druck zur Trockne verdampft und der Rückstand mit absolutem Alkohol ausgekocht. Hierbei blieben nicht weniger als 6 g ungelöst, die nach dem Umkristallisiren aus heissem Wasser Analysezahlen gaben, welche auf ein Gemisch von Leucin (bezw. Isoleucin) und Aminovaleriansäure hindeuten.

0.1720 g Sbst.: 0.3374 g CO₂, 0.1483 g H₂O = 53.49 pCt. C und 9.58 pCt. H.
— 0.1684 g Sbst.: 16.3 cem N (20°, 765 mm) = 11.14 pCt. N.



Die Entfernung dieser Aminosäuren aus dem Rohprolin beruht darauf, dass sie in der racemischen Form sich in Alkohol viel schwerer lösen als in der activen³⁾.

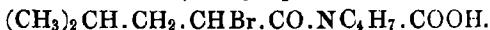
¹⁾ E. Fischer und Umetaro Suzuki, diese Berichte 37, 2842 [1904].

²⁾ E. Fischer, Zeitschr. f. physiol. Chem. 33, 164 [1901].

³⁾ Für den qualitativen Nachweis der einfachen Aminosäuren in dem complicirten Gemisch, das bei der Hydrolyse der Proteine mit Mineralsäuren entsteht, und in welchem neben den activen Producten immer schon Racemkörper

Zur völligen Reinigung wurde das in der alkoholischen Lösung befindliche racemische Prolin nach dem Verjagen des Alkohols in das schön krystallisirende Kupfersalz verwandelt, und daraus durch Ausfällen mit Schwefelwasserstoff wieder regenerirt. Die Ausbeute an reinem Material betrug schliesslich 19 g aus 40 g Rohproduct. Für die nachfolgenden Versuche wurde ausschliesslich das reine Präparat benutzt.

α -Bromisocapronyl-prolin (inaktiv).



6 g racemisches Prolin werden in 52.2 ccm Normalnatronlauge (1 Mol.) gelöst und in einem Gemisch von Salz und Eis gekühlt. Dazu setzt man unter fortwährendem Schütteln abwechselnd in kleinen Portionen im Laufe von etwa $\frac{1}{2}$ Stunde 12 g α -Bromisocapronylchlorid (1 Mol.) und 62 ccm Normalnatronlauge. Uebersättigt man jetzt mit Säure, so fällt das α -Bromisocapronyl-prolin zunächst ölig aus, wird aber nach einiger Zeit zum Theil krystallinisch. Am bequemsten ist die Isolirung durch Ausäthern.

Da das Product sich nur in öligem Zustand leicht in Aether löst, so überschichtet man am besten die noch alkalische Flüssigkeit mit ziemlich viel Aether, fügt dann die berechnete Menge Säure (etwa 12 ccm fünffach Normalsalzsäure) zu und befördert die Ausätherung durch kräftiges Schütteln. Beim Verdunsten des Aethers bleibt ein anfangs öliger Rückstand, der sehr bald zum grössten Theil krystallisiert. Nach 12-stündigem Stehen wird die Masse zur Entfernung des ölig gebliebenen Theils mit Petroläther angerieben und scharf abgesaugt. Zur völligen Reinigung löst man die Krystalle in wenig heissem Aceton. Beim Abkühlen scheidet sich der Bromkörper in feinen, farblosen Nadelchen aus. Die Krystallisation kann durch Zusatz von Petroläther vervollständigt werden.

Die Ausbeute an reiner Substanz betrug 8 g oder 52 pCt. der Theorie. Die im Vacuum getrocknete Substanz verliert bei 105° nicht an Gewicht.

0.1853 g Sbst.: 0.3070 g CO_2 , 0.1087 g H_2O . -- 0.1755 g Sbst.: 7.3 ccm N (18° , 762 mm). — 0.1790 g Sbst.: 0.1170 g AgBr.

$\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{O}_3\text{NBr}$. Ber. C 45.2, H 6.2, N 4.8, Br 27.4%
Gef. » 45.1, » 6.2, » 4.8, » 27.8.

Das Bromisocapronyl-prolin ist in heissem Aceton und Alkohol leicht löslich, viel schwerer in Aether und Chloroform und

vorhanden sind, ist auch die völlige Racemisirung trotz der dabei eintretenden Verluste rathsam, weil dann die Trennung erheblich leichter wird. Auf diesem Kunstgriff habe ich schon früher bei der Isolirung der Aminovaleriansäure aus Casein hingewiesen. (Zeitschr. f. phys. Chem. 33, 162).

E. Fischer.

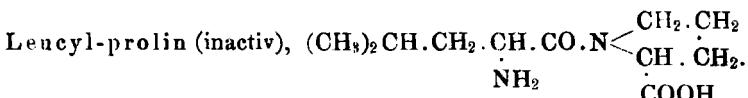
fast unlöslich in Petroläther. In kaltem Wasser ist es fast unlöslich, in viel heissem löst es sich auf. Es schmilzt zwischen 159.5° und 163° (corr.) ohne Zersetzung und ist selbstverständlich gänzlich optisch inaktiv. Ob der wenig scharfe Schmelzpunkt der Substanz, die im übrigen einheitlich aussieht, durch eine geringe Verunreinigung verursacht wird, können wir nicht sagen. Die gleiche Bemerkung gilt für die anderen, in dieser Abhandlung beschriebenen Producte.

Dem krystallisierten Bromisocapronyl-prolin ist, wie oben erwähnt, anfänglich ein syrupartiges Product beigemischt, das durch Waschen mit Petroläther und scharfes Absaugen entfernt wird. Wir vermuthen, dass in diesem Syrup eine stereoisomere Verbindung enthalten ist, deren Bildung man theoretisch voraussehen kann.

Da aber ihre Isolirung Schwierigkeiten hat, und die Substanz augenblicklich auch kein grosses Interesse beanspruchen kann, so haben wir auf die weitere Untersuchung verzichtet.

Ebenso leicht, wie das racemische Prolin, lässt sich seine active Form mit dem Bromisocapronylchlorid vereinigen. Wir haben dafür L-Prolin verwandt, das mit Hülfe des in Alkohol löslichen Kupfersalzes gereinigt war. Die Darstellung der Bromisocapronylverbindung geschah genau wie oben angegeben. Das Präparat schmolz etwas niedriger als der Racemkörper, und zwar zwischen 154° und 158° (corr.), und zeigte auch in der äusseren Form eine Verschiedenheit, denn es krystallisierte aus warmem Aceton in mikroskopisch feinen Prismen. Ferner ist es stark aktiv.

0.1223 g Sbst.: 0.2021 g CO₂, 0.0702 g H₂O = 45.06 pCt. C und 6.39 pCt. H.



Löst man Bromisocapronyl-prolin in der fünffachen Menge wässrigem Ammoniak, das bei 0° gesättigt ist, und lässt drei Tage im Eisschranken stehen, so hinterbleibt beim Abdampfen der Flüssigkeit unter stark verminderter Druck ein Rückstand, der nur zum Theil krystallisiert. Zur Isolirung des darin enthaltenen Leucyl-prolins wird mit ziemlich viel Essigester ausgekocht. Schon beim Abkühlen der Lösung pflegt dann das Dipeptid in feinen Nadelchen auszufallen. Den Rest gewinnt man durch passende Concentration des Filtrates. Zur völligen Beseitigung des aufangs dem Präparat noch anhaftenden Bromammoniums wird es noch 1—2 Mal aus Essigester umgelöst. Die Ausbeute an reiner Sbstanz betrug 3/5 des angewandten Bromkörpers oder 77 pCt. der Theorie. Die im Vacuumexsiccator getrocknete Sbstanz behielt ihr Gewicht im Toluolbade.

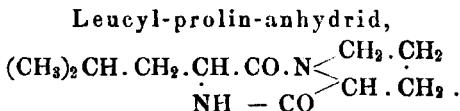
0.1782 g Sbst.: 0.3769 g CO₂, 0.1412 g H₂O. -- 0.1851 g Sbst.: 19.5 ccm N (20°, 761 mm).

C₁₁H₂₀O₃N₂. Ber. C 57.9, H 8.8, N 12.3.
Gef. » 57.7, » 8.8, » 12.1.

Das Leucyl-prolin krystallisiert aus Essigester in mikroskopisch kleinen, meist zu Büscheln vereinigten Nadelchen, schmilzt zwischen 116° und 119° (corr.) und schmeckt ziemlich stark bitter. Es ist in Wasser und Alkohol leicht löslich, dagegen in Aether sehr schwer löslich.

Von den bisher bekannten Dipeptiden, auch von dem nahe verwandten Prolyl-alanin¹), unterscheidet es sich scharf durch sein Verhalten gegen Kupferoxyd oder Kupfercarbonat, denn seine wässrige Lösung färbt sich beim Kochen mit diesen Agentien nicht blau. Es scheint also, dass unter diesen Bedingungen kein Kupfersalz entstehen kann. Der Grund für dieses abweichende Verhalten liegt höchst wahrscheinlich darin, dass das zum Carbonyl in α -Stellung befindliche Stickstoffatom tertiär gebunden ist. Wir beabsichtigen, diesen Gesichtspunkt an anderen Beispielen zu prüfen.

Durch zweistündiges Erhitzen mit starker Salzsäure auf dem Wasserbade wird das Leucyl-prolin völlig in seine Componenten Leucin und Prolin gespalten, die sich nach Entfernung der Salzsäure leicht durch heißen Alkohol trennen lassen.



Wird obiges Dipeptid im Oelbade auf 145° erhitzt, so verliert es unter Blasenwerfen Wasser. Nach 30 Minuten pflegt die Reaction beendet zu sein, und beim Abkühlen erstarrt die schwach gelblich gefärbte Flüssigkeit krystallinisch. Das Anhydrid ist in kaltem Wasser schwer löslich und lässt sich aus heißem Wasser sehr leicht in feinen Nadelchen gewinnen, die zwischen 117° und 121° (corr.) schmelzen. Für die Analyse war im Vacuumexsiccator getrocknet. Die wässrige Lösung des Anhydrids färbt sich beim Kochen mit Kupferoxyd ebenfalls nicht blau.

0.1702 g Sbst.: 0.3913 g CO₂, 0.1332 g H₂O.
 C₁₁H₁₈N₂O₂. Ber. C 62.8, H 8.6.
 Gef. » 62.7, » 8.7.

Das Anhydrid ist in Aceton leicht löslich, weniger leicht in Alkohol, fast unlöslich in Aether und Petroläther.

¹) E. Fischer und Umetaro Suzuki, I. c.