

530. Emil Fischer: Synthese von Polypeptiden. XXI^{1).}
Derivate des Tyrosins und der Glutaminsäure.

[Aus dem Chemischen Institut der Universität Berlin.]

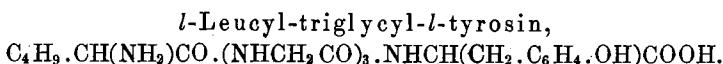
(Eingegangen am 10. August 1907.)

Bei der partiellen Hydrolyse des Seidenfibroins entstehen neben Glycyl-alanin und Glycyl-tyrosin (bezw. Tyrosyl-glycin) kompliziertere Derivate des Tyrosins, auf die ich zuerst gemeinschaftlich mit P. Bergell²⁾ kurz hingewiesen, und die ich neuerdings gemeinschaftlich mit E. Abderhalden³⁾ genauer untersucht habe. Um Anhaltspunkte für die Beurteilung und experimentelle Behandlung dieser Stoffe zu gewinnen, erschien das Studium der höheren Polypeptide des Tyrosins notwendig. Ich habe deshalb ein dahin gehöriges Tripeptid und Pentapeptid untersucht. Das erste ist



Es entsteht durch Kupplung der *d*- α -Brompropionsäure mit Glycyl-*l*-tyrosin und nachfolgende Amidierung.

Das zweite ist



Es wurde erhalten durch Amidierung des *d*- α -Bromisocapronyl-triglycyl-*l*-tyrosins, welches durch Kupplung von *d*- α -Bromisocapronyl-triglycylchlorid mit *l*-Tyrosin leicht zu bereiten ist.

Diese beiden Polypeptide sind dem früher beschriebenen Glycyl-tyrosin recht ähnlich. Sie unterscheiden sich aber davon durch die Fällbarkeit mit Ammoniumsulfat aus wässriger Lösung. Bei dem Pentapeptid tritt diese Fällung auch in verdünnter Lösung ein, beim Tripeptid findet sie nur in sehr konzentrierter und ganz kalter Lösung statt. Sie gleichen darin den Albumosen, für welche die Abscheidung durch Ammoniumsulfat, Kochsalz und dergl. als charakteristisch angesehen wird. Dieselbe Eigenschaft haben E. Abderhalden und

¹⁾ Vergl. Nr. XX, diese Berichte **40**, 2737 [1907] und Nr. XIX, Ann. d. Chem. **354**, 1.

²⁾ Chem.-Ztg. **1902**, 939.

³⁾ Bildung von Polypeptiden bei der Hydrolyse der Proteine, Sitzungsberichte der Berliner Akademie der Wissenschaften **1907**, 574, vergl. auch die hergehende Abhandlung (S. 3544) mit gleichem Titel, wo auf die Bedeutung dieser Beobachtung für die Beurteilung der Albumosen hingewiesen ist.

ich¹⁾) bei einem Produkt beobachtet, das durch Abbau von Seidenfibroin gewonnen wird, und das wir für ein Tetrapeptid aus 2 Mol. Glykokoll, 1 Mol. *d*-Alanin und 1 Mol. *l*-Tyrosin halten.

Da die Glutaminsäure in vielen Proteinen in erheblicher Menge enthalten ist, so war es schon lange mein Wunsch, ihre Polypeptide kennen zu lernen. Die Untersuchung ist leider durch verschiedene Umstände, insbesondere durch die geringe Krystallisationsfähigkeit der meisten Glutaminsäuredervate verzögert worden. Ich bin aber jetzt in der Lage, nach Versuchen des Hrn. Theodor Johnson²⁾ ein schönes krystallisierendes Dipeptid, die

l-Leucyl-*d*-glutaminsäure,

beschreiben zu können, welche auf die gewöhnliche Art aus der *d*- α -Bromisocapronyl-*d*-glutaminsäure gewonnen wurde. Ihr Studium hat zu einer neuen allgemeinen Methode für die Abscheidung von Polypeptiden der Glutaminsäure durch Fällung mit Silberlösung geführt.

Über die nahe verwandte Glycyl-glutaminsäure und einige kompliziertere Glieder der Reihe werde ich demnächst gemeinschaftlich mit Hrn. Walter Kropf berichten.

Amide von Derivaten der Polypeptide sind schon verschiedene bekannt, z. B. Carbäthoxyl-glycyl-glycinamid³⁾, $C_2H_5.CO_2.NHCH_2CO.NHCH_2CO.NH_2$, oder Carbonyl-diglycyl-glycinamid, $CO:(NHCH_2CO.NHCH_2CO.NH_2)_2$. Um auch die einfachen Formen kennen zu lernen, habe ich aus Triglycyl-glycin-methylester durch Erhitzen mit methylalkoholischem Ammoniak das

Triglycyl-glycin-amid, $NH_2CH_2CO.(NHCH_2CO)_2.NHCH_2CO.NH_2$, dargestellt.

Die weit aufsteigende Reihe der künstlichen Polypeptid deren Zusammensetzung und Struktur aus der Synthese gefolger werden kann, scheint mir eine gute Gelegenheit zu bieten, die Brauchbarkeit der modernen Molekulargewichtsbestimmungen für kompliziertere Systeme zu prüfen. Ich habe den Anfang mit einigen Di-, Tri-, Tetrapeptiden und einem Hexapeptid gemacht, die bei der Gefrierpunktmethode leidlich stimmende Werte für das aus chemischen Gründen abgeleitete Molekulargewicht gaben.

¹⁾ loc. cit.

²⁾ Vergl. seine Inauguraldissertation, Berlin 1906.

³⁾ E. Fischer, diese Berichte 35, 1095 [1902].

d-Brompropionyl-glycyl-*l*-tyrosin,
 $\text{CH}_3 \cdot \text{CHBr} \cdot \text{CO} \cdot \text{NHCH}_2 \cdot \text{CO} \cdot \text{NH} \cdot \text{CH}(\text{CH}_2 \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{OH}) \cdot \text{COOH}$.

Zu einer stark gekühlten Lösung von 5 g reinem, krystallisiertem Glycyl-*l*-tyrosin (1 Mol.) in 26 ccm *n*-Natronlauge (1.25 Mol.) werden abwechselnd und allmählich 3.6 g *d*-Brompropionylchlorid (1 Mol.) und 26 ccm *n*-Natronlauge (1.25 Mol.) hinzugegeben. Die Umsetzung erfolgt sehr schnell. Beim Ansäuern mit 15 ccm $\frac{5}{10}\text{-n}$. Salzsäure fällt eine gelblichgraue, schmierige Masse aus, welche die Millonsche Reaktion gibt und nicht näher untersucht wurde. Die filtrierte Lösung wird nun häufig (10—15 Mal) ausgeäthert, bis eine Probe des Auszugs mit Petroläther keine Fällung mehr gibt. Verdampft man nun den zuvor durch Natriumsulfat getrockneten ätherischen Extrakt zum größeren Teil, so scheidet sich ein gelbes Öl aus. Nach Abgießen der Mutterlauge wird dieses in wenig Essigäther gelöst und mit Petroläther wieder gefällt. Beim längeren Stehen und häufigen Reiben verwandelt es sich allmählich in sehr feine Nadelchen. Ist man schon im Besitz von Krystallen, so empfiehlt es sich, zu impfen. Die Ausbeute an krystallisiertem Produkt betrug durchschnittlich nur 3.2 g oder 40% der Theorie.

Zur Reinigung wurde in der 10-fachen Menge warmem Essigäther gelöst und mit Petroläther wieder abgeschieden, wobei ebenfalls die Krystallisation nur langsam erfolgte.

Zur Analyse wurde im Vakuum über Phosphorpentoxyd getrocknet. Bei 100° nahm das Präparat dann nicht mehr an Gewicht ab.

0.1277 g Sbst.: 0.2116 g CO_2 , 0.0498 g H_2O . — 0.1823 g Sbst.: 10.32 ccm $\frac{1}{10}\text{-n}$. Schwefelsäure (Kjeldahl). — 0.1596 g Sbst.: 0.0814 g AgBr.

$\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{O}_5\text{N}_2\text{Br}$ (373.1). Ber. C 45.03, H 4.59, N 7.51, Br 21.43.
 Gef. » 45.19, » 4.36, » 7.93, » 21.70.

Die Substanz schmilzt bei 155° (korrig. 157°). Sie ist leicht löslich in Alkohol, Aceton, Essigäther, warmem Wasser, schwer löslich in Äther und Petroläther. Aus Wasser krystallisiert sie in häufig zu Drusen verwachsenen lanzettförmigen Blättchen.

Zur optischen Bestimmung diente eine Lösung in Wasser.

0.3035 g Substanz, Gesamtgewicht der Lösung 6.7994 g. $d = 1.015$. Drehung im 1-dm-Rohr bei 20° und Natriumlicht 2.24° nach rechts. Mithin $[\alpha]_D^{20} = + 49.4^\circ$ ($\pm 0.4^\circ$).

0.2945 g Sbst., Gesamtgewicht der Lösung 7.1229 g. $d^{20} = 1.014$. Drehung im 1-dm-Rohr bei 20° und Natriumlicht 2.12° nach rechts. Mithin $[\alpha]_D^{20} = + 50.6^\circ$ ($\pm 0.5^\circ$).

Man sieht, daß die Werte um 1.2° verschieden sind, und ich will bei dieser Gelegenheit nochmals betonen, daß die Gewähr für die Richtigkeit solcher Zahlen nicht sehr groß ist, wenn es sich wie hier um Präparate handelt, die ziemlich schwer krystallisieren, und bei

denen eine fortgesetzte Reinigung durch häufig wiederholte Krystallisation schon aus Mangel an Material ausgeschlossen ist. Denn selbst, wenn man optisch ganz reine Ausgangsmaterialien benutzt, ist bei der Kupplung Gelegenheit zu einer teilweisen Racemisierung gegeben, und die Entfernung der dadurch entstehenden optischen Isomeren ist in manchen Fällen sehr schwierig.

d-Alanyl-glycyl-l-tyrosin.

2 g *d*-Brompropionylglycyl-*l*-tyrosin wurden in 10 ccm 25-prozentigem Ammoniak gelöst und 3½ Tage bei 25° aufbewahrt. Die Abspaltung des Broms war dann fast vollständig. Nach dem Verdampfen des Ammoniaks unter 10–15 mm Druck wurde der gelbe, sirupöse Rückstand mit Wasser aufgenommen und das Bromammonium in der üblichen Weise durch Bariumhydroxyd und Silbersulfat entfernt. Als die wäßrige Lösung unter geringem Druck stark konzentriert war, fiel auf Zusatz von Alkohol das Tripeptid in weißen, amorphen Flocken aus. Seine Menge betrug 0.85 g. Aus der Mutterlauge wurden durch Eindämpfen noch weitere 0.55 g erhalten, so daß die Ausbeute auf 1.4 g oder 85% der Theorie stieg.

Zur Reinigung wurde das Rohprodukt mit etwa 400 Teilen Alkohol ausgekocht und die filtrierte Lösung im Vakuum auf etwa 50 ccm konzentriert. Dabei fiel das Tripeptid als amorphes, ziemlich körniges Pulver aus.

Zur Analyse wurde es im Vakuum über Phosphorpentoxyd bei 105° getrocknet.

0.1160 g Sbst.: 0.2304 g CO₂, 0.0673 g H₂O. — 0.1839 g Sbst. (Kjeldahl): 17.39 ccm $\frac{1}{10}\text{-n}$. H₂SO₄.

C₁₄H₁₉O₅N₃ (309.2). Ber. C 54.34, H 6.19, N 13.59.
Gef. » 54.17, » 6.49, » 13.25.

Zur optischen Bestimmung diente eine Lösung in Wasser.

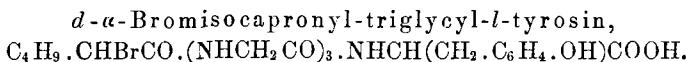
0.1455 g Sbst., Gesamtgewicht der Lösung 3.6251 g. d²⁰ = 1.01. Drehung im 1-dm-Rohr bei 20° und Natriumlicht 1.62° (\pm 0.02°) nach rechts. Mithin [α]_D²⁰ = + 40.0° (\pm 0.5°).

0.2295 g Sbst., Gesamtgewicht der Lösung 5.0034 g. d²⁰ = 1.01. Drehung im 1-dem-Rohr bei 20° und Natriumlicht 1.94° (\pm 0.02°) nach rechts. Mithin [α]_D²⁰ = + 41.9° (\pm 0.4°).

Die Substanz hat keinen Schmelzpunkt. Sie schäumt von etwa 140° ab stark auf und wird von etwa 180° ab gelb und allmählich braun. In Wasser ist sie spielend leicht löslich. Sie gibt die Millonsche und auch die Biuret-Reaktion.

Aus sehr konzentrierter, wäßriger Lösung wird sie bei gewöhnlicher Temperatur durch einen Überschuß einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung ölig gefällt. Kühlst man in Eiswasser und schüttelt um, so ballt sich das Öl zu einer zähen, amorphen Masse zusammen. In konzentrierter Lösung gibt das Dipeptid auch mit Tannin eine-

ölige Fällung, die sich im Überschuß wieder löst. Beide Fällungen finden aber lange nicht so leicht statt, als bei dem Leucyltriglycyltyrosin.



Zu einer stark gekühlten Lösung von 1.75 g *l*-Tyrosin (1.25 Mol.) in 19.2 ccm *n*-Natronlauge (2 Mol., berechnet auf Tyrosin) wurden abwechselnd und allmählich 3 g *d*-Bromisocapronyl-diglycyl-glycylchlorid (1 Mol.) und 9.6 ccm *n*-Natronlauge (1.25 Mol.) zugesetzt. Bei kräftigem Schütteln unter Zugabe von Glasperlen war das Chlorid in etwa $\frac{3}{4}$ Stunden umgesetzt. Die Lösung schäumte während der Operation sehr stark. Beim Ansäuern mit 10 ccm $^5/1-n$. Salzsäure fiel der größte Teil des Reaktionsproduktes als hellgraue, zähe Masse aus. Sie wurde aus der Lösung entfernt und mit wenig Wasser verrieben. Nach 12 Stunden war sie fest geworden. Die Menge betrug 1.25 g. Aus der ersten Mutterlauge krystallisierten beim längeren Stehen noch 0.12 g reinen Bromkörper aus. Als das Filtrat mit 21 ccm *n*-Natronlauge neutralisiert wurde, schied sich das unverbrauchte Tyrosin ab. Es wurde nach 2-stündigem Stehen abfiltriert, und aus der Mutterlauge schieden sich nach 12 Stunden abermals 0.18 g Bromkörper aus.

Die Gesamtausbeute betrug also 1.55 g.

Zur Reinigung wurde aus der 18-fachen Menge heißem Wasser umkristallisiert. Der Schmelzpunkt ist nicht scharf.

Die frisch umkristallisierte, nur lufttrockne Substanz wird von 100° ab weich und schmilzt gegen 115° unter Schäumen. Die bei 78° im Vakuum über Phosphorpentoxid vom Krystallwasser befreite Substanz sintert von 100° ab sehr stark, wird allmählich dunkelgelb bis braun und ist gegen 220° ohne Gasentwicklung geschmolzen.

Zur Analyse wurde bei 78° im Vakuum über Phosphorpentoxid getrocknet.

0.1240 g Sbst.: 0.2154 g CO₂, 0.0651 g H₂O. — 0.1455 g Sbst.: 13.5 ccm N (18°, 762 mm). — 0.1541 g Sbst.: 0.0545 g AgBr.

$C_{21}H_{39}O_7N_4Br$ (529.2). Ber. C 47.62, H 5.52, N 10.59, Br 15.11.

Gef. » 47.38, » 5.87, » 10.77, » 15.05.

Aus Wasser krystallisiert der Körper in undeutlich ausgebildeten Nadeln, aus Alkohol aber recht schön in feinen, zu Büscheln verwachsenen Nadelchen.

In heißem Wasser und Alkohol, sowie in Aceton ist er leicht löslich, auch in warmem Essigäther, schwerer in kaltem Wasser und Alkohol, sehr schwer in Äther. Zur optischen Bestimmung diente die wässrige Lösung.

0.1026 g Sbst., Gesamtgewicht der Lösung 8.4350 g. $d^{20}=1.002$. Drehung im 2-dm-Rohr bei 20° und Natriumlicht 0.70° nach rechts. Mithin $[\alpha]_D^{20}=+28.7^\circ (\pm 0.8^\circ)$.

0.1037 g Sbst., Gesamtgewicht der Lösung 8.9543 g. $d^{20} = 1.002$. Drehung im 2-dm-Rohr bei 20° und Natriumlicht 0.66° nach rechts. Mithin $[\alpha]_D^{20} = + 28.4^\circ (\pm 0.8^\circ)$.

l-Leucyl-triglycyl-*l*-tyrosin.

Als eine Lösung von 2 g Bromkörper in 10 ccm 25-prozentigem Ammoniak $3\frac{1}{2}$ Tage bei 25° stehen blieb, war alles Brom abgespalten. Nun wurde das Ammoniak im Vakuum verdampft und der Rückstand mit wenig Wasser aufgenommen. Dabei blieben 0.1 g eines krystallinischen Körpers zurück, der alle Eigenschaften des Glycyl-tyrosinanhydrids zeigte. Seine Bildung erinnert an die Entstehung von Glycinanhydrid bei der Einwirkung von Ammoniak auf Chloracetyl-diglycyl-glycin¹⁾. Nachdem aus dem Filtrat das Bromammonium in der üblichen Weise durch Baryt und Silbersulfat quantitativ entfernt war, wurde die Lösung im Vakuum zur Trockne verdampft und der Rückstand mit ca. 10 ccm Wasser aufgenommen, wobei wiederum etwas Anhydrid (0.03 g) zurückblieb. Aus dem auf ca. 5 ccm konzentrierten Filtrat fiel auf Zusatz von absolutem Alkohol das Pentapeptid als schwach graue, amorphe Masse, die abfiltriert und mit Alkohol und Äther gewaschen wurde. Die Ausbeute betrug 0.7 g. Zur Analyse war das Präparat nochmals aus konzentrierter wässriger Lösung mit Alkohol gefällt und bei 105° im Vakuum über Phosphorperoxyd getrocknet worden.

Die erste Mutterlauge wurde unter geringem Druck verdampft. Beim Aufnehmen des Rückstandes mit wenig Wasser blieb ein kleiner Teil zurück, und die Lösung war etwas gefärbt. Sie wurde deshalb mit Tierkohle gekocht, dann konzentriert und wiederum mit Alkohol gefällt. So wurden noch 0.3 g rein weißes Produkt erhalten. Im ganzen betrug die Ausbeute also 1.0 g oder 57 % der Theorie.

0.1417 g Sbst.: 0.2798 g CO₂, 0.0901 g H₂O. — 0.1868 g Sbst.: 25.1 ccm N (22°, 758 mm).

C₂₁H₃₁O₇N₃ (465.3). Ber. C 54.16, H 6.71, N 15.06.

Gef. » 53.85, » 7.11, » 15.26.

Das Pentapeptid ist in Wasser sehr leicht löslich und wird daraus durch Alkohol in farblosen, amorphen Flöcken gefällt. Leider ist es bisher nicht gelungen, es krystallisiert zu erhalten. Dasselbe gilt für seine Salze. Die bei 105° getrocknete Substanz beginnt gegen 160° zu schäumen, wird gegen 180° gelb und zersetzt sich bei höherer Temperatur immer mehr.

Die wässrige Lösung dreht ziemlich stark nach rechts, aber das Drehungsvermögen war bei verschiedenen Präparaten keineswegs gleich, wie die folgenden beiden Bestimmungen zeigen.

0.2556 g Sbst. Gesamtgewicht der Lösung 5.1929 g. $d^{20} = 1.01$. Drehung im 1-dm-Rohr bei 20° und Natriumlicht 1.56° nach rechts. Mithin $[\alpha]_D^{20} = + 31.4^\circ (\pm 0.4^\circ)$.

¹⁾ Diese Berichte 37, 2503 [1904].

0.0998 g Sbst. Gesamtgewicht der Lösung 2.0765 g. $d^{20} = 1.01$. Drehung im 1-dm-Rohr bei 20° und Natriumlicht 1.77° nach rechts. Mithin $[\alpha]_D^{20} = +36.5^\circ (\pm 0.4^\circ)$.

Das Pentapeptid schmeckt ziemlich stark bitter, reagiert sauer und gibt stark die Biuretfärbung und Millons Reaktion. Das Nitrat bildet eine amorphe Masse, die sich sowohl in Wasser wie in Alkohol leicht löst und aus letzterem durch Äther amorph gefällt wird. Pikrat und Pikrolonat sind in Wasser schwer löslich und bilden zähe Öle. Das tiefblaue Kupfersalz ist in Wasser leicht, in Alkohol aber äußerst schwer löslich. Charakteristisch ist das Verhalten des Pentapeptids gegen Salzlösungen. So wird es aus Wasser durch eine gesättigte Ammoniumsulfatlösung leicht niedergeschlagen. Bei niederer Temperatur fällt es in dicken, amorphen Flocken und bei gelinder Wärme als zähe, klebrige Masse aus. Die mit Essig- oder Salpetersäure versetzte, nicht zu verdünnte wäßrige Lösung wird auch durch eine gesättigte Kochsalzlösung gefällt. Ferner gibt Tannin in der wäßrigen Lösung des Pentapeptids sofort eine dicke Fällung. Endlich wird es wie so viele andere künstliche Polypeptide aus schwefelsaurer Lösung durch Phosphorwolframsäure gefällt. Mehrere der zuvor erwähnten Reaktionen werden als charakteristisch für die Albumosen angesehen. Man kann deshalb das vorliegende Pentapeptid in diese Klasse einreihen, und es ist vielleicht kein Zufall, daß der größere Teil der bisher beschriebenen Albumosen Millons Reaktion geben, mithin Tyrosin enthält¹⁾. Ich will damit aber keineswegs sagen, daß nicht auch andere ziemlich einfache Polypeptide ähnliche Eigenschaften haben können. Im Gegenteil, ich kann schon jetzt mitteilen, daß das *D*-*L*-leucyl-cystin, welches ich gemeinschaftlich mit Dr. O. Gerngross untersucht habe, auch durch Ammoniumsulfat aus der wäßrigen Lösung leicht gefällt wird, und weitere Beispiele dieser Art werden sich gewiß noch manche finden lassen.

d-α-Bromisocapronyl-*d*-glutaminsäure.

Da die aktive Bromisocapronsäure sehr viel schwerer zugänglich ist, als die Glutaminsäure, so empfiehlt es sich, letztere bei der Kuppelung im Überschuß anzuwenden und auch die zur Lösung der Säure bestimmte Menge Alkali auf 1.5 Mol. zu bemessen.

Dementsprechend wurden 8.2 g *d*-Glutaminsäure in 83 ccm *n*-Natronlauge gelöst, in einer Kältemischung gekühlt und unter kräftigem Schütteln 8 g *d*-α-Bromisocapronylchlorid (aus *d*-Leucin) und 55 ccm *n*-Natronlauge abwechselnd in kleinen Portionen zugegeben. Die Operation dauerte ungefähr $\frac{3}{4}$ Stunden.

¹⁾ Vergl. F. Hofmeister, Ergebnisse der Physiologie I, 781.

Nachdem die Flüssigkeit mit 110 ccm *n*-Salzsäure übersättigt war, wurde sie mehrmals ausgeäthert und die eingeengten ätherischen Auszüge durch Petroläther gefällt. Das anfangs ölig abgeschiedene Kupplungsprodukt kristallisierte bei längerem (12 Stunden) Stehen vollständig. Die Ausbeute betrug 10 g oder rund 82 % der Theorie. Zur Reinigung wurde in Äther gelöst und wieder mit Petroläther gefällt, wobei die Substanz zuerst sich wieder ölig abschied und allmählich in meist sternförmig vereinigten, langen Nadeln krystallisierte. Für die Analyse wurde über Schwefelsäure im Vakuum getrocknet.

0.1897 g Sbst.: 0.2824 g CO₂, 0.0931 g H₂O. — 0.1900 g Sbst.: 7.5 ccm N (22°, 748 mm). — 0.1673 g Sbst.: 0.0963 g Ag Br.

C₁₁H₁₈O₅NBr (324.1). Ber. C 40.73, H 5.60, N 4.32, Br 24.67.

Gef. » 40.60, » 5.49, » 4.42, » 24.49.

Die Substanz schmilzt bei 108—109° (korrig.). Sie ist in kaltem Wasser, Alkohol, Äther und heißem Chloroform leicht, dagegen in Benzol schwer und in Petroläther fast gar nicht löslich. Sie dreht in wässriger Lösung ganz schwach nach links.

l-Leucyl-*d*-glutaminsäure,



Löst man 5 g Bromisocapronylglutaminsäure in 25 ccm wässrigem Ammoniak von 25 % und läßt 3 Tage bei 25° stehen, so ist alles Brom abgespalten. Die Flüssigkeit wird dann unter geringem Druck verdampft, der Rückstand in wenig Wasser gelöst und in einer Schale auf dem Wasserbade mehrmals unter Zusatz von Alkohol wieder verdampft. Hierbei scheidet sich das Dipeptid krystallinisch aus. Es wird schließlich mit heißem Alkohol ausgelaugt, um das Bromammonium zu entfernen. Die Ausbeute betrug 2.1 g oder 52 % der Theorie. Zur völligen Reinigung löst man in heißem Wasser und fällt mit Alkohol. Die im Vakuum über Schwefelsäure getrocknete Substanz verliert bei 120° nicht an Gewicht.

0.1694 g Sbst.: 0.3163 g CO₂, 0.1210 g H₂O. — 0.1834 g Sbst.: 17.2 ccm N (18°, 759 mm).

C₁₁H₂₀O₅N₂ (260.2). Ber. C 50.74, H 7.75, N 10.77.

Gef. » 50.92, » 7.99, » 10.84.

Das Dipeptid schmilzt nicht ganz konstant gegen 232° (korrig.) unter Zersetzung. Es löst sich in ca. 30 Teilen kochendem Wasser und kommt aus dieser Lösung in der Kälte recht langsam in langen, häufig drusenartig verwachsenen Nadeln. Viel rascher erfolgt die Krystallisation auf Zusatz von Alkohol, worin es äußerst schwer löslich ist. In verdünnter Salzsäure ist es sehr leicht löslich und scheidet sich daraus auf Zusatz von Natriumacetat langsam, aber ziemlich vollständig wieder ab.

Wegen der geringen Löslichkeit in Wasser diente für die optische Untersuchung eine Lösung in Normalsalzsäure.

0.5970 g Sbst., Gesamtgewicht der Lösung 7.290 g, $d^{20} = 1.035$. Drehung in 2-dcm-Rohr bei 20° und Natriumlicht 1.78° nach rechts. Mithin $[\alpha]_D^{20} = +10.5^\circ (\pm 0.1^\circ)$ in salzsaurer Lösung.

0.5754 g Sbst., Gesamtgewicht der Lösung 7.4251 g, $d = 1.033$. Drehung im 2-dcm-Rohr bei 20° und Natriumlicht $1.66^\circ (\pm 0.02^\circ)$ nach rechts. Mithin: $[\alpha]_D^{20} = +10.4^\circ (\pm 0.1^\circ)$.

Das Dipeptid schmeckt schwach sauer und gleichzeitig schwach abstumpfend. In verdünnter, schwefelsaurer Lösung wird es von Phosphorwolframsäure nicht gefällt. Das Natriumsalz ist in Wasser sehr leicht, in konzentrierter Natronlauge aber schwer löslich. Das Bariumsalz, dargestellt durch Kochen der wäßrigen Lösung mit Bariumcarbonat, bleibt beim Verdunsten als amorphe, farblose Masse zurück, die sich wieder leicht in Wasser löst. Die wäßrige Lösung des Dipeptids wird von zweifach basisch essigsarem Blei nicht gefällt.

Dagegen ist das Silbersalz in Wasser sehr schwer löslich; infolgedessen wird die mit Ammoniak neutralisierte, wäßrige Lösung des Dipeptids durch Silbernitrat auch bei ziemlich starker Verdünnung gefällt. Der Niederschlag ist amorph, etwas gallertig und anfangs ganz farblos, färbt sich aber am Licht langsam.

Die Leucyl-glutaminsäure gleicht also in dieser Hinsicht der Glutaminsäure selbst, deren neutrales Silbersalz ebenfalls durch Umsetzung des neutralen Ammoniumsalzes mit Silbernitrat ausgeschieden wird¹⁾. Ähnlich verhalten sich die Glycyl-*d*-glutaminsäure und die entsprechende Chloracetyl-glutaminsäure, die später ausführlicher beschrieben werden sollen, und es ist zu erwarten, daß man die gleiche Eigenschaft bei vielen Polypeptiden der Glutaminsäure wiederfinden wird. Endlich habe ich mich überzeugt, daß auch Derivate der Asparaginsäure die Reaktion zeigen. So werden Asparagyl-monoglycin und Asparagyl-dialanin²⁾ ebenfalls durch Ammoniak und Silbernitrat, wenn die Lösung abgekühlt und nicht gar zu verdünnt ist, als farblose, amorphe Niederschläge ausgeschieden.

Aus diesen Beobachtungen folgt, daß man manche derartige Derivate von Glutamin- und Asparaginsäure aus verdünnten Lösungen abscheiden und von vielen anderen Polypeptiden trennen kann.

Die Methode wird deshalb voraussichtlich gute Dienste beim Studium der partiellen Hydrolyse von Proteinen leisten. Das erste Beispiel dafür bietet die Abscheidung der *l*-Leucyl-*d*-glutaminsäure aus den Spaltprodukten des Gliadins, die von E. Abderhalden und mir in der vorhergehenden Abhandlung geschildert (S. 3559) worden ist.

¹⁾ J. Habermann, Ann. d. Chem. **179**, 250 [1875].

²⁾ E. Fischer und E. Koenigs, diese Berichte **37**, 4585 [1904].

Triglycyl-glycinamid,
 $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CO} \cdot (\text{NHCH}_2\text{CO})_2 \cdot \text{NHCH}_2\text{CO} \cdot \text{NH}_2$.

1 g gepulverter Triglycyl-glycinmethylester¹⁾ wurde mit 20 ccm bei 0° gesättigtem methylalkoholischen Ammoniak 2 Stunden unter Schütteln auf 80—100° erhitzt. Nach dem Erkalten ist die Flüssigkeit von einem Brei feiner Krystalle erfüllt, weil das Amid im Gegensatz zum Ester selbst in heißem Methylalkohol schwer löslich ist. Die Krystalle wurden abgesaugt, mit Methylalkohol gewaschen, dann abgepreßt und im Vakuum getrocknet. Zur ölichen Reinigung wurden sie schließlich in etwa 10 ccm Wasser gelöst, filtriert und durch Zusatz von Methylalkohol wieder abgeschieden. Die Ausbeute an reinem Produkt betrug 0.6 g oder 60 % der Theorie.

Zur Analyse wurde bei 80° im Vakuum getrocknet.

0.1706 g Sbst.: 0.2453 g CO₂, 0.0980 g H₂O. — 0.1155 g Sbst.: 23.1 ccm $\frac{1}{10}\text{-n. NH}_2$ (Kjeldahl).

C₈H₁₅O₄N₅. (245.2). Ber. C 39.16, H 6.16, N 28.57.

Gef. » 39.21, » 6.43, » 28.02.

Das Amid löst sich in Wasser leicht mit stark alkalischer Reaktion, dagegen sehr schwer in trocknem Methylalkohol, noch schwerer in Äthylalkohol, Äther etc.

Aus Wasser durch Methylalkohol abgeschieden, bildet es feine Nadelchen, die meist büschel- oder pinselförmig vereinigt sind. Es hat keinen bestimmten Schmelzpunkt, beginnt aber im Capillarrohr gegen 225° zu sintern und sich dunkel zu färben.

In sehr wenig mäßig verdünnter Salzsäure oder Salpetersäure löst sich das Amid in gelinder Wärme, und in der Kälte krystallisieren langsam die Salze, die in reinem Wasser leicht löslich sind. Schwerer löslich ist das Pikrat; es krystallisiert aus der heißen, wäßrigen Lösung beim langsamen Erkalten in schönen, glänzenden, orangerothen Blättchen, die unter dem Mikroskop wie Rhomben aussehen und im Capillarrohr nach vorhergehender Sinterung gegen 240° unter Schwärzung und Aufschäumen schmelzen.

In ziemlich konzentrierter, wäßriger Lösung wird das Amid auch bei Gegenwart von Schwefelsäure durch Phosphorwolframsäure amorph gefällt. Bei größerer Verdünnung bleibt die Reaktion aber aus.

Es zeigt sehr stark die Biuretreaktion und gibt beim Erwärmen mit Alkali sofort Ammoniak.

Kupferoxyd wird von der wäßrigen Lösung beim Kochen mit blauvioletter Farbe gelöst, während Kupfersulfat eine reine blaue Farbe gibt.

Größeren Schwierigkeiten bin ich begegnet bei den Versuchen, den Pentaglycyl-glycinmethylester in das Amid zu verwandeln.

Sowohl bei Anwendung von flüssigem Ammoniak bei gewöhnlicher Temperatur wie beim Erhitzen mit Ammoniak in methyl- oder äthylalkoholischer Lösung auf 100° resultierten immer Präparate, die zweifellos Amid enthielten, weil sie beim Kochen mit Alkali reichliche Mengen von Ammoniak entwickelten, aber stets weniger Stickstoff aufwiesen, als dem reinen Amid entspricht. Die besten Resultate wurden erhalten beim 12-stündigen Schütteln des feingepulverten Esters mit der 10-fachen Menge methylalkoholischem Ammoniak, das bei 0° gesättigt war, bei 100°. Durch die geringe Löslichkeit des Esters in Methylalkohol wird die Reaktion natürlich sehr verzögert. Das abfiltrierte amorphe Produkt wurde ungefähr in der 10-fachen Menge heißem Wasser gelöst und nach Abkühlen auf 0° unter Zusatz einer kleinen Menge Natronlauge etwa 5 Minuten mit der Mutterlauge geschüttelt, um unveränderten Methylester zu lösen.

Das abgesaugte, mit kaltem Wasser sorgfältig gewaschene und schließlich bei 80° im Vakuum getrocknete Präparat gab dann bei der Analyse folgendes Resultat:

0.1392 g Sbst.: 25.65 ccm $\frac{1}{10}\text{-n. NH}_3$.

Gef. N 25.82,

während für das Amid 27.3 und den Ester 22.5 pCt. N berechnet sind.

Molekulargewichtsbestimmungen für einige Polypeptide.

Da die Polypeptide in ihrem chemischen Charakter den Aminosäuren recht ähnlich sind und letztere, wie die ausführlichen Beobachtungen am Glykokoll¹⁾ zeigen, dem Raoult'schen Gesetz sehr genau folgen, so durfte man erwarten, daß auch die einfacheren Polypeptide das gleiche Verhalten zeigen würden. Die nachfolgenden Beobachtungen bestätigen das im allgemeinen; nur sind die Abweichungen von Versuch und Theorie erheblich größer als beim Glykokoll, und beachtenswert ist, daß die gefundenen Werte geringer sind als das berechnete Molekulargewicht. Besonders groß ist die Abweichung beim Triglycyl-glycin. Das hängt vielleicht mit der großen Verdünnung der untersuchten Lösung zusammen, leider war die Anwendung einer größeren Konzentration wegen der geringen Löslichkeit der Substanz nicht möglich. Verhältnismäßig groß sind auch die Differenzen bei dem Leucyl-diglycyl-glycin, obschon hier konzentriertere Lösungen untersucht wurden.

Den 5 Polypeptiden habe ich noch ein Diketopiperazin, das Glycyl-d-valinanhydrid zugefügt, weil es auffallend große Neigung

¹⁾ W. A. Roth, Ztschr. für physikal. Chem. **43**, 558 [1903]. Vergl. auch Th. Curtius und H. Schulz, diese Berichte **23**, 3041 [1890].

hat, aus seinen Lösungen gelatinös auszufallen. Man hätte darnach erwarten können, daß es schon in Lösung zur Bildung komplizierterer Moleküle hinneige. Das Resultat der Molekulargewichtsbestimmung beweist aber das Gegenteil. Alle Versuche sind mit wäßrigen Lösungen ausgeführt, und für die Berechnung diente der Wert $K = 19$.

Glycyl-l-tyrosin (krystallisiert)¹⁾,
 $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CO} \cdot \text{NHCH}(\text{CH}_2 \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{OH})\text{COOH}$.

I.	Prozentgehalt der Lösung	2.982,	$\Delta = 0.256^\circ$
II.	" "	" "	$\Delta = 0.185^\circ$
III.	" "	" "	$\Delta = 0.322^\circ$

Molekulargewicht. Ber. 238. Gef. I. 221, II. 198, III. 215.

Diglycyl-glycin, $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CO} \cdot \text{NHCH}_2\text{CO} \cdot \text{NHCH}_2\text{COOH}$.

I.	Prozentgehalt der Lösung	1.56,	$\Delta = 0.173^\circ$
II.	" "	" "	$\Delta = 0.335^\circ$

Molekulargewicht. Ber. 189. Gef. I. 171, II. 175.

Triglycyl-glycin, $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CO} \cdot (\text{NHCH}_2\text{CO})_2 \cdot \text{NHCH}_2\text{COOH}$.

I.	Prozentgehalt der Lösung	0.683,	$\Delta = 0.073^\circ$
II.	" "	" "	$\Delta = 0.081^\circ$

Molekulargewicht. Ber. 246. Gef. I. 178, II. 188.

Leucyl-diglycyl-glycin, $\text{C}_4\text{H}_9 \cdot \text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO} \cdot (\text{NHCH}_2\text{CO})_2 \cdot \text{NHCH}_2\text{COOH}$.

I.	Prozentgehalt der Lösung	1.75,	$\Delta = 0.130^\circ$
II.	" "	" "	$\Delta = 0.154^\circ$
III.	" "	" "	$\Delta = 0.168^\circ$

Molekulargewicht. Ber. 302. Gef. I. 256, II. 260, III. 253.

l-Alanyl-diglycyl-l-alanyl-glycyl-glycin²⁾,

$\text{NH}_2 \cdot \text{CH}(\text{CH}_3)\text{CO} \cdot (\text{NHCH}_2\text{CO})_2 \cdot \text{NHCH}(\text{CH}_3)\text{CO} \cdot \text{NHCH}_2\text{CO} \cdot \text{NHCH}_2\text{COOH}$.

Prozentgehalt der Lösung	2.00,	$\Delta = 0.104^\circ$
	1.97,	$\Delta = 0.114^\circ$

Molekulargewicht. Ber. 388. Gef. 366, 329.

Glycyl-d-valin anhydrid³⁾.

Prozentgehalt der Lösung 1.966, $\Delta = 0.271^\circ$.

Molekulargewicht: Ber. 156. Gef. 138.

¹⁾ Das bisher nur in amorphem Zustand bekannte Dipeptid wurde in jüngster Zeit von den Hrn. E. Abderhalden und B. Oppler im hiesigen Institut krystallisiert erhalten.

²⁾ E. Fischer, diese Berichte **39**, 2925 [1906].

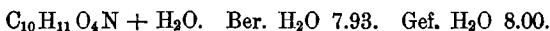
³⁾ Die Verbindung ist erst in jüngster Zeit von Hrn. H. Scheibler im hiesigen Institut hergestellt worden.

Formyl-*l*-tyrosin, CHO.NH.CH(CH₂.C₆H₄.OH).COOH.

Die Bereitung der Monoacylderivate des Tyrosins durch Einwirkung von Säurechloriden auf die alkalische Lösung der Aminosäuren bietet Schwierigkeiten, weil die Acylierung auch an der Phenolgruppe erfolgt. So entsteht bei Anwendung von Benzoylchlorid als Hauptprodukt Dibenzoyltyrosin¹⁾. Unter diesen Umständen ist die leichte Bereitung der Monoformylverbindung durch Kochen des Tyrosins mit Ameisensäure beachtenswert. Aus der Indifferenz des Produktes gegen verdünnte Säuren darf man schließen, daß das Formyl in die Aminogruppe übergetreten ist.

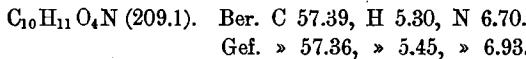
Entsprechend der Darstellung des Formylleucins²⁾ werden 5 g reines *l*-Tyrosin mit 25 ccm Ameisensäure von 98 % 3 Stunden auf dem Wasserbade erhitzt, wobei klare Lösung eintritt, dann die Flüssigkeit unter geringem Druck verdampft und der zurückbleibenden Sirup noch 2 Mal in der gleichen Weise mit 12 ccm Ameisensäure behandelt. Hierbei bleibt ein hellbrauner Sirup oder, wenn man längere Zeit wartet, eine hellgraue, krystallinische Masse. Zur Entfernung von wenig unverändertem Tyrosin verreibt man die feste Substanz mit der ungefähr dreifachen Menge ganz kalter *n*-Salzsäure, saugt scharf ab, wäscht mit wenig eiskaltem Wasser und krystallisiert den Rückstand aus etwa der vierfachen Menge heißem Wasser unter Zusatz von etwas Tierkohle, wobei es nötig ist, nach dem Erkalten ein paar Tropfen Salzsäure zuzufügen, um etwa entstandenes Tyrosin in Lösung zu halten. Die Ausbeute an reinem Präparat betrug 3.6 g oder 62 % der Theorie. Zur Analyse und optischen Bestimmung diente ein mehrmals aus heißem Wasser umgelöstes, ganz farbloses Präparat. Die lufttrockne Substanz enthält 1 Mol. Wasser.

0.2026 g Sbst. verloren bei 100° im Vakuum über Phosphorpentoxid 0.0162 g.



Die getrocknete Substanz gab folgende Zahlen:

0.1239 g Sbst.: 0.2606 g CO₂, 0.0604 g H₂O. — 0.1778 g Sbst.: 8.80 ccm $\frac{1}{10}\text{-n}$. H₂SO₄ (Kjeldahl).



Für die optische Bestimmung diente die alkoholische Lösung der getrockneten Substanz.

0.3649 g Sbst., Gesamtgewicht der Lösung 6.5123 g, d = 0.812. Drehung im 1-dcm-Rohr bei 20° und Natriumlicht 3.86° nach rechts. Mithin $[\alpha]_D^{20} = +84.8^\circ (\pm 0.4^\circ)$.

¹⁾ E. Fischer, diese Berichte **32**, 2454 [1899] und A. Schultze Ztschr. für physiolog. Chem. **29**, 467.

²⁾ Diese Berichte **38**, 3997 [1905].

Nach nochmaligem Umkristallisieren war das Drehungsvermögen nicht verändert.

0.3853 g Sbst., Gesamtgewicht der Lösung 7.1616 g, $d = 0.811$. Drehung im 2-dem-Rohr bei 20° und Natriumlicht 7.41° nach rechts. Mithin $[\alpha]_D^{20} = +84.9^\circ (\pm 0.2^\circ)$.

Die Übereinstimmung der beiden Werte spricht zwar für die optische Reinheit, ohne sie aber endgültig zu beweisen. In der Tat hat die Hydrolyse mit Salzsäure ein Tyrosin geliefert, das optisch etwas minderwertig war. Ob das allerdings von der ursprünglichen Unreinheit des Formylkörpers oder von einer Racemisierung bei der Hydrolyse herrührt, ist noch ungewiß.

Das Formyltyrosin löst sich nicht allein in heißem Wasser, sondern auch in kaltem Alkohol und Aceton leicht; viel schwerer wird es von Äther und äußerst schwer von Chloroform und Petroläther aufgenommen.

Aus heißem Wasser krystallisiert es meist in ziemlich dicken Prismen, einmal wurde es auch in vierseitigen Blättchen erhalten.

Sein Schmelzpunkt ist nicht ganz konstant. Das reinste, bei 100° getrocknete Präparat schmolz bei raschem Erhitzen unter Aufschäumen zwischen 171° und 174° (korrig.) zu einer gelben Flüssigkeit.

Bei diesen Versuchen bin ich von den HHrn. Dr. Walter Aschhausen und Dr. Hans Tappen unterstützt worden, wofür ich ihnen auch hier herzlichen Dank sage.

531. Emil Fischer und Karl Raske: Verwandlung des *l*-Serins in *d*-Alanin.

(Eingegangen am 10. August 1907.)

[Aus dem chemischen Institut der Universität Berlin.]

Nachdem die Darstellung der aktiven Serine und die Feststellung ihrer Konfiguration gelungen war, lag die Möglichkeit vor, durch ihre Verknüpfung mit dem aktiven Alanin dessen Konfiguration ebenfalls zu ermitteln. Leider zeigte sich der einfachste Weg, die Reduktion des Alanins mit Jodwasserstoffsäure, als nicht gangbar, weil bei der hohen Temperatur der Reaktion Racemisierung eintritt. Dagegen gelang es, aus dem inaktiven salzauren Serinmethylester durch Phosphorpentachlorid eine Substanz zu gewinnen, welche die Struktur



zu haben schien¹⁾.

¹⁾ E. Fischer und W. A. Jacobs, diese Berichte **40**, 1059 [1907].