

durch Krystallisation aus verdünntem Alkohol, in welchem das Lactam weniger löslich ist, trennen. Das Methyllactam bildet schöne, weisse, glänzende Nadeln vom Schmp. 238°. In Benzol ist es ziemlich leicht löslich, wie auch in Salzsäure von 15 pCt.

0.3372 g Sbst. (bei 100° getrocknet): 0.3372 g CO<sub>2</sub>, 0.0591 g H<sub>2</sub>O. —  
0.2090 g Sbst. (bei 110° getrocknet): 17 ccm N (21°, 736 mm).

C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O. Ber. C 80.92, H 5.58, N 8.62.  
Gef. » 80.81, » 5.80, » 8.96.

#### Aethyl-Lactam.

Eine Lösung von 30 pCt. Aethylamin in Wasser giebt auf dem soeben beschriebenen Wege das Aethylactam, das aus wasserhaltigem Alkohol in feinen, weissen Nadeln vom Schmp. 203° krystallisirt und im übrigen vollkommen dem Methylhomologen gleicht.

0.1700 g Sbst.: 0.5049 g CO<sub>2</sub>, 0.0884 g H<sub>2</sub>O. — 0.1858 g Sbst.: 13.4 ccm N (18°, 718 mm).

C<sub>23</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O. Ber. C 81.12, H 5.92, N 8.25.  
Gef. » 81.00, » 5.82, » 8.00.

Genf, Universitätslaboratorium, Januar 1906.

### 107. Emil Fischer und Emil Abderhalden: Bildung eines Dipeptids bei der Hydrolyse des Seidenfibroïns.

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

(Eingegangen am 12. Februar 1906.)

Auf der Naturforscher-Versammlung zu Karlsbad im September 1902 hat der Eine von uns (Fischer) einen Vortrag über die Hydrolyse der Proteinstoffe gehalten, der nur im Auszug in der Chemiker-Zeitung vom 4. October 1902, Jhrgg. 26, No. 80, nach einem Autoreferat wiedergegeben ist. Er machte darin die Mittheilung, dass es ihm in Gemeinschaft mit Dr. Bergell gelungen sei, durch combinirte Hydrolyse des Seidenfibroïns mit starker kalter Salzsäure, Trypsin und warmem Barytwasser ein krystallinisches Product zu gewinnen, das zur völligen Reinigung in das  $\beta$ -Naphthalinsulfoderivat verwandelt wurde. Nach der Analyse und dem Resultat der totalen Hydrolyse glaubte er dieses Präparat als die Naphthalinsulfoverbindung eines Dipeptids, und zwar wahrscheinlich des Glycyl-alanins, betrachten zu dürfen. Ein späterer Versuch, denselben Körper durch Synthese zu gewinnen, schlug fehl, denn die beiden synthetischen  $\beta$ -Naphthalinsulfoderivate des Glycyl-*d*-alanins und des *d*-Alanyl-glycins zeigten zwar im allge-

meinen ganz ähnliche Eigenschaften, unterschieden sich aber durch den Schmelzpunkt<sup>1)</sup>. Dazu gesellte sich eine neue Schwierigkeit. Die glücklichen Bedingungen, welche bei dem ersten publicirten Versuch die Gewinnung des analysenreinen Körpers ermöglicht hatten, konnten später nicht mehr genau getroffen werden, und es zeigte sich, dass die  $\beta$ -Naphthalinsulfopräparate bei zahlreichen späteren Hydrolysen stets durch Verbindungen der einfachen Aminosäuren oder der höheren Peptide verunreinigt waren. Da ausserdem Dr. Bergell durch äussere Verhältnisse verhindert wurde, weiter an dieser Untersuchung theilzunehmen, so blieb sie längere Zeit liegen. Wir haben sie aber vor einigen Monaten wieder aufgenommen, nachdem es uns bei einer anderen Arbeit<sup>2)</sup> gelungen war, eine neue Methode für die Abscheidung der Dipeptide aus Gemischen mit Aminosäuren und höheren Peptiden zu finden. Diese beruht auf dem verschiedenen Verhalten der Ester. Sie sind bei den einfachen Aminosäuren leicht flüchtig, und deshalb bequem zu entfernen. Ferner haben die Ester der Dipeptide die Eigenthümlichkeit, rasch in die gut krystallisirenden Diketopiperazine überzugehen, welche verhältnissmässig leicht von den Estern der höheren Peptide getrennt werden können.

Auf diese Weise ist es uns nun gelungen, aus den hydrolytischen Spaltproducten des Seidenfibroïns in reichlicher Menge ein Methyl-

diketopiperazin,  $\text{NH} \begin{array}{c} \text{CH}_2\text{---CO} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{CO---CH.CH}_3 \end{array} \text{NH}$ , zu gewinnen, das identisch

ist mit einem synthetischen Product aus Glykocoll und *d*-Alanin.

Dieses Diketopiperazin entspricht zwei Dipeptiden, dem Glycyl-*d*-alanin und dem *d*-Alanyl-glycin. Wir glauben aber, dass aus dem Seidenfibroïns das Glycyl-*d*-alanin in überwiegender Menge oder vielleicht ausschliesslich gebildet wird, denn bei einigen Versuchen wurde das Gemisch der Spaltungsproducte der längeren Wirkung des Pankreassaftes unterworfen, der nach unserer früheren Beobachtung das *d*-Alanyl-glycin leicht spaltet, und hier war die Menge des später isolirten Anhydrids nicht wesentlich kleiner als dort, wo die Hydrolyse mit Säuren allein durchgeführt wurde.

Um unseren Befund sicher zu stellen, war es natürlich nothwendig, die secundäre synthetische Bildung des obigen Diketopiperazins aus Glykocoll und *d*-Alanin bei dem Isolirungsverfahren auszu-

<sup>1)</sup> Emil Fischer und Peter Bergell: Ueber die Derivate einiger Dipeptide und ihr Verhalten gegen Pankreasfermente. Diese Berichte **36**, 2592 [1903].

<sup>2)</sup> Ueber das Verhalten verschiedener Polypeptide gegen Pankreassaft und Magensaft. Zeitschr. für physiol. Chem. **46**, 52 [1905].

schliessen. Durch die später beschriebenen Controllversuche glauben wir, dies genügend gethan zu haben.

Das Glycyl-*d*-alanin bietet den ersten Fall, wo die Synthese der Polypeptide zusammentrifft mit dem hydrolytischen Abbau der Proteine, und wir können die Versicherung abgeben, dass es uns ohne die synthetischen Erfahrungen nicht gelungen wäre, seine Bildung bei dem analytischen Process zu erkennen. Wir werden selbstverständlich dieselbe Methode anwenden, um andere Dipeptide als Spaltproducte der Proteine aufzusuchen und haben die feste Hoffnung, dass die weitere Ausnutzung der synthetischen Resultate auch dazu führen wird, complicirtere Peptide in dem bisher unentwirrbaren Gemisch, welches man Peptone und Albumosen nennt, zu entdecken.

Da das Seidenfibroin in Wasser unlöslich ist, und deshalb von den Verdauungsfermenten nicht angegriffen wird, so muss die Hydrolyse zunächst mit starken Säuren bewerkstelligt werden. Vermeidet man höhere Temperatur, so ist die Menge der gebildeten Aminosäuren gering, und das Hauptproduct besteht aus peptonartigen Körpern. Ob man dabei rauchende Salzsäure oder 70-procentige Schwefelsäure anwendet, scheint für den Verlauf der Hydrolyse keinen wesentlichen Unterschied zu machen. Wir haben die Schwefelsäure in dem Falle bevorzugt, wo hinterher eine Verdauung durch Pankreassaft stattfinden sollte, weil sie sich bequemer als die Salzsäure entfernen lässt. Eine wesentliche Aenderung in dem Resultate hat sich übrigens bei der nachträglichen Behandlung mit Pankreassaft gegenüber der Wirkung in Säure allein nicht ergeben.

### Experimenteller Theil.

#### Hydrolyse mit Schwefelsäure und Pankreassaft.

250 g Seidenfibroin wurden mit 1500 ccm 70-procentiger Schwefelsäure übergossen. Beim öfteren Umschütteln war nach einigen Stunden klare Lösung eingetreten. Die bräunlich gefärbte Flüssigkeit wurde dann 5 Tage bei 18° aufbewahrt und nun mit etwa der fünffachen Menge kaltem Wasser unter Abkühlung vermischt; dabei scheidet sich in verhältnissmässig kleiner Menge ein Product ab, dessen Eigenschaften an Weyl's Sericoïn<sup>1)</sup> erinnern. Ohne dies zu filtriren, füllten wir jetzt die Schwefelsäure durch einen mässigen Ueberschuss von Barythydrat, trennten dann den dicken Niederschlag von der Flüssigkeit durch Centrifugiren und laugten das Baryumsulfat noch mehrmals mit warmem Wasser aus. Aus dem Filtrat fällten wir den Baryt genau mit Schwefelsäure und verdampften die abermals filtrirte Flüssigkeit unter geringem Druck bis auf etwa 1 L. Die braungelb ge-

<sup>1)</sup> Diese Berichte 21, 1407 [1888].

färbte Flüssigkeit gab eine tiefrote Biuretprobe und bei der Sättigung mit Ammoniumsulfat einen flockigen Niederschlag. Die Gesamtlösung wurde mit 10 ccm activem Pankreassaft versetzt und nach Zugabe von Toluol 8 Tage im Brutraum aufbewahrt. Schon am ersten Tage machte sich die Abscheidung von Tyrosin bemerkbar<sup>1)</sup>. Als schliesslich die Verdauungsflüssigkeit auf Zimmertemperatur abgekühlt war, betrug seine Menge 10 g, mithin 40 pCt. der Quantität, die bei der totalen Hydrolyse des Seidenfibröins erhalten wird. Zum Theil liegt das daran, dass eine erhebliche Menge von Tyrosin in der Flüssigkeit wahrscheinlich durch die anderen Spaltungsproducte zurückgehalten wird, denn beim starken Eindampfen unter vermindertem Druck konnten noch 5 g gewonnen werden. Vielleicht sind aber auch tyrosinhaltige Polypeptide vorhanden, die von dem Pankreasferment nicht vollständig gespalten werden. Beim völligen Verdampfen der Flüssigkeit unter geringem Druck blieb ein braungelber Syrup, der sich in kaltem Wasser zum allergrössten Theil wieder löste. Der geringe, dabei bleibende Rückstand (1.2 g) war wieder Tyrosin, aber ziemlich unrein.

Die wässrige Lösung wurde nun in zwei Hälften getheilt. Wie die Untersuchung einer Probe zeigte, enthielt jede derselben 70 g Trockensubstanz. Von dem Seidenfibröin bis hierher war also schon ein erheblicher Verlust eingetreten, der theils durch den beim Verdünnen der schwefelsauren Lösung entstandenen Niederschlag, theils durch ungenügendes Auswaschen des Baryumsulfats und endlich durch Entfernung des Tyrosins verursacht war.

Die eine Hälfte der wässrigen Lösung, entsprechend 70 g Rückstand, wurde unter geringem Druck zum Syrup verdampft, dann mit 500 ccm absolutem Alkohol übergossen und trockene, gasförmige Salzsäure langsam bis zur Sättigung eingeleitet, sodass die Temperatur 50° nicht überschritt. Nach 14-stündigem Stehen wurde die alkoholische Lösung bei 12 mm Druck aus einem Bade, dessen Temperatur nicht über 35° stieg, verdampft, und die Veresterung genau in der

<sup>1)</sup> Dass das Tyrosin bei der Wirkung des Pankreasfermentes sehr rasch erscheint, haben wir früher schon beim Casein angegeben, wo die Abscheidung bei Bruttemperatur bereits nach mehreren Stunden beginnt und nach 1—2 Tagen beendet ist (vergl. Zeitschr. für physiolog. Chemie 39, 81 [1903]). Dieselbe Erscheinung wurde nochmals von Emil Abderhalden und Béla Reinhold betont (ebenda 41, 284 [1905] und 46, 159 [1905]). Wir können deshalb dem in jüngster Zeit von den HHrn. Adrian John Brown und Edmund Theodore Millar (Proceed. of the chem. Society 21, No. 301 [1905]) aufgestellten Satz, dass man allgemein das Tyrosin als spätes Product der tryptischen Hydrolyse betrachtet habe, nicht beistimmen.

gleichen Weise wiederholt. Dann wurde die Lösung unter denselben Vorsichtsmaassregeln zum Syrup verdampft, der Rückstand in absolutem Alkohol gelöst, und diese Lösung genau auf 250 ccm verdünnt. Nachdem in einer Probe dieser Flüssigkeit der Gehalt an Salzsäure titrimetrisch festgestellt war, wurde sie mit der für das Chlor genau berechneten Menge einer 2 $\frac{1}{2}$ -procentigen Lösung von Natrium in Alkohol versetzt, das Chlornatrium abfiltrirt und die bräunlich gefärbte Mutterlauge bei 10 mm Druck aus einem Bade verdampft, dessen Temperatur zum Schluss auf 65° stieg. Das alkoholische Destillat enthielt kleine Mengen von Aminosäureestern. Es wurde deshalb mit wässriger Salzsäure angesäuert und zur Trockne verdampft. Der Rückstand betrug nur 3 g. Aus ihm konnten 1.5 g Glykocoll-ester-chlorhydrat gewonnen werden. Der übrige Theil war wohl grösstentheils Alanin.

Der beim Abdestilliren des Alkohols und der Aminosäureester zurückgebliebene bräunlich grüne Syrup musste die Ester der Polypeptide und der complicirten Aminosäuren enthalten. Er löste sich zum grössten Theil in warmem. absolutem Alkohol. Das Ungelöste bestand fast nur aus Kochsalz. In die klare, alkoholische Lösung wurde nun unter Vermeidung von Erwärmung trocknes Ammoniakgas bis zur Sättigung eingeleitet, um die Dipeptidester in Diketopiperazine zu verwandeln. Nach sechsstündigem Stehen begann in der dunkel gefärbten, aber klaren Lösung die Bildung eines krystallinischen Niederschlages, der nach weiterem 24-stündigem Stehen abfiltrirt, scharf abgepresst und mit kaltem Alkohol gewaschen wurde. Er gab noch schwach die Biuretprobe und auch Millon's Reaction, färbte sich aber beim Kochen in wässriger Lösung mit Kupferoxyd nur sehr wenig, enthielt also offenbar nur noch kleine Mengen von Aminosäuren oder Polypeptiden. Durch Auskochen mit nicht zuviel trockenem Aceton konnte er von den Substanzen befreit werden, welche die Biuret- und Millon's Probe verursachten. Zur weiteren Reinigung wurde das Product zweimal aus heissem Alkohol unter Zusatz von Thierkohle umkrystallisirt. Es bildete dann feine Nadelchen, welche nach dem Trocknen bei 100° folgende für die Formel  $C_5H_8N_2O_2$  gut stimmende Werthe gab.

0.1959 g Sbst.: 0.3367 g  $CO_2$ , 0.1123 g  $H_2O$ . — 0.1270 g Sbst.: 24.2 ccm N (19°, 766 mm).

$C_5H_8N_2O_2$ . Ber. C 46.88, H 6.25, N 21.88.  
Gef. » 46.87, » 6.37, » 22.1.

Die Verbindung hat nicht allein die gleiche Zusammensetzung, sondern besitzt auch manche äussere Aehnlichkeit mit dem früher beschriebenen inactiven Glycyl-alanin-anhydrid<sup>1)</sup>. So fängt sie

<sup>1)</sup> Emil Fischer und Erich Otto, diese Berichte 36, 2113 [1903].

im Capillarrohr erhitzt, gegen  $235^{\circ}$  an, braun zu werden, und schmilzt zwischen  $240^{\circ}$  und  $242^{\circ}$  (corr.) unter geringer Zersetzung und theilweiser Sublimation. Sie löst sich leicht in Wasser und auch ziemlich leicht in heissem Alkohol und besitzt einen schwach bitteren Geschmack. Von dem eben erwähnten synthetischen Producte unterscheidet sie sich durch die optische Activität.

Eine Lösung, welche in 4.8609 g Wasser 0.2999 g Subst. enthielt, drehte im Decimeterrohr Natriumlicht  $0.24^{\circ}$  nach links.

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -3.9^{\circ}.$$

Dass die Verbindung ein Derivat des Glycyl-*d*-alanins ist, beweist auch das Resultat der Hydrolyse, für welche 1 g mit 5 ccm Salzsäure vom spec. Gewicht 1.19 im geschlossenen Rohr 6 Stunden auf  $100^{\circ}$  erhitzt wurde. Zur Trennung der beiden Aminosäuren, diente wieder die Estermethode. Die Menge des Glykocoll-ester-chlorhydrats betrug 0.8 g, entsprechend 0.43 g Glykocoll.

0.2057 g Subst.: 0.2570 g  $\text{CO}_2$ , 0.1356 g  $\text{H}_2\text{O}$ .

$\text{C}_4\text{H}_{10}\text{NO}_2\text{Cl}$ . Ber. C 34.41, H 7.17.

Gef. » 34.07, » 7.32.

Aus der Mutterlauge wurde das Alanin gewonnen und gab folgende Zahlen:

0.2010 g Subst.: 0.2966 g  $\text{CO}_2$ , 0.1416 g  $\text{H}_2\text{O}$ .

$\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2$ . Ber. C 40.45, H 7.87.

Gef. » 40.24, » 7.83.

Die spezifische Drehung des salzsauren Salzes wurde zu  $+7.8^{\circ}$  gefunden. Es handelt sich also um *d*-Alanin, nur war es nicht ganz rein, sondern enthielt etwa 25 pCt. Racemkörper.

Endlich haben wir noch obiges Anhydrid durch Schütteln mit der für 1.2 Moleküle berechneten Menge *n*-Natronlauge bei gewöhnlicher Temperatur in das Dipeptid zurückverwandelt und hierbei ein Präparat erhalten, welches folgende Zahlen gab:

0.1925 g Subst.: 0.2914 g  $\text{CO}_2$ , 0.1203 g  $\text{H}_2\text{O}$ .

$\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_3\text{N}_2$ . Ber. C 41.09, H 6.85.

Gef. » 41.28, » 6.94.

Wir sind aber der Ansicht, dass es ein Gemisch von zwei Isomeren, die aus dem Anhydrid entstehen können, d. h. von Glycyl-*d*-alanin und von *d*-Alanyl-glycin, war.

Endlich konnten wir noch unser Anhydrid vergleichen mit synthetisch gewonnenem Glycyl-*d*-alanin-anhydrid<sup>1)</sup>. Beim Vermischen

<sup>1)</sup> Diese Verbindung hat Hr. A. Schulze unter meiner Leitung nach bekannter Methode hergestellt. Die Beschreibung der Synthese wird später erfolgen.  
E. Fischer.

beider Präparate zeigte sich keine Veränderung des Schmelzpunktes, auch im Aussehen der Kryställchen und der Löslichkeit war die grösste Aehnlichkeit vorhanden. Eine kleine Differenz zeigte sich nur im Drehungsvermögen, welches bei unserem Präparate etwas geringer war. Das würde sich leicht erklären durch die Beimengung von etwas Racemkörper, der bei der brutalen Aufspaltung des Seidenfibroins durch die starke Säure wohl entstehen kann.

Wir zweifeln also nicht daran, dass unser Product Glycyl-*d*-alanin-anhydrid ist. Die Ausbeute an ganz reinem Präparat betrug 5.2 g für die Hälfte der wässrigen Lösung, die 70 g Trockenrückstand enthielt. In Wirklichkeit ist die Menge des Anhydrids sicher erheblich grösser, denn die Trennung von den anderen Producten der Hydrolyse und die völlige Reinigung ist mit starken Verlusten verbunden.

In der That wird die Ausbeute besser, wenn man aus der wässrigen Lösung erst die complicirteren Substanzen durch Phosphorwolframsäure entfernt. Wir haben für den Zweck einen anderen Theil derselben wässrigen Lösung, die für den obigen Versuch gedient hatte, soweit verdünnt, dass sie nur 1 pCt. Trockenrückstand enthielt, und mit einer 5-procentigen Lösung von Phosphorwolframsäure so lange versetzt, als noch ein Niederschlag entstand. Das Filtrat wurde dann in der üblichen Weise durch Baryt gefällt, der Ueberschuss des Letzteren mit Schwefelsäure genau entfernt, das Filtrat unter geringem Druck zum Syrup verdampft und dieser genau so, wie zuvor beschrieben, nach der Estermethode behandelt. Auf 10 g Trockenrückstand der wässrigen Lösung konnten so 1.2 g reines Glycyl-*d*-alanin-anhydrid isolirt werden.

#### Hydrolyse mit Salzsäure.

30 g Seidenfibroin wurden anfangs unter öfterem Umschütteln mit 90 ccm Salzsäure vom specifischen Gewicht 1.19 übergossen und zuerst 3 Tage bei 18° und schliesslich 4 Tage bei 37° aufbewahrt. Die klare Flüssigkeit war dunkel mit einem Stich in's Violette gefärbt. Sie wurde mit der fünffachen Menge Wasser verdünnt, und die Hauptmenge der Salzsäure durch Eintragen von überschüssigem, fein gepulvertem Kupferoxydul entfernt. Nachdem das gelöste Kupfer durch Schwefelwasserstoff gefällt war, wurde die Flüssigkeit unter geringem Druck zum Syrup verdampft, und dieser nach der Estermethode in der zuvor beschriebenen Weise auf Glycyl-*d*-alanin-anhydrid verarbeitet. Dieses zeigte dieselben Eigenschaften, wie bei dem vorigen Versuche.

0.1308 g Subst.: 0.2244 g CO<sub>2</sub>, 0.0749 g H<sub>2</sub>O.

C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ber. C 46.88, H 6.25.

Gef. » 46.79, » 6.36.

Die Ausbeute an reinem Präparat betrug hier 4.2 g oder 12 pCt. des angewandten Fibröins. Der Versuch beweist also, dass die Bildung dieses Productes unabhängig von der Wirkung des Pankreassaftes ist.

#### Controllversuche.

Um dem Einwande zu begegnen, dass bei der Abscheidung des Glycyl-*d*-alanin-anhydrids eine Synthese aus zuvor gebildetem Glykocoll und *d*-Alanin stattfinden könne, haben wir folgende Versuche angestellt.

1. Je 5 g Glykocoll und Alanin wurden mit Aethylalkohol und Salzsäure verestert, die Lösung unter vermindertem Druck verdampft, der Rückstand wieder in Alkohol gelöst, die Ester mit der berechneten Menge Natriumäthylat in Freiheit gesetzt und die filtrirte, alkoholische Lösung bei 10—15 mm Druck abdestillirt, bis die Temperatur des Bades 65° betrug. Es blieb ein geringer, schmieriger Rückstand, der nur zum kleinen Theil in kochendem Alkohol löslich war. Aus dieser alkoholischen Lösung schied sich nach dem Einleiten von gasförmigem Ammoniak nichts aus. Beim vollständigen Verdampfen betrug der Rückstand 0.4 g, aus dem wir vergeblich versucht haben, Glycyl-alanin-anhydrid abzuscheiden.

2. 20 g fein gepulvertes Glykocoll und 23 g inactives Alanin wurden genau so, wie bei der obigen ersten Hydrolyse des Seidenfibröins in der fünffachen Menge 70-procentiger Schwefelsäure gelöst und 5 Tage bei 18° aufbewahrt. Nachdem dann die Flüssigkeit mit Wasser verdünnt und die Schwefelsäure genau mit Baryt entfernt war, wurde das Filtrat unter vermindertem Druck auf 150 ccm eingeeengt und mit 5 ccm activem Pankreassaft unter Zusatz von Toluol 8 Tage im Brutraum aufbewahrt. Die weitere Verarbeitung der Flüssigkeit geschah dann genau so, wie bei dem obigen Versuche mit Seidenfibröin. Bei der Destillation ging der allergrösste Theil des angewandten Glykocolls und Alanins über, und als Rückstand blieben nur 4 g zurück, von denen nur 1.2 g in kochendem, absolutem Alkohol löslich waren. Aus dieser alkoholischen Lösung gelang es uns durch Einleiten von Ammoniak nicht, Glycyl-alanin-anhydrid abzuscheiden. Es entstand wohl ein ganz geringer Niederschlag, der aber Kupferoxyd mit tiefblauer Farbe löste.

3. Um die weitere Möglichkeit auszuschliessen, dass die übrigen Spaltproducte der Proteine etwa durch katalytische Wirkung ein Zusammentreten von Glykocoll und Alanin zum Dipeptid veranlassen könnten, haben wir das glykocollfreie Casein unter Zusatz von Glykocoll und *d*-Alanin der Hydrolyse durch kalte rauchende Salzsäure unterworfen.

50 g Casein (Hammarsten), 10 g Glykocoll und 10 g *d*-Alanin wurden mit 210 ccm Salzsäure vom spec. Gewicht 1.19 bei 18° übergossen und umgeschüttelt, bis Lösung eingetreten war. Diese Flüssigkeit blieb noch 3 Tage bei 18° stehen, wurde dann bei 10—15 mm Druck eingedampft und nun, wie bei den obigen Versuchen mit Seidenfibröin, auf die Ester verarbeitet. Die beim Abdestilliren der alkoholischen Lösung übergehenden Ester wurden in



der üblichen Weise durch Zusatz von Salzsäure und Verdampfen der Flüssigkeit in die Hydrochlorate der Aminosäuren übergeführt. Die Menge der trocknen Hydrochlorate betrug 24 g, während aus der Quantität der angewandten Aminosäuren 28.7 g sich berechnen. Der nicht flüchtige Theil der Ester wurde dann in alkoholischer Lösung mit Ammoniak behandelt. Auch hier ist es uns nicht gelungen, die Abscheidung eines krystallinischen Productes zu beobachten, und wir halten uns deshalb zu der Behauptung berechtigt, dass auch hier irgendwie erhebliche Mengen von Glycyl-*d*-alanin-anhydrid nicht vorhanden sein konnten.

4. Endlich haben wir noch geprüft, ob bei der Hydrolyse des Seidenfibröins mit 70-procentiger Schwefelsäure und nachfolgender Behandlung mit Pankreassaft erhebliche Mengen von Monoaminosäuren gebildet werden, was schon nach den Resultaten der Veresterung sehr unwahrscheinlich war.

Zu dem Zwecke haben wir die Lösung der hydrolytischen Spaltproducte in der oben schon angegebenen Weise mit Phosphorwolframsäure von den höheren Polypeptiden befreit und nach Entfernung der Phosphorwolframsäure in der üblichen Weise mit  $\beta$ -Naphthalinsulfochlorid und Alkali behandelt. Die hierbei entstehenden, in Wasser unlöslichen  $\beta$ -Naphthalinsulfoderivate bildeten eine zähe, amorphe Masse, von der beim Auskochen mit Aether nur ein kleiner Theil gelöst wurde. Da die Naphthalinsulfoderivate des Glykocolls und des Alanins in Aether leicht löslich sind, so können diese Monoaminosäuren nur in ganz kleiner Menge unter den Spaltproducten des Seidenfibröins nach der Behandlung mit kalter Schwefelsäure und Pankreassaft vorhanden gewesen sein.

Alle diese Beobachtungen sprechen auf das bestimmteste gegen die Möglichkeit einer secundären Bildung des Glycyl-*d*-alanin-anhydrids aus primär entstandenem Glykocoll und *d*-Alanin.

Das Glycyl-*d*-alanin-anhydrid ist übrigens nicht das einzige Diketopiperazin, welches sich aus der alkoholischen Lösung der aus dem Seidenfibröin durch Säurespaltung entstehenden Polypeptide bei der Behandlung mit Ammoniak abscheidet. Es ist uns vielmehr gelungen, aus der letzten Krystallisation einen anderen Körper zu isoliren, der in Wasser schwer löslich ist und die Zusammensetzung eines Glycyl-tyrosin-anhydrids besitzt und bei der Aufspaltung mit Salzsäure Glykocoll und Tyrosin lieferte. Da wir aber den Körper bisher nur in kleiner Menge unter Händen hatten, so wollen wir seine ausführliche Besprechung verschieben, bis seine Constitution durch die Synthese ganz sicher gestellt ist.