

## Mittheilungen.

### 83. Emil Fischer: Untersuchungen über Aminosäuren, Polypeptide und Proteine<sup>1)</sup>.

[Vortrag, gehalten vor der Deutsch. chemisch. Gesellsch. am 6. Januar 1906.]

Meine Herren!

Da die Proteinstoffe bei allen chemischen Processen im lebenden Organismus auf die eine oder andere Weise betheiligt sind, so darf man von der Aufklärung ihrer Structur und ihrer Metamorphosen die wichtigsten Aufschlüsse für die biologische Chemie erwarten. Es ist deshalb kein Wunder, dass das Studium jener Stoffe, von dem die Chemiker sich seit länger als einem Menschenalter fast ganz zurückgezogen haben, weil sie lohnendere Arbeit in der Ausbildung der synthetischen Methoden oder dem Studium einfacherer natürlicher Verbindungen fanden, von den Physiologen in immer steigendem Maasse und mit unverkennbarem Erfolge gepflegt wurde. Trotzdem werden die Eingeweihten niemals daran gezweifelt haben, dass die organische Chemie, deren Wiege bei den Proteinen gestanden hat, sich ihnen schliesslich wieder zuwenden werde. Nur über den Zeitpunkt, wo ein Zusammenwirken von Biologie und Chemie erfolgreich sein werde, gingen und gehen noch heute die Ansichten auseinander.

Während vorsichtige Fachgenossen befürchten, dass eine rationelle Bearbeitung dieser Körperklasse durch ihre verwickelte Zusammensetzung und ihre höchst unbequemen physikalischen Eigenschaften heute noch auf unüberwindliche Schwierigkeiten stossen werde, neigen andere, optimistisch veranlagte Beobachter, zu denen ich mich zählen will, zu der Ansicht, dass man wenigstens den Versuch machen soll, mit allen Hilfsmitteln der Gegenwart die jungfräuliche Feste zu belagern; denn nur durch das Wagniss selbst kann die Grenze für die Leistungsfähigkeit unserer Methoden ermittelt werden. Der nüchternen Kritik wird man allerdings nicht das Recht verwehren können, die Aussicht auf den Erfolg zu discutiren, indem sie die jeweiligen Kenntnisse vergleicht mit dem, was zur Erreichung des Zieles nothwendig ist.

---

<sup>1)</sup> Zu meinem lebhaften Bedauern ist der Inhalt meines Vortrages von der Tagespresse vielfach mit phantastischen Uebertreibungen besprochen worden. Man wird aus dieser kritisch gehaltenen Abhandlung, über deren Rahmen ich beim Vortrag nicht hinausgegangen bin, die Ueberzeugung gewinnen, dass ich mich keiner Ueberschätzung der Resultate schuldig gemacht habe.

In Bezug auf Unterscheidung, Isolirung und biologische Characterisirung der zahlreichen natürlichen Proteine hat die physiologische Chemie Bemerkenswerthes geleistet. Wir kennen mehrere Dutzend scharf unterschiedene Glieder dieser Klasse, die sich nach Löslichkeit und Fällungsverhältnissen in Gruppen ordnen lassen und von denen manche im krystallisirten Zustand gewonnen werden konnten. Wir wissen ferner, dass die einzelnen Individuen Träger verschiedener biologischer Functionen sind. Wir wissen endlich, dass alle diese Körper unter dem Einfluss bestimmter Fermente tiefgreifende, charakteristische Zersetzungen erfahren.

Trotz alledem sind unsere Kenntnisse von ihrer chemischen Zusammensetzung recht gering. Sieht man ab von den Ergebnissen der Elementar-Analyse, so beschränken sie sich im wesentlichen auf die Resultate der Hydrolyse, die einerseits durch Säuren oder Alkalien und andererseits durch die Verdauungsfermente bewirkt werden kann. Ausser Ammoniak entstehen dadurch aus allen Proteinen nach und neben einander Albumosen, Peptone und schliesslich Aminosäuren. Ueber die Natur der beiden ersten Spaltproducte sind wir kaum besser unterrichtet als über die Proteine selbst.

Um so erfolgreicher ist das bisherige Studium der Aminosäuren gewesen; denn für viele hat man nicht allein die Structur feststellen, sondern auch die Synthese verwirklichen können. Auf dieser Basis wird deshalb die chemische Forschung weiter bauen müssen, die sich die Aufklärung und künstliche Reproduction der Peptone, Albumosen und Proteine zum Ziel gesetzt hat.

Von dieser Ueberzeugung durchdrungen, habe ich vor sechs Jahren, als ich den Entschluss fasste, mich dem Studium der Proteine zu widmen, mit den Aminosäuren begonnen, um aus ihrer besseren Kenntniss neue Gesichtspunkte und Methoden für ihre complicirteren Derivate zu gewinnen.

Der Erfolg hat meine Erwartungen nicht getäuscht. Zunächst gelang es durch Benutzung der Ester, eine neue Trennungsmethode für die Monoaminosäuren zu finden, die für die Hydrolyse der Proteine ein werthvolles Hülfsmittel geworden ist und nicht allein die Isolirung der bekannten Aminosäuren erleichtert, sondern auch die Auffindung von neuen Gliedern der Klasse ermöglicht hat.

Noch wichtiger scheinen mir die auf dem gleichen Wege gefundenen Methoden zur Umwandlung der Aminosäuren in ihre amidartigen Anhydride, für die ich den Sammelnamen »Polypeptide« gewählt habe. Die höheren Glieder dieser synthetischen Körperklasse sind in Bezug auf äussere Eigenschaften, gewisse Farbenreactionen, Verhalten gegen Säuren, Alkalien und Fermente, den natürlichen Peptonen so ähnlich,

dass man sie als ihre nächsten Verwandten betrachten kann, und dass ich ihre Gewinnung als den Beginn der Synthese der natürlichen Peptone und Albumosen bezeichnen möchte.

Da die weitere Verfolgung dieser Beobachtungen noch viele Jahre in Anspruch nehmen kann und andererseits das experimentelle Material schon jetzt einen erheblichen Umfang angenommen hat, so halte ich es für zweckmässig, zur leichteren Orientirung einen Auszug daraus zu geben, der alle Publicationen bis zum Ende 1905 umfasst. Ich werde mich dabei auf meine eigenen Untersuchungen und die damit im engen Zusammenhange stehenden Arbeiten im hiesigen Institut beschränken und fremde Versuche nur soweit berücksichtigen, als sie mir besonders wichtig oder historisch interessant erscheinen.

## I. Aminosäuren.

Indem ich ihre Geschichte als bekannt voraussetze, will ich nur erwähnen, dass bei Beginn meiner Versuche 9 Monoaminosäuren, 3 Diaminosäuren und das schwefelhaltige Cystin als Spaltproducte von Proteinen bekannt waren.

### Synthese der Monoaminosäuren.

Die Synthese war bereits realisiert bei den 8 Monoaminosäuren: Glykocoll, Alanin,  $\alpha$ -Aminovaleriansäure, Leucin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Phenylalanin und Tyrosin, soweit es sich um die Racemkörper handelt.

Von den Methoden, die dazu benutzt wurden und die man in den Lehrbüchern der organischen Chemie zusammengestellt findet, sind zwei durch allgemeine Gültigkeit und praktische Brauchbarkeit ausgezeichnet: einerseits die Wechselwirkung zwischen Ammoniak und den  $\alpha$ -Halogenfettsäuren und andererseits die von Strecker herrührende Cyanhydrinmethode, d. h. Vereinigung eines Aldehyds mit Blausäure und Ammoniak und nachfolgende Verseifung des Amino-cyanhydrins

Ich habe beide wiederholt angewendet, um bekannte oder neue Aminosäuren zu gewinnen, und habe auch die erste Methode erweitert durch eine neue Darstellung der dafür erforderlichen  $\alpha$ -Halogenfettsäuren. Sie besteht darin, die Monoalkylmalonsäure von der allgemeinen Formel  $R \cdot CH[COOH]_2$  zu bromiren und die dabei fast quantitativ entstehenden Bromproducte von der Formel  $R \cdot CBr(COOH)_2$  durch Erhitzen in Bromfettsäuren zu verwandeln. Auf diese Art lässt sich z. B. die Isobutylmalonsäure mit guter Ausbeute in Leucin<sup>1)</sup> über-

<sup>1)</sup> E. Fischer u. W. Schmitz, diese Berichte 39, 351 [1906].

führen. Praktische Bedeutung hat das Verfahren gewonnen für die Bereitung des Phenyl-alanins<sup>1)</sup>, die meiner Ansicht nach bequemer ist, als die Synthese von Erlenmeyer jun.

Entdeckt wurde mit seiner Hülfe die bisher unbekannte  $\gamma$ -Phenyl- $\alpha$ -aminobuttersäure<sup>2)</sup>, und ich kann es für alle diejenigen Fälle empfehlen, wo die betreffende Malonsäure leicht zu bereiten ist. Seine Verwendung für die Synthese der Diaminosäuren wird später besprochen werden.

### Spaltung in die optischen Isomeren.

Mit Ausnahme des Glykocolls enthalten sämtliche Aminosäuren, die aus den Proteinen entstehen, ein asymmetrisches Kohlenstoffatom, und sind deshalb, soweit sie in der Natur vorkommen, optisch-activ.

Im Gegensatz dazu liefert die Synthese die Racemform, und es bedarf noch besonderer Operationen, um aus ihr die optisch-activen Componenten zu isoliren. Die letzte Aufgabe war nur in vereinzelt Fällen gelöst, am frühesten bei der Asparaginsäure; denn ihr Amid, das Asparagin, kann durch blosse Krystallisation des Racemkörpers aus Wasser in die beiden optischen Antipoden gespalten werden.

Unvollkommener waren die Resultate, welche E. Schulze und Bosshard<sup>3)</sup> bei dem racemischen Leucin und der racemischen Glutaminsäure, oder Engel bei der racemischen Asparaginsäure durch partielle Vergärung erzielten; denn sie konnten so nur die optischen Antipoden der in der Natur gewöhnlich vorkommenden Aminosäuren erhalten.

Ich habe deshalb eine neue Spaltungsmethode der Aminosäuren ausgearbeitet, welche darauf beruht, ihre Benzoylverbindungen, welche starke Säuren sind, mit optisch-activen Basen zu verbinden und die beiden isomeren Salze durch Krystallisation zu trennen. Die activen Benzoylverbindungen liefern dann bei der Hydrolyse die entsprechenden activen Aminosäuren.

Auf diese Weise gelang es mir, das Alanin<sup>4)</sup>, die  $\alpha$ -Aminobuttersäure<sup>5)</sup>, das Leucin<sup>6)</sup>, die  $\alpha$ -Amino-*n*-capronsäure<sup>7)</sup>, das Phenylalanin<sup>8)</sup>, das Tyrosin<sup>9)</sup>, die Asparaginsäure<sup>10)</sup> und die Glutamin-

1) Diese Berichte 37, 3062 [1904].

2) E. Fischer und W. Schmitz, diese Berichte 39, 351 [1906].

3) Zeitschr. für physiolog. Chem. 10, 138 [1886].

4) Diese Berichte 32, 2454 [1899].      5) Diese Berichte 33, 2390 [1900].

6) Diese Berichte 33, 2370 [1900].

7) E. Fischer und R. Hagenbach, diese Berichte 34, 3764 [1901].

8) Diese Berichte 33, 2383 [1900].      9) Diese Berichte 32, 3638 [1899].

10) Diese Berichte 32, 2460 [1899].

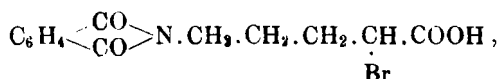
säure<sup>1)</sup> in die optischen Componenten zu spalten und dadurch auch die Synthese der natürlichen optisch-activen Formen zu verwirklichen.

An Stelle der Benzoylverbindungen lassen sich auch andere Acylderivate, z. B. die Formylkörper<sup>2)</sup>, für den gleichen Zweck verwenden, und diese bieten noch den besonderen Vortheil, dass die Rückverwandlung in Aminosäuren schneller und leichter von statten geht, und in Folge dessen die Gefahr der Racemisirung vermindert wird.

### Synthese der Diaminosäuren.

Im Gegensatz zu den Monoaminosäuren sind diese Körper der künstlichen Herstellung recht schwer zugänglich. Zwar gelang die Darstellung des Anfangsgliedes, der Diaminopropionsäure, aus  $\alpha, \beta$ -Dibrompropionsäure und Ammoniak verhältnissmäßig leicht<sup>3)</sup>; dagegen fehlte es an Methoden, die homologen Substanzen, in denen die Aminogruppen weiter von einander entfernt sind, zu gewinnen. Selbst wenn die entsprechenden Bromverbindungen bekannt sind, kann die Verwandlung in Diaminosäuren missglücken, wie die Beobachtungen von Willstätter zuerst gezeigt haben, der aus  $\alpha, \delta$ -Dibromvaleriansäure beziehungsweise dem entsprechenden Dibrompropylmalonester durch Ammoniak an Stelle der erwarteten Diaminosäure die  $\alpha$ -Pyrrolidincarbonensäure gewann<sup>4)</sup>.

Bessere Resultate erhielt ich<sup>5)</sup> durch eine Modification der schönen Synthese, welche S. Gabriel mit Hülfe des Phtalimids ausgeführt hat. So diente für die Synthese der  $\alpha, \delta$ -Diamino-valeriansäure der von Gabriel beschriebene Phtalimidopropyl-malonsäureester als Ausgangsmaterial. Er nimmt in der Malongruppe leicht ein Bromatom auf. Durch Verseifung und Abspaltung von Kohlensäure erhält man weiter die Phtalimido-brom-valeriansäure,



und daraus entsteht endlich durch Ammoniak und nachträgliche Abspaltung der Phtalylgruppe die  $\alpha, \delta$ -Diamino-valeriansäure. Diese konnte als die racemische Form des natürlichen Ornithins gekennzeichnet werden, denn sie lieferte ein Benzoylderivat, das sich nur durch die optische Inactivität von der durch Jaffé entdeckten Ornithursäure unterscheidet. Den nahe liegenden Gedanken, die synthetische Benzoylverbindung nach der oben beschriebenen allgemeinen

<sup>1)</sup> Diese Berichte 32, 2464 [1899].

<sup>2)</sup> E. Fischer und O. Warburg, diese Berichte 38, 3997 [1905].

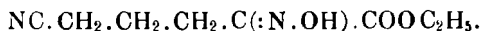
<sup>3)</sup> Klebs, Zeitschr. für physiolog. Chem. 19, 301 [1894].

<sup>4)</sup> Diese Berichte 33, 1160 [1900].

<sup>5)</sup> Diese Berichte 34, 454 [1901].

Methode in die optischen Componenten zu spalten, habe ich leider wegen Mangel an Material nicht ausführen können; er ist aber einige Jahre später von Sørensen<sup>1)</sup> mit Erfolg aufgenommen worden. Damit ist die Synthese des natürlichen Ornithins und auch des natürlichen Arginins vollständig durchgeführt; denn das Letztere entsteht, nach den Beobachtungen von E. Schulze und Winterstein<sup>2)</sup>, durch Addition von Cyanamid an Ornithin.

Auf dieselbe Art wie die  $\alpha, \delta$ -Diamino-valeriansäure erhielt ich aus dem Phtalimidoäthyl-malonsäureester die  $\alpha, \gamma$ -Diamino-buttersäure<sup>3)</sup>, und man kann mit ziemlich grosser Sicherheit voraussagen, dass der von Gabriel und Maass dargestellte Phtalimidobutyl-malonsäureester bei der gleichen Behandlung die  $\alpha, \epsilon$ -Diamino-capronsäure (inactives Lysin) liefern wird. Den letzteren Versuch habe ich nicht ausgeführt, weil es mir in Gemeinschaft mit F. Weigert<sup>4)</sup> inzwischen gelungen war, ein viel bequemerer Verfahren für die Synthese dieser Diaminosäure zu finden. Es beruht auf der Wechselwirkung, welche der schon von Blank nach der Methode Gabriel's dargestellte  $\gamma$ -Cyanpropyl-malouester,  $\text{NC} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}(\text{COOC}_2\text{H}_5)_2$ , durch salpetrige Säure erfährt. Unter Austritt von einem Carboxäthyl entsteht dabei der  $\alpha$ -Oximido- $\delta$ -cyan-valeriansäureäthylester:



Wird diese Verbindung mit Alkohol und Natrium reducirt, so bildet sich in verhältnissmässig glatter Weise  $\alpha, \epsilon$ -Diamino-capronsäure,  $\text{H}_2\text{N} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}(\text{NH}_2) \cdot \text{COOH}$ , die sich als identisch mit dem racemisirten Lysin erwiesen hat.

Für die völlige Synthese des natürlichen activen Lysins bleibt nur noch die Spaltung des Racemkörpers auszuführen, die aller Wahrscheinlichkeit nach auch nach meiner Methode mit Benutzung der Benzoyl- oder Formyl-Verbindung gelingen wird.

Einige Jahre nach meinen Publicationen hat S. P. L. Sørensen<sup>5)</sup> eine neue Synthese des Ornithins und Lysins beschrieben, die grosse Aehnlichkeit mit meiner Methode hat. Er führt nämlich zuerst die Phtalimidogruppe in den Malonsäureester ein, lässt auf diese Verbindung Natriumalkylat und  $\gamma$ -Brompropyl-phtalimid beziehungsweise  $\gamma$ -Chlorbutyronitril einwirken und reducirt die letztere Substanz mit Alkohol und Natrium. Durch nachträgliche Abspaltung der Estergruppen, der Phtalylgruppen und eines Carboxyls gewinnt er dann schliesslich die Diaminosäure. Für die Bereitung des inactiven Or-

<sup>1)</sup> Compt. rend. d. trav. d. Laborat. Carlsberg VI.

<sup>2)</sup> Diese Berichte 32, 3191 [1899].

<sup>3)</sup> Diese Berichte 34, 2900 [1901].

<sup>4)</sup> Diese Berichte 35, 3772 [1902].

<sup>5)</sup> a. a. O.

nithins scheint sein Verfahren mit dem meinigen gleichwerthig zu sein. Bei der Darstellung des inactiven Lysins lässt aber die Ausbeute zu wünschen übrig, und deshalb ist hier sicherlich das Verfahren von Weigert und mir als bequemer und billiger vorzuziehen. Wir haben darnach ziemlich grosse Mengen (über 100 g) von inactivem Lysinikrat hergestellt, und dieses Material hat dann später Suzuki und mir für die Synthese von Lysyl-lysin und Lysin-anhydrid gedient<sup>1)</sup>.

Die dritte neue Methode zur Gewinnung von Diaminosäuren beruht auf der Wechselwirkung zwischen Ammoniak und den doppelt ungesättigten Säuren. So entsteht aus der Sorbinsäure beim Erhitzen mit starkem, wässrigem Ammoniak auf 150° eine neue Diaminocaprinsäure<sup>2)</sup>, die mit dem inactiven Lysin isomer ist, deren Structur aber noch nicht sicher festgestellt wurde. Sie ist ausgezeichnet durch die Neigung, bei höherer Temperatur unter Verlust von Ammoniak und Wasser in das Anhydrid einer Aminohexensäure von der Formel  $C_6H_9ON$  überzugehen.

Auf dieselbe Art entsteht aus der  $\beta$ -Vinyl-acrylsäure eine neue Diamino-valeriansäure<sup>3)</sup>, die gleichfalls, wenn auch weniger leicht, bei der Destillation in das Anhydrid einer Aminopentensäure übergeht.

#### Synthese der Oxyaminosäuren.

Nachdem das von Cramer<sup>4)</sup> entdeckte Serin als regelmässiges Spaltproduct der Proteine erkannt war<sup>5)</sup>, und nachdem auch noch andere Oxyaminosäuren, wie die Oxypyrrolidin-carbonsäure, bei der Hydrolyse einzelner Proteine aufgefunden waren<sup>6)</sup>, lag der Gedanke nahe, eine Synthese für derartige Producte zu suchen; denn die Methoden, die zur künstlichen Herstellung des Tyrosins gedient hatten, konnten für die aliphatischen Verbindungen nicht in Betracht kommen. Gleichzeitig schien eine neue Untersuchung über die Structur des Serins und sein Verhältniss zu dem künstlich gewonnenen Isoserin nöthig.

Diese Aufgabe wurde gelöst durch die Versuche von H. Leuchs und mir, welche in der Abhandlung »Synthese des Serins, der *l*-Glucosaminsäure und anderer Oxyaminosäuren«<sup>7)</sup> beschrieben sind.

<sup>1)</sup> Diese Berichte 38, 4181 [1905].

<sup>2)</sup> E. Fischer und F. Schlotterbeck, diese Berichte 37, 2357 [1904].

<sup>3)</sup> E. Fischer und K. Raske, diese Berichte 38, 3607 [1905].

<sup>4)</sup> Journ. für prakt. Chem. [1] 96, 76 [1865].

<sup>5)</sup> Zeitschr. für physiolog. Chem. 35, 222 [1902]; 36, 473 [1902]; 39, 156 [1903].

<sup>6)</sup> Diese Berichte 35, 2660 [1902].

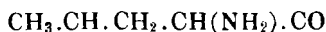
<sup>7)</sup> Diese Berichte 35, 3787 [1904].

Es gelang uns nämlich, die Strecker'sche Methode auf die Oxyaldehyde anzuwenden. Aus Glykolaldehyd wurde das Serin gewonnen. Als Zwischenproduct entsteht dabei aller Wahrscheinlichkeit nach das Amino-cyanhydrin,  $\text{CH}_2(\text{OH})\cdot\text{CH}(\text{NH}_2)\cdot\text{CN}$ , das aber nicht isolirt wurde. Für das Serin ergab sich aus dieser ersten Synthese die schon früher gebrauchte, aber keineswegs bewiesene Structurformel  $\text{CH}_2(\text{OH})\cdot\text{CH}(\text{NH}_2)\cdot\text{COOH}$ , die überdies noch durch die Reduction des Serins mit Jodwasserstoff zum  $\alpha$ -Alanin bestätigt werden konnte. Da das Isoserin bei gleicher Reduction  $\beta$ -Alanin lieferte, so war auch seine Structur endgültig festgelegt.

Etwas später hat E. Erlenmeyer jun. eine andere Synthese des Serins beschrieben<sup>1)</sup>, die zu demselben Schlusse bezüglich der Structur führt.

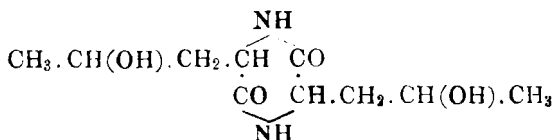
Eine dritte, noch nicht publicirte Synthese, die nur eine Modification der ersten ist, wurde in jüngster Zeit von H. Leuchs und W. Geiger im hiesigen Institut aufgefunden und ist im Gegensatz zu den beiden ersten Methoden für die praktische Darstellung des Serins zu empfehlen.

Viel leichter als der Glykolaldehyd lässt sich das Aldol nach der Cyanhydrin-Methode in die entsprechende  $\alpha$ -Amino- $\gamma$ -oxyvaleriansäure,  $\text{CH}_3\cdot\text{CH}(\text{OH})\cdot\text{CH}_2\cdot\text{CH}(\text{NH}_2)\cdot\text{CO}_2\text{H}$ , verwandeln; diese ist ebenso wie die gewöhnlichen  $\gamma$ -Oxysäuren durch die Neigung zur Anhydridbildung ausgezeichnet, denn sie verwandelt sich schon bei der Behandlung mit Alkohol und Salzsäure in das Hydrochlorat einer Base  $\text{C}_5\text{H}_9\text{O}_2\text{N}$ , die wir als das Lacton:



O

auffassten. Letzteres zeigt eine merkwürdige Polymerisation; es geht schon bei gewöhnlicher Temperatur in eine feste Substanz über, welche die gleiche empirische Zusammensetzung, aber das doppelte Molekulargewicht hat, und die wir glaubten als das Diketopiperazin:



betrachten zu müssen.

Endlich konnten wir die synthetische Methode auch auf die Zuckerarten anwenden. Am leichtesten war der Versuch bei der

<sup>1)</sup> Diese Berichte 35, 3769 [1904].



Galactose, weil die hier in ziemlich guter Ausbeute entstehende Galahptosaminsäure,  $\text{CH}_2(\text{OH})\cdot[\text{CH}\cdot\text{OH}]_4\cdot\text{CH}(\text{NH}_2)\cdot\text{COOH}$ , wegen ihrer geringen Löslichkeit in Wasser bequem zu isoliren ist.

Ungleich interessanter aber war das Resultat bei der *l*- und *d*-Arabinose; denn hier resultiren die *l*- und die *d*-Glucosaminsäuren  $\text{CH}_2(\text{OH})\cdot[\text{CH}\cdot\text{OH}]_3\cdot\text{CH}(\text{NH}_2)\cdot\text{COOH}$ , von denen die *d*-Verbindung sich identisch mit dem Oxydationsproduct des Glucosamins zeigte. Da umgekehrt die Glucosaminsäuren sich wieder zum Zuckerderivat reduciren liessen, so war damit die totale Synthese des physiologisch so wichtigen Glucosamins verwirklicht und gleichzeitig seine Constitution endgültig festgestellt.

Es ist kaum zu bezweifeln, dass man mit Hilfe dieser Methode noch zahlreiche glucosaminähnliche Derivate der Zuckerarten gewinnen kann, und ich halte diese Versuche keineswegs für überflüssig, da aller Wahrscheinlichkeit nach solche Producte in grösserer Zahl in der Natur zu finden sind.

Eine ganz andere Methode zur Synthese der aliphatischen Oxyaminosäuren hat kürzlich Sörensen<sup>1)</sup> gefunden. Sie schliesst sich auf's engste an seine Synthese der Diaminosäuren an. So gelang es ihm, aus dem  $\gamma$ -Brompropyl-phtalimidomalonester die  $\delta$ -Oxy- $\alpha$ -aminovaleriansäure zu gewinnen, die mit der oben erwähnten, aus Aldol entstehenden Verbindung isomer ist. Ich werde später auf diese interessante Substanz zurückkommen.

Schliesslich erwähne ich noch die Synthese von zwei Oxypyrrolidincarbonensäuren, welche H. Leuchs<sup>2)</sup> im hiesigen Institut ausgeführt hat und bei der ebenfalls ein Malonester-Derivat als Ausgangsmaterial diente.

#### Derivate der Aminosäuren.

Um neue Methoden für die Isolirung, Erkennung, Reinigung, Trennung und Condensation der Aminosäuren zu gewinnen, habe ich eine Reihe von Derivaten studiren müssen, über deren Darstellung Eigenschaften und Benutzung folgende allgemeine Bemerkungen orientiren sollen.

#### Acylverbindungen.

Am bekanntesten sind die Benzoylverbindungen der Aminosäuren, an deren Spitze die Hippursäure steht. Sie lässt sich synthetisch recht gut durch Schütteln einer alkalischen Lösung von Glykocoll mit Benzoylchlorid bereiten. Aber dieses einfache Verfahren giebt schlechte Resultate bei den kohlenstoffreicheren Aminosäuren. Ich habe es des-

<sup>1)</sup> a. a. O.

<sup>2)</sup> Diese Berichte 38, 1937 [1905].

halb modificirt durch Anwendung von Natriumbicarbonat an Stelle von Natronlauge und mit dieser Abänderung nicht allein für die gewöhnlichen Aminosäuren — Alanin, Leucin,  $\alpha$ -Aminobuttersäure,  $\alpha$ -Amino-*n*-capronsäure —, sondern auch für die Asparagin- und Glutamin-Säure recht gute Resultate erhalten<sup>1)</sup>. Dass diese Benzoylverbindungen für die Spaltung der racemischen Aminosäuren in die optischen Componenten verwendet wurden, ist bereits erwähnt. Man kann sie auch in einzelnen Fällen zur Charakterisirung der Aminosäuren benutzen.

Noch leichter als die Benzoylverbindungen lassen sich die Formylderivate<sup>2)</sup> bereiten, denn sie entstehen in guter Ausbeute beim blossen Kochen der Aminosäuren mit trockner Ameisensäure.

Auch sie sind für die Spaltung in die optischen Componenten geeignet, wie an dem Beispiel des Formylleucins gezeigt wurde, und sie bieten den besonderen Vortheil, dass sie sich recht leicht durch Säuren oder Alkalien in die Aminosäuren zurückverwandeln lassen. In Folge dessen ist die Gefahr der partiellen Racemisirung bei ihnen geringer, als bei den Benzoylkörpern.

Weniger wichtig sind die Acetylverbindungen. Von ihnen kennt man nur die zuerst von Kraut und Hartmann beschriebene Aceturssäure, die Th. Curtius<sup>3)</sup> später durch Kochen von Glykocoll mit Essigsäureanhydrid erhielt, und das racemische Acetyl-leucin, das ich aus Leucinester und Essigsäureanhydrid gewann<sup>4)</sup>. Zum Unterschied von der Formylverbindung bildet letzteres mit den Alkaloïden keine gut krystallisirenden Salze.

Noch leichter als die Benzoylderivate lassen sich die Verbindungen der Aminosäuren mit der Benzolsulfosäure darstellen, indem man deren Chlorid mit ihrer alkalischen Lösung schüttelt<sup>5)</sup>. Besonders fällt hier die Schwierigkeit fort, das Benzolsulfoderivat von der gleichzeitig gebildeten Benzolsulfosäure zu trennen, da diese in Wasser sehr leicht löslich ist. In einzelnen Fällen, wie beim Leucin oder der  $\alpha$ -Amino-buttersäure, können diese Benzolsulfoverbindungen wegen ihrer schönen Eigenschaften zur Kennzeichnung der Aminosäure benutzt werden.

Wichtiger für diesen Zweck sind aber die gleichen Derivate der  $\beta$ -Naphtalinsulfosäure<sup>6)</sup>, weil sie in Wasser sich sehr schwer lösen. Man kann in Folge dessen mit ihrer Hülfe die Aminosäuren aus sehr

<sup>1)</sup> Diese Berichte 32, 2453 [1899].

<sup>2)</sup> E. Fischer und O. Warburg, diese Berichte 38, 3997 [1905].

<sup>3)</sup> Diese Berichte 16, 757 [1883].

<sup>4)</sup> Diese Berichte 34, 449 [1901].      <sup>5)</sup> Diese Berichte 33, 2380 [1900].

<sup>6)</sup> E. Fischer und P. Bergell, diese Berichte 35, 3779 [1902].

verdünnten und stark verunreinigten Lösungen isoliren, und das Verfahren ist nicht auf die einfachen Aminosäuren beschränkt, sondern giebt auch noch bei den Oxyaminosäuren, z. B. Serin und Oxyprolin, oder bei manchen Polypeptiden, z. B. Glycylglycin, und Alaurylglycin, gute Resultate.

In Folge dessen ist es bereits wiederholt von den Physiologen zum Nachweis der Aminosäuren im Harn oder anderen thierischen Secreten benutzt worden.

An Stelle der Naphtalinsulfosäure hat später Siegfried die 4-Nitrotoluol-2-sulfosäure<sup>1)</sup> empfohlen. Dass sie besondere Vortheile vor der  $\beta$ -Naphtalinsulfosäure haben soll, ist mir recht zweifelhaft. Ich will aber die Möglichkeit zugeben, dass in einzelnen Fällen, wo die  $\beta$ -Naphtalinsulfoderivate schlecht krystallisiren, ein solcher Ersatz nützlich sein kann. Selbstverständlich wird man dann aber auch unter der grossen Zahl von Sulfosäuren noch eine weitere Auswahl treffen können.

Leider ist das Säure-Radical in allen diesen Verbindungen recht fest gebunden, sodass sie der Hydrolyse noch grösseren Widerstand leisten, als die Benzoylkörper.

#### Phenylisocyanat-Verbindungen.

Nach der Beobachtung von Paal<sup>2)</sup> verbinden sich die Aminosäuren in alkalischer Lösung mit Phenylisocyanat zu den sogenannten Phenylureidosäuren. Aus dem Glykocoll entsteht z. B. die Phenylureido-essigsäure. Ich habe solche Verbindungen aus einer grösseren Anzahl von Aminosäuren dargestellt und auf ihre schönen Eigenschaften hingewiesen<sup>3)</sup>. Etwas später hat dann A. Mouneyrat<sup>4)</sup> im hiesigen Institut gefunden, dass diese Verbindungen beim Eindampfen mit Salzsäure sehr leicht in ihre Anhydride, Derivate des Hydantoins, übergehen, die ebenfalls schön krystallisiren und schärfere Schmelzpunkte als die ursprünglichen Ureidosäuren haben. C. Neuberg und A. Manasse<sup>5)</sup> haben endlich die  $\alpha$ -Naphtylisocyanat-Verbindungen für den gleichen Zweck empfohlen.

#### Ester.

Da sie bei meinen Arbeiten eine besonders wichtige Rolle gespielt haben und deshalb im Nachfolgenden sehr häufig erwähnt werden müssen, so mag wohl ein historischer Rückblick auf ihre Entdeckung und Verwerthung am Platze sein.

<sup>1)</sup> Zeitschr. für physiolog. Chem. 43, 68 [1904].

<sup>2)</sup> Diese Berichte 27, 974 [1894].

<sup>3)</sup> Diese Berichte 33, 2381, 2386 [1900].

<sup>4)</sup> Diese Berichte 33, 2393 [1900].    <sup>5)</sup> Diese Berichte 38, 2359 [1905].

Die ersten bestimmten Angaben über Salze des Glykocoll-Methyl- und -Aethyl-Esters rühren von Kraut<sup>1)</sup> her, welcher die Natur der durch Einwirkung von Jodalkyl und Alkohol auf Glykocoll schon von G. v. Schilling gewonnenen Producte richtig erkannte. Ihre Untersuchung blieb aber sehr lückenhaft, bis Theodor Curtius<sup>2)</sup> sich mit ihnen beschäftigte. Er zeigte, dass diese Verbindungen ausserordentlich leicht durch Einwirkung von Aethyl- oder Methyl-Alkohol und gasförmiger Salzsäure auf Glykocoll entstehen, und ferner, dass man aus den schön krystallisirenden Hydrochloraten durch Silberoxyd in ätherischer Lösung die freien Ester isoliren kann, dass diese unzersetzt destilliren und stark basische Flüssigkeiten von grosser Reactionsfähigkeit sind. Er wandte das gleiche Verfahren auf das Alanin, Leucin, Tyrosin und die Asparaginsäure an, begnügte sich aber hier mit der Isolirung der Hydrochlorate, denn sie haben ihm bekanntlich als Material für seine ausgedehnten und erfolgreichen Studien über aliphatische Diazverbindungen gedient.

Abgesehen von der Wirkung der salpetrigen Säure hat Curtius noch zwei Umwandlungen des Glykocoll-äthylesters untersucht. Die eine findet in wässriger Lösung statt und führt zum Glycinanhydrid oder Diketopiperazin, die andere erfolgt beim blossen Stehen des Esters und liefert die sogenannte Biuretbase, von der unten noch die Rede sein wird.

Die späteren Beobachtungen von Tafel, Lilienfeld, Röhmann Weidel und Roithner über Salze anderer Aminosäuren haben nichts principiell Neues ergeben. Meine eigenen Beobachtungen knüpfen deshalb an die Arbeiten von Curtius an.

In der Ueberzeugung, dass diese Stoffe wegen der Fähigkeit zu destilliren, für die Reinigung und Trennung der Aminosäuren brauchbar sein würden, habe ich mich zunächst bemüht, ein bequemeres Verfahren für die Bereitung der freien Ester aus ihren Salzen zu finden. Das gelang auf Grund der Beobachtung, dass die Ester bei niedriger Temperatur von Alkali verhältnissmässig langsam angegriffen werden. Man kann sie deshalb aus der concentrirten wässrigen Lösung der Salze bei guter Abkühlung durch concentrirtes Alkali in Freiheit setzen und mit Aether extrahiren. Diese Operation giebt allerdings bei den in Wasser sehr leicht löslichen Estern des Glykocolls, Alanins und der Asparaginsäure nur dann gute Resultate, wenn man gleichzeitig die wässrige Flüssigkeit mit Kaliumcarbonat sättigt.

<sup>1)</sup> Ann. d. Chem. 177, 267 [1875]; 182, 172 [1876].

<sup>2)</sup> Diese Berichte 16, 753 [1883]; 17, 953 [1884]; ferner Curtius und Goebel, Journ. für prakt. Chem. [2] 37, 150 [1888].

Mit Hilfe des Verfahrens lassen sich die Ester von Glykocoll, Alanin, Aminovaleriansäure, Leucin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Asparagin- und Glutamin-Säure verhältnissmässig leicht isoliren. Verluste sind allerdings unvermeidlich, da trotz der niederen Temperatur stets eine partielle Verseifung des Esters erfolgt.

Ganz unbrauchbar aber ist diese Methode beim Tyrosinester, der wegen der Phenolgruppe sich mit Alkali verbindet, und bei den Estern der Diaminosäuren. Hier gelangt man am besten zum Ziel, wenn man die salzsauren Salze, die keineswegs rein zu sein brauchen, sondern als rohe Syrupe zur Anwendung kommen können, in trockenem Methyl- oder Aethyl-Alkohol löst, dann maassanalytisch in einer kleinen Probe den Chlorgehalt bestimmt und nun die Hauptmenge mit der für das Chlor berechneten Menge von Natriummethylat versetzt<sup>1)</sup>. Beim vorsichtigen Verdampfen der Flüssigkeit bleiben die Ester nebst Kochsalz zurück und können von diesem durch ein geeignetes Lösungsmittel, Aether, Essigester, Aceton etc., getrennt werden.

Für die Gewinnung des Tyrosinesters kann man auch das Hydrochlorat in wässriger Lösung mit Kaliumcarbonat zersetzen und die Flüssigkeit mit Essigester ausschütteln.

Nach diesem Verfahren sind ausser den bereits bekannten Glykocollverbindungen die Aethylester des racemischen und des *d*-Alanins, der  $\alpha$ -Aminobuttersäure, des *dl*- und *l*-Leucins, der  $\alpha$ -Amino-*n*-capronsäure, des *dl*-Phenylalanins, des *l*-Tyrosins, des Sarkosins, der Asparaginsäure und der Glutaminsäure im reinen Zustande gewonnen worden<sup>2)</sup>. Von ihnen ist nur der Tyrosinester bei gewöhnlicher Temperatur krystallisirt. Ebenfalls im freien Zustand isolirt, aber nicht analysirt, sind die Ester der *dl*-Diamino-propionsäure, des *dl*-Lysins, des Arginins, des Histidins, des *dl*-Isoserins und des *dl*-Serins<sup>3)</sup>; sie bilden leicht lösliche, stark alkalisch reagirende Flüssigkeiten.

Im unreinen Zustande habe ich auch den Aethylester des activen Prolins in Händen gehabt. Misslungen ist die Veresterung bei der  $\alpha$ -Amino- $\gamma$ -oxyvaleriansäure<sup>4)</sup> und der Glucosaminsäure<sup>5)</sup>, weil hier durch die Wirkung des Alkohols und der Salzsäure Lactone entstehen, vielleicht als Umwandlungsproducte von intermediär gebildeten Estern.

Die Salze der Ester mit Mineralsäuren sind in der Regel in Wasser leicht löslich, krystallisiren aber manchmal, insbesondere aus der alkoholischen Lösung, recht schön. Verhältnissmässig schwer löslich in Wasser sind die Pikrate, die deshalb in vereinzelt Fällen

<sup>1)</sup> E. Fischer und U. Suzuki, diese Berichte 38, 4176 [1905].

<sup>2)</sup> Diese Berichte 34, 433 [1901].      <sup>3)</sup> Diese Berichte 38, 4173 [1905].

<sup>4)</sup> E. Fischer und H. Leuchs, diese Berichte 35, 3800 [1902].

<sup>5)</sup> Diese Berichte 36, 28 [1903].

zur Abscheidung und Identificirung benutzt werden können. Hinderlich ist nur die grosse Neigung dieser Ester, mit Wasser, zumal in der Wärme, zu reagiren und die Aminosäuren zurückzubilden.

Im Gegensatz zu den Aminosäuren sind die Ester ausschliesslich Basen und zeigen deshalb in ihren Reactionen die grösste Aehnlichkeit mit den gewöhnlichen primären Aminen. Ich habe das speciell für den Glykocollester gezeigt, der sich leicht mit Säurechloriden, Säureanhydriden, mit Halogenalkylen, Isocyanaten, Senfölen, Aldehyden, Ketonen, Schwefelkohlenstoff und Phosgen vereinigt. Genauer untersucht wurden seine Verbindungen mit Acetessigester, Acetyl-aceton, Acetyl-aceton, Phenylsenföl, Phosgen und Schwefelkohlenstoff<sup>1)</sup>.

Eine besonders interessante Reaction der Ester ist ihre Verwandlung in Diketopiperazine, die zuerst von Curtius bei dem Glykocollester beobachtet wurde. Sie findet hier in concentrirter wässriger Lösung bei gewöhnlicher Temperatur statt. Anders verhalten sich die Homologen. Sie werden durch kaltes Wasser, allerdings recht langsam, in der Hauptmenge verseift und in Aminosäuren verwandelt. Lässt man sie aber in reinem Zustand stehen, so verwandeln sie sich im Laufe von Wochen oder Monaten partiell in das Diketopiperazin. Sehr viel rascher erfolgt diese Reaction beim Erhitzen auf 160—180°, und ich habe darauf eine ebenso bequeme wie ergiebige Methode zur Darstellung der Diketopiperazine von Alanin,  $\alpha$ -Aminobuttersäure, Leucin,  $\alpha$ -Amino-*n*-capronsäure, Phenylalanin, und Tyrosin gegründet<sup>2)</sup>. Etwas schwieriger ist die Reaction bei dem Asparaginsäure-diäthylester zu leiten. Sie gelingt hier am besten beim längeren Kochen unter 15 mm Druck bei Gegenwart von wenig Zinkchlorid, liefert aber selbst dann nur 15 pCt. der theoretischen Ausbeute<sup>3)</sup>.

Es verdient hervorgehoben zu werden, dass die Methylester die Umwandlung in Diketopiperazine viel leichter erfahren, als die Aethylverbindungen<sup>4)</sup>.

Bei der Glutaminsäure ist bisher der Vorgang nicht beobachtet worden, weil ihr Ester zu grosse Neigung hat, in den Ester der Pyrrolidincarbonsäure überzugehen.

Endlich verdient noch die Wechselwirkung zwischen den Estern und dem Ammoniak erwähnt zu werden. Reines flüssiges Ammoniak erzeugt bei gewöhnlicher Temperatur grösstentheils Amid, und es

<sup>1)</sup> Diese Berichte 34, 437 ff. [1901].

<sup>2)</sup> Diese Berichte 34, 442 ff. [1901].

<sup>3)</sup> E. Fischer und E. Königs, diese Berichte 37, 4601 [1904].

<sup>4)</sup> Diese Berichte 39, 455 [1906].

gelang so, auch sehr empfindliche Amide, z. B. das bisher unbekannte Dianid der Asparaginsäure, darzustellen<sup>1)</sup>. In alkoholischer Lösung erzeugt aber Ammoniak auch manchmal Diketopiperazine. So entsteht bei dem Asparaginsäure-diäthylester ausschliesslich das zu dieser Klasse gehörige Asparaginimid.

#### Chloride der Aminosäuren und ihrer Acylderivate.

So lange ich mich mit dem Problem, die Aminosäuren peptidartig zu verkuppeln, beschäftige, ist mir besonders wünschenswerth erschienen, ihre wahren Chloride, die an Stelle des Carboxyls die Gruppe  $\text{COCl}$  enthalten, herstellen zu können. Aber manche Versuche missglückten, weil es an einem passenden Lösungsmittel für die Aminosäuren und den Chlorphosphor fehlte. Erst die Erfahrungen, die ich mit den Acylderivaten sammeln konnte, haben mich auf den richtigen Weg geführt.

Den ersten Erfolg brachte die Benutzung des Thionylchlorids bei den Carbäthoxyderivaten des Glycylglycins<sup>2)</sup> und etwas später des Glykocolls<sup>3)</sup>. Obschon die Reaction keineswegs glatt verläuft und deshalb auch nur unreine Producte liefert, so liess sie sich doch auf einige andere Acylverbindungen, z. B. das  $\beta$ -Naphthalinsulfo-glycin und das  $\beta$ -Naphthalinsulfo-d-alanin, übertragen<sup>4)</sup>. Dagegen versagte sie in anderen Fällen, weil das Thionylchlorid erst bei höherer Temperatur wirkt und hier manche der Chloride schon zersetzt werden. Besser wurden die Resultate, als ich an Stelle des Thionylchlorids das Phosphorpentachlorid setzte und als Lösungsmittel Acetylchlorid benutzte. Auf diese Art gelang zuerst die Chlorirung des Bromisocapronyl-glycins<sup>5)</sup>, dann des Bromisocapronyl-glycyl-glycins sowie der Hippursäure, und alle diese Producte konnten, wie ich später ausführlich schildern werde, für die Gewinnung von Polypeptiden oder deren Acylderivaten benutzt werden<sup>6)</sup>.

Der letzte Erfolg dieser langen Versuchsreihe war endlich die Gewinnung der Aminosäurechloride selbst, die bei der Reaction als Hydrochlorate entstehen. Die Structur dieser Körper habe ich durch die allgemeine Formel  $\text{R} \cdot \text{CH} \cdot \text{COCl}$  ausgedrückt, weil ich glaube, dass



sie am einfachsten ihre Entstehung und ihre Verwandlungen darzustellen erlaubt.

1) E. Fischer und E. Königs, diese Berichte 37, 4599 [1904].

2) Diese Berichte 36, 2099 [1903].      3) Diese Berichte 36, 2109 [1903].

4) E. Fischer und P. Bergell, diese Berichte 36, 2594 [1903].

5) Diese Berichte 37, 3070 [1904].      6) Diese Berichte 38, 605 [1905].

Bisher wurde das Verfahren nur auf die Monoamino-monocarbonsäuren angewendet, hat aber hier ausnahmslos zum Ziele geführt. Die Operation besteht darin, dass die fein gepulverte Aminosäure mit etwa der 10—15-fachen Menge Acetylchlorid und der berechneten Menge Phosphorpentachlorid bei 0—20° geschüttelt wird. Die Aminosäure verschwindet dabei allmählich, und an ihre Stelle tritt das schwer lösliche Hydrochlorat des Aminosäurechlorids. Bei einigen Aminosäuren, namentlich beim Glykocoll, bedarf es allerdings einer besonderen Vorbereitung für diese Reaction, d. h. die Aminosäure muss aus der warmen, wässrigen Lösung durch Alkohol gefällt und dann selbstverständlich scharf getrocknet werden. Mit solchem Material gelingt es, die Chlorirung so glatt durchzuführen, dass das Product nahezu den theoretischen Chlorgehalt besitzt.

Ganz anders ist das Resultat, wenn man das aus Wasser krystallisirte Glykocoll auch nach feinsten Pulverung und sorgfältigstem Trocknen verwendet, da dann gar kein salzsaures Glycylchlorid erhalten wird. Die Ursache dieser merkwürdigen Verschiedenheit ist noch nicht aufgeklärt<sup>1)</sup>. Analysirt sind bis jetzt die Chlorderivate des Glykocolls, des *dl*- und *d*-Alanins, der *dl*-Amino-buttersäure, des *dl*-Leucins und des *dl*-Phenyl-alanins.

Grössere Schwierigkeiten haben sich bei den Diamino- und Oxyamino-Säuren gezeigt, weil hier phosphorhaltige Nebenproducte entstehen, die die Isolirung der richtigen Chloride sehr erschweren. Auch für Asparagin- und Glutamin-Säure sind die Versuche noch nicht abgeschlossen. Trotzdem bildet die Auffindung dieser Halogenderivate der Aminosäuren einen wesentlichen Fortschritt für die Synthese vieler Derivate, insbesondere der Polypeptide; denn wie leicht begreiflich, besitzen diese Producte eine ähnliche Reactionsfähigkeit, wie die gewöhnlichen Säurechloride. In Folge dessen bietet auch ihre Erkennung keine Schwierigkeiten. Man braucht sie nur mit kaltem Alkohol zu übergiessen, um sofort lebhafte Erwärmung, Lösung und Bildung von salzsaurem Aminosäureester zu beobachten.

### Erkennung und Trennung der Aminosäuren.

Im reinen Zustande sind die bisher bekannten  $\alpha$ -Amino- und Oxyamino-Säuren schön krystallisirte Stoffe, deren Analyse keine Schwierigkeiten bietet. Trotzdem ist die Identificirung kleinerer Mengen, besonders wenn es sich um Unterscheidung von Isomeren handelt, bei dem Mangel an einem scharfen Schmelzpunkt nicht so einfach. Ausserordentlich schwierig aber kann die Aufgabe werden, wenn es sich um

<sup>1)</sup> Diese Berichte 38, 2917 [1905].



complicirtere Gemische handelt, zumal wenn diese noch durch andere Substanzen, wie anorganische Salze und dergl., verunreinigt sind.

Für die Trennung solcher Gemische war man früher auf die Krystallisation aus wässriger oder wässrig-alkoholischer Lösung angewiesen, und jedermann, der sich mit derartigen Versuchen beschäftigt hat, musste die Unvollkommenheit und Unsicherheit des Verfahrens beklagen. Aus diesem Grunde habe ich den Vorschlag gemacht, zur Abscheidung und Trennung die Ester zu benutzen. Das Verfahren wird später bei der Besprechung der Proteine ausführlicher behandelt werden. Die Destillation der Ester bietet den grossen Vorzug, dass dadurch alle anorganischen Stoffe und auch die complicirteren Aminosäuren, wie die Diaminosäuren, die hochmolekularen Oxyaminosäuren, sowie polypeptidartige Producte leicht entfernt werden.

Ferner wird durch die fractionirte Destillation eine schon ziemlich weitgehende Trennung der Ester erreicht, und diese lässt sich noch verschärfen, indem man die verschiedene Löslichkeit der Ester in Wasser, Aether und Petroläther benutzt.

Die aus den Estern regenerirten Aminosäuren sind also schon relativ rein und können dann durch specielle Methoden in leicht definirbare Derivate verwandelt werden. Als solche habe ich in manchen Fällen die Phenylisocyanat-Verbindungen und die daraus hervorgehenden Hydantoïne mit Vortheil benutzt. In anderen Fällen leisten die  $\beta$ -Naphthalinsulfoverbindungen noch bessere Dienste. Dass auch die früher viel gebrauchten Kupferverbindungen mit zu benutzen sind, ist selbstverständlich.

Nur eine der bekannteren Aminosäuren, das Prolin, ist in absolutem Alkohol leicht löslich und kann dadurch verhältnissmässig leicht von seinen Verwandten getrennt werden.

Die Phenylisocyanat- und Naphthalinsulfo-Verbindungen lassen sich auch häufig zur Isolirung der Aminosäuren aus wässrigen, durch andere Stoffe verunreinigten Lösungen benutzen. Handelt es sich um sehr verdünnte Lösungen, wie Harn, so wird man den Naphthalinsulfoverbindungen wegen ihrer geringen Löslichkeit den Vorzug geben. Ohne dieses Hilfsmittel wäre es trotz der Estermethode sehr schwer gewesen, das Serin unter den Spaltproducten mancher Proteine zu erkennen.

Für die Diaminosäuren ist bekanntlich die Fällung mit Phosphorwolframsäure das wichtigste Abscheidungsmittel, aber nach meiner Erfahrung bedarf es bei Anwendung dieser Methode bestimmter Vorsichtsmaassregeln. Die Phosphorwolframate der Monoaminosäuren, z. B. des Glykocolls und des Alanins, sind keineswegs so leicht lös-

lich, wie man im allgemeinen annimmt. Ich habe gefunden, dass die Verdünnungsgrenze (5 pCt.), welche E. Schulze und Winterstein<sup>1)</sup> für Glykocoll angaben, nicht mehr gültig ist, wenn die Lösungen einige Zeit stehen, wie das ja bei grösseren Fällungen und Filtrationen gar nicht zu vermeiden ist; denn selbst 2-procentige Lösungen von Glykocoll und Alanin, die ausserdem 10 pCt. Schwefelsäure enthalten, geben mit einer sehr concentrirten Lösung von Phosphorwolframsäure nach längerem Stehen krystallinische Niederschläge, deren Menge allerdings ziemlich klein ist.

Endlich ist die Gefahr recht gross, dass die Monoaminosäuren von den fallenden Phosphorwolframatn der Diaminverbindungen mitgerissen werden, und schliesslich verdient es noch betont zu werden, dass das Auswaschen der Niederschläge bei grösseren Operationen nicht so leicht ist.

Ich halte es deshalb für zweckmässig, den Phosphorwolframsäure-Niederschlag stets stark abzupressen<sup>2)</sup>, wieder mit Wasser zu verreiben und dann die Filtration und Pressung zu wiederholen. Zur völligen Entfernung der Monoaminosäure ist es dann rathsam, den Niederschlag mit Baryt zu zerlegen und in der vom Baryt befreiten Lösung die Fällung mit Phosphorwolframsäure zu wiederholen. Dass dabei ein Theil der Diaminosäure durch ihre Löslichkeit verloren geht, ist unvermeidlich, fällt aber auch nur für quantitative Versuche in's Gewicht.

Für Lysin, Arginin und Histidin besitzen wir ausser der Fällung mit Phosphorwolframsäure die vortrefflichen, namentlich von Kossel und seinen Schülern ausgearbeiteten Isolirungs-Methoden, denen ich nichts zuzufügen habe. Anders aber steht es mit den in neuerer Zeit erst entdeckten Stoffen, die durch Phosphorwolframsäure gefällt werden, z. B. der von Abderhalden und mir im Casein gefundenen Diaminotrioxo-dodekansäure, die wahrscheinlich mit Skraup's Caseinsäure identisch ist, aber die von uns aufgestellte Formel besitzt. Sie wird zwar durch Phosphorwolframsäure sehr leicht gefällt, aber nicht mehr in den Verdünnungen, wo Arginin und Lysin noch ausfallen. Aehnliche, bisher noch nicht im reinen Zustande isolirte Körper sind nach meinen Erfahrungen noch mehr unter den hydrolytischen Spaltproducten des Caseins und anderer Proteine vorhanden.

Speciellere Methoden für den Nachweis einzelner Aminosäuren sind in der folgenden Zusammenstellung erwähnt, welche in registerartiger Kürze alle Beobachtungen enthält, die von mir und den An-

<sup>1)</sup> Zeitschr. für physiol. Chem. 33, 574 [1901].

<sup>2)</sup> E. Fischer und E. Abderhalden, Zeitschr. für physiol. Chem. 39, 88 [1903].

gehörigen des hiesigen Instituts in Bezug auf Darstellung, Eigenschaften und Derivate dieser Stoffe gemacht wurden. Der Kürze halber sind bei den Literaturangaben »Diese Berichte« mit »B.«, »Liebig's Annalen« mit »A.« und »Zeitschrift für physiologische Chemie« mit »Z.« bezeichnet.

**Glykocoll.** Darstellung des Aethylesters aus dem Hydrochlorat durch Alkali und Kaliumcarbonat (B. 34, 436). Der dort angegebene Siedepunkt des Esters (43–44° bei 11 mm Druck) ist zu niedrig. Er wurde später für ein analysirtes Präparat unter 10 mm Druck bei 51.5–52.5° beobachtet und liegt also auffallender Weise etwas höher, als der Siedepunkt des Alaninesters (48.5° bei 10–11 mm). Verbindungen des Esters mit Acetessigester, Acetyl-aceton, Acetonyl-aceton, Phenylsenföf, Phosgen und Schwefelkohlenstoff (B. 34, 437 ff.) Qualitativer Nachweis mittels Aethylesterchlorhydrat (Z. 33, 156). Abscheidung und quantitative Bestimmung von Glykocoll-esterchlorhydrat (Z. 33, 183 und 35, 230; ferner 35, 72).  $\beta$ -Naphthalinsulfo-glycin (B. 35, 3773).  $\gamma$ -Phenyl-hydantoin aus Glykocoll (B. 33, 2394). Salzsaures Glycylchlorid (B. 38, 2915). Hippursäure, Nichtspaltbarkeit durch Alkaloide (B. 32, 2470). Hippurylchlorid (B. 38, 612). Die zahlreichen Verbindungen des Glykocolls mit halogenhaltigen Acylen sind später bei den Polypeptiden erwähnt.

**Sarkosin.** Aethylester (B. 34, 452).

**Alanin.** Spaltung des Racemkörpers in die optischen Componenten, Beschreibung der Letzteren; ferner Darstellung des *dl*-, *d*- und *l*-Benzoylalanins (B. 32, 2454 ff.). Aethylester und seine Verwandlung in das Lactimid oder Dimethyl-diketopiperazin (B. 34, 442). Abscheidung des Alanins durch die Estermethode (Z. 33, 157 und 184). Verwandlung von *d*-Alanin in *d*-Milchsäure (Z. 33, 190). Darstellung des *d*-Alanins aus Seide (B. 39, 462).  $\beta$ -Naphthalinsulfoderivat des *d*-Alanins und des racemischen Alanins (B. 35, 3781). Salzsaures Alanylchlorid (B. 38, 618 und 2917). Carbäthoxylalanin nebst Ester, Amid und Chlorid (A. 340, 137 ff.).

$\alpha$ -Amino-buttersäure. Darstellung, Benzoyl- und Benzolsulfoderivat; ferner Spaltung in die beiden optischen Componenten und deren Eigenschaften (B. 33, 2337 ff.). Aethylester und seine Verwandlung in das entsprechende Diketopiperazin (B. 34, 443).

$\alpha$ -Amino-isovaleriansäure. Darstellung des Racemkörpers nebst Aethylester, Benzoyl- und Phenylisocyanat-Derivat; ferner Derivate der  $\alpha$ -Amino-*n*-valeriansäure, der  $\alpha$ -Amino-methyl-äthyllessigsäure und der  $\beta$ -Amino-isovaleriansäure (B. 35, 400). Auffindung der activen Amino-isovaleriansäure im Casein (Z. 33, 157) und im Horn (Z. 36, 469).

**Leucin.** a) Racemkörper. Darstellung, Benzoyl-, Benzolsulfo- und Phenylisocyanat-Verbindung; ferner Spaltung in die optischen Componenten (B. 33, 2370 ff.). Verwandlung in Phenyl-isobutyl-hydantoin (B. 33, 2395). Aethylester und seine Verwandlung in Leucinimid; ferner Acetylderivat (B. 34, 449). Salzsaures Leucylchlorid (B. 38, 615).  $\beta$ -Naphthalinsulfoderivat (B. 35, 3782).

b) *l*-Leucin (natürliches). Synthetische Bereitung aus dem Racemkörper mittels der Benzoylverbindung (B. 33, 2378) oder der Formylverbindung (B. 38, 3997) oder des Aethylesters (Warburg, B. 38, 187). Optisches Verhalten (B. 33, 2379 und B. 38, 4003 ff.). Benzoylderivat (B. 33, 2377). Aethylester (B. 34, 445).  $\beta$ -Naphtalinsulfoderivat (B. 35, 3783).

*d*-Leucin. Darstellung aus dem Racemkörper mittels der Benzoylverbindung (B. 33, 2375), mittels der Formylverbindung (B. 38, 3997).

$\alpha$ -Amino-*n*-capronsäure. Benzoyl- und Benzolsulfo-Verbindungen (B. 33, 2382). Spaltung in die optischen Componenten mittels der Benzoylverbindung (B. 34, 3764). Aethylester (B. 34, 450).

Phenyl-alanin. a) Racemkörper. Darstellung nach dem Verfahren von Erlemeyer jun.; ferner Spaltung in die optischen Isomeren mittels der Benzoylverbindung (B. 33, 2383 ff.). Darstellung aus der Benzylmalonsäure (B. 37, 3064). Aethylester und seine Verwandlung in das Diketopiperazin (B. 34, 450).  $\beta$ -Naphtalinsulfoderivat (B. 35, 3783). Salzsäures Phenylalanylchlorid (B. 38, 2918).

b) *d*-Phenyl-alanin. Darstellung aus dem Racemkörper; optisches Verhalten und Phenylisocyanatverbindung (B. 33, 2385). Umwandlung in Phenylbenzylhydantoin (B. 33, 2396).

c) *l*-Phenyl-alanin. Isolirung und Nachweis mit der Estermethode unter den Spaltproducten des Caseins (Z. 33, 171), des Seidenfibroins (Z. 33, 188), des Oxyhämoglobins (Z. 36, 273). Nachweis kleiner Mengen durch die Bildung von Phenyl-acetaldehyd beim Kochen mit Bichromat und Schwefelsäure (Z. 33, 174).

$\gamma$ -Phenyl- $\alpha$ -aminobuttersäure. Synthese aus der Phenyl-äthylmalonsäure und Eigenschaften (B. 39, 355).

Tyrosin. Darstellung des racemischen Benzoyltyrosins nach der Methode von Erlemeyer jun. und seine Spaltung in die optischen Componenten. Ferner Synthese des natürlichen *l*-Tyrosins, sowie des *d*-Tyrosins und ihr optisches Verhalten (B. 32, 3638). Dibenzoylderivat des *l*-Tyrosins (B. 32, 2454). Gewinnung des *l*-Tyrosins aus Seidenfibroin (Z. 33, 181). *l*-Tyrosin-äthylester und seine Verwandlung in das entsprechende Diketopiperazin (B. 34, 451).

Asparaginsäure. Spaltung des Racemkörpers in die optischen Componenten mit Hilfe der Benzoylverbindung; ferner Benzoylirung und optisches Verhalten der *l*-Asparaginsäure (B. 32, 2459 ff.). *l*-Asparaginsäure-diäthylester (B. 34, 452). Darstellung desselben Esters aus Asparagin; ferner seine Verwandlung in Asparaginsäure-diamid, Asparagin und das Piperazinderivat (B. 37, 4599 ff.).

Glutaminsäure. Spaltung des Racemkörpers in die optischen Componenten mit Hilfe der Benzoylverbindung (B. 32, 2464). *d*-Glutaminsäure-diäthylester (B. 34, 453). Darstellung der *d*-Glutaminsäure aus Casein (Z. 33, 153).

Prolin oder Pyrrolidin- $\alpha$ -carbonsäure. Neue Synthese des Racemkörpers; seine Phenylisocyanatverbindung und deren Anhydrid (B. 34, 458). Entdeckung des activen *l*-Prolins unter den Spaltproducten des Caseins durch Salzsäure und seine Isolirung nach der Estermethode: Phenylisocyanat-

verbindung und deren Anhydrid, Racemisirung (Z. 33, 167). Entstehung des activen und racemischen Prolins bei der Hydrolyse des Caseïns durch Alkali (Z. 35, 227). Bildung des *l*-Prolins bei der enzymatischen Spaltung des Caseïns (Z. 40, 215). Praktische Darstellung des racemischen Prolins aus Gelatine (B. 37, 3072).

Oxy-prolin. Entdeckung der activen Form unter den Spaltproducten der Gelatine, Krystallform, Drehungsvermögen, Verbindung mit Phenylisocyanat und Reduction zu Prolin (B. 35, 2660). Nachweis unter den Spaltproducten des Caseïns (Z. 39, 156). Synthese von zwei inactiven Oxyproli dicarbonsäuren (H. Leuchs. B. 38, 1937).

Serin. Synthese, Phenylisocyanat-Verbindung, Reduction zu  $\alpha$ -Alanin (B. 35, 3787). Nachweis unter den Spaltproducten des Seidenfibröins und optische Inactivität (Z. 35, 221 ff.). Ich halte es für wahrscheinlich, dass in den Proteïnen die active Form des Serins enthalten ist, die vielleicht schlecht krystallisirt und deshalb schwer zu isoliren ist. Das inactive Serin, das man bisher aus Proteïnen gewonnen hat, würde nach dieser Anschauung erst durch Racemisirung aus der activen Form entstehen. Es wäre deshalb interessant, die Racemform durch die Benzoylverbindung in die optischen Componenten zu zerlegen.

Isoserin. Verbesserte Darstellung, Kupfersalz, Aethylester, Phenylisocyanat-Verbindung und Reduction zu  $\beta$ -Alanin (B. 35, 3794 ff.).

$\alpha$ -Amino- $\gamma$ -oxy-valeriansäure. Synthese. Lacton und dessen Umwandlung in das polymere Di- $\beta$ -oxypropyl-diketopiperazin. Phenylisocyanat-Verbindung und Reduction zu  $\alpha$ -Amino-valeriansäure (B. 35, 3797).

Galaheptosaminsäure. Synthese und Kupfersalz (B. 35, 3801).

Glucosaminsäure. Synthese der *l*- und *dl*-Verbindung. Löslichkeit und Drehungsvermögen der activen Formen (B. 35, 3802 ff.). Synthese der *d*-Verbindung und des daraus durch Reduction entstehenden *d*-Glucosamins (B. 36, 24).

$\alpha, \beta$ -Diamino-propionsäure. Methylester und seine Verwandlung in das Dipeptid (B. 38, 4173).

$\alpha, \gamma$ -Diamino-buttersäure. Synthese (B. 34, 2900).

$\alpha, \delta$ -Diamino-valeriansäure oder Ornithin. Synthese des Racemkörpers und seiner Benzoylverbindungen (B. 34, 462 ff.).

Eine zweite, ziemlich ähnliche Synthese ist später von Sörensen ausgeführt worden (a. a. O.). Er hat ferner die Dibenzoylverbindung nach meiner Methode in die optischen Componenten zerlegt, sodass also jetzt auch die Synthese der beiden activen Ornithine und des activen Arginins wirklich ist.

Diamino-valeriansäure (unbekannter Structur). Synthese aus  $\beta$ -Vinylacrylsäure (B. 38, 3607).

$\alpha, \epsilon$ -Diamino-capronsäure oder Lysin. Synthese des Racemkörpers, seine Monobenzoyl- und Dibenzoyl-Verbindung und das Phenylisocyanatderivat; ferner Racemisirung des activen Lysins (B. 35, 3772 ff.). Methylester des racemischen Lysins und seine Verwandlung in das Anhydrid oder Diketopiperazinderivat (B. 38, 4173).

**Diamino-capronsäure** (unbekannter Structur). Darstellung aus Sorbinsäure und Eigenschaften (B. 37, 2357 ff.).

**Arginin. Methylester und seine Condensation.** Praktische Darstellung des Arginins aus Edestin (B. 38, 4186).

**Histidin.** Isolirung des Methylesters aus dem Hydrochlorat und seine Verwandlung in das Anhydrid (B. 38, 4184).

**Cystin.** Identität von Protein- und Stein-Cystin. Optisches Verhalten und Dimethylester (Z. 45, 405).

## II. Polypeptide.

Den Namen Polypeptide habe ich vorgeschlagen für die Producte, die durch amidartige Verkettung von Aminosäuren entstehen und deren einfachster Vertreter das Derivat des Glykocolls, das sogenannte Glycyl-glycin,  $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CO.NHCH}_2\text{COOH}$ , ist. Nach der Anzahl der in ihnen enthaltenen Aminosäuren sollen sie als Di-, Tri-, Tetra-Peptide u. s. w. unterschieden werden. Diese Bezeichnung ist einerseits der Nomenclatur der Kohlehydrate nachgebildet, andererseits ist darin das alte Wort Pepton verwerthet, denn ich habe von Anfang an erwartet und ich bin durch alle nachfolgenden Beobachtungen in dieser Ueberzeugung bestärkt worden, dass diese künstlichen Producte den natürlichen Peptonen sehr nahe verwandt sind, mit anderen Worten, dass die Peptone im wesentlichen ein bisher untrennbares Gemisch von Polypeptiden sind.

Da wegen dieser Beziehungen die synthetischen Körper ein weitgehendes Interesse beanspruchen dürfen, so habe ich mich im Laufe der letzten 4 Jahre eifrig bemüht, die Methoden für ihren Aufbau so vielseitig und leistungsfähig wie möglich zu gestalten, und es ist mir auch Dank der Hülfe einer grösseren Anzahl von Mitarbeitern gelungen, eine stattliche Reihe solcher Stoffe im reinen Zustand zu gewinnen.

Da ich mich zu der Hoffnung berechtigt halte, dass diese Versuche den Beginn der Synthese in dem Gebiete der Peptone bedeuten, so scheint es mir angezeigt, bei ihrer zusammenfassenden Besprechung einen historischen Rückblick auf ältere Versuche in diesem Gebiete zu geben. An die Spitze deaselben will ich ohne Aenderung die Worte setzen, welche vor 5 Jahren als Einleitung zu der Beschreibung des ersten Polypeptides, des Glycylglycins, dienten.

»Der Gedanke, die aus den Proteinstoffen durch Hydrolyse entstehenden Aminosäuren durch Anhydridbildung wieder zu grösseren Complexen zu vereinigen, ist schon seit längerer Zeit von verschiedenen Forschern experimentell behandelt worden. Wir erinnern nur an

die Anhydride der Asparaginsäure von Schaal<sup>1)</sup>, ihre Verwandlung einerseits in den colloidalen Polyasparaginharnstoff von Grimaux<sup>2)</sup>, andererseits an die Polyaspartsäuren von H. Schiff<sup>3)</sup>, ferner an die Versuche von Schützenberger<sup>4)</sup> über die Vereinigung verschiedener Aminosäuren (Leucine und Leuceine) mit Harnstoff durch Erhitzen mit Phosphorsäureanhydrid, an die ähnlichen Beobachtungen Lilienfeld's<sup>5)</sup> über die Wirkung von Kaliumsulfat, Formaldehyd und anderen Condensationsmitteln auf ein Gemisch von Aminosäureestern und endlich an die Angaben von Balbiano und Frasciatti<sup>6)</sup> über die Verwandlung des Glykocolls in ein hornartiges Anhydrid durch Erhitzen mit Glycerin. Aber alle von ihnen beschriebenen Producte sind amorphe, schwer charakterisierbare Substanzen, über deren Structur man ebenso wenig wie über den Grad ihrer Verwandtschaft mit den natürlichen Proteinstoffen etwas sagen kann.

Will man auf diesem schwierigen Gebiete zu sicheren Resultaten kommen, so wird man zuerst eine Methode finden müssen, welche es gestattet, successive und mit definirbaren Zwischenstufen die Moleküle verschiedener Aminosäuren anhydridartig aneinander zu reihen.

Ausser den genannten Forschern hat sich dann noch Theodor Curtius mit der Verkettung von Aminosäuren beschäftigt, aber in der allergrössten Zahl seiner Versuche benutzte er als einen Componenten nicht die freie Aminosäure, sondern deren Benzoylderivat. Obschon die so resultirenden Benzoylkörper ganz andere Eigenschaften als die freien Polypeptide besitzen und deshalb für die Chemie der Proteine nur eine untergeordnete Bedeutung haben, so will ich doch die Versuche von Curtius, von denen er selbst eine historisch gehaltene Uebersicht gegeben hat<sup>7)</sup>, hier ebenfalls besprechen, weil es sich bei ihnen um krystallisirende, scharf definirbare Stoffe handelt.

Bereits im Jahre 1882 erhielt er durch Einwirkung von Benzoylchlorid auf Glykocollsilber ausser Hippursäure noch zwei höher molekulare Säuren, von denen die eine als Hippurylamido-essigsäure,  $C_6H_5.CO.NHCH_2.CO.NHCH_2.COOH$ , gekennzeichnet wurde. Sie ist also die Benzoylverbindung des von Fourneau und mir entdeckten Glycyl-glycins.

1) Ann. d. Chem. 157, 24 [1871]. 2) Bull. soc. chim. [2] 38, 64 [1882].

3) Ann. d. Chem. 303, 183 [1898] und 307, 231 [1899].

4) Recherches sur la synthèse des matières albuminoïdes et protéiques. Compt. rend. 106, 1407 [1888] und Compt. rend. 112, 198 [1891].

5) Dubois' Archiv 1894, 383 und 555.

6) Diese Berichte 33, 2323 [1900] und 34, 1501 [1901].

7) Journ. für prakt. Chem. [2] 70, 57 [1904].

Die zweite, sogenannte  $\gamma$ -Säure, die in alkalischer Lösung mit Kupfersalzen eine biuretähnliche Färbung giebt, erhielt er im folgenden Jahre auch durch Zusammenschmelzen von Hippursäureester und Glykocoll. Aber erst 21 Jahre später, nachdem inzwischen von mir die freien Polypeptide entdeckt waren, gelang es Curtius und Benrath, die wahre Zusammensetzung der Verbindung, die Benzoyl-pentaglycyl-aminoessigsäure ist, festzustellen.

Allerdings hatte Curtius schon 1884 darauf hingewiesen, dass bei der Einwirkung von Glykocollsilber auf Benzoylchlorid »neben Hippursäure eine Reihe von Säuren entsteht, in der jedes folgende Glied ein Glykocoll  $- H_2O = NHCH_2CO$  mehr enthält als das vorhandene«. Aber das war doch mehr eine theoretische Conception, als eine experimentelle Errungenschaft, da von keinem dieser höheren Glieder die Zusammensetzung richtig ermittelt war. Eine andere Versuchsreihe von Curtius, die nach meiner Ansicht für das Kapitel der Polypeptide grössere Bedeutung hat, ist aus seiner Entdeckung des freien Glykocoll-esters hervorgegangen. Er fand in Gemeinschaft mit Goebel, dass dieser Ester in wässriger Lösung in das Glycinanhydrid verwandelt wird:  $NH \left\langle \begin{array}{c} CH_2 \cdot CO \\ CO \cdot CH_2 \end{array} \right\rangle NH$ , welches der einfachste Repräsentant der für die Chemie der Dipeptide so wichtigen Diketopiperazine ist. Er beobachtete ferner, dass der Glykocoll-ester beim Aufbewahren eine Base liefert, welche ähnlich dem Biuret mit Alkali und Kupfersalzen eine schöne rothe Farbe liefert und deshalb »Biuretbase« genannt wurde. Seine Angaben über Zusammensetzung und Eigenschaften der Verbindung, die er damals nicht rein gehabt hat, mussten allerdings später modificirt werden.

Im Jahre 1901 fanden E. Fourneau und ich<sup>1)</sup> durch Aufspaltung des Glycinanhydrids mit Säuren das erste und einfachste Polypeptid, das schon erwähnte Glycyl-glycin nebst seinem Ester und der Phenylisocyanat-Verbindung, sowie dem Carbäthoxyl- und dem Carbamido-Derivat seines Esters. Ein halbes Jahr später konnte ich den Nachweis führen<sup>2)</sup>, dass bei dem Carbäthoxyl-glycyl-glycin noch eine dritte Aminosäure angefügt werden kann, indem man seinen Ester mit Leucinester zusammen erhitzt, wobei unter Alkoholaustritt der Carbäthoxyl-glycyl-glycyl-leucinester,  $C_2H_5CO_2 \cdot NHCH_2CO \cdot NHCH_2CO \cdot NH \cdot CH(C_4H_9) \cdot CO_2 C_2H_5$ , resultirt.

In derselben Abhandlung ist ein anderes Dipeptid, das Leucyl-leucin beschrieben, das aus dem schon länger als 50 Jahre bekannten Leucinimid durch Erhitzen mit concentrirtem Bromwasserstoff gewonnen wurde.

<sup>1)</sup> Diese Berichte 34, 2868 [1901].    <sup>2)</sup> Diese Berichte 35, 1035 [1902].



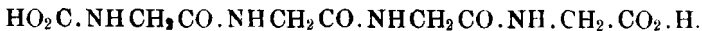
Einige Monate später erschien eine vorläufige Notiz von Curtius über eine neue Synthese des Hippurylglycins aus Hippurylazid und Glykocoll und die Benutzung der gleichen Methode zur Verlängerung der Glycinkette, wobei als Endproduct die Benzoyl-pentaglycyl-amidoessigsäure,



resultirte<sup>1)</sup>.

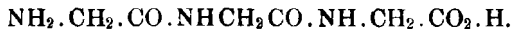
Im Jahre 1903 gelang mir zum Theil in Gemeinschaft mit Otto zum ersten Male die Verwandlung des Carboxyls in die Säurechloridgruppe bei den Derivaten des Glykocolls und zwar durch gelindes Erwärmen des Carbäthoxylglycins mit Thionylchlorid. Das hierbei entstehende Carbäthoxylglycylchlorid konnte zwar nicht im analysereinen Zustand gewonnen werden, liess sich aber leicht mit Glycin- oder Alanin-Ester verkuppeln, und durch Verseifung der zuerst entstehenden Ester konnten Carbäthoxyl-glycyl-glycin und Carbäthoxyl-glycyl-alanin isolirt werden.

Die Chlorirung mit Thionylchlorid war auch noch anwendbar bei den Carbäthoxylderivaten des Glycyl-glycins und des Diglycyl-glycins, und durch Verkuppelung der Chloride mit Glycinester wurde dann als Endproduct der Carbäthoxyl-triglycyl-glycin-ester gewonnen, der bei der Verseifung die Triglycyl-glycin-carbonsäure lieferte<sup>2)</sup>:



Diese und ähnliche Verbindungen standen den freien Polypeptiden schon näher, als die Benzoylderivate von Curtius, da sie nur das eine Carboxyl als fremden Bestandtheil enthielten. Aber die Hoffnung, dieses als Kohlensäure abspalten zu können, wie man es nach dem Verhalten der Carbaminsäure und ähnlicher Substanzen erwarten musste, hat sich leider nicht erfüllt. Ich habe deshalb in Gemeinschaft mit Otto<sup>3)</sup> einen anderen Weg eingeschlagen, um die freien Polypeptide zu gewinnen.

Glycyl-glycinester wurde zuerst mit Chloracetylchlorid combinirt und das aus dem so resultirenden Ester durch Verseifung gewonnene Chloracetyl-glycyl-glycin durch Erwärmen mit Ammoniak in Diglycyl-glycin verwandelt.



Dieses Verfahren hat sich in der Folge als eine sehr fruchtbare Reaction erwiesen, durch die sich die verschiedenartigsten Di-, Tri-, Tetra- und einzelne Penta-Peptide erhalten liessen.

<sup>1)</sup> Diese Berichte 35, 3226 [1902].

<sup>2)</sup> Diese Berichte 36, 2094, 2106 [1903].

<sup>3)</sup> Diese Berichte 36, 2106 [1903].

Inzwischen war auch die Biuretbase von Curtius von neuem studirt worden. Schwarzschild<sup>1)</sup>, der das Verhalten gegen Trypsin untersuchte, glaubte sie als den Aethylester eines Heptapeptids, d. h. des Hexaglycyl-glycins, betrachten zu müssen. Aber erst Curtius<sup>2)</sup> erkannte im Jahre 1904 ihre richtige Zusammensetzung und Structur; er zeigte in überzeugender Weise, dass sie der Aethylester des Triglycyl-glycins ist. Ich konnte diesen Schluss bald nachher bestätigen, da das von mir auf ganz anderem Wege gewonnene Triglycyl-glycin bei der Veresterung dieselbe Verbindung, resp. ihr Benzoylderivat lieferte<sup>3)</sup>. Eine interessante, von Curtius erwähnte Veränderung erfährt der freie Ester nach einer Beobachtung seines Mitarbeiters Gumlisch; denn ähnlich dem Glycinester geht er dabei in Anhydrid über<sup>4)</sup>, das auch ebenso, wie es von mir und Fourneau für das Glycinanhydrid beobachtet wurde, durch Salzsäure aufgespalten wird und dabei ein Octapeptid des Glycins liefern soll.

Einen anderen Verlauf der Reaction beobachtete ich anfangs 1906 bei dem Methyl ester des Diglycyl-glycins; denn hier entsteht der Methyl ester des Pentaglycyl-glycins, aus dem sich durch Verseifung leicht das Hexapeptid gewinnen lässt<sup>5)</sup>.

Im Sommer 1904 hat endlich Theodor Curtius in einer Reihe von Abhandlungen<sup>6)</sup>, die den gemeinsamen Titel »Verkettung von Amidosäuren« tragen, seine Synthesen von Benzoylderivaten der Polypeptide ausführlich beschrieben. Sie erstrecken sich auf die Derivate des Glykocolls, Alanins, Isoleucins, der Asparaginsäure und  $\beta$ -Amino-buttersäure. Für die Synthese wurde stets die Azidmethode benutzt. Obschon sie auch noch manche interessante Beobachtungen — insbesondere über die Metamorphosen der Azide — enthalten, so kann ich doch auf ihren Inhalt nicht weiter eingehen, da alle Punkte erwähnt sind, die zu meinen Versuchen in Beziehung stehen.

Ungefähr um dieselbe Zeit fand ich<sup>7)</sup>, dass das Bromisocapronyl-glycin auch mit Phosphorpentachlorid in sein Chlorid verwandelt werden kann, wenn man als Lösungsmittel Acetylchlorid benutzt, und dass die Combination solcher Chlorkörper mit Aminosäureestern eine neue Synthese von Polypeptiden gestattet. Die Verfolgung dieser Beobachtung hat mich im Jahre 1905 zur Entdeckung der Chloride der Aminosäuren selbst geführt, die abermals eine neue und durch

1) Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathologie 4, 155 [1903].

2) Diese Berichte 37, 1284 [1904]. 3) Diese Berichte 37, 2504 [1904].

4) Diese Berichte 37, 1300 [1904]. 5) Diese Berichte 39, 453 [1906].

6) Journ. f. prakt. Chem. [2] 70, 57 ff. [1904].

7) Diese Berichte 37, 3070 [1904].

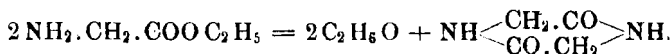
ihre Anwendung auf die optisch-activen Substanzen besonders wichtige Methode zum Aufbau der Polypeptide im Gefolge hatte<sup>1)</sup>.

### Synthetische Methoden.

Da das älteste Dipeptid, das Glycylglycin, zuerst aus dem Glycinanhydrid erhalten wurde und da auch heute noch manche Dipeptide am leichtesten aus den 2.5-Diketopiperazinen<sup>2)</sup> darzustellen sind, so will ich zunächst die Bildungsweisen der Letzteren besprechen, indem ich zugleich auf die von mir früher gegebene historische Uebersicht<sup>3)</sup> ihrer Entdeckung verweise.

Das älteste Glied der Klasse ist wohl das sogenannte Leucinimid, welches zuerst von Bopp<sup>4)</sup> 1849 beobachtet und später auch künstlich aus dem Leucin durch Erhitzen im Kohlensäure-<sup>5)</sup> oder im Salzsäure-Strom<sup>6)</sup> erhalten wurde. Nach demselben Verfahren sind die Anhydride des Phenyl-glykocolls, Phenyl-alanins und Sarkosins dargestellt. Bezüglich der zahlreichen 2.5-Diketopiperazine mit zwei an Stickstoff gebundenen aromatischen Radicalen, die von P. W. Abenius und O. Widman, sowie von C. A. Bischoff und seinen Mitarbeitern nach verschiedenen Methoden erhalten wurden, verweise ich auf die Lehrbücher<sup>7)</sup>, da diese Verbindungen für das Studium der Proteine nicht in Betracht kommen.

Eine zweite wichtige Bildungsweise fanden Curtius und Goebel bei dem Glykocoll-äthylester, denn dieser verwandelt sich in wässriger Lösung zum grossen Theil in das Anhydrid:



<sup>1)</sup> Diese Berichte 38, 605 [1905]

<sup>2)</sup> Dieser ursprünglich von C. A. Bischoff, sowie von Abenius und Widman gebrauchte Name (diese Berichte 21, 1257 u. 1662 [1888]) ist später durch Diacipiperazin ersetzt worden. Ich habe letzteren ebenfalls so lange benutzt, bis A. Hantzsch, der die Silbe »aci« für andere Zwecke reserviren will, wieder Diketopiperazin in Vorschlag brachte (diese Berichte 38, 998 [1905]). Obgleich Bedenken dagegen erhoben werden können und man nach einem Vorschlag, den mir Hr. P. Jacobson privatim machte, vielleicht besser den von Kekulé herrührenden Ausdruck »Dioxo« (vgl. Anschütz u. Parlato, diese Berichte 25, 1977 [1892]) hier anwenden würde, so scheint es mir doch besser, vorläufig keine Aenderung mehr vorzunehmen, weil dadurch stets einig Verwirrung gestiftet wird.

<sup>3)</sup> Diese Berichte 34, 435 [1901].

<sup>4)</sup> Ann. d. Chem. 69, 28 [1849].

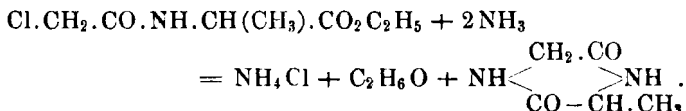
<sup>5)</sup> Hesse und Limpricht, Ann. d. Chem. 116, 201 [1860].

<sup>6)</sup> Kohler, Ann. d. Chem. 134, 367 [1865].

<sup>7)</sup> z. B. Chemie der 6-gliedrigen, heterocyclischen Systeme von Brühl, Hjelt und Aschan, S. 1043.

Bei den kohlenstoffreicheren Aminosäuren erfolgt die Reaction in wässriger Lösung nicht oder nur in sehr geringem Maasse, wohl aber, wie ich gefunden habe<sup>1)</sup>, sehr langsam beim Aufbewahren und ziemlich rasch beim Erhitzen auf 150—180°. Das Verfahren ist sehr zu empfehlen für die Bereitung der Diketopiperazine von Alanin, Aminobuttersäure, Leucin,  $\alpha$ -Amino-*n*-capronsäure, Phenyl-alanin und Tyrosin. Der gleiche Vorgang spielt sich rasch schon bei 100° ab bei dem Methylester des Histidins und Lysins<sup>2)</sup>; langsam erfolgt er bei 100° auch bei dem Methylester des *d*-Alanins<sup>3)</sup>. Mit einer kleinen Modification lässt er sich auch benutzen bei dem Asparaginsäure-diäthylester<sup>4)</sup>; dagegen versagt er bei den Estern der Glutaminsäure, weil diese zu leicht in die Ester der Pyrrolidon-carbonsäure übergehen.

Eine dritte, recht glatt verlaufende und deshalb für die praktische Darstellung in vielen Fällen geeignete Methode beruht auf der Wechselwirkung zwischen Ammoniak und den Estern der Aminosäuren, die ein  $\alpha$ -Halogenacyl enthalten. Sie wurde gefunden<sup>5)</sup> bei dem Chloracetyl-alaninester und gab das erste gemischte Diketopiperazin:



Dass die Reaction auch noch in complicirteren Fällen eintritt, beweist die ziemlich glatte Verwandlung des Chloracetyl-asparaginsäureesters in Anhydro-glycyl-asparaginsäureester und Anhydro-glycyl-asparagin<sup>6)</sup>.

Als Zwischenproduct entsteht aller Wahrscheinlichkeit nach der Ester des Dipeptids, der durch die weitere Wirkung des alkoholischen Ammoniaks in Diketopiperazin verwandelt wird.

Dass dieser letzte Process in der That sehr leicht stattfindet, wurde zuerst bei dem Glycyl-glycinester<sup>7)</sup> und später in zahlreichen anderen Fällen beobachtet und ist deshalb wichtig, weil darauf eine Trennung der Dipeptide von den höheren Polypeptiden beruht. Im Zusammenhang damit steht die Bildung der Diketopiperazine durch

1) Diese Berichte 34, 435 [1901].

2) E. Fischer und U. Suzuki, diese Berichte 38, 4173 [1905].

3) Diese Berichte 39, 469 [1906].

4) E. Fischer und E. Königs, diese Berichte 37, 4601 [1904].

5) E. Fischer und E. Otto, diese Berichte 36, 2112 [1903].

6) E. Fischer und E. Königs, diese Berichte 37, 4589 [1904].

7) E. Fischer und E. Fourneau, diese Berichte 34, 2873 [1901].

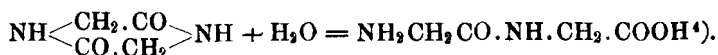
Anhydrisirung der Dipeptide selbst, die in manchen Fällen recht glatt beim Schmelzen erfolgt<sup>1)</sup>.

Eine recht eigenartige Entstehung von Diketopiperazinen wurde bei der  $\alpha$ -Amino- $\gamma$ -oxy-valeriansäure beobachtet<sup>2)</sup>, denn ihr öliges Lacton verwandelt sich schon bei gewöhnlicher Temperatur durch Umlagerung und Polymerisation in das feste Piperazinderivat. Wahrscheinlich wird man den gleichen Vorgang bei anderen  $\alpha$ -Amino- $\gamma$ -oxysäuren wiederfinden.

Endlich erwähne ich noch eine complicirtere Bildungsweise der Dipeptide. Bei der Darstellung des Diglycyl-glycins und des Triglycyl-glycins aus den entsprechenden Chloracetylkörpern wurde als Nebenproduct eine kleine Menge Glycinanhydrid beobachtet<sup>3)</sup>. Hier muss also in geringem Maasse eine hydrolytische Sprengung der Glycinkette stattfinden.

Bildung der Dipeptide aus den 2.5-Diketopiperazinen.

Die Reaction wurde zuerst bei dem Glycinanhydrid beobachtet und führte, wie bereits mehrfach erwähnt, zur Entdeckung des ersten Dipeptids, des Glycyl-glycins. Der Vorgang entspricht der Gleichung:



Er wurde zuerst durch kurzes Erwärmen mit starker Salzsäure bewirkt<sup>4)</sup>, wobei das Hydrochlorat des Dipeptids entsteht und beim starken Abkühlen krystallisirt. Verwendet man an Stelle der wässrigen Lösung alkoholische Salzsäure, so resultirt das Hydrochlorat des Glycyl-glycinesters. Bei den Homologen des Glycinanhydrids stösst die praktische Ausführung der Reaction auf grössere Schwierigkeiten. Bei dem Alaninanhydrid z. B. sind die Producte der Aufspaltung mit Salzsäure sowohl in wässriger wie in alkoholischer Lösung so schwer zu krystallisiren, dass ihre Isolirung bisher nicht gelang, und es bedurfte hier der Ueberführung des Alanyl-alaninesters

<sup>1)</sup> Ann. d. Chem. 340, 126 ff. [1905].

<sup>2)</sup> E. Fischer und H. Leuchs, diese Berichte 35, 3798 [1902].

<sup>3)</sup> Diese Berichte 37, 2501 ff. [1904].

<sup>4)</sup> Bei den aromatischen Abkömmlingen des Diketopiperazins, z. B. dem Ditolylderivat  $\text{CH}_3 \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{N} \left\langle \begin{array}{l} \text{CH}_2 \cdot \text{CO} \\ \text{CO} \cdot \text{CH}_2 \end{array} \right\rangle \text{N} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{CH}_3$ , ist die gleiche Reaction schon 1888 von P. W. Abenius und O. Widman (diese Berichte 21, 1662 [1888]) beschrieben worden. Aber an ihre Uebertragung auf die aliphatischen Verbindungen, bei denen allerdings nicht allein die äusseren Eigenschaften, sondern auch die Affinitätsverhältnisse wesentlich anders sind, hat niemand gedacht.

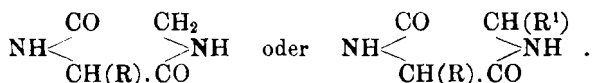
<sup>5)</sup> E. Fischer und E. Fournéau, diese Berichte 34, 2869 [1901].

in seine Carbäthoxylverbindung, um ein reines Präparat zu gewinnen<sup>1)</sup>. Wieder andere Bedingungen waren nöthig bei dem schwer löslichen Leucinanhydrid (Leucinimid). Hier gelang die Verwandlung in Leucyl-leucin am besten durch  $\frac{1}{2}$ -ständiges Erhitzen mit einer bei 0° gesättigten, wässrigen Bromwasserstoffsäure.

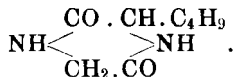
Bequemer ist die Aufspaltung der Diketopiperazine durch verdünntes Alkali<sup>2)</sup>. Bei Anwendung von Normalnatronlauge vollzieht sich die Verwandlung des Glycinanhydrids in das Dipeptid bei gewöhnlicher Temperatur schon in 15—20 Minuten, und die Isolirung des Dipeptids bietet gar keine Schwierigkeiten, besonders wenn man das Alkali nicht durch Salzsäure, sondern durch Jodwasserstoff oder Essigsäure abstumpft, weil die hierdurch entstehenden Natriumverbindungen in Alkohol leicht löslich sind und sich deshalb bequem vom Glycyl-glycin trennen lassen. Nach [diesem Verfahren wurde auch ohne Schwierigkeit das bis dahin unbekannte racemische Alanyl-alanin gewonnen<sup>3)</sup>.

Langsamer erfolgt der Angriff des Alkalis bei den kohlenstoffreicheren Diketopiperazinen; denn bei dem Anhydrid der  $\alpha$ -Aminobuttersäure ist bei gewöhnlicher Temperatur schon tagelanges Schüteln nothwendig<sup>4)</sup>. Aehnliches wurde beim Anhydrid des Histidins beobachtet<sup>5)</sup>. Allerdings geht die Aufspaltung bei höherer Temperatur rascher von statten, aber dabei entsteht dann auch die Gefahr, dass die Hydrolyse weiter bis zur Bildung von Aminosäuren fortschreitet. Bei dem Leucinanhydrid<sup>6)</sup> ist die Schwierigkeit noch grösser, sodass die Reaction hier noch nicht durchgeführt werden konnte.

Eine besondere Betrachtung verdienen die unsymmetrisch substituirten Diketopiperazine von der Formel:



Sie entsprechen zwei verschiedenen Dipeptiden, aus denen sie einerseits entstehen und [in die sie andererseits durch Aufspaltung zurückgehen können. Dieser Fall wurde experimentell geprüft bei dem Leucyl-glycin-anhydrid,



<sup>1)</sup> Diese Berichte 35, 1103 [1902].

<sup>2)</sup> Diese Berichte 38, 607 [1905].

<sup>3)</sup> E. Fischer und K. Kautzsch, diese Berichte 38, 2375 [1905].

<sup>4)</sup> Nach Versuchen von Dr. K. Raske. <sup>5)</sup> Diese Berichte 38, 4185 [1905].

<sup>6)</sup> Diese Berichte 38, 609 [1905].

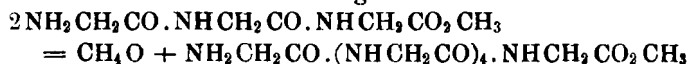
Es entsteht sowohl aus dem Leucyl-glycin wie aus dem Glycyl-leucin durch Abspaltung von Wasser<sup>1)</sup> und liefert bei der Aufspaltung mit Alkali wieder beide Dipeptide<sup>2)</sup>, allerdings in ungleicher Menge.

Zu erwähnen ist endlich die ziemlich weitgehende Racemisirung, die beim Aufspalten des *d*-Alanin-anhydrids mit Alkali eintritt<sup>3)</sup>.

#### Synthese der Polypeptide mittels der Ester.

Während die Ester der einfachen  $\alpha$ -Aminosäuren unter Abgabe von Alkohol so leicht in Diketopiperazine übergehen, führt die Reaction bei der Diamino-propionsäure nur bis zum Ester des Dipeptids. Der Grund dafür ist vielleicht der, dass die Kuppelung hier an der in  $\beta$ -Stellung befindlichen Aminogruppe erfolgt und dadurch die Bildung eines Piperazinringes unmöglich wird. In der That verhält sich das Isoserin ebenso, während der Methylester des Serins, das eine  $\alpha$ -Aminosäure ist, unter den gleichen Bedingungen ein Diketopiperazin liefert<sup>4)</sup>.

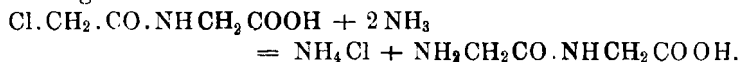
Die grosse Neigung der Ester zur Abspaltung von Alkohol ist auch noch bei den höheren Polypeptiden vorhanden. Curtius hat sie zuerst für den Aethylester des Triglycyl-glycins<sup>5)</sup> erwähnt, und ich habe sie bald nachher bei dem Derivat des Diglycyl-glycins beobachtet<sup>6)</sup>. Viel glatter geht nach meiner Erfahrung der Vorgang bei den Methylestern. So konnte ich zeigen, dass der Methylester des Diglycyl-glycins bei 100° sehr rasch nach der Gleichung



in den Methylester des Hexapeptids übergeht, aus dem das Hexapeptid durch Verseifung leicht zu erhalten ist<sup>7)</sup>. Voraussichtlich wird dieses Verfahren beim Aufbau complicirterer Systeme noch recht gute Dienste leisten.

#### Synthese der Polypeptide mittels der Halogenacyl-Verbindungen.

Ebenso leicht wie die gewöhnlichen Säureradiale lassen sich die halogenhaltigen Acyle in die Aminosäuren einführen, und durch nachträgliche Behandlung der Producte mit Ammoniak entstehen Dipeptide. Für das Glycyl-glycin wird der Vorgang durch folgende Gleichung veranschaulicht:



<sup>1)</sup> Ann. d. Chem. 340, 127 [1905].

<sup>2)</sup> Nach Versuchen von Hrn. Schrauth, die noch nicht publicirt sind.

<sup>3)</sup> Diese Berichte 39, 469 [1906].

<sup>4)</sup> E. Fischer und U. Suzuki, diese Berichte 38, 4174 [1905].

<sup>5)</sup> Diese Berichte 37, 1300 [1904].    <sup>6)</sup> Diese Berichte 37, 2501 [1904].

<sup>7)</sup> Diese Berichte 39, 453 [1906].

Das Dipeptid lässt sich dann von neuem mit dem Halogenacyl verkuppeln, und abermalige Behandlung mit Ammoniak liefert jetzt das Diglycyl-glycin:



Die Synthese wurde bis zu dem Pentapeptid fortgeführt, aber die Grenze ihrer Leistungsfähigkeit ist damit sicher noch nicht erreicht. Zur Einführung des Halogenacyls in die Aminosäure oder das Polypeptid stehen zwei Methoden zur Verfügung: Einwirkung des Halogenacylchlorids auf die alkalische Lösung der Aminosäure bzw. des Polypeptids oder auf die Lösung ihrer Ester. Der erste Weg ist der bequemere und giebt in vielen Fällen ausgezeichnete Resultate. Bei einfacheren Halogenacylchloriden, wie Chloracetylchlorid oder Brompropionylbromid, die schon von Wasser sehr rasch zersetzt werden, muss die Operation bei sehr niederer Temperatur ausgeführt werden und liefert trotzdem in manchen Fällen keine gute Ausbeute.

Bei dem zweiten Verfahren, d. h. bei der Anwendung der Ester, verläuft die Reaction in der Regel glatter, besonders in wasserfreien Lösungsmitteln wie Aether, Petroläther, Chloroform; aber sie hat den Nachtheil, dass man 2 Mol. Ester auf 1 Mol. des Säurechlorids verwenden muss, da die Hälfte des Esters als Hydrochlorat der Reaction entzogen wird. Der Uebelstand fällt allerdings weg, wenn man in wässriger Lösung in Gegenwart von Alkali oder Alkalicarbonat arbeitet, aber auch dann ist noch eine nachträgliche Verseifung des Esters erforderlich, die ebenfalls Verluste von wechselnder Grösse durch Veränderung des halogenhaltigen Radicals mit sich bringen kann. Im allgemeinen wird man also die Ester nur dann benutzen, wenn die Reaction in wässriger Lösung schlecht verläuft, oder wenn das anzuwendende Halogenacylchlorid verhältnissmässig kostspielig ist.

Als Halogenacylchloride kamen selbstverständlich vorzugsweise die in Betracht, die den  $\alpha$ -Aminosäuren und zwar den in der Natur vorkommenden entsprechen. Bisher wurden benutzt:

Chlor-(Brom)-acetylchlorid	zur Einführung des Glycyl;
$\alpha$ -Brom-propionylchlorid (bromid)	» » » Alanyl;
actives <i>l</i> - $\alpha$ -Brom-propionylchlorid	» » » activen Alanyl;
$\alpha$ -Brom-butyrylchlorid	» » » $\alpha$ -Aminobutyryl;
$\alpha$ -Brom-isocapronylchlorid	» » » Leucyl;
$\alpha$ -Brom-phenylacetylchlorid	» » » Phenylglycyl;
$\alpha$ -Brom-hydrozimmtsäurechlorid	» » » Phenylalanyl;
$\alpha,\delta$ -Dibrom-valerylchlorid	» » » Prolyl.

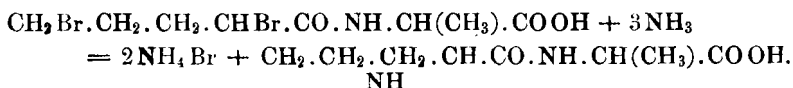
Die Mehrzahl dieser Chloride musste für die Zwecke der Synthese erst bereitet werden und für einige davon, wie das Brom-isoca-



pronyl-<sup>1)</sup> und das Brom-hydrozimmtsäure-Chlorid<sup>2)</sup>, fehlte auch noch die Synthese der zugehörigen Säuren.

Einer besonderen Erläuterung bedarf die Benutzung des  $\alpha,\delta$ -Dibromvalerylchlorids zur Bereitung von Prolylverbindungen. Die Wirkung des Ammoniaks führt hier nämlich nicht zur Substitution beider Halogene durch Amid, sondern es wird statt dessen der Ring des Pyrrolidins erzeugt.

Speziell studirt wurde der Vorgang bei dem  $\alpha,\delta$ -Dibromvalerylalanin, dessen Umwandlung in Prolyl-alanin<sup>3)</sup> durch folgende Gleichung wiedergegeben wird:



Mit der Halogenacyl-Methode sind die meisten bisher bekannten Polypeptide gewonnen worden. Die Zahl der Halogenacyle kann gewiss noch vergrössert werden, und ich habe die Hoffnung, dass man bei Verwendung von  $\alpha,\beta$ -,  $\alpha,\gamma$ - und  $\alpha,\varepsilon$ -Dibromacylen auch das Radical der Diamino- bzw. Oxyamino-Säuren einführen kann.

Als anderer Component sind ausser den gewöhnlichen Aminosäuren auch die Oxyaminoverbindungen, wie Tyrosin<sup>4)</sup> und Isoserin<sup>5)</sup>, oder Prolin<sup>6)</sup> und endlich complicirtere Substanzen, wie Cystin<sup>7)</sup>, bereits mit Erfolg benutzt worden.

In einem Falle hat bisher die Methode versagt. Das Halogen-succinyl nämlich kann in den Combinationen mit Aminosäuren nicht in Asparagyl verwandelt werden, sondern liefert ausschliesslich Fumaryl-derivate; aber glücklicherweise kann in diesem besonderen Falle der Schaden durch ein Specialverfahren ausgeglichen werden, denn diese Fumarylkörper addiren beim Erhitzen mit starkem, wässrigem Ammoniak die Base unter Bildung von Asparagyl-Verbindungen. Auf diese

Weise wurden Asparagyl-di-alanin,  $\text{CH}_2\text{CO} \cdot \text{NH} \cdot \text{CH}(\text{CH}_3) \cdot \text{COOH}$ ,  $\text{NH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CO} \cdot \text{NH} \cdot \text{CH}(\text{CH}_3) \cdot \text{COOH}$ , und Asparagyl-mono-glycin gewonnen<sup>8)</sup>. Wahrscheinlich wird sich die letzte Reaction auch auf Verbindungen von einfachen ungesättigten Acylen ausdehnen lassen; aber es besteht dann die Gefahr, dass die

<sup>1)</sup> Diese Berichte 36, 2988 [1903]; 37, 2492 [1904].

<sup>2)</sup> Diese Berichte 37, 3062 [1904].

<sup>3)</sup> E. Fischer u. U. Suzuki, diese Berichte 37, 2842 [1904].

<sup>4)</sup> Diese Berichte 37, 2495 [1904].

<sup>5)</sup> E. Fischer u. F. Kölker, Ann. d. Chem. 340, 172 [1905].

<sup>6)</sup> E. Fischer u. E. Abderhalden, diese Berichte 37, 3071 [1904].

<sup>7)</sup> E. Fischer u. U. Suzuki, diese Berichte 37, 4575 [1904].

<sup>8)</sup> E. Fischer u. E. Königs, diese Berichte 37, 4585 [1904].

Aminogruppe nicht in die  $\alpha$ -, sondern wie bei den ungesättigten Säuren in die  $\beta$ -Stellung eintritt.

#### Aufbau der Polypeptide durch Verlängerung der Kette am Carboxyl.

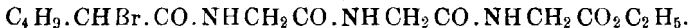
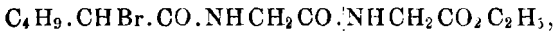
Dass man bei den Benzoylderivaten der Aminosäuren mit Hilfe der Ester und der Azide in dieser Richtung aufbauen kann, hat Curtius in weitgehender Weise gezeigt. Ich selbst habe für die Carbäthoxylverbindungen eine ähnliche Methode gefunden, bei der die Chloride, die man durch Behandlung mit Thionylchlorid gewinnt, in Anwendung kommen. Beide Verfahren sind in der historischen Einleitung ausführlich besprochen.

Für die Synthesen der Polypeptide kommen sie nicht in Betracht, da es bisher kein Mittel giebt, das Benzoyl oder das Carbäthoxyl ohne Schädigung des ganzen Systems abzuspalten.

Um diese Schwierigkeit zu umgehen, habe ich die gleiche Reaction auf die Halogenacyl-Verbindungen ausgedehnt und dadurch eine sehr brauchbare Methode für die Darstellung von Polypeptiden gewonnen.

Für die Chlorirung des Carboxyls hat sich aber das Thionylchlorid in den meisten Fällen nicht bewährt. Ich musste vielmehr auf das Phosphorpentachlorid zurückgreifen, kam aber damit erst zum Ziel, als gleichzeitig Acetylchlorid zur Lösung verwendet wurde.

Der erste erfolgreiche Versuch betraf das  $\alpha$ -Bromisocapronylglycin<sup>1)</sup>. Bei der Behandlung mit Acetylchlorid und Phosphorpentachlorid liefert es ein Product, das zwar nicht analysirt werden konnte, das aber nach seinem ganzen Verhalten sehr wahrscheinlich die Structur  $C_4H_9.CHBr.CO.NHCH_2CO.NHCH_2CO_2C_2H_5$  hat. Dieses lässt sich nun sehr leicht mit den Estern von Aminosäuren oder Polypeptiden verkuppeln. So entstehen z. B. mit Glycin-äthylester und Glycyl-glycinester<sup>2)</sup> folgende beide Verbindungen:



Durch Verseifung und nachträgliche Behandlung mit Ammoniak wird die erste in das Leucyl-glycyl-glycin und die zweite in das Leucyl-diglycyl-glycin verwandelt. Dass das Verfahren auch noch bei complicirteren Systemen verwendbar ist, beweist das Verhalten des  $\alpha$ -Bromisocapronyl diglycyl-glycins<sup>3)</sup>.

Die Darstellung des Chlorids gelingt hier sogar besonders leicht, und dieses lässt sich nicht allein mit Glykocollester, sondern ebenso

<sup>1)</sup> Diese Berichte 37, 3070 [1904].

<sup>2)</sup> Diese Berichte 38, 610 [1905].

<sup>3)</sup> Diese Berichte 39, 453 [1906].

leicht mit Glykocoll selbst oder sogar mit Polypeptiden, wie Glycyl-glycin oder Diglycyl-glycin, in alkalischer Lösung kuppeln.

Aus den so resultirenden Brom-Verbindungen konnten dann durch Ammoniak die Polypeptide:

Leucyl-tetraglycyl-glycin und Leucyl-pentaglycyl-glycin gewonnen werden. Diese Methode ist gewiss noch eines weiteren Ausbaus fähig. Sie hat nur den Nachtheil, dass manche Chloride, besonders die einfacher zusammengesetzten, in Acetylchlorid löslich sind und beim Verdampfen der Lösung eine theilweise Zersetzung erleiden.

Dieser Uebelstand fällt weg bei der Uebertragung der Reaction auf die Aminosäuren selbst. Sie werden dadurch, wie oben ausführlich dargelegt ist, in die Hydrochlorate der Aminosäurechloride von

der allgemeinen Formel 
$$\begin{array}{c} \text{R. CH. COCl} \\ | \\ \text{NH}_2\text{Cl} \end{array}$$
 verwandelt, die in der Regel

in Acetylchlorid schwer löslich und deshalb leicht zu isoliren sind<sup>1)</sup>. Werden diese Chlorverbindungen dann bei gewöhnlicher Temperatur mit den Estern der Aminosäuren zusammengebracht, so entstehen meist in guter Ausbeute die Ester der entsprechenden Dipeptide, aus denen man durch Verseifung die Dipeptide selbst gewinnen kann.

Das Chlorirungsverfahren hat sich bei allen einfachen Monoamino-säuren bewährt. Besonders wichtig ist seine Brauchbarkeit bei den optisch-activen Aminosäuren, weil sie einen neuen Weg für die Synthese von optisch-activen Polypeptiden eröffnet<sup>2)</sup>. Versagt hat leider das Verfahren bisher bei den Oxy-amino- und Diamino-Säuren, weil hier phosphorhaltige Producte resultiren.

Dagegen scheint die Reaction einer allgemeineren Anwendung fähig zu sein bei den Polypeptiden. So konnten das Leucyl-glycin und das Leucyl-diglycin in die entsprechenden Chlorderivate übergeführt werden, die durch Combination mit Leucinester und Glycinester ein Tri- bezw. Tetra-peptid lieferten.

Voraussichtlich wird es gelingen, an Stelle der einfachen Aminosäureester auch die Polypeptidester oder an Stelle der Ester die alkalische Lösung der Aminosäuren und Polypeptide bei dieser Synthese zu verwerthen.

#### Synthese von optisch-activen Polypeptiden.

Da alle in der Natur vorkommenden Proteine, sowie ihre Spaltungsproducte: Albumosen, Peptone u. s. w. optisch activ sind, so muss das vornehmste Ziel der Synthese selbstverständlich die Gewinn-

<sup>1)</sup> Diese Berichte 38, 606 und 2914 [1905].

<sup>2)</sup> Diese Berichte 38, 2921 [1905]; 39, 453 [1906].

nung von Polypeptiden sein, die nur die natürlichen optisch-activen Aminosäuren enthalten. Ich habe mich deshalb besonders bemüht, möglichst viele praktische Methoden für diesen Zweck aufzufinden.

Die ersten Erfolge wurden erzielt durch die Uebertragung der Halogenacyl-Methode auf die activen Aminosäuren. Dahin gehört die Synthese des Glycyl-*l*-tyrosins<sup>1)</sup>, des Glycyl-asparagins<sup>2)</sup> und des Diglycyl-cystins<sup>3)</sup>. Complicirter werden die Verhältnisse bei Anwendung von Halogenacylen mit einem asymmetrischen Kohlenstoffatom, wie  $\alpha$ -Brom-propionylbromid oder  $\alpha$ -Brom-isocapronylchlorid, denn ihre Combination mit einer activen Aminosäure muss ein Gemisch von zwei isomeren optisch-activen Halogenverbindungen bezw. Dipeptiden liefern. In einzelnen Fällen, wie bei dem *d*- und *l*-Leucyl-asparagin lassen sich diese beiden Formen durch Krystallisation trennen, und man erhält dann einheitliche optisch-active Dipeptide<sup>4)</sup>. Gewöhnlich aber sind die Löslichkeitsverhältnisse der stereoisomeren Körper so ähnlich, dass ihre Scheidung durch Umlösen nicht gelingt. Aus diesem Grunde ist die Einheitlichkeit mancher der früher beschriebenen activen Polypeptide, wie Leucyl-*l*-tyrosin<sup>5)</sup>, Leucyl-asparaginsäure<sup>6)</sup>, zweifelhaft.

Einen besonderen Fall bieten das Dialanyl- und Dileucyl-Cystin, denn hier ist auch die Möglichkeit vorhanden, dass ein einheitliches Molekül entsteht<sup>7)</sup>, welches sowohl die *d*- wie die *l*-Form des Alanyls bezw. Leucyls enthält.

Eine zweite Methode beruht auf der Anwendung optisch-activer Halogenacyle. Mit Hülfe des linksdrehenden  $\alpha$ -Brom-propionylchlorids wurde die Synthese des *l*-Alanyl-glycins<sup>8)</sup> ausgeführt. Leider aber sind die activen Halogenacylchloride, bezw. die entsprechenden Halogenfettsäuren schwer zugänglich, und selbst in dem vorstehenden Falle enthielt das Dipeptid nicht das natürliche *d*-Alanin, sondern den optischen Antipoden.

Um diese Schwierigkeit zu umgehen, habe ich versucht, die racemischen Halogenacyl-aminosäuren, z. B. das  $\alpha$ -Bromisocapronyl-glycin, durch Alkaloide in die optisch-activen Componenten zu spalten, aber bisher keinen rechten Erfolg gehabt.

1) Diese Berichte 37, 2495 [1904].    2) Diese Berichte 37, 4587 [1904].

3) Diese Berichte 37, 4577 [1904].

4) Diese Berichte 37, 4591 [1904] und nach weiteren, noch nicht publicirten Versuchen von Dr. E. Königs.

5) Diese Berichte 37, 2498 [1904].    6) Diese Berichte 37, 4593 [1904].

7) Fischer und Suzuki, diese Berichte 37, 4575 [1904].

8) Fischer und Warburg, Ann. d. Chem. 340, 165 [1905].

Recht werthvoll scheint mir endlich für den Aufbau activer Polypeptide die zuvor schon erwähnte Verwendung der Chloride von activen Aminosäuren. Genauer geprüft ist sie bei dem *d*-Alanin, dessen Chlorid mit den Estern des Glykocolls und des *d*-Alanins combinirt wurde, wobei einerseits das *d*-Alanyl-glycin und andererseits das *d*-Alanyl-*d*-alanin resultirte. Da das Verfahren aller Wahrscheinlichkeit nach auch für die activen Polypeptide angewandt werden kann, so wird es voraussichtlich für die Bereitung complicirterer optisch-activer Formen noch eine grosse Rolle spielen.

Mit Hilfe der zuvor zusammengestellten Methoden sind bisher nahezu 70 Polypeptide der verschiedensten Zusammensetzung bereitet worden, die ich zur leichteren Uebersicht in der folgenden Tabelle zusammenstelle. Bei jeder Verbindung ist die hauptsächlichste Literaturstelle mit denselben Abkürzungen wie in der ersten Tabelle (S. 548—551) zugefügt.

## Tabelle der Polypeptide.

## Dipeptide.

- Glycyl-glycin (B. 34, 2870).  
 Glycyl-*dl*-alanin (B. 37, 2489).  
 Glycyl-*d*-alanin (noch nicht publicirt).  
*dl*-Alanyl-glycin (A. 340, 130), Fischer und Axhausen.  
*d*-Alanyl-glycin (B. 38, 2921).  
*l*-Alanyl-glycin (A. 340, 165), Fischer und Warburg.  
 Alanyl-alanin (inact.) (B. 38, 2376), Fischer und Kautzsch.  
*d*-Alanyl *d*-alanin (B. 39, 465).  
 $\alpha$ -Aminobutyryl-glycin (A. 340, 182) Fischer und Raske.  
 $\alpha$ -Aminobutyryl- $\alpha$ -Aminobuttersäure A } (A. 340, 187) Fischer  
 » » B } und Raske.  
 Glycyl *dl*-leucin (A. 340, 157), Fischer und Warburg.  
*dl*-Leucyl-glycin (A. 340, 144), Fischer und Brunner.  
 Alanyl-leucin A } (A. 340, 154, 155), Fischer und Warburg.  
 » » B }  
 Leucyl-alanin (A. 340, 160), Fischer und Warburg.  
 Leucyl-isoserin A } (A. 340, 174, 175), Fischer und Kölker.  
 » » B }  
 Leucyl-leucin (B. 35, 1104 und 37, 2491).  
 Phenylglycyl-glycin (A. 340, 192) } Fischer und  
 Phenylglycyl-alanin A } (A. 340, 197) } Schmidlin.  
 » » B }  
 Glycyl-phenylalanin (B. 37, 3313) }  
 Alanyl-phenylalanin (ibid.) } Leuchs und Suzuki.  
 Leucyl-phenylalanin A } (B. 37, 3308) }  
 » » B }

## Dipeptide.

- Phenylalanyl-glycin (B. 38, 2919).  
 Phenylalanyl-phenylalanin (B. 37, 3068).  
 Glycyl-*l*-tyrosin (B. 37, 2495).  
 Leucyl-*l*-tyrosin (B. 37, 2498).  
 Seryl-serin (B. 38, 4195) }  
 Isoseryl-isoserin (B. 38, 4193) } Fischer und Suzuki.  
 Glycyl-asparagin (B. 37, 4587) }  
 Leucyl-asparagin (B. 37, 4591) } Fischer und Königs.  
 Phenylglycyl-asparagin (A. 340, 199), Fischer und Schmidlin.  
 Leucyl-asparaginsäure (B. 37, 4593) }  
 Asparagyl-monoglycin (B. 37, 4594) } Fischer und Königs.  
*dl*-Prolyl-alanin (B. 37, 2845), Fischer und Suzuki.  
 Leucyl-prolin (inactiv) (B. 37, 3074), Fischer und Abderhalden.

## Dipeptide der Diaminosäuren.

- Diamino-propionsäure-Dipeptid } (B. 38, 4173), Fischer und  
 Lysyl-lysin }  
 Histidyl-histidin } Suzuki.

## Tripeptide.

- Diglycyl-glycin (B. 36, 2983 und 37, 2500).  
*dl*-Alanyl-glycyl glycin (B. 36, 2987).  
 Dialanyl-alanin (B. 38, 2384), Fischer und Kautzsch.  
*dl*-Leucyl-glycyl-glycin (B. 36, 2990).  
 Leucyl-alanyl-alanin A }  
 » » » B } (B. 38, 2381), Fischer und Kautzsch.  
 Glycyl-leucyl-alanin (A. 340, 164), Fischer und Warburg.  
 Alanyl-leucyl-glycin (A. 340, 150), Fischer und Brunner.  
 Leucyl-alanyl-glycin A } (A. 340, 136, 137), Fischer und Ax-  
 » » » B } hausen.  
*dl*-Phenylalanyl-glycyl-glycin (B. 37, 3066).  
 Diglycyl-phenylalanin (B. 37, 3315) }  
 Leucyl-glycyl-phenylalanin (B. 37, 3314) } Leuchs und  
 Dileucyl-phenylalanin oder }  
 Leucyl- $\alpha$ -leucylphenylalanin (B. 37, 3311) } Suzuki.  
 Asparagyl-dialanin (B. 37, 4597), Fischer und Königs.

## Tetrapeptide.

- Triglycyl-glycin (B. 37, 2501).  
*dl*-Leucyl-diglycyl-glycin (B. 38, 611).  
 Dileucyl-glycyl-glycin (B. 37, 2506).  
 Diglycyl-cystin (B. 37, 4577) }  
 Dialanyl-cystin (B. 37, 4579) } Fischer und Suzuki.  
 Dileucyl-cystin (B. 37, 4580) }

## Pentapeptide.

Tetraglycyl-glycin (B. 37, 2507).

## Hexapeptide.

Pentaglycyl glycin (B. 39, 472).

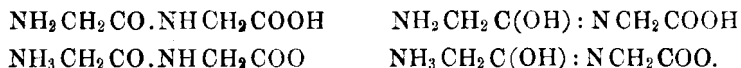
Leucyl-tetraglycyl-glycin (B. 39, 460).

## Heptapeptide.

Leucyl-pentaglycyl-glycin (B. 39, 461).

## Structur der Polypeptide und Diketopiperazine.

Die Resultate der Synthese und alle bisher bekannten Metamorphosen der Polypeptide führen übereinstimmend zu dem Schlusse, dass in ihnen die Aminosäuren amidartig verkuppelt sind. Dies gilt auch für die Derivate der Oxyaminosäuren, z. B. die Leucyl-isoserine, bei denen die zweite Möglichkeit, nämlich eine esterartige Verkuppelung der Componenten, durch eine besondere Untersuchung ausgeschlossen werden konnte<sup>1)</sup>. Trotz dieser Vereinfachung bleibt die Frage nach der Structur und der Möglichkeit von isomeren Formen bei den Polypeptiden immer noch complicirt genug; denn bei ihnen vereinigen sich die Streitpunkte, welche bezüglich der Structur der Amide und der Aminosäuren bisher unerledigt geblieben sind. Wir haben also einerseits mit der Möglichkeit von Lactam- und Lactim-Formen und andererseits mit dem Gegensatz von freier Aminosäure und intramolekularem Salz zu rechnen. Für das Glycyl-glycin ergeben sich daraus folgende vier Formeln:



Da es nach den bisher vorliegenden Beobachtungen unmöglich ist, eine Auswahl zwischen ihnen zu treffen, so habe ich der Einfachheit halber nur die erste Formel gebraucht. Ich halte es aber keineswegs für überflüssig, bei einem gründlicheren Studium der Polypeptide auch die übrigen Formen, deren Zahl natürlich mit der Grösse des Moleküls sich vermehrt, in's Auge zu fassen. Schon jetzt habe ich bei einigen Polypeptiden Beobachtungen gemacht, die auf verschiedene Zustände hinzudeuten scheinen. So ist das Leucyl-diglycyl-glycin im amorphen Zustand in Alkohol leicht löslich; erwärmt man aber die alkoholische Flüssigkeit auf dem Wasserbade, so beginnt nach einiger Zeit die Abscheidung des krystallinischen Tetrapeptids, das nun in Alkohol sehr schwer löslich ist<sup>2)</sup>.

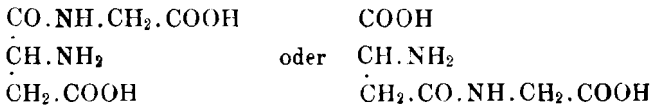
1) Ann. d. Chem. 340, 177 [1905].

2) Diese Berichte 38, 611 [1905].

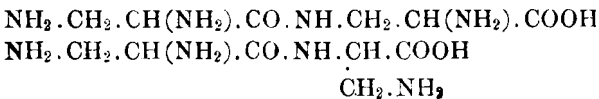
Eine besondere Art von Isomerie, deren Ursache bisher auch noch nicht aufgeklärt ist, hat sich bei den Carbäthoxylverbindungen der Polypeptide gezeigt. Die Erscheinung wurde zuerst beobachtet bei dem Carbäthoxyl-glycyl-glycinester; die daraus durch Verseifung mit Alkali entstehende Glycyl-glycin-carbonsäure,  $\text{HO}_2\text{C.NH.CH}_2\text{.CO.NH.CH}_2\text{.CO}_2\text{H}$ , giebt nämlich bei der Behandlung mit alkoholischer Salzsäure einen ebenfalls neutralen Ester, der mit der ursprünglichen Verbindung isomer ist. Ich habe die Ester vorläufig als  $\alpha$ - und  $\beta$ -Verbindung unterschieden und musste die Feststellung ihrer Structur weiteren Versuchen überlassen.

Die gleiche Art der Isomerie wurde bei dem Carbäthoxyl-diglycyl-glycinester und endlich auch bei den entsprechenden Doppelamiden beobachtet<sup>1)</sup>.

Eine weitere Complication erfährt die Frage nach der Structur der Polypeptide, wenn sie Amino-dicarbonensäure oder Diaminosäure enthalten. So musste für das Asparagyl-monoglycin die Wahl zwischen den beiden Formeln

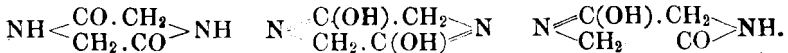


offen bleiben<sup>2)</sup>. Ebenso wenig konnte für das Dipeptid der Diaminopropionsäure eine Entscheidung zwischen den Formeln



getroffen werden<sup>3)</sup>.

In nächster Beziehung zu den Dipeptiden stehen die Diketopiperazine. Auch bei ihnen hat man ausser der üblichen Ketoform die Enolform zu berücksichtigen. Für die einfachste Verbindung der Klasse, das Glycinanhydrid, sind also drei Möglichkeiten gegeben:



Bei der Aufspaltung des Alaninanhydrids durch Alkali wurde in der That die vorübergehende Bildung einer Alkaliverbindung beobachtet, die allerdings nicht analysirt worden ist, die man aber mit einem ziemlich grossen Grad von Wahrscheinlichkeit als das Derivat einer Enolform betrachten darf<sup>4)</sup>.

<sup>1)</sup> Diese Berichte 36, 2096 [1903].

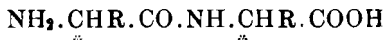
<sup>2)</sup> Diese Berichte 37, 4594 [1904].      <sup>3)</sup> Diese Berichte 38, 4173 [1905].

<sup>4)</sup> Diese Berichte 38, 609 und 2376 [1905].



Configuration der Polypeptide<sup>1)</sup>.

Mit Ausnahme des Glykocolls enthalten alle  $\alpha$ -Aminosäuren, um die es sich bei den vorliegenden Synthesen vorzugsweise handelt, ein asymmetrisches Kohlenstoffatom. Bei den Polypeptiden berechnet sich also die Zahl der selbstständigen optischen Isomeren nach der bekannten van 't Hoff'schen Formel zu  $2^n$ . Z. B. ein Dipeptid von der allgemeinen Formel:



muss wegen der beiden durch Sternechen markirten, asymmetrischen Kohlenstoffatome in vier activen Formen existiren, von denen je zwei eine racemische Verbindung bilden können. Bei Benutzung von racemischem Rohmaterial ist also a priori die Bildung von zwei isomeren inactiven Substanzen zu erwarten, und diese müssen schon auftreten bei den halogenhaltigen Zwischenproducten:



Derselbe Schluss gilt natürlich auch für die Umwandlung eines Dipeptids in Tripeptid, mit anderen Worten, für die Ankuppelung jeder weiteren Aminosäure mit einem asymmetrischen Kohlenstoffatom. Diese Isomerie ist zuerst bei dem Leucyl-phenylalanin<sup>2)</sup> beschrieben worden. Dazu sind später viele neue Beispiele gekommen: Leucyl-alanyl-glycin, Alanyl-leucin,  $\alpha$ -Aminobutyryl- $\alpha$ -aminobuttersäure, Phenylglycyl-alanin, Leucyl-isoserin<sup>3)</sup>, Leucyl-alanyl-alanin<sup>4)</sup>, und es verdient hervorgehoben zu werden, dass in fünf Fällen die Trennung der Isomeren schon bei den halogenhaltigen Zwischenproducten gelungen ist.

Die bisherigen Betrachtungen sind selbstverständliche Consequenzen der Theorie des asymmetrischen Kohlenstoffatoms, speciell angewandt auf die Bildung der Polypeptide, und ich hatte deshalb keinen Grund, auf ähnliche Beobachtungen bei der Bildung der gewöhnlichen Amide hinzuweisen. Das ist bald nach meiner Publication durch E. Mohr<sup>5)</sup> geschehen, der bei der Darstellung der  $\alpha$ -Phenyl-äthylamide der Benzyl-äthyl-essigsäure ebenfalls zwei Isomere erhielt. Wie in seiner zweiten Abhandlung erwähnt ist, hatten aber schon drei Jahre früher Kipping und Hall ähnliche Resultate bei den Hydrindamiden der Phenylchloroessigsäure erhalten<sup>6)</sup>.

<sup>1)</sup> Diese Berichte 37, 2486 [1904].

<sup>2)</sup> Leuchs u. Suzuki, diese Berichte 37, 3306 [1904].

<sup>3)</sup> Ann. d. Chem. 349, 124 [1905]. <sup>4)</sup> Diese Berichte 38, 2375 [1905].

<sup>5)</sup> Diese Berichte 37, 2702, 3470 [1904] und Journ. für prakt. Chem. [2] 71, 305 [1905].

<sup>6)</sup> Journ. chem. Soc. 79, 445 [1901].

Der Aufbau der Polypeptide hat jedoch ein viel reicheres Material für die Beleuchtung solcher Reactionen gegeben, und ich konnte deshalb die Aufmerksamkeit auf einen anderen theoretisch recht wichtigen Punkt lenken, d. h. auf das Mengenverhältniss, in welchem die beiden möglichen Isomeren praktisch entstehen. Da häufig nur eine einzige Form isolirt werden konnte, so muss man annehmen, dass sie unter der Bedingung der Synthese die begünstigte ist und darum, wenn auch nicht ausschliesslich, so doch in überwiegender Menge entsteht. Theoretisch lässt sich das durch folgende Betrachtung erklären<sup>1)</sup>. Wenn inactives Chlorid und inactive Aminosäure in Lösung zusammentreffen, so spielt sich der Vorgang der Vereinigung zwischen den vier activen Molekülen *d* und *l* einerseits und *d'* und *l'* andererseits ab. Bekanntlich übt aber die sterische Isomerie einen keineswegs untergeordneten Einfluss auf die Geschwindigkeit der Reaction aus. Am deutlichsten zeigt sich das bei der Wirkung der Fermente, wie ich an zahlreichen Beispielen nachweisen konnte<sup>2)</sup>. Aber auch bei einfacheren Molekülen zeigt sich der gleiche Unterschied, wenn auch in viel schwächerem Maasse, wie von Marckwald und Mc Kenzie<sup>3)</sup> nachgewiesen wurde. Man kann sich deshalb auch vorstellen, dass die Reactionen zwischen beiden Paaren von Molekülen mit ungleicher Geschwindigkeit verlaufen, und dass deshalb von den beiden Racemkörpern [*dd'*, *ll'*] und [*dl'*, *ld'*] das eine Paar leichter und deshalb in grösserer Menge als das andere entsteht. Dieser Schluss ist durch die Erfahrung bei der Synthese der Polypeptide vielfach bestätigt worden, denn wo die beiden Isomeren beobachtet wurden, da war in der Regel ihr Mengenverhältniss recht ungleich. In dem Fall, wo nur ein Product isolirt werden konnte, ist die Entscheidung über seine Einheitlichkeit viel schwieriger, da die Isomeren auch so ähnlich sein können, dass sie hartnäckig Mischkrystalle bilden. Ich verweise in der Beziehung auf das Bromisocapronyl-phenylalanin<sup>4)</sup> und das Bromisocapronyl-isoserin<sup>5)</sup>, die beide durch die Umwandlung in je zwei Dipeptide als Gemische erkannt wurden.

Eine besondere Besprechung erfordert noch der Aufbau der optisch-activen Polypeptide. Sind beide Componenten einheitlich active Stoffe, so kann natürlich nur ein Product resultiren; z. B. das Alanyl-alanin aus *d*-Alanylchlorid und *d*-Alaninester muss ein einheitliches optisch-actives Dipeptid sein, das bei der Hydrolyse nur *d*-Alanin

<sup>1)</sup> Diese Berichte **37**, 2487 [1904].

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. physiol. Chem. **26**, 60 [1898].

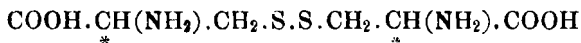
<sup>3)</sup> Diese Berichte **32**, 2130 [1899].

<sup>4)</sup> Leuchs und Suzuki, diese Berichte **37**, 3306 [1904].

<sup>5)</sup> Ann. d. Chem. **340**, 172 [1905].

liefern kann. Anders liegen die Verhältnisse, wenn der eine der Componenten activ und der andere racemisch ist. Dann ist die Entstehung von zwei optisch-activen Substanzen zu erwarten, die aber keine optischen Antipoden sind. Dahin gehören die zahlreichen Combinationen des activen Tyrosins, Asparagins und der Asparaginsäure mit Alanyl, Leucyl, Phenylglycyl. Da die Isomeren hier keine optischen Antipoden sind, so ist die Möglichkeit vorhanden, sie durch blosse Krystallisation zu trennen. Das gelang in der That bei dem Bromisocapronyl-asparagin und führte dann zur Gewinnung der beiden einheitlichen Leucyl-asparagine. In den meisten Fällen ist aber bisher diese Trennung nicht durchgeführt und scheint auch nicht ganz leicht zu sein, weil die Isomeren wegen ihrer grossen Aehnlichkeit offenbar Mischkrystalle bilden, auf die man den von mir<sup>1)</sup> zuerst gebrauchten Ausdruck »partielle Racemie« anwenden kann, und die überall dort anzunehmen sind, wo ein Racemkörper in Combination mit dem activen Rest durch Krystallisation nicht in die beiden isomeren Formen getrennt werden kann<sup>2)</sup>.

Einen eigenartigen Fall, der eine besondere Betrachtung erfordert, bieten die Derivate des Cystins. Diese Aminosäure gleicht, wie ein Blick auf die Structurformel zeigt



in stereo-chemischer Beziehung der activen Weinsäure, denn sie besteht aus zwei gleichen Hälften mit je einem, durch Sternchen markirten, asymmetrischen Kohlenstoffatom, und es ist deshalb gleichgültig, an welcher Aminogruppe Substitution eintritt. »Combinirt man nun Cystin mit zwei Molekülen eines racemischen Säurechlorids, wie  $\alpha$ -Brompropionylchlorid, so können drei isomere, optisch-active Producte entstehen. Werden die beiden Stereoisomeren des Säurechlorides mit *d* und *l* bezeichnet, so hat man für das Dibrompropionyl-cystin die drei Formen *dd*-, *ll*-, *dl*-Dibrompropionyl-cystin. In welchem Mengenverhältniss diese drei Producte gebildet werden, lässt sich theoretisch nicht voraussagen; soviel kann man aber nach den bisherigen Erfahrungen sagen, dass die beiden Combinationen *dd* und *ll* wahrscheinlich annähernd in gleicher Quantität resultiren werden, während die Combination *dl* unabhängig von den anderen ist und deshalb auch das einzige Product der Reaction sein kann<sup>3)</sup>.«

Von den drei bisher bekannten Polypeptiden des Cystins ist nun das Dialanyl-derivat am schönsten und deshalb am genauesten unter-

<sup>1)</sup> Diese Berichte 27, 3225 [1894].

<sup>2)</sup> Vergl. Ladenburg, diese Berichte 31, 524 u. 937 [1898].

<sup>3)</sup> Fischer und Suzuki, diese Berichte 37, 4576 [1904].

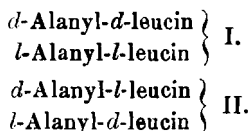
sucht. Das Dibrompropionyl-cystin, aus dem es gewonnen wird, entsteht in einer Ausbeute von 71 pCt. und macht äusserlich den Eindruck einer einheitlichen Substanz. Sollte die weitere Untersuchung seine Homogenität bestätigen, so könnte man aus der Ausbeute und den vorangegangenen Betrachtungen den Schluss ziehen, dass es die *dl*-Verbindung sein muss.

Für die Bezeichnung der optisch-activen Polypeptide werde ich die schon eingebürgerten sterischen Namen der activen Aminosäuren benutzen. Als Beispiele wähle ich die beiden Leucylderivate des Asparagins; sie erhalten die Namen *l*-Leucyl-*l*-asparagin und *d*-Leucyl-*l*-asparagin. Nur das erste ist ein Derivat der in der Natur vorkommenden beiden Aminosäuren, des *l*-Leucins und *l*-Asparagins. Ebenso einfach und unzweideutig lassen sich die Racemformen der Polypeptide, die nur ein asymmetrisches Kohlenstoffatom enthalten, bezeichnen; z. B. sind

*dl*-Leucyl-glycin, Glycyl-*dl*-leucin

die beiden isomeren inactiven Dipeptide.

Complicirter wird diese Art der Bezeichnung bei Racemformen mit mehreren asymmetrischen Kohlenstoffatomen. Als Beispiel wähle ich das Alanyl-leucin. Von ihm haben wir folgende vier optisch-active Formen zu unterscheiden, die zwei durch die Klammern angedeuteten Antipodenpaare bilden



Will man daraus abgekürzte Namen für die Racemformen ableiten, so ergeben sich die Ausdrücke *dl*-Alanyl-*dl*-leucin, *dl*-Alanyl-*ld*-leucin.

Diese Nomenclatur ist selbstverständlich erst dann anwendbar, wenn die Configuration der Polypeptide festgestellt ist. So lange das nicht zutrifft, ist es richtiger, die Unterscheidung der Isomeren durch die nichtssagenden Buchstaben A und B, die dem Namen angehängt werden, zu bewirken.

Als Regel habe ich den Buchstaben A den schwerer löslichen Stoffen beigelegt. Die Feststellung der Configuration von solchen Racemformen kann selbstverständlich am sichersten durch die Synthese der optisch-activen Formen und ihre Vereinigung zu Racemverbindungen geschehen, aber das Verfahren ist recht mühsam und wurde deshalb noch niemals angewandt.

Ein bequemerer Weg ist die Hydrolyse des Polypeptids durch Pankreassaft, die asymmetrisch stattfindet und nach allen bisherigen

Beobachtungen nur die in den natürlichen Proteinen vorkommenden activen Aminosäuren liefert. Da von den beiden oben erwähnten Alanyl-leucinen nur die Verbindung A hydrolysiert wird, so kann man mit einiger Wahrscheinlichkeit schliessen, dass sie mit der obigen Form II identisch ist, weil in ihr die aus den beiden natürlichen Aminosäuren bestehende Combination *d*-Alanyl-*l*-leucin enthalten ist<sup>1)</sup>.

#### Configuration der 2,5-Diketopiperazine.

Die Stereochemie dieser ringförmigen Gebilde ist im wesentlichen die gleiche wie diejenige der offenen Ketten, d. h. die Zahl der optischen Isomeren berechnet sich auch hier nach der Zahl der asymmetrischen Kohlenstoffatome, die aber bei den Derivaten der gewöhnlichen Aminosäuren nur 2 betragen kann. Das Anhydrid des oben erwähnten Alanyl-leucins wird also in 4 optisch-activen und 2 Racemformen existiren, die man sich aus den 4 activen Dipeptiden durch Ringschluss entstanden denken kann.

Bekannt ist davon nur eine racemische Form, die aus dem Leucyl-alanin durch Schmelzen entsteht<sup>2)</sup>. Ob dieses Präparat ganz einheitlich war, erscheint mir allerdings nach den neueren Erfahrungen etwas zweifelhaft, da in anderen Fällen bei der hohen Schmelztemperatur sterische Umlagerungen beobachtet wurden.

Etwas anders liegen die Verhältnisse bei den Diketopiperazinen, die aus zwei Molekülen derselben Aminosäure gebildet sind, also zwei gleiche Substituenten enthalten. Für sie sieht die Theorie nur 4 Formen voraus: nämlich 2 optisch-active Antipoden nebst dem entsprechenden Racemkörper und eine inactive, nicht spaltbare Mesoform, in welcher die Substituenten *trans*-Stellung haben. Die bisherigen Beobachtungen stehen mit dieser Schlussfolgerung ganz in Einklang.

Aus dem *d*-Alanyl-*d*-alanin wurde mit dem Umweg über den Ester das stark active *d*-Alaninanhydrid gewonnen, das die beiden Methylene in *cis*-Stellung enthalten muss<sup>3)</sup>. Dieselbe Verbindung, nur etwas weniger rein, entsteht aus dem Aethyl- oder besser Methyl-Ester des *d*-Alanins durch längeres Erhitzen auf 100°. Bei der umgekehrten Aufspaltung des *d*-Alaninanhydrids zum activen Dipeptid durch verdünntes Alkali bei gewöhnlicher Temperatur wird aber fast die Hälfte racemisirt.

Noch vor der Auffindung des activen Alaninanhydrids ist bei einem complicirteren Diketopiperazin, dem aus Asparaginsäure-äthyl-

<sup>1)</sup> Fischer und Abderhalden, Zeitschr. für physiol. Chem. 46, 54 [1905].

<sup>2)</sup> Fischer und Warburg, Ann. d. Chem. 340, 163 [1905].

<sup>3)</sup> Diese Berichte 39, 453 [1906].

ester durch Wärme entstehenden 2.5-Diketopiperazin-3.6-diessigsäure-diäthylester optische Activität beobachtet worden<sup>1)</sup>.

Einen dritten Fall dieser Art bietet das active Glycin-*d*-alanin-anhydrid, das einerseits von Abderhalden und mir aus Seide<sup>2)</sup> erhalten wurde und andererseits nach Versuchen von Hrn. Arnold Schulze aus Glycyl-*d*-alanin entsteht.

### Eigenschaften der Polypeptide.

Ein Vergleich der bisher gewonnenen Körper in Bezug auf physikalische Eigenschaften ergibt manche Aehnlichkeit, aber auch viele Unterschiede, deren Beachtung für die weitere experimentelle Behandlung der Klasse nützlich sein kann.

In Wasser sind die meisten Glieder der Gruppe leicht löslich. Um so mehr Beachtung verdienen die Ausnahmen; dahin gehören von den Dipeptiden: *dl*-Leucyl-glycin, Leucyl-alanin und Leucyl-leucin, ferner Phenylalanyl-glycin, Phenylalanyl-phenylalanin und die beiden Leucyl-phenylalanine, von Tripeptiden: Leucyl-alanyl-alanin A, Phenylalanyl-glycyl-glycin und Leucyl-glycyl-phenylalanin; von Tetrapeptiden: Dileucyl-glycyl-glycin und endlich das Penta- und Hexapeptid des Glykocolls, die im Gegensatz zu den anderen Glycylderivaten selbst in heissem Wasser schwer löslich sind.

Hervorzuheben ist die Beobachtung, dass die Polypeptide von manchen schwer löslichen Aminosäuren in Wasser spielend leicht löslich sind, wie das Glycyl- und Leucyl-Tyrosin, dass ferner die gemischten Polypeptide in der Regel leichter löslich sind, als die aus gleichartigen Aminosäuren zusammengesetzten Formen<sup>3)</sup>.

Von absolutem Alkohol werden die meisten künstlichen Polypeptide fast garnicht aufgenommen. Eine Ausnahme bildet das Leucyl-prolin, das in Alkohol und sogar in Essigester ziemlich leicht löslich ist.

Die in Wasser schwer löslichen Polypeptide werden sowohl von Mineralsäuren, wie von Alkalien leicht aufgenommen, weil sie damit Salze bilden. Viel geringer ist die Löslichkeit in Essigsäure. Ein gutes Lösungsmittel ist in vielen Fällen auch Alkohol unter Zusatz von wenig wässrigem Ammoniak; beim Wegkochen des Letzteren fällt dann in der Regel das Polypeptid aus.

Einzelne Polypeptide, wie das Leucyl-diglycyl-glycin, sind im amorphen Zustand in Alkohol löslich, werden aber, zumal in der Wärme, in den unlöslichen krystallinischen Zustand übergeführt.

<sup>1)</sup> Fischer und Königs, diese Berichte 37, 4601 [1904].

<sup>2)</sup> Diese Berichte 39, Heft 3 [1906].

<sup>3)</sup> Diese Berichte 39, 473 [1906].

Die meisten Polypeptide schmelzen erst über 200° unter gleichzeitiger Zersetzung (Gasentwicklung und meistens auch Dunkelfärbung). Bei einigen, besonders den reinen Glycinderivaten, erfolgt die Zersetzung ohne Schmelzung. Einen besonders niedrigen Schmp., 116—119°, hat das Leucyl-prolin, das auch in manchen anderen Eigenschaften eine Sonderstellung einnimmt.

Beim Schmelzen gehen die meisten Dipeptide theilweise oder vollständig in die zugehörigen Diketopiperazine über. Bei den übrigen Polypeptiden ist die Veränderung in der Hitze noch wenig untersucht.

Im Gegensatz zu den  $\alpha$ -Aminosäuren schmecken die Polypeptide nicht süß, sondern schwach bitter oder schwach fade; ziemlich stark bitter ist das Leucyl-prolin. Bei isomeren Polypeptiden zeigt sich manchmal eine sehr deutliche Geschmacksdifferenz; so ist das Leucyl-alanin geschmacklos, während die beiden isomeren Alanyl-leucine bitter schmecken. Am Geschmack kann man deshalb in vielen Fällen die Anwesenheit der süßen  $\alpha$ -Aminosäuren neben den Polypeptiden erkennen. Es verdient bemerkt zu werden, dass auch die natürlichen Peptone einen bitteren Geschmack haben.

Im Gegensatz zu den Aminosäuren haben die activen Polypeptide in der Regel ein recht starkes Drehungsvermögen. Ich verweise in dieser Beziehung auf die activen Alanyl-glycine, das *d*-Alanyl-*d*-alanin und die beiden Leucyl-asparagine. Indessen ist das Drehungsvermögen auch hier, wie in anderen Gruppen activer Substanzen, ausserordentlich wechselnd. Multirotation wurde bisher nicht beobachtet; ich werde aber, namentlich bei den complicirteren Substanzen, darauf noch sorgfältig achten, weil ihr Auftreten ein Merkzeichen für die Existenz von leicht veränderlichen Isomeren sein würde.

Gegen Phosphorwolframsäure verhalten sich die einfachen Dipeptide ungefähr so wie die  $\alpha$ -Aminosäuren. Mit der Länge der Kette wächst aber die Fällbarkeit. Schon manche Tripeptide, wie Leucyl-glycyl-glycin werden in nicht zu verdünnter, schwefelsaurer Lösung durch Phosphorwolframsäure sofort gefällt, und derselben Erscheinung begegnet man bei fast allen Tetrapeptiden; die Niederschläge lösen sich meistens im Ueberschuss des Fällungsmittels. Dass die Derivate der Diaminosäuren diese Fällung besonders leicht erleiden, kann nicht überraschen.

Alle gewöhnlichen Polypeptide färben sich beim Kochen der wässrigen Lösung mit gefällttem Kupferoxyd sofort blau, oder zuweilen auch blau-violett; sie unterscheiden sich dadurch von den cyclischen Diketopiperazinen, die beim kurzen Kochen diese Färbung nicht geben.

Eine Ausnahme bildet auch hier das Leucyl-prolin, das wohl in Folge seiner eigenartigen Structur selbst beim längeren Kochen kein Kupferoxyd aufnimmt und deshalb keine Färbung liefert.

Die meisten Kupfersalze der Polypeptide sind in Wasser leicht löslich und ziemlich schwierig zu krystallisiren. Einige lösen sich auch in Alkohol; analysirt sind bisher nur wenige. Das schönste davon ist das Kupfersalz des Leucyl-glycins, das die etwas ungewöhnliche Formel<sup>1)</sup>



hat. Einfacher zusammengesetzt ist das Salz des Phenylglycyl-glycins,  $C_{10}H_{10}O_3N_2Cu$ , in welchem zwei Wasserstoffatome des Dipeptids durch das Metall ersetzt sind<sup>2)</sup>.

Interessanter als die reinen Kupfersalze sind die Alkali-Kupfer-Verbindungen, die bei der sogenannten Biuretprobe in Betracht kommen. Diese Probe, die bekanntlich als charakteristisch für die natürlichen Peptone angesehen wird, fällt bei einer ganzen Reihe von Polypeptiden positiv aus.

Für die reinen Glycinderivate tritt sie zuerst bei dem Tetrapeptid ein; dagegen habe ich sie schon bei den meisten Tripeptiden anderer Zusammensetzung, wenn auch manchmal ziemlich schwach, gefunden. In der Regel wird sie aber mit der Verlängerung der Kette erheblich stärker. Bemerkenswerth ist, dass die Färbung auch bei der Veresterung des Carboxyls intensiver wird, wie der Vergleich zwischen Triglycyl-glycin und seinem Aethylester, der sogenannten Biurethbase von Curtius, zeigt. Dieselbe Wirkung hat die Amidirung des Carboxyls<sup>3)</sup>.

Für die praktische Anstellung der Probe bleibt zu beachten, dass man zu der ziemlich stark alkalischen Lösung des Polypeptids das Kupfersalz in relativ kleiner Menge zufügen muss, weil der Ueberschuss von Kupfer in manchen Fällen die ursprüngliche violette Färbung in Blau umschlagen lässt. Von Dipeptiden hat bisher nur das Derivat der Diaminopropionsäure die Reaction gezeigt, aber ich muss dazu bemerken, dass die Einheitlichkeit und völlige Reinheit dieses Präparats nicht gewährleistet ist.

#### Derivate und Spaltungen der Polypeptide.

Bei den Polypeptiden spielen die Aminogruppen und das Carboxyl die gleiche Rolle wie bei den Aminosäuren. Dass letzteres in die Säurechloridgruppe verwandelt werden kann, und dass in die Aminogruppe sich leicht ein halogenhaltiges Säureradical einführen lässt, ist schon bei der Besprechung der synthetischen Methoden angeführt. Aber auch andere Acyle können ebenso leicht hier angekuppelt wer-

<sup>1)</sup> Ann. d. Chem. 340, 145.      <sup>2)</sup> Ann. d. Chem. 340, 193 [1905].

<sup>3)</sup> Diese Berichte 35, 1105 [1902].



den, indem man die alkalische Lösung des Polypeptids mit dem betreffenden Säurechlorid schüttelt. Ausser einigen Benzoylderivaten wurden so insbesondere auch Verbindungen der  $\beta$ -Naphthalinsulfosäure dargestellt<sup>1)</sup>, die meist in Wasser ziemlich schwer löslich sind und sich dann zur Abscheidung oder auch zur Erkennung des betreffenden Polypeptids eignen. Ebenso leicht lässt sich die Carbäthoxygruppe mit Hilfe von Chlorkohlensäureester<sup>2)</sup> einführen.

Erwähnenswerth ist endlich die leichte Bildung der Phenylisocyanat-Verbindungen, die aber hier nicht so wichtig sind, wie für die Abscheidung und Erkennung der Aminosäuren, weil sie keine besonders schöne Eigenschaften haben und auch nicht in die besser krystallisirenden Phenylhydantoine übergeführt werden können.

Ungleich wichtiger sowohl für die Erkennung und Trennung, als auch für den höheren Aufbau der Polypeptide sind ihre Ester. Sie entstehen ebenso leicht wie die Derivate der Aminosäuren durch Einwirkung von alkoholischer Salzsäure. Vermeidet man dabei längeres Erwärmen, so ist die Gefahr einer Hydrolyse des Polypeptids gering. In einzelnen Fällen, wo die Polypeptide selbst nicht krystallisiren, habe ich ihre Ester oder deren Salze für die Analyse benutzt.

Besonders häufig haben die Ester für weitere Synthesen, oder für die Gewinnung anderer Derivate gedient. Ich will deshalb kurz die Veränderungen zusammenstellen, die bisher bei ihnen beobachtet wurden.

Durch kalte, verdünnte Alkalien lassen sie sich glatt verseifen, ohne dass Hydrolyse des Polypeptids eintritt. Merkwürdigerweise erfolgt diese Verseifung bei der Behandlung mit heissem Wasser durchaus nicht glatt. Die Ester der Dipeptide gehen dabei vielmehr zum Theil in Diketopiperazine über, und die Ester der höheren Peptide erfahren eine complicirtere Veränderung, die noch nicht genügend aufgeklärt ist. Aehnliche Verhältnisse wurden bei den Dipeptiden der Diaminosäuren und des Isoserins beobachtet.

Durch alkoholisches Ammoniak gehen die Ester der Dipeptide ziemlich glatt in Diketopiperazine über. Ist die Aminogruppe durch ein Säureradical, Benzoyl oder Carbäthoxyl, substituirt, so bewirken alkoholisches Ammoniak und flüssiges Ammoniak die Bildung von Amid. Diese Umwandlung scheint unter denselben Bedingungen auch bei den Estern der Tripeptide einzutreten. Auf diesem Unterschied beruht eine recht brauchbare Methode, Dipeptide von den übrigen Polypeptiden zu trennen.

Von den Estern der Aminosäuren unterscheiden sich die Derivate der Polypeptide durch die Unlöslichkeit in Petroläther und durch die geringe Löslichkeit in Aether. Dagegen werden viele von ihnen

<sup>1)</sup> Diese Berichte 35, 3786 [1902].

<sup>2)</sup> Diese Berichte 34, 2875 [1901].

durch Chloroform in erheblicher Menge aufgenommen und diese Lösung hat meist zur Combination mit Säurechloriden für den Aufbau höherer Peptide gedient.

Ueber das Verhalten der Ester der Tri- und Tetra-Peptide beim Erhitzen liegen zwei ältere, unvollständige Mittheilungen von Curtius<sup>1)</sup> und von mir<sup>2)</sup> vor, die oben besprochen sind. In jüngster Zeit habe ich, wie ebenfalls schon erwähnt, den Vorgang ausführlicher bei dem Methylester des Diglycyl-glycins studirt und gefunden, dass dieser Ester sich sehr leicht unter Abgabe von Methylalkohol in den Methylester des Pentaglycyl-glycins verwandelt<sup>3)</sup>.

Von salpetriger Säure werden die Polypeptide ähnlich den Aminosäuren in kalter, wässriger Lösung angegriffen unter Entwicklung von Stickstoff. Die Hoffnung, dass sich hierbei ein scharfer Unterschied zwischen der Amino- und den Imino-Gruppen zeigen würde, hat sich aber nicht erfüllt. Die Versuche mit den beiden Leucyl-isoserinen und dem Glycyl-leucin<sup>4)</sup> haben nämlich ergeben, dass nicht allein die Amidgruppe, sondern auch ein allerdings schwankender Theil der Iminogruppe als Stickstoff abgelöst wird. Durch diese Beobachtung werden die Schlüsse, die man bezüglich der Bindung des Stickstoffs in den Peptonen und Proteinen aus dem Verhalten gegen salpetrige Säure gezogen hat, sehr zweifelhaft.

Kaliumpermanganat wird von der Lösung der gewöhnlichen Polypeptide in kohlen-saurem Natrium in der Kälte beim kurzen Stehen nicht reducirt. Darin liegt ein scharfer Unterschied gegenüber den ungesättigten Verbindungen, die häufig bei der Synthese von Polypeptiden durch Einwirkung von Ammoniak auf die Halogenacyl-Verbindungen als Nebenproducte entstehen und sich gegen das Baeyer-sche Reagens wie die gewöhnlichen ungesättigten Säuren verhalten. Dass bei längerer Einwirkung von Permanganaten in wässriger Lösung auch eine Oxydation der gewöhnlichen Polypeptide eintritt, ist kürzlich von L. Pollak<sup>5)</sup> für das Glycyl-glycin gezeigt worden.

In Bezug auf Hydrolyse verhalten sich die künstlichen Polypeptide sehr ähnlich den Peptonen oder Proteinen. 5-stündiges Kochen mit concentrirter Salzsäure genügt auch hier, um völligen Zerfall in die Aminosäuren zu bewirken. Beim Erhitzen mit 10-procentiger Salzsäure auf 100° geht aber die Spaltung schon ziemlich träge von statten<sup>6)</sup>. Langsam erfolgt auch der Angriff der Alkalien, und bei

<sup>1)</sup> Diese Berichte 37, 1300 [1904].

<sup>2)</sup> Diese Berichte 37, 2501 [1904].

<sup>3)</sup> Diese Berichte 39, 471 [1906].

<sup>4)</sup> E. Fischer und F. Kölker, Ann. d. Chem. 340, 177 [1905].

<sup>5)</sup> Beiträge zur chem. Physiologie u. Pathologie 7, 16 [1905].

<sup>6)</sup> Diese Berichte 39, 466 [1906].

gewöhnlicher Temperatur ist die Wirkung von überschüssiger Normallauge auf die gewöhnlichen Polypeptide so gering, dass selbst nach 24 Stunden sich kaum eine Veränderung nachweisen lässt. In Folge dieser Beständigkeit können die Polypeptide aus ihren Estern oder sogar aus den Formylverbindungen durch Behandlung mit Alkali gewonnen werden.

Am interessantesten endlich ist das Verhalten der Polypeptide gegen die Verdauungsfermente, insbesondere gegen Pankreassaft. Durch eine ausführliche Studie von Abderhalden und mir<sup>1)</sup>, die sich auf 29 Polypeptide erstreckt, ist der Nachweis geführt, dass der Angriff des Pankreassaftes theils von der Natur der Aminosäuren, theils von ihrer Anordnung, ferner von der Länge der Kette und endlich ganz besonders von der Configuration des Moleküls abhängig ist. In der Regel werden nur die Combinationen gespalten, welche aus den in der Natur vorkommenden optisch-activen Aminosäuren gebildet sind. Mit Hilfe des Pankreassaftes ist es also möglich, die Polypeptide in biologisch verschiedene Klassen zu scheiden.

Anders ist ihr Verhalten gegen Magensaft, für den bisher keine hydrolytische Wirkung auf fünf der künstlichen Polypeptide beobachtet wurde. Man darf aber erwarten, dass die Fortsetzung dieser Versuche, insbesondere bei den höheren Polypeptiden, auch zu positiven Ergebnissen führen und dass es so vielleicht gelingen wird, eine schärfere Grenze zwischen der Magen- und Darm-Verdauung festzustellen.

### III. Proteïne.

Um durch analytischen Abbau einen Einblick in die Structur der Proteïne zu gewinnen, kann man bei ihrem complicirten Moleküle selbstverständlich sehr verschiedene Wege einschlagen. Aber von den zahlreichen Spaltungen, die bisher zu dem Zwecke ausgeführt worden sind, hat gerade so wie bei den Polysacchariden nur die Hydrolyse umfassende und sichere Resultate gegeben. Sie führt bekanntlich von den Proteïnen durch verschiedene Zwischenglieder (Albumosen, Peptone) zu den Aminosäuren, und diese werden von der überwiegenden Mehrzahl der Sachverständigen als die wahren Bestandtheile der Proteïne betrachtet. Auch der Gedanke, dass die Aminosäuren in jenen complicirten Gebilden anhydridartig verkuppelt sind, dürfte den meisten Forschern, die sich auf diesem Gebiete bethätigt haben, geläufig gewesen sein, wenn auch damit keineswegs, wie ich später zeigen will, alle Möglichkeiten erschöpft sind.

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiol. Chem. 46, 52 [1905].

Auf die Untersuchung der hydrolytischen Spaltproducte sind auch meine Untersuchungen vorzugsweise gerichtet gewesen, weil ich die Ueberzeugung habe, dass durch ihre Erforschung der Synthese am raschesten der richtige Weg gewiesen wird.

Die Hydrolyse kann bekanntlich durch Säuren, Alkalien oder Fermente bewirkt werden. Die erste Methode führt am raschesten zu den Endproducten und ist deshalb von mir in der Regel dort benutzt worden, wo es sich um das Studium der Aminosäuren handelte. Alkalien wirken langsamer, und ihre Anwendung hat vor den Säuren keinen Vortheil; bei den Fermenten endlich bleibt die Hydrolyse stets unvollkommen. Ich werde die drei Methoden getrennt behandeln.

Bei der Mehrzahl der Proteine entsteht als Endproduct ein verwickeltes Gemisch von Aminosäuren, deren Trennung eine recht schwierige Aufgabe ist. Für einzelne Aminosäuren, wie Tyrosin, Cystin und Asparaginsäure, kannte man zwar schon lange leicht ausführbare Isolirungsmethoden, und für die Diaminosäuren, Arginin, Lysin und Histidin sind namentlich durch die Bemühungen von A. Kossel die Trennungsverfahren so vollständig geworden, dass sie zuverlässige quantitative Bestimmungen gestatten.

Ausserordentlich schwierig war dagegen früher die Trennung der einfachen Aminosäuren, des Glykocolls und seiner Homologen, und wer jemals versucht hat, in der früher üblichen Weise durch blosser Krystallisation reines Leucin herzustellen, selbst aus Gemischen, die reich daran sind, der wird die Unvollkommenheit des Trennungsverfahrens bitter beklagt haben.

Diese Schwierigkeit glaube ich nun grossentheils beseitigt zu haben durch ein neues Trennungsverfahren für Aminosäuren, das ich die »Estermethode« genannt habe, und das im wesentlichen auf der fractionirten Destillation der Ester beruht. Dadurch wird eine ziemlich weitgehende Scheidung erreicht, und die aus den Estern durch Verseifung regenerirten Aminosäuren können dann verhältnissmässig leicht durch Krystallisation oder durch besondere Fällungsmethoden isolirt werden.

Ich will zunächst eine genaue Beschreibung des Verfahrens mit seinen verschiedenen Modificationen geben und dann die mit seiner Hilfe erzielten Resultate zusammenstellen.

#### Hydrolyse der Proteine durch Säuren und Trennung der Aminosäuren durch die Estermethode.

Für die praktische Hydrolyse kommen nur Salzsäure und Schwefelsäure in Betracht. Letztere hat den Vorzug, dass sie nach beendigter Operation durch Baryumhydroxyd vollständig entfernt werden kann

Da aber diese Operation immerhin ziemlich unbequem ist, so wird man Schwefelsäure nur da anwenden, wo einzelne Producte, wie besonders das Tyrosin und die Diamino-trioxy-dodekansäure, durch directe Krystallisation aus wässriger Lösung isolirt werden sollen.

Nach meinen Erfahrungen wird die Spaltung am besten durch 12—15-stündiges Kochen des Proteins mit der 5—6-fachen Menge 25-procentiger Schwefelsäure am Rückflusskühler bewerkstelligt. Die, wenn nöthig, filtrirte saure Flüssigkeit verdünnt man dann noch mit dem doppelten Volumen Wasser und fällt die Schwefelsäure durch Zusatz von Baryumcarbonat oder durch eine concentrirte Lösung von Baryumhydroxyd. Schliesslich muss der in Lösung gegangene Baryt durch Schwefelsäure genau gefällt werden. Damit Verluste an Aminosäuren ausgeschlossen werden, ist der massenhafte Niederschlag von Baryumsulfat stark abzunutzen und mehrmals mit Wasser auszukochen; dies ist besonders nöthig, um das schwer lösliche Tyrosin völlig zu gewinnen.

Viel bequemer ist die Anwendung der Salzäure, und man wird sie deshalb überall dort bevorzugen, wo es auf die Gewinnung von Tyrosin und ähnlichen Producten nicht ankommt. Für die Ausführung der Hydrolyse wird der Proteinstoff mit der dreifachen Menge rauchender Salzsäure (spec. Gewicht 1.19) in einem Kolben übergossen, dann einige Zeit unter häufigem Umschwenken stehen gelassen, wobei die meisten Proteine, u. a. auch die widerstandsfähigen Gerüstsubstanzen, wie Fibroin, Horn u. s. w., schon zum grossen Theil in Lösung gehen. Dann erwärmt man am Rückflusskühler bis zum Kochen und setzt diese Operation 5—6 Stunden fort. Dabei entweicht natürlich ein Theil der Salzsäure gasförmig, und es bleibt schliesslich eine Säure von ungefähr 25 pCt. zurück. In den meisten Fällen färbt sich die Lösung erst dunkelviolett und dann tief dunkelbraun. Häufig werden Huminsubstanzen oder fettsäureähnliche Massen ausgeschieden. Man filtrirt deshalb die, wenn nöthig, mit etwas Thierkohle aufgekochte Flüssigkeit nach dem Erkalten durch gehärtetes Papier oder Asbest und wäscht mit wenig Wasser nach. Die salzsaure Lösung wird entweder auf dem Wasserbade in einer Porzellanschale oder besser unter vermindertem Druck in einem Kolben eingedampft. Enthält die Masse Glutaminsäure in grösserer Menge, so empfiehlt es sich, sie direct als Hydrochlorat abzuscheiden. Zu dem Zweck sättigt man die sehr stark concentrirte Lösung nochmals in der Kälte mit gasförmiger Salzsäure und lässt einige Tage im Eisschrank stehen. Um den Krystallbrei filtriren zu können, ist es rathsam, ihn mit etwa dem gleichen Volumen eiskalten Alkohols zu vermischen, dann abzusaugen und mit wenig eiskaltem Alkohol nachzuwaschen. Die

salzsaure Glutaminsäure ist leicht durch Aufkochen der wässrigen Lösung mit Thierkohle und abermalige Fällung mit gasförmiger Salzsäure zu reinigen.

Die salzsaure Mutterlauge, oder, bei Abwesenheit von grösseren Mengen Glutaminsäure, die ursprüngliche salzsaure Lösung, dient für die Bereitung der Ester. Sie wird zu dem Zweck am besten unter geringem Druck möglichst stark eingedampft, dann der Rückstand mit absolutem Alkohol übergossen und gasförmige, trockne Salzsäure ohne Abkühlung, zuletzt sogar unter Erwärmung auf dem Wasserbade bis zur Sättigung eingeleitet. Auf 500 g Protein verwendet man  $1\frac{1}{2}$  L Alkohol. Da bei der Veresterung ziemlich viel Wasser entsteht, das der Reaction schädlich ist, so empfiehlt es sich, die salzsaure alkoholische Lösung unter stark vermindertem Druck (bei 15–30 mm) aus einem Bade, dessen Temperatur nicht über  $50^{\circ}$  geht, stark einzudampfen, den Rückstand wieder mit  $1\frac{1}{2}$  L absolutem Alkohol zu übergiessen und abermals mit Salzsäure zu sättigen. Eine zweite Wiederholung der ganzen Operation steigert noch die Ausbeute an Ester. Selbstverständlich kann man auch die Menge des Alkohols von vornherein grösser wählen und kommt dann mit einmaliger Wiederholung der Veresterung aus. Eine wesentliche Zeitersparnis bedeutet dies aber nicht, weil das Sättigen der grossen Flüssigkeitsmasse mit Salzsäure unbequem wird.

Enthält das Product grössere Mengen von Glykocoll, so wird dieses jetzt am bequemsten als Esterchlorhydrat abgeschieden. Man lässt deshalb die mit Salzsäure gesättigte, alkoholische Lösung, am besten nach Einimpfen eines Kryställchens, 12 Stunden bei  $0^{\circ}$  stehen, wobei es vortheilhaft ist, die Krystallisation durch Umrühren oder durch Reiben der Glaswände zu befördern. Das salzsaure Salz wird in der Kälte abgesaugt und mit eiskaltem Alkohol gewaschen. Einmaliges Umkrystallisiren des Productes aus heissem Alkohol genügt zur Reinigung, und das Präparat hat dann den Schmp.  $144^{\circ}$  und kann durch die Analyse leicht identificirt werden.

Um die Abscheidung zu vervollständigen, concentrirt man die Mutterlauge, sättigt wieder mit Salzsäure und lässt abermals nach Einimpfen unter häufigem Rühren mehrere Stunden in der Kältemischung stehen. Es gelingt so, den allergrössten Theil des Glykocolls zu entfernen, wodurch die spätere Fractionirung der Ester sehr erleichtert wird. Bei kleinen Mengen von Glykocoll findet in dem complicirten Gemisch keine Krystallisation statt; es lässt sich dann aber nach der Fractionirung der Ester aus den ersten Destillaten als Esterchlorhydrat isoliren. Die vom Glykocollesterchlorhydrat abfiltrirte, salzsaure, alkoholische Lösung wird jetzt unter stark vermindertem Druck bei einer

40° nicht übersteigenden Temperatur aus dem Wasserbade möglichst stark verdampft; der Rückstand enthält die Hydrochlorate der übrigen Aminosäureester. Man kann daraus die freien Ester entweder mit concentrirtem Alkali und Aether isoliren oder die Hydrochlorate in alkoholischer Lösung mit der berechneten Menge Natriumalkylat zersetzen.

Die erste Methode habe ich am häufigsten angewandt, weil dabei schon eine Entfernung des Tyrosins und der Diaminosäuren stattfindet. Man versetzt zu dem Zweck den dicken Syrup direct in dem Destillationskolben, welcher der Bequemlichkeit halber nicht mehr als 250 g des ursprünglichen Proteins enthalten soll, mit dem halben Volumen Wasser und dem etwa 1½-fachen Volumen Aether, kühlt in einer Mischung aus Eis und Kochsalz sorgfältig ab, fügt dann soviel starke Natronlauge hinzu, dass die freie Salzsäure neutralisirt ist, und endlich einen erheblichen Ueberschuss von fein gekörntem, festem Kaliumcarbonat.

Diese Operation hat den Zweck, die schwach-basischen Ester der Asparagin- und Glutamin-Säure, welche gegen freies Alkali besonders empfindlich sind, abzuscheiden. Nach gutem Durchschütteln wird der Aether abgegossen, durch neuen ersetzt und zu der wiederum sehr sorgfältig gekühlten Masse in verschiedenen Portionen 33-procentige Natronlauge und festes Kaliumcarbonat zugegeben. Nach jedesmaligem Zusatz wird kräftig umgeschüttelt, um das Alkali in der steifen Masse zu vertheilen und den frei gewordenen Ester sofort in die ätherische Lösung überzuführen. Es ist vortheilhaft, den Aether mehrmals zu erneuern. Die Menge des Alkalis muss wenigstens so gross sein, dass sie zur Bindung sämtlicher Salzsäure ausreicht, und Kaliumcarbonat ist soviel zuzufügen, dass die Salzmasse einen dicken Brei bildet, denn nur dann werden die in Wasser äusserst leicht löslichen Ester der einfachen Aminosäuren ausgesalzen. Ganz besonders gilt das für die Fälle, wo Glykocoll, Alanin und Serin zu isoliren sind. Während der ganzen Operation soll die Temperatur des alkalischen Gemisches möglichst niedrig sein. Man erreicht das nur durch wiederholtes und kräftiges Schütteln in der Kältemischung.

Die vereinigten ätherischen Auszüge, welche braun gefärbt sind, werden etwa 15 Minuten mit Kaliumcarbonat geschüttelt, dann abgegossen und einige Stunden mit entwässertem Natriumsulfat getrocknet, da die übrigen Trockenmittel, wie Aetzkali, Kalium- und Baryum-Oxyd oder selbst das Kaliumcarbonat, bei längerer Einwirkung etwas Ester zersetzen.

Beim Abdampfen des Aethers gehen nur kleine Mengen von Glykocoll- und Alanin-Ester in das Destillat; will man sie nicht verlieren, so ist es nöthig, dasselbe mit wenig verdünnter Salzsäure durch-

zuschütteln. Beim Abdampfen der salzsauren Lösung bleiben dann die Hydrochlorate der Aminosäuren zurück.

Geringer ist die Gefahr, Aminosäuren zu verlieren, wenn der Aether bei gewöhnlicher Temperatur unter vermindertem Druck verdampft wird. Dabei wird auch noch die Möglichkeit, einen Theil der Ester durch die höhere Temperatur zu zerstören, beseitigt. Die als dunkles Oel hinterbleibenden Ester werden dann unter vermindertem Druck destillirt. Ich habe diese Operation früher unter dem Druck, wie man ihn mit der Wasserstrahlpumpe erhält (8—15 mm), ausgeführt. Besser werden aber die Resultate, wenn bei den höheren Fractionen der Druck unter 1 mm herabgesetzt ist. Das gelingt leicht mit Hilfe des Apparates, den ich in Gemeinschaft mit C. Harries vor einigen Jahren beschrieben habe<sup>1)</sup>. Ich will bei dieser Gelegenheit bemerken, dass die von anderer Seite für den gleichen Zweck gemachten Vorschläge in diesem Falle unbrauchbar sind, da es sich hier um Flüssigkeiten handelt, die erhebliche Mengen von Aether, Alkohol und Wasser enthalten, und da ausserdem geringe Mengen von Gasen entwickelt werden. Alle diese Dämpfe lassen sich nur dann rasch entfernen, wenn man für genügende Abkühlung, am besten durch flüssige Luft, und für gleichzeitige rasche Evacuierung der Gefässe sorgt.

Am bequemsten scheint es mir, die Destillation zuerst an der Strahlpumpe und später unter dem geringen Druck auszuführen. Dementsprechend verfährt man folgendermaassen:

Das durch Verdampfen bei gewöhnlicher Temperatur unter dem Druck der Strahlpumpe vom Aether möglichst befreite Gemisch der Ester wird unter demselben Druck mit gleichzeitiger Erhitzung im Wasserbade weiter destillirt und in etwa 3 Fractionen (bis 60°, bis 80° und bis 100°) getheilt, wobei die Temperaturangaben für das Bad und nicht für die Dämpfe gelten. Die Destillation wird jetzt unter etwa 0.5 mm Druck fortgesetzt, bis bei der Temperatur des siedenden Wassers nichts mehr übergeht. Man ersetzt dann das Wasserbad durch ein Oelbad und destillirt in 2—3 Fractionen, bis die Temperatur des Bades auf 160° gestiegen ist. Ich halte es jetzt für vorthellhaft, die Gesamtmenge der Ester, die bis 100° destillirt sind, unter einem Druck von etwa 10 mm über freier Flamme nochmals zu fractioniren und dabei die Temperatur der Dämpfe als Maassstab für die Scheidung zu benutzen. Die Zahl der Fractionen und die Temperaturintervalle hängen selbstverständlich von der Zusammensetzung des Gemisches ab. Im allgemeinen wird man mit 4 Fractionen zwischen 40° und 100° auskommen. Sie enthalten ausser kleinen Mengen von Glykocoll-

<sup>1)</sup> Diese Berichte 35, 2158 [1902].



ester das Alanin, das Prolin, die  $\alpha$ -Amino-valeriansäure, den allergrössten Theil des Leucins und jedenfalls auch das Isoleucin. In dem Theil, der unter 0.5 mm Druck über 100° siedet, sind hauptsächlich enthalten: die Ester der Asparaginsäure und Glutaminsäure, fast die gesammte Menge des Phenylalanins, ferner des Serins, zuweilen der Pyrrolidoncarbonsäure als Zersetzungsproduct des Glutaminsäureesters und Producte unbekannter Zusammensetzung.

In dem Destillationsrückstand, der ein dunkles, zähes, in der Kälte meist glasartig erstarrendes Oel ist, finden sich neben unbekanntem Stoffen wechselnde Mengen von Diketopiperazinen, z. B. Leucinimid.

Eine nochmalige Fractionirung der bei 0.5 mm über 100° siedenden Ester hat keinen besonderen Werth. Sehr vortheilhaft ist dagegen die Abscheidung des Phenylalaninesters durch seine leichte Löslichkeit in Aether. Will man sie benutzen, so versetzt man das Gemisch der Ester (Sdp. 100—130°) mit der 4—5-fachen Menge Wasser; ist wenig Phenylalanin vorhanden, so findet fast klare Lösung statt, da die Ester der Asparagin- und Glutamin-Säure und des Serins, sowie anderer Oxyaminosäuren in Wasser leicht löslich sind. Ist die Menge des Phenylalanins grösser, so bleibt der Ester zum Theil ölig in der wässrigen Lösung suspendirt. Unter allen Umständen schüttelt man die Flüssigkeit mit dem gleichen Volumen Aether, trennt die ätherische Schicht ab und schüttelt sie drei Mal hintereinander mit dem gleichen Volumen Wasser. Dadurch werden die Ester von Asparagin- und Glutaminsäure, die von dem Aether aufgenommen wurden, wieder entfernt, und beim Verdampfen der ätherischen Lösung bleibt jetzt der Phenylalaninester schon ziemlich rein zurück.

Ein anderes werthvolles Trennungsverfahren beruht auf der Unlöslichkeit des Serinesters in Petroläther. Versetzt man also die Fraction, die ihn enthält, mit einigen Procent Wasser und dann mit dem 5—8-fachen Volumen Petroläther, so scheidet er sich als Oel ab, während Leucin, Phenylalanin und der grösste Theil des Asparagin- und Glutamin-Säureesters in Lösung bleiben. Man kann den ausgeschiedenen Serinester noch mehrmals mit Petroläther durchschütteln, um die oben erwähnten Beimengungen möglichst zu entfernen, und benutzt schliesslich das Präparat zur Gewinnung von Serin.

Nachdem die Trennung der Ester bis zu diesem Punkte durchgeführt ist, müssen sie in die Aminosäuren zurückverwandelt werden. Das geschieht für die Fractionen, die unter 100° sieden, durch mehrstündiges Kochen mit der 5-fachen Menge Wasser am Rückflusskühler. Das Ende der Verseifung erkennt man an dem Verschwinden der alkalischen Reaction. Bei der Fraction, die grosse Mengen Leucin enthält, findet während der Operation die Abscheidung der schwer löslichen Aminosäure statt.

Die Verseifung derjenigen Fraction, die Glutamin- und Asparaginsäure enthält, geschieht durch Baryumhydroxyd, weil beim Kochen mit Wasser die Reaction bei der Bildung von sauren Estern stehen bleibt, deren Anwesenheit die Erkennung der Aminosäuren erschwert. Man versetzt also die wässrige Lösung der betreffenden Ester, die nach der Abtrennung des Phenylalaninesters resultirt, mit einem Ueberschuss einer ziemlich concentrirten Lösung von Baryumhydroxyd und erhitzt 1—1½ Stunden auf dem Wasserbade. Sind grössere Mengen von Asparaginsäure vorhanden, so fällt bei dieser Operation asparaginsaures Baryum aus, das in der Regel zum grossen Theil aus Racemkörper besteht. Man kann diesen Niederschlag filtriren und daraus direct die Asparaginsäure in bekannter Weise isoliren. Die wässrige Lösung wird mit Schwefelsäure genau vom Baryt befreit und am besten unter vermindertem Druck eingedampft.

Die Verseifung des Phenylalaninesters geschieht endlich durch ein- bis zwei-maliges Abrauchen mit starker Salzsäure. Man erhält dabei das salzsaure Salz, das leicht durch Krystallisation aus starker Salzsäure gereinigt werden kann.

Bei allen zuvor erwähnten Operationen ist selbstverständlich die leichte Veränderlichkeit der Aminosäureester zu berücksichtigen. Man thut deshalb gut, die Destillation zu beschleunigen und auch die Verseifung der Ester nach Beendigung ihrer Trennung möglichst bald, spätestens aber im Laufe von 24 Stunden für die niedrig siedenden Theile, auszuführen.

Für die Erkennung der einzelnen Aminosäuren in diesen Fractionen dienen die später einzeln angeführten Methoden.

Die Abscheidung der Ester aus dem rohen Gemisch der Hydrochlorate durch Alkali, Kaliumcarbonat und Aether hat den Vorzug, dass dabei das Tyrosin, dessen Ester eine Alkaliverbindung bildet und die Derivate der Diaminosäuren, die in Aether sehr schwer löslich sind, entfernt werden. Es hat aber andererseits den Nachtheil, dass eine wechselnde Menge der gesuchten Ester durch das Alkali zerstört und deshalb der Extraction durch Aether entzogen wird. Will man diesen Verlust wieder einbringen, so ist es nöthig, die alkalische, mit grossen Mengen Kaliumcarbonat durchsetzte Masse nach Abtrennung des Aethers mit Salzsäure zu übersättigen, dann einzudampfen, wobei man zeitweise das massenhaft auskrystallisirende Chlorkalium entfernt, schliesslich den Rückstand mit Alkohol auszulaugen und die Veresterung sowie die Abscheidung der Ester durch Alkali zu wiederholen. Auch hierbei tritt selbstverständlich wieder ein Verlust ein, der jetzt aber verhältnissmässig klein ist. Immerhin bringt diese Methode wegen der grossen Masse von concentrirten Salzlösungen viel lästige Arbeit mit sich.

In manchen Fällen, wo es auf die möglichst vollständige Gewinnung der Aminosäuren ankommt, scheint es mir deshalb bequemer zu sein, die Ester aus den Hydrochloraten nicht durch Alkali, sondern durch Natriumäthylat in Freiheit zu setzen. Man löst zu dem Zweck den durch starkes Verdampfen von überschüssiger Salzsäure möglichst befreiten dicken Syrup, der das Gemisch der salzsauren Ester enthält, etwa in der 5-fachen Menge absolutem Alkohol, bestimmt in einer kleinen Quantität dieser Flüssigkeit den Chlorgehalt und fügt nun, ganz in der Kälte, eine ebenfalls gut gekühlte, etwa 3-procentige alkoholische Lösung von Natrium in berechneter Menge unter gutem Rühren zu. Dabei fällt eine erhebliche Menge von Kochsalz aus, das abgesaugt und mit kaltem, absolutem Alkohol nachgewaschen wird. Die alkoholische Lösung wird jetzt unter stark vermindertem Druck eingedampft. Da hierbei nicht unerhebliche Mengen von Aminosäureester in das Destillat gehen, so muss dieses für sich nach dem Ansäuern mit Salzsäure verdampft werden, wobei die Hydrochlorate der Aminosäuren zurückbleiben. Die beim Verjagen des Alkohols hinterbleibenden Ester werden nun erst mit der Wasserstrahlpumpe und dann unter 0.5 mm Druck destillirt bis zu 160° Badtemperatur. Der nicht destillirbare Rückstand ist hier viel reichlicher, weil er auch die Diaminosäuren, das Tyrosin und noch andere complicirte Stoffe enthält, die bei der anderen Methode in der alkalisch-wässrigen Flüssigkeit bleiben. Bei diesem Verfahren vermeidet man den Verlust von Estern durch Verseifung, aber es entstehen namentlich für die hochsiedenden Producte grössere Verluste bei der Destillation, weil das Estergemisch eine viel complicirtere Zusammensetzung hat.

Wie leicht begreiflich, kann die Estermethode auch combinirt werden mit der Gewinnung des Tyrosins und der Diaminosäuren. Man bewirkt dann die Hydrolyse mit Schwefelsäure, scheidet, wie oben beschrieben, das Tyrosin durch Krystallisation ab, fällt aus dem Filtrat nach dem Ansäuern mit Schwefelsäure die Diaminosäuren durch Phosphorwolframsäure, entfernt aus der abermals filtrirten Lösung den Ueberschuss der Phosphorwolframsäure mit Baryt, dann den überschüssigen Baryt mit Schwefelsäure und verarbeitet das letzte Filtrat nach der Estermethode.

Bei diesem complicirten Verfahren ist aber darauf zu achten, dass dem Tyrosin ausser Diamino-trioxy-dodekansäure auch wechselnde Mengen der schwer löslichen Monoaminosäuren, insbesondere Leucin, beigemischt sein können, ferner, dass durch Phosphorwolframsäure auch leicht ein Theil der Monoaminosäuren gefällt wird, wenn die Lösung nicht sehr verdünnt ist, und dass endlich das Absaugen und Auswaschen des Phosphorwolframat-Niederschlages mit besondrer Sorg-

falt, am besten unter Anwendung von Pressen, geschehen muss, weil er leicht erhebliche Mengen von Mutterlauge in sich schliesst.

Aus allen diesen Gründen wird man die combinirte Methode nur dann anwenden, wenn der Mangel an Untersuchungsmaterial zur Sparsamkeit zwingt. In allen anderen Fällen ist es rathsam, die Prüfung auf Tyrosin, Diamino- und Monoamino-Säuren in drei getrennten Operationen vorzunehmen.

### Isolirung und Erkennung der einzelnen Monoaminosäuren.

Nach Ausführung der oben beschriebenen Trennung mit Hilfe der Ester ist die Isolirung der einzelnen Producte immerhin noch eine ziemlich mühsame Aufgabe, besonders wenn es sich um eine halbwegs quantitative Untersuchung handelt. Es scheint mir zweckmässig, auch diese speciellen Methoden, die natürlich je nach dem Falle wechselnde Modificationen erfahren können, hier zusammenzustellen.

#### Glykocoll.

Für seine Erkennung ist die Abscheidung als Esterchlorhydrat bei weitem das beste Mittel. Grössere Mengen können so direct aus dem Gemisch der rohen Ester, wie oben beschrieben, krystallisirt werden. Kleinere Mengen findet man erst nach der Fractionirung der Ester in dem ersten Antheil, oder auch in den Partien der Ester, die beim Abdampfen des Aethers und Alkohols mit übergehen. Auch die kleinen Mengen von Glykocoll, die noch dem Alanin anhaften können, wenn es aus dem Ester regenerirt ist, werden immer am besten in Form des Esterchlorhydrats abgeschieden. Ein- bis zwei-maliges Umkrystallisiren des Salzes aus heissem, absolutem Alkohol liefert ein reines Präparat, das durch den Schmp.  $144^{\circ}$  (corrigirt  $145^{\circ}$ ) und die Analyse leicht identificirt werden kann.

Das Verfahren gestattet auch eine annähernde quantitative Bestimmung der Aminosäure, das um so bessere Resultate liefert, je grösser die Menge des Glykocolls ist. Nach besonderen Controllversuchen<sup>1)</sup> gelingt es bei Anwesenheit von 20 pCt. Glykocoll im Protein etwa  $\frac{4}{5}$  desselben als Esterchlorhydrat aus dem Gemisch der salzsauren Ester abzuscheiden, und von dem Reste findet man dann noch eine nicht unerhebliche Menge bei der späteren Fractionirung der freien Ester. Das Esterchlorhydrat hat die Formel  $C_4H_{10}O_2NCl$  und enthält 53.8 pCt. Glykocoll.

Alle kohlenstoffreicheren Aminosäuren finden sich in den Proteinen in optisch-activer Form; sie werden aber bei der Hydrolyse

<sup>1)</sup> Zeitschr. für physiolog. Chem. 35, 229 [1902].

durch Säuren partiell racemisirt. In Folge dessen hat man es stets mit einem Gemisch von racemischer und activer Form zu thun, wodurch die Isolirung durch Krystallisation recht erschwert wird. Ich werde auf diesen Punkt später zurückkommen.

#### Alanin.

Es findet sich vorzugsweise in der Fraction der Ester, die bei 10 mm Druck von 40—60° siedet, und kann nach der Verseifung mit Wasser in der Regel durch fractionirte Krystallisation rein gewonnen werden, besonders, wenn seine Menge relativ bedeutend ist. Manchmal enthalten die ersten Krystallisationen noch etwas Leucin oder Amino-valeriansäure. Aus den späteren Fractionen pflegt aber das Alanin ziemlich rein herauszukommen, vorausgesetzt, dass das Glykocoll sorgfältig vorher abgeschieden war. Ist das nicht der Fall, so empfiehlt es sich, hier nochmals zu verestern und die Abscheidung des Glykocolls als Esterchlorhydrat zu wiederholen. Die salzsaure Mutterlauge wird dann mit Wasser verdampft, aus dem Hydrochlorat die freie Aminosäure durch Kochen mit Bleioxyd in Freiheit gesetzt und durch Krystallisation gereinigt. In den Mutterlauen kann auch Prolin enthalten sein, das die Gewinnung der letzten Antheile von Alanin erschwert. Es ist dann am besten, die wässrige Lösung ganz zur Trockne zu verdampfen und den Rückstand mit der 5—10-fachen Menge absolutem Alkohol sorgfältig auszukochen. Selbstverständlich kann man diese Operation auch von vornherein vornehmen, ohne sich erst mit der fractionirten Krystallisation zu bemühen. Ob die eine oder andere Modification rathsam ist, hängt von den Mengenverhältnissen der Aminosäuren ab und muss in jedem einzelnen Falle geprüft werden. Das Alanin wird am besten durch die Analyse identificirt, nachdem eine vorläufige Controlle durch den Schmelzpunkt stattgefunden hat. Die rohe Aminosäure ist stets ein Gemisch von optisch-activer und racemischer Form. Bei der optischen Prüfung in salzsaurer Lösung findet man deshalb in der Regel eine geringere Drehung, als dem reinen salzsauren *d*-Alanin ( $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +10.3^{\circ}$ )<sup>1)</sup> entspricht. Nur wenn die Menge der activen Aminosäure recht gross ist, wie bei der Seide, gelingt es, sie durch Krystallisation aus Wasser rein abzuschneiden. Will man noch weitere Beweise für das Vorliegen von Alanin haben, so empfiehlt sich die Darstellung der Benzoylverbindung mit Bicarbonat und Benzoylchlorid und deren Analyse. Dabei ist aber zu beachten, dass der Schmelzpunkt des Präparates unscharf sein kann, da es ein Gemisch von optisch-activer und racemischer Form zu sein pflegt.

<sup>1)</sup> Diese Berichte 39, 464 [1906].

Prolin (Pyrrolidin- $\alpha$ -carbonsäure).

Es ist in Wasser sehr leicht löslich und findet sich hauptsächlich in der Fraction, die Leucin und Aminovaleriansäure enthält, ist aber in kleiner Menge auch dem Alanin beigemischt. Man erhält es, indem man die wässrigen Lösungen der Fractionen eindampft, eventuell unter Abfiltriren der auskrystallisirenden Partien, und dann den trocknen Rückstand in zerkleinertem Zustand mehrmals mit der 5-fachen Menge absolutem Alkohol sorgfältig auskocht. Die alkoholischen Auszüge von den verschiedenen Fractionen werden vereinigt, zur Trockne verdampft und der krystallinische Rückstand abermals mit der 5-fachen Menge absolutem Alkohol gekocht. Dabei bleibt in der Regel wieder eine kleine Menge von gewöhnlichen Aminosäuren zurück. Das Eindampfen der alkoholischen Lösung und die Wiederaufnahme mit Alkohol muss eventuell nochmals wiederholt werden. Man erhält jetzt ein Präparat, das zum grössten Theil aus Prolin besteht, aber wieder ein Gemisch von activer und racemischer Form ist. Um diese zu trennen, löst man die Masse in Wasser und kocht bis zur Sättigung etwa  $\frac{1}{2}$  Std. mit überschüssigem, gefälltem Kupferoxyd. Das tiefblaue Filtrat wird auf dem Wasserbade verdampft und der zerkleinerte Rückstand zwei Mal mit der 5-fachen Menge heissem, absolutem Alkohol sorgfältig ausgelaut. Dabei bleibt der grösste Theil des racemischen Prolinkupfers ungelöst, und aus dem heissen Filtrat scheidet sich häufig noch eine kleine Menge des Salzes ab. Dieses Kupfersalz kann jetzt in der Regel durch Umkrystallisiren aus heissem Wasser völlig gereinigt und durch die Analyse (Gehalt an Krystallwasser und Kupfer) identificirt werden. Qualitativ erkennt man schon längst vorher das Prolin an dem charakteristischen Geruch von Pyrrolidin, der sich beim Eindampfen des Kupfersalzes kund giebt. In der alkoholischen Mutterlauge ist das Kupfersalz des activen Prolins. Es wird nach dem Verdampfen des Alkohols in Wasser gelöst, durch Schwefelwasserstoff zerlegt und das Filtrat unter vermindertem Druck verdampft. Das Prolin muss sich jetzt in absolutem Alkohol klar lösen; ist das nicht der Fall, so enthält es noch gewöhnliche Aminosäuren. Man kann das Prolin aus der alkoholischen Lösung oder durch Pyridin aus der concentrirten, wässrigen Lösung krystallinisch abscheiden und den Schmelzpunkt bestimmen. Bequemer aber als die Isolirung der reinen Verbindung ist die Darstellung ihres Phenylhydantoins<sup>1)</sup>, das einen constanten Schmelzpunkt ( $144^\circ$  corrigirt) besitzt und deshalb leicht zu identificiren ist.

<sup>1)</sup> Zeitschr. für physiolog. Chem. 33, 168 [1901].

Die quantitative Bestimmung des Prolins ist ziemlich roh; sie giebt aber trotzdem vergleichbare Zahlen, wenn man das in Alkohol völlig lösliche Product nach sorgfältigem Trocknen wägt; denn der kleine Fehler, den man in Folge der Verunreinigungen nach oben macht, dürfte ungefähr compensirt sein durch die Verluste, die bei der Isolirung und Fractionirung der Ester entstehen. Genauer ist natürlich die Wägung des racemischen Prolinkupfers, aber sie hat keine Bedeutung, da das Verhältniss von Racemkörper und activer Aminosäure wechselt und es nur auf die Gesamtausbeute an Prolin ankommt. Diese ist deshalb in der Regel nach dem Gewicht des in Alkohol völlig löslichen rohen Präparates angegeben.

#### $\alpha$ -Amino-valeriansäure.

Sie findet sich zusammen mit dem Leucin in den Fractionen der Ester, die bei 60–90° sieden, und ihre Abscheidung ist so schwierig, dass sie meist misslingt, wenn nur kleinere Mengen vorhanden sind. Für ihre Isolirung habe ich die fractionirte Krystallisation der freien Aminosäuren und des Kupfersalzes in wechselnder Reihenfolge benutzt. Eine Vorschrift zu geben, die für alle Fälle passt, ist nicht möglich, da die Verhältnisse mit den Mengen zu sehr wechseln. Für die Identificirung kommt in erster Linie die Elementaranalyse, dann aber auch das Drehungsvermögen in salzsaurer Lösung in Betracht. Am leichtesten ist mir die Abscheidung gelungen bei der Hydrolyse des Horns, und ich verweise deshalb auf die betreffende Abhandlung<sup>1)</sup>. Aber selbst in diesem Falle war es sehr schwer zu sagen, dass das Product absolut rein sei. Dagegen ist dort der Beweis geliefert, dass die Verbindung aller Wahrscheinlichkeit nach die Structur einer  $\alpha$ -Amino-isovaleriansäure hat. Die Aminosäure hat in salzsaurer Lösung ein wesentlich stärkeres Drehungsvermögen als das Leucin. Ihre Trennung von dem Leucin wird besonders durch den Umstand erschwert, dass sie mit jenem Mischkrystalle bildet, und dass solche Mischkrystalle auch bei den Kupfersalzen der beiden Aminosäuren existiren<sup>2)</sup>. Die Amino-valeriansäure ist in kleinerer Menge auch in der Fraction des Alanins enthalten, und sie geht endlich beim Auskochen des Prolins mit Alkohol in kleiner Menge in Lösung. Leichter wird die Isolirung der  $\alpha$ -Amino-valeriansäure, wenn man das Gemisch mit Leucin zuvor racemisirt, wie es sogleich beschrieben werden soll, und in diesem Falle empfiehlt es sich, die durch Krystallisation mög-

<sup>1)</sup> E. Fischer und Th. Dörpinghaus, Zeitschr. für physiolog. Chem. 36, 469 [1902].

<sup>2)</sup> E. Fischer, Zeitschr. für physiolog. Chem. 33, 162 [1901].

licht gereinigte Aminosäure noch in das Phenylhydantoin umzuwandeln<sup>1)</sup>.

Leichter als bei den gewöhnlichen Proteïnen ist nach den Beobachtungen von Kossel und Dakin<sup>2)</sup> die Isolirung der Amino-valeriansäure bei einzelnen Protaminen, wie dem Salmin, weil hier das Leucin fehlt.

#### Leucin.

Es findet sich hauptsächlich in den Fractionen der Ester, die bei 10 mm Druck von 70—90° sieden. Da die Menge des Leucins bei den meisten Proteïnen verhältnissmässig gross ist, so gelingt es in der Regel leicht, durch Krystallisation der aus den Estern regenerirten Aminosäuren Präparate in erheblicher Menge zu gewinnen, welche die Zusammensetzung des Leucins haben; es handelt sich dabei immer um das *l*-Leucin, das in salzsaurer Lösung nach rechts dreht. Sobald man aber die Präparate optisch untersucht, findet man, dass sie keineswegs einheitlich sind. Bei den schwer löslichen Fractionen ist häufig das Drehungsvermögen zu gering, weil relativ viel Racemkörper vorhanden ist, und bei den leichter löslichen wird das Drehungsvermögen häufig zu hoch gefunden. Da die Elementaranalyse scharfe Werthe giebt, so handelt es sich hier sehr wahrscheinlich um eine Beimengung des von F. Ehrlich<sup>3)</sup> entdeckten und so sorgfältig studirten *d*-Isoleucins, das nach seinen interessanten Beobachtungen ein Bestandtheil der meisten Proteïnstoffe zu sein scheint. Ich habe mich mit der Trennung dieses Stoffes von dem Leucin nicht näher beschäftigt und muss mich mit der Bemerkung begnügen, dass die Präparate, die als Leucin von mir oder meinen Mitarbeitern angeführt sind, vielfach ein Gemisch von Leucin und Isoleucin sein können.

Erheblich leichter wird die Gewinnung von reinem Leucin aus Proteïnen, wenn man auf die Isolirung der activen Substanzen verzichtet und das zu trennende Gemisch der Aminosäuren zuvor vollständig racemisirt. Das geschieht in der bekannten, von E. Schulze vorgeschlagenen Weise durch Erhitzen mit Baryt auf 160—180°. Bei grösserer Menge habe ich diese Operation im Autoclaven ausgeführt und als Gefäss einen Porzellanbecher benutzt, der von dem Baryt bei der hohen Temperatur viel weniger als Glas angegriffen wird. Da das Leucin auch bei Gegenwart von Baryt in Wasser nicht leicht

<sup>1)</sup> E. Fischer, Zeitschr. für physiolog. Chem. 33, 160 [1901] und 36, 470 [1902].

<sup>2)</sup> Zeitschr. für physiolog. Chem. 40, 565 [1903].

<sup>3)</sup> Diese Berichte 37, 1809 [1904]; ferner Zeitschr. Ver. Rübenzucker-Ind. 1905, 539 oder Chem. Centralblatt 1905, II, 156.



löslich ist, so habe ich in der Regel auf 1 Theil der rohen Aminosäure 20 Theile Wasser und 2—3 Theile krystallisirtes Baryhydrat verwendet. Beim 24-stündigen Erhitzen auf 170—175° ist die Racemisirung sicher vollständig. Der Baryt wird aus der wässrigen Lösung am bequemsten durch Einleiten von Kohlensäure entfernt; dabei ist aber zu beachten, dass das racemische Leucin selbst in heissem Wasser keineswegs leicht löslich ist. Die Ausfällung des Baryts geschieht deshalb am besten in recht verdünnter und heisser Lösung. Beim Eindampfen der vom Baryumcarbonat filtrirten Flüssigkeit krystallisirt zuerst das schwer lösliche, racemische Leucin, das durch die Ueberführung in das Phenylhydantoïn bezw. die Benzoyl- oder die Benzolsulfosäure-Verbindung sicher identificirt werden kann, da alle diese Derivate bestimmte Schmelzpunkte haben. Die dem ursprünglichen Product beigemengte Amino-valeriansäure ist in der racemischen Form in Wasser viel leichter löslich und findet sich deshalb in den Mutterlaugen. Das Gleiche scheint für das Isoleucin zuzutreffen.

Aus der eben geschilderten Schwierigkeit, reines Leucin (besonders in der activen Form) aus dem Gemisch der Aminosäuren abzuscheiden, ergibt sich schon, dass von einer genauen quantitativen Bestimmung dieser Aminosäure nicht die Rede sein kann. Die Zahlen, die für Leucin in den zahlreichen, aus dem hiesigen Institut publicirten Hydrolysen von Proteïnen angegeben sind, beziehen sich alle nicht auf das ganz reine Präparat, sondern vielmehr auf ein Gemisch mit Isoleucin, dem auch noch wechselnde Mengen von Amino-valeriansäure beigemischt sein können. Trotzdem sind die Zahlen wahrscheinlich in den meisten Fällen nicht zu hoch, da bei der Isolirung und Fractionirung der Ester und auch bei der späteren Krystallisation der Aminosäuren erhebliche Verluste unvermeidlich sind.

#### Phenylalanin.

Die zuvor beschriebene Abtrennung dieses Esters ist so vollständig, dass die Reinigung keine Schwierigkeiten bietet. Es genügt, das durch Verseifung mit Salzsäure erhaltene Hydrochlorat einmal aus starker Salzsäure umzukrystallisiren, dann mit überschüssigem, wässrigem Ammoniak zu verdampfen, aus dem Rückstand das Chlorammonium mit wenig eiskaltem Wasser wegzulaugen und die Aminosäure einmal aus der heissen, wässrigen Lösung durch Alkohol zu fällen. Dieses Präparat giebt in der Regel bei der Elementar-Analyse scharf stimmende Werthe; es ist aber gleichfalls ein Gemisch von activer und racemischer Form. Eine sehr scharfe, qualitative Probe auf Phenylalanin habe ich in der Umwandlung in Phenylacetaldehyd

gefunden<sup>1)</sup>. Man löst zu dem Zweck die Aminosäure in verdünnter Schwefelsäure, fügt einen Ueberschuss von Kaliumbichromat zu und kocht, wobei der sehr charakteristische Geruch des Aldehyds sich bald bemerkbar macht. Die Probe kann auch mit recht kleinen Mengen ausgeführt werden.

Für die quantitative Bestimmung des Phenylalanins wird direct das beim Verdampfen des Esters mit Salzsäure hinterbleibende Rohproduct gewogen, da bei sorgfältiger Ausführung der Ester-Trennung keine anderen Aminosäuren zugegen sind. Selbstverständlich haftet der Bestimmung der Fehler an, der durch Verluste bei der Isolirung und Fractionirung der Ester entsteht. Will man der Sicherheit halber noch ein Derivat des Phenylalanins von festem Schmelzpunkt darstellen, so empfiehlt es sich, die Aminosäure zu racemisiren und in die Phenylisocyanat-Verbindung bezw. deren Hydantoïn umzuwandeln<sup>2)</sup>.

#### Asparaginsäure.

Bei der Trennung der Ester bleibt sie schliesslich gemischt mit Glutaminsäure und Serin, und bei der oben geschilderten Verseifung dieser Ester mit Barythydrat scheidet sich häufig ein Theil der Asparaginsäure als schwer lösliches Barymsalz aus. Seine Umwandlung in die freie Säure und deren völlige Reinigung durch Krystallisation bietet nicht die geringsten Schwierigkeiten. Wie schon erwähnt, ist die aus dem Barymsalz gewonnene Säure hauptsächlich Racemkörper. Um den in Lösung gebliebenen Theil der Asparaginsäure zu gewinnen, fällt man den Baryt genau mit Schwefelsäure aus und verdampft dann die Flüssigkeit. Ist verhältnissmässig viel Asparaginsäure zugegen, so scheidet sie sich langsam krystallinisch ab und kann dann durch Umlösen aus heissem Wasser gereinigt werden. Häufig ist sie durch Glutaminsäure verunreinigt, von der man sie durch starke Salzsäure, in der das Glutaminsäurechlorhydrat schwer löslich ist, trennen muss. Auch Serin kann die Isolirung der Asparaginsäure erschweren; es ist dann vortheilhaft, die Trennung von Asparaginsäure und Serin schon bei den Estern mit Petroläther vorzunehmen. Charakteristisch ist für die Asparaginsäure einerseits das ziemlich schwer lösliche Kupfersalz und andererseits der ausgesprochen saure Geschmack, wodurch sie sich namentlich von der Glutaminsäure und selbstverständlich auch von den einfachen Aminosäuren unterscheidet.

<sup>1)</sup> Zeitschr. für physiolog. Chem. 33, 174 [1901].

<sup>2)</sup> Zeitschr. für physiolog. Chem. 33, 173 [1901].

## Glutaminsäure.

Bei grösserer Menge ist es durchaus rathsam, sie direct nach der Hydrolyse des Proteïns mit Salzsäure als schwer lösliches Hydrochlorat abzuscheiden, wie zuvor ausführlich beschrieben wurde. Der Rest der Säure findet sich nach der Trennung durch die Ester bei der Asparaginsäure, und es ist in den meisten Fällen angezeigt, hier die Abscheidung durch starke Salzsäure zu wiederholen. Man löst zu dem Zweck das rohe Gemisch der beiden Säuren in wenig starker Salzsäure, lässt erkalten, sättigt, wenn nöthig, noch mit gasförmiger Salzsäure und lässt dann in Eis oder auch in einer Kältemischung 1—2 Stunden stehen. Ist auch nur wenig Glutaminsäure zugegen, so fällt sie als Hydrochlorat aus, das auf Asbest abgesogen und durch Umkrystallisiren aus sehr starker Salzsäure gereinigt wird. Um daraus die freie Glutaminsäure zu gewinnen, löst man in wenig Wasser und fügt die zur Bindung der Salzsäure gerade ausreichende Menge von titrirter Alkalilauge zu. Die in kaltem Wasser ziemlich schwer lösliche Glutaminsäure scheidet sich dann bei genügender Concentration krystallinisch ab. Um aus dem Filtrat von der salzsauren Glutaminsäure die Asparaginsäure und andere Aminosäuren zu gewinnen, verdampft man dasselbe, löst den Rückstand in Wasser und entfernt durch Kochen mit Bleioxyd in der bekannten Weise das Chlor. Die Reinigung der Glutaminsäure als Hydrochlorat setzt natürlich voraus, dass das Phenylalanin, dessen salzsaures Salz in überschüssiger Salzsäure schwer löslich ist, zuvor als Ester sorgfältig abgetrennt wurde. Ein bequemes Erkennungsmittel für Glutaminsäure ist ihr eigenartig fader und sehr schwach saurer Geschmack; der sichere Nachweis muss selbstverständlich durch die Elementar-Analyse der freien Säure oder des Hydrochlorates geführt werden. Bei grösseren Mengen ist die quantitative Bestimmung der Glutaminsäure verhältnissmässig genau, da ihre Abscheidung als Hydrochlorat aus dem ursprünglichen Gemisch der Spaltungsproducte gute Resultate liefert. Dagegen ist die Gewinnung aus dem Ester in quantitativer Beziehung recht unvollkommen. Erheblich besser wird übrigens die Ausbeute, wenn man den bei der Destillation der Ester bleibenden Rückstand mehrere Stunden mit Barytwasser kocht und in dem Filtrat nach Entfernung des Baryts die Glutaminsäure als Hydrochlorat abscheidet.

## Serin.

Sein Ester findet sich vorzugsweise in den Fractionen, die unter 0.5 mm Druck bei einer Temperatur des Bades von 100—130° übergehen. Seine Abscheidung mit Petroläther aus dem Estergemisch ist oben erwähnt. Der rohe Ester enthält ausser Serin auch wechselnde

Mengen Asparagin- oder Glutamin Säureester und ausserdem noch Producte unbekannter Zusammensetzung. Er wird durch  $1\frac{1}{2}$  stündiges Erhitzen mit überschüssigem, concentrirtem Barytwasser auf dem Wasserbade verseift, dann der Baryt mit Schwefelsäure genau ausgefällt und das Filtrat unter vermindertem Druck verdampft. Beim Auskochen des Rückstandes mit absolutem Alkohol geht ein Theil der Verunreinigungen in Lösung, während das Serin im Rückstand bleibt. Man löst es in wenig Wasser, filtrirt eventuell von dem schwer löslichen Rückstand, behandelt mit Thierkohle und überlässt dann die geklärte und eingedampfte Flüssigkeit der Krystallisation<sup>1)</sup>. Das Präparat wird durch den Schmelz- und Zersetzungs-Punkt (gegen  $245^{\circ}$ ) und die Elementar-Analyse identificirt.

Will man noch ein Derivat darstellen, so empfiehlt es sich, die  $\beta$ -Naphtalinsulfo-Verbindung<sup>2)</sup> zu wählen. Das so gewonnene Serin ist optisch-inactiv und identisch mit dem synthetischen Racemkörper. Ich vermuthe aber, dass die Aminosäure in den Proteinen ursprünglich auch in der optisch-activen Form enthalten ist, und dass erst bei der Hydrolyse die Racemisirung eintritt. Vielleicht ist auch noch eine optisch-active Form unter den Spaltproducten vorhanden, aber nicht so leicht zu krystallisiren, sodass sie sich bisher der Beobachtung hat entziehen können.

Ist die Menge des Serins verhältnissmässig klein, so können die beigemengten anderen Aminosäuren, insbesondere Asparagin und Glutamin-Säure, die Krystallisation verhindern. Dann wird die Abtrennung dieser Producte durch das Kupfersalz und das Hydrochlorat nothwendig, wie es bei der Isolirung des Serins aus dem Casein geschah. Bezüglich der Einzelheiten verweise ich auf die betreffende Abhandlung<sup>3)</sup>.

#### Oxy-prolin (Oxy-Pyrrolidin- $\alpha$ -carbonsäure).

Ihre Abscheidung ist besonders mühsam und wurde deshalb bisher nur in wenigen Fällen (Gelatine, Casein, Oxyhaemoglobin, Edestin) durchgeführt. Sie beruht darauf, alle anderen Aminosäuren theils durch Krystallisation, theils durch die Estermethode, theils durch Fällung mit Phosphorwolframsäure zu entfernen. Aus den letzten Mutterlaugen kann dann das Oxy-prolin durch Krystallisation abgetrennt werden<sup>4)</sup>. Zur Identificirung empfiehlt sich die  $\beta$ -Naphtalinsulfo-Verbindung<sup>5)</sup>.

1) Zeitschr. für physiolog. Chem. **36**, 472 und 473 [1902].

2) Diese Berichte **35**, 3784 [1902].

3) Zeitschr. für physiolog. Chem. **39**, 156 [1903].

4) Diese Berichte **35**, 2660 [1902].    5) Diese Berichte **35**, 3785 [1902].

## Tyrosin.

Seine Abscheidung nach der Hydrolyse des Proteins mit Schwefelsäure ist oben erwähnt und bietet nichts Neues. Ich glaube, bei dieser Gelegenheit betonen zu müssen, dass das rohe Tyrosin recht unrein sein kann, und dass die Darstellung des reinen Präparates keineswegs so leicht ist, wie man im allgemeinen annimmt.

Das öfters beigemengte Leucin entfernt man am besten nach dem von Habermann und Ehrenfeld<sup>1)</sup> angegebenen Verfahren durch Auskochen mit Eisessig; dabei scheinen auch noch andere Producte entfernt zu werden. Aber auch dann noch ist in vielen Fällen wiederholtes Umlösen aus siedendem Wasser nöthig, um ein analysenreines Präparat zu gewinnen.

Bei weitem am leichtesten gelingt die Darstellung des reinen Tyrosins aus Seide weil diese nur sehr kleine Mengen anderer, in Wasser schwer löslicher Aminosäuren, wie Leucin, Phenylalanin, enthält. Es verdient aber bemerkt zu werden, dass selbst dieses Tyrosin in optischer Beziehung nicht ganz einheitlich ist, sondern kleine, aber wechselnde Mengen von Racemkörper enthält. Will man die Racemisirung des Tyrosins, oder allgemeiner gesprochen der Aminosäuren, ganz vermeiden, so muss die Hydrolyse des Proteins durch Fermente ausgeführt werden, was aber leider bei der Seide bisher nicht möglich ist.

## Diamino-trioxy-dodekansäure.

Mit diesem Namen haben Abderhalden und ich die Aminosäure  $C_{12}H_{24}N_2O_5$  bezeichnet, die aus dem Casein entsteht und dem rohen Tyrosin beigemischt ist. Sie unterscheidet sich von dem Tyrosin durch die Fällbarkeit mit Phosphorwolframsäure. Nach dem Wasserstoffgehalt muss sie das Derivat einer gesättigten Fettsäure sein und die Gruppen enthalten, die in ihrem Namen angegeben sind. Im übrigen ist die Aufklärung ihrer Structur, insbesondere die Zurückführung auf eine Fettsäure noch nicht durchgeführt. Wir mussten die Substanz für verschieden von der Caseinsäure halten, die Skraup<sup>2)</sup> einige Monate vor unserer Publication beschrieben hatte, weil sie nicht allein in der Zusammensetzung, sondern auch in den Eigenschaften von dem Skraup'schen Präparate stark abwich. Inzwischen aber haben wir durch Privat-Correspondenz mit Hrn. Skraup erfahren, dass seine Caseinsäure bei sorgfältiger Reinigung so grosse Aehnlichkeit mit einem von uns gelieferten Präparate zeigte, dass sie wahrscheinlich identisch sind.

1) Zeitschr. für physiolog. Chem. 37, 18 [1902].

2) Diese Berichte 37, 1596 [1904].

Wenn wir trotzdem den von uns gewählten Namen beibehalten so geschieht es, weil er die Zusammensetzung der Verbindung wiedergibt. Wir können zudem bemerken, dass unsere Untersuchung ganz unabhängig von der Skraup'schen Arbeit war, und dass auch die Isolierungsmethode unseres Präparates mit dem Skraup'schen Verfahren nicht die geringste Aehnlichkeit hat.

Die Aminosäure bildet ein schwer lösliches Kupfersalz, in welchem zwei Wasserstoffe durch das Metall ersetzt sind. Dass man daraus aber keineswegs auf ihre zweibasische Natur, oder mit anderen Worten auf die Anwesenheit von zwei Carboxylen schliessen darf, beweist das gleiche Verhalten des Isoserins<sup>1)</sup>.

Für die Isolirung der Aminosäure scheint mir unser Verfahren bequemer zu sein als das von Skraup angegebene.

#### Cystin und Diaminosäuren.

Bezüglich der Abscheidung des Cystins habe ich keine neuen Erfahrungen sammeln können. Ich verweise deshalb auf die ausführlichen Untersuchungen von K. A. Mörner<sup>2)</sup>. Dasselbe gilt für die Diaminosäuren Arginin, Lysin und das Histidin, wo wir, dank den ausgezeichneten Untersuchungen von Drechsel, E. Schulze, Hedin und namentlich von A. Kossel, sogar recht gute quantitative Trennungsmethoden kennen.

#### Tryptophan

ist durch die bekannten Farbreactionen in den Proteinen so leicht zu erkennen, dass es keiner neuen Proben bedarf. Ich habe mich deshalb nicht damit beschäftigt und verweise auf die schönen Untersuchungen von F. G. Hopkins und S. W. Cole (Journ. of Physiol. 27, 418 und 29, 451).

In neuerer Zeit sind einige weitere Aminosäuren von Skraup<sup>3)</sup> aus dem Casein und dem Leim erhalten worden. Ferner will Wohlgemuth<sup>4)</sup> in dem Rückstand der Ester, der bei der Hydrolyse eines Leberproteids entstand, noch eine Aminosäure entdeckt haben. Bezüglich dieser Producte fehlt mir jede Erfahrung, und ihre Beschreibung ist auch nicht der Art, dass man ihre Isolirung mit Sicherheit wiederholen könnte. Ich kann deshalb über die Tragweite und Zuverlässigkeit dieser Beobachtungen kein bestimmtes Urtheil fällen.

<sup>1)</sup> E. Fischer und H. Leuchs, diese Berichte 35, 3795 [1902].

<sup>2)</sup> Zeitschr. für physiolog. Chem. 34, 207 [1901].

<sup>3)</sup> Diese Berichte 37, 1596 [1904]; Monatsh. für Chem. 25, 633 [1904]; 26, 1343 [1905].

<sup>4)</sup> Diese Berichte 37, 4362 [1904].

### Ergebnisse der Estermethode.

Um den grossen Nutzen der Estermethode zu beweisen, will ich die dadurch erzielten Resultate kurz zusammenstellen.

Neu entdeckt habe ich mit ihrer Hülfe als Spaltproduct der Proteine das Prolin, sowohl in der optisch activen, als in der racemischen Form, von denen die Letztere kurz vorher von Willstätter<sup>1)</sup> und dann von mir<sup>2)</sup> synthetisch erhalten war, ferner das Oxy-prolin. Dagegen ist ohne Benutzung der Ester die Diamino-trioxy-dodekansäure gefunden worden.

Viel grösser aber sind die Dienste, welche die Methode für die Abscheidung der bekannten Aminosäuren geleistet hat. Während man in früherer Zeit sich gewöhnlich mit dem Nachweis des Tyrosins, Leucins und der Asparaginsäure begnügte und das Glykocoll oder die Glutaminsäure nur dann fand, wenn sie in relativ grosser Menge zugegen waren, ist man jetzt im Stande, die ganze, oben angeführte Reihe der Monoaminosäuren mit einem ziemlich hohen Grade von Sicherheit aufzufinden, falls nicht gerade ihre Menge verschwindend klein ist.

Im einzelnen sei noch hervorgehoben, dass Alanin und Serin, von denen das erste früher nur einmal mit Sicherheit im Seidenfibroin und das zweite ebenfalls nur im Seidenleim gefunden war, jetzt als Bestandtheile aller gewöhnlichen Proteine erkannt sind und sogar das Glykocoll an Verbreitung weit übertreffen.

Dasselbe gilt für das Phenylalanin, welches von E. Schulze nur einmal als Spaltproduct eines pflanzlichen Eiweissstoffes isolirt wurde, jetzt aber in allen darauf untersuchten Proteinen nachgewiesen werden konnte; es ist sogar verbreiteter, als das ähnlich zusammengesetzte Tyrosin und steht diesem als aromatischer Bestandtheil des Proteïn-moleküls an Bedeutung mindestens gleich.

Ebenso war die Auffindung der  $\alpha$ -Amino-valeriansäure früher so ausserordentlich schwierig, dass sie nur durch Zufall gelingen konnte. Durch die Estermethode ist auch diese Aufgabe wesentlich erleichtert. Endlich hat sie für das Glykocoll nicht allein eine sehr scharfe Erkennung, sondern auch eine in quantitativer Beziehung ziemlich befriedigende Abscheidung ermöglicht.

Das Bild, das wir durch diese Methode bezügl. der Verbreitung der Monoaminosäuren in den Proteinen gewonnen haben, ist wesentlich verschieden von den früher gebräuchlichen Vorstellungen, und wenn auch die quantitativen Zahlen an Genauigkeit zu wünschen übrig lassen und meist hinter der Wirklichkeit zurückbleiben, so haben sie

<sup>1)</sup> Diese Berichte 33, 1160 [1900].

<sup>2)</sup> Diese Berichte 34, 455 [1901].

doch in relativer Beziehung eine nicht zu unterschätzende Bedeutung. Ich habe deshalb verschiedentlich daran Betrachtungen über den Zusammenhang der natürlichen Aminosäuren unter einander oder mit den Kohlenhydraten knüpfen können<sup>1)</sup>, von denen ich die wesentlichsten Punkte hier wiederholen und vervollständigen will.

Das regelmässige Vorkommen des Leucins, Alanins und Serins erklärt sich vielleicht durch die nahen Beziehungen in der Zusammensetzung mit den Kohlenhydraten. Das Molekül des Leucins hat dieselbe Kohlenstoffanzahl wie die Glucose, während Alanin und Serin die Hälfte davon enthalten, d. h. der Milchsäure bezw. der Glycerose entsprechen. Dass in dem Leucin die Kohlenstoffkette verzweigt ist im Gegensatz zu der normalen Kette der Glucose, kann nicht als Einwand gegen diese Betrachtung gelten, da bekanntlich, wie die Saccharinbildung beweist, bei den Kohlenhydraten aus der normalen Kohlenstoffkette leicht eine anomale entsteht.

Die  $\alpha$ -Amino-valeriansäure steht meines Erachtens zu den Pentosen in dem gleichen Verhältniss wie das Leucin zu den Hexosen.

Phenylalanin und Tyrosin enthalten neben dem aromatischen Reste wiederum die aus drei Kohlenstoffatomen bestehende Gruppe. Cystin ist gerade so wie das Serin ein Alaninderivat.

Glutaminsäure und Asparaginsäure könnten durch Oxydation aus Aminovaleriansäure oder auch aus Leucin entstehen. Dass auch die Diaminosäuren Lysin und Arginin in diese Betrachtung verflochten werden können, ist selbstverständlich. Ich will aber hier erwähnen, dass bereits Kossel<sup>2)</sup> auf den möglichen Zusammenhang dieser Basen mit dem Leucin und den Kohlenhydraten hinwies und sie gerade deshalb Hexonbasen nannte. Am entferntesten steht scheinbar das Glykocoll, das übrigens auch in manchen, für den lebenden Organismus sehr wichtigen Proteinen entweder gar nicht oder doch nur in untergeordneter Menge enthalten ist.

Besonders hervorzuheben ist noch die Rolle der Oxyaminosäuren, deren einfachster Repräsentant, das Serin, eine so weite Verbreitung hat. Nach meiner Ueberzeugung wird man von dieser Klasse noch andere Vertreter in den Eiweisskörpern auffinden; denn sie bilden eine natürliche Brücke zwischen den Kohlenhydraten und den einfachen Aminosäuren, wobei noch Zwischenproducte wie das Glucosamin angenommen werden können.

Ich bin mir wohl bewusst, dass derartige Betrachtungen der tatsächlichen Unterlage entbehren, halte sie aber doch nicht für nutzlos,

<sup>1)</sup> Z. B. Fischer u. Abderhalden, Zeitschr. für physiol. Chem. 36, 276 [1902].

<sup>2)</sup> Zeitschr. für physiol. Chem. 25, 175 [1898].



weil sie anregend auf die experimentelle Forschung wirken können. Und dass die chemischen Uebergänge zwischen den drei grossen Klassen organischer Verbindungen: Kohlenhydrate, Eiweissstoffe und Fette reizvolle Probleme der physiologischen Chemie sind, bedarf keiner weiteren Ausführung. Ich will aber auch bei dieser Gelegenheit meine Ansicht nicht verschweigen, dass solche Speculationen leicht über das Ziel hinausschiessen, und dass die Literatur der letzten Jahre warrende Beispiele dafür genug gebracht hat.

Die Estermethode ist theils von mir, theils von meinen Mitarbeitern, namentlich von E. Abderhalden, auf so zahlreiche Proteine angewandt worden, dass es mir lohnend erscheint, diese in folgender Tabelle zusammenzustellen. Die Reihenfolge ist chronologisch und die beigefügten Citate beziehen sich sämmtlich auf die Zeitschrift für physiologische Chemie.

Casein	(33, 151; 35, 227 und 39, 155; 44, 23).
Seidenfibrin	(33, 177; 35, 221 und 39, 155).
Seidenleim	(35, 221).
Eialbumin	(33, 412 und 46, 24).
Leim (Gelatine)	(35, 70 und 42, 543).
Horn	(36, 462).
Oxyhämoglobin	(36, 268 und 37, 484).
Edestin	(37, 499; 40, 249 und 44, 265 u. 284).
Serumalbumin	(37, 495)
Zein	(37, 508).
Salmin	(41, 55).
Thymushiston	(41, 278).
Elastin	(41, 293).
Gliadin	(44, 276).
Serumglobulin	(44, 23).
Ovomucoid	(44, 44).
Eiweiss aus Kiefersamen	(45, 273).
Conglutin	(45, 479).
Keratin aus Pferdehaaren und aus Gänsefedern	(46, 31 und 46, 40).
Bence-Jones'scher Eiweisskörper	(46, 125).

### Hydrolyse der Proteine durch Alkalien oder Fermente.

Die Spaltung der Eiweisskörper durch Alkalien ist fast ebenso lange bekannt, wie die saure Hydrolyse. Den ausführlichsten Gebrauch davon hat Schützenberger gemacht, der zur Spaltung concentrirtes

Barytwasser unter Druck bis zur Temperatur von 200° benutzte und dadurch sicherlich manche secundären Producte erhalten hat.

Ich habe nur eine einzige Hydrolyse von Casein mit Kalilauge ausgeführt, speciell um zu beweisen, dass auch in alkalischer Lösung Prolin entsteht<sup>1)</sup>. Die Hydrolyse geht hier langsamer von statten als mit Säure; denn beim Erhitzen von Casein mit der 5-fachen Menge 10-proc. Natronlauge auf 100° war die Biuretreaction erst nach 65 Stunden nahezu verschwunden, und es konnte dann aus der Flüssigkeit eine nicht unbeträchtliche Menge von Prolin isolirt werden.

Ungleich wichtiger ist die Spaltung der Proteine durch die Fermente des Verdauungstractus. Eine grössere Versuchsreihe über die Wirkung der Pankreasfermente<sup>2)</sup> allein oder die combinirte Wirkung von Pepsin-Salzsäure und Pankreatin<sup>3)</sup> habe ich gemeinschaftlich mit E. Abderhalden ausgeführt.

Würde die Verdauung im ersten Fall bis ungefähr zum Verschwinden der Biuretreaction getrieben, so konnten unter den Spaltproducten Prolin und Phenylalanin mit den jetzigen Methoden nicht nachgewiesen werden, während andere Monoaminosäuren, wie Alanin, Leucin, Glutaminsäure und Asparaginsäure, entstanden waren. Dagegen fand sich ein complicirtes abiuretisches Product, das mit den künstlichen Polypeptiden einige Aehnlichkeit zeigte und bei der Hydrolyse durch Salzsäure neben Alanin, Leucin, Glutamin- und Asparagin-Säure auch reichliche Mengen von Prolin und Phenylalanin lieferte. Diese Beobachtungen erstrecken sich auf Casein, Edestin, Hämoglobin, Serumglobulin, Eialbumin und Fibrin.

Bei successiver Pepsin- und Pankreatin-Verdauung konnten direct unter den Spaltproducten auch ziemlich grosse Mengen Prolin und Phenylalanin isolirt werden, während die Quantität des polypeptidartigen Stoffes geringer war. Wir haben daraus den Schluss gezogen, dass aller Wahrscheinlichkeit nach das Prolin ein wirklicher Bestandtheil des Proteïn moleküls ist, und dass ferner in Uebereinstimmung mit den alten Ansichten von Kühne die Fermentverdauung nicht zur völligen Auflösung der Proteine in die Aminosäuren führt; nur ist der resistente Theil kein gewöhnliches Pepton, wie Kühne angenommen hat, sondern ein abiuretisches Product, das sich durch den Gehalt an Prolin und Phenylalanin auszeichnet.

Ob die Hydrolyse durch Säuren, Alkalien oder Fermente bewirkt wird, ist auf das Endresultat von keinem grossen Einfluss. Die letzten Spaltproducte sind die Aminosäuren, deren überwiegende Mehr-

1) Zeitschr. für physiol. Chem. 35, 227 [1902].

2) Zeitschr. für physiol. Chem. 39, 81 [1903].

3) Zeitschr. für physiol. Chem. 40, 215 [1903].

zahl in allen drei Fällen entsteht. Eine Ausnahme bildet nur, soweit wir bis jetzt unterrichtet sind, das Tryptophan, das bei der Hydrolyse mit Säuren, wie es scheint, zum grossen Theil zerstört wird. Ich halte es aber wohl für möglich, dass man noch andere leicht zerstörbare Spaltproducte der Proteine finden wird, die sich zwar bei der milden Wirkung der Fermente halten können, aber durch die starken Säuren und Alkalien zersetzt werden. Schon aus diesem Grunde scheint ein erneutes und gründlicheres Studium der fermentativen Hydrolyse sehr wünschenswerth.

Da die Aminosäuren bisher die wichtigsten, in ihrer Structur erkannten, hydrolytischen Producte der Proteine sind, so liegt die Frage, ob sie wirkliche Bestandtheile des Proteinmoleküls sind, sehr nahe und verdient nicht allein generell, sondern für jedes einzelne Product discutirt zu werden. So viel mir aus der Literatur ersichtlich ist, neigen die meisten Forscher, die sich mit dieser Frage beschäftigt haben, zu der Ansicht, dass für die bei der fermentativen Hydrolyse entstehenden Aminosäuren das ursprüngliche Vorhandensein im Proteinmolekül nicht zweifelhaft sein könne. Der Einzige, der meines Wissens auch diese Ansicht verwirft und selbst bei der Spaltung durch Fermente complicirte Atomverschiebungen im Eiweissmolekül annimmt, ist O. Löw<sup>1)</sup>. Da aber seine Darlegung nur durch ganz unzutreffende Gründe gestützt ist, so glaube ich mich nicht weiter damit beschäftigen zu müssen.

Auch ich habe nicht den geringsten Zweifel, dass Tyrosin, Leucin, Alanin, Tryptophan u. s. w., die so leicht bei der pankreatischen Spaltung des Eiweiss entstehen, seine wirklichen Bestandtheile sind, und die Gewinnung der künstlichen Polypeptide, sowie ihr Verhalten gegen Pankreassaft können als kräftige Stütze für diese alte und an und für sich schon sehr wahrscheinliche Ansicht gelten. Was aber für Tyrosin und Leucin zutrifft, das wird man füglich Weise auch für Glykocoll und Phenylalanin annehmen müssen, obschon sie bei der pankreatischen Verdauung entweder garnicht oder nur in kleinen Mengen gefunden werden.

Aus den Erfahrungen mit den künstlichen Polypeptiden, die sich vom Glykocoll und Phenylalanin ableiten, kann man sogar den Schluss ziehen, dass auch manche natürliche Di- und Tri-Peptide dieser Aminosäuren aller Wahrscheinlichkeit nach gegen Pankreassaft widerstandsfähig sein werden.

Schärfer aber hat sich die Frage zugespitzt bei dem Prolin und Oxyprolin. Ich selbst habe sie gleich bei der Auffindung des ersteren als hydrolytisches Product der Proteine aufgeworfen und die Möglich-

<sup>1)</sup> Chemikerzeitung 1905, Nr. 44, 604.

keit betont, dass der Pyrrolidinring erst secundär durch die Wirkung der Säure aus einer anderen labilen Gruppe entsteht<sup>1)</sup>. Ich habe auch versucht, Arginin und Ornithin durch Kochen mit Säuren in Prolin überzuführen, aber ohne Erfolg. Als dann später auch bei der Hydrolyse des Caseïns mit Alkali Prolin gefunden war<sup>2)</sup>, und als endlich durch die Versuche von Abderhalden und mir<sup>3)</sup> die Bildung derselben Aminosäure bei der combinirten Verdauung durch Pepsinsalzsäure und Pankreatin beobachtet worden war, schien mir ihre secundäre Entstehung höchst unwahrscheinlich. In letzter Zeit ist aber die Frage wiederum von S. P. L. Sørensen<sup>4)</sup> aufgerollt worden, nachdem er die interessante Beobachtung gemacht hatte, dass die von ihm synthetisch dargestellte  $\alpha$ -Amino- $\delta$ -oxy-valeriansäure beim Abdampfen mit starker Salzsäure partiell in racemisches Prolin übergeht. So lange aber nicht die gleiche Umwandlung beim Erhitzen mit Alkalien oder bei successiver Wirkung von Pepsinsalzsäure und Pankreatin festgestellt und so lange ausserdem die Amino-oxy-valeriansäure nicht selbst unter den Spaltproducten des Eiweiss gefunden ist, sind die von mir für die primäre Natur des Prolins vorgebrachten Gründe nicht entkräftet. Ich halte es aber auch für sehr wohl möglich, dass Prolin und Amino-oxy-valeriansäure beide Bestandtheile des Eiweiss sind, und dass sie entweder wechselseitig oder wenigstens das Erste aus dem Zweiten im Organismus entstehen. Aber selbst wenn sich herausstellen sollte, dass Prolin und Oxy-prolin nur secundäre Producte sind, so würde ihre Auffindung unter den Zersetzungsproducten der Proteïne doch für die physiologische Chemie wichtig bleiben, weil man indirect durch sie auf die primären Producte aufmerksam geworden ist, und weil ausserdem die Möglichkeit der Entstehung von Pyrrolidin-Derivaten aus den Proteïnen im Organismus bestehen bleibt.

#### Peptone und Albumosen.

Bekanntlich erfolgt der hydrolytische Abbau der Proteïne in verschiedenen Phasen, die namentlich für die fermentativen Prozesse Gegenstand ausführlicher Studien von seiten der physiologischen Chemiker gewesen sind. Aber bei aller Anerkennung, die ich den Arbeiten von Kühne, Hofmeister, Neumeister u. A. gern zolle, kann ich mich doch der Ueberzeugung nicht verschliessen, dass die

<sup>1)</sup> Zeitschr. für physiol. Chem. 33, 169 [1901].

<sup>2)</sup> Zeitschr. für physiol. Chem. 35, 227 [1902].

<sup>3)</sup> Fischer und Abderhalden, Zeitschr. für physiol. Chem. 40, 215 [1903].

<sup>4)</sup> Trav. du Laborat. Carlsberg 6, 137 [1905].

von ihnen angewandten Fällungsmethoden nicht im Stande sind, bei so complicirten Gemischen, wie sie durch den Zerfall der Proteine entstehen, reine Producte zu liefern, und dass deshalb die verschiedenen Sorten von Albumosen und Peptonen, mit denen die Physiologen rechnen, für den Chemiker nur unentwirrbare Gemische bedeuten können. Das nächste Ziel der Forschung auf diesem Gebiete müsste dahin gerichtet sein, aus ihnen chemisch definirbare, einheitliche Substanzen zu isoliren. Aller Wahrscheinlichkeit nach wird das aber ohne die Auffindung neuer wirksamerer Trennungsmethoden nicht gelingen. Meine eigenen Erfahrungen auf diesem Gebiete sind noch sehr dürftig.

Abgesehen von den oben erwähnten Versuchen über die Verdauung des Caseïns, bei welcher der abiurete polypeptidartige Stoff aufgefunden wurde, habe ich mich, in Gemeinschaft mit P. Bergell<sup>1)</sup>, eingehender nur mit der stufenweisen Hydrolyse des Fibröins aus Seide beschäftigt und dabei, wie mir scheint zum ersten Mal, eine Combination der drei hydrolytischen Methoden, Spaltung durch Säuren, Base und Fermente benutzt.

Das in allen indifferenten Lösungsmitteln unlösliche Fibröin löst sich leicht in rauchender Salzsäure, und dabei entsteht nach den Beobachtungen von Weyl<sup>2)</sup> zuerst das sogenannte Sericoïn. Dies unterliegt dann der weiteren Hydrolyse und geht in ein peptonartiges Product über. Daraus konnten wir mit Pankreatin das Tyrosin völlig ausscheiden. Das jetzt entstandene Product zeigte auch noch die Reactionen der Peptone. Beim Erwärmen mit Barytwasser verlor sich aber bald die für jene charakteristische Biuretreaction, und aus dem nun resultirenden Präparat gelang es uns, durch Krystallisation und nachträgliche Darstellung der  $\beta$ -Naphtalinsulfo-Verbindung eine Substanz zu isoliren, die nach der Analyse und dem Resultat der Hydrolyse das Derivat eines Dipeptids aus Glykocoll und Alanin sein musste.

Da aber seine Identificirung mit den synthetisch dargestellten  $\beta$ -Naphtalinsulfo-Derivaten des Glycyl-*d*-alanins und des *d*-Alanyl-glycins misslang<sup>3)</sup> und auch die Darstellung grösserer Mengen des reinen Körpers auf Schwierigkeiten stiess, so blieb die Untersuchung länger, als ich erwartet hatte, unbeendet. In jüngster Zeit habe ich sie gemeinschaftlich mit E. Abderhalden wieder aufgenommen, und es ist uns mit Hülfe einer besseren Methode zur Trennung der Dipeptide von den höheren Peptiden und den Aminosäuren gelungen,

<sup>1)</sup> Vortrag zu Karlsbad 1902. Autoreferat in der Chemiker-Zeitung 1902, Nr. 80.

<sup>2)</sup> Diese Berichte 21, 1407 [1888].    <sup>3)</sup> Diese Berichte 36, 2592 [1903].

in reichlicher Menge das Glycyl-*d*-alanin-Anhydrid abzuscheiden und dadurch die Anwesenheit von Glycyl-*d*-alanin unter den Spaltproducten des Seidenfibroins mit einem hohen Grade von Wahrscheinlichkeit darzuthun<sup>1)</sup>.

Ich hoffe, dass diese Beobachtung nicht vereinzelt bleiben, sondern den Anfang einer rationellen Bearbeitung jener complicirten Gemische bilden wird.

### Structur und Systematik der Proteiue.

An Betrachtungen über die Constitution der Eiweisskörper fehlt es in der chemischen und physiologischen Literatur nicht. Von bescheidenen Aeusserungen über die Verkettung der Aminosäuren bis zu anspruchsvollen, höchst phantastischen Structurformeln begegnet man allen Abstufungen. So weit ich mir ein Urtheil habe bilden können, gehen die meisten Ansichten dahin, dass in den Proteiue-molekülen die Aminosäuren amidartig verkettet sind. Am ausführlichsten ist dieser Gedanke wohl von Hofmeister<sup>2)</sup> behandelt worden, aber er wird gewiss nicht den Anspruch erheben wollen, sein Urheber zu sein, denn alle synthetischen Versuche zur Verkuppelung der Aminosäuren, unter anderem auch die Entdeckung des Glycylglycins<sup>3)</sup>, die zeitlich vor seiner Publication liegen, basiren auf der gleichen Annahme.

In der grossen Aehnlichkeit der künstlichen Polypeptide mit den Peptonen, insbesondere bezüglich des Verhaltens gegen Pankreassaft, ferner in der Gewinnung des Glycyl-*d*-alanin-Anhydrids aus Seide darf man eine neue, starke Stütze für jene Ansicht erblicken. Dass man mit dieser Art der Verkettung allein aus den bis jetzt bekannten natürlichen Aminosäuren schon eine recht stattliche Anzahl von Proteiuen theoretisch ableiten kann, liegt auf der Hand und ist von Hofmeister in populärer Form ausführlich gesagt worden. Besonders mannigfaltig wird natürlich das Bild durch die Betheiligung der Amino-dicarbonensäuren (Asparagin- und Glutamin-Säure), sowie der Diaminosäuren (Lysin, Arginin u. s. w.).

Ich möchte aber hier darauf aufmerksam machen, dass die einfache Amidbildung nicht die einzige Möglichkeit der Verkuppelung im Proteiue-molekül ist. Im Gegenteil, ich halte es sogar für recht wahrscheinlich, dass einerseits Piperazinringe dort vorkommen, deren leichte Sprengung durch Alkali und Rückbildung aus den Dipeptiden oder ihren Estern ich so häufig bei den künstlichen Producten beob-

<sup>1)</sup> Diese Berichte 39, Nr. 3 [1906].

<sup>2)</sup> Vortrag auf der Naturforscher-Versammlung zu Karlsbad 1902.

<sup>3)</sup> Diese Berichte 34, 2868 [1901].

achtet habe, und dass andererseits die zahlreichen Hydroxyle der Oxyaminosäuren keineswegs indifferente Gruppen im Proteïn molekül sind. Die Letzteren könnten durch intramolekulare Anhydridbildung in Ester- oder Aether-Gruppen übergehen, und die Mannigfaltigkeit würde sich noch erhöhen, wenn man Poly-oxyaminosäuren als wahrscheinliche Bestandtheile des Eiweisses voraussetzt. Es liegt kein Grund vor, diese Betrachtung weiter auszuspinnen, aber es schien mir doch nöthig, auf die verschiedenen Möglichkeiten hinzuweisen, um allzu einseitigen Anschauungen, die der experimentellen Forschung hinderlich werden können, vorzubeugen.

In dem Aufbau der Proteïne und ihrer verschiedenen complicirten Derivate hat die Natur, soviel wir wissen, ihre höchste chemische Leistung erreicht, und es würde aller Erfahrung der organischen Chemie und der Biologie widersprechen, wenn sie sich hier auf nur wenige Typen beschränkt hätte.

Wie die grosse Zahl der Aminosäuren und ihr stetig wechselndes Mengenverhältniss schon zeigt, besteht in der Zusammensetzung der Proteïne eine ungleich grössere Mannigfaltigkeit als bei den Kohlenhydraten und den Fetten. Wenn dazu nun noch die verschiedenen Möglichkeiten der Bindungsformen kommen, die ich oben angedeutet habe, so erhalten die Proteïne ein chemisches Gepräge, welches den überaus mannigfaltigen Zwecken ebenbürtig ist, zu denen sie von der Natur bei dem Aufbau und den Functionen der Organe benutzt werden.

Was die Eintheilung der Proteïne betrifft, so habe ich den Ausführungen in dem vor 4 Jahren gehaltenen<sup>1)</sup>, trefflichen Vortrag des Hrn. A. Kossel »Ueber den gegenwärtigen Stand der Eiweisschemie« nicht viel zuzufügen. Seine Ansicht, dass die chemische Systematik in erster Linie die bei der totalen Hydrolyse entstehenden Aminosäuren nach Qualität und Quantität berücksichtigen müsse, und dass man erst in viel späterer Zeit mit den Albumosen und Peptonen werde rechnen können, trifft auch jetzt noch zu. Nur ist die Zahl der Monoaminosäuren gewachsen und das Bild von ihrer Verbreitung durch die Resultate der Estermethode wesentlich anders geworden. Sieht man von den Protaminen ab, so übertreffen sie in den Eiweisskörpern an Masse bei weitem die Diaminosäuren, und in einzelnen Gerüstsubstanzen, wie dem Seidenfibroin, bilden gerade die einfachsten unter ihnen, Glykocoll, Alanin, Serin und Tyrosin, die Hauptbestandtheile.

Trotz des ausserordentlich grossen Interesses, welches das massenhafte Vorkommen der Diaminosäuren in den Protaminen für die Bio-

<sup>1)</sup> Diese Berichte 34, 3214 [1901].

logie hat, scheint mir deshalb Kossel's Vorschlag, einen »Protamin-kern« in allen Eiweisskörpern anzunehmen und ihn zum Ausgangspunkt für die chemische Systematik zu machen, doch zu weit zu gehen. Die Möglichkeit, dass die geringen Mengen von Diaminosäuren in dem Seidenfibroin oder einzelnen pflanzlichen Eiweissstoffen nur Verunreinigungen sind, lässt sich nicht bestreiten; denn, wie Kossel selbst ganz richtig hervorgehoben hat, darf man bei den Proteinen eine besonders grosse Neigung zur Bildung von Mischkristallen und sogenannten festen Lösungen annehmen. Aber selbst wenn die Diaminosäuren als Bestandtheile des Moleküls gerechnet werden, so können sie doch in dem Riesencomplex ganz anders vertheilt sein, als in den Protaminen. Jedenfalls existirt bis jetzt keine Beobachtung, die das Gegentheil auch nur andeutet.

Die zuror geschilderten Methoden zum Aufbau der Polypeptide sind so mannigfaltig, dass sie die Gewinnung von zahlreichen und recht complicirten Combinationen der natürlichen Aminosäuren gestatten werden, wenn man Arbeit und Kosten nicht scheut.

Aber die wahllose Vermehrung der Formen würde vielleicht die Mühe nicht lohnen. Wichtiger erscheint mir der Nutzen, den die Erfabrungen in der experimentellen Behandlung der synthetischen Producte für die Auffindung neuer Methoden zur Abscheidung ihrer natürlichen Verwandten aus den Peptonen gewähren. Die Gewinnung des Glycin-*d*-alanin-Anhydrids aus der Seide bietet das erste Beispiel dafür. Mir scheint deshalb die Hoffnung begründet, dass es in nicht allzu ferner Zeit gelingen wird, die wichtigsten Bestandtheile der natürlichen Peptone und selbst der Albumosen zu isoliren und künstlich zu reproduciren. Da es sich aber bei der sehr verschiedenen Zusammensetzung der Proteine um eine grosse Anzahl von Einzelindividuen handelt, so wird schon hier die Arbeit vieler Hände nöthig sein. Ungleich schwieriger gestaltet sich das Problem natürlich für die genuinen Eiweisskörper, denn für ihre Reconstruction aus den ersten Producten der Hydrolyse müssen völlig neue Methoden geschaffen werden, und selbst wenn diese principiell gegeben sind, wird ihre Anwendung in jedem Einzelfalle höchst wahrscheinlich eine langwierige Arbeit sein. Man kann sich deshalb die Frage vorlegen, ob der schliessliche Erfolg der aufgewandten Mühe entsprechen wird. Das hängt meines Erachtens ab von dem Nutzen, den die biologische Forschung daraus ziehen kann, und dieser ist wieder bedingt durch die Art, wie die Synthese verwirklicht wird.

Wenn es heute durch einen glücklichen Zufall, mit Hülfe einer brutalen Reaction, z. B. durch Zusammenschmelzen der Aminosäuren



in Gegenwart eines wasserentziehenden Mittels, gelingen sollte, ein echtes Protein darzustellen, und wenn es weiter möglich wäre, was noch unwahrscheinlicher ist, das künstliche Product mit einem natürlichen Körper zu identificiren, so würde damit für die Chemie der Eiweissstoffe wenig und für die Biologie so gut wie garnichts erreicht sein.

Eine derartige Synthese möchte ich einem Reisenden vergleichen, der im Schnellzug ein Land durchheilt und hinterher kaum etwas darüber berichten kann. Ganz anders gestaltet sich die Lage, wenn die Synthese gezwungen ist, schrittweise vorzugehen und das Molekül Stufe für Stufe aufzubauen, wie es oben für die Polypeptide gezeigt wurde. Dann gleicht sie dem Fussgänger, der Schritt für Schritt mit gespannter Aufmerksamkeit sich den Weg sucht, der viele Wege erproben muss, bis er den rechten gefunden hat. Der lernt auf seiner langen, mühsamen Wanderung nicht allein die Geographie und Topographie des Landes gründlich kennen, sondern wird auch mit der Sprache und Cultur seiner Bewohner vertraut. Wenn er schliesslich sein Ziel erreicht hat, so ist er im Stande, sich in jedem Winkel des Landes zurecht zu finden, und wenn er ein Buch darüber schreibt, so wird dies anderen Leuten auch möglich sein.

Ich möchte es deshalb geradezu als ein Glück ansehen, dass die Synthese genöthigt ist, zahlreiche neue Methoden des Aufbaues, der Erkennung und Isolirung zu schaffen, und Hunderte von Zwischenproducten genau zu studiren, bevor sie zu den Proteinen gelangen kann. Denn diese Methoden werden schliesslich nicht allein dazu dienen, alle Proteine der Natur und noch viel mehr, als sie hervorbrachte, zu erzeugen; sie werden voraussichtlich auch genügen für die Aufklärung der zahlreichen und merkwürdigen Umwandlungsproducte von Proteinen, die als Fermente, Toxine u. s. w. eine so grosse Rolle spielen.

Kurzum, man darf erwarten, dass durch die tiefgehende und weit ausgedehnte synthetische Arbeit das ganze, jetzt noch so dunkle Gebiet chemisches Culturland wird, aus dem die Biologie einen grossen Theil der Hilfsmittel beziehen kann, deren sie zur Lösung ihrer chemischen Aufgaben bedarf.

---