

mals aus Aether umkrystallisirt. Es schmilzt dann bei  $96^{\circ}$ , ist also völlig rein. Die Analyse ergab die richtigen Werthe.

0.1996 g Sbst.: 0.5856 g  $\text{CO}_2$ , 0.2007 g  $\text{H}_2\text{O}$ . — 0.3301 g Sbst.: 0.1179 g AgCl.

Ber. C 80.09, H 11.10, Cl 8.77.

Gef. » 80.13, » 11.29, » 8.81.

Dieses Verfahren der Cholesterylchlorid-Darstellung ist sehr einfach und besitzt gegenüber dem älteren wesentliche Vortheile.

Es ist uns nicht gelungen, das Chloratom durch die Amidogruppe zu ersetzen. Bei der Behandlung des Cholesterylchlorids mit methyl- oder äthyl-alkoholischem Ammoniak entstehen vielmehr krystallinische Cholesterilene, die bei  $82^{\circ}$  resp.  $256^{\circ}$  schmelzen.

#### 470. Emil Fischer und Peter Bergell: Spaltung einiger Dipeptide durch Pankreasferment.

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

(Eingegangen am 5. August 1904.)

Vor einem Jahre<sup>1)</sup> haben wir gezeigt, dass die Naphtalinsulfo- und Carbäthoxyl-Derivate des Glycyl-tyrosins und des Glycyl-leucins durch Pankreasferment hydrolysirt werden. Nachdem die freien Polypeptide durch die neuen synthetischen Methoden in grösserer Zahl zugänglich geworden waren, lag es nahe, ihr Verhalten gegen das Enzym ebenfalls zu studiren. Mit positivem Erfolge haben wir das bei dem Glycyl-*l*-tyrosin und dem inactiven Leucyl-alanin gethan. Bei dem ersten ist die Hydrolyse am leichtesten zu beobachten, weil das Tyrosin auskrystallisirt. Da das Glycyl-*l*-tyrosin in stereochemischer Beziehung einheitlich sein muss, so war eine gleichmässige und schliesslich vollständige Hydrolyse durch das Enzym zu erwarten. In Wirklichkeit haben wir aber nicht die theoretische Menge von Tyrosin erhalten können. Wir werden auf diesen Punkt später zurückkommen. Das andere Dipeptid ist racemisch, und man durfte deshalb bei ihm eine asymmetrische Wirkung des Enzyms erwarten, wie wir sie früher beim Carbäthoxylglycyl-*d*-*l*-leucin beobachtet haben. Das ist in der That der Fall. Als Spaltungsproducte des Leucyl-alanins konnten wir *l*-Leucin und *d*-Alanin sicher nachweisen und die Bildung von activem Dipeptid sehr wahrscheinlich machen.

<sup>1)</sup> Diese Berichte 36, 2592 [1903].

Spaltung des Glycyl-*l*-tyrosins.

Für den Versuch diente ein möglichst reines Präparat, das nach der kürzlich mitgetheilten Vorschrift<sup>1)</sup> mit Anwendung von natürlichem *l*-Tyrosin dargestellt war. 1 g des Präparates wurde in 20 ccm Wasser gelöst und diese Lösung, die in 1 Decimeter-Rohr 1.87° nach rechts drehte, mit Ammoniak schwach alkalisch gemacht. Von der Flüssigkeit diente 1 ccm als Controllprobe. Der übrige Theil wurde mit 0.2 g käuflichem Trypsin (Pankreatin von der Firma Rhenania) versetzt, tüchtig geschüttelt, wobei ein Theil des Enzyms in Lösung ging, und filtrirt. Die Flüssigkeit drehte jetzt im 1 Decimeter-Rohr nur noch + 1.6°. Sie wurde nach Zugabe von Toluol zugleich mit der Controllprobe im Brutschrank bei 36° aufbewahrt. Nach 12 Stunden war in der mit Enzym versetzten Flüssigkeit Tyrosin als ziemlich dicker Krystallbrei abgeschieden, der sich in den nächsten 30 Stunden noch sichtlich vermehrte. Nach 6 Tagen wurde das Tyrosin abfiltrirt. Seine Menge betrug 0.25 g. Die Drehung des Filtrates war auf + 0.55° zurückgegangen. Die Controllprobe zeigte sich unverändert. Die filtrirte Flüssigkeit wurde von neuem mit 0.1 g Pankreatin versetzt, geschüttelt, filtrirt und wieder 24 Stunden bei 36° gehalten. Es fand abermals Abscheidung von Tyrosin statt, dessen Menge nach 24-stündigem Stehen im Eisschrank 0.12 g betrug. Die Gesamtmenge des Tyrosins war also 0.37 g, während für 1 g Ausgangsmaterial nach Abzug der Controllprobe 0.72 g sich berechnen, sodass die Ausbeute etwas mehr als 50 pCt. war. Wahrscheinlich wird man sie bei weiterem Zusatz von Enzym noch erhöhen können, aber die theoretische Menge zu erreichen, dürfte kaum möglich sein, da ein Theil des Tyrosins durch die mit dem Enzym eingeführten Fremdstoffe in Lösung gehalten wird. Es ist deshalb schwer zu prüfen, wie weit die Hydrolyse geführt werden kann. Zur Reinigung wurde das Tyrosin einmal in verdünnter Salzsäure gelöst, durch Ammoniak wieder abgeschieden, dann aus heissem Wasser umgelöst und bei 100° getrocknet.

0.1808 g Sbst.: 0.3924 g CO<sub>2</sub>, 0.0980 g H<sub>2</sub>O.

Ber. C 59.66, H 6.08.

Gef. » 59.20, » 6.00.

Das Präparat schmolz unter partieller Zersetzung bei 313—314° (corr.).

Zum Nachweis des gleichzeitig entstehenden Glykocolls wurde die vom Tyrosin abfiltrirte Mutterlauge mit 4 ccm Normalnatronlauge und einer ätherischen Lösung von 3 g  $\beta$ -Naphthalinsulfochlorid versetzt und dann so verfahren, wie es früher<sup>2)</sup> für die Bereitung der  $\beta$ -Naph-

<sup>1)</sup> Diese Berichte 37, 2495 [1904].

<sup>2)</sup> Diese Berichte 35, 3780 [1902].

talinsulfoderivate von Aminosäuren empfohlen wurde. Beim Ansäuern der alkalischen Lösung fiel das  $\beta$ -Naphthalinsulfoglycin zunächst als Oel aus, das auch beim längern Stehen nicht krystallisirte. Es wurde deshalb mit 30 ccm Wasser ausgekocht; aus dem Filtrat fiel dann die Verbindung beim Abkühlen krystallinisch aus, zeigte aber zunächst noch einen etwas zu niedrigen Schmelzpunkt. Dieser stieg nach einmaligem Umkrystallisiren aus sehr verdünntem Alkohol auf  $159^{\circ}$  (corr.), wie früher angegeben, und die Analyse des bei  $100^{\circ}$  getrockneten Productes gab auch auf Naphthalinsulfoglycin stimmende Zahlen:

0.1736 g Sbst.: 0.3465 g  $\text{CO}_2$ , 0.0652 g  $\text{H}_2\text{O}$ .

Ber. C 54.34, H 4.15.

Gef. « 54.40, » 4.20.

Bei einem zweiten Versuch mit 0.75 g Glycyl-tyrosin, bei dem das Enzym in drei Portionen von je 0.1 g zugegeben war, verlief die Spaltung unter ähnlichen Erscheinungen, und die Menge des Tyrosins betrug nach der Reinigung mit Salzsäure und Ammoniak 0.31 g oder 55 pCt. der Theorie.

#### Spaltung des Leucyl-alanins.

Das bisher nicht beschriebene Dipeptid wurde von Hrn. O. Warburg im hiesigen Institut aus racemischem Alanin und inactivem Bromisocapronylchlorid dargestellt. Es ist ein gut krystallisirter Stoff, der unter Zersetzung gegen  $245^{\circ}$  schmilzt und dem äusseren Anschein nach einheitlich ist, vielleicht aber doch noch ein Gemisch von zwei stereoisomeren Racemkörpern bildet.

4 g wurden in 110 ccm Wasser und einigen Tropfen Ammoniak unter gelindem Erwärmen gelöst, nach dem Abkühlen mit 0.8 g Pankreatin tüchtig geschüttelt und von dem nicht gelösten Theil des Enzyms abfiltrirt. Diese Flüssigkeit, die im 1 Decimeter-Rohr  $0.41^{\circ}$  nach links drehte, wurde nach Zusatz von Toluol drei Tage bei  $36^{\circ}$  aufbewahrt, wobei die Linksdrehung auf  $-0.73^{\circ}$  stieg, dann wurden noch 0.3 g Enzym zugegeben und nach dem Schütteln wieder filtrirt. Die Drehung der Lösung, die jetzt  $-0.76^{\circ}$  betrug, ging in den nächsten Tagen bei  $36^{\circ}$  noch auf  $-0.83^{\circ}$  hinauf. Nachdem die Wirkung des Enzyms im ganzen 8 Tage gedauert hatte, wurde die Flüssigkeit zur Isolirung der Producte zunächst in einer Platinschale auf dem Wasserbade zur Trockne verdampft und der Rückstand mit 5 ccm Wasser, das auf  $0^{\circ}$  abgekühlt war, sorgfältig ausgelaugt. Der ungelöste Theil betrug 2.2 g. Die Verarbeitung der Mutterlange, die mit A bezeichnet sei, wird später beschrieben. Der ungelöste Theil enthielt actives Leucin neben unverändertem Dipeptid und anderen Producten. Für die Isolirung des Leucins diente das schwer lösliche Kupfersalz. Zu seiner Bereitung wurde die ganze Masse in viel Wasser gelöst und etwa

1 Stunde mit überschüssigem Kupferoxyd auf dem Wasserbade unter häufigem Umschütteln digerirt. Die heiss filtrirte Lösung gab dann beim Einengen unter vermindertem Druck ein schwer lösliches Kupfersalz, das zunächst noch keine deutliche Krystallform zeigte. Als aber die Krystallisation aus heissem Wasser wiederholt wurde, entstanden die blassblauen Blättchen, wie sie dem Leucinkupfer eigenthümlich sind. Die Ausbeute an reinem Salz betrug allerdings nur 0.35 g, jedenfalls war aber die Menge des Leucins erheblich grösser, denn die Trennung der Aminosäure von den Polypeptiden mit Hilfe des Kupfersalzes ist nichts weniger als quantitativ. Das Leucinkupfer gab folgende Zahlen:

0.0852 g Sbst.: 0.021 g CuO.

$(C_6H_{12}NO_2)_2Cu$ . Ber. Cu 19.6. Gef. Cu 19.6.

Der Rest des Kupfersalzes diente zur Bereitung der freien Aminosäure. Diese glich in Krystallform, Geschmack, Löslichkeit ganz dem natürlichen Leucin, insbesondere drehte sie in salzsaurer Lösung nach rechts. Eine Lösung in 20-procentiger Salzsäure, die 3.14 pCt. der Aminosäure enthielt, drehte im 1 Decimeter-Rohr bei Natriumlicht  $0.40^\circ$  nach rechts und hatte das spec. Gewicht 1.10, daraus berechnet sich  $[\alpha]_D^{20} + 11.6^\circ$ . Die specifische Drehung betrug mithin nur  $\frac{2}{3}$  des Werthes, der für reinstes Leucin beobachtet wurde. Das aus dem Dipeptid gebildete Leucin bestand mithin zu etwa 83 pCt. aus *l*-Verbindung und 17 pCt. *d*-Verbindung; daraus geht zweifellos hervor, dass die Wirkung des Enzyms asymmetrisch erfolgt und vorzugsweise das natürliche *l*-Leucin liefert. Ob die kleine Menge *d*-Leucin auch durch den enzymatischen Process oder durch theilweise Racemisation bei der Isolirung entstanden ist, müssen wir unentschieden lassen. Aus dem löslichen Theil des Kupfersalzes konnte noch unangegriffenes, inactives Dipeptid gewonnen werden.

Der in eiskaltem Wasser lösliche Theil des ursprünglichen Reactionsproductes (Mutterlauge A) enthielt *d*-Alanin und ein actives Dipeptid, dessen Trennung und Nachweis allerdings ziemlich schwierig war. Die Lösung wurde zunächst wieder in einer Platinschale zur Trockne verdampft und nochmals mit 6 ccm eiskaltem Wasser ausgelaugt, wobei ein geringer, amorpher und nicht weiter untersuchter Rückstand blieb. Die wässrige Lösung gab auf Zusatz von viel absolutem Alkohol einen festen, nicht deutlich krystallisirten Niederschlag (1 g). Er wurde zur Entfernung von peptonartigen Producten mit 90-procentigem Alkohol ausgekocht, und die von einem schmierigen Rückstand getrennte Lösung mit dem ersten wässrig-alkoholischen Filtrat vereinigt. Beim Verdampfen dieser Lösung in einer Platinschale hinterblieb ein zum Theil krystallinischer, zum Theil syrupöser Rückstand. Er wurde zwischen Fließpapier stark gepresst. Die

krystallinische Masse zeigte dann keine Biuretreaction mehr, enthielt also nichts mehr von den Stoffen, die mit dem Enzym in die Lösung eingeführt waren. Sie schmeckte bitter, war bei 200° schon völlig geschmolzen und zeigte, in Normalsalzsäure gelöst, eine spezifische Drehung von ungefähr 58° nach links. Sie wurde in der gewöhnlichen Weise in die  $\beta$ -Naphtalinsulfoverbindung verwandelt. Diese krystallisirte aus verdünntem Alkohol in langen, seidenglänzenden Nadeln, die bei 151° schmolzen und, in Normalnatronlauge gelöst, schwach nach rechts drehten. Eine Lösung vom Procentgehalt 4.42 in Normalnatronlauge drehte im 1 Decimeter Rohr Natriumlicht + 1.74°, woraus sich berechnet  $[\alpha]_D$  ungefähr + 38°. Allerdings hat die Analyse Werthe ergeben, die nur annähernd mit den für Naphtalinsulfoleucyl-alanin berechneten übereinstimmen.

0.1417 g Sbst.: 0.2929 g CO<sub>2</sub>, 0.0874 g H<sub>2</sub>O. — 0.1892 g Sbst.: 11.4 ccm N [21°, 760 mm].

C<sub>19</sub>H<sub>24</sub>O<sub>5</sub>N<sub>2</sub>S. Ber. C 58.2, H 6.1, N 7.2.

Gef. » 56.4, » 6.8, » 6.9.

Leider reichte unser Material nicht zur Wiederholung der Reinigung und der Analyse aus. Der beim Abpressen des activen Leucyl-alanins vom Papier aufgenommene Syrup enthielt das *d*-Alanin. Es wurde mit Wasser ausgelaugt, die Flüssigkeit verdampft und der Rückstand in der üblichen Weise in die Naphtalinsulfoverbindung verwandelt. Aus der alkalischen Lösung gefällt, wurde diese nach einiger Zeit krystallinisch. Zur Reinigung diente das schwer lösliche Baryumsalz. Es schied sich aus, als die Säure in der gerade ausreichenden Menge Ammoniak gelöst und mit Baryumchlorid versetzt wurde. Die aus dem Baryumsalz regenerirte Säure verhielt sich ganz ähnlich wie das früher beschriebene  $\beta$ -Naphtalinsulfo-*d*-alanin<sup>1)</sup>. Aus Wasser krystallisirt, enthielt sie Krystallwasser und schmolz in Folge dessen schon bei 80°. Nachdem sie aber bei 60° im Vacuum getrocknet war, lag der Schmp. bei 125°. Eine Stickstoffbestimmung der trocknen Säure gab einen hinreichend stimmenden Werth.

0.1816 g Sbst.: 8.4 ccm N (23°, 760 mm).

Ber. N 5.0. Gef. N 5.2.

Die alkalische Lösung der Säure drehte stark nach links; es handelt sich demnach um das Derivat des natürlichen *d*-Alanins.

Wir haben ferner das ebenfalls von O. Warburg dargestellte inactive Alanyl-leucin, und endlich das Leucyl-leucin in derselben Weise geprüft und in beiden Fällen auch die Anzeichen einer asymmetrischen Hydrolyse beobachtet. Da aber die Spaltung hier recht unvoll-

<sup>1)</sup> Diese Berichte 35, 3781 [1902].

kommen und in Folge dessen die Isolirung der Producte noch schwieriger war als im vorhergehenden Fall, so können die Versuche nicht als abgeschlossen betrachtet werden.

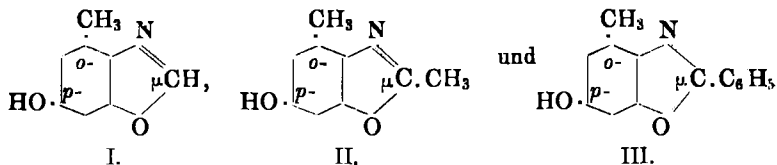
Man wird überhaupt aus der vorhergehenden Schilderung die Ueberzeugung gewinnen, dass namentlich die quantitative Verfolgung der Hydrolyse von Polypeptiden durch Pankreasenzym äusserst mühsam ist. Wir schreiben das zum grossen Theil der mangelhaften Qualität des Enzyms zu. Bei seiner Gewinnung aus der Pankreasdrüse kommen Zersetzungsproducte der Proteinstoffe in Lösung, die dem gefällten Enzym beigemengt bleiben. Sie bestehen aus peptonartigen Producten und erschweren sehr die Isolirung der durch den enzymatischen Process gebildeten Aminosäuren. Will man auf diesem Gebiete eine grössere Reihe von Untersuchungen machen, so ist ein wirksameres Enzym nothwendig. Wir beabsichtigen deshalb, in Zukunft das frische Secret der Pankreasdrüse, wie es durch Anlage einer Pankreasfistel bei Hunden gewonnen werden kann, zu benutzen, denn wir müssen auf diese Versuche grossen Werth legen, weil die Wirkung der pankreatischen Enzyme vor der Hand das beste Mittel zu sein scheint, um aus der grossen Zahl der künstlichen Polypeptide die biologisch werthvollen Combinationen auszuwählen.

**471. Ferd. Henrich und Gustav Opfermann:  
Beiträge zur Kenntniss des Zusammenhangs zwischen  
Fluorescenz und chemischer Constitution bei Derivaten des  
Benzoxazols.**

[Aus dem chemischen Laboratorium der Universität Erlangen.]

(Eingegangen am 8. August 1904.)

Vor einer Reihe von Jahren hat der Eine von uns gezeigt<sup>1)</sup>, dass das salzsaure Amidoorcin durch Orthocondensation mit Säurechloriden und Säureanhydriden in Derivate des *o*-Toluxazols übergeht. Von den so dargestellten Oxytoluxazolen:



<sup>1)</sup> F. Henrich, »Ueber Derivate des Amidoorcins«, Wiener Monatshefte 19, 483 [1899].