

2-Phenyl-*p*-cymol.

26 g des Kohlenwasserstoffs $C_{16}H_{18}$, $\alpha_D^{15} + 81^\circ$, wurden mit 150 g 1-procentiger Eisessig-Salzsäure 5 Stunden unter Rückfluss gekocht. Durch Eingiessen in Wasser und Behandeln mit Alkali wurde die Essigsäure entfernt und das erhaltene Oel im Vacuum destillirt. Sdp. $153-154^\circ$ (i. D.) unter 14 mm Druck, $\alpha_D^{15} = 0^\circ$. Ausbeute 20 g. Phenylcymol ist ein stark lichtbrechendes, farbloses Oel von schwachem Geruch, das unter gewöhnlichem Druck (752 mm) bei 268° siedet.

0.1315 g Subst.: 0.4398 g CO_2 , 0.1021 g H_2O .

$C_{16}H_{18}$. Ber. C 91.43, H 8.57.

Gef. » 91.21, » 8.70.

$d_4^{13.6} = 0.9822$	} Mol.-Refr. Ber. 69.18.
$n_D^{13.8} = 1.5670$	
	Gef. 69.47.

In Schwefelsäure (6 pCt. SO_3) löst es sich in der Kälte leicht zu einer Sulfosäure, die sich beim Stehenlassen des Sulfurirungsgemisches an feuchter Luft als Hydrat in glänzenden Krystallen abscheidet und durch Absaugen über Glaswolle gewonnen werden kann.

Heidelberg, Universitätslaboratorium.

366. Emil Fischer und Emil Abderhalden:

Bildung von Dipeptiden bei der Hydrolyse der Proteine.

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

(Eingegangen am 22. Juni 1906.)

Wie wir vor fünf Monaten¹⁾ gezeigt haben, entsteht bei der Hydrolyse des Seidenfibroins durch starke kalte Schwefel- oder Salz-Säure in reichlicher Menge ein Dipeptid des Glykocolls und *d*-Alanins, das in Form seines Anhydrids isolirt wurde. Wir haben selbstverständlich die Methode, durch welche dieses wichtige Resultat erzielt wurde, auch auf andere Proteine angewandt und können heute über zwei neue Dipeptid-anhydride berichten, die unter ähnlichen Bedingungen entstanden sind. Das eine davon ist aus *l*-Tyrosin und Glykocoll zusammengesetzt und entsteht ebenfalls aus Seidenfibroin. Es wurde schon am Schlusse der ersten Mittheilung kurz erwähnt.

¹⁾ Diese Berichte 39, 752 [1906].

Die weiteren Beobachtungen haben unsere damals ausgesprochene Ansicht über seine Zusammensetzung ganz bestätigt, denn es ist uns gelungen, seine Identität mit einem synthetisch gewonnenen Glycyl-L-tyrosinanhydrid zu beweisen.

Das zweite neue Diketopiperazin enthält Glykocoll und actives Leucin. Es entsteht aus dem Elastin und wurde auch mit einem synthetisch gewonnenen Glycyl-L-leucinanhydrid identificirt.

Unter der grossen Anzahl von Proteinen haben wir für den vorliegenden Zweck zunächst diejenigen ausgewählt, welche wie Spongin, Gelatine, Keratin, Gliadin, Zein u. s. w. reich an einfachen Monoaminsäuren sind, weil man erwarten darf, dass die hier entstehenden Diketopiperazine sich verhältnissmässig leicht isoliren lassen. Wir werden aber später das Verfahren ganz allgemein zu verwerthen suchen.

Inzwischen haben Levene und Beatty ¹⁾ bei der Hydrolyse der Gelatine mit Trypsin die Bildung eines Diketopiperazins von Prolin und Glycin beobachtet, welches vielleicht auch durch Anhydrisirung aus einem Dipeptid entstanden ist. Trifft diese Voraussetzung zu, so würde die Zahl der Dipeptide, welche bei der Spaltung der Proteine in Form ihrer Anhydride nachgewiesen werden konnten, schon vier betragen.

1. Seidenfibroïn.

100 g Seidenfibroïn wurden mit 300 ccm Salzsäure vom spec. Gew. 1.19 übergossen und unter öfterem Umschütteln zuerst 3 Tage bei 18° und dann 3 Tage bei 37° aufbewahrt. Aus der mit der fünffachen Menge Wasser verdünnten Flüssigkeit entfernten wir die Hauptmenge der Salzsäure durch Eintragen von überschüssigem, feingepulvertem Kupferoxydul. Das in Lösung gegangene Kupfer wurde mit Schwefelwasserstoff gefällt, und das Filtrat vom Kupfersulfid unter vermindertem Druck bei 35–40° (Temperatur des Bades) zum Syrup verdampft. Wie früher beschrieben, wurde der Rückstand verestert, und die Ester mit etwas weniger als der berechneten Menge Natriumäthylat in Freiheit gesetzt. Einen Ueberschuss an Äthylat suchten wir in allen Fällen zu vermeiden. Bei der Destillation des Alkohols unter geringem Druck bis 65° (Badtemperatur) gingen nur geringe Mengen von Aminosäureester über, denn beim Verdampfen des mit Salzsäure versetzten Destillates blieben nur 5.0 g feste Substanz. Der beim Verjagen des Alkohols bleibende Rückstand wurde zunächst zur Entfernung noch vorhandener Monoaminsäureester wiederholt mit Äther ausgeschüttelt und hierauf in heissem, absolutem Alkohol ge-

¹⁾ Diese Berichte 39, 2060 [1906]. Vgl. auch Zeitschr. für physiol. Chem. 47, 143 [1906].

löst. In der braun gefärbten, klaren Lösung wurde durch Einleiten von trockenem Ammoniakgas zunächst der kleine Rest der noch vorhandenen Hydrochlorate zersetzt, das ausgeschiedene Chlorammon abfiltrirt und das Filtrat eingeeengt. Nach 24 Stunden war die ganze Masse zu einem lockeren, anscheinend krystallinischen Brei erstarrt. Er wurde sofort abgenutscht, mit kaltem, absolutem Alkohol gewaschen und scharf abgepresst. Wie die Eigenschaften dieses Productes, das in rohem Zustande 25.0 g wog, zeigten, lag das früher beschriebene Glycyl-*d*-alaninanhydrid vor. In dieser Masse waren unter dem Mikroskop noch keine deutlichen Krystalle zu erkennen und erst durch wiederholtes Umlösen aus heissem, absolutem Alkohol wurde das Präparat ganz krystallinisch. Die Mutterlauge von der ersten Abscheidung des Glycylalaninanhydrides gab nach mehrtätigem Stehen einen zweiten gallertigen Niederschlag, der starke Millon'sche Reaction zeigte. Er wurde zunächst aus heissem Alkohol und schliesslich aus heissem Wasser umgelöst, wodurch es gelang, das noch beigemengte in Wasser ziemlich leicht lösliche Glycyl-alaninanhydrid zu entfernen.

Das gereinigte Product krystallisirte aus heissem Wasser in schönen, farblosen, meist stern- oder kugelförmig vereinigten Nadeln. Es schmolz beim raschen Erhitzen nicht ganz scharf unter Zersetzung zwischen 278—283° (corr.) und gab die Millon'sche Probe recht stark. Für die Analyse war es bei 100° getrocknet:

0.1254 g Sbst.: 0.2775 g CO₂, 0.0635 g H₂O.

C₁₁H₁₂N₂O₃. Ber. C 60.0, H 5.4.

Gef. » 60.35, » 5.67.

Dass die Verbindung ein Derivat des Glykocolls und Tyrosins ist, zeigt das Resultat der Hydrolyse. Zu dem Zwecke wurde die Substanz mit der zehnfachen Menge 25-proc. Schwefelsäure 10 Stunden am Rückflusskühler gekocht, dann die Schwefelsäure nach dem Verdünnen mit Wasser durch Baryumhydroxyd genau gefällt, das Baryumsulfat nochmals mit Wasser ausgekocht, die gesammelten Filtrate mit Thierkohle entfärbt und darauf das Tyrosin in der üblichen Weise isolirt.

0.1538 g Sbst.: 0.3365 g CO₂, 0.0854 g H₂O.

C₉H₁₁NO₃. Ber. C 59.66, H 6.07.

Gef. » 59.69, » 6.17.

Seine Menge betrug 0.56 g auf 1 g Anhydrid, mithin 68 pCt. der Theorie. Aus dem Filtrat wurde das Glykocoll nach dem Verdampfen als Esterchlorhydrat abgeschieden, welches den Schmp. 144° (corr.) zeigte. Seine Menge betrug 0.42 g, entsprechend 0.22 g Glykocoll = 64.7 pCt. der Theorie.

Wir haben endlich unser Präparat mit einem synthetisch gewonnenen Glycyl-*l*-tyrosinanhydrid, welches Hr. W. Schrauth im hiesigen Institut aus Chloracetyl-*l*-tyrosinester dargestellt hat, verglichen. In Bezug auf die Form der Krystalle, die Löslichkeit und den Schmelzpunkt fanden wir völlige Uebereinstimmung. Ein kleiner Unterschied zeigte sich nur im optischen Verhalten. Wir benutzten zu dessen Bestimmung eine Lösung in wässrigem Ammoniak, welche das Gesamtgewicht 10.1245 g und das spec. Gew. 0.9682 hatte und 0.1722 g Substanz enthielt. Sie drehte im 1 dm-Rohr 2.03° nach rechts. Daraus berechnet sich $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +123.3^{\circ}$. Der Werth ist natürlich bei der grossen Verdünnung der Lösung wenig genau. Hr. Schrauth hat unter ganz ähnlichen Bedingungen für das synthetische Product $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +126.4^{\circ}$ gefunden. Die Differenz ist aber zu gering, um begründete Zweifel an der Identität der Producte zu erwecken.

Die Ausbeute an reinem Glycyl-*l*-tyrosinanhydrid betrug beim ersten Versuche mit 100 g Seidenfibroïn 4.2 g, sodass ein erheblicher Theil des Gesamttyrosins in dieser Substanz enthalten war. Diese grosse Ausbeute war wohl einem glücklichen Zufall zu verdanken, denn bei einem zweiten Versuche, der mit 200 g Seide durchgeführt wurde, war sie sehr viel geringer. An gut krystallisirtem Product wurden hier nur 0.35 g erhalten, während der grösste Theil der Substanz im gallertigen Zustand verharrte und deshalb nicht ganz rein gewonnen werden konnte.

Elastin.

200 g fein zertheiltes Elastin wurden mit der 4 fachen Menge 70-procentiger Schwefelsäure unter häufigem Umschütteln 3 Tage bei gewöhnlicher Temperatur behandelt, wobei Lösung eintrat, und noch ein Tag bei 37° aufbewahrt. Die Schwefelsäure wurde nun mit Baryt quantitativ gefällt, und der centrifugirte Niederschlag wiederholt mit Wasser ausgekocht. Die Verarbeitung der Filtrate geschah genau so, wie es beim Seidenfibroïn beschrieben ist, durch Verdampfen unter vermindertem Druck, Veresterung, Zerlegung der Esterchlorhydrate mit Natriumäthylat und Verarbeitung der alkoholischen Lösung. Die Menge der Aminosäuren, die auf diese Weise isolirt werden konnte, war etwas grösser als beim Seidenfibroïn, denn das alkoholische Destillat hinterliess beim Verdampfen mit Salzsäure 12 g Rückstand, der aus den Hydrochloraten der Aminosäuren bestand. Durch Extraction des beim Verdampfen des Alkohols bleibenden Rückstandes mit Aether wurden noch 5 g Aminosäureester erhalten.

Der in Aether unlösliche Theil der Ester wurde in absolutem Alkohol warm gelöst und nach dem Abkühlen in die stark braun ge-

färbte Flüssigkeit Ammoniakgas bis zur Sättigung eingeleitet. Dabei fiel noch eine kleine Menge von Chlorammonium aus. In dem Filtrat begann nach zweitägigem Stehen zunächst an den Wänden des Gefässes die Abscheidung einer Masse, die man makroskopisch für kristallinisch hätte halten können, während unter dem Mikroskop keine deutliche Krystallform zu erkennen war. Ihre Menge betrug nach weiterem 3 tägigem Stehen schon über 10 g, und die Mutterlauge gab beim längeren Aufbewahren noch mehrere neue Abscheidungen. Die Masse liess sich gut filtriren und durch Waschen mit kaltem Aceton oder Aether von dem braunen Farbstoff ganz befreien. Zur Reinigung wurde sie aus heissem Aceton oder Alkohol mehrmals umkristallisirt, wobei die Abscheidung in der Regel ziemlich langsam (im Laufe von 24 Stunden) erfolgte. An manchen Stellen des Niederschlags konnte man unter dem Mikroskop ganz deutlich äusserst feine, biegsame Nadelchen, die filzartig zusammengelagert waren, erkennen; dagegen ist es uns nicht gelungen, die ganze Masse in dieser homogenen Form zu erhalten.

Für die Analyse war bei 100° getrocknet:

0.1638 g Sbst.: 0.3408 g CO₂, 0.1229 g H₂O. — 0.1752 g Sbst.: 25.5 ccm N (19°, 756 mm).

C₈H₁₄O₂N₂. Ber. C 56.47, H 8.24, N 16.47.

Gef. » 56.74, » 8.39, » 16.64.

Die gefundenen und berechneten Zahlen stimmen ziemlich gut überein. Die kleine Differenz im Kohlenstoff ist wohl auf die Anwesenheit einer geringen Beimengung von kohlenstoffreicheren Producten zurückzuführen. Der Schmelzpunkt des Präparats lag gegen 253° (corr.). Für die Bestimmung der spezifischen Drehung diente eine verdünnte, wässrige Lösung von 6.7516 g Gewicht, die 0.1098 g Substanz enthielt. Sie drehte im 2 dm-Rohr 0.95° nach rechts. $[\alpha]_D^{20} = + 29.2^\circ$.

Dass die Verbindung aus Glykocoll und Leucin zusammengesetzt ist, beweist das Resultat der Hydrolyse, welche durch 6-stündiges Erhitzen mit der 6-fachen Menge rauchender Salzsäure (spec. Gew. 1.19) im Einschlussrohr auf 100° bewerkstelligt wurde. Nach dem Verdampfen der Salzsäure haben wir das Glykocoll als Esterchlorhydrat abgeschieden und durch den Schmelzpunkt 144° identificirt. Die Ausbeute betrug etwa die Hälfte der berechneten Menge. Aus der Mutterlauge des Glykocoll-esterchlorhydrates konnte das Leucin isolirt und durch Darstellung des Kupfersalzes charakterisirt werden.

Wir haben dann endlich unser Präparat mit einem synthetisch gewonnenen Glycyl-*l*-leucinanhydrid verglichen und keinen wesentlichen Unterschied gefunden, denn das synthetische Product schmolz bei

254—255° (corr.) und zeigte eine spezifische Drehung in 2-procentiger, wässriger Lösung von $[\alpha]_D^{20} = +31.7^\circ (\pm 0.5)$. Auch die Krystallform und die Neigung, sich scheinbar amorph aus Lösungen abzuscheiden, waren die gleichen, nur schien uns die Reinheit des synthetischen Productes etwas grösser zu sein, denn es konnte leichter bei vorsichtigem Umlösen in mikroskopisch deutlichen Kryställchen erhalten werden. Auch war die spezifische Drehung etwas grösser. Bei der grossen Uebereinstimmung der Eigenschaften zweifeln wir aber nicht im geringsten an der Identität beider Producte.

367. Emil Fischer: Spaltung der α -Aminoisovaleriansäure in die optisch activen Componenten¹⁾.

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

(Eingegangen am 25. Juni 1906; vorgetr. in der Sitzung vom Verfasser.)

In den Keimlingen von Lupinen und ähnlichen Pflanzen haben E. Schulze²⁾ und seine Mitarbeiter eine Aminovaleriansäure gefunden, die gelöst in 20-procentiger Salzsäure eine spezifische Drehung von durchschnittlich $+27.9^\circ$ zeigte. Eine Verbindung von sehr ähnlichem Drehungsvermögen wurde bei der Hydrolyse des Caseins³⁾ und des Horns⁴⁾ beobachtet. Das Präparat aus Horn zeigte ferner nach der Racemisirung sowohl in den äusseren Eigenschaften wie im Schmelzpunkt, der Phenylisocyanatverbindung und ihrem Anhydrid völlige Uebereinstimmung mit der synthetischen α -Aminoisovaleriansäure. Daraus wurde der Schluss gezogen, dass die im Horn, Casein und in den Keimlingen von *Lupinus* beobachtete Aminovaleriansäure sehr wahrscheinlich die active α -Aminoisoverbindung sei. Die gleiche Annahme macht A. Kossel, allerdings ohne entscheidende Beobach-

¹⁾ Bei den folgenden Versuchen ist anfangs Hr. Prof. Koichi Matsubara aus Tokio theilhaftig gewesen. Er hat die racemische Formyl-aminoisovaleriansäure dargestellt und deren Spaltung in die beiden optisch activen Formen bewerkstelligt. Die völlige Reinigung der activen Formylkörper, ihre Verwandlung in die activen Aminosäuren sowie die Untersuchung ihrer Derivate sind dann von meinem Assistenten Hrn. Dr. S. Hilpert ausgeführt worden.

²⁾ Vergl. Zeitschr. für physiol. Chem. 35, 300 und Journ für prakt. Chem. N. F. 27, 353 ff.

³⁾ E. Fischer, Zeitschr. f. physiol. Chem. 33, 159.

⁴⁾ E. Fischer und Th. Dörpinghaus, Zeitschr. für physiol. Chem. 36, 469.