

## Synthetische Polypeptide II.

Über das Poly-L-Tyrosin und seine Derivate.<sup>1</sup>

X. Mitteilung über Peptide<sup>2</sup>.

Von

K. Schlögl, F. Wessely und E. Wawersich.

Aus dem II. Chemischen Laboratorium der Universität Wien.

Mit 2 Abbildungen.

(Eingelangt am 28. April 1953. Vorgelegt in der Sitzung am 11. Juni 1953.)

Durch Polymerisation von O-Acetyl-L-tyrosin-N-carbonsäureanhydrid wurde ein Poly-O-Acetyl-L-tyrosin vom mittleren Molgewicht 3800 erhalten, das somit etwa 18 bis 19 Aminosäurereste pro Peptidkette enthält. Alkalische Verseifung lieferte ein Poly-L-Tyrosin, das ausschließlich aus Tyrosinresten aufgebaut ist.

Umsetzung dieses Poly-Tyrosins mit Dimethylsulfat, Dinitrofluorbenzol und Jod ergab ein Poly-O-Methyl-, Poly-O-DNP- und ein Poly-3,5-Dijod-L-tyrosin. Poly-O-DNP-Tyrosin konnte auch durch Polymerisation des entsprechenden N-Carbonsäureanhydrids gewonnen werden.

Ein Poly-Tyrosin ist unseres Wissens in der Literatur erst einmal<sup>3</sup>, jedoch ohne Angaben über Darstellung und Eigenschaften erwähnt. Wir konnten vor einiger Zeit<sup>1</sup> durch Diazotieren und Verkochen eines Poly-p-Aminophenylalanins zu einem Poly-Tyrosin gelangen, das allerdings nur etwa 70% Tyrosinreste enthielt, stark gefärbt, in Lauge unlöslich und daher für weitere Untersuchungen nicht geeignet war.

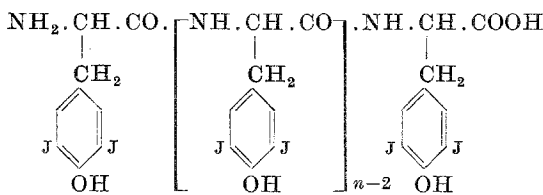
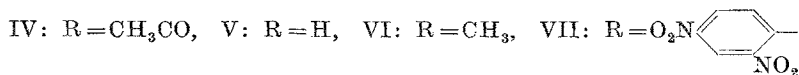
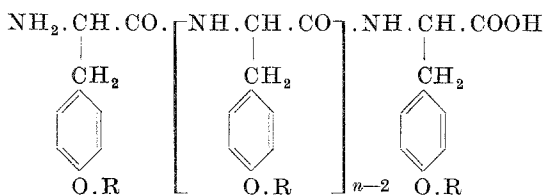
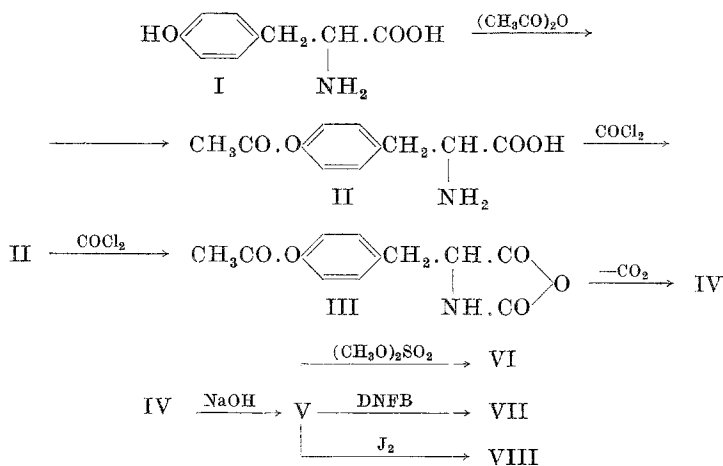
Da jedoch einem einheitlichen Poly-Tyrosin nicht nur wegen der Kenntnis seiner Eigenschaften und der einiger Derivate — etwa in

<sup>1</sup> I.: K. Schlögl, F. Wessely und G. Korger, Mh. Chem. **83**, 845 (1952).

<sup>2</sup> IX. Mittlg.: F. Wessely, K. Schlögl und E. Wawersich, Mh. Chem. **84**, 263 (1953).

<sup>3</sup> W. T. Astbury, C. E. Dalgliesh, S. E. Darmon und G. B. B. M. Sutherland, Nature **162**, 596 (1948). — Nach Abschluß dieser Arbeit kam uns zur Kenntnis, daß E. Katchalski am II. Internat. Biochem. Kongreß [ref. in Angew. Chem. **64**, 650 (1952)] über die Darstellung eines Poly-Tyrosins aus dem O-Cbzo-Tyrosin-N-carbonsäureanhydrid berichtet hatte.

Hinblick auf die Verwandtschaft mit tyrosinreichen Proteinen —, sondern auch im Zusammenhang mit spektrographischen Fragen nicht unwesentliches Interesse zuzukommen schien, stellten wir ein definiertes Produkt sowie einige seiner Derivate auf dem im folgenden skizzierten Weg dar.



VIII

Die Überführung von L-Tyrosin I<sup>4</sup> in sein O-Acetyl-derivat II wurde anfänglich nach *W. Sakami* und *G. Toennies*<sup>5</sup> durch Acetylierung in Perchlorsäure-Eisessig und anschließende Neutralisation mit n-Amyl-

<sup>4</sup> Da alle in dieser Arbeit erwähnten Derivate des Tyrosins sich von der L-Form dieser Aminosäure ableiten, ist im weiteren Text der Einfachheit halber die Bezeichnung -L- weggelassen.

<sup>5</sup> *J. Biol. Chem.* **144**, 203 (1942).

amin ausgeführt. Einfacher und materialsparender — vor allem in Hinblick auf das teure Amylamin — konnten wir II durch Acetylierung des Tyrosin-Kupfer-Komplexes mit Essigsäureanhydrid erhalten. Arbeitet man in genügend konz. Lösung, so fällt der Cu-Komplex von II aus, der dann mit H<sub>2</sub>S zersetzt wird; dabei erhält man II in freier Form, während nach der Methode von *H. Bretschneider* und *K. Biemann*<sup>6</sup> II als Chlorhydrat anfällt.

Das in der Literatur<sup>7</sup> beschriebene und dort aus O-Acetyl-N-Cbz-tyrosin mit PCl<sub>5</sub> erhaltene N-Carbonsäureanhydrid III, das auch — allerdings unreiner — mit SOCl<sub>2</sub> gewonnen werden kann, wurde in üblicher Weise und in ausgezeichneter Ausbeute aus II und Phosgen in Tetrahydrofuran dargestellt und zeigte die beschriebenen Eigenschaften.

Die Polymerisation von III zum Polymeren IV führten wir nach *R. R. Becker* und *M. A. Stahmann*<sup>8</sup> in absol. Dioxan unter Verwendung von definierten Mengen Ammoniak als Starter durch; dabei ist anzunehmen, daß im entstehenden Polymeren IV die endständige Carboxylgruppe als Amid vorliegt, das aber dann bei der weiteren Umsetzung von IV nach V mit NaOH mitverseift werden wird. Allerdings konnten wir bei dieser Polymerisation — während beim Poly-Glutaminsäureester bei einem Molverhältnis Anhydrid/Ammoniak 50 : 1 der Polymerisationsgrad  $n$  80 betrug<sup>9</sup> — in unserem Fall bei gleichem Molverhältnis nur ein  $n$  von 18 bis 19 erreichen, was auf die schwereren Tyrosinreste bzw. auf die schlechte Löslichkeit des Polymeren in Dioxan zurückzuführen sein dürfte.

Das Poly-O-Acetyl-tyrosin IV, dessen Reinigung im exper. Teil näher beschrieben ist, stellt ein lockeres, ganz schwach bräunlich gefärbtes Pulver dar, das sich bis 330° nur verfärbt, ohne zu schmelzen. Es ist in den wichtigsten Lösungsmitteln auch in der Hitze unlöslich und geht nur beim Schütteln mit Lauge nach einiger Zeit unter Verseifung in Lösung. Die Acetyl- und Stickstoffbestimmungen lieferten die erwarteten Werte, während die C-Werte, ebenso wie beim Poly-Tyrosin V, immer um etwa 2 bis 3% zu tief lagen.

Beim Erhitzen mit wäbr. Ninhydrinlösung färben sich die Polymerenteilchen oberflächlich violett. Der Pikrinsäuretest auf Diketo-piperazine<sup>10</sup> war negativ.

Quantitative Hydrolyse des Polymeren trat erst beim Erhitzen mit konz. Salzsäure im Bombenrohr auf 140 bis 150° ein. Im Papierchromato-

<sup>6</sup> *Mh. Chem.* **81**, 647 (1950).

<sup>7</sup> *J. L. Bailey*, *J. Chem. Soc. London* **1950**, 3461.

<sup>8</sup> *J. Amer. Chem. Soc.* **74**, 38 (1952).

<sup>9</sup> *M. Green* und *M. A. Stahmann*, *J. Biol. Chem.* **197**, 771 (1952).

<sup>10</sup> *E. Abderhalden* und *E. Komm*, *Z. physiol. Chem.* **139**, 181 (1924).

gramm des Hydrolysats fand sich nur Tyrosin, während quantitative spektrophotometrische Tyrosinbestimmung 103% d. Th. an Tyrosin ergab.

Das mittlere Molgewicht von IV wurde durch Bestimmung des Amino-stickstoffgehaltes nach *van Slyke* in der von *D. G. Doherty* und *C. L. Ogg*<sup>11</sup> für unlösliche Proteine modifizierten Form zu etwa 3800 ermittelt, was einem  $n$  von 18 bis 19 entspricht. Allerdings schwanken diese Größen bei Produkten, die aus verschiedenen Ansätzen stammen, obwohl die Polymerisation stets unter denselben Bedingungen ausgeführt wurde. So konnten z. B. auch Polymere mit einem  $n$  von etwa 12 erhalten werden.

Wurde nun dieses Poly-O-Acetyl-tyrosin IV vom Molgewicht 3800 15 Min. bei Zimmertemp. mit 0,5  $n$  NaOH geschüttelt, so trat klare Lösung ein und mit HCl konnte das Poly-Tyrosin V ausgefällt werden, das durch Zentrifugieren, Dialysieren der wäbr. Suspension gegen Wasser zur Entfernung niedermolekularer Anteile und Gefrier-trocknung isoliert und gereinigt wurde. Auch bei V handelt es sich wieder um ein lockeres, ganz schwach gelbbraun gefärbtes Pulver, das seine Farbe auch bei längerem Liegen an der Luft zum Unterschied von dem früher<sup>1</sup> erhaltenen Produkt nicht ändert. Beim Kochen mit wäbr. Ninhydrinlösung färben sich wieder nur die Teilchen oberflächlich violett; die *Millonsche* Probe ist — wohl wegen der Unlöslichkeit der Substanz — negativ. Ebenso negativ ist der Pikrinsäuretest. Ab 250° tritt allmähliche Braunfärbung ein und bei 340° ist die Substanz dunkelbraun, aber sonst noch unverändert. V löst sich in Lauge schon in der Kälte unter schwacher Gelbfärbung, ebenso in kaltem Dimethylformamid. In Pyridin und konz. Schwefelsäure tritt erst beim Erwärmen Lösung ein.

Hydrolyse unter den gleichen Bedingungen wie bei IV und Chromatographie des Hydrolysats gab wieder nur Tyrosin, während quantitative Bestimmung dieser Aminosäure den erwarteten Wert (100,5% d. Th.) lieferte.

Das mittlere Molekulargewicht wurde zu etwa 3400 ermittelt ( $n = 20$  bis 21), was in Übereinstimmung mit den entsprechenden Werten für IV steht.

Das Poly-Na-Salz konnte aus der Lösung von V in NaOH mit Äthanol gefällt werden; es enthielt 90% d. Th. Natrium. Die Lösung des Natrium-salzes ist am Papier mit diazotierter Sulfanilsäure gut anfärbbar.

Wichtig für die Charakterisierung des Poly-Tyrosins schien seine optische Aktivität. Für die Feststellung, ob und in welchem Maße bei der Darstellung Racemisierung eingetreten war, mußte die Drehung des bei der Hydrolyse erhaltenen Tyrosins maßgebend sein. Die aus IV und V mit HCl erhaltenen Hydrolysate waren aber in allen Fällen optisch

<sup>11</sup> Ind. Eng. Chem., Analyt. Ed. 15, 751 (1943).

inaktiv. Es tritt jedoch, wie wir feststellen konnten, unter den hier notwendigen Hydrolysebedingungen (6 bis 7 Stdn., 140 bis 150°) auch schon beim freien Tyrosin praktisch völlige Racemisierung ein, so daß der obige Befund seine Beweiskraft verliert.

Da jedoch das Poly-Tyrosin in *n* NaOH eine Drehung von  $[\alpha]_D = +17,2^\circ$  aufweist — das als Ausgangsmaterial verwendete Tyrosin zeigte in HCl eine Drehung von  $[\alpha]_D = -16,3^\circ$ , in *n* NaOH ein  $[\alpha]_D$  von  $-15,1^\circ$  —, steht fest, daß jedenfalls keine vollständige Racemisierung eingetreten sein konnte. Inwieweit eine solche aber überhaupt und in welchem Maße sie vorliegt, kann damit nicht festgestellt werden.

Die Drehung von V in alkalischer Lösung (*n* NaOH) sinkt nun, wie Tab. 1 zeigt, sehr langsam ab, so daß Racemisierung bei der alkalischen Verseifung von IV nach V nicht anzunehmen ist.

Über UV-spektrographische Untersuchungen des Poly-Tyrosins und die dabei erhaltenen Ergebnisse wird von Herrn Doz. Dr. *E. Schauenstein* an anderer Stelle berichtet werden.

Wir haben noch zum Vergleich mit Tyrosin die UR-Spektren der beiden Substanzen aufgenommen<sup>12</sup>, die in Abb. 1 wiedergegeben sind.

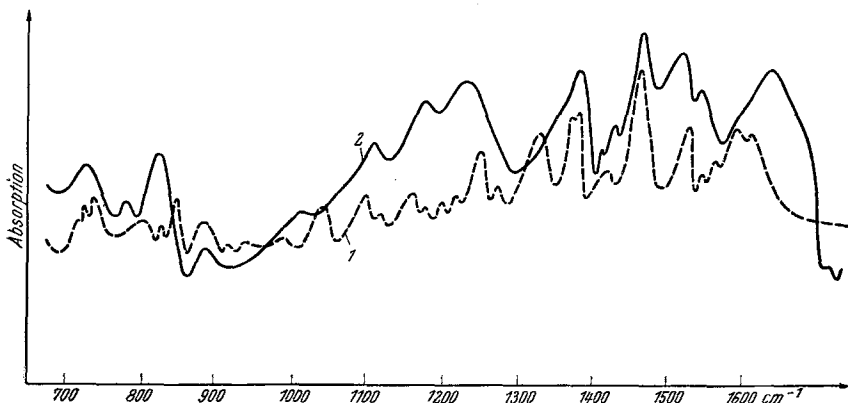


Abb. 1. UR-Spektren von Tyrosin (1) und Poly-Tyrosin (2).  
Aufgenommen in Paraffinöl mit UR-Spektrographen Perkin-Elmer 12 C.

Zur weiteren Charakterisierung des Poly-Tyrosins stellten wir das Poly-O-Methyl-tyrosin VI durch Methylierung von V mit Dimethylsulfat in alkalischer Lösung dar. Schon nach kurzem Schütteln fiel

<sup>12</sup> Die Aufnahmen der Spektren verdanken wir Herrn Dr. *J. Derkosch*.

Tabelle 1. Absinken von  $[\alpha]_D$  einer Lösung von V in *n* NaOH (*c* = 1,85). Z.-Temp. (20°).

Zeit in Tagen	$[\alpha]_D$
0	+ 17,2
1	+ 14,8
2	+ 12,4
3	+ 11,0
6	+ 10,5
12	+ 8,1

der in Lauge unlösliche Poly-Äther aus und wurde wieder durch Zentrifugieren, Dialysieren und Gefriertrocknung isoliert und gereinigt. Das weiße, sehr lockere Pulver ist bis auf warme konz. Schwefelsäure in allen gebräuchlichen Lösungsmitteln unlöslich. Methoxylbestimmung zeigte, daß quantitative Methylierung eingetreten war.

Für Hydrolyseversuche und papierchromatographische Prüfung der Hydrolysate benötigten wir als Vergleichssubstanz das O-Methyl-tyrosin.

Dieses ließ sich nach dem in der Literatur<sup>13</sup> angegebenen Verfahren (Methylierung von N-Acetyl-tyrosin mit Dimethylsulfat und anschließende Verseifung) nicht befriedigend gewinnen, weshalb wir die Methylierung des N-Acetyl-tyrosins mit Diazomethan vornahmen. Auch hier verläuft die Methylierung nur mit mäßigen Ausbeuten, doch läßt sich der erhaltene O-Methyl-N-acetyl-tyrosin-methylester vom nicht methylierten Produkt viel leichter abtrennen als das O-Methyl-N-acetyl-tyrosin bei der Methylierung mit Dimethylsulfat. Der erwähnte Ester konnte alkalisch zum bekannten O-Methyl-N-acetyl-tyrosin verseift werden, das die in der Literatur<sup>13</sup> beschriebenen Eigenschaften besaß. Beide Produkte gaben bei saurer Hydrolyse das gewünschte O-Methyl-tyrosin, das allerdings von 205 bis 207° schmolz, während die Angaben in der Literatur von 235<sup>14</sup> bis 265<sup>13</sup> schwanken. Da aber unser Produkt einerseits die geforderten Analysenwerte ergab, andererseits sich papierchromatographisch mit dem durch Methylierung mit Dimethylsulfat gewonnenen Produkt, das immer etwas mit Tyrosin verunreinigt war, als identisch erwies, kann kein Zweifel am Vorliegen der gewünschten Verbindung bestehen.

Überdies haben wir noch das UV-Spektrum in saurer Lösung aufgenommen, das in Abb. 2 zusammen mit den Spektren von O-Acetyl-tyrosin, O-DNP-Tyrosin und Tyrosin (alle in  $n/10$  HCl) wiedergegeben ist. Das Spektrum der O-Methylverbindung ist, wie das aus Analogie (Phenol-Anisol) zu erwarten war, dem des Tyrosins sehr ähnlich, während die Substitution durch Acetyl eine analoge Verschiebung wie von Phenol nach Phenylacetat bewirkt.

Das Polymere VI erwies sich einerseits gegen Hydrolyse sehr beständig — so war es nach 20stündigem Kochen mit 5 n H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und 12stündigem Erhitzen mit Barytwasser noch unverändert —, andererseits fand sich aber im Hydrolysat mit konz. HCl (4 Stdn., 140°) nur Tyrosin, was quantitative Ätherspaltung beweist. Auch nach Druckhydrolyse mit 5 n H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> lagen nur Spuren O-Methyl-tyrosin neben viel Tyrosin vor. Erst nach Lösen in warmer konz. Schwefelsäure, Verdünnen mit Wasser und 5stündigem Kochen der klaren Lösung fand sich im Papierchromatogramm nur mehr O-Methyl-tyrosin.

<sup>13</sup> P. Karrer, Helv. Chim. Acta 5, 469 (1922). — L. D. Behr und H. T. Clarke, J. Amer. Chem. Soc. 54, 1630 (1932).

<sup>14</sup> W. J. Boyd und W. Robson, Biochemic. J. 29, 546 (1935).

Da, besonders nach Arbeiten von *H. Zahn* und *A. Würz*<sup>15</sup> über die Dinitrophenylierung des Seidenfibroins, ein Poly-O-DNP-Tyrosin VII von Interesse schien, wurde auch dieses, teils durch Umsetzung von V mit DNFB, teils durch Polymerisation eines aus O-DNP-Tyrosin mit Phosgen gewonnenen O-DNP-Tyrosin-N-carbonsäureanhydrids dargestellt.

Im ersten Fall waren entsprechend der Gewichtszunahme etwa 80% der OH-Gruppen blockiert worden, während das durch Polymerisation

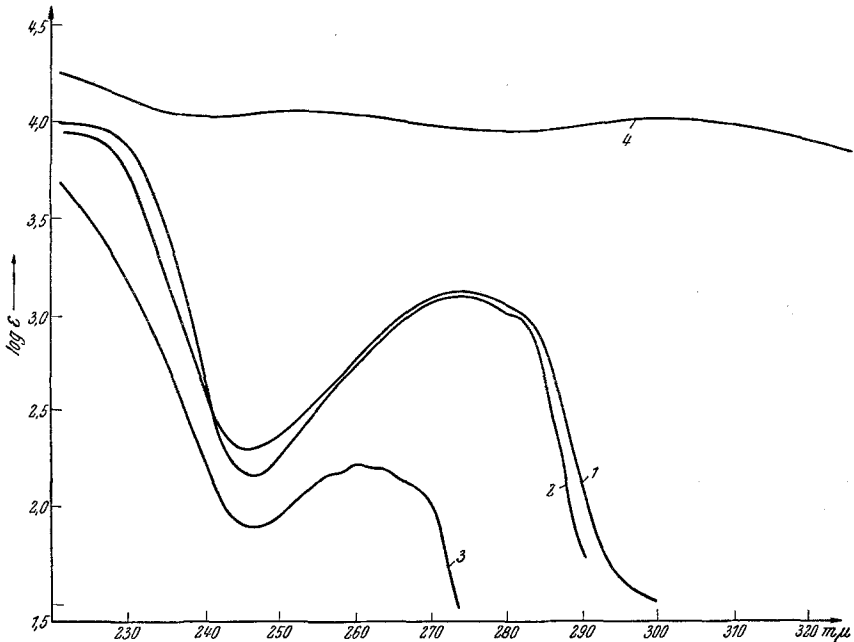


Abb. 2. UV-Spektren von Tyrosin und O-substituierten Derivaten in 0,1n HCl.  
Beckman-Spektrophotometer, Modell DU.

1: Tyrosin, 2: O-Methyl-tyrosin, 3: O-Acetyl-tyrosin, 4: O-DNP-Tyrosin.

gewonnene Produkt sämtliche OH-Gruppen veräthert hatte. Das Molekulargewicht dieses Polymeren betrug etwa 4800, was einem  $n$  von 14 bis 15 entspricht. Ansonsten besaßen beide Produkte praktisch dieselben Eigenschaften. Sie stellten gelbliche Pulver dar, verfärbten sich bis  $340^\circ$  nach Dunkelbraun und waren bis auf warme konz. Schwefelsäure in keinem der üblichen Lösungsmittel löslich. Beim Erhitzen mit Lauge färbte sich die Lauge gelb, ohne daß Lösung eintrat.

Gegen Hydrolyse sind beide Polymere überaus stabil. Nach 24stündigem Kochen mit 5 n  $H_2SO_4$  liegen sie noch unverändert vor, während mehrstündiges Erhitzen mit konz. HCl auf  $150^\circ$  nur zu starker Dunkel-färbung führt, ohne daß Lösung eintritt.

<sup>15</sup> Biochem. Z. 322, 327 (1952).

Als letztes Derivat des Poly-Tyrosins wurde das Poly-3,5-Dijod-tyrosin VIII dargestellt, das aus Analogie zu biologisch wichtigen Jod-Tyrosin-Derivaten von größerem Interesse schien.

VIII ließ sich leicht durch Jodierung von V in alkalischer Lösung mit elementarem Jod erhalten und wurde durch Zentrifugieren, Dialysieren, Gefriertrocknung und anschließende Ätherextraktion gereinigt. Entsprechend der Jodbestimmung waren 2 Atome Jod pro Tyrosinrest eingetreten; Hydrolyse mit Barytwasser und Papierchromatographie des Hydrolysats zeigte das ausschließliche Vorliegen von 3,5-Dijod-tyrosin.

Bei VIII handelt es sich um ein gelbliches Pulver, das sich ab etwa 210° zersetzt und weit besser löslich als die übrigen Poly-Tyrosinderivate ist. So ist es schon in kaltem Pyridin und Tetrahydrofuran glatt löslich und löst sich beim Erwärmen in Dimethylformamid und Lauge. Beim Erhitzen mit konz. Schwefelsäure entweichen Joddämpfe.

Zur Charakterisierung der im Laufe dieser Arbeit erhaltenen Tyrosinderivate leistete, wie mehrfach erwähnt, die Papierchromatographie gute Dienste. Tabelle 2 zeigt die  $R_F$ -Werte einiger Verbindungen, die mit dem früher erwähnten<sup>16</sup> Lösungsmittelgemisch n-Butanol-Äthanol-konz. Ammoniak-Wasser (4 : 4 : 1 : 1) auf Schleicher-Schüll 2043 b (rauh) bestimmt wurden. Zum Nachweis der N-substituierten, mit Ninhydrin nicht anfärbbaren Verbindungen wurden Umbelliferon bzw. 4-Methylumbelliferon als Fluoreszenzindikatoren herangezogen, die sich schon zum Nachweis verschiedener Gruppen organischer Säuren am Papier sehr gut bewährt hatten<sup>2, 16, 17</sup>.

Tabelle 2.  $R_F$ -Werte von Tyrosin-derivaten, absteigend, SS 2043 b (rauh).

Verbindung	Lösungsmittel		Nachweis
	Butanol- Äthanol- NH <sub>3</sub>	Butanol- Eisessig-H <sub>2</sub> O	
Tyrosin .....	0,27	0,37	} Ninhydrin
3,5-Dijod-tyrosin .....	0,20	0,69	
O-Acetyl-tyrosin .....	0,27	0,53	
O-Methyl-tyrosin .....	0,49	0,52	
O-DNP-Tyrosin .....	0,65	Streifen <sup>18</sup>	
N-Acetyl-tyrosin .....	0,41	—	} 4-Methyl-umbelliferon
N-Cbzo-Tyrosin .....	0,68	—	
O-Methyl-N-acetyl-tyrosin .	0,56	—	

<sup>16</sup> K. Schlögl, A. Siegel und F. Wessely, Z. physiol. Chem. 291, 265 (1952).

<sup>17</sup> K. Schlögl und A. Siegel, Mikrochem. 40, 202 (1953). — A. Siegel und K. Schlögl, ibid. 40, 383 (1953).

<sup>18</sup> Während O-DNP-Tyrosin mit dem ammoniakalischen Gemisch runde Flecke gibt, tritt mit dem sauren Gemisch immer starke Streifenbildung auf.



Das O-Acetyl-tyrosin kann mit dem ammoniakalischen Gemisch nicht chromatographiert werden, da es dabei zu Tyrosin verseift wird. Es sind daher in der Tabelle 2 auch die  $R_F$ -Werte unter Verwendung von Butanol-Eisessig-Wasser (4 : 1 : 5) als Lösungsmittel angegeben.

### Experimenteller Teil.

#### *O-Acetyl-tyrosin (II).*

2,2 g Tyrosin-chlorhydrat wurden in 80 ml heißem Wasser gelöst, mit 2,4 g  $\text{CuCO}_3$  und 6,3 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  versetzt, zum Sieden erhitzt, von nicht umgesetztem  $\text{CuCO}_3$  filtriert und in das gekühlte Filtrat unter Rühren 5 g (5 Mol) Essigsäureanhydrid eingetropfelt. Es wurde dann noch 1 Std. bei Zimmertemp. gerührt, der ausgefallene Cu-Komplex abzentrifugiert, mit eiskaltem Wasser 3mal gewaschen, hierauf in 50 ml heißem Wasser suspendiert und mit  $\text{H}_2\text{S}$  zersetzt. Das Filtrat vom  $\text{CuS}$  wurde im Vak. eingedampft und lieferte als Rückstand 1,2 g (54% d. Th.) O-Acetyl-tyrosin vom Schmp. 212 bis 215°<sup>19</sup>. Nach Umlösen aus 50%igem Äthanol lag der Schmp. bei 213 bis 215° (die Literatur<sup>5</sup> gibt 213 bis 214° an). Keine Depression im Mischschmp. mit dem nach<sup>5</sup> dargestellten Produkt. Die beiden Substanzen erwiesen sich auch im Papierchromatogramm als identisch.

#### *O-Acetyl-tyrosin-N-carbonsäureanhydrid (III).*

8,4 g II suspendierten wir in 120 ml absol. Tetrahydrofuran und leiteten bei 40° unter Rühren Phosgen ein. Nach 1½ Stdn. war Lösung eingetreten. Abdampfen des Lösungsmittels im Vak. und 2maliges Umkristallisieren des festen Rückstandes aus absol. Essigester-absol. Petroläther lieferte 8,1 g (90% d. Th.) Anhydrid vom Schmp. 122 bis 123° (Zers.) (Lit.-Schmp.<sup>7</sup> 120°).

#### *Poly-O-Acetyl-tyrosin (IV).*

7,9 g III wurden in 75 ml absol. Dioxan gelöst und mit einer Lösung von 10,4 mg Ammoniakgas (0,02 Mol) in 10 ml absol. Dioxan versetzt. Es trat rasch Trübung ein und nach 1 Std. Stehen bei Zimmertemp. erhitzten wir noch 40 Stdn. unter Feuchtigkeitsausschluß am siedenden Wasserbad. Es hatte sich ein dichter gallertiger Niederschlag abgeschieden. Nun wurde mit 31 ml n HCl (1 Mol bezogen auf III) und 50 ml Wasser versetzt und 3 Stdn. auf der Maschine geschüttelt. Nach Zentrifugieren und oftmaligem Waschen mit Wasser und Äthanol wog der getrocknete Rückstand 5,7 g (88% d. Th.).

Zur weiteren Reinigung wurde er noch gut gepulvert, in n HCl aufgeschlämmt, abgesaugt, gut mit Wasser und Äthanol gewaschen und je 2mal mit je 50 ml absol. Äthanol und absol. Essigester ausgekocht. Das hellbräunliche Pulver verfärbt sich bis 330° ohne zu schmelzen. Löslichkeiten siehe allg. Teil. Pikrinsäuretest negativ.

$(\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{O}_3\text{N})_{18} \cdot \text{H}_2\text{O}$  (MG = 3711).

Ber. C 64,08, H 5,43,  $\text{COCH}_3$  20,87, N 6,79,  $\text{N}_{\text{NH}_2}$  0,377.

Gef. C 62,71, H 5,48,  $\text{COCH}_3$  21,14, N 6,81,  $\text{N}_{\text{NH}_2}$  0,370.

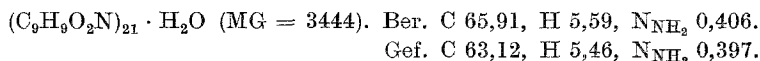
<sup>19</sup> Alle Schmelzpunkte dieser Arbeit wurden im Mikroschmelzpunktsapparat nach *Kofler* bestimmt.

*Hydrolyse von IV.*

192,6 mg IV wurden mit 5 ml konz. HCl im Vak. eingeschmolzen und 7 Stdn. auf 150° erhitzt. Die klare, schwach braune Lösung wurde auf 10 ml aufgefüllt und ein aliquoter Teil davon nach entsprechender Verdünnung zur spektrophotometrischen Tyrosinbestimmung verwendet. Gef. 103% d. Th. Papierchromatographie des Hydrolysats gab nur Tyrosin.  $[\alpha]_D = 0^\circ$ .

*Poly-Tyrosin (V).*

3 g IV wurden mit 60 ml 0,5 n NaOH (2 Mol) 15 Min. bei Zimmertemp. geschüttelt, von Spuren Ungelöstem filtriert und mit konz. HCl schwach angesäuert. Der gallertige Niederschlag wurde abzentrifugiert, mehrfach mit Wasser gewaschen und die wäßr. Suspension im Cellophanschlauch 24 Stdn. gegen dest. Wasser, das mehrfach gewechselt wurde, bei + 4° dialysiert. Anschließend wurde der Schlauchinhalt der Gefriertrocknung unterworfen. Ausbeute: 1,8 g (76% d. Th.) schwach gelbliches Pulver, das sich ab 250° verfärbt und bei 340° noch nicht geschmolzen ist. *Millonsche* Reaktion und Pikrinsäuretest negativ. Löslichkeiten siehe allg. Teil.

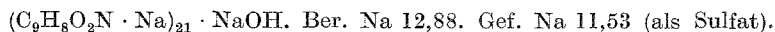


Die Substanz war zur Analyse 10 Stdn. bei 100° und 0,001 Torr über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> getrocknet worden.

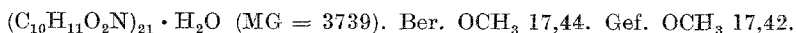
$$[\alpha]_D^{20} = + 17,2^\circ \quad (\alpha = + 0,64^\circ, \text{ 2 dm, } c = 1,856 \text{ in n NaOH}).$$

Die Hydrolyse erfolgte, wie bei IV angegeben. Tyrosin wurde spektrophotometrisch bestimmt. Gef. 100,5% d. Th. Im Papierchromatogramm lag nur Tyrosin vor, die Drehung des Hydrolysats war 0.

Zur Darstellung des *Poly-Na-Salzes* wurde V in 1 Mol n NaOH gelöst und mit einem Überschuß von Äthanol das Na-Salz ausgefällt. Es konnte durch Zentrifugieren abgetrennt werden und stellte nach dem Trocknen ein bräunliches, leicht wasserlösliches Pulver dar.

*Poly-O-Methyl-tyrosin (VI).*

0,20 g V lösten wir in 3,6 ml n NaOH (3 Mol) und schüttelten mit 0,45 g (3 Mol) Dimethylsulfat 1/2 Std. Bereits nach etwa 10 Min. fiel ein gallertiger Niederschlag, worauf noch 5 ml Wasser zugesetzt wurden. Nach weiterem Verdünnen mit Wasser wurde zentrifugiert und weiter wie bei V angegeben, aufgearbeitet. Ausbeute: 0,18 g (83% d. Th.) lockeres farbloses Pulver von den im allg. Teil angegebenen Eigenschaften.



*Hydrolyse.* a) Beim 20stünd. Kochen mit 5 n H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und 12stünd. Erhitzen mit Barytwasser keine Lösung.

b) Konz. HCl, 4 Stdn. 140°. Papierchrom.: Nur Tyrosin.

c) 5 n H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 6 Stdn. 150°. Papierchrom.: Tyrosin, Spuren O-Methyltyrosin.

d) Lösen (zirka 30 mg) in 1 ml warmer konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Zugabe von 3 ml Wasser, 5 Stdn. kochen. Papierchrom.: Nur O-Methyltyrosin.

*O-Methyl-N-acetyl-tyrosin-methylester.*

3 g N-Acetyl-tyrosin wurden in 25 ml absol. Methanol gelöst und mit einer ätherischen Diazomethanlösung bis zur bleibenden Gelbfärbung versetzt. Nach 5 Stdn. wurden die Lösungsmittel abgedampft und der Rückstand im Kugelrohr destilliert. Bei 0,002 Torr gingen von 140 bis 150° Luftbadtemp. 1,2 g rasch erstarrendes Öl über, das keine *Millon*-Reaktion gab und das, aus Methanol-Äther-Petroläther umgelöst, von 106 bis 108° schmolz. Bis 190° gingen noch 0,8 g nicht erstarrendes Öl über, das deutliche *Millon*-Reaktion zeigte. Es wurde in Essigester aufgenommen und mit n NaOH 2mal durchgeschüttelt. Aus der so behandelten Essigesterlösung ließen sich noch 0,35 g Substanz vom Schmp. 105 bis 108° gewinnen. Gesamtausbeute: 1,55 g (45% d. Th.).

$C_{13}H_{17}O_4N$ . Ber. C 62,13, H 6,82,  $OCH_3$  24,70.  
Gef. C 61,94, H 6,55,  $OCH_3$  24,45.

*O-Methyl-N-acetyl-tyrosin.*

0,3 g des Methylesters wurden mit 1,2 ml n NaOH (1 Mol) und 5 ml Methanol 1 Std. am Wasserbad erhitzt, anschließend das Methanol im Vak. verdampft, 1mal mit Äther ausgeschüttelt und nach Ansäuern erneut 2mal mit Essigester und Äther ausgeschüttelt. Die abgedampften Lösungsmittel lieferten 0,26 g (92% d. Th.) erstarrenden Rückstand.

Aus Äthanol-Äther-Petroläther Prismen. Schmp. 149 bis 151°. [Lit.-Schmp.<sup>13</sup> 147 bis 148° (*Karrer*), 150 bis 151° (*Behr* und *Clarke*)].

$C_{12}H_{15}O_4N$ . Ber.  $OCH_3$  13,08, Äqu.-Gew. 237,2.  
Gef.  $OCH_3$  13,04, Äqu.-Gew. 239,5 (Titr.).

*O-Methyl-tyrosin.*

a) Aus *O-Methyl-N-acetyl-tyrosin-methylester*.

0,5 g Ester wurden mit 10 ml HCl (1 : 3) 4 Stdn. unter Rückfluß gekocht, die Salzsäure im Vak. vertrieben, der über KOH getrocknete Rückstand in wenig Wasser gelöst und mit Ammoniak das *O-Methyl-tyrosin* gefällt. Aus Wasser Blättchen. Schmp. 205 bis 207° (Zers.). Ausbeute 0,28 g (71% d. Th.).

$C_{10}H_{13}O_3N$ . Ber. C 61,53, H 6,71,  $OCH_3$  15,90.  
Gef. C 61,61, H 6,66,  $OCH_3$  16,15.

b) Aus *O-Methyl-N-acetyl-tyrosin*.

Die Verseifung erfolgte wie beim Ester beschrieben, nur daß hier 2 Stdn. erhitzt wurde. Ausbeute 60% d. Th. *O-Methyl-tyrosin* vom Schmp. 205 bis 207°. Keine Depression im Mischschmp. mit dem nach a) gewonnenen Produkt. Auch papierchromatographisch erwiesen sich die beiden Substanzen als identisch.

*Poly-O-DNP-Tyrosin (VII).*

a) Durch Umsetzung von V mit DNFB.

0,256 g V wurden in 3 ml n NaOH gelöst, mit 6 ml Wasser verdünnt und mit  $CO_2$ -Schnee das Poly-Tyrosin in fein verteilter Form wieder ausgefällt. Nach Zusatz von 0,66 g  $NaHCO_3$  (5 Mol) und 1,5 g (5 Mol) DNFB in 60 ml Äthanol wurde unter kräftigem Rühren mit einem Vibro-Mischer 8 Stdn. auf 40° erwärmt. Nach Stehen über Nacht wurde zentrifugiert, mehrfach

mit Wasser und Äthanol gewaschen und der Niederschlag anschließend noch 30 Stdn. mit Äther extrahiert. Das trockene Polymere wog 0,467 g, während sich für eine quantitative Umsetzung 0,517 g berechnen. Es waren also etwa 80% der OH-Gruppen blockiert worden. Löslichkeit und übrige Eigenschaften siehe allg. Teil.

b) Durch Polymerisation.

*O-DNP-tyrosin-N-carbonsäureanhydrid.*

1,9 g O-DNP-Tyrosin, dargestellt nach <sup>15</sup>, wurden in 35 ml absol. Tetrahydrofuran suspendiert, unter Rühren bei 40° Phosgen eingeleitet und die nach 1/2 Std. bereits klare Lösung im Vak. zur Trockene gedampft. Aus Essigester-Petroläther (absol.) kristallisierten 2,0 g (97% d. Th.) des Anhydrids in Form schwach gelblicher Körnchen. Das Produkt, das mit Anilin lebhaftes CO<sub>2</sub>-Entwicklung gibt, schäumt bei 139 bis 142° auf und geht, ohne ganz durchzuschmelzen, in ein festes Produkt über, das sich bis 300° nur verfärbt.

C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>O<sub>8</sub>N<sub>3</sub>. Ber. C 51,48, H 2,97. Gef. C 51,73, H 3,30.

*Polymerisation.*

1,2 g Anhydrid wurden in 25 ml absol. Dioxan gelöst und mit 4 ml einer Lösung von Ammoniakgas in absol. Dioxan versetzt, die 0,06 mMol NH<sub>3</sub> enthielt (Molverhältnis Anhydrid/NH<sub>3</sub> = 50:1). Die weitere Reaktion und Aufarbeitung erfolgte wie bei IV angegeben.

Ausbeute 0,8 g (75% d. Th.) gelbbraunes Pulver von den im allg. Teil angegebenen Eigenschaften.

*Poly-3,5-Dijod-tyrosin (VIII).*

0,20 g V lösten wir in 3,6 ml n NaOH (3 Mol) und versetzten unter Schütteln bei 0° in kleinen Portionen mit 0,62 g (2 Mol) fein gepulvertem Jod. Gegen Ende der Zugabe fiel ein dichter gallertiger Niederschlag, worauf noch 3 ml Wasser zugesetzt wurden. Nachdem insgesamt 1/2 Std. geschüttelt worden war, wurde mit einigen Tropfen HCl eben angesäuert, der Niederschlag zentrifugiert, gut mit Wasser gewaschen, dann die wäßr. Suspension 24 Stdn. gegen dest. Wasser dialysiert und hierauf gefriergetrocknet. Zur Entfernung von noch immer anhaftendem Jod wurde die trockene Substanz noch 24 Stdn. mit Äther extrahiert. Ausbeute 0,35 g (69% d. Th.) gelbliches Pulver. Eigenschaften siehe allg. Teil.

(C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>O<sub>2</sub>NJ<sub>2</sub>)<sub>21</sub> · H<sub>2</sub>O (MG = 8731). Ber. J 61,05. Gef. J 58,56  
für Poly-Monojod-tyrosin 43,94.

Die *Hydrolyse* von VIII erfolgte durch 8stündiges Kochen mit heißgesättigtem Barytwasser. Das Ba<sup>++</sup> wurde mit n H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ausgefällt, der Niederschlag gut mit heißem Wasser gewaschen und das eingeengte Filtrat papierchromatographiert. Es fand sich nur 3,5-Dijod-tyrosin (siehe Tabelle 2).

Die Mikroanalysen wurden von Herrn Dr. G. Kainz im Mikrolaboratorium des II. Chemischen Institutes ausgeführt.

Für die Überlassung von Mitteln haben wir der Fa. Hoffmann-La Roche, Wien, zu danken.